



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Pediatria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Medicina dello sviluppo e Scienze
della Programmazione

INDIRIZZO: Ematologia e Immunologia

CICLO XXI

**ALTERAZIONI DEL GENOMA E DELL'ESPRESSIONE GENICA
NEL MEDULLOBLASTOMA:**

ANALISI DI CARATTERISTICHE MODULANTI L'AGGRESSIVITÀ

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Supervisore: Dr. Angelo Rosolen

Dottorando: Massimiliano De Bortoli

Alla mia Famiglia

SOMMARIO

Il medulloblastoma è il più frequente tumore cerebrale maligno. Nonostante miglioramenti importanti, la prognosi dei pazienti affetti è ancora sfavorevole, soprattutto in caso di malattia metastatica o malattia in progressione o in recidiva. Inoltre, la prognosi dei lungo-sopravvissuti è pesantemente condizionata dagli effetti collaterali della chemioterapia e della radioterapia. Una miglior comprensione dei meccanismi biologici che sottendono alla trasformazione maligna e al comportamento aggressivo del medulloblastoma potrà permettere una migliore stratificazione dei pazienti e una modulazione conseguente della terapia.

Il mio lavoro sul medulloblastoma è stato finalizzato alla caratterizzazione citogenetica del tumore, individuando le alterazioni cromosomiche più frequenti, con delezione di 17p, 16q, 10q, 8p, o guadagno di 17q, 7q o 2p. Abbiamo mostrato come il guadagno del braccio lungo del cromosoma 8 (8q) sia significativamente associato alla prognosi ($p = 0,0141$), ma questo dato non era interamente attribuibile a amplificazioni o espressione di *MYC*. L'analisi dell'espressione genica di tumori che mostravano guadagno di 8q, ha permesso di individuare tre geni che mappano sulla stessa regione e la cui espressione era significativamente associata alla prognosi: *Eucaryotic Translation Elongation Factor 1D (EEF1D)*, *Ribosomal Protein L30 (RPL30)*, *Ribosomal Protein S20 (RPS20)*.

P53 è una proteina espressa ubiquitariamente in tutte le cellule, e sovrintende al mantenimento dell'integrità del patrimonio genetico, alla conservazione del programma genetico specifico per ogni singola cellula, al controllo del ciclo cellulare, fino all'induzione dei processi di differenziazione, senescenza, o apoptosi. Nel medulloblastoma p53 è raramente mutata, ma la via di segnale appare perturbato. *TP73* appartiene alla famiglia di *TP53*, e condivide molte delle funzioni proprie di p53. La proteina da esso codificata è essenziale per lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Di p73 sono state identificate una isoforma completa (TAp73) e numerose varianti tronche nella porzione amino-terminale (Δ Np73). Abbiamo analizzato l'espressione di queste isoforme in linee cellulari di medulloblastoma e in 34 tumori primitivi. Sia le linee cellulari stabilizzate, sia i tumori primitivi esprimevano elevati livelli di TAp73 e Δ Np73, relativamente ai controlli cerebrali normali. Mediante analisi di Kaplan-Meier, è stato dimostrato un trend favorevole per i pazienti i cui tumori presentavano sovra espressione di

TAp73. Inducendo una maggior espressione di TAp73 e Δ Np73, abbiamo dimostrato un'alterazione del ciclo cellulare e un'induzione dell'apoptosi in condizioni basali e in risposta all'azione di farmaci citotossici.

WIP1, *Wild-type p53-induced phosphatase 1*, codifica per una fosfatasi che inibisce p53. Il gene mappa sulla regione 17q22-q23, della quale i medulloblastomi presentano frequentemente guadagno. Abbiamo dimostrato come WIP1 sia sovraespressa nei medulloblastomi primitivi in relazione ai controlli normali, e in particolare come il guadagno di 17q si associ a livelli maggiormente elevati di WIP1. Inducendo una maggior espressione di WIP1, abbiamo dimostrato come, sia in condizioni basali, sia in risposta al trattamento farmacologico, WIP1 antagonizzi l'azione di p53, determinando, così, una minor induzione dell'apoptosi.

In conclusione, numerosi fattori biologici concorrono a determinare il fenotipo aggressivo nel medulloblastoma. Il guadagno di 8q, elevati livelli di proteine ribosomiali e la regolazione negativa dell'azione di p53 possono contribuire a indurre una maggiore aggressività o una scarsa risposta alla terapia nel medulloblastoma.

ABSTRACT

Medulloblastoma is the most frequent malignant brain tumor of childhood. Despite numerous advances, prognosis is still grim for children who present metastases at diagnosis, tumor progression or recurrence. Survivors suffer long-term toxicities, affecting their neuro-cognitive, psychological, and growth potential or endocrine system.

A better understanding of biological mechanisms underlying medulloblastoma malignant transformation and aggressive behavior will improve patients' management and therapeutical strategies.

By cytogenetical characterisation, we identified the most frequent chromosomal copy number aberrations in 71 medulloblastoma. The most frequent lesions involved loss of 17p, 16q, 10q, 8p, or gains of 17q, 7q or 2p. Gain of 8q is significantly associated to worse overall survival ($p = 0,0141$), but this result was not entirely attributable to *MYC* amplifications or overexpression. By applying cytogenetical data to gene expression analysis, we identified three 8q-mapped genes whose expression levels were associated to prognosis: *Eucaryotic Translation Elongation Factor 1D (EEF1D)*, *Ribosomal Protein L30 (RPL30)*, *Ribosomal Protein S20 (RPS20)*.

P53 is a ubiquitous protein which directly regulates genome stability, cell fate, cell cycle, and can induce cell differentiation, senescence or apoptosis. P53 is rarely mutated in medulloblastoma, but its pathway is perturbed. *TP73* is an onco-suppressor gene that belong to the same superfamily of genes, and the protein retains some of p53 functions. Moreover, p73 is fundamental in central nervous system development. Recently, many different isoforms of p73 have been identified, encoding a full length (Tap73) and many N-terminal truncated proteins (Δ Np73). We analyzed p73 isoform expression in cell lines and 34 primary medulloblastoma samples and detected higher levels of TAp73 and Δ Np73 compared to normal brain tissue. By Kaplan-Meier analysis, we showed that high expression levels of TAp73 are significantly associated to better prognosis. Overexpression of TAp73 and Δ Np73 altered cell cycle and induced apoptosis in basal conditions and after cytotoxic treatment.

WIP1, *Wild-type p53-induced phosphatase 1*, encoder for a phosphatase that inhibits p53. Its gene maps on 17q22-q23, which is frequently gained in medulloblastoma. We detected high expression levels in medulloblastoma cell lines and 34 primary tumors, and in particular in those with gain of 17q. Overexpression of WIP1 counteracts p53 functions,

protecting cells from apoptosis under basal growth conditions and after in response to chemotherapeutic drug.

In summary, several biological factors influence medulloblastoma aggressive behavior. We showed that gain of 8q, high expression levels of ribosomal proteins and regulation of p53 functions by p73 isoforms and WIP1 may contribute to the malignant tumor behaviour or modulate therapeutical response in medulloblastoma.

INTRODUZIONE

Il Medulloblastoma

Epidemiologia e caratteristiche generali.

Il medulloblastoma è il tumore cerebrale maligno più frequente nell'età pediatrica, di cui rappresenta circa il 20% di tutti i tumori primitivi del sistema nervoso centrale e quasi la metà delle neoplasie a localizzazione primitiva nella fossa cranica posteriore (1, 2), essendo la sede d'insorgenza il cervelletto.

Il picco di incidenza si colloca nei primi cinque-dieci anni di vita, anche se vi sono forme più rare che colpiscono fino all'età giovane adulta. Caratteristicamente, questa neoplasia colpisce con una frequenza doppia il sesso maschile rispetto al sesso femminile.

Alcune sindromi familiari sono associate a un maggior rischio di sviluppare questa neoplasia: atassia-teleangectasia, sindrome di Turcot, sindrome del carcinoma delle cellule basali. Tuttavia, la maggior parte dei medulloblastomi si presenta in maniera sporadica e non è possibile inquadrare la neoplasia nell'ambito di alterazioni ereditarie.

La recente classificazione del World Health Organization, aggiornata recentemente, riconosce alcuni sottotipi istologici principali di medulloblastoma. La più frequente variante è detta classica, ed è caratterizzata da piccole cellule densamente disposte in regolari foglietti. La forma nodulare o desmoplastica presenta zone ad alta cellularità, pallide alle colorazioni, intervallate da zone ricche di stroma; tale istotipo appare frequente soprattutto nei bambini più piccoli o in età giovane adulta. La variante classica si localizza in maniera preferenziale a livello della porzione mediale (verme), mentre quella nodulare o desmoplastica più frequentemente viene riscontrata a livello degli emisferi cerebellari (1, 3). Una variante recentemente identificata, ma che va assumendo una sempre maggiore importanza dal punto di vista prognostico, è la forma a grandi cellule / anaplastica. Questo

gruppo di medulloblastomi presenta cellule spesso raggruppate tra loro in piccoli “nidi” con caratteristiche di anaplasia: citoplasma abbondante, nucleo spesso grande, irregolare, mitosi bizzarre (1). Come per altre neoplasie pediatriche di derivazione embrionale, la definizione anatomico-patologica di tumori che presentano caratteristiche anaplastiche all’interno di un altro istotipo prevalente diviene spesso difficile. È sorto pertanto un vivace dibattito circa la rilevanza della presenza di anaplasia all’interno di medulloblastomi classico o nodulare, alimentato dalle prime osservazioni riguardante la prognosi, che appare più grave proprio nei pazienti affetti da medulloblastoma anaplastico (4-6). Per tale motivo, rispetto all’iniziale identificazione, gli attuali studi epidemiologici riportano percentuali di anaplasia molto ampie e a volte discrepanti tra loro (7). Altre forme più rare sono la melanotica e il medullomioblastoma, che vengono diagnosticate molto più raramente, ma che più spesso possono essere repertate come aree di differenziazione in altri sottotipi maggiori (1).

Caratteristiche biologiche.

Nonostante l’impegno di ricerca profuso per definire meglio questa neoplasia maligna, le nostre conoscenze sui meccanismi biologici che sottendono alla trasformazione dei precursori, alla crescita, alla progressione e alla risposta alla terapia dei tumori è ancora largamente insufficiente. I maggiori successi comprendono infatti il miglioramento della prognosi globale, senza però che essi derivino dall’individuazione di fattori biologici.

Ad esempio, un problema riguarda l’origine del o, piuttosto, dei medulloblastomi. Infatti, la cellula precursore del tumore non è ancora stata chiaramente identificata. Molto probabilmente, a fenotipi e varianti istologiche con diversa localizzazione topografica, corrispondono anche cellule di origine diversa, l’attivazione di vie di segnale differenti e di processi di trasformazione maligna influenzati da geni specifici (8, 9).

Alcuni studi, infatti, hanno dimostrato la derivazione del medulloblastoma da strutture diverse del cervelletto. I primi lavori, soprattutto grazie all’uso di modelli murini genotipicamente modificati, ha mostrato come la variante desmoplastica nodulare riconosca la sua origine in cellule precursori dello strato granulare esterno del cervelletto che persistono in uno stato mitoticamente attivo e, accumulando mutazioni, si trasformano in cellule a fenotipo maligno (10, 11). Più recente è invece l’evidenza che cellule staminali periventricolari potrebbero essere implicate nell’insorgenza della variante classica di medulloblastoma (9, 12-14).

Lo studio e la caratterizzazione a livello patologico del medulloblastoma hanno notevolmente beneficiato dei progressi ottenuti mediante caratterizzazione citogenetica e di espressione genica. Dal momento che la cellula di origine non è ancora stata con sicurezza identificata, molti lavori sono stati indirizzati alla scoperta dei geni responsabili della trasformazione maligna di precursori cerebellari. Alla distinzione circa l'origine cellulare del medulloblastoma corrisponderebbero anche alterazioni della biologia molecolare diverse nei diversi casi. In particolare, alla base dei medulloblastomi di tipo desmoplastico o nodulare vi sarebbe un'alterazione del *pathway* di Sonic Hedgehog (SHH), in particolare mutazioni a carico del suo recettore PTCH1. Tale gene codifica per una proteina essenziale per lo sviluppo embrionale, in particolare nel sistema nervoso centrale. A livello del cervelletto, SHH contribuisce alla proliferazione e alla successiva maturazione dei neuroni dello strato granulare esterno, inducendoli poi a migrare verso gli strati interni (10, 15-17). Al contrario, l'attivazione della via di segnale di WNT / β -catenin sarebbero attivati nel medulloblastoma classico (12, 18-21). Gli studi di embriogenesi nei topi indicano come Wnt1 sia implicato nei processi di sviluppo del sistema nervoso centrale e del cervelletto in particolare (22). Appartiene a una famiglia di geni determinanti nel controllare l'espressione di molti geni, in particolare coinvolti nella crescita e nell'adesione cellulari, e interagisce con numerosi fattori di crescita (23, 24). La via di segnale indotta da WNT1 risulta coinvolta in numerosi tipi di neoplasia (8, 25, 26).

Nuove tecnologie consentono di studiare i cambiamenti a livello di cromosomi, le mutazioni a livello di geni e differenze nell'espressione di singoli geni. In particolare, conosciamo oggi molto più approfonditamente molti riarrangiamenti genici che ci permettono di apprezzare differenze anche all'interno dei diversi sottotipi di medulloblastoma (27). Negli ultimi anni, sono stati pubblicati numerosi lavori che, mediante approcci paralleli, hanno studiato il patrimonio genico delle cellule del medulloblastoma per identificarne le caratteristiche più importanti.

Una delle tecniche che ha permesso lo studio su numerosi campioni di tumore è il CGH, *Comparative Genomic Hybridization*. Tale tecnica prevede la marcatura con fluorofori diversi di DNA normale e di tumore che vengono ibridizzati competitivamente in modo da determinare ove vi siano regioni di incremento o di perdita di DNA tumorale.

Per quanto riguarda le più frequenti anomalie a carico del patrimonio genico di questo tumore, il cromosoma 17 appare riarrangiato in circa il 50% dei casi: il guadagno del braccio lungo e la perdita del braccio corto sono le alterazioni più importanti e spesso

sono presenti nello stesso paziente, dando luogo al caratteristico isocromosoma 17q. Altre lesioni sono state riportate nel medulloblastoma, anche se con una frequenza minore (28-33). Nessuna delle alterazioni del genotipo è inoltre risultata specifica del medulloblastoma, né ad esse corrispondono anche precise o specifiche modificazioni dell'espressione genica responsabili della tumorigenesi. Il caso più significativo è proprio quello dell'isocromosoma 17q o della perdita di 17p, lesioni la cui alta frequenza ha suggerito una possibile diminuzione dell'espressione di p53. Secondo tale ipotesi, la perdita di una copia di p53, il cui gene mappa proprio su 17p13, avrebbe potuto risultare la causa determinante della trasformazione maligna di cellule precursori, ma tale mutazione del patrimonio genico si associa a riduzione della proteina in termini quantitativi o funzionali. Alcuni studi hanno ri-classificato il medulloblastoma in classi diverse a seconda delle anomalie genetiche evidenziate, rilevandone il possibile impatto clinico-prognostico (34).

Altri Autori hanno anche tentato di associare la presenza di determinate alterazioni o il loro numero al fenotipo maligno. Ad esempio, un cariotipo maggiormente modificato, secondo Reardon, è caratteristico della variante anaplastica/a grandi cellule del medulloblastoma (33). In realtà, non è sempre agevole né univoco definire tali relazioni, per cui differenze notevoli esistono anche tra diversi studi.

Numerosi studi hanno ricercato una relazione tra la presenza di determinate lesioni citogenetiche e la prognosi: tra tutte, la principale è senza dubbio la perdita del braccio corto del cromosoma 17 (35-37). Ma tali osservazioni non sono state confermate da altri studi (27, 30, 31, 38). Tali discrepanze possono essere spiegate soprattutto con il fatto che il medulloblastoma è un tumore, in termini assoluti, abbastanza raro. Le casistiche spesso comprendono un numero limitato di campioni e i pazienti sono stati spesso trattati in maniera eterogenea, perché provenienti da istituzioni diverse o in periodi diversi. Pertanto, i risultati sono spesso contrastanti e non permettono di formulare ipotesi conclusive.

Anche lo studio del profilo di espressione genica soprattutto mediante microarray ha consentito di studiare ulteriormente i processi che sottendono alla genesi del medulloblastoma. Tale approccio permette lo studio del trascritto cellulare, con la contemporanea determinazione dei livelli di espressione di migliaia di geni in un unico esperimento. Infatti, l'RNA del tumore e un RNA di riferimento vengono retrotrascritti e marcati con nucleotidi biotinilati e successivamente ibridati su un supporto con sequenze complementari derivanti da geni noti o presunti. Il segnale fluorescente che si ottiene è

pertanto proporzionale alla relativa abbondanza di ogni mRNA trascritto. Tramite questo o altri approcci simili, diviene più agevole studiare l'espressione di migliaia di geni in pressoché tutti i tessuti, normali o patologici, per definire una mappa di geni espressi in maniera diversa a seconda delle diverse condizioni.

Un lavoro fondamentale in questo campo è rappresentato dallo studio condotto da Pomeroy e coll (39), che ha evidenziato come il profilo di espressione genica sia in grado di discriminare i diversi tumori cerebrali, ma anche come la variante classica e desmoplastica di medulloblastoma presentino una regolazione diversa a livello di trascritto. Infatti, tra le due varianti istologiche, l'espressione di 149 geni differiva significativamente, e tra questi anche molti coinvolti nel *pathway* di SHH (PTCH, GLI, IGF-2, MYCN), un fattore di crescita e differenziazione molto importante per le cellule del foglietto granulare esterno della corteccia cerebellare, la cui importanza appare determinante nello sviluppo proprio dell'istotipo desmoplastico/nodulare. Tale *pathway*, inoltre, appare alterato nella sindrome di Gorlin o del carcinoma delle cellule basali, che comporta un aumentato rischio di medulloblastoma (specie nella primissima infanzia), ma che appare sporadicamente coinvolto fino in circa il 20% dei medulloblastomi. Lo stesso lavoro, infine, ha identificato un sottogruppo di geni associati significativamente alla prognosi dei pazienti affetti da medulloblastoma.

Lo studio di Chopra e collaboratori, mediante la stessa tecnica, ha dimostrato come la sovraespressione di determinati geni (nella fattispecie PDGF-R α o altri fattori implicati nella trasduzione dei segnali del sistema RAS/MAPK) sia associata a un comportamento molto più aggressivo della malattia, con maggiore tendenza alla disseminazione metastatica o una scarsa risposta alla terapia (40).

Rimane comunque aperto l'interrogativo su come utilizzare nella pratica clinica l'enorme mole di dati che vengono generati dall'analisi di migliaia di trascritti mRNA mediante un singolo approccio tecnico (41).

Più recentemente, l'affermarsi di modelli murini transgenici ha permesso di chiarire con maggior profondità il ruolo di alcune proteine (come PTCH, DNA ligasi IV, inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti, eventualmente associate a mutazioni di p53) nell'indurre il fenotipo maligno e di stabilire ulteriori connessioni tra il trascrittoma proprio delle neoplasie e dei precursori in particolare del foglietto granulare esterno della corteccia cerebellare. Questi studi contribuiscono a validare l'ipotesi che proprio queste cellule

precursori, in conseguenza dell'accumularsi di mutazioni e alterazioni genetiche, persistono in uno stato mitoticamente attivo, non vanno incontro al normale processo di maturazione, ma si possono facilmente trasformare in cellule maligne (42-44).

Ruolo di p53 nel medulloblastoma.

P53 è una proteina espressa ubiquitariamente in tutte le cellule, e sovrintende al mantenimento dell'integrità del patrimonio genetico, alla conservazione del programma genetico specifico per ogni singola cellula, al controllo del ciclo cellulare, fino all'induzione dei processi di differenziazione, senescenza, o apoptosi. Per tale motivo, l'espressione e l'attivazione di p53 nelle cellule vitali sono finemente e strettamente regolate. Aumenti della concentrazione e della attivazione di p53 avvengono come risposta a eventi stressanti, all'esposizione ad agenti che danneggiano il DNA o a stimoli mitogeni cronici (49, 50).

Mutazioni del gene che la codifica, in particolare a livello del dominio legante il DNA, determina la perdita delle funzioni proprie di p53. In tal modo, le cellule possono progredire nel ciclo cellulare senza controllo, accumulando nuove mutazioni e alterando completamente il programma biologico e il destino cellulare previsti (51). I pazienti affetti da sindrome di Li-Fraumeni, cioè portatori di mutazioni ereditarie a carico del gene *TP53*, sono ad aumentato rischio di sviluppare neoplasie, incluso, anche se non frequentemente, il medulloblastoma (52). Al contempo, studi sperimentali di modelli murini hanno mostrato come mutazioni di *Tp53* aumentino l'incidenza di medulloblastomi, in associazione ad altre mutazioni (53-55). Rispetto ai tumori che insorgono in età adulta, nel medulloblastoma le mutazioni a carico del gene *TP53* sono rare (56, 57). La perdita del braccio corto del cromosoma 17 è un evento frequente nel medulloblastoma; pertanto è stato ipotizzato che più che mutazioni a carico del gene, la emizigosi possa determinare una ridotta funzione di p53 (58, 59). Tuttavia, questo meccanismo non è mai stato provato e sono state formulate diverse ipotesi alla ricerca del gene coinvolto sul cromosoma 17p (60, 61). Recentemente è stato identificato, come possibile gene candidato per il medulloblastoma, *REN(KCTD11)*, che ha funzioni di inibire il *pathway* di Sonic Hedgehog e che inibisce la proliferazione cellulare (62). La precisa identificazione del gene o, più probabilmente, dei geni coinvolti nella trasformazione maligna delle cellule del cervelletto rimane ancora dibattuta. Tuttavia, l'evidenza mostra come il *pathway* controllato da p53

sia perturbato anche nel medulloblastoma, con perdita di funzione e riduzione dei meccanismi che dovrebbero portare la cellula tumorale incontro alla morte programmata (63, 64). Frank e collaboratori hanno per primi descritto la elevata espressione di p53 nella variante anaplastica a grandi cellule del medulloblastoma (65). I meccanismi che sottendono questo epifenomeno sono ancora parzialmente sconosciuti. Uno dei meccanismi ipotizzati coinvolge la degradazione di p53, in particolare tramite ubiquitinazione e degradazione proteosomica della proteina, che appare sequestrata a livello del citoplasma, e che quindi non può esercitare le sue funzioni a livello del nucleo (66). Un altro meccanismo implicato è l'espressione di proteine che interferiscono sull'attivazione e sulle funzioni di p53 o ancora la sintesi di isoforme di p53 e di proteine appartenenti alla stessa famiglia ad alterata composizione rispetto alla proteina nativa (67). Infatti, *TP53* e la famiglia di geni che essa comprende sono oggetto di *splicing* alternativo che determina la sintesi di proteine tronche nella parte N-terminale (globalmente indicate dal simbolo ΔN) o che differiscono nelle sequenze carbossi-terminali (indicate con l'appendice α , β , eccetera) (68-71). Recentemente, sono state identificate isoforme di p53 differenti per la sequenza C-terminale, la cui funzione rimane ignota (72). P73 è un membro della famiglia di p53 e di essa esistono isoforme diverse (73, 74). Il gene che codifica per la proteina mappa sul cromosoma 1p36, regione frequentemente coinvolta e deleta in numerose neoplasie, incluso il medulloblastoma. La isoforma completa (TAp73) condivide con p53 la stessa struttura di base e notevoli analogie a livello dei singoli domini, in particolare del dominio legante il DNA (75, 76). Mantiene proprietà oncosoppressori simili, se non a volte sovrapponibili a quelle di p53 e proprietà di induzione dell'apoptosi in vitro (75-78). Numerose isoforme troncate a livello della sequenza N-terminale, invece, si ritiene agiscano in maniera dominante negativa sulle funzioni di p53, esercitando una funzione anti-apoptotica in cellule tumorali e neuronali (79, 80). In particolare, p73 (e soprattutto le forme troncate della proteina) sono espresse nel sistema nervoso centrale durante lo sviluppo, dove contrastano l'azione di p53 e prevengono l'apoptosi neuronale. Nonostante le numerose analogie strutturali con p53, le proteine codificate dai geni correlati hanno delle funzioni specifiche. Infatti, mentre i topi privi di p53 (p53 $-/-$) sono vitali, si sviluppano normalmente e non presentano un fenotipo distinguibile dai topi selvaggi (81). I doppi mutanti per *Tp73* presentano delle anomalie di sviluppo del sistema nervoso centrale (idrocefalo e disgenesia dell'ippocampo), oltre ad alterazione della risposta infiammatoria (82). La trascrizione del gene *TP73* è direttamente attivata da p53, che, pertanto, ne determina anche le funzioni di controllo sul ciclo

cellulare; anche altri fattori (ad esempio E2F1) contribuiscono a transattivare p73 (83), che, a sua volta, contribuisce a incrementare la trascrizione del proprio gene (84). Numerose sono le modificazioni post-trascrizionali che regolano l'attività di p73, quali ubiquitinazione, acetilazione, fosforilazione, in parte specifici (ad esempio l'interazione con c-Abl), in parte condivisi con p53 e le proteine simili (85).

WIP1 (PPM1D, wild type p53-induced phosphatase 1 o protein phosphatase, magnesium-dependent 1, delta) è un proto-oncogene la cui trascrizione è direttamente regolata da p53. Il gene mappa su 17q22-q23. L'espressione di Wip1 aumenta in risposta a stress e danni indotti al DNA cellulare (86). Elevati livelli di WIP1 sono stati riportati in numerose neoplasie, in particolare per amplificazione della regione cromosomica dove mappa (87, 88). La proteina ha funzioni di defosforilazione e regola negativamente l'attivazione del *pathway* di p53, assumendo funzioni pro-cancerogene (87). In particolare, inibisce l'attività di p38MAPK e riduce la fosforilazione e l'attivazione di p53 (87, 89, 90). La mancata fosforilazione di p53 da parte di p38MAPK causa l'abrogazione dei controlli sul ciclo cellulare che sono propri di p53. Inoltre WIP1 determina anche una defosforilazione dei residui di Serina di ATM e dei residui di p53 fosforilati da ATM stesso (91). Gli effetti dell'azione di WIP1 contribuiscono ad alterare i fondamentali meccanismi regolatori del ciclo cellulare e le risposte cellulari stesse agli insulti al DNA. WIP1 contrasta direttamente la attivazione di p53 e indirettamente inattiva alcune delle principali chinasi volte a innescare la via del segnale di p53 stesso. Inoltre, WIP1 contribuisce anche alla defosforilazione di MDM2, una E3 ubiquitinasi che determina l'ubiquitinazione e la successiva degradazione proteosomiale di p53. Quando p53 e MDM2 sono defosforilate su specifici residui aminoacidici, l'interazione tra le due proteine è favorita e il processo di degradazione di p53 viene innescato (92).

L'interesse per WIP1 è notevolmente aumentato negli ultimi anni, e sempre più dettagliata è la descrizione di interazioni con proteine che, inibendo p53, potrebbero spiegare la funzione anti-apoptotica. Recentemente, due studi sul medulloblastoma hanno confermato la elevata espressione di questa fosfatasi, pur senza studiare i meccanismi biologici che alti livelli di WIP1 possono modificare, favorendo la crescita tumorale (29, 35).

Clinica e diagnosi.

In considerazione della localizzazione del tumore primitivo, il paziente affetto da medulloblastoma si presenta comunemente per i sintomi legati all'ipertensione endocranica: la cefalea, caratteristicamente mattutina, seguita poi da vomito a getto, ipertensione e bradicardia, fino alla papilla da stasi. Tra tutti i tumori primitivi del sistema nervoso centrale, il medulloblastoma ha la maggior tendenza a infiltrare i tessuti circostanti, le meningi e a diffondere per via liquorale ed ematica, potendo dare seppur raramente anche metastasi extra-cerebrali (in particolare osso e midollo osseo, linfonodi, fegato e polmoni). La compromissione dei tessuti sani circostanti determina i caratteristici segni della sindrome cerebellare, con atassia, ipotonia, debolezza, adiadococinesia, nistagmo, mentre deficit focali possono essere rilevati soprattutto a carico del tronco encefalico. Fino al 10% dei pazienti si presenta con localizzazioni metastatiche già alla diagnosi. Nel post-operatorio, è caratteristica del medulloblastoma la cosiddetta "sindrome della fossa cranica posteriore", caratterizzata, con espressione solitamente variabile, da alterazione del comportamento, mutismo, deficit a carico dei nervi cranici e del cervelletto, emiparesi. Solitamente tale sintomatologia è reversibile, anche se i tempi e l'entità del recupero sono estremamente variabili. Gli effetti a lungo termine delle terapie sono spesso pesanti, in particolare per i pazienti più piccoli, in cui maggiore è il declino delle funzioni psico-cognitive e sensoriali o l'alterazione dell'accrescimento e delle funzioni endocrine.

Le indagini radiologiche necessarie per porre il sospetto di medulloblastoma comprendono TAC e RMN cerebrali e spinale, mentre la puntura lombare con esame del liquido cerebro-spinale contribuisce a chiarire una eventuale disseminazione di malattia. Altre indagini, eseguite molto più raramente possono comprendere scintigrafia ossea e biopsia osteo-midollare.

Terapia e prognosi.

Pur essendo un tumore maligno e avendo caratteristiche di elevata malignità, il medulloblastoma è una delle neoplasie cerebrali più radio- e chemiosensibili.

Il primo approccio terapeutico prevede la stabilizzazione del paziente mediante correzione dell'eventuale ipertensione endocranica. Dopo che il paziente è stato compensato, il tumore stesso viene asportato chirurgicamente. I miglioramenti nelle

tecniche di neurodiagnostica e neurochirurgia hanno consentito di ottenere l'asportazione totale o quasi-totale della neoformazione nella maggior parte dei casi. Questo risultato riveste un ruolo estremamente importante in tutti gli studi clinici, in quanto si associa a una prognosi più favorevole, se comparato con la presenza di un residuo di malattia.

La prima forma di trattamento dei pazienti affetti da medulloblastoma è stata la radioterapia, che ancor oggi viene distribuita su tutto l'asse cranio-spinale (proprio in relazione alla elevata tendenza alla diffusione attraverso gli spazi sub-aracnoidei), con una maggior copertura della fossa cranica posteriore. L'associazione di vari regimi di chemioterapia ha permesso di ridurre o dilazionare nel tempo (per cercare di minimizzare gli effetti delle radiazioni sull'encefalo in via di sviluppo) la dose di radiazioni ionizzanti cui il paziente viene esposto. A seconda delle fasce di rischio e dell'età del paziente, sono previsti regimi chemioterapici che comprendono l'uso di alcaloidi della vinca, metotrexate, nitrosuree, ciclofosfamide. Con un approccio combinato di chirurgia, radio- e chemioterapia, oggi la sopravvivenza globale dei bambini affetti da questa neoplasia è migliorata notevolmente, arrivando al 65-70% a cinque anni dalla diagnosi nei pazienti che presentano caratteristiche di rischio cosiddette "standard", mentre cala drasticamente al 25-35% nei pazienti ad alto rischio (2).

Il riconoscimento dei fattori di rischio clinico per i pazienti affetti da medulloblastoma, come per altre patologie tumorali, diviene molto importante per la corretta definizione dell'approccio terapeutico. A livello generale, sono stati individuati diversi fattori prognostici, ma i principali sono ancora strettamente clinici e non determinati dalle caratteristiche proprie o intrinseche della neoplasia (27, 41, 45).

Un primo criterio è rappresentato dall'età del paziente alla diagnosi. Infatti, la ricaduta o la progressione di malattia sono più frequenti se il paziente presenta una età inferiore ai tre anni. Questo riscontro sembra essere più in relazione alla mancata o ritardata somministrazione di radioterapia in assenza di un regime chemioterapico sostitutivo. La resezione completa, o quasi completa, e l'assenza di disseminazione metastatica comportano un'aspettativa di sopravvivenza decisamente migliore rispetto a quei pazienti nei quali il residuo post-chirurgico è sensibile o vi sia già alla diagnosi disseminazione locale o a distanza.

La definizione di più precise categorie o sottotipi istologici ha permesso di riconoscere entità che comportano probabilmente una diversa possibilità di sopravvivenza

generale, anche se queste prime indicazioni devono essere confermate da più ampi studi epidemiologici, anche in considerazione della migliore definizione anatomo-patologica delle “malattie-medulloblastoma”. In particolare, la variante a estesa nodularità, caratteristica della sindrome del carcinoma delle cellule basali, anche se insorge più frequentemente nei lattanti o nella primissima infanzia, si associa a una prognosi decisamente migliore, mentre invece la variante anaplastica / a grandi cellule avrebbe una prognosi peggiore rispetto alle altre (4, 6, 40, 46).

Infine, le alterazioni a carico del cromosoma 17 (soprattutto la delezione del braccio corto), una elevata espressione di MYC o di ERB/B2 sarebbero associate a una prognosi peggiore, mentre una elevata espressione di TRKC o di catenina sarebbero in relazione a una prognosi favorevole (6, 27, 47).

Soltanto adesso le caratteristiche biologiche intrinseche del tumore, al contrario di altre forme di neoplasia, iniziano a rivestire un significato clinico e a integrare pertanto le informazioni cliniche sulla malattia, venendo almeno in parte valutate in alcuni dei più nuovi protocolli clinici sperimentali. Questa mancanza di chiari marcatori genetici deriva almeno in parte dal fatto che le conoscenze sulle caratteristiche biologiche della malattia sono ancora relativamente modeste e perciò stesse in divenire. In parte perchè le relazioni tra caratteristica biologica e prognosi non sono ancora sufficientemente provate, mancando ad esempio di numeri sufficienti a dirimere i vari aspetti, e secondariamente perchè l’impatto dei singoli fattori su *trial* clinici diversi deve essere attentamente soppesato (6).

Predire il comportamento di una neoplasia in base alle sue caratteristiche biologiche rimane uno degli obiettivi fondamentali per la ricerca in Oncologia e questo si deve necessariamente avvalere di una migliore caratterizzazione delle tappe che portano dalla cellula normale alla cellula neoplastica o di quelle caratteristiche che condizionano, all’interno di una stessa neoplasia, la formazione di diversi sottotipi di malattia o evoluzione e storia clinica differente (41).

Tali conoscenze potranno, inoltre, consentire di curare il singolo paziente del suo peculiare tumore, adeguando pertanto la terapia in base alle caratteristiche genetiche e fenotipiche della malattia. Per il carcinoma mammario, infatti, è in atto un *trial* clinico-sperimentale che ha come obiettivo l’integrazione dei dati ottenuti mediante l’analisi del profilo di espressione genico con i parametri clinici di stadiazione e terapia del cancro alla mammella. Questo studio, condotto nei Paesi Bassi, è l’unico di questo tipo attualmente

aperto, che si pone l'ambizioso programma di valutare l'impatto dell'espressione di 70 geni correlati alla sopravvivenza su tutti i nuovi casi di tumore nella nazione (48).

La caratterizzazione genica di una neoplasia

Le basi molecolari di una neoplasia.

Nel corso degli ultimi decenni, l'evoluzione delle nostre nozioni in biologia molecolare e in particolare per le applicazioni di essa in oncologia è stata decisamente notevole e grandiosa.

Negli anni '70, Knudson propose per la prima volta la sua teoria, basata sull'osservazione dei retinoblastomi con componente ereditaria, chiamata "two hits", secondo la quale ad una mutazione germinale di un gene determinante per lo sviluppo del tumore, si aggiunge un secondo difetto a carico dello stesso gene nelle cellule somatiche che assumono caratteristiche di omozigosi per la mutazione e diventano suscettibili di trasformazione maligna (93). Tale teoria è stata rivoluzionaria e costituisce tutt'oggi una pietra miliare dell'oncologia, anche se sono molto poche le situazioni simili a quelle del retinoblastoma, in cui è l'alterazione di un singolo gene a determinare il processo di tumorigenesi.

L'informazione genetica posseduta dalle cellule maligne non è la stessa di quella delle cellule sane appartenenti allo stesso individuo. Questa ulteriore affermazione ha successivamente aperto la strada a nuove e sempre più approfondite analisi. Infatti, le cellule tumorali possono essere caratterizzate da alterazioni grossolane a livello dell'intero patrimonio cromosomico, o alcuni dei cromosomi, o da cambiamenti più fini, con mutazioni, amplificazioni, delezioni, o traslocazioni di regioni cromosomiche.

Le moderne tecniche di biologia molecolare permettono di conoscere e investigare fino a singole mutazioni puntiformi che possono bloccare il processo di trascrizione, alterare la funzionalità di proteine o modificare sequenze di regolazione dell'espressione genica.

Nella maggior parte dei casi, gli eventi che portano alla trasformazione di una cellula facendole acquisire un fenotipo maligno sono molto complessi, dipendono dal contemporaneo verificarsi di molti eventi e coinvolgono numerosi geni, che, a vario grado, controllano la capacità delle cellule di differenziarsi, moltiplicarsi, sopravvivere o andare incontro all'apoptosi nei tempi e nelle modalità programmate.

Nella classificazione tradizionale, i geni responsabili della tumorigenesi appartengono a due grandi famiglie: i proto-oncogeni e i geni oncosoppressori. Alla prima classe appartengono i geni che attivano il ciclo cellulare, o determinano la resistenza all'apoptosi spontanea o indotta dalla terapia, o stravolgono il programma predeterminato per una linea maturativa di cellule (come *MYC*), mentre la seconda comprende geni che frenano il ciclo cellulare, controllano l'integrità delle informazioni genetiche o promuovono processi di differenziazione e di apoptosi (come *TP53* o *RB*). Gli eventi che si accumulano durante la trasformazione maligna liberano la cellula dai controlli propri e contribuiscono a rendere ulteriormente più instabile il patrimonio genetico tumorale.

Caratterizzazione del genoma e del trascrittoma: Comparative Genomic Hybridization (CGH) e studio del profilo d'espressione genica mediante microarray.

Alle tradizionali tecniche di citogenetica per lo studio del cariotipo, si sono affiancate negli ultimi anni altre metodiche che permettono lo studio su larga scala del patrimonio genetico di numerosi campioni, come FISH, CGH, SKY, analisi SNP, fornendo spesso informazioni complementari.

L'introduzione del CGH si deve a Kallioniemi (94). Tale approccio prevede di marcare con fluorofori differenti il DNA del materiale da esaminare e un DNA standard e di ibridarle competitivamente su una piattaforma costituita da cromosomi normali o sonde sintetiche, in modo da determinare alterazioni nel contenuto di DNA nel campione da testare. L'eccitamento del marcatore con laser opportuno determina l'emissione di fluorescenza, che viene analizzata con appositi programmi. In pratica, nell'ambito oncologico, se prevale il segnale fluorescente corrispondente al tumore vi sarà un guadagno di materiale genetico nel tumore stesso, mentre se prevale il fluoroforo con cui è stato marcato il DNA di riferimento, significa che il tumore presenta una perdita del corrispondente contenuto di DNA. A seconda della piattaforma utilizzata, la risoluzione varia da 10-20 Mbp (nel *chromosomal CGH*) alle 10-50 kbp nell'*array CGH*.

Questo approccio è oggi ampiamente utilizzato come metodo standard per screening e caratterizzazione di linee cellulari e campioni di neoplasie. Nella maggior parte dei casi, è difficile individuare con certezza singoli geni coinvolti nella neoplasia, in parte per la risoluzione della tecnica stessa e in parte perché geni in regioni coinvolte in guadagni o perdite non sempre mostrano una espressione alterata o sono imputati in rilevanti processi biologici. Infine, traslocazioni bilanciate (cioè senza perdite o guadagno di materiale genetico) non vengono evidenziate, come pure difficilmente vengono evidenziate alterazioni all'interno di sequenze altamente ripetitive (come quelle pericentromeriche) o dei bracci corti acrocentrici. L'applicazione del CGH ha peraltro facilitato la identificazione di regioni cromosomiche frequentemente alterate, anche nel medulloblastoma.

Allo stesso modo, per quanto riguarda lo studio dell'espressione genica, alle tecniche che prevedevano l'analisi di singoli trascritti per saggio (come la PCR), oggi nuove tecniche permettono la contemporanea determinazione della relativa abbondanza di varie migliaia di geni. Tra queste, un rilievo e un'importanza particolare la riveste l'analisi mediante *microarray*. Due sono le principali modalità di allestimento dei *microarray*: la prima utilizza intere catene o frammenti di cDNA fissate su un supporto di vetro (*cDNA microarray*), mentre nella seconda brevi sequenze di oligonucleotidi (in genere da 20 a 60 bp) sono sintetizzate direttamente su un supporto di vetro (*oligonucleotide microarray*).

In breve, sequenze di cDNA o cRNA sono ottenute mediante retro trascrizione di RNA, vengono marcate per via indiretta con fluorocromi e poi lasciate ibridare con il materiale genetico legato al supporto di vetro. Dopo eccitazione mediante raggio laser, un computer registra l'intensità delle radiazioni emesse dai fluorofori stessi. Un software quantifica e interpreta i segnali emessi, permettendo all'operatore di comparare la espressione relativa dei geni nel campione rispetto al tessuto di riferimento.

Proprio lo studio del profilo di espressione genica dei tumori si è rivelato la più grande applicazione dei *microarray*, che costituiscono oggi un fondamentale approccio alla comprensione dei processi che sottendono la nascita di un tumore (95). Questa tecnica, infatti, consente di ottenere una visione certamente più globale della complessa rete di segnali che regolano la vita della cellula e individuare caratteristiche peculiari della singola neoplasia, sia in termini di individuazione della causa o di fattori associati a un fenotipo biologicamente aggressivo, sia per quanto attiene la risposta alla terapia. Molti sono gli studi che si sono proposti di identificare i fattori responsabili della trasformazione in senso

neoplastico delle cellule, che vengono ad acquisire nuove proprietà e caratteristiche che le distinguono dalla popolazione cellulare normale, spiegando così le diversità di comportamento e di risposta alle terapie (96). Benché queste informazioni siano decisamente importanti anche per i possibili sviluppi terapeutici, le potenzialità dello studio del profilo dell'espressione genica non appaiono ancora completamente sfruttate, soprattutto a causa della scarsa conoscenza delle funzioni biologici di molti geni (45). Infatti, la definizione dell'intero patrimonio genetico umano ha consentito di scoprire numerosi nuovi geni e di identificare, sulla base delle analogie di sequenza, nuove famiglie di geni .

Anche l'interpretazione della mole di dati generati da questi tipi di studi non conosce una uniforme valutazione e analisi statistica, con metodologie e approcci che spesso sono molto diversi tra loro e che non trovano unanimi consensi. Nella metodica specifica, inoltre, il campione di riferimento varia notevolmente a seconda dei gruppi di studio o dei lavori e questo può rendere molto difficile il confronto dei dati. La complessità delle operazioni volte a processare i campioni richiede che siano messi in atto tutti i controlli che servono a garantire la qualità del materiale e la riproducibilità dei risultati, minimizzando al contempo anche i possibili *bias* che possono compromettere, a partire dal disegno dell'esperimento, i risultati stessi. Dato che non sempre è possibile isolare le cellule di interesse, l'amplificazione di RNA proveniente da materiale normale frammisto a quello da testare può compromettere la qualità dei risultati stessi.

Infine, la trascrizione è solo uno dei numerosi passaggi necessari per arrivare alla espressione piena del fenotipo della neoplasia e la cellula può regolare e modificare la rete di segnali che ne regolano la biologia attraverso molti meccanismi, anche post-trascrizionali, che non vengono rilevati dall'analisi del trascrittoma con *microarray*.

Diventa pertanto necessario validare anche con altre metodiche i risultati ottenuti tramite *microarray* e la regolazione dell'espressione dei singoli geni di interesse deve essere confermata tramite approcci tradizionali ben consolidati, come la qRT-PCR. Infine, ulteriori indagini possono identificare i meccanismi fini che regolano la funzione o l'attivazione delle proteine identificate, che sono gli effettori ultimi, e perciò i più importanti, di tutte le funzioni cellulari.

SCOPI DEL LAVORO

Nonostante i miglioramenti conseguiti negli ultimi decenni, la prognosi dei pazienti affetti da medulloblastoma è ancora severa, particolarmente per i pazienti con malattia disseminata o con recidiva. Inoltre, gli effetti a lungo termine delle terapie possono notevolmente condizionare la qualità di vita dei pazienti lungo-sopravvivenenti e delle loro famiglie. Un ulteriore miglioramento della prognosi dipenderà, quindi, dal miglioramento delle nostre conoscenze sulla biologia molecolare e sui meccanismi di trasformazione maligna delle cellule del cervelletto. Questi progressi potrebbero contribuire a classificare meglio i pazienti in opportune fasce di rischio e modulare conseguentemente l'intensità della terapia, o meglio ancora, modellare la terapia in base alle caratteristiche proprie della singola neoplasia. Da questo può derivare un miglioramento della sopravvivenza a lungo termine e una minimizzazione degli effetti collaterali indesiderati. Inoltre, la scoperta di singoli geni implicati nella cancerogenesi potrebbe aprire la strada a nuove forme di terapia, inclusa la terapia genica.

Lo scopo dei miei studi è l'identificazione di geni associati a specifici fenotipi tumorali e che modulano le proprietà maligne del medulloblastoma. ciò è stato ottenuto utilizzando numerosi approcci:

1. Mediante CGH ho contribuito a definire le principali regioni di guadagno o di perdita genetica nel medulloblastoma:
2. Associando il profilo di espressione genica alle anomalie genomiche ho identificato alcuni geni la cui espressione si associa a una prognosi peggiore;
3. Alterando l'espressione di geni che contribuiscono a modulare l'azione di p53 nel medulloblastoma, ne ho studiato gli effetti in colture cellulari in condizioni basali e dopo stress (trattamento chemioterapico), per determinarne l'importanza nel regolare l'omeostasi delle cellule neoplastiche.

MATERIALI E METODI

Dati clinici e campioni biologici.

Nel presente studio, come parte di una valutazione retrospettiva, sono stati inclusi 71 pazienti (con età compresa tra 7 mesi e 38 anni) affetti da medulloblastoma e trattati al Texas Children's Cancer Center di Houston, Texas, e al Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts. I campioni sono stati ottenuti dopo consenso informale e approvazione da parte dei rispettivi comitati etici istituzionali, immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Sessanta pazienti sono stati sottoposti a resezione totale del tumore primitivo; una resezione parziale è stata ottenuta solo in undici pazienti. I pazienti con età superiore a 36 mesi hanno ricevuto il previsto trattamento radiante (dose totale di radiazioni sull'asse cranio-spinale 2400-3600 cGy con boost fino a 5300-7200 cGy sul tumore primitivo). Cinquanta pazienti hanno eseguito chemioterapia adiuvante, comprendente cisplatino e vincristina, in associazione a diverse combinazioni di farmaci comprendenti carboplatino, etoposide, ciclofosfamide e lomustina in accordo ai diversi protocolli utilizzati nelle diverse istituzioni, mentre 21 hanno ricevuto cicli di chemioterapia ad alte dosi comprendente vincristina, cisplatino, ciclofosfamide ed etoposide, seguita da rescue con cellule staminali autologhe. Per l'intero gruppo, il follow-up aveva una mediana di 36 mesi (range 4-109). Quarantaquattro di questi, pari al 67%, sono attualmente in vita. Cinquantuno pazienti erano maschi, 20 femmine. L'istologia prevalente era medulloblastoma classico (32), seguito dal desmoplastico / nodulare (22 casi) e dall'anaplastico / a grandi cellule (14 campioni); una istologia mista è stata identificata in tre casi.

Comparative Genomic Hybridization (CGH).

Il DNA della neoplasia è stato ottenuto mediante utilizzo di DNeasy kit (QIAGEN) secondo le indicazioni fornite dalla ditta. In particolare, 10-15 mg di tessuto venivano posti a digerire in apposito buffer di lisi a 50°C durante la notte in presenza di proteinasi K. Il

mattino successivo, dopo aver centrifugato il campione, veniva aggiunto buffer contenente β -mercaptoetanololo e successivamente etanolo puro. Il lisato veniva fatto legare ad apposita colonna di silice, purificato mediante lavaggi con buffer appropriati e successivamente risospeso in acqua. In caso di limitata disponibilità di tessuto, dalla fase organica del TRIzol, come descritto successivamente per l'estrazione di RNA, il DNA è stato precipitato mediante aggiunta di etanolo puro e successiva centrifugazione (1950 x g per 30 minuti a 4°C). Il DNA veniva sottoposto a tre differenti lavaggi in soluzione con sodio citrato 0,1M in etanolo al 10% e un lavaggio finale con etanolo al 75%. Ridissolto il pellet in appropriato volume di NaOH 8 mM, tamponata immediatamente mediante l'aggiunta di HEPES 1M, il DNA veniva ulteriormente purificato mediante DNeasy kit, per eliminare tracce di Sali (in particolare basi), seguendo le indicazioni del produttore.

1-2 μ g di DNA sono poi stati marcati utilizzando il protocollo della nick-end translation, utilizzando un mix di DNA polimerasi e DNasi I (Invitrogen), con FITC-12-dUTP o Texas Red-5-dUTP (Dupont NEN), rispettivamente per il campione di tumore o il DNA di riferimento (placentare). Purificati mediante colonne Sefadex, i due materiali (probando e riferimento) sono stati precipitati in eccesso di Cot-1 DNA (Invitrogen) e risospesi un paio d'ore in soluzione di ibridazione (formamide 50%, 10 x SSC, 10% destrano solfato) prima di applicarle a un vetrino sul quale erano presenti numerose figure mitotiche allestite da linfociti di individui normali dopo stimolazione con fitoemoagglutinina. Dopo circa 48 ore di ibridazione a 37°C, i vetrini sono stati sottoposti ad analisi mediante software QuipsPathfinder in modo da poter analizzare almeno quindici metafasi separate tra loro. Il rapporto tra le intensità dei segnali luminosi fluorescenti emessi da Texas Red e FITC lungo tutto il cromosoma è stato calcolato mediante Quantitative Image Processing System (Applied Imaging). La media dei rapporti tra i segnali luminosi ottenuti dalle diverse mitosi e l'intervallo di confidenza del 99% sono state determinate per tutti i tumori su tutti i cromosomi. Rapporti maggiori di 1.2 o minori di 0.8 sono stati scelti come valori limite per definire regioni di amplificazione e di perdita di materiale genetico del tumore, rispettivamente. Le amplificazioni sono state identificate per valori maggiori di 2.0 per le regioni cromosomiche specifiche.

Analisi del trascritto mediante microarray e qRT-PCR.

Ventisette dei 71 casi studiati per le alterazioni genomiche, erano stati analizzati in precedenza anche per l'espressione genica, come parte di un più ampio gruppo di 64 medulloblastomi (39). Il materiale biologico, ancora congelato, è stato omogeneizzato mediante omogeneizzatore Polytron, in reagente TRIzol (Invitrogen). Dopo breve incubazione a temperatura ambiente, è stato aggiunto cloroformio e, dalla fase acquosa ottenuta dopo centrifugazione (11900 x g per 30 minuti a 4°C), è stato precipitato l'RNA mediante aggiunta di isopropanolo e successiva centrifugazione. Rimosso il sovrantante, l'RNA è stato sottoposto a lavaggio con etanolo al 75% in acqua DEPC e successivamente risospeso in un appropriato volume di acqua DEPC.

Un ulteriore grado di purificazione, al fine di eliminare le frazioni a basso peso molecolare di RNA (tRNA e frazione 5S), è stato ottenuto mediante RNeasy kit (QIAGEN). In breve, la sospensione di RNA, addizionata di buffer di lisi con β -mercaptoetanolo e successivamente di etanolo al 100%, è stata sottoposta a filtrazione attraverso una membrana di silice posta su apposita colonna e successivamente purificata mediante due lavaggi secondo le indicazioni fornite dalla ditta. L'RNA è stato risospeso nella soluzione finale in due successive eluizioni con un appropriato volume di acqua DEPC. L'integrità del materiale è stata accertata mediante Agilent 2000 Bioanalyzer presso il Microarray Core Facility del Baylor College of Medicine.

Per valutare l'espressione genica, 5-10 μ g di RNA totale sono stati utilizzati per generare due successive catene di cDNA, mediante impiego di Superscript II (Invitrogen) e nuovamente cRNA biotinilato (T7 RNA Polimerasi, Affymetrix) in adatto buffer (Affymetrix). Tale prodotto veniva poi frammentato (GeneChip Sample Cleanup, Affymetrix), prima di essere ibridato *overnight* su HuGeneFL array (Affymetrix), contenente 5920 geni noti e 897 sequenze codificanti non conosciute. Dopo quattro lavaggi in soluzioni a concentrazioni decrescenti di SDS e SSC, i segnali fluorescenti sono stati quantificati mediante scanner Affymetrix e software GeneChip (affymetrix) presso il microarray Core Facility del Baylor College of Medicine. Sono stati ritenuti validi solo quei chip per i quali sono stati rilevati valori di espressione con minima variazione (GeneChip factor < 3). La normalizzazione dei dati (CEL file) è stata ottenuta mediante software dCHIP v 1.3 (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>).

La quantificazione dell'espressione genica mediante qRT-PCR è stata eseguita utilizzando tecniche standard. L'RNA cellulare totale è stato retro trascritto a cDNA utilizzando M-MLVRT (Invitrogen), insieme a RNasi *inhibitor* in apposito mix di sali,

oligonucleotidi e nucleotidi secondo le indicazioni fornite. Le reazioni di qRT-PCR sono state effettuate utilizzando cDNA, SYBERGreen (Bio-Rad) e primer specifici ed effettuate in triplette, in almeno tre repliche, utilizzando cicli standard su termociclatore iQ4 Multicolor (Bio-Rad). L'espressione dei geni di interesse è stata normalizzata sull'espressione di GAPDH comparata al tessuto cerebrale fetale o cerebellare adulto umani (Stratagene). L'integrità del prodotto di amplificazione è stata verificata con elettroforesi su gel di agarosio, curve di *melting*, e sequenziamento.

Analisi statistica del profilo genomico e dell'espressione genica.

In un primo momento, abbiamo individuato le alterazioni del patrimonio genetico in relazione alla sopravvivenza dei pazienti affetti. Mediante software SPSS v 11 (<http://spss.com/spssbi/spss/index/htm>), sono state generate le curve di sopravvivenza globale e libera da malattia, stratificando i pazienti in base alla presenza o meno della singola mutazione studiata. Il disegno dello studio ha previsto inoltre l'analisi del profilo di espressione di gruppi di medulloblastomi caratterizzati dalla stessa alterazione del genoma, comparandoli ai restanti tumori, per generare una lista di geni la cui espressione fosse significativamente modificata (definita dal log in base 2 dei rapporti campioni / gruppo di riferimento e dal valore di $p < 0.05$, ottenuto mediante t-test) nello stesso senso della modificazione genomica studiata. Sono state prese in considerazione solo quelle alterazioni che erano presenti in almeno il 10% dei campioni studiati. Per i geni identificati in base alla espressione differenziale, sono state generate le curve di sopravvivenza dei pazienti, stratificati in "esprimenti ad alto o basso livello" in relazione alla mediana di espressione nel gruppo di 64 medulloblastomi studiati mediante *microarray* (Figura 1).

Analisi proteica.

Campioni congelati sono stati omogeneizzati in buffer di lisi (SDS 0,5%, 50 mM Tris HCl pH8, 5mM NaEDTA, 2% β -mercaptoetanolo), a 100°C per ottenere la frazione proteica. Dopo centrifugazione a massima velocità e a 4°C, la concentrazione delle proteine nel sovrantante né stato determinato mediante Protein Assay (Bio-Rad). I lisati proteici, conservati a -80°C fino all'utilizzo, sono stati analizzati con elettroforesi su gel di SDS-PAGE e trasferimento *overnight* su membrane di nitrocellulosa. Gli opportuni

anticorpi primari, diluiti alla concentrazione desiderata in blocking solution contenente 5% BSA, sono stati incubati con la membrana *overnight*; mentre gli anticorpi secondari, marcati con tracciante fluorescente (Invitrogen) sono stati visualizzati mediante apparecchio Odyssey (LI-COR Biosciences). L'espressione delle proteine è stata normalizzata utilizzando β -actina come controllo interno.

Colture cellulari, trattamenti farmacologici, transfezioni, saggi di luciferasi e ciclo cellulare.

Linee cellulari stabilizzate di medulloblastoma (Daoy e D283Med), ottenute dall'American Type Culture Collection, sono state mantenute in coltura in DMEM, addizionato del 10% di siero fetale bovino, aminoacidi non essenziali, glutamina, alla temperatura di 37°C e CO₂ 5%. Per i trattamenti farmacologici, cellule Daoy (portatrici di mutazione a livello del gene *TP53*) e D283Med (con *TP53 wild-type*) sono state esposte a concentrazioni crescenti di etoposide (1-10 μ M) e cisplatino (5-25 μ M); il veicolo (DMSO) è stato utilizzato come controllo, diluito in terreno completo alla massima concentrazione impiegata per i farmaci.

Per le transfezioni, le cellule venivano seminate la sera precedente il trattamento in piastre a sei pozzetti (Daoy 10000/mm², D283Med 200000/ml); il mattino successivo venivano risospese in terreno senza siero (800uL). 10 μ g di Lipofettamina (Invitrogen) e 2 μ g di plasmide per singola condizione venivano risospesi rispettivamente in 100 μ l di terreno senza siero per 15 minuti, combinati insieme per 45 minuti e poi addizionati alle cellule per 3 ore (D283Med) o 6 ore (Daoy), prima di inattivare la reazione con 1 ml di DMEM addizionato di FBS al 20%. Il giorno successivo, le cellule venivano esposte ai farmaci per la durata e alla concentrazione previste dall'esperimento. Nei saggi di transfezione che prevedevano l'impiego di luciferasi, il controllo della transfezione è stato ottenuto mediante l'impiego di 5 ng di un vettore codificante per renilla luciferase (Promega). La lisi delle cellule alle varie condizioni e la lettura dei segnali di luciferasi è stata ottenuta secondo il protocollo Dual Luciferase Assay (Promega) mediante l'utilizzo di strumento Bio-Rad. Per le transfezioni di siRNA, sono state impiegate sequenze opportunamente disegnate da Dharmacon, utilizzando Oligofettamina (Invitrogen) e poi sottoposte a trattamento farmacologico.

Il ciclo cellulare è stato determinato raccogliendo le cellule in condizioni basali o dopo aggiunta di chemioterapico mediante tripsinizzazione leggera, lavaggio in PBS e fissazione in metanolo puro a -20°C in ghiaccio per almeno 1h; successivamente le cellule venivano reidratate in PBS, risospese in PBS contenente ipratropio bromuro (100 µg/ml). Almeno 10⁵ cellule sono state analizzate per la determinazione del ciclo cellulare.

L'apoptosi è stata determinata mediante saggio TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated byotinilated dUTP nick-end labeling*). Le cellule, raccolte mediante rapida tripsinizzazione, sono state successivamente fissate in paraformaldeide al 4% per 10 minuti, lavate in PBS e conservate a +4°C. La frazione apoptotica è stata determinata mediante kit Frag-EL DNA fragmentation detection (Oncogene), mediante incorporazione di nucleotidi biotinilati e anticorpi anti-biotina marcati con FITC. I nuclei cellulari sono stati marcati con PI per controllo. Almeno 10³ cellule sono state utilizzate per ogni condizione.

L'acquisizione del segnale di fluorescenza (ciclo cellulare e apoptosi) è stata effettuata utilizzando un fluorocitometro a flusso della Becton-Dickinson; l'analisi dei dati fluorimetrici è stata ottenuta mediante software CellQuest.

RISULTATI

Integrazione dei dati di caratterizzazione genomica e espressione genica nel medulloblastoma.

Principali alterazioni del cariotipo nel medulloblastoma e loro relazione con la sopravvivenza.

Lo scopo del primo lavoro era di identificare geni differenzialmente espressi in relazione a cambiamenti della regione cromosomica su cui mappano e verificarne l'impatto sulla sopravvivenza (Figura 1). Abbiamo incluso 71 pazienti con adeguati dati clinici e materiale biologico disponibile per la caratterizzazione del patrimonio genetico mediante CGH. Abbiamo innanzitutto studiato le più comuni variabili cliniche (età, sesso, presenza di metastasi alla diagnosi, sottotipo istologico e regime terapeutico – convenzionale o alte dosi con trapianto autologo di cellule staminali) in relazione alla sopravvivenza globale e libera da malattia. Di tutte le caratteristiche considerate, l'età inferiore ai 3 anni e la presenza di malattia disseminata alla diagnosi hanno mostrato una debole associazione con una prognosi più severa, mentre gli altri fattori non hanno mostrato nessuna relazione statistica con la sopravvivenza (Tabella 1).

La maggior parte dei 71 medulloblastomi studiati mediante CGH ha mostrato alterazioni del patrimonio genetico, riassunte in figura 2. Il cromosoma più frequentemente coinvolto, in accordo con precedenti studi riportati in letteratura, era il 17, con la perdita del braccio corto o il guadagno del braccio lungo in poco meno della metà dei casi, rispettivamente. Le due alterazioni si sono presentate associate, dando luogo all'isocromosoma 17q (l'alterazione genetica più caratteristica del medulloblastoma), in circa un terzo dei casi. L'iso17q è stato l'unica anomalia cromosomica riscontrata in cinque casi, confermando come il guadagno del braccio lungo e la perdita del braccio corto del cromosoma 17 sia nel medulloblastoma un evento importante (27). In generale, le perdite di materiale genetico nel tumore sono state rilevate in maggior numero rispetto al guadagno di regioni cromosomiche. Nel primo caso, le anomalie hanno maggiormente

coinvolto i cromosomi 16, 10, 8 e 11; guadagni di materiale genetico, invece, hanno riguardato le regioni o i cromosomi 2p, 7, 18, X, 2q. L'amplificazione di regioni cromosomiche è stato identificato a livello della regione 2p23-p24, che è risultata l'amplificazione più frequente (n = 4); altre amplificazioni sono state identificate a livello di 2q14, 7q34, 12p13 (n = 2 ciascuna); in un unico caso è stata identificata l'amplificazione a carico di 8q23-q24. Data la risoluzione del *chromosomal CGH*, le regioni 2p23-p24 e 8q23-q24 con molta probabilità comprendono i geni MYCN e MYC, rispettivamente.

Il guadagno di 8q23-q24 e il guadagno o l'amplificazione di 2p23-p24 non erano associati in maniera statisticamente significativa alla variante anaplastica / a grandi cellule, mentre l'unica amplificazione 8q23-q24 è stata identificata in un medulloblastoma anaplastico.

Per verificare il possibile significato prognostico delle alterazioni del patrimonio genetico, abbiamo selezionato le anomalie genetiche presenti in almeno il 10% dei campioni. I 71 pazienti sono stati stratificati per la presenza o meno di ogni specifica lesione e mediante analisi di Kaplan-Meier abbiamo verificato la relazione di ogni anomalia con la prognosi. Delle più frequenti alterazioni, nessuna è risultata statisticamente associata alla sopravvivenza globale. Il guadagno della regione 8q23-q24 ha presentato la significatività maggiore (p=0.0141) in relazione alla prognosi. In aggiunta, eliminando l'unico caso che presentava una amplificazione della stessa regione, questo valore statistico diveniva ancora maggiore (p=0.0005). Abbiamo verificato mediante analisi multivariata la importanza di tale guadagno anche in relazione all'entità della resezione, l'età, o la presenza di malattia disseminata alla diagnosi (Figura 3a). Il guadagno di 8q era ancora statisticamente associato alla sopravvivenza libera da malattia o sopravvivenza generale (p=0.003 e p=0.013, rispettivamente, Cox analisi). Tra le altre lesioni, solo il guadagno di 2p ha mostrato un trend per quanto riguarda la sopravvivenza, con una prognosi decisamente peggiore per i casi con amplificazione della regione contenente *MYCN* (Figura 3b).

Studio d'espressione genica di geni che mappano su 8q.

Abbiamo successivamente analizzato il possibile contributo di MYC alla prognosi. Il dato di CGH mostra come, escludendo l'unico caso con amplificazione della regione 8q23-q24, la significatività per la prognosi aumenti in modo significativo. Di 64

medulloblastomi, inoltre, avevamo i dati dell'analisi microarray per il profilo di espressione genica (dati precedentemente pubblicati) e 27 di questi sono stati anche studiati mediante CGH per la definizione del genoma. Abbiamo stratificato i 64 pazienti per l'espressione di *MYC* in base ai dati dei microarray in due gruppi, in relazione alla mediana. I pazienti i cui tumori avevano un'espressione minore di *MYC* non presentavano una curva di sopravvivenza statisticamente migliore rispetto al gruppo con elevata espressione. Questo dato concorda con l'analisi dei dati ottenuti mediante CGH nell'affermare che, in generale, l'amplificazione o l'espressione di *MYC* non influenzano in maniera significativa la prognosi dei pazienti affetti da medulloblastoma.

In considerazione dell'assenza di impatto prognostico di *MYC*, abbiamo ricercato altri possibili geni, mappanti su 8q, la cui espressione potesse essere posta in relazione alla sopravvivenza. Abbiamo utilizzato il sottogruppo di 27 pazienti per i quali era disponibile l'analisi del genoma e dell'espressione genica. Dei tre tumori che presentavano un guadagno della regione 8q23-q24, abbiamo analizzato il profilo di espressione genica, comparandolo a quello dei restanti medulloblastomi. Dei 149 geni differenzialmente regolati (almeno 1.5 volte rispetto al gruppo di controllo, $p < 0,05$), 27 erano sovraespressi e cinque mappavano sulla regione di interesse. I 64 pazienti con dati di espressione genica sono stati stratificati rispetto alla mediana di espressione per ogni singolo gene. Tre dei cinque geni che mappano su 8q sono risultati significativamente associati alla prognosi globale e libera da malattia nel gruppo di 64 pazienti: eukaryotic translation elongation factor 1D (*EEF1D*: $p=0.014$ e 0.085 , rispettivamente); ribosomal protein L30 (*RPL30*: $p=0.014$ e 0.0018); ribosomal protein S20 (*RPS20*: $p=0.0005$ e 0.0213) (Figura 3). Abbiamo infine indagato se vi fosse una correlazione tra l'espressione di *MYC* e i tre geni ribosomiali nel gruppo di 64 tumori con i dati dell'analisi microarray, ma non è stato possibile identificare una relazione diretta (28).

Studio di proteine che alterano la funzione di p53 nel medulloblastoma

Caratterizzazione dei livelli di espressione di p53 e p73.

Al fine di appurare il possibile ruolo su p53 delle diverse isoforme di p73 nel medulloblastoma, abbiamo innanzitutto determinato il livello di espressione dei geni

oggetto di studio, nelle linee cellulari Daoy e D283Med e in 34 campioni primitivi di medulloblastoma. La linea cellulare Daoy, con mutazione a carico del gene *TP53*, esprime alti livelli basali di *TP53*, simili a quello del cervello fetale e marcatamente maggiore del cervelletto adulto; al contrario, le D283Med esprimono bassi livelli basali di *TP53*, sia minori del cervelletto adulto sia del cervello fetale. I livelli d'espressione di *TP53* nei tumori primitivi è maggiore di quello del cervello fetale e soprattutto di quello del cervelletto adulto. Entrambe le linee cellulari esprimono livelli elevati di *TAp73* e delle sue isoforme tronche N-terminali (qui indicate globalmente come $\Delta Np73$), anche se le D283Med, la cui sequenza di *TP53* non è mutata, presentano livelli di espressione molto maggiori rispetto alle Daoy sia di *TAp73*, sia di $\Delta Np73$. Livelli ancora maggiori delle diverse isoforme di *TP73* sono stati misurati nei tumori primitivi, che, rispetto allo stesso controllo (cervelletto adulto umano), presentavano marcatissimi livelli sia della forma completa *TAp73*, sia delle restanti isoforme $\Delta Np73$ (Figura 4a). In considerazione del particolare interesse per $\Delta Np73$, la cui proteina si ritiene eserciti un ruolo antagonista di p53, abbiamo analizzato i livelli di espressione delle singole isoforme tronche nei residui N-terminali. Nella nostra serie di campioni primitivi studiati (n = 34), non abbiamo osservato significative differenze nell'espressione dei diversi trascritti di tali isoforme (Figura 4b). L'analisi del contenuto proteico ha confermato la bassa espressione basale di p53 nelle D283Med rispetto alle Daoy e ai tumori primitivi. Abbiamo, inoltre, rilevato una marcata espressione di *TAp73* e $\Delta Np73$ a livello di linee cellulari, mentre i tumori primitivi esprimono livelli molto maggiori di $\Delta Np73$ rispetto alla isoforma completa *TAp73* (Figura 4c). Questi risultati suggeriscono un complesso sistema di regolazione dell'espressione delle varie proteine, indicando come meccanismi post-trascrizionali possano contribuire in modo rilevante alla determinazione dei livelli finali di proteina. La comparazione della determinazione proteica con i risultati ottenuti dalla qRT-PCR ha confermato i risultati per le D283Med, mentre le Daoy esprimono più proteina intera rispetto alle isoforme tronche; infine, i tumori primitivi esprimono *TAp73* a livelli minori rispetto alla presunta forma dominante negativa $\Delta Np73$ (Figura 4c).

Significato clinico dei livelli di espressione di p73.

Abbiamo stratificato i 34 pazienti analizzati per l'espressione di *TP73* in gruppi diversi in relazione all'espressione di *TAp73* e, mediante analisi di Kaplan-Meier, abbiamo riscontrato un *trend* verso una migliore sopravvivenza globale e libera da

malattia nei pazienti con più alta espressione di TAp73, mentre i livelli di RNA di TP53 e DNp73 non erano legati in alcun modo alla prognosi dei pazienti (Figura 5). Inoltre, non sono state individuate relazioni tra i livelli di mRNA delle diverse isoforme di p53 e p73 e le principali variabili cliniche prese comunemente in considerazione (età del paziente, entità della resezione, presenza di metastasi alla diagnosi).

Significato funzionale dell'espressione di p53, TAp73 e ΔNp73 nel medulloblastoma.

Dal momento che i campioni di tumori primitivi analizzati sono stati raccolti prima di qualsiasi tipo di trattamento, i livelli di espressione di p53 e p73 non riflettono le alterazioni dinamiche che possono essere determinate dai trattamenti stessi nei tumori primitivi. Per indagare se i farmaci di comune impiego nella pratica clinica inducano o meno una diversa espressione delle varie proteine, abbiamo studiato le linee cellulari parentali di medulloblastoma prima e dopo trattamento chemioterapico con cisplatino (CDDP), etoposide (VP16), doxorubicina. La linea cellulare Daoy, che esprime livelli basali più alti di p53, ha mostrato solo una minima induzione di tale proteina rispetto alle D283Med (Figura 6a), probabilmente perché la proteina mutata non subisce le medesime regolazioni di quella integra. I trascritti del gene *TP73*, invece, vengono decisamente sovraespressi, soprattutto per quanto riguarda le forme tronche *ΔNp73* (Figura 6a). Al contrario, il trattamento chemioterapico nelle D283Med determina un incremento soprattutto di *TP53* e del trascritto delle forme tronche *ΔNp73*, mentre i livelli di espressione della *TAp73* non si modifica significativamente (Figura 6b).

La transfezione delle linee cellulari stabilizzate con plasmidi, al fine di forzare l'espressione di p53, TAp73 e ΔNp73, ha permesso di rilevare le proteine indotte mediante western-blot. L'induzione di elevati livelli di p53 *wild-type* esogena, sia nelle Daoy sia nelle D283Med, ha determinato un incremento della frazione apoptotica misurata come picco pre-G0/G1 mediante citofluorimetria, in condizioni basali e dopo trattamento farmacologico. Al contrario, l'espressione di TAp73 o ΔNp73 nelle Daoy non ha modificato la percentuale di cellule in apoptosi sia in condizioni basali sia dopo esposizione ai farmaci. Tale risultato indica che p53 rimane probabilmente una proteina essenziale anche rispetto alle specifiche funzioni di p73 e che, quindi, la mutazione presente nelle Daoy impedisce le funzioni di induzione dell'apoptosi o del blocco del

ciclo cellulare. Diversamente, nelle D283Med l'induzione sia di TAp73 sia di Δ Np73 aumenta l'apoptosi in condizioni basali e dopo stress indotto da farmaci. Questo risultato suggerisce che sia TAp73 sia Δ Np73 richiedano la presenza di p53 *wild-type* per esercitare un ruolo ma altresì che il diverso ruolo delle due isoforme non risulta completamente distinto, almeno apparentemente, in quanto entrambe determinano l'incremento di apoptosi (Figura 7) (97).

WIP1 è espresso maggiormente nei medulloblastomi che mostrano un guadagno di 17q.

Anche per lo studio di WIP1, inizialmente abbiamo caratterizzato le linee cellulari e 34 medulloblastomi primitivi per l'espressione di *WIP1* mediante studio del trascritto mRNA. Mentre le Daoy esprimono bassi livelli di *WIP1*, le D283Med, che sono caratterizzate dalla presenza di iso17q, lo esprimono ad elevati valori, se comparate al cervello fetale. L'analisi dei tumori primitivi ha mostrato livelli globali di espressione maggiore in tutti i tumori rispetto al cervello fetale e alle linee cellulari. Studiando i livelli del trascritto in base alla presenza o meno di guadagno del braccio lungo del cromosoma 17, abbiamo notato come l'espressione di *WIP1* sia notevolmente maggiore nei tumori con guadagno del braccio lungo del cromosoma 17 o presenza di iso17q, rispetto agli altri medulloblastomi primitivi. Questa associazione tra citogenetica ed espressione di *WIP1* mRNA è risultata statisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 8a).

Un sottogruppo di 10 medulloblastomi è stato analizzato anche mediante tecnica western-blot per valutare il grado di espressione di WIP1 a livello proteico. Questa valutazione ha confermato come le D283Med esprimano anche in termini di proteine maggiori livelli di WIP1 rispetto alle Daoy. Tra i tumori primitivi, cinque avevano un guadagno di 17q o iso17q, uno una trisomia 17, mentre i restanti quattro non erano caratterizzati da nessuna alterazione a carico del braccio lungo del cromosoma 17. Anche questa analisi ha confermato, seppur su un ridotto numero di campioni di tumore, la maggior espressione di WIP1 nei medulloblastomi con guadagno di materiale genetico nella regione 17q rispetto agli altri tumori (Figura 8b).

WIP1 interferisce con l'attivazione del pathway di p53 in linee cellulari stabilizzate di medulloblastoma.

In maniera simile a quanto effettuato per p53 e p73 nelle diverse isoforme, abbiamo transfettato con vettori di espressione per WIP1 le cellule stabilizzate (Daoy e D283Med), per indurre aumentati livelli di proteina. Il trattamento delle Daoy e delle D283Med con agenti citotossici causa un aumento della quantità totale di p53 e della sua attivazione, determinata mediante misurazione della forma fosforilata sul residuo Ser-15. La transfezione di WIP1 contrasta l'induzione e l'attivazione di p53, come mostrato in figura 9. Infatti, in entrambe le linee cellulari, la aumentata espressione di WIP1 riduce sia il livello totale di p53, sia la forma fosforilata (Figura 9a). Abbiamo utilizzato anche un approccio con plasmide *reporter* per analizzare l'attivazione del *pathway* di p53. Il gene della Luciferasi, sotto controllo del promotore di p21, viene trascritto in risposta all'attivazione di p53 e in tal modo viene sintetizzata la luciferasi, che genera una reazione fluorescente se posta a contatto con apposito reagente. Quindi, una maggior fluorescenza della luciferasi si spiega con l'aumentata trascrizione indotta da p53 sul promotore di p21. La transfezione di p53 ha determinato un incremento del segnale luminoso, evidenziando una attivazione di p53 sia nelle Daoy sia nelle D283Med. La co-transfezione di p53 insieme con WIP1 ha prodotto una riduzione del segnale luminoso della luciferasi, indicando così come WIP1 nel sistema cellulare impiegato inibisce direttamente p53 o interferisca con la sua attivazione (Figura 9b).

Abbiamo poi trattato le linee cellulari stabilizzate con etoposide per 24 ore a concentrazioni sub-tossiche e ne abbiamo studiato le alterazioni a livello di ciclo cellulare e gli effetti sull'apoptosi (Figure 9c e 9d). In particolare, l'aumento dell'apoptosi rilevata nelle D283Med dopo trattamento era significativamente maggiore rispetto a quella che è stata notata nelle Daoy ($p = 0,033$). Tale dato può essere spiegato ancora una volta dalla presenza della mutazione a livello di *TP53* che previene l'induzione della morte cellulare. Infatti, l'espressione di p53 esogena ha almeno parzialmente compensato le funzioni della proteina endogena inattiva. L'incremento della frazione di cellule in fase sub G_0 - G_1 dopo trattamento chemioterapico e transfezione con p53 è risultato maggiore e statisticamente significativo in entrambe le linee cellulari ($p = 0,019$ per le D283Med; $p = 0,044$ per le Daoy). La transfezione di WIP1 e la co-transfezione di p53 e WIP1 nella linea cellulare D283Med ha ridotto in maniera significativa la percentuale di cellule in fase sub G_0 - G_1 soprattutto in condizioni basali ($p = 0,013$ e $p = 0,026$, rispettivamente). Dopo

trattamento citotossico, la co-transfezione di WIP1 e p53 non ha determinato cambiamenti nella percentuale di cellule in apoptosi rispetto al controllo (vettore per l'espressione di GFP), mentre tale valore era minore rispetto alle cellule transfettate per la sola p53.

Presi globalmente, tutti questi dati confermano come, anche nel medulloblastoma, WIP1 eserciti una funzione anti-apoptotica, interferendo con l'azione e l'attivazione di p53 (98).

DISCUSSIONE

La maggior parte del mio lavoro di ricerca durante il programma di dottorato è stata dedicata alla caratterizzazione molecolare del medulloblastoma e all'identificazione di fattori responsabili della trasformazione maligna o in grado di influenzare l'aggressività del tumore, con un'ottica particolare alla risposta terapeutica e alla prognosi dei bambini affetti.

Il primo ambito di attività ha previsto l'integrazione delle informazioni ottenute attraverso lo studio delle alterazioni genomiche e dell'espressione genica nel medulloblastoma. La frequenza delle principali alterazioni presenti nella nostra serie, comprendente 71 campioni primitivi, è simile a quella riportata in altri lavori. In particolare, la perdita del braccio corto e il guadagno del braccio lungo del cromosoma 17 sono risultate le più comuni, seguite da perdite delle regioni o dei cromosomi 16q, 10q, 8p, 16p6q, 10p, 9q, 11p e dal guadagno di 7q, 2p, 7p. La presenza di tutte queste alterazioni non è risultata significativamente associata alla sopravvivenza globale o libera da malattia in base alla valutazione dei dati clinici dei nostri pazienti. Alcuni lavori, invece, hanno identificato una possibile relazione tra alterazioni del genoma e prognosi (35-38, 99), anche se questi risultati appaiono ancora controversi, dato che in altri studi non è stata riscontrata alcuna relazione tra alterazioni del genoma e sopravvivenza (27, 30, 31). In particolare, il cambiamento significativo per la prognosi identificato con maggior frequenza è senza dubbio la perdita del braccio corto del cromosoma 17 (35-38, 99). In base all'analisi della nostra casistica, invece, possiamo affermare come tale cambiamento coesista in maniera significativa con il guadagno e, soprattutto, l'amplificazione della regione 2p23-p24, comprendente l'oncogene *MYCN*. L'amplificazione è stata rilevata in quattro campioni e tre di essi presentavano anche la delezione 17p ($p = 0.005$). Le amplificazioni a carico dei principali oncogeni sono un evento non molto frequente nel medulloblastoma. Anche in questo caso, i nostri dati concordano con quelli ottenuti mediante un'altra tecnica in una serie diversa (100). Proprio l'amplificazione o l'elevata espressione dell'oncogene *MYCN*, secondo la nostra ipotesi, si possono accompagnare alla perdita di 17p come epifenomeno o come alterazione aggiuntiva e peggiorativa e, pertanto, possono influenzare la prognosi. Il

nostro lavoro ha evidenziato come il guadagno della regione 8q23-q24 si associ in modo statisticamente significativo alla prognosi. Inoltre, escludendo l'unico paziente con amplificazione a carico della stessa regione, la relazione diviene statisticamente ancora più significativa, suggerendo come altri geni, e non solo MYC, possano influenzare il fenotipo rendendolo più aggressivo. Infatti, anche l'analisi dell'espressione genica ottenuta mediante microarray, ha confermato come una elevata espressione di MYC non si associ a una peggiore sopravvivenza in una casistica di 64 tumori. Invece, la nostra analisi ha individuato tre geni, che mappano sul cromosoma 8q, espressi ad alto livello nei tumori con guadagno di 8q e i cui elevati livelli sono in relazione con una minore sopravvivenza globale e libera da malattia. Dal momento che abbiamo rilevato una maggior espressione di tali geni anche in campioni di tumori che non presentano guadagno della regione 8q, si può supporre che meccanismi alternativi di induzione, diversi dalla semplice alterazione genomica, possano contribuire a determinare il fenotipo tumorale e la sopravvivenza dei pazienti. Tutti e tre i geni individuati sono coinvolti nelle funzioni ribosomiali: RPS20 codifica per una proteina che compone la subunità 60S dei ribosomi, mentre RPL30 costituisce parte della subunità 40S. EEF1D è coinvolto nel legame del t-RNA al ribosoma, durante l'allungamento della catena proteica. Questo reperto conferma come l'espressione di geni ribosomiali sia parte fondamentale della biologia cellulare per garantire un vantaggio alla crescita tumorale. L'individuazione dei meccanismi, che la cellula tumorale stessa mette in atto per garantirsi le basi per un più sostenuto metabolismo, rimangono da chiarire e possono al contempo gettare nuova luce sui meccanismi di tumorigenesi e fornire ulteriori spunti per terapie più selettive (41).

I meccanismi molecolari alla base del medulloblastoma non sono ancora chiariti e la regolazione della risposta alle terapie messe in atto verso tale neoplasia (sia farmacologica sia radiante) può contribuire all'*outcome* finale dei pazienti affetti. Evidenze sperimentali chiamano in causa *TP53* nel processo di tumorigenesi, ma questo gene presenta mutazioni solo in una minima parte dei medulloblastomi primitivi finora studiati (56-58, 101). Il *pathway* di p53 appare peraltro fortemente perturbato nel medulloblastoma e i livelli di espressione di p53 sono molto elevati proprio nelle forme ad alta malignità come l'anaplastico / a grandi cellule (64, 65). È verosimile che molteplici eventi concorrano a inibire l'attivazione o la funzione della proteina stessa, prevenendo la messa in atto dei meccanismi volti al controllo del ciclo cellulare e all'induzione dell'apoptosi in risposta a insulti al genoma. Abbiamo quindi cercato di studiare alcuni fattori in grado di inibire o alterare p53 e il *pathway* indotto, permettendo

alle cellule normali di sfuggire ai normali meccanismi omeostatici e di controllo sulla proliferazione e trasformazione maligna.

TP73 appartiene alla famiglia di *TP53*. Il gene è localizzato a livello di 1p36, regione frequentemente deleta nel medulloblastoma. La struttura della proteina derivante dal gene *TP73* presenta numerose analogie con quella di p53. Il trascritto di *TP73* può dar origine a diverse isoforme con funzioni non ancora del tutto chiarite, sia nelle cellule normali, sia nelle cellule tumorali (67). Come per p53, anche p73 presenta diverse isoforme caratterizzate da differenti porzioni nelle sequenze carbossi-terminali, la cui scoperta richiede ulteriori studi volti a precisare meglio le specifiche funzioni (68-71). Del gene *TP73*, inoltre, sono state descritte numerose varianti caratterizzate, rispetto alla forma nativa, dal troncamento a livelli diversi nelle sequenze N-terminali, riferite come $\Delta Np73$ (79, 102, 103). La proteina completa esplicherebbe funzioni simili a quelle di p53, inducendo la sintesi e la attivazione di proteine atte a bloccare il ciclo cellulare o di indurre l'apoptosi in cellule per le quali il danno genomico non permette la riparazione. È stato proposto che le isoforme tronche nelle sequenze N-terminali agiscano come una proteina dominante negativa, prevenendo l'azione di p53 e p73 e quindi proteggendo dall'apoptosi. Tali proteine sono espresse a diversi livelli nel sistema nervoso centrale durante lo sviluppo e la vita adulta (82). Il nostro lavoro ha confermato come anche tessuti cerebrali non trasformati esprimano queste isoforme, mentre linee cellulari e soprattutto campioni di medulloblastoma esprimono i trascritti e le proteine a elevati livelli. L'analisi quantitativa ha evidenziato come elevati livelli della forma nativa *TAp73* presentino un trend verso una migliore sopravvivenza dei pazienti. Elevati livelli di *TAp73* e $\Delta Np73$ possono influenzare il fenotipo del tumore e regolare la risposta delle cellule maligne agli eventi citotossici, interagendo con p53 potendo rivestire quindi un significato funzionale.

I nostri dati indicano che il trattamento con agenti chemioterapici determina un aumento dei livelli di espressione di p73, in particolare di $\Delta Np73$. Per meglio chiarire il significato funzionale delle diverse isoforme di p73, abbiamo forzato l'espressione di p53, *TAp73* e $\Delta Np73$ nelle linee di medulloblastoma e determinato i cambiamenti a livello di ciclo cellulare e frazione delle cellule in apoptosi, in condizioni basali e dopo stress citotossico. Abbiamo determinato come l'aumentata espressione di tali geni alteri il profilo del ciclo cellulare e induca l'apoptosi, specialmente dopo risposta al trattamento farmacologico. I nostri dati supportano l'ipotesi che le isoforme di p73 agiscano

complementando l'azione di p53, ma necessitano della forma nativa della proteina (e quindi completamente attiva) per determinare i loro effetti. Il modello iniziale, che presupponeva che TAp73 esercitasse una funzione pro-apoptotica, mentre $\Delta Np73$ contrastasse tali effetti, sembra oggi eccessivamente semplificativo (77, 102, 103). Infatti, anche in altri sistemi cellulari le due isoforme non sembrano contrastarsi reciprocamente. Questi dati via via emergenti, indicano come le funzioni delle diverse isoforme di p73 sembrano dipendere dal contesto biologico cellulare e suggeriscono che molteplici fattori entrino in gioco nel determinare l'azione pro- o anti-apoptotica. Le relazioni tra le diverse isoforme di p73, e tra queste e p53, sono ancora da definire, anche se appare chiaro come in molti casi il ruolo di questi legami sia determinante (79).

WIP1 è un gene direttamente regolato anche da p53, che codifica per una serina-treonina fosfatasi. La proteina può contrastare l'attività di p53 defosforilandola sui residui aminoacidici chiave o contribuendo alla stabilizzazione di MDM2, che ubiquitinizza p53 e ne determina la degradazione proteosomiale (88, 104, 105). Guadagno o amplificazioni a livello della regione 17q23, dove mappa il gene *WIP1*, sono frequenti nel medulloblastoma (35). Nel nostro lavoro, abbiamo dimostrato una elevata espressione di *WIP1* nei tumori rispetto ai controlli normali, ed in particolar misura nei tumori che sono caratterizzati dal guadagno della regione coinvolta. Gli alti livelli di *WIP1* possono conferire un vantaggio alle cellule tumorali, garantendo l'inattivazione di p53 e prevenendo i controlli propri sul ciclo cellulare. Anche i tumori primitivi, esprimendo maggiori quantità di *WIP1*, riescono meglio ad evadere i controlli previsti sul ciclo cellulare, anche dopo trattamento radiante o con farmaci citotossici. Abbiamo quindi utilizzato linee cellulari stabilizzate di medulloblastoma per studiare il possibile ruolo di *WIP1* nell'inibizione di p53 in risposta alla terapia.

Come era prevedibile, un'aumentata espressione di p53, anche in cellule con proteina nativa, determina l'aumento della frazione cellulare apoptotica, sia in condizioni basali ma soprattutto dopo stress citotossico. Una maggiore espressione di *WIP1*, per converso, ha bloccato tale azione, nelle cellule con p53 mutante e p53 nativa, in maniera molto più evidente nelle cellule esposte all'etoposide.

CONCLUSIONE

L'identificazione delle variabili biologiche associate alla prognosi rimane uno dei fattori determinanti per la conoscenza e la gestione del medulloblastoma. Infatti, la migliore stratificazione dei pazienti in base ai fattori di rischio clinici e soprattutto biologici potrà consentire di predire quali pazienti presentino una neoplasia aggressiva e quali siano affetti da una neoplasia con caratteristiche maligne più contenute, modulando la terapia in maniera conseguente. Questo potrà permettere di migliorare la sopravvivenza globale in quei pazienti per i quali la prognosi appare ancor oggi grave, e di limitare gli effetti a distanza della terapia per i bambini affetti da tumore relativamente più benigno.

La complessità della biologia del medulloblastoma rappresenta al momento attuale un problema clinico importante e al contempo costituisce una sfida al clinico e al ricercatore, che sono chiamati a mettere a punto strategie sempre più personalizzate per un percorso clinico incentrato sulla singola malattia e sull'individuo affetto.

Il lavoro esposto ha cercato di rispondere ad alcuni quesiti, individuando marcatori biologici apparentemente in grado di influenzare il decorso clinico del medulloblastoma. Gli studi funzionali sono ancora in corso, con il preferenziale obiettivo di chiarire i cambiamenti alla base della risposta alla terapia e i meccanismi di evasione messi in atto dalle cellule tumorali, che continuano a crescere o possono causare la recidiva.

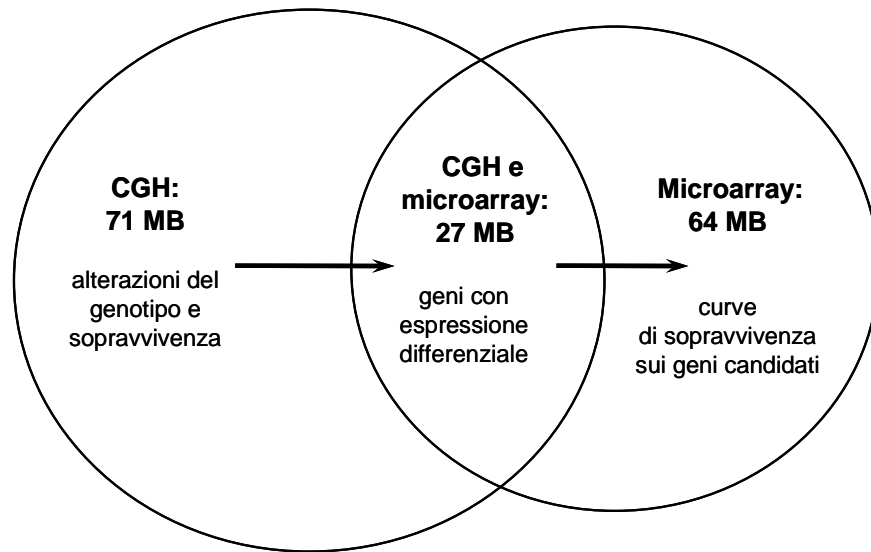
ICONOGRAFIA

Tabella 1.

PAZIENTI E CARATTERISTICHE DEI MEDULLOBLASTOMI	71 tumori Analizzati con CGH	27 tumori Analizzati con CGH e microarray	64 tumori Analizzati con microarray
Età in mesi (mediana) (media; range)	80 (89.4; 7-458)	73 (93.6; 7-458)	74 (99.9; 7-458)
Follow-up in mesi (mediana) (media; range)	36 (39; 4-109)	39 (40.2; 7-80)	39 (46; 5-130)
Pazienti di età < 3 anni (p)	14 (0.079)	7 (0.593)	11 (0.656)
Metastasi (sec Chang) M0: M+ (p)	54 : 17 (0.106)	20 : 7 (0.1132)	43 : 21 (0.116)
Sesso- maschio: femmina (p)	51 : 20 (0.911)	18 : 9 (0.592)	42 : 22 (0.328)
ISTOLOGIA			
Classico (p)	32 (0.714)	16 (0.461)	43 (0.652)
Nodulare / Desmoplastico (p)	22 (0.558)	8 (0.327)	15 (0.46)
Anaplastico / a grandi cellule (p)	14 (0.844)	0	0
Misti (p)	3 (0.935)	3 (0.769)	6 (0.736)

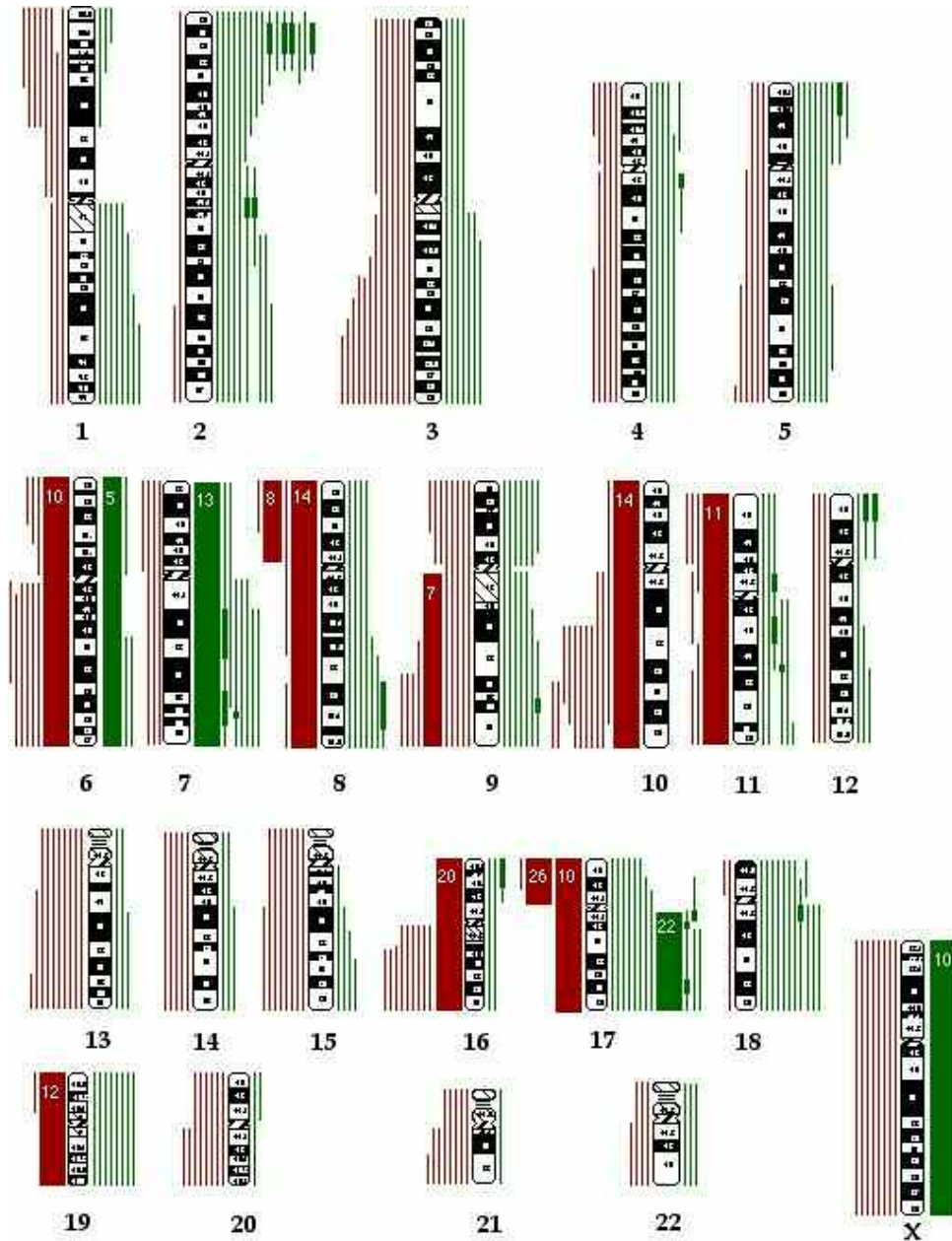
Principali caratteristiche cliniche e patologiche dei tumori compresi nello studio.

Figura 1.



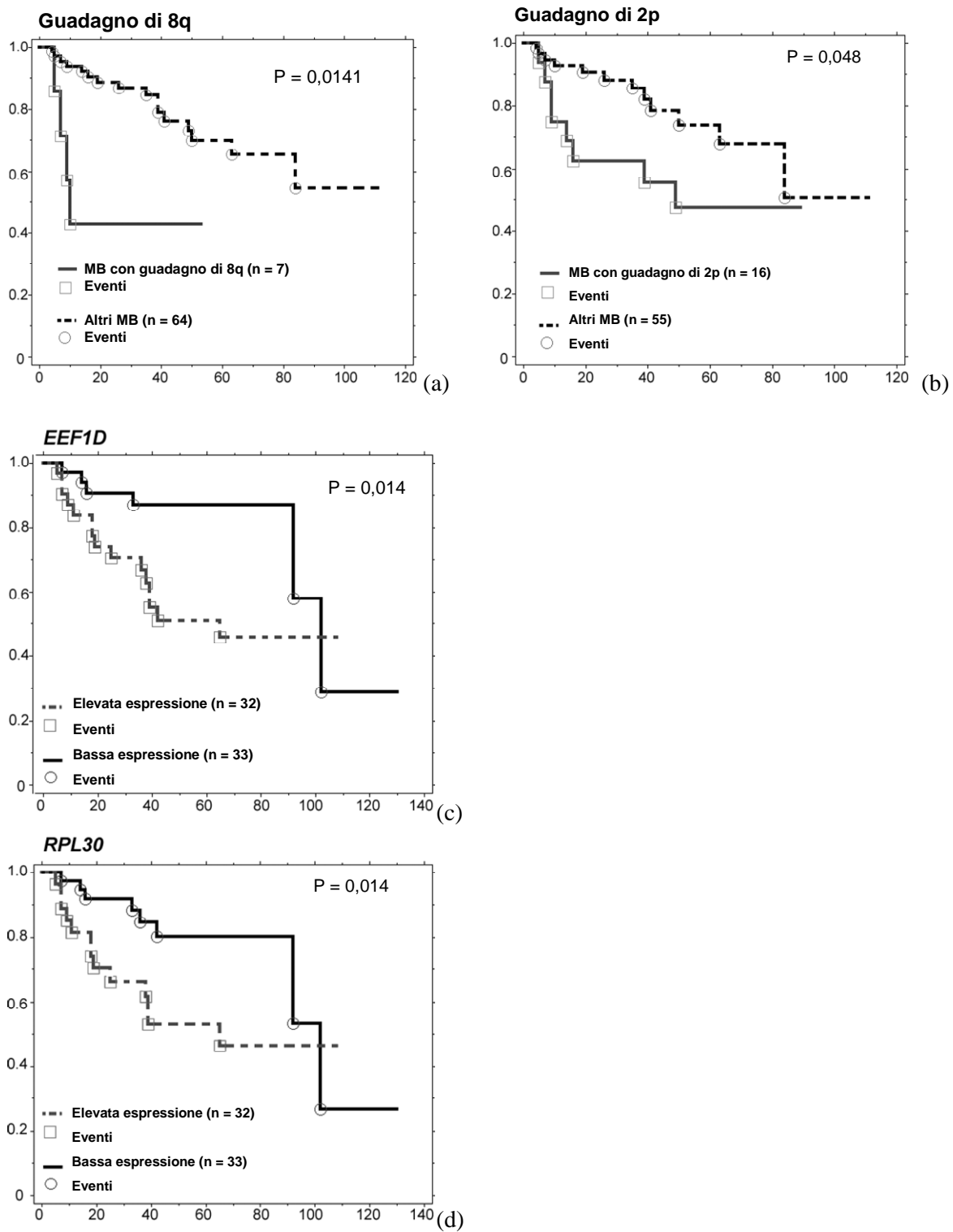
Schema del disegno sperimentale dello studio di integrazione dei dati del profilo genomico e di espressione genica. 71 medulloblastomi (MB) sono stati studiati per i cambiamenti a carico del genoma. Le alterazioni più frequenti sono state analizzate in relazione alla sopravvivenza dei pazienti affetti. Il sottogruppo di 27 campioni ha permesso di studiare i geni differenzialmente regolati nei tumori con guadagno di 8q e di selezionare i cinque geni che mappavano sulla stessa regione cromosomica. L'espressione dei cinque geni candidati è stata studiata mediante curve di Kaplan-Meier nel gruppo di 64 medulloblastomi studiati precedentemente per il profilo di espressione genica; i pazienti sono stati stratificati a seconda che l'espressione dei geni fosse maggiore o minore della mediana.

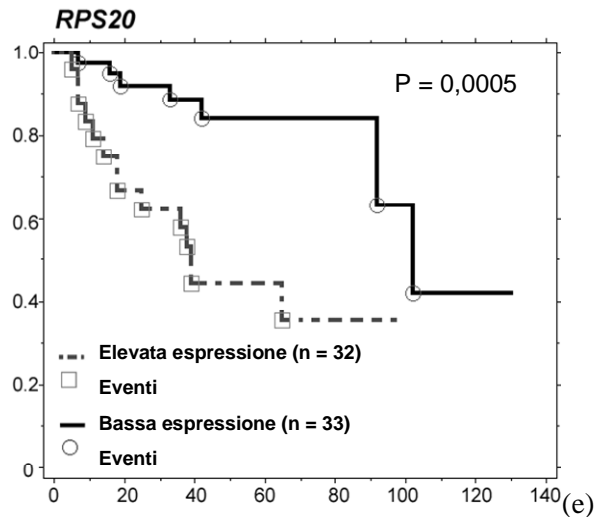
Figura 2.



Ideogramma riassuntivo delle alterazioni rilevate mediante Comparative Genomic Hybridization (CGH) in 71 medulloblastomi. le linee rosse alla sinistra dei cromosomi rappresentano perdite di materiale genetico, mentre quelle verdi alla destra corrispondono a ogni singolo guadagno di regione cromosomica. Le amplificazioni sono state raffigurate come linee ispessite. Le lesioni più frequenti sono state le perdite, mentre il cromosoma 17 è stato coinvolto in circa una metà dei casi.

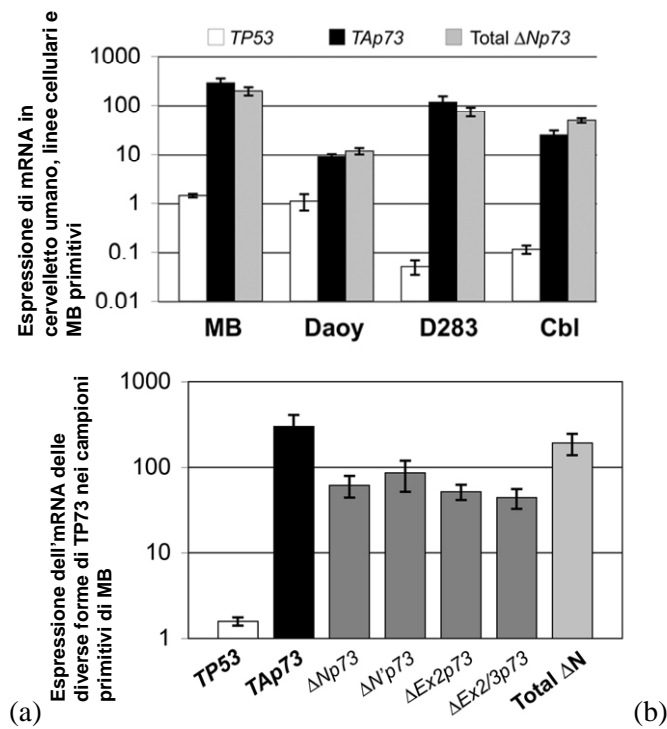
Figura 3.





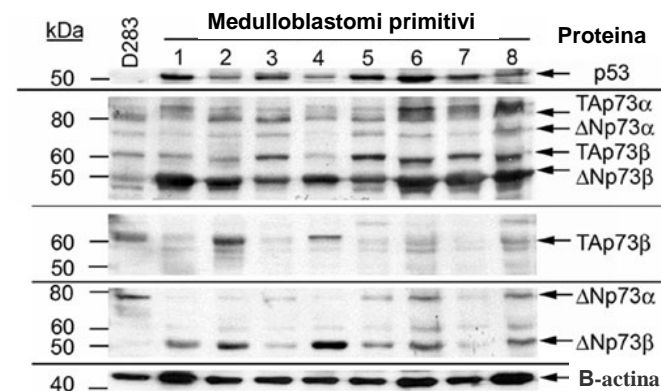
Curve di sopravvivenza nei pazienti affetti da medulloblastoma. Le più frequenti lesioni riscontrate nei 71 medulloblastomi con caratterizzazione genomica sono state valutate analizzate con metodo di Kaplan-Meier per la sopravvivenza in relazione o meno alla presenza di ogni singola lesione cromosomica. Il guadagno di 8q (a) ha mostrato la più alta significatività ($p = 0.0141$), mentre il guadagno di 2p ha mostrato un trend verso una minore sopravvivenza ($p = 0.0848$), valore che assumeva una significatività maggiore considerando anche le amplificazioni (b). I candidati geni identificati mediante integrazione dei dati del profilo genico e d'espressione sono stati valutati con un approccio simile, stratificando i pazienti a seconda dell'espressione maggiore o minore della mediana nel gruppo di 64 medulloblastomi precedentemente studiati mediante microarray. Le curve di sopravvivenza in (c), (d), (e) raffigurano l'aspettativa di vita in pazienti affetti da medulloblastoma a secondo dei livelli di espressione dei geni: EEF1D, RPL30, RPS20 (rispettivamente).

Figura 4.



(a)

(b)

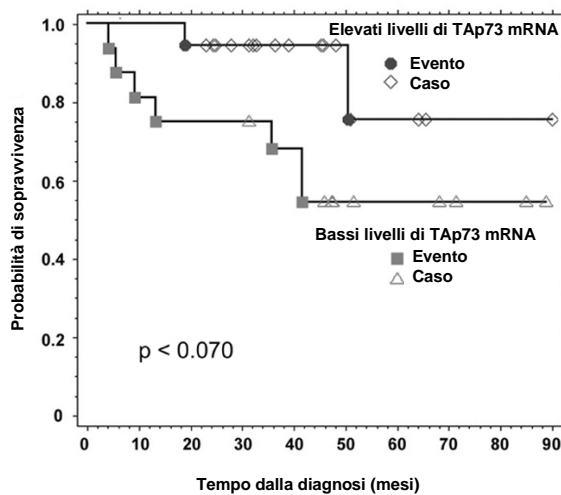


(c)

I campioni primitivi di medulloblastoma esprimono elevati livelli di TAp73 e ΔNp73 e minori livelli di TP53 rispetto al cervello umano fetale. (a) In relazione al tessuto di controllo (cervello fetale umano), il cervelletto umano adulto, le linee cellulari stabilizzate di medulloblastoma (Daoy e D283Med) e in 34 tumori primitivi, esprimono alti livelli di TAp73 e ΔNp73. L'espressione è maggiore, in generale, per la forma completa (TAp73). Il trascritto di TP53 non variava significativamente nei campioni primitivi e nella linea cellulare Daoy (portatrice di mutazioni nel dominio legante il DNA), mentre è stato rilevato un minore livello di espressione nelle D283Med e nel cervelletto umano adulto. (b) Istogramma riassuntivo dell'espressione delle diverse isoforme di TP73 in 34 tumori primitivi. TAp73 è stato rilevato ai più alti livelli rispetto al tessuto di controllo, mentre le diverse forme tronche nella parte N-terminale hanno mostrato livelli elevati ma sostanzialmente senza differenze di rilievo. Le colonne rappresentano l'espressione relativa al tessuto di controllo (cervello umano fetale) normalizzata per l'espressione di GAPDH.

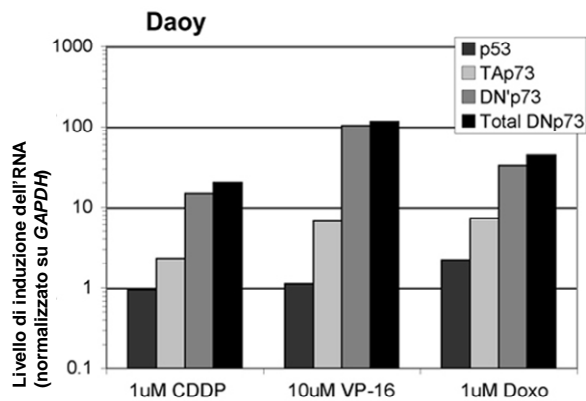
(c) L'analisi western blot di linee cellulari e campioni primitivi di medulloblastoma ha confermato gli elevati livelli di TAp73, ma ha altresì evidenziato la ancor maggiore espressione di $\Delta Np73$ nei tumori rispetto alle cellule in coltura, suggerendo molteplici meccanismi di regolazione dell'espressione, anche a livello post-trascrizionale.

Figura 5.

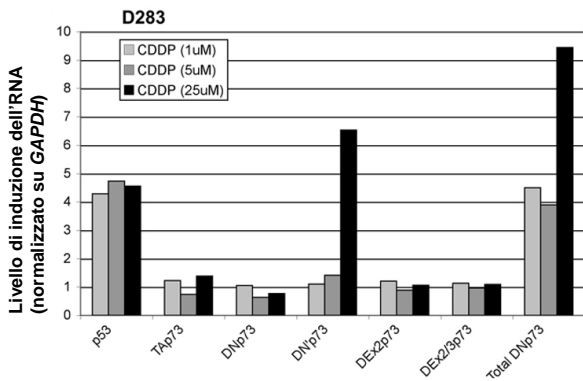


I livelli di espressione di TAp73 correlano con la prognosi dei pazienti affetti da medulloblastoma. In accordo con la determinazione delle copie di RNA nei diversi tumori, abbiamo stratificato i campioni in base all'espressione relativamente al valore mediano. Pazienti con livelli di TAp73 elevati presentano un trend verso una prognosi migliore ($p < 0,07$).

Figura 6.



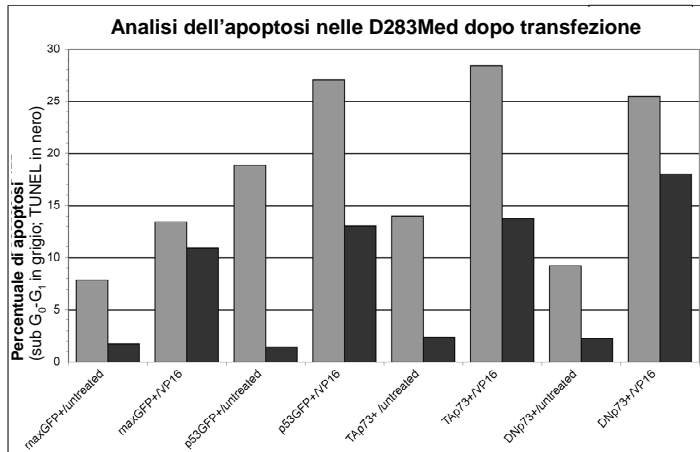
(a)



(b)

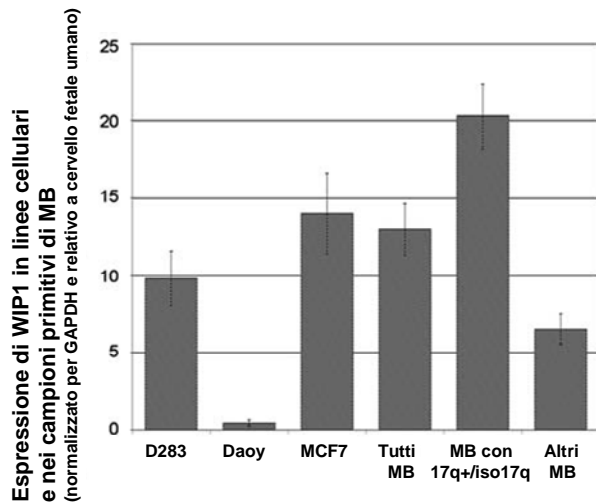
Il trattamento delle linee cellulari di medulloblastoma con farmaci chemioterapici modifica l'espressione dei geni coinvolti. Esponendo la linea cellulare Daoy a diversi farmaci citotossici, viene indotta l'espressione di p73 e soprattutto le isoforme $\Delta Np73$, che probabilmente contribuiscono a proteggere le cellule dall'azione del farmaco (a). L'incremento dell'espressione di $TP53$ dopo incubazione con concentrazioni crescenti di cisplatino (CDDP) riflette la attivazione della proteina selvatica in risposta ai danni citotossici; lo stesso trattamento induce in maniera preferenziale le isoforme $\Delta Np73$ rispetto alla forma completa, nelle stesse cellule (b).

Figura 7.

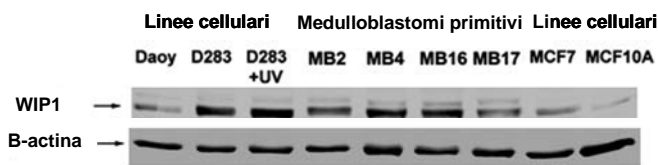


L'espressione di p53, TAp73 e Δ Np73 induce l'apoptosi nelle D283Med. Il trattamento delle D283Med con etoposide (VP16) 1,5 μ M per 24 ore aumenta la percentuale di cellule in apoptosi (quantificata mediante picco subG₀-G₁ o mediante saggio TUNEL) in condizioni basali o dopo transfezione con vettore codificante il gene per Glial Fluorescent Protein (controllo). La presenza di p53 esogena determina un aumento della apoptosi in condizioni basali e specialmente dopo trattamento farmacologico. Una maggior espressione di TAp73 induce un aumento della quota di cellule in apoptosi anche in condizioni basali simili a quella determinata da p53; Δ Np73, invece, promuove l'apoptosi delle D283Med dopo trattamento citotossico, uguagliando p53 e TAp73. In grigio, la percentuale di apoptosi ricavata mediante colorazione nucleare con PI; in nero, la percentuale di apoptosi calcolata con saggio TUNEL.

Figura 8.



(a)

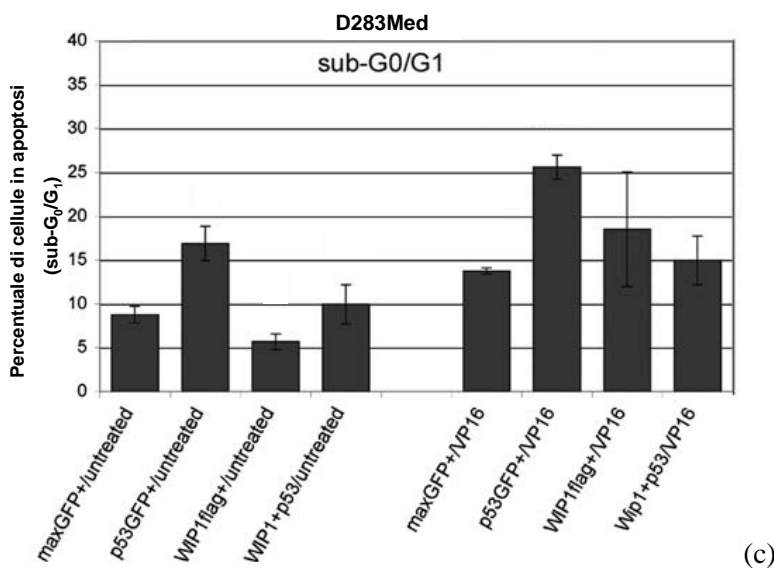
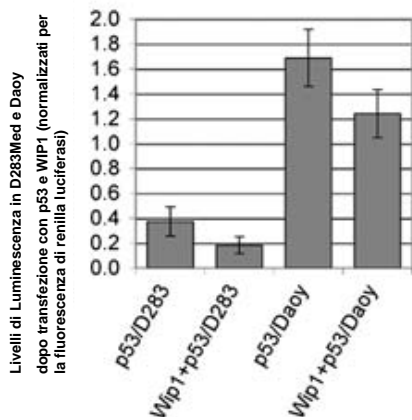
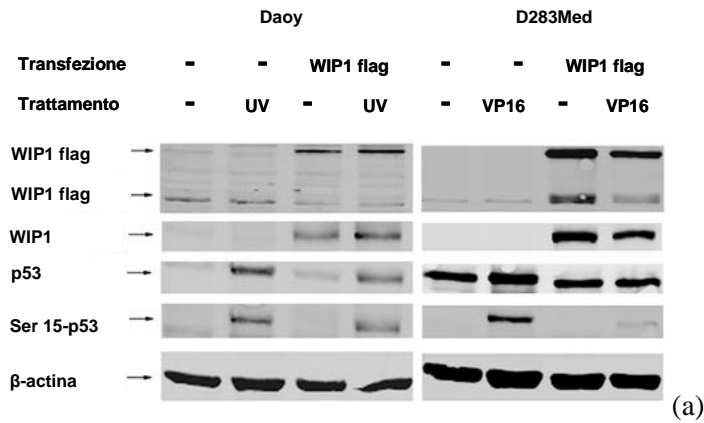


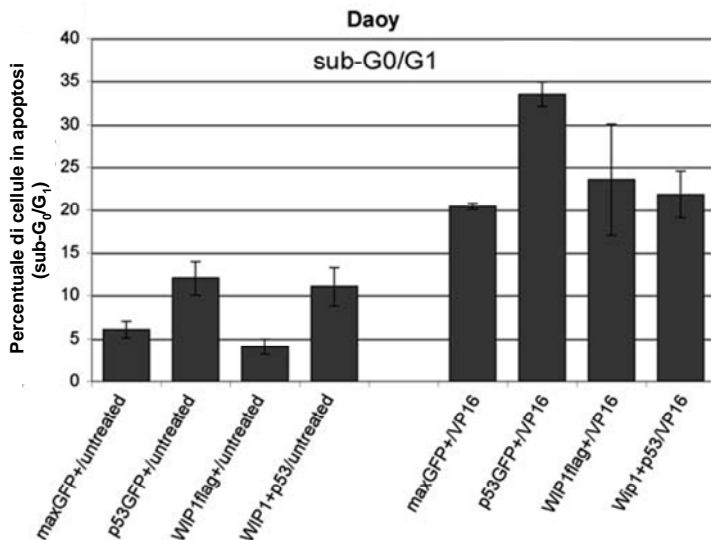
(b)

I medulloblastomi (MB) con guadagno del braccio lungo del cromosoma 17 (17q+) o isocromosoma 17q (iso17q) esprimono WIP1 a livelli significativamente maggiori. (a) L'analisi qRT-PCR su 34 campioni di medulloblastoma primitivo ha evidenziato il maggior livello di espressione dell'mRNA di WIP1 in associazione al guadagno della regione cromosomica dove il gene *WIP1* mappa (guadagno 17q o iso17q), rispetto ai medulloblastomi senza la stessa anomalia. Tale rapporto ha raggiunto importanza statistica ($p = 0,0001$). Il dato di espressione genica è stato confermato su tre determinazioni; gli istogrammi rappresentano la relativa espressione del gene nei gruppi cellulari ottenuta da tre esperimenti distinti; per confronto, sono state indicate anche le linee cellulari di medulloblastoma (D283Med e Daoy), insieme alla linea di carcinoma mammario MCF7 che è caratterizzata dall'amplificazione del gene WIP1 stesso. I valori sono stati normalizzati per l'espressione di GAPDH e riferiti all'espressione del cervello fetale umano. (b) l'analisi del contenuto proteico di linee cellulari di medulloblastoma (Daoy e D283) e dei medulloblastomi primitivi ($n = 10$) ha confermato il maggior grado di espressione di WIP1 nelle D283 e nei tumori, anche comparando il valore alle linee cellulari di carcinoma mammario MCF7 e MCF10. In particolare, a differenza degli altri campioni primitivi, il MB17 non presentava guadagno del materiale genetico 17q,

confermando come la maggior espressione della proteina dipenda anche dalle alterazioni citogenetiche sottostanti.

Figura 9.





(d)

WIP1 antagonizza l'azione pro-apoptotica di p53 in linee cellulari di medulloblastoma.

(a) Le linee cellulari stabilizzate di medulloblastoma D283Med (che esprime p53 nativa) e Daoy (che esprime una forma mutata di p53) sono state transfettate con plasmidi per l'espressione di WIP1 e sottoposte o meno a trattamento (etoposide e radiazioni ionizzanti). Lo stress citotossico ha determinato l'incremento di p53 e la sua attivazione (misurata come proteina fosforilata sul residuo Ser-15) in entrambe le linee cellulari. WIP1 esogeno contrasta l'incremento e soprattutto l'attivazione di p53. (b) L'espressione di p53 esogena determina l'incremento della luciferasi in risposta al legame di p53 al promotore di p21 sia nelle D283Med, sia nelle Daoy; in quest'ultima, la presenza della p53 esogena determina un aumento rispetto alle condizioni basali più marcato che non nelle D283Med. La co-transfezione di WIP1 comporta la riduzione dell'attivazione di p53. (c) L'espressione di p53 nella linea D283Med aumenta significativamente le cellule in apoptosi rilevate mediante citofluorimetria come percentuale in fase sub G₀-G₁; tale valore aumenta ulteriormente dopo trattamento con etoposide per 24 ore. In contrasto, la co-transfezione con plasmide per WIP1 contrasta parzialmente l'effetto pro-apoptotico di p53, sia in condizioni basali, sia dopo incubazione con etoposide. Un plasmide per l'espressione di GFP è stato utilizzato come controllo negativo. L'incremento della quota di apoptosi con espressione di p53 esogena è risultato significativo sia in condizioni basali, sia dopo trattamento con VP16 ($p = 0,033$ e $p = 0,019$, rispettivamente). La riduzione dell'apoptosi nelle D283 transfettate con WIP1 e co-transfettate per p53 e WIP1 rispetto alle D283 transfettate solo con p53, in condizioni basali è risultata significativa ($p = 0,013$ e $0,026$, rispettivamente). (d) La linea cellulare Daoy è stata transfettata con plasmide per p53 e WIP1 singolarmente e associati. La p53 esogena ha determinato un aumento della quota di cellule nella regione sub G₀-G₁, che ha raggiunto significatività statistica dopo trattamento con etoposide ($p = 0,044$). La transfezione con WIP1 non ha determinato cambiamenti significativi in condizioni basali, mentre la co-transfezione con p53 ha evidenziato una minore induzione di apoptosi dopo incubazione con VP16 per 24 ore.

BIBLIOGRAFIA

1. Giangaspero F EC, Haapasalo H, Pietsch T, Wiestler OD, Ellison DW. Medulloblastoma. In: Tumors WHOCo, editor. Pathology and genetics: Tumors of the Central Nervous System; 2007. p. 132-40.
2. Strother DR PI, Fisher PG, Hunter JV, Woo SY, Pomeroy SL, Rorke LB. Tumor of the Central Nervous System. In: Pizzo PA PD, editor. Principles and Practise of Pediatric Oncology. Philadelphia: Lippincott; 2003. p. 778-85.
3. Gulino A, Arcella A, Giangaspero F. Pathological and molecular heterogeneity of medulloblastoma. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 668-75.
4. Verma S, Tavare CJ, Gilles FH. Histologic features and prognosis in pediatric medulloblastoma. *Pediatr Dev Pathol* 2008; 11: 337-43.
5. Eberhart CG, Kepner JL, Goldthwaite PT, et al. Histopathologic grading of medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group study. *Cancer* 2002; 94: 552-60.
6. Eberhart CG, Kratz J, Wang Y, et al. Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 441-9.
7. Kaderali Z, Lamberti-Pasculli M, Rutka JT. The changing epidemiology of paediatric brain tumours: a review from the Hospital for Sick Children. *Childs Nerv Syst* 2008.
8. Cairo S, Armengol C, De Reynies A, et al. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 14: 471-84.
9. Eberhart CG. In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg Clin N Am* 2007; 18: 59-69, viii-ix.
10. Kim JY, Nelson AL, Algon SA, et al. Medulloblastoma tumorigenesis diverges from cerebellar granule cell differentiation in patched heterozygous mice. *Dev Biol* 2003; 263: 50-66.
11. Kenney AM, Widlund HR, Rowitch DH. Hedgehog and PI-3 kinase signaling converge on Nmyc1 to promote cell cycle progression in cerebellar neuronal precursors. *Development* 2004; 131: 217-28.
12. Fan X, Eberhart CG. Medulloblastoma stem cells. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2821-7.
13. Pilkington GJ. Cancer stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Prolif* 2005; 38: 423-33.
14. Gilbertson RJ, Ellison DW. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 341-65.
15. Cohen MM, Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A* 2003; 123A: 5-28.
16. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, et al. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 2008; 14: 135-45.
17. Rao G, Pedone CA, Coffin CM, Holland EC, Fults DW. c-Myc enhances sonic hedgehog-induced medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice. *Neoplasia* 2003; 5: 198-204.
18. Kool M, Koster J, Bunt J, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS ONE* 2008; 3: e3088.
19. Guessous F, Li Y, Abounader R. Signaling pathways in medulloblastoma. *J Cell Physiol* 2008; 217: 577-83.
20. Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, et al. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle* 2006; 5: 2666-70.

21. Yokota N, Nishizawa S, Ohta S, et al. Role of Wnt pathway in medulloblastoma oncogenesis. *Int J Cancer* 2002; 101: 198-201.
22. McMahon AP, Bradley A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 1990; 62: 1073-85.
23. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004; 303: 1483-7.
24. Cheng CW, Smith SK, Charnock-Jones DS. Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology. *Exp Cell Res* 2003; 291: 415-25.
25. Zhang X, Podsypanina K, Huang S, et al. Estrogen receptor positivity in mammary tumors of Wnt-1 transgenic mice is influenced by collaborating oncogenic mutations. *Oncogene* 2005; 24: 4220-31.
26. De Toni EN, Thieme SE, Herbst A, et al. OPG is regulated by beta-catenin and mediates resistance to TRAIL-induced apoptosis in colon cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4713-8.
27. Ellison D. Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002; 28: 257-82.
28. De Bortoli M, Castellino RC, Lu XY, et al. Medulloblastoma outcome is adversely associated with overexpression of EEF1D, RPL30, and RPS20 on the long arm of chromosome 8. *BMC Cancer* 2006; 6: 223.
29. Ehrbrecht A, Muller U, Wolter M, et al. Comprehensive genomic analysis of desmoplastic medulloblastomas: identification of novel amplified genes and separate evaluation of the different histological components. *J Pathol* 2006; 208: 554-63.
30. Nicholson J, Wickramasinghe C, Ross F, Crolla J, Ellison D. Imbalances of chromosome 17 in medulloblastomas determined by comparative genomic hybridisation and fluorescence in situ hybridisation. *Mol Pathol* 2000; 53: 313-9.
31. Gilhuis HJ, Anderl KL, Boerman RH, et al. Comparative genomic hybridization of medulloblastomas and clinical relevance: eleven new cases and a review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg* 2000; 102: 203-9.
32. Bayani J, Zielenska M, Marrano P, et al. Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. *J Neurosurg* 2000; 93: 437-48.
33. Reardon DA, Jenkins JJ, Sublett JE, Burger PC, Kun LK. Multiple genomic alterations including N-myc amplification in a primary large cell medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg* 2000; 32: 187-91.
34. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1924-31.
35. Mendrzyk F, Radlwimmer B, Joos S, et al. Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8853-62.
36. Pan E, Pellarin M, Holmes E, et al. Isochromosome 17q is a negative prognostic factor in poor-risk childhood medulloblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4733-40.
37. Gilbertson R, Wickramasinghe C, Hernan R, et al. Clinical and molecular stratification of disease risk in medulloblastoma. *Br J Cancer* 2001; 85: 705-12.
38. Batra SK, McLendon RE, Koo JS, et al. Prognostic implications of chromosome 17p deletions in human medulloblastomas. *J Neurooncol* 1995; 24: 39-45.
39. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 2002; 415: 436-42.
40. Chopra A, Brown KM, Rood BR, Packer RJ, MacDonald TJ. The use of gene expression analysis to gain insights into signaling mechanisms of metastatic medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg* 2003; 39: 68-74.
41. Gilbertson RJ, Gajjar A. Molecular biology of medulloblastoma: will it ever make a difference to clinical management? *J Neurooncol* 2005; 75: 273-8.
42. Dyer MA. Mouse models of childhood cancer of the nervous system. *J Clin Pathol* 2004; 57: 561-76.
43. Fomchenko EI, Holland EC. Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5288-97.

44. Uziel T, Zindy F, Xie S, et al. The tumor suppressors Ink4c and p53 collaborate independently with Patched to suppress medulloblastoma formation. *Genes Dev* 2005; 19: 2656-67.
45. Fernandez-Teijeiro A, Betensky RA, Sturla LM, Kim JY, Tamayo P, Pomeroy SL. Combining gene expression profiles and clinical parameters for risk stratification in medulloblastomas. *J Clin Oncol* 2004; 22: 994-8.
46. Ozer E, Sarialioglu F, Cetingoz R, et al. Prognostic significance of anaplasia and angiogenesis in childhood medulloblastoma: a pediatric oncology group study. *Pathol Res Pract* 2004; 200: 501-9.
47. Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, et al. beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7951-7.
48. Mook S, Van't Veer LJ, Rutgers EJ, Piccart-Gebhart MJ, Cardoso F. Individualization of therapy using Mammaprint: from development to the MINDACT Trial. *Cancer Genomics Proteomics* 2007; 4: 147-55.
49. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-31.
50. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22: 9030-40.
51. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10: 431-42.
52. Gold EB, Leviton A, Lopez R, et al. The role of family history in risk of childhood brain tumors. *Cancer* 1994; 73: 1302-11.
53. Zindy F, Uziel T, Ayrault O, et al. Genetic alterations in mouse medulloblastomas and generation of tumors de novo from primary cerebellar granule neuron precursors. *Cancer Res* 2007; 67: 2676-84.
54. Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res* 2001; 61: 513-6.
55. Momota H, Shih AH, Edgar MA, Holland EC. c-Myc and beta-catenin cooperate with loss of p53 to generate multiple members of the primitive neuroectodermal tumor family in mice. *Oncogene* 2008; 27: 4392-401.
56. Saylor RL, 3rd, Sidransky D, Friedman HS, et al. Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas. *Cancer Res* 1991; 51: 4721-3.
57. Ohgaki H, Eibl RH, Wiestler OD, Yasargil MG, Newcomb EW, Kleihues P. p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res* 1991; 51: 6202-5.
58. Cogen PH, Daneshvar L, Metzger AK, Duyk G, Edwards MS, Sheffield VC. Involvement of multiple chromosome 17p loci in medulloblastoma tumorigenesis. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 584-9.
59. Bigner SH, Vogelstein B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. *Brain Pathol* 1990; 1: 12-8.
60. Biegel JA, Burk CD, Barr FG, Emanuel BS. Evidence for a 17p tumor related locus distinct from p53 in pediatric primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 3391-5.
61. Badiali M, Iolascon A, Loda M, et al. p53 gene mutations in medulloblastoma. Immunohistochemistry, gel shift analysis, and sequencing. *Diagn Mol Pathol* 1993; 2: 23-8.
62. Di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, et al. REN(KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10833-8.
63. Adesina AM, Dunn ST, Moore WE, Nalbantoglu J. Expression of p27kip1 and p53 in medulloblastoma: relationship with cell proliferation and survival. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 243-50.
64. Eberhart CG, Chaudhry A, Daniel RW, Khaki L, Shah KV, Gravitt PE. Increased p53 immunopositivity in anaplastic medulloblastoma and supratentorial PNET is not caused by JC virus. *BMC Cancer* 2005; 5: 19.
65. Frank AJ, Hernan R, Hollander A, et al. The TP53-ARF tumor suppressor pathway is frequently disrupted in large/cell anaplastic medulloblastoma. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 121: 137-40.
66. Slack A, Chen Z, Tonelli R, et al. The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 731-6.

67. Jacobs WB, Walsh GS, Miller FD. Neuronal survival and p73/p63/p53: a family affair. *Neuroscientist* 2004; 10: 443-55.
68. Garcia-Alai MM, Tidow H, Natan E, Townsley FM, Veprintsev DB, Fersht AR. The novel p53 isoform "delta p53" is a misfolded protein and does not bind the p21 promoter site. *Protein Sci* 2008; 17: 1671-8.
69. Sauer M, Bretz AC, Beinoraviciute-Kellner R, et al. C-terminal diversity within the p53 family accounts for differences in DNA binding and transcriptional activity. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 1900-12.
70. Goldschneider D, Horvilleur E, Plassa LF, et al. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 5603-12.
71. Harms KL, Chen X. The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 2014-30.
72. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 1-12.
73. Scoumanne A, Harms KL, Chen X. Structural basis for gene activation by p53 family members. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1178-85.
74. Harms K, Nozell S, Chen X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 822-42.
75. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90: 809-19.
76. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008; 27: 6507-21.
77. Rosenbluth JM, Pietenpol JA. The jury is in: p73 is a tumor suppressor after all. *Genes Dev* 2008; 22: 2591-5.
78. Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, et al. p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *EMBO J* 2008; 27: 792-803.
79. Becker K, Pancoska P, Concin N, et al. Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int J Oncol* 2006; 29: 889-902.
80. Hooper C, Tavassoli M, Chapple JP, et al. TAp73 isoforms antagonize Notch signalling in SH-SY5Y neuroblastomas and in primary neurones. *J Neurochem* 2006; 99: 989-99.
81. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356: 215-21.
82. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 2000; 289: 304-6.
83. Pediconi N, Ianari A, Costanzo A, et al. Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 552-8.
84. Chen X, Zheng Y, Zhu J, Jiang J, Wang J. p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene* 2001; 20: 769-74.
85. Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 1999; 399: 809-13.
86. Rossi M, Demidov ON, Anderson CW, Appella E, Mazur SJ. Induction of PPM1D following DNA-damaging treatments through a conserved p53 response element coincides with a shift in the use of transcription initiation sites. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 7168-80.
87. Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet* 2002; 31: 210-5.
88. Li J, Yang Y, Peng Y, et al. Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nat Genet* 2002; 31: 133-4.
89. Yu E, Ahn YS, Jang SJ, et al. Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 101: 269-78.
90. Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, et al. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J* 2000; 19: 6517-26.

91. Lu X, Nguyen TA, Donehower LA. Reversal of the ATM/ATR-mediated DNA damage response by the oncogenic phosphatase PPM1D. *Cell Cycle* 2005; 4: 1060-4.
92. Lu X, Ma O, Nguyen TA, Jones SN, Oren M, Donehower LA. The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell* 2007; 12: 342-54.
93. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-3.
94. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-21.
95. Ben-Dor A, Bruhn L, Friedman N, Nachman I, Schummer M, Yakhini Z. Tissue classification with gene expression profiles. *J Comput Biol* 2000; 7: 559-83.
96. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-6.
97. Castellino RC, De Bortoli M, Lin LL, et al. Overexpressed TP73 induces apoptosis in medulloblastoma. *BMC Cancer* 2007; 7: 127.
98. Castellino RC, De Bortoli M, Lu X, et al. Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D. *J Neurooncol* 2008; 86: 245-56.
99. Cogen PH, McDonald JD. Tumor suppressor genes and medulloblastoma. *J Neurooncol* 1996; 29: 103-12.
100. Aldosari N, Bigner SH, Burger PC, et al. MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 540-4.
101. Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat* 2003; 21: 182-91.
102. Concin N, Hofstetter G, Berger A, et al. Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8372-83.
103. Concin N, Becker K, Slade N, et al. Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* 2004; 64: 2449-60.
104. Lu X, Nannenga B, Donehower LA. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev* 2005; 19: 1162-74.
105. Lu X, Bocangel D, Nannenga B, Yamaguchi H, Appella E, Donehower LA. The p53-induced oncogenic phosphatase PPM1D interacts with uracil DNA glycosylase and suppresses base excision repair. *Mol Cell* 2004; 15: 621-34.

INDICE

Sommario	p 3
Abstract	p 5
Il Medulloblastoma	p 7
Epidemiologia e caratteristiche generali	p 7
Caratteristiche biologiche	p 8
Ruolo di p53 nel Medulloblastoma	p 12
Clinica e diagnosi	p 15
Terapia e prognosi	p 15
La caratterizzazione genica di una neoplasia	p 18
Le basi molecolari di una neoplasia	p 18
Caratterizzazione del genoma e del trascrittoma: Comparative Genomic Hybridization (CGH) e studio del profilo d'espressione genica mediante microarray	p 19
Scopi del lavoro	p 23
Materiali e metodi	p 25
Dati clinici e campioni biologici	p 25
Comparative Genomic Hybridization (CGH)	p 25
Analisi del trascritto mediante microarray e qRT-PCR	p 26
Analisi statistica del profilo genomico e dell'espressione genica	p 28
Analisi proteica	p 29
Culture cellulari, trattamenti farmacologici, transfezioni, saggi di luciferasi e ciclo cellulare	p 29
Integrazione dei dati di caratterizzazione genomica e espressione genica nel medulloblastoma	p 31
Principali alterazioni del cariotipo nel medulloblastoma e loro relazione con la sopravvivenza	p 31
Studio d'espressione genica di geni che mappano su 8q	p 32
Studio di proteine che alterano la funzione di p53	

nel medulloblastoma	p 33
Caratterizzazione dei livelli di espressione di p53 e p73	p 33
Significato clinico dei livelli di espressione di p73	p 34
Significato funzionale dell'espressione di p53, TAp73 e Δ Np73 nel medulloblastoma	p 35
WIP1 è espresso maggiormente nei medulloblastomi che mostrano un guadagno di 17q	p36
WIP1 interferisce con l'attivazione del <i>pathway</i> di p53 in linee cellulari stabilizzate di medulloblastoma	p 37
Discussione	p 39
Conclusione	p 43
Iconografia	p 45
Bibliografia	p 57