



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: MALATTIE RARE
CICLO XXIII**

**Nutlin-3 sensibilizza le cellule di medulloblastoma
all'apoptosi indotta da agenti chemioterapici attraverso
la stabilizzazione di p53 mediante inibizione di Mdm2.**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

Supervisore : Prof. Angelo Rosolen

Dottorando : Angelica Zin

RIASSUNTO	5
SUMMARY	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Medulloblastoma: caratteristiche cliniche e terapeutiche	7
1.2 <i>p53</i>	9
1.3 Metabolismo e regolazione di <i>p53</i>	11
1.4 Espressione di <i>p53</i> nel Medulloblastoma	13
1.5 L'apoptosi	14
1.6 La cascata apoptotica	14
1.7 NUTLIN-3	18
2. MATERIALI E METODI	21
2.1 Colture cellulari	21
2.2 Reagenti ed anticorpi	21
2.3 Chemioterapia e Saggio di citotossicità con MTT	22
2.4 Irradiazione e Saggio di citotossicità con MTT	23
2.5 Immunoblotting	23
2.6 Analisi fluorocitometrica	24
2.7 Epifluorescenza nucleare con colorazione DAPI	25
3. RISULTATI	26
3.1 Caratterizzazione delle linee cellulari di medulloblastoma ed effetto del trattamento farmacologico.	26
3.2 Nutlin-3 aumenta l'effetto citotossico delle radiazioni ionizzanti su MB1603, linea cellulare con <i>p53 wild-type</i> .	33
3.3 Il trattamento con Nutlin-3 determina attivazione di <i>p53</i> e induzione di proteine coinvolte nell'apoptosi.	35
3.4 Nutlin-3 induce arresto del ciclo cellulare e stimola il processo apoptotico.	46
3.5 Condensazione e frammentazione nucleare in cellule di medulloblastoma trattate con Nutlin-3 e chemioterapici.	51
4. DISCUSSIONE	57
5. BIBLIOGRAFIA	63

RIASSUNTO

Il medulloblastoma è il più frequente tumore cerebrale maligno del bambino. Nonostante miglioramenti importanti, la prognosi dei pazienti è ancora sfavorevole, soprattutto in caso di metastasi, progressione o recidiva di malattia. Inoltre, la prognosi dei lungo-sopravvissuti è pesantemente condizionata dagli effetti collaterali della chemioterapia e della radioterapia, che includono un progressivo declino delle funzioni cognitive, problemi endocrinologici e neurosensoriali, insorgenza di secondi tumori.

Abbiamo studiato l'effetto della molecola Nutlin-3, in combinazione con chemioterapici di uso comune, quali Etoposide, Cisplatino e Vincristina, e con il trattamento radiante su linee cellulari di medulloblastoma, allo scopo di verificare se la somministrazione combinata determini una migliore risposta terapeutica rispetto ai trattamenti singoli tradizionali.

P53 è una proteina espressa ubiquitariamente in tutte le cellule, che sovrintende al mantenimento dell'integrità del patrimonio genetico, al controllo del ciclo cellulare, all'induzione di processi di differenziazione, senescenza e apoptosi. Nei tumori pediatrici, come il medulloblastoma, p53 viene espressa allo stato nativo ma viene inattivata da meccanismi post-traduzionali. Nutlin-3 è in grado di favorire l'apoptosi liberando la proteina p53 dal suo principale inibitore, MDM2 (ubiquitina ligasi). MDM2 è un'ubiquitina ligasi di tipo E3 che forma un dimero con p53 e procede alla sua ubiquitinazione, fino a condurla a degradazione proteosomale. Nutlin-3, antagonizzando questo processo, libera e stabilizza p53, che può quindi indurre apoptosi con effetto nettamente più intenso.

I risultati dimostrano che Nutlin-3, da sola, mediante stabilizzazione e attivazione di p53, è in grado di indurre apoptosi. La somministrazione combinata di Nutlin-3 con chemioterapici convenzionali o con radioterapia incrementa l'efficacia dei singoli trattamenti. In particolare, la co-somministrazione di Nutlin-3 determina una significativa riduzione della vitalità cellulare e una più intensa apoptosi, anche con dosi estremamente ridotte di chemioterapici convenzionali o di radiazioni ionizzanti. Abbiamo dimostrato che tale azione è p53-dipendente, mediante studio dell'espressione dei target molecolari di p53 e di una proteina bersaglio dei meccanismi di apoptosi.

Inoltre, nel nostro modello cellulare l'effetto si manifesta precocemente, già dopo 16 ore di esposizione, generando una risposta apoptotica molto significativa alle 72 ore.

SUMMARY

Medulloblastoma is the most frequent pediatric malignant brain tumor. Despite recent improvements, its prognosis is still dismal in case of metastatic disease, progression or relapse. Moreover, long-term survivors suffer from toxicities from chemo- and radiotherapy, such as neurocognitive impairment, endocrinological and sensorial problems, and secondary malignancies.

We studied the efficacy of Nutlin-3, alone and in combination with other agents (namely Etoposide, Cisplatin, Vincristine), and radiotherapy on medulloblastoma cell lines, and verify whether the co-treatments induced increased response.

P53 is a ubiquitously expressed protein that regulates genome integrity, cell cycle progression, differentiation, senescence and apoptosis. In pediatric brain tumors it is expressed as wild type, but its functions are impaired at post-translational levels. Nutlin-3 can induce apoptosis, by counteracting the most important p53 inhibitor, MDM2. MDM2 is a E3 ubiquitine ligase which forms a heterodimer with p53 and, through ubiquitination process, promotes p53 proteosomal degradation. Nutlin-3, thus, increases un-ubiquitinated (active) p53, which in turn increases apoptosis.

Our results show that in medulloblastoma cell lines carrying wild type p53, Nutlin-3, can induce apoptosis. Association of Nutlin-3 and chemo- or radiotherapy increases efficacy of each chemotherapy agents and of radiotherapy. We confirmed that those effects are p53-dependent, by studying expression levels of p53 molecular targets and apoptosis induced proteins. When we analyzed drug response-curve in a p53 wild type medulloblastoma cell line, Nutlin-3 effects were evident after only 16 hours and high apoptotic rates were detectable after 72 hours.

1. INTRODUZIONE

1.1 Medulloblastoma: caratteristiche cliniche e terapeutiche

I tumori del sistema nervoso centrale (SNC) sono i tumori solidi più comuni e costituiscono, per frequenza, il secondo gruppo di neoplasie infantili, dopo le leucemie e i linfomi.

Il medulloblastoma è il più frequente tumore maligno tra le neoplasie del SNC delle quali rappresenta circa il 20-30%. L'incidenza si aggira intorno a 5 casi per milione in età compresa tra 0 e 14 anni, con picco di insorgenza verso i 5 anni; il sesso maschile è colpito con una frequenza pressoché doppia rispetto al sesso femminile. Il medulloblastoma presenta una rapida crescita e un'importante tendenza all'invasività: ha una rapida diffusione attraverso il liquido cerebro-spinale, con conseguente metastatizzazione in diverse aree dell'encefalo e del midollo spinale, mentre più rare sono le metastasi extra-SNC. La sopravvivenza a 5 anni si attesta intorno al 60%.
[C.G.Ebhart, J.L.Kepner, et al. *Cancer*, 2002, January 15, 94, 552-560]

Recentemente l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha definito una classificazione dei principali sottotipi di medulloblastoma (MB):

- **MB classico** (circa 70% dei casi): presenta cellule densamente stipate, piccole, con nucleo ipercromatico e scarso citoplasma; si localizza prevalentemente nel verme del cervelletto;
- **MB desmoplastico** (circa 15%), con aspetto nodulare, che presenta zone a ricca cellularità e zone ricche di stroma; si localizza frequentemente negli emisferi del cervelletto;
- **MB ad estesa modularità** (meno dell'1%) con nidi di cellule a marcata differenziazione neuronale;
- **MB a grandi cellule/anaplastico** (~ 10%) presenta cellule raggruppate in piccoli "nidi" con citoplasma abbondante, nucleo grande, irregolare, abbondanti mitosi, a volte irregolari, estese aree necrotiche ed apoptotiche;
- **MB melanocitico e medullomioblastoma**, che sono due rare varianti del medulloblastoma classico. Il melanocitico presenta melanina nelle cellule ed assume aspetto epitelioido; il medullomioblastoma ha aspetti di rabiomioblastoma con formazione di fibrille muscolari. [Kleihues P., Luois DN,

J Neuropath Exp. Neurol; 61, 215-225, 2002]. [Ellison D.W., Clifford S.C., Eur.J.of Ped.Oncol., 2003, 7, 53-56].

Uno dei primi sintomi del medulloblastoma è l'aumento della pressione intracranica, che si manifesta con cefalea, vomito, e più tardivamente ipertensione e bradicardia. Inoltre i pazienti appaiono astenici, presentano disturbi del movimento (atassia) e nistagmo, debolezza muscolare ed irritabilità. Possono presentare alterazioni di personalità e di comportamento. La presentazione clinica può essere varia e dipendere dalle dimensioni e dalla posizione della massa tumorale

Il medulloblastoma ha peraltro elevata tendenza ad infiltrare i tessuti circostanti e le meningi, mentre raramente tende a diffondere all'esterno del SNC. *[Brosh R., Rotter V., Cancer, 2000 Oct., 9, 701-713]*

Per quanto concerne il trattamento, esso si basa sull'asportazione chirurgica della massa, seguita dalla radioterapia e dalla chemioterapia. La radioterapia è stata la prima forma di trattamento e attualmente viene erogata su tutto l'asse cranio-spinale. Successivamente, è stata associata la chemioterapia alla radioterapia, in modo da ridurre la dose di radiazioni e diminuirne gli effetti collaterali. *[Strother DR PI, Fisher PG, Hunter JV, Principles of Ped.Onc.,2003,778-785]* Infatti, l'uso delle radiazioni determina un arresto di sviluppo del SNC tanto più grave quanto più giovane è il paziente. La conseguenza è un progressivo declino delle funzioni cognitive, complicato da problemi endocrinologici. Tale complicità è di particolare rilievo perché il medulloblastoma colpisce prevalentemente individui in età pediatrica.

Contro il medulloblastoma si impiegano alcuni tra i chemioterapici più comuni, inclusi **etoposide (VP16), cisplatino (CDDP) o vincristina (VCR).**

Il Cisplatino è un composto inorganico strutturalmente molto semplice ed è uno dei più efficaci e diffusi antineoplastici in uso. Tuttavia il CDDP si avvale di una serie di proprietà quali un ampio spettro di attività antitumorale (efficacia su tumori a crescita lenta/rapida, localizzati/disseminati) e non subisce deformazioni e cambiamenti particolari. *[H. Huang, L. Zhu, B. R. Reid, G. P. Drobny, P. B. Hopkins, Science, 1995, 270, 1842.] [P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 12309]* Il VP16 è una molecola organica, derivato di semisintesi che si ottiene dalla podofillotossina, glicoside di estrazione dal rizoma del *Podophillum peltatum*. Il VP16 lega il complesso DNA-Topoisomerasi II, bloccandolo nella forma clivata. Così facendo si impedisce la replicazione corretta del genoma che apparirà completamente

frammentato. La cellula andrà rapidamente incontro a morte. Infine, la Vincristina è un farmaco antitumorale ricavato, come la vinblastina, da una pianta, *Catharanthus roseus* (pervinca del Madagascar), anche nota con il nome comune "vinca rosea". Le proprietà antitumorali della vincristina derivano dalla sua capacità di inibire la divisione cellulare agli stadi precoci del processo di mitosi. La vincristina si lega ai monomeri di tubulina, impedendo la formazione dei microtubuli delle fibre del fuso. [Nørregaard A., Kristensen B.W., *Neurotox Res* 2011, Dec 28]. Poiché la vincristina agisce impedendo alle cellule di dividersi, essa non è in grado di inibire in maniera selettiva la divisione delle cellule tumorali e bloccando la divisione di una porzione di cellule sane, causa effetti collaterali. [A. S. Jaggi, N. Singh, *Toxicology* 291 (2012) 1– 9]

Benché utilizzati a dosaggi relativamente bassi e discretamente tollerati dall'organismo, essi causano danni piuttosto gravi anche a porzioni sane del tessuto cerebrale e di altri tessuti, specie se in fase attiva di replicazione, portando a conseguenze gravi e talora irreversibili. La loro efficacia sulle cellule neoplastiche è indiscussa, tuttavia la loro somministrazione continuativa crea lesioni alle cellule neuronali sane. In tal modo, specie per i derivati del Platino, il paziente può divenire portatore di sordità neurosensoriale, oltre che presentare altre complicanze dovute alla chemioterapia. [N.G.Gottardo, A.Gajjar, *J.of Child Neurology*, 2008, Oct, 23, 10, 1149-1159]

Per tale motivo, l'utilizzo di strategie alternative può determinare un miglioramento della sopravvivenza, permettendo al contempo di limitare gli effetti collaterali. La ricerca attuale si concentra pertanto sull'individuazione di caratteristiche biologiche che possano dimostrarsi un utile bersaglio terapeutico o nell'individuazione di agenti terapeutici alternativi, da associare agli attuali schemi terapeutici convenzionali.

1.2 p53

p53 o "guardiano del genoma" è una proteina ubiquitaria, espressa in tutte le cellule, coinvolta nella maggior parte delle forme di neoplasia maligna.

Riveste un ruolo di fondamentale importanza in quanto provvede al mantenimento dell'integrità del patrimonio genetico stabilizzando il DNA e prevenendone le mutazioni. Oltre a ciò controlla il ciclo cellulare, induce i processi di differenziazione, senescenza, apoptosi e agisce come oncosoppressore. Eventi stressanti, come l'esposizione ad agenti chimici o fisici che determinino danni al DNA, di norma comportano un aumento della concentrazione della p53 in particola nella forma attiva.

TP53 è il gene codificante per p53 ed è situato nel braccio corto del cromosoma 17p. La perdita del braccio corto del cromosoma 17 è l'anomalia più frequente nel medulloblastoma e determina un comportamento aggressivo del tumore. [Lamont JM, McManamy CS, Pearson AD, Clifford S, Ellison DW. *Clin Cancer Res*; 10, 5482-5493, 2004].

Sono stati descritti due meccanismi di regolazione dell'espressione di p53 oltre che della sua attività. Il primo coinvolge la degradazione di p53 tramite ubiquitinazione e degradazione proteosomica. La proteina appare così sequestrata a livello del citoplasma e non esplica più la sua funzione nucleare.

L'altro meccanismo implicato è l'espressione di proteine capaci di interferire con l'attivazione e la funzione di p53 o l'espressione di isoforme di p53 (a seguito dello splicing alternativo a carico del gene TP53) differenti dalla proteina nativa. [Slack A, Chen Z, Tonelli R, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 731-6]. Il risultato di questi processi è che la proteina appare così sequestrata a livello del citoplasma in forma inattiva e non esplica più la sua funzione a livello del nucleo o dei mitocondri. [Jacobs WB, Walsh GS, Miller FD. *Neuroscientist* 2004; 10: 443-55]

Per poter agire, p53 non solo deve trovarsi nel nucleo, ma deve anche formare dei complessi o tetramerizzare: infatti si è visto come la porzione C-terminale interagisca col cuore della proteina-tetramero così da permetterne il suo aggancio ai siti di riconoscimento del DNA. [M.Matsumoto; M.Furihata; Y.Ohtsuki *Med.Mol.Morphol.* (2006) 39:79-87]

p53 esplica la sua azione di oncosoppressore mediante numerosi meccanismi:

- 1.arresta temporaneamente il ciclo cellulare in G1/S per riconoscere il danno cellulare;
- 2.attiva la riparazione del DNA attraverso attivazione delle proteine atte a tale scopo;
- 3.innesca il processo apoptotico qualora il danno al genoma risulti irreparabile.

Per poter compiere queste attività la proteina deve legare i siti promotori del DNA relativi a geni specifici, al fine di regolare l'espressione genica di proteine responsabili delle attività sopra citate.

E' possibile distinguere due classi di *bersagli trascrizionali* di p53 coinvolti nel processo apoptotico:

- I componenti della via dei segnali di morte cellulare **ESTRINSECI** (Death Receptor DR, TNF, superfamiglia di recettori R, fattori di interazione di ligando-recettore L). Ad esempio CD95/Fas/Apo-1, DR4, DR5, appartenenti alla famiglia dei TNF-R, sono trascrizionalmente indotti da p53 poiché così possono contribuire all'apoptosi;
- Componenti centrali della via apoptotica **INTRINSECA**, mitocondriale (APAF-1 componente chiave dell'apoptosoma, PUMA, NOXA). L'espressione di questi geni è strettamente controllata da p53: mediante queste proteine p53 controlla l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, effetto che si manifesta in risposta ad una varietà di eventi stressanti.

Alcuni tra i principali bersagli molecolari di p53 sono p21, che determina l'arresto del ciclo cellulare in G1 e partecipa all'arresto in G2/M in seguito a danno al DNA, e MDM2 la cui espressione viene indotta quando p53 aumenta. MDM2 è infatti un enzima che porta a degradazione p53, pertanto la sua induzione mantiene l'equilibrio omeostatico intracellulare.

1.3 Metabolismo e regolazione di p53

p53 è sottoposta a processi metabolici che ne regolano l'espressione e l'emivita. Il più importante meccanismo di regolazione ha per protagonista la proteina MDM2 (*Murine Double Minute 2*). Si tratta di un enzima, un'ubiquitina ligasi E3: esso è il terzo ed ultimo enzima implicato nella ligazione dell'Ubiquitina alle proteine.

MDM2 lega la regione α -elica di p53 creando l'interazione proteina-proteina in una regione largamente idrofobica. Strutturalmente MDM2 può esistere in ben 29 conformazioni differenti, tuttavia essa ne assume solo alcune per l'interazione con p53.

In questo modo viene bloccata l'attività di p53, dato che il suo dominio attivo è occupato, e viene innescato il processo di ubiquitinazione della proteina.

MDM2 infatti lega le molecole di Ubiquitina (Ub) alle Lys del sito TAD della p53.

Il legame tra p53 e l'Ubiquitina mediata da MDM2 è solo l'ultimo evento di una serie complessa di reazioni. Infatti, l'ubiquitina viene dapprima attivata con una molecola di ATP, mediante un legame tioestere ad alta energia tra il carbossile della Gly terminale dell'Ub e il residuo di Cys dell'enzima E1 della cascata di ubiquitinazione.

Successivamente l'Ub viene trasferita nel sito attivo dell'enzima E2 dove è presente un altro residuo di Cys (si ottiene una reazione di trans-tio-esterificazione).

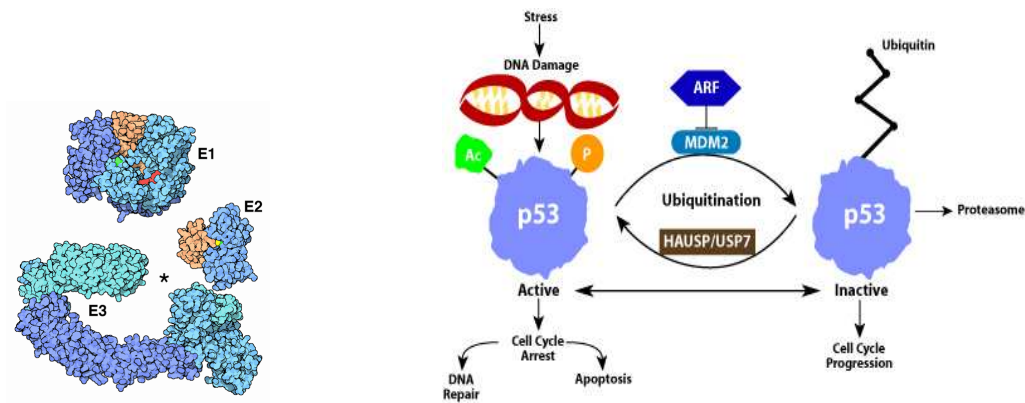


Fig. 1 Pathway di ubiquitinizzazione di p53 ad opera di MDM2.

A questo punto interviene l'ubiquitina-proteina-ligasi (o E3) che interagisce con l'etero-dimero E2-proteina da degradare. L'Ubiquitina viene legata ai residui di Lys della proteina da eliminare che è immediatamente intercettata dal proteosoma e degradata.

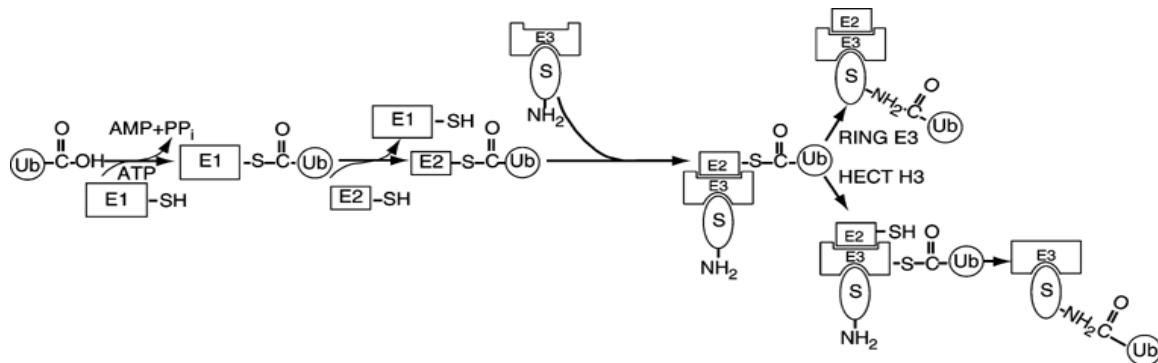


Fig. 2 Chimica del processo di ubiquitinizzazione

L'ubiquitinazione (monoubiquitinazione) di p53 nel nucleo avvia i segnali di trasporto che mediano la migrazione di p53 verso il citosol dove andrà incontro, anche in base ai siti e al numero di ubiquitine legate, a destini differenti,:

- va incontro a degradazione attraverso la via del proteosoma;
- lega proteine che la mantengono sequestrata nel citoplasma in forma inattiva, anche se non viene attivata la degradazione proteosomale;

- può essere riattivata in caso di danno mediante proteine Chaperon, deubiquitinasi, chinasi o acetilasi (per essere fosforilata o acetilata e quindi per prepararsi strutturalmente allo svolgimento della sua attività di induttore genico);

Tra MDM2 e p53, tuttavia, esiste anche un equilibrio trascrizionale; infatti quando vi sono stimoli che inducono un aumento dell'espressione di p53, essa stessa andrà ad indurre l'espressione di MDM2 che mantiene l'equilibrio tra induzione e degradazione della proteina, così da evitarne un accumulo indiscriminato (*feedback negativo*).

Ecco perché nelle cellule sane e non sottoposte a stress vi sono bassi livelli di p53: perché essa viene espressa in quantità minime e appena necessarie a supervisionare l'integrità del genoma e in ogni caso viene regolarmente degradata da MDM2. Questo equilibrio si rompe nelle cellule tumorali, anche per una maggior espressione di MDM2 con conseguente maggior degradazione di p53 che viene a perdere la sua funzione di guardiano del genoma.

Data l'estrema importanza di p53, numerosi studi hanno descritto un ulteriore processo che interviene nella regolazione dell'interazione MDM2-p53: si tratta dell'intervento delle chinasi. E' stato dimostrato che molteplici enzimi chinasi sono attivi nella fosforilazione delle due proteine su residui di Thr e Ser, tuttavia il risultato che si ottiene è totalmente opposto. [M.Matsumoto; M.Furihata; Y.Ohtsuki *Med.Mol.Morphol.* (2006) 39:79-87]

ATM, ATR, JNK, p38, Cdk2, DNA PK sono enzimi comunemente attivi su p53 e su MDM2; ciononostante p53 viene stabilizzata e attivata in quanto si mantiene libera da MDM2, mentre quest'ultima viene bloccata nella sua attività di legame per p53 poiché i gruppi fosfato creano un ingombro sterico che impedisce a p53 di adagiarsi nel suo sito di legame specifico. Generalmente p53 viene fosforilata solo in seguito a danni al genoma dovuti a farmaci o a radiazioni ionizzanti. [Alarcon-Vergas D, Ronai Z, *Carcinogenesis*,2002,vol 23, no 4, 541-547]

1.4 Espressione di p53 nel Medulloblastoma

Mutazioni del gene TP53 nei tumori dell'età pediatrica, quali il medulloblastoma, sono eventi molto rari e per lo più legati a sindromi familiari. Nonostante questo, p53, specie nella variante anaplastica a grandi cellule di medulloblastoma, viene espressa ad elevate

concentrazioni senza indurre le sue caratteristiche funzioni, come se funzionalmente alterata. Inoltre, maggiori sono i livelli di espressione di p53 nel tumore, maggiore è l'aggressività e peggiore è la prognosi dei pazienti affetti.

In base a questi presupposti, ci sono evidenze del fatto che il pathway controllato da p53 sia effettivamente perturbato nel medulloblastoma, inducendo alla perdita della funzione di controllo svolta da p53 e alla riduzione dei meccanismi che dovrebbero portare la cellula tumorale ad apoptosi. [Adesina AM, Dunn ST, Moore WE, Nalbantoglu J. *Pathol Res Pract* 2000; 196:243-50], [Eberhart CG, Chaudhry A, Daniel RW, Khaki L, Shah KV, Gravitt PE. *BMC Cancer* 2005; 5:19].

1.5 L'apoptosi

Fisiologicamente o a seguito di un danno irreversibile e pertanto non riparabile, le cellule vanno incontro a morte. Stress quali ipossia, alta concentrazione di radicali liberi, agenti chemioterapici e/o genotossici, farmaci intercalanti, radiazioni ionizzanti, ecc. sono responsabili dell'innescare dei meccanismi di morte della cellula. In relazione a:

- tipo di noxa patogena;
- durata e intensità dello stress;
- stato metabolico-funzionale della cellula;

si possono attivare due differenti processi accomunati unicamente dal medesimo risultato: **necrosi** o **apoptosi**.

La figura 3 mette in evidenza, mediante una tabella, le principali differenze tra i due processi.

1.6 La cascata apoptotica

L'apoptosi rappresenta la morte programmata della cellula; può essere fisiologica, per mantenere il controllo omeostatico sul numero di cellule che costituiscono un tessuto o un organo, tuttavia può essere anche patologica se si innesca in risposta a stress/danni cellulari.

Apoptosi	Necrosi
<p>Coinvolge singole cellule.</p> <p>Processo attivo.</p> <p>Le cellule presentano una riduzione del volume e picnosi nucleare (aspetto a gocciolina d'inchiostro).</p> <p>Membrane cellulari apparentemente intatte.</p> <p>Organuli intatti al microscopio.</p> <p>Assenza di infiltrati infiammatori grazie all'eliminazione dei residui per fagocitosi di corpi apoptotici circondati da membrana (lisosomi e fagolisosomi).</p> <p>Morte cellulare programmata: associata all'embriogenesi, a normali fenomeni involutivi (es. timo). Può anche essere innescata da stimoli patologici, comunque di moderata intensità.</p>	<p>Coinvolge gruppi di cellule (confluenti).</p> <p>Processo passivo.</p> <p>Cellule dilatate, nuclei debolmente colorabili, bordi evidenziabili.</p> <p>Alterazione morfo-funzionale della membrana cellulare.</p> <p>Organuli anormali (es. mitocondri giganti).</p> <p>Presenza di eventi infiammatori a causa della diffusione di frammenti proteici.</p> <p>Morte cellulare dovuta ad esposizione ad agenti nocivi, non costituisce una risposta fisiologica.</p>

Fig. 3 Tabella di confronto tra necrosi e apoptosi.

Il processo a cascata che la determina è piuttosto complesso e non ancora del tutto noto. L'innescamento apoptotico avviene ad opera di stimoli che possono giungere dall'esterno o dall'interno della cellula (alterazioni al DNA, alterata espressione genica durante il ciclo cellulare, variazioni del calcio intracellulare, ecc...). Questi stimoli possono essere molecole in grado di legare recettori di membrana o intracellulari come il Tumor Necrosis Factor (TNF) ed il Fas-ligand (agiscono tramite i recettori di membrana della famiglia del TNF receptor), i glucocorticoidi (inducono l'apoptosi nei linfociti tramite recettori intracellulari specifici) oppure stimoli "trofici" quali la carenza di fattori di crescita, il distacco dalla matrice extracellulare determinato dalle integrine, la carenza ormonale. In generale il meccanismo si basa prevalentemente sull'attivazione di processi enzimatici cellulari, anche se in molti casi viene coinvolta la trascrizione di una serie di geni coinvolti nella via apoptotica (*MYC*, *BAX*, *TP53*, *E2F*, a seguire *BCL-2*) o attiva i meccanismi di riparazione intracellulari.

Il passo successivo vede l'attivazione di proteasi citoplasmatiche: le proteasi neutre calcio-dipendenti e le caspasi. [KB Spurgers, NS Chari, NL Bohnenstiehl, TJ McDonnell *Nature*, 2006, 13, 1360-1370].

Le *proteasi neutre* sono enzimi inattivi alle normali concentrazioni di Calcio intracellulare e si attivano quando la sua concentrazione aumenta in modo significativo (200-400 nM vs 1uM).

Le *caspasi* invece sono una famiglia di proteasi cisteiniche capaci di scindere il legame peptidico dopo un acido aspartico. Sono una famiglia di circa 10 componenti noti ad oggi, i quali differiscono tra loro per le proprietà biochimiche (specificità di substrato, inibitori). Coprono ruoli determinanti nell'innesco del processo (caspasi inizianti) e nella sua evoluzione (caspasi effettrici); inoltre agiscono come enzimi proteolitici le une sulle altre (le iniziatrici attivano tramite proteolisi le effettrici) oppure inibiscono, proteolizzando, altri enzimi coinvolti nel processo (es. le proteine che riparano il DNA, l'actina, le laminine, ecc.). Esistono anche vie apoptotiche caspasi indipendenti.

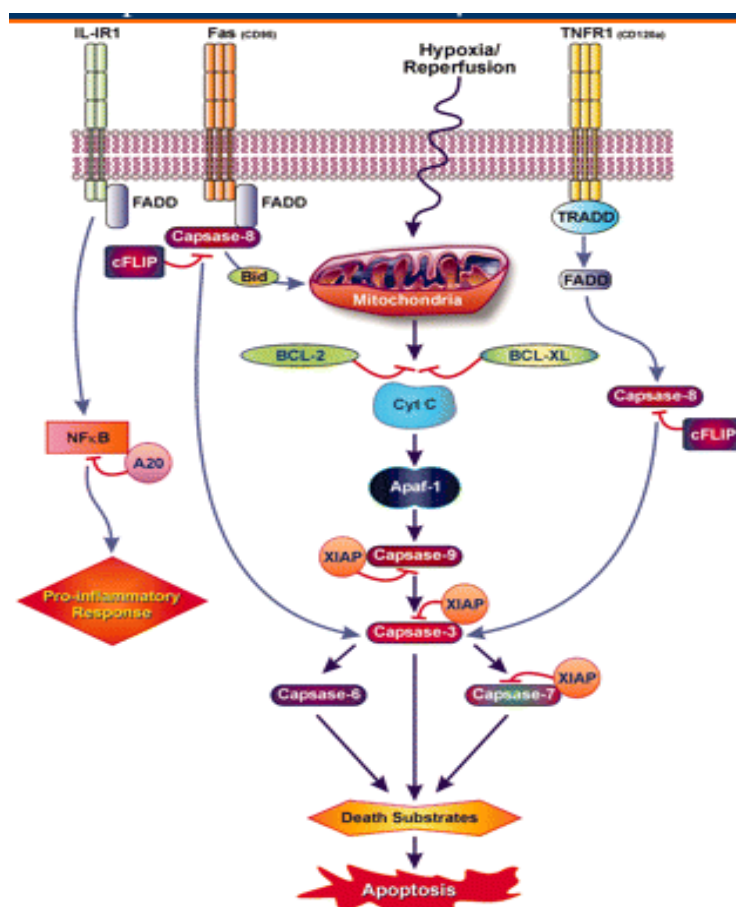


Fig. 4 Schema del meccanismo di apoptosi

L'apoptosi può seguire due vie: la via **estrinseca** e la via **intrinseca**.

La via **apoptotica estrinseca** inizia con l'interazione ligando-recettore TNFR e Fas receptor con TNF e Fas ligandi. Il complesso proteico che si crea attiva il death domain dei recettori che determinano la proteolisi, quindi l'attivazione, della Casp-8, uno dei fattori di inizio della cascata.

Accanto a questa via si attiva la **via apoptotica intrinseca** che ha per protagonista il mitocondrio.

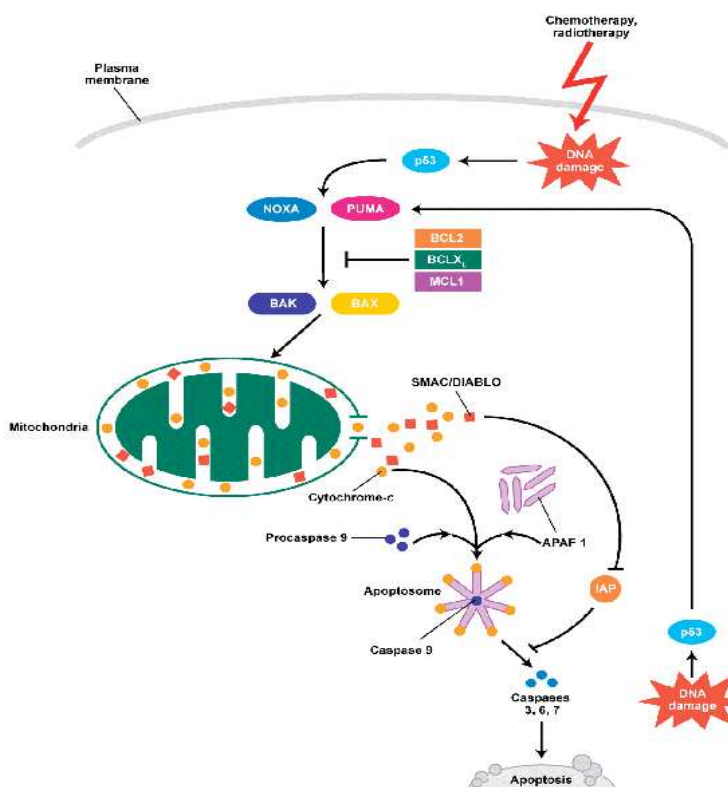


Fig. 5 Schema descrittivo della via apoptotica intrinseca

Il danno subito dalla cellula porta all'induzione dell'espressione di alcuni fattori proteici responsabili di un controllo sullo stato metabolico della cellula stessa. Il primo ad essere attivato è *p53* che, per l'importanza, ricopre il ruolo di “*guardiano del genoma*”. Questa proteina viene indotta e attivata, determinando l'innescò di numerose azioni. Il primo meccanismo d'azione di *p53*, a tutt'oggi il più noto, prevede la sua migrazione a livello del nucleo e il legame a determinate sequenze di DNA che determinano l'induzione (molto raramente la repressione) di sequenze di mRNA. Ad esempio, in tale maniera determina l'aumento dell'espressione di PUMA e NOXA, fattori pro apoptotici che bloccano Bcl-2 mitocondriale; inoltre *p53* stessa riduce l'espressione di Bcl-2. Il

guardiano arriva poi al mitocondrio dove spiazza Bcl-2 e Bcl-xl, così facendo Bak e Bax sono libere di creare dei pori sulla membrana mitocondriale che permettono la fuoriuscita del citocromo c (Cyto c). Quest'ultimo genera un complesso con Apaf-1, altro fattore pro-apoptotico indotto da p53. L'eterodimero verrà catturato dalla pro-caspasi-9 che si attiva, e i tre fattori vanno a costituire un complesso proteico detto apoptosoma. [Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J., *Nature*, 2008 March, 9, 231-241].

E' esattamente a questo punto del processo che le due vie intrinseca ed estrinseca si incontrano: la Caspasi 8 e l'apoptosoma attivano la Caspasi 3 clivandola. Quest'ultima attiva altri due membri della stessa famiglia: la Caspasi 6 e la Caspasi 7. Queste tre effettrici porteranno alla distruzione progressiva della cellula, determinando l'alterazione delle proteine cellulari e delle membrane. [Kim R., Emi M., et al, *J.of Pathology*, 2006, 208: 319-326]

1.7 NUTLIN-3

Numerosi recenti studi hanno dimostrato che destabilizzando il complesso MDM2-p53 sfruttando un approccio macromolecolare o, più semplicemente, sopprimendo l'espressione di MDM2, si arriva ad una liberazione e stabilizzazione di p53 inibendo la crescita tumorale. [Espinoza-Fonseca LM, *Theor.Biol.Med.Model*, 2005, 2:38] [Fry DC, Vassilev LT, *J.Mol.Med*, 2005,83,955-963] Vassilev e co. hanno scandagliato le librerie di composti chimici per individuare famiglie di composti guida ad alta efficacia, potenti e selettivi, capaci di agire come inibitori dell'eterodimero MDM2-p53. Una di queste classi è una famiglia di analoghi cis-imidazolici detti Nutlins (nome che sta per **Nutley inhibitors**). E' una famiglia piuttosto ampia, caratterizzata da diversi analoghi che differiscono tra loro per gruppi sostituenti che ne modificano l'ingombro sterico e i caratteri di idro-lipoficità.

Sono molecole ancora in fase di valutazione pre-clinica per le quali esistono pochissimi studi che mettono in luce gli eventuali effetti su animali. Mancano ancora dati di farmacocinetica e farmacodinamica, tuttavia nell'ultimo periodo l'interesse verso questi composti è divenuto decisamente considerevole.

La molecola di maggior rilievo dal punto di vista dell'efficacia è Nutlin-3. [Vassilev et al, *Science*, 6 February 2004: 844-848 DOI: 10.1126/science.1092472].

Viene sintetizzato come racemo; infatti esiste in due forme enantiomeriche a seconda della disposizione nello spazio dei due sostituenti cloro-fenilici. E' importante distinguere i due poiché i risultati sperimentali riportati in letteratura dimostrano che l'enantiomero b è 150 volte meno efficace dell' enantiomero a, e a quanto sembra dagli studi di affinità, tale differenza si deve all'enorme attività legante che si associa solo al Nutlin 3-a. [Wang Z, Jonga M, Lambros T, *J.of Pharm.and Biom.Anal*, 2007, 45,720-729]

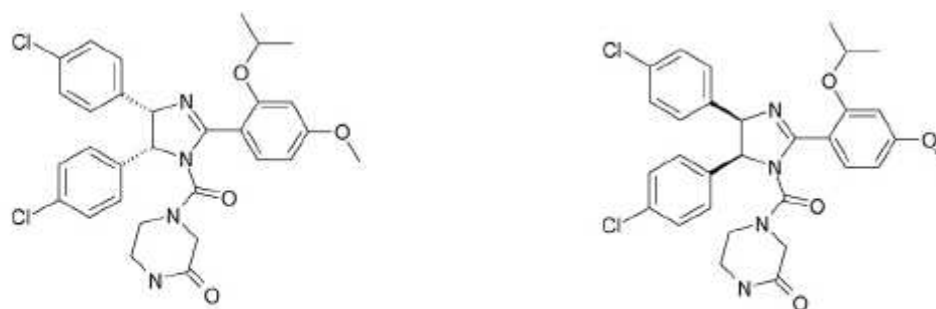


Fig. 6 Struttura chimica di Nutlin-3: enantiomero 3a (a sinistra); enantiomero 3b (a destra)

Ne è stata studiata la struttura cristallina e si è evidenziato che Nutlin-3 agisce mimando p53 nella tasca di legame che MDM2 mette appositamente a disposizione: un sostituito Cloro-fenilico entra nella tasca del Trp²³; l'altro nella tasca della Leu²⁶; il gruppo piridin-chinone nella tasca della Phe¹⁹; il nucleo imidazolico rimpiazza lo scheletro elicoidale della p53 e dirige i gruppi sostituenti nelle tasche proteiche normalmente occupate da Phe¹⁹, Leu²⁶, Trp²³. È strano immaginare che una molecola a così basso PM com'è Nutlin-3 possa inibire un complesso proteico, dato che di norma le proteine hanno una superficie di interazione piuttosto ampia che permette loro di legarsi e una molecola a basso PM non crea una destabilizzazione sufficiente a staccare i leganti. Nutlin-3 invece riesce in quest'impresa per il semplice fatto che MDM2 e p53 interagiscono in punti ben definiti: la struttura cristallina dell'eterodimero mostra una profonda tasca idrofobica di MDM2 che viene riempita da tre catene di residui amminoacidici specifici appartenenti a p53, per l'appunto Trp²³, Leu²⁶, Phe¹⁹. Questi tre sono i siti di maggior interazione che determinano la formazione di un legame piuttosto forte tra le due subunità proteiche. [Macchiarulo A., Giacchè N., et al. *J.Chem.Inf.Model.*, 2008, 48, No.10].

Nutlin-3 agisce quindi come inibitore di MDM2 intercalandosi tra le subunità proteiche interagenti e prevenendo l'inibizione di p53. In questo modo p53 si accumula nel nucleo in forma attiva, mentre MDM2 viene bloccata e non determina l'inibizione di p53.

Il primo effetto che si nota dopo il trattamento con Nutlin-3 è un aumento di p53 e di conseguenza un incremento dei suoi target trascrizionali: aumenta p21 poiché la cellula verrà subito indotta ad un blocco del ciclo cellulare; aumentano le proteine pro-apoptotiche poiché viene stimolato tale processo grazie all'incremento di p53, può aumentare anche MDM2 come risposta al bilanciamento esistente tra i due peptidi.

[Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al, Proc.Natl.Acad.Sci, USA 2006,103:1888-93]

[Vassilev L.T, Trends in Mol.Medicine, vol 13, No1]

Per le sue caratteristiche, Nutlin-3, non potrà mai sostituire un agente antineoplastico; tuttavia il suo meccanismo d'azione può essere sfruttato per potenziare gli effetti di un trattamento chemioterapico convenzionale. Nutlin-3 determina una maggior concentrazione utile e attiva di p53 nelle cellule. Associando questa agli agenti tradizionali, possono essere ottenuti effetti curativi maggiori inducendo un danno cellulare mediante i farmaci chemioterapici in cellule predisposte a una più potente attivazione di p53 determinata dalla minor degradazione.

Da ciò si deduce che Nutlin-3 riesce ad "amplificare" l'effetto del chemioterapico permettendo una riduzione del dosaggio di quest'ultimo, conseguenza che porta ad una notevole riduzione dei gravi effetti collaterali che, specialmente nei bambini, sono ben conosciuti e prevedibili.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

Lo studio del *pathway* di regolazione MDM2-p53 dipendente dall'azione di Nutlin-3 è stato condotto su cellule derivate da medulloblastoma umano: Daoy e MB1603.

Daoy è una linea cellulare ipertetraploide, isolata nel 1985 dal cervelletto di un paziente maschio di 4 anni, caucasico, affetto da medulloblastoma cerebrale desmoplastico. In esse p53 ha subito una mutazione e codifica per una proteina p53 mutata ed iper-espressa.

MB1603 è una linea cellulare di medulloblastoma anaplastico a grandi cellule.

Le Daoy crescono in RPMI 1640 addizionato al 10% di FBS (*Fetal Bovin Serum*), 1% di L-glutammina (2 mM), di aminoacidi non essenziali e di antibiotici (penicillina e streptomina 100 ug/mL).

Le MB1603 crescono in DMEM addizionato al 10% di FBS, al 1% di FPS (*Fetal Porcine Serum*), 1% di L-glutammina (2 mM), di Sodio Piruvato, di aminoacidi non essenziali e di antibiotici (penicillina e streptomina 100 ug/mL).

La linea cellulare Daoy è stata ottenuta dall'ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas VA): le MB1603 sono state ottenute per gentile concessione del Dott. Capra (Istituto "G. Gaslini", Genova).

2.2 Reagenti ed anticorpi

Nutlin-3 acquistato da Sigma Aldrich (SIGMA Aldrich, Missouri, USA), è stato disciolto in DMSO, aliquotato e mantenuto a -20°C.

Il sale di tetrazolio MTT, 3,(4,4-dimetiltiazolo)-2,5 difenil-tetrazolo bromuro, è stato acquistato dalla SIGMA (SIGMA Chemical Co., USA).

I reagenti per la quantificazione proteica (BCATM protein quantitation assay) sono stati acquistati dalla Pierce (Pierce Chemical Co., USA).

L'anticorpo policlonale anti-p53(DO-1) sc-126 (Santa Cruz Biotechnology; CA) è stato usato 1:1250, mentre l'anti-MDM2 (Ab-2) Mouse mAb (2A10) acquistato da Oncogene (Calbiochem-Novabiochem Corp., USA) 1:750. L'anticorpo anti-actina (I-19, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz CA) usato 1:5000; anti-PARP è stato acquistato da Cell

Signaling (Cell Signaling Technology Inc., USA) usato 1:1000; l'anticorpo monoclonale anti-p21 WAF1 da BD Biosciences (BD Biosciences Clontech, USA) usato 1:1000 e anti- β -tubulina usato 1:500 da Sigma (SIGMA Aldrich, Missouri, USA). Gli anticorpi secondari coniugati a perossidasi sheep anti-mouse e donkey anti-rabbit sono stati acquistati da Amersham (Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA): anti-mouse IgG coniugato ad HRP (Amersham); anti rabbit IgG coniugato ad HRP (Amersham) anti-mouse IgM coniugato con HRP.

La soluzione chemiluminescente *Enhanced chemoluminescence* kit è stata acquistata da Amersham ("*ECL-PLUS*", Amersham Biosciences; Europe GmbH); le membrane di nitrocellulosa acquistate da Schleicher & Schuell dopo incubazione con la soluzione chemiluminescente sono state esposte a lastre *Hyperfilm ECL* (Amersham Biosciences; Europe GmbH) ed in seguito opportunamente sviluppate.

Il colorante nucleare DAPI è stato acquistato da Molecular Probes (Molecular Probes Inc., USA).

2.3 Chemioterapia e Saggio di citotossicità con MTT

Il saggio con MTT, 3-(4,4-dimetiltiazolo)-2,5 difenil-tetrazolo bromuro, ha lo scopo di valutare la capacità da parte di cellule vitali di convertire il sale di tetrazolio giallo nella sua forma ridotta, un precipitato porpuro insolubile di formazano.

La reazione di riduzione è attribuita all'attività glicolitica mitocondriale ed è un processo dipendente dalla presenza di NADH e NADPH. Nelle cellule in attiva proliferazione la conversione di MTT nella sua forma ridotta è rilevabile tramite lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 540 nm. La quantità di formazano che si forma, in seguito alla reazione mitocondriale, è proporzionale al numero di cellule sane e vitali nella popolazione esaminata.

Per valutare la riduzione mitocondriale dell'MTT le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di $0,5 \times 10^6$ /mL per le MB1603 e di $1,2 \times 10^3$ /mL per le Daoy, in un volume di 100 μ L di terreno, a cui sono stati successivamente aggiunti 10 μ L di una soluzione del farmaco o dell'associazione dei farmaci a concentrazioni differenti. Le cellule di controllo sono mantenute in presenza di DMSO alla stessa diluizione di quella utilizzata per ottenere la più alta concentrazione del farmaco, così da escludere ogni possibile tossicità attribuibile al solvente. Le piastre sono state incubate a 37°C e ad intervalli di 24, 48, 72 ore e 7 giorni

è stato aggiunto il reagente: 10 μ L di una soluzione 5 mg/mL di MTT. Le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C, per permettere l'incorporazione e la riduzione del sale di tetrazolio, centrifugate per 10 minuti a 300 rcf e risospese in 150 μ L di DMSO per favorire la solubilizzazione dei cristalli di formazano. Le piastre sono quindi lasciate ad agitare per 30 minuti e lette ad una lunghezza d'onda di 540 nm (Victor3 Multilabel Counter, Perkin Elmer).

I rapporti tra i valori di assorbanza delle cellule mantenute in presenza ed in assenza dei farmaci (A/A_{CTR}) riportati in grafico corrispondono alle medie di tre esperimenti indipendenti.

2.4 Irradiazione e Saggio di citotossicità con MTT

Le cellule MB1603 e Daoy sono state esposte a Radiazioni Gamma (radiazioni ionizzanti – IR) emesse mediante Theratronic cobalt unit T-1000 (Theratronic Internation, Inc., Ottawa, Canada) per valutare gli effetti del trattamento combinato irradiazione/Nutlin-3 e combinazione di farmaci. Brevemente, le cellule, mantenute in attiva fase di crescita, sono state raccolte e successivamente esposte a differenti dosaggi di radiazioni (0,3, 0,6, 0,9, 1, 1,2, 2, 5 e 10 Gy) e trattate secondo quanto descritto nel paragrafo 2.3 per valutarne gli effetti citotossici.

2.5 Immunoblotting

Le cellule ad una concentrazione di 2×10^6 /mL sono state seminate e trattate con differenti concentrazioni di farmaco e combinazioni di farmaci per tempi crescenti. Successivamente sono state raccolte e dopo 2 lavaggi con PBS 1X sono state risospese in buffer di lisi (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; 1% Triton X-100; EDTA 2 mM; 0,5% acido deossicolico; 0,1% SDS; aprotinina 20 μ g/mL; leupeptina 20 μ g/mL; PMSF 1 mM) ed incubate in ghiaccio per 20 minuti. I lisati cellulari sono stati poi purificati mediante centrifugazione a 4°C, (14000 x g per 30 minuti), e il surnatante, rappresentativo sia della frazione citosolica che di quella nucleare solubile, sono stati recuperati. La concentrazione proteica è determinata mediante saggio colorimetrico con BCA (acido bicinoninico, 540 nm), utilizzando l'albumina sierica bovina (2 mg/mL BSA) come standard di riferimento.

Una volta determinate le concentrazioni proteiche dei campioni, 30-40-60-90 ug di lisato proteico, diluito in una soluzione riducente RLB (*Reducing Loading Buffer*: DTT 77 µg/mL, 1 g/mL SDS, 50% glicerolo, 40% Tris-HCl 1 M pH 6.8), sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (10% SDS-PAGE). Le proteine sono state poi trasferite *over-night* su membrana di nitrocellulosa mantenendo all'interno della camera di trasferimento a temperatura (4 °C) e voltaggio (50V) costanti. Dopo saturazione con una soluzione di latte deidratato privo di grassi al 5% (2 ore) la membrana è stata lasciata ad ibridare con l'anticorpo specifico diretto contro la proteina di interesse secondo le modalità descritte dalla ditta produttrice. Successivamente, dopo abbondanti lavaggi con TNE 1X, è stato utilizzato un anticorpo secondario coniugato ad una perossidasi di rafano (HRP) per rilevare la presenza della proteina mediante il metodo della chemiluminescenza. In presenza di perossido di idrogeno, la perossidasi catalizza l'ossidazione di un diacil-idrazide ciclico creando un intermedio instabile che decade con l'emissione di luce. Questa luminescenza può essere rilevata tramite l'esposizione ad una lastra fotografica poi trattata con liquidi di sviluppo fotografico.

2.6 Analisi fluorocitometrica

Gli effetti dei chemioterapici e di Nutlin-3 sulla distribuzione delle popolazioni nel ciclo cellulare (G1, S, G2/M) sono stati valutati con tecnica citofluorimetrica. Le cellule sono state seminate come descritto nel paragrafo 2.5. Al termine di ogni trattamento, le cellule sono state prelevate, centrifugate (10 minuti) a 300 rcf, lavate per 2 volte in PBS 1X e risospese in un volume di 500 µL dello stesso; infine sono state fissate per 20 minuti in 2 mL di metanolo (mantenuto a -20 °C) in ghiaccio. Dopo una centrifugazione di 10 minuti a 300 rcf, le cellule sono state lavate per due volte con PBS 1X ed infine risospese in una soluzione colorante di propidio ioduro diluito 1:100 con PBS 1X.

Mediante il kit APO-DIRECT™ (CHEMICON International, USA & CA) sono state analizzate in citofluorimetria le percentuali di cellule vitali e delle cellule apoptotiche in seguito al trattamento con i farmaci singoli o combinati con Nutlin-3. Brevemente, le cellule sono state seminate come descritto nel paragrafo 2.5, al termine di ogni trattamento sono state prelevate, centrifugate (10 minuti) a 300 rcf, lavate per 2 volte in PBS 1X, per procedere poi con la fissazione (paraformaldeide 1% ed etanolo 70%) e la colorazione secondo le modalità descritte dal manuale fornito dalla ditta produttrice. La colorazione delle cellule apoptotiche avviene attraverso l'utilizzo dell'enzima TdT

(*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) in grado di incorporare, nel DNA frammentato, nucleotidi di deossiridina trifosfato marcati con fluoresceina. Risospendendo le cellule in una soluzione colorante di propidio ioduro vengono marcate le cellule vitali.

Mediante citofluorimetro FACSCalibur ed il software CELLQUEST (Becton Dickinson, NJ, USA) è stata identificata la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare (G1, S, G2/M) e di cellule apoptotiche.

2.7 Epifluorescenza nucleare con colorazione DAPI

La colorazione al DAPI è stata utilizzata per la valutazione delle modificazioni della morfologia nucleare delle cellule MB1603 trattate con 2 μ M Nutlin-3, 2 μ M di CDDP e 0,2 μ M VP16 usati singolarmente ed in associazione per 24 e 72 ore. Le cellule sono state lavate per due volte con PBS 1X, risospese in 100 μ L di PBS 1X e 2 μ L di sospensione sono stati posti su un vetrino per fluorescenza; sono state quindi fissate in una soluzione di paraformaldeide al 4% per 20 minuti e, dopo 4 lavaggi di 5 minuti in PBS 1X, sono state permeabilizzate in una soluzione 0,2% Triton X-100 in PBS 1X per 10 minuti. In seguito sono state messe per 10 minuti in una soluzione 100 mM di glicina e poi incubate per 10 minuti in FCS al 10%. Dopo tre lavaggi con PBS 1X, le cellule sono state colorate con DAPI diluito 1:500 con glicerolo/PBS 1:1, e le immagini sono state acquisite con telecamera digitale Leica DC 300, montata su microscopio Leica DMLB (Leica Microsystem Ltd, Switzerland).

3. RISULTATI

3.1 Caratterizzazione delle linee cellulari di medulloblastoma ed effetto del trattamento farmacologico.

Abbiamo innanzitutto caratterizzato le due linee cellulari di medulloblastoma utilizzate: MB1603 E Daoy. Mediante tecnica Western Blotting, abbiamo determinato il livello di espressione basale delle due principali proteine implicate nei meccanismi di azione di Nutlin-3, p53 ed MDM2.

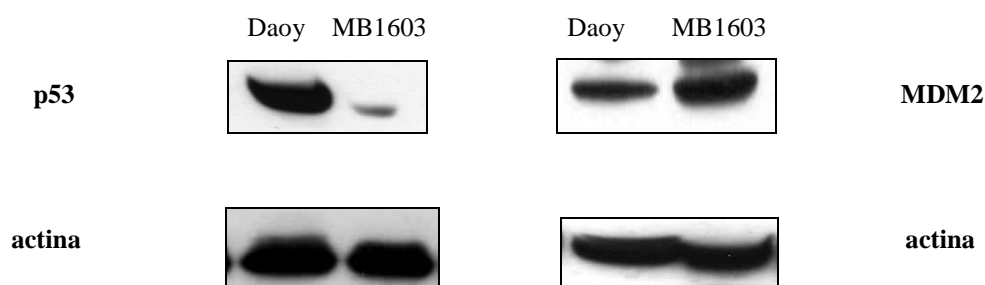


Fig. 1 Espressione basale di p53 ed MDM2 nelle linee cellulari, Daoy e MB1603. Le proteine (40µg per p53 e 60µg per MDM2) sono state separate in condizioni denaturanti mediante SDS-PAGE e trasferite su membrana di nitrocellulosa. p53 (53kDa) e MDM2 (72kDa) sono state visualizzate mediante immunoblotting, utilizzando anticorpi policlonali specifici per il riconoscimento.

Le cellule MB1603 hanno bassi livelli di p53 mentre le Daoy, che presentano una p53 mutata, esprimono livelli molto maggiori di proteina. Confrontando i livelli di espressione di MDM2, possiamo notare che proprio la linea cellulare con p53 *wild-type* presenta quantità maggiori di MDM2 rispetto alla linea cellulare Daoy.

Abbiamo successivamente studiato l'effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico di Nutlin-3 sulle due linee cellulari utilizzate come modello sperimentale in saggi di citotossicità (MTT, vedi Materiali e Metodi). Le cellule, mantenute in condizioni standard di coltura ed in fase di crescita esponenziale, sono state seminate in piastre a 96 pozzetti e trattate con differenti concentrazioni di Nutlin-3, CDDP, VP16 e VCR singolarmente e in associazione, valutando la vitalità cellulare a 24 ore, 72 ore e 7 giorni.

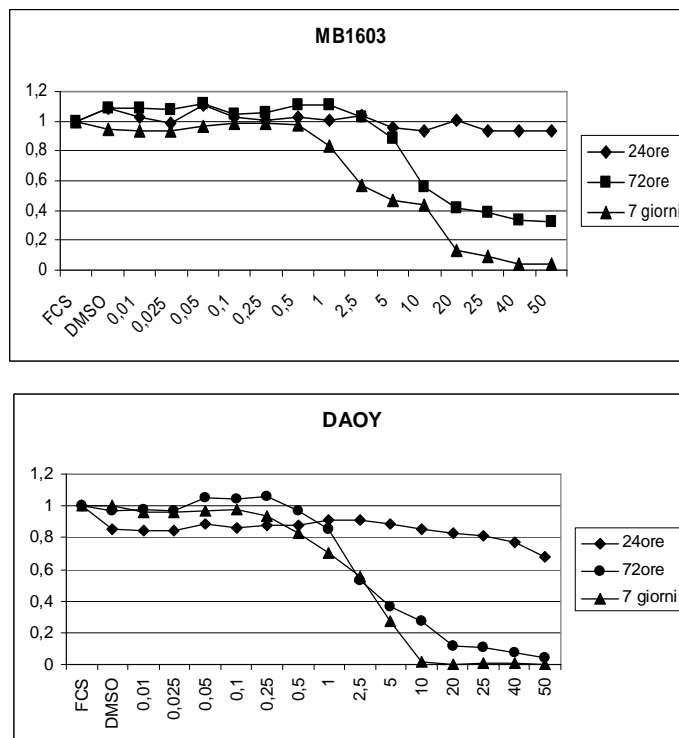


Fig. 2 Cellule di medulloblastoma in fase di crescita esponenziale sono state seminate ad una concentrazione di $0,4 \times 10^6$ /ml (MB1603); $1,5 \times 10^4$ /cm² (Daoy) in piastre da 96 pozzetti, lasciate crescere O.N. in condizioni standard di coltura e quindi trattate con concentrazioni crescenti di Cis-platino (CDDP - µM). L'analisi della proliferazione cellulare è stata eseguita mediante saggio MTT (vedi Materiali e Metodi). In ordinata sono riportati i rapporti tra i valori di assorbanza (O.D. 540nm) misurati nelle cellule coltivate in presenza del farmaco e quelli misurati nelle cellule coltivate in presenza di DMSO [(A)/(A)ctr].

Il nostro primo obiettivo è stato quello di valutare la risposta delle cellule utilizzando *range* molto ampi di concentrazioni di farmaci a tre tempi differenti (24h, 72h, 7 giorni) per evidenziare l'andamento della vitalità cellulare ed individuare il dosaggio minimo efficace per la successiva fase di studio dell'associazione dei trattamenti.

Come riportato in figura 2, concentrazioni micromolari di CDDP inducono un elevato effetto antiproliferativo su tutte le linee cellulari. La risposta al trattamento è tardiva, infatti si esplica dopo le 72 ore per le MB1603, mentre le Daoy presentano una maggiore sensibilità al farmaco, manifestando una risposta decisamente evidente già alle 72 ore di trattamento. La IC50 si posiziona intorno a 2-2,5 µM dopo 7 giorni di esposizione al chemioterapico per entrambe le linee cellulari.

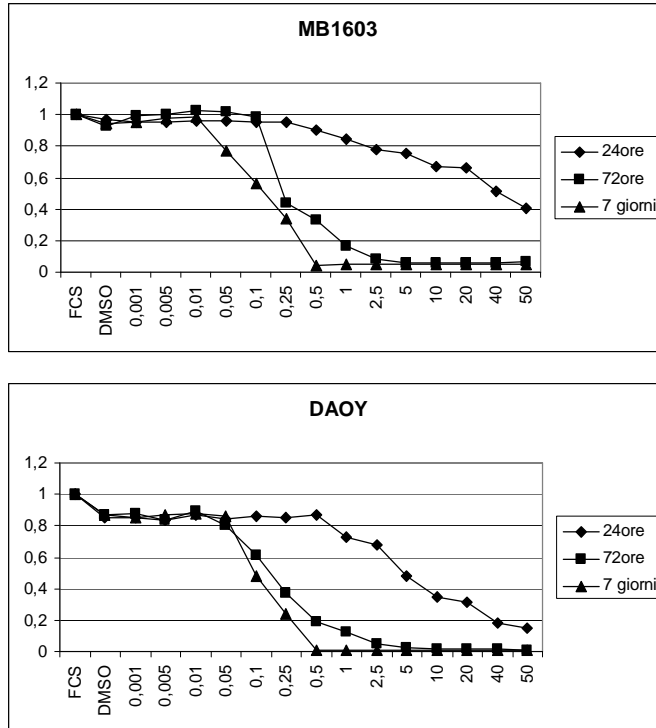


Fig. 3 Cellule di medulloblastoma in fase di crescita esponenziale trattate con concentrazioni crescenti di Etoposide (VP16 - µM). L'analisi della proliferazione cellulare è stata eseguita mediante saggio MTT (vedi Materiali e Metodi). In ordinata sono riportati i rapporti tra i valori di assorbanza (O.D. 540nm) misurati nelle cellule coltivate in presenza del farmaco e quelli misurati nelle cellule coltivate in presenza di DMSO [(A)/(A)ctr].

Il VP16 sembra essere più efficace del CDDP sulle cellule di medulloblastoma. Infatti la sua azione si evidenzia dopo sole 24 ore di trattamento, mostrando un buon effetto antiproliferativo a dosi comprese tra 5µM e 15µM. Dopo 72 ore di trattamento le cellule presentano una vitalità del 5-10% a 5µM e dopo 7 giorni si raggiungono tali valori di vitalità già a dosi comprese tra lo 0,25 e lo 0,5µM. La IC50 al settimo giorno di esposizione al farmaco si posiziona intorno a 0,1 µM. Anche in questo caso le Daoy si rivelano la linea cellulare più sensibile, manifestando una risposta più intensa e precoce.

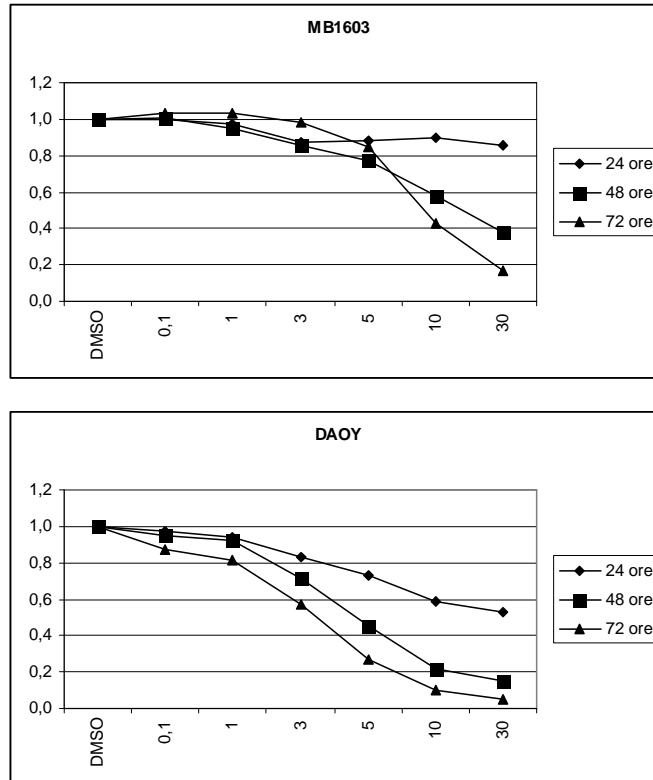


Fig. 4 Cellule di medulloblastoma in fase di crescita esponenziale trattate con concentrazioni crescenti di Vincristina (VCR - nM). L'analisi della proliferazione cellulare è stata eseguita mediante saggio MTT (vedi Materiali e Metodi). In ordinata sono riportati i rapporti tra i valori di assorbanza (O.D. 540nm) misurati nelle cellule coltivate in presenza del farmaco e quelli misurati nelle cellule coltivate in presenza di DMSO [(A)/(A)ctr].

La Vincristina è risultata essere più efficace sulla linea cellulare Daoy dove, già a 24 ore dal trattamento ed alle concentrazioni maggiori, è in grado di ridurre la vitalità cellulare di circa il 50%. A 72 ore dall'esposizione al farmaco l'IC50 per le Daoy corrisponde circa al dosaggio 3 nM. Anche le MB1603 risultano essere sensibili a VCR, ma la loro risposta è più tardiva e richiede concentrazioni maggiori.

Infine Nutlin-3 è stata valutata per le due linee e, come ci si attendeva, le Daoy che esprimono una p53 mutata, non vengono influenzate dalla molecola. Le MB1603, invece, dimostrano una buona sensibilità al trattamento che si manifesta con maggiore intensità dopo i 7 giorni, quando presentano una IC50 tra 2,5 μ M e 3 μ M. La IC50 alle 72 ore di trattamento si posiziona a valori intorno a 5-10 μ M (figura 5).

Questo tipo di analisi ci ha permesso di caratterizzare e quantificare la risposta delle linee cellulari selezionate ai farmaci chemioterapici, VP16, CDDP e VCR e a Nutlin-3.

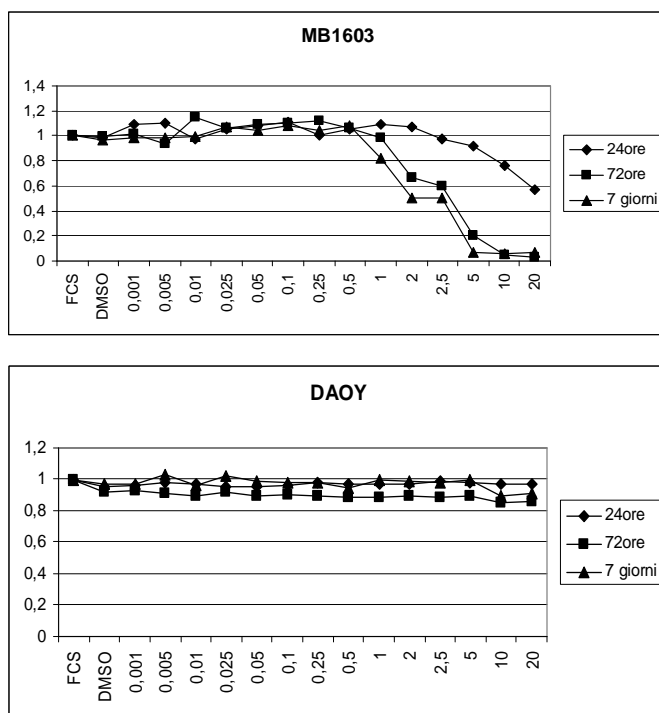


Fig. 5 Cellule di medulloblastoma in fase di crescita esponenziale trattate con concentrazioni crescenti di Nutlin-3 (μM). L'analisi della proliferazione cellulare è stata eseguita mediante saggio MTT (vedi Materiali e Metodi). In ordinata sono riportati i rapporti tra i valori di assorbanza (O.D. 540nm) misurati nelle cellule coltivate in presenza del farmaco e quelli misurati nelle cellule coltivate in presenza di DMSO [(A)/(A)ctr].

Abbiamo utilizzato lo stesso approccio per verificare se il trattamento combinato con Nutlin-3 sia in grado di incrementare l'effetto citotossico. Abbiamo mantenuto Nutlin-3 a concentrazione fissa (1 e 2 μM), per il CDDP è stato testato un dosaggio compreso tra 0,01 μM e 5 μM , per il VP16 tra 0,001 μM e 0,5 μM ed infine, per la VCR tra 0,1 nM e 30 nM.

I risultati ottenuti confermano la nostra ipotesi. In particolare, abbiamo notato che i co-trattamenti, Nutlin-3/CDDP, Nutin-3/VP16 e Nutlin-3/VCR determinino una riduzione della vitalità cellulare, considerevolmente maggiore rispetto ai singoli farmaci. Questo fenomeno è evidente già a partire dalle concentrazioni più basse di chemioterapico. L'effetto risulta più intenso e precoce utilizzando concentrazioni di Nutlin-3 più elevate (2 μM).

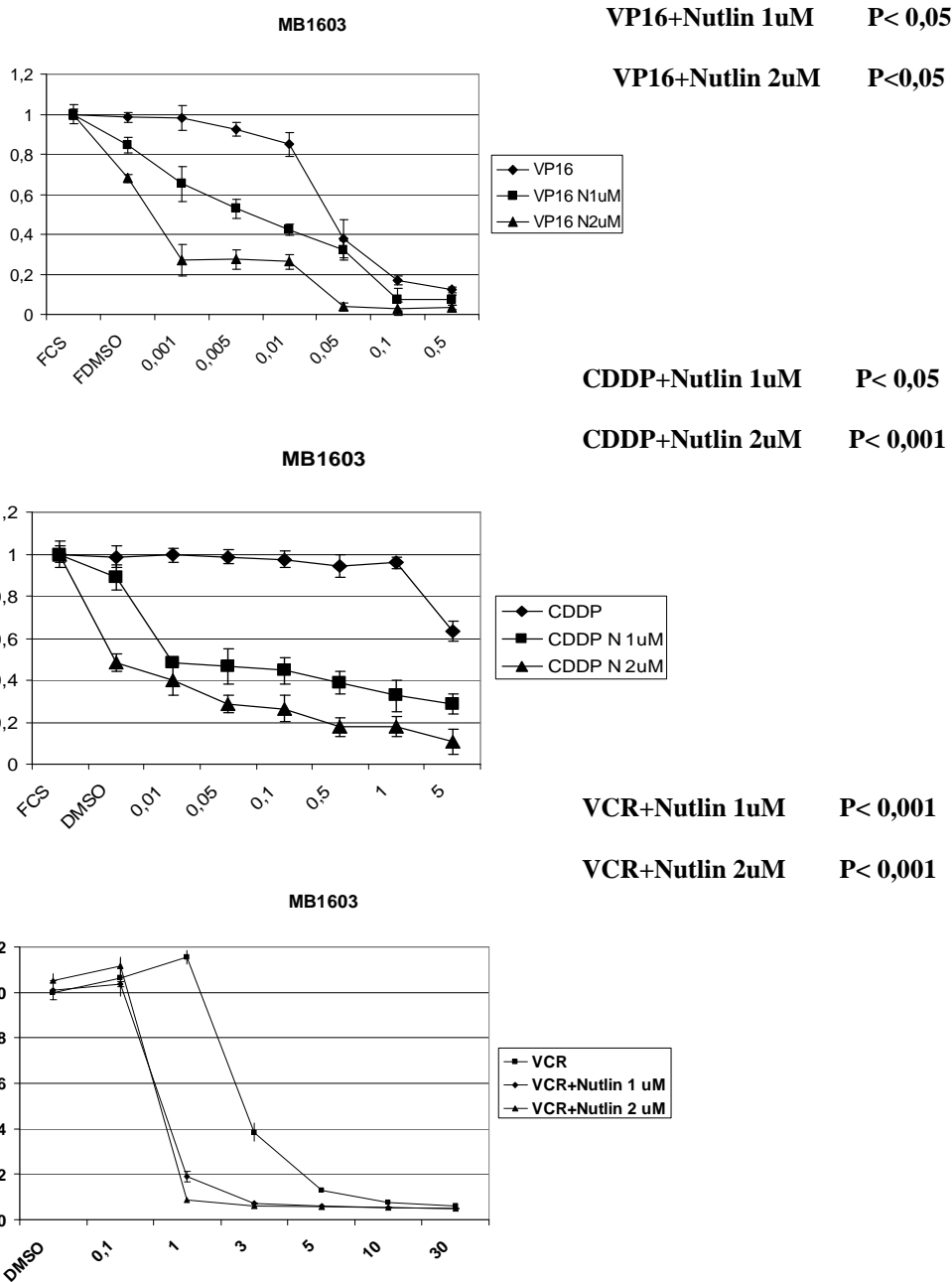


Fig. 6 Cellule di medulloblastoma, MB1603, che esprimono p53 *wild type*, trattate con concentrazioni crescenti di VP16, CDDP e VCR usati singolarmente e associati ad una concentrazione fissa di Nutlin-3, rispettivamente di 1 μ M e 2 μ M.

Le MB1603 presentano una maggiore risposta al trattamento combinato dei farmaci, rispetto all'uso del singolo chemioterapico (CDDP, VP16 o VCR). La vitalità cellulare è nettamente ridotta con l'associazione di Nutlin-3 e VP16; più precisamente, la differenza è più evidente alle concentrazioni minori, quando l'etoposide si dimostra efficace solo se in associazione con Nutlin-3. La vitalità varia da 90-95% con il VP16 0,001 μ M da solo a 60% e a 30% quando sia in combinazione con Nutlin 1 μ M o 2 μ M rispettivamente. L'esposizione a CDDP e Nutlin-3 si dimostra maggiormente efficace

rispetto al singolo farmaco. In questo caso alla concentrazione di 0,01 μM di CDDP la vitalità varia da un 50% in presenza di Nutlin 1 μM ad un 40% con Nutlin 2 μM , differenza che si mantiene anche alle concentrazioni maggiori di CDDP. Di converso la diminuzione della vitalità rispetto al trattamento singolo è netta: dal 90-97% al 40-50%. Anche il trattamento con Vincristina e Nutlin-3 ha prodotto degli effetti citotossici maggiori rispetto al singolo trattamento con VCR. Ad una concentrazione di VCR 1 nM la vitalità cellulare si riduce al 20% e al 10% circa, con aggiunta rispettivamente di Nutlin-3 1 μM e 2 μM . L'analisi statistica evidenzia una differenza significativa dei risultati (figura 6).

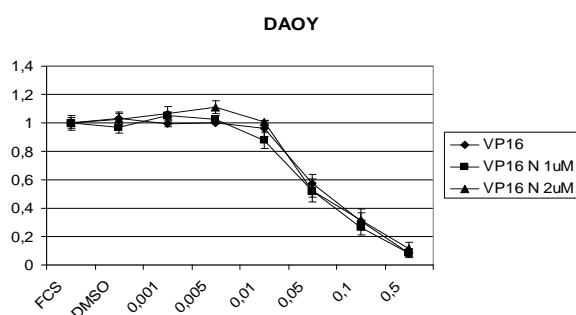
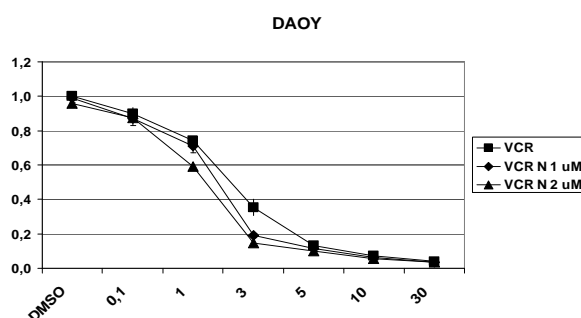
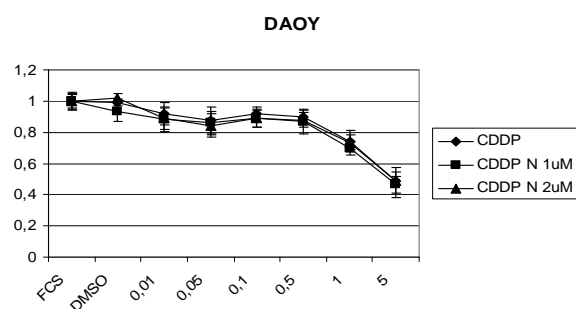


Fig. 7 Cellule di medulloblastoma, Daoy con p53 mutata, trattate con concentrazioni crescenti di VP16, CDDP e VCR usati singolarmente e associati ad una concentrazione fissa di Nutlin-3, rispettivamente di 1 μM e 2 μM .



Le cellule Daoy esprimono elevate concentrazioni di p53, mutata nel dominio di legame al DNA e pertanto non funzionante. La loro risposta a Nutlin-3 è nulla e i saggi MTT sopra riportati evidenziano come il trattamento combinato di CDDP, VP16 e VCR con Nutlin-3 non determini nessuna modifica rispetto al trattamento con il singolo agente chemioterapico, tranne che per una modesta riduzione di vitalità cellulare alla concentrazione 3 nM di Vincristina.

3.2 Nutlin-3 aumenta l'effetto citotossico delle radiazioni ionizzanti su MB1603, linea cellulare con p53 *wild-type*.

È stato precedentemente dimostrato che le cellule in fase G1 del ciclo cellulare mostrano una sensibilità ai raggi X circa 2 volte superiore rispetto a quelle che si trovano in fase S. [Pawlik TM et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59: 928-942] Abbiamo quindi considerato l'ipotesi che l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare nelle linee di medulloblastoma *wild-type* possa determinarne un aumento della radiosensibilità. Abbiamo esposto le MB1603 e le Daoy a dosaggi crescenti di radiazioni ionizzanti (0-10 Gy) e dopo 24 ore le abbiamo trattate con Nutlin-3 1 μ M per verificare gli effetti sulla vitalità cellulare della combinazione radioterapia/trattamento farmacologico.

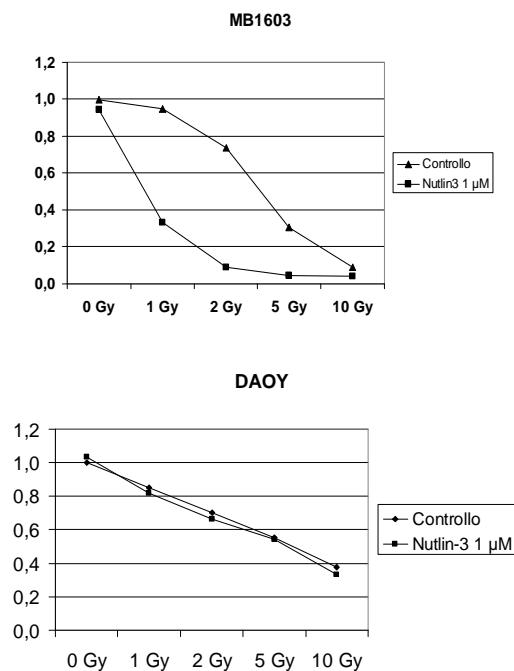


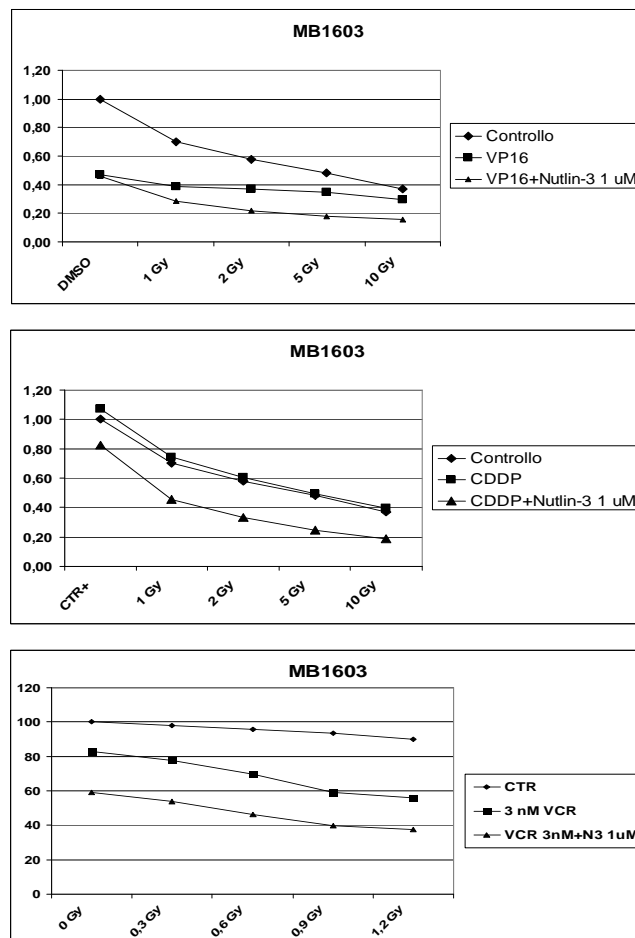
Fig. 8 Le cellule MB1603 e Daoy sono state esposte a dosaggi crescenti di radiazioni ionizzanti (0-10 Gy) e trattate a 72 ore con Nutlin-3 (1 μ M). L'analisi della proliferazione cellulare è stata eseguita mediante saggio MTT (vedi Materiali e Metodi).

Nelle cellule MB1603, in cui p53 è presente nella forma *wild-type*, il trattamento con Nutlin-3 ha portato ad un marcato decremento della vitalità cellulare già a partire dal più basso dosaggio di radiazioni ionizzanti; come si può notare in figura 8, la percentuale di cellule vive, esposte ad un 1 Gy, a 72 ore è passata dal 90% in assenza di Nutlin-3 al 30% in presenza del farmaco. Come atteso, il co-trattamento con radioterapia e

chemioterapia della linea cellulare Daoy (p53-mutata) non ha mostrato alcun aumento di efficacia.

In considerazione del mancato effetto di Nutlin-3 sulla linea cellulare Daoy e di quanto precedentemente descritto per le MB1603, abbiamo utilizzato solamente quest'ultima linea cellulare per una preliminare valutazione della combinazione del trattamento radiante con i trattamenti chemioterapici VP16, CDDP (2 μ M) e VCR (3 nM) utilizzati singolarmente ed in associazione con Nutlin-3 (1 μ M). Le MB1603 irradiate presentano una maggiore risposta al trattamento combinato dei farmaci, rispetto all'uso del singolo chemioterapico. La vitalità cellulare, infatti, viene ulteriormente ridotta con l'associazione di Nutlin-3 e VP16, già a partire dalle più basse esposizioni alle radiazioni ionizzanti (1 Gy) rispetto a quando l'etoposide viene utilizzato da solo. Anche la co-somministrazione di CDDP e Nutlin-3, nelle cellule sottoposte a radioterapia, si dimostra maggiormente efficace rispetto al singolo farmaco.

Fig. 9 Le cellule MB1603 sono state esposte a dosaggi crescenti di radiazioni ionizzanti (0-10 Gy) e trattate 24 ore con VP16 e CDDP (2 μ M), e 48 ore con VCR (3 nM), usati singolarmente o associati a Nutlin-3 1 μ M.



Infine, il trattamento radiante in combinazione con VCR e Nutlin-3 ha mostrato gli stessi effetti fino ad ora descritti (figura 9).

3.3 Il trattamento con Nutlin-3 determina attivazione di p53 e induzione di proteine coinvolte nell'apoptosi.

MDM2 è ritenuto il principale regolatore di p53; tale enzima costituisce l'ultimo anello di una complessa catena di proteine volte ad attivare una molecola segnale per la degradazione proteosomale, l'ubiquitina, che viene legata a p53. p53, in tal modo, viene sequestrata, inattivata e distrutta. Secondo la nostra ipotesi, l'inibizione dell'attività enzimatica di MDM2 da parte di Nutlin-3 potrebbe indurre nelle cellule di medulloblastoma attivazione e stabilizzazione di p53. A tal proposito abbiamo analizzato la cinetica dello stato stazionario delle principali proteine coinvolte nel percorso metabolico di p53 in cellule di medulloblastoma coltivate in presenza di Nutlin-3 a concentrazioni e tempi crescenti, verificando le eventuali variazioni dell'espressione proteica.

Il primo effetto valutato è stato l'andamento dell'espressione di p53 nelle due linee cellulari.

Come riportato in figura 10, il trattamento con Nutlin-3 determina una maggiore concentrazione di p53 fin dalle 12 ore di trattamento nelle MB1603. La concentrazione più alta di Nutlin-3 determina un effetto più intenso già a tempi precoci, ma questo è osservabile soprattutto alle 24 ore, quando si nota una espressione di p53 decisamente superiore rispetto al controllo (0 ore) e rispetto a Nutlin 1 μM . Per il trattamento di 72 ore, invece, i tre dosaggi non mostrano significative differenze per quanto riguarda i livelli di p53.

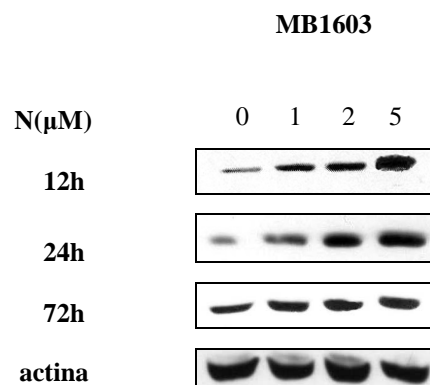


Fig. 10 Espressione di p53 mediante western blotting in cellule MB1603 trattate con concentrazioni crescenti di Nutlin-3 (N), rispettivamente 1, 2 μM e 5 μM per tempi crescenti.

A seguito di questa evidenza abbiamo valutato se l'utilizzo di Nutlin-3 determini un cambiamento di espressione di MDM2, che è non solo regolatore della stabilità di p53, ma è anche da essa regolato a livello trascrizionale.

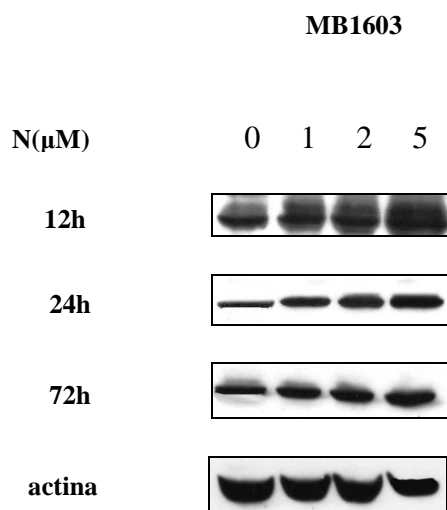


Fig. 11 Espressione di MDM2 mediante western blotting in cellule MB1603 trattate con concentrazioni crescenti di Nutlin-3 (N), rispettivamente 1, 2 μ M e 5 μ M per tempi crescenti.

La figura 11 evidenzia l'andamento dell'espressione di MDM2 (72 kDa). E' possibile osservare come l'andamento della quantità di proteina presente nella cellula sia simile all'andamento visto per p53. La presenza di Nutlin-3 determina un aumento della espressione di MDM2. Quest'ultima, infatti, aumenta con l'aumentare della dose di Nutlin-3 e tale effetto è osservabile soprattutto alle 24 ore nelle MB1603. Alle 72 ore abbiamo osservato la massima induzione di MDM2, parallelamente a quanto osservato per p53, anche se non vi sono differenze per le diverse concentrazioni di Nutlin-3. Abbiamo successivamente verificato se l'aumento della concentrazione di p53 sia in grado di aumentarne l'efficacia. Abbiamo valutato, mediante tecnica Western Blotting, l'espressione di p21, target trascrizionale di p53, e di PARP (Poli-ADP-ribosil polimerasi), un enzima che viene attivato durante i fenomeni di apoptosi.

PARP è una proteina di 116 kDa che viene clivata da uno dei principali effettori dell'apoptosi, la caspasi-3, e dà origine ad un frammento di 89 kDa. La proteina p21^{Waf/Cip1} è invece un potente inibitore universale delle chinasi ciclina-dipendenti (Cdk). Con tale azione genera un blocco del ciclo cellulare nella fase G1/S, che di

norma si verifica a seguito di danno al DNA tale da indurre l'espressione di p53. Infatti p21 è strettamente regolata da p53 in quanto suo diretto bersaglio trascrizionale.

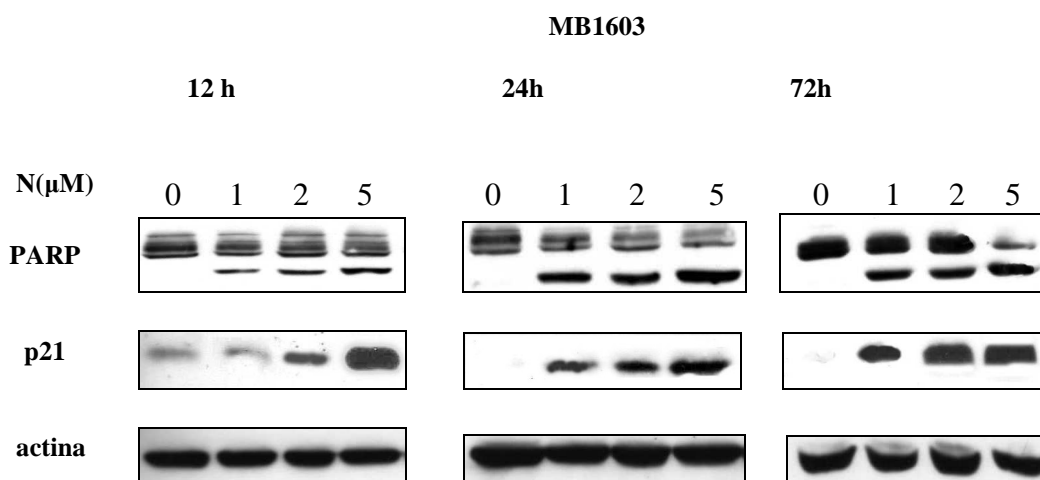


Fig. 12 Cellule di medulloblastoma, MB1603, trattate a concentrazioni crescenti di Nutlin-3 (N) per tempi di esposizione crescenti, come indicato in figura. Le proteine (PARP 40 μ g, p21 60 μ g) sono state separate mediante SDS-PAGE e trasferite su membrana di nitrocellulosa, valutandone poi lo stato stazionario mediante l'uso degli anticorpi policlonali anti-PARP ed anti-p21.

Nutlin-3 si dimostra efficace nell'innescare il processo apoptotico nella linea cellulare che esprime p53 *wild-type* (MB1603). Il clivaggio di PARP si manifesta già alle 12 ore e tende ad essere tanto più marcato quanto maggiore è la dose utilizzata.

Piuttosto intensa è l'induzione di p21 che presenta un rapido incremento dalle 12 ore in poi, crescendo parallelamente con la concentrazione utilizzata; tuttavia anche in questo caso la situazione tende a raggiungere i valori di massima espressione per tutti e tre i dosaggi alle 72 ore, in analogia a quanto osservato per p53 (figura 12).

La linea cellulare Daoy ha una p53 mutata nel sito di legame per il DNA. Proprio per questo motivo, nonostante sia espressa a concentrazioni elevate, non appare funzionalmente attiva. La figura 13 evidenzia la risposta assente delle Daoy in seguito a trattamento con Nutlin-3. L'espressione di p53 e MDM2 non mostra variazioni nel tempo dopo esposizione a diverse concentrazioni di farmaco; PARP non mostra alcun segno di clivaggio.

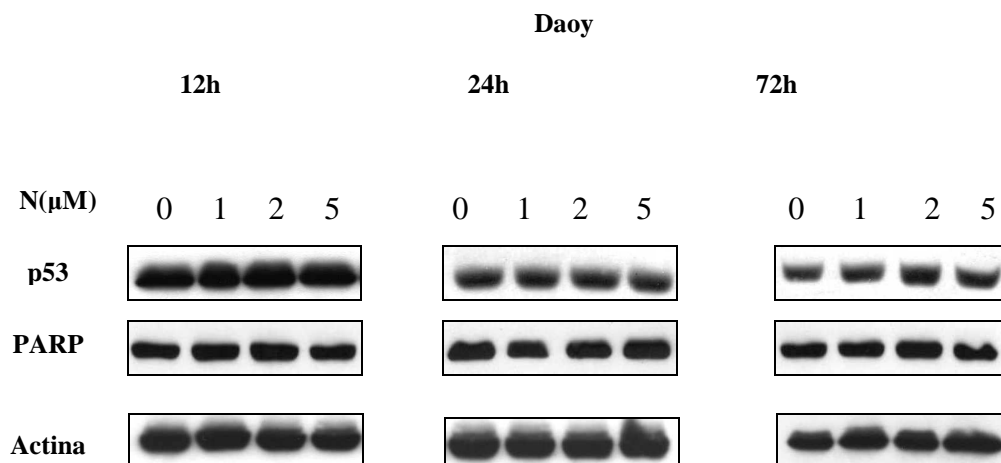
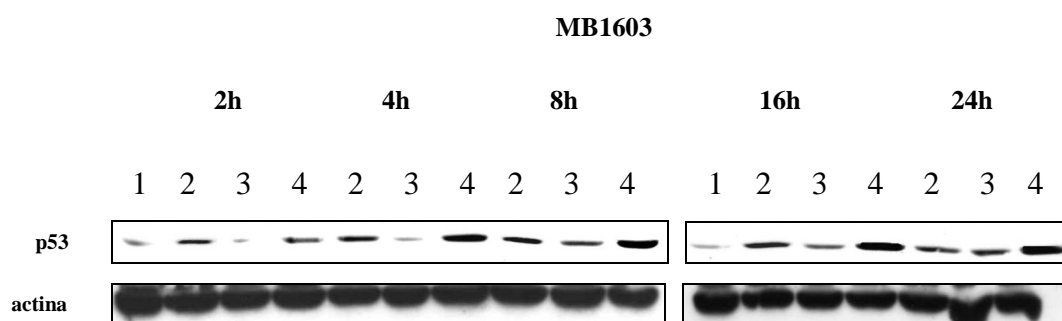


Fig. 13 Cellule Daoy trattate con concentrazioni crescenti di Nutlin-3 (N) per tempi di esposizione crescenti. Le proteine (p53 e PARP 40 μ g) sono state separate mediante SDS-PAGE e analizzate mediante western blotting.

Dopo aver osservato la risposta delle linee cellulari a Nutlin-3, è stata condotta la prima analisi dell'efficacia dei co-trattamenti; in particolare dell'associazione Nutlin-3-CDDP. Lo studio è stato eseguito per tempi brevi di esposizione ai trattamenti al fine di valutare la cinetica della risposta dei nostri sistemi cellulari alle molecole studiate. La variabilità dell'espressione proteica è stata analizzata dopo un'esposizione a Nutlin-3 e CDDP per tempi fino alle 24 ore. I trattamenti sono stati condotti utilizzando una concentrazione di Nutlin-3 pari a 2 μ M singolarmente e in combinazione; è stata indagata la variabilità nell'espressione di p53 e del suo regolatore e target MDM2, e il differente livello di clivaggio di PARP. In considerazione del mancato effetto di Nutlin-3 sulla linea cellulare Daoy e della risposta precedentemente descritta per le MB1603, abbiamo utilizzato solamente l'ultima linea cellulare per la valutazione della cinetica di risposta.



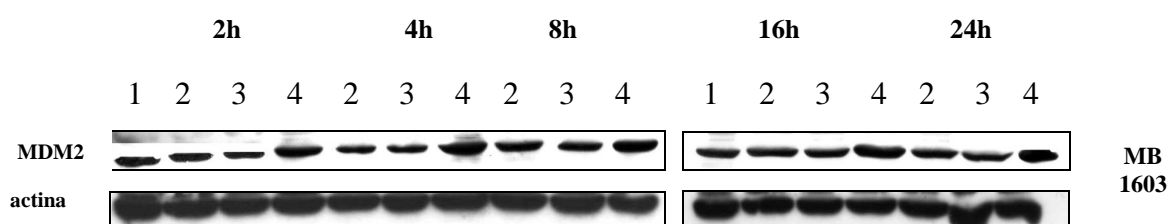
Legenda

1 Controllo; 2 Nutlin; 3 CDDP; 4 CDDP+Nutlin

Fig. 14 Espressione di p53 in cellule MB1603 che esprimono una p53 wt, trattate con Nutlin-3 e CDDP 2 μ M singoli e combinati per tempi di esposizione crescenti.

p53 viene stimolata già a partire dalle 2 ore di trattamento; tuttavia si nota un effetto combinato delle due molecole che diviene particolarmente evidente dopo 8 ore di trattamento.

Dai dati in figura 15 le cellule subiscono un'induzione dell'espressione di MDM2 che cresce parallelamente con il tempo di esposizione e in accordo con l'aumento della p53 attiva visto in figura 14. Anche in questo caso l'effetto del trattamento combinato è più consistente dopo 8 ore di esposizione.

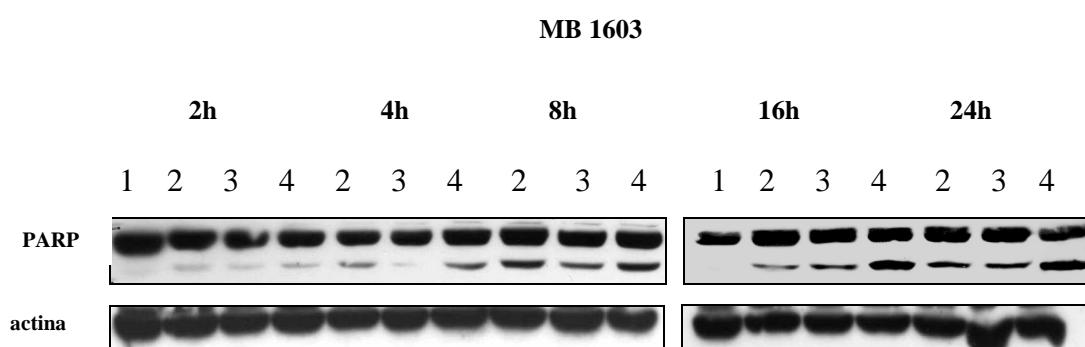


Legenda

1 Controllo 2 Nutlin 3 CDDP 4 CDDP+Nutlin

Fig. 15 Espressione di MDM2 in cellule MB1603, trattamenti singoli e combinati di Nutlin-3 e CDDP 2 μ M per tempi crescenti.

Per MB1603 si evidenzia un clivaggio di PARP che, benchè minimo, inizia dopo sole 2 ore di trattamento.



Legenda

1 Controllo 2 Nutlin 3 CDDP 4 CDDP+Nutlin

Fig. 16 Clivaggio di PARP in cellule di medulloblastoma, MB1603 p53 wt, trattate con Nutlin-3 e CDDP 2 μ M singoli e combinati per tempi crescenti.

La differente efficacia dei trattamenti si palesa nuovamente dopo le 8 ore di trattamento, mostrando come l'effetto combinato delle due molecole sia evidenziabile solo tra le 8 ore e le 16 ore.

Successivamente, è stata valutata la variazione dei livelli di espressione di p53 fosforilata sul residuo amminoacidico Serina 15. La proteina presenta molteplici siti fosforilabili (specialmente su aminoacidi Serina e Treonina), tra i quali la Ser 15 che si trova nel dominio N-terminale di trans-attivazione. Questa posizione viene fosforilata principalmente in seguito a danni indotti da radiazioni o agenti genotossici.

La figura 17 dimostra come solo in presenza del chemioterapico sia possibile osservare un incremento della quantità di p53 fosforilata sulla Ser15, in accordo con quanto descritto in letteratura. Tale aumento è decisamente maggiore dopo trattamento combinato con VP16 e Nutlin-3, rispetto al solo agente chemioterapico tradizionale.

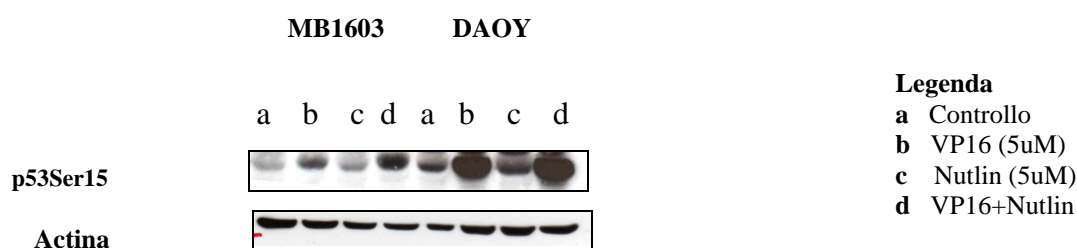


Fig. 17 Espressione di p53Ser15 mediante western blotting su cellule di medulloblastoma trattate con concentrazione 5 μ M di VP16 e Nutlin usati singolarmente e in combinazione, per un tempo di esposizione di 24 ore.

In seguito, è stato studiato l'andamento dell'espressione di uno dei principali target trascrizionali di p53, la proteina p21, in conseguenza a trattamento con Nutlin-3 e VP16 usati singolarmente e in combinazione. p21 è una delle molecole attraverso le quali p53 controlla il ciclo cellulare. La sua espressione nella cellula determina il blocco del ciclo cellulare (fase G1/S), innescando i processi di apoptosi o permettendo la correzione del danno genico subito. Naturalmente più intenso è tale danno e maggiore è la probabilità che venga innescato il processo apoptotico.

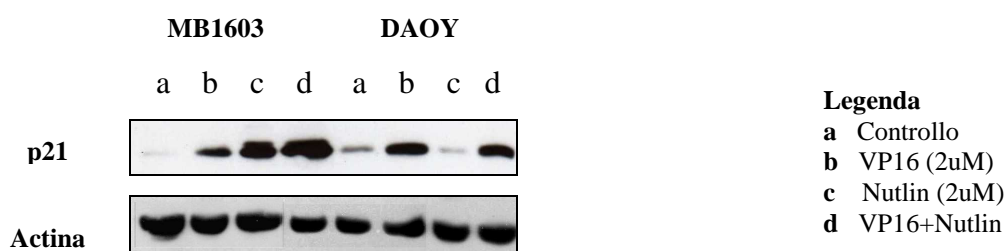
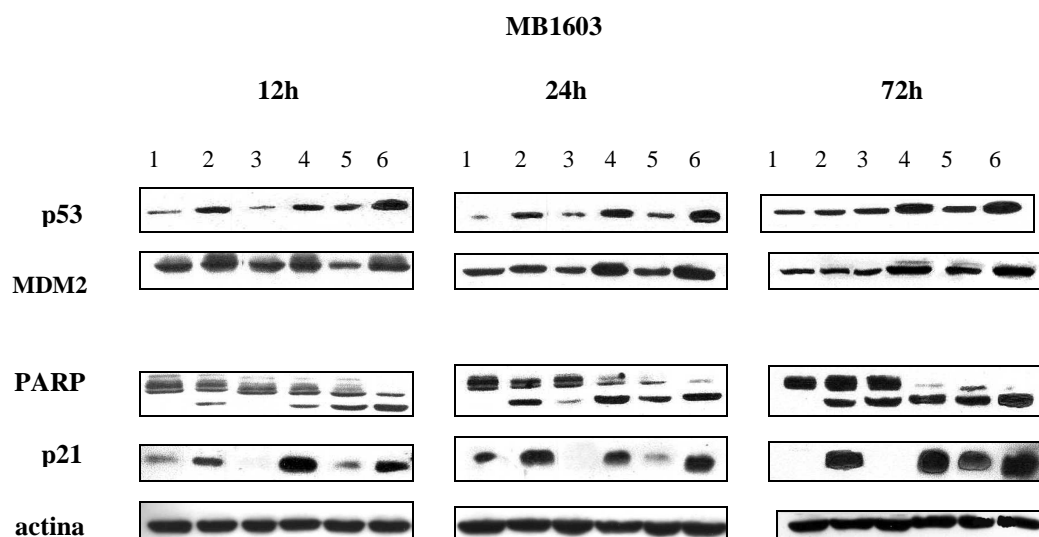


Fig. 18 Espressione di p21 in cellule di medulloblastoma trattate con VP16 e Nutlin singoli e in combinazione ad una concentrazione 2 μ M per 24 ore. La proteina (60 μ g) è stata analizzata mediante western blotting.

In figura 18 è possibile osservare come l'espressione di p21 aumenti in maniera rilevabile già dopo esposizione della linea cellulare MB1603 alle singole molecole, ma soprattutto in presenza del trattamento combinato VP16 con Nutlin-3. Questo è stato notato nelle due linee di medulloblastoma aventi p53 *wild-type*; di converso le Daoy, che possiedono p53 mutata, subiscono un aumento di p21 solo in presenza dell'agente genotossico, mentre Nutlin-3 non determina alcun tipo di stimolazione.

Dopo aver verificato l'intensità e confermato l'esistenza e l'andamento della risposta cellulare ai trattamenti, abbiamo studiato alcune delle proteine collegate a p53, nelle MB1603 (*wild-type*) confrontando la risposta delle cellule ai tre trattamenti singoli e combinati. Sono state scelte delle concentrazioni che fossero attive a tempi di esposizione brevi (12h, 24h, 72h): il VP16 è stato usato ad una concentrazione di 1 μ M; Nutlin-3 ad una concentrazione di 2 μ M, così come il CDDP. Sono concentrazioni che si collocano sopra o in prossimità della IC50 valutata alle 24h e alle 72h di trattamento. La figura 19 mostra la variabilità dell'espressione proteica in seguito ai differenti trattamenti. La prima proteina ad essere studiata è stata p53; la sua espressione varia in modo tanto maggiore quanto più intenso è il danno subito dalla cellula. Si nota come i suoi livelli di espressione aumentino parallelamente all'aumentare del tempo di esposizione ai trattamenti, in particolare si evidenziano più elevati livelli di p53 quando le cellule vengono esposte ai trattamenti combinati. L'uso di CDDP da solo mostra un effetto limitato, mentre se associato a Nutlin-3 esso comporta un incremento dell'espressione di p53 che si intensifica dalle 24 alle 72h di esposizione. Il VP16 invece mostra un effetto più netto anche se usato singolarmente; tuttavia la sua azione aumenta, nella combinazione con Nutlin-3, fin dalle 12 ore di trattamento.



Legenda

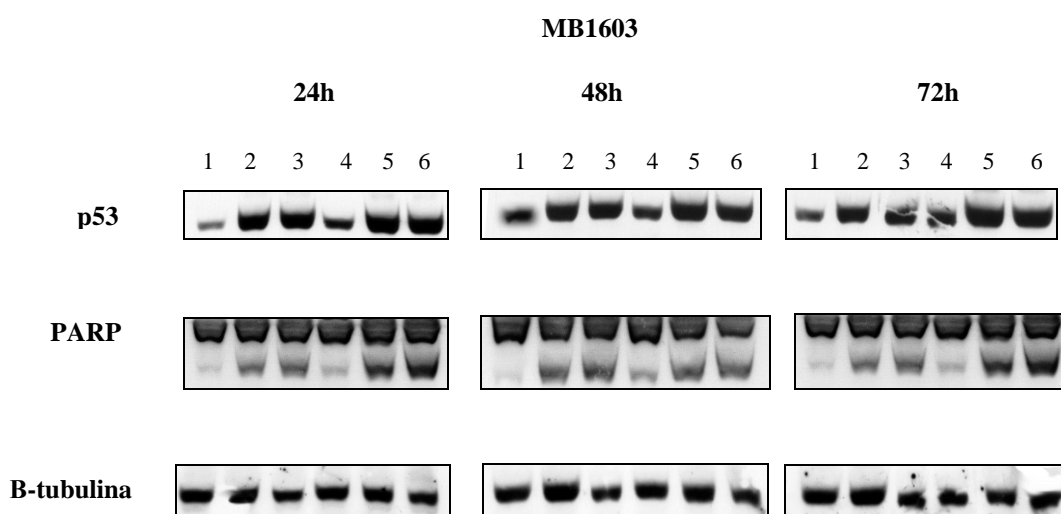
1 Controllo; 2 Nutlin; 3 CDDP; 4 CDDP+Nutlin; 5 VP16; 6 VP16+Nutlin

Fig. 19 Cellule di medulloblastoma, MB1603 wt, trattate con VP16 1 μ M; CDDP 2 μ M; Nutlin-3 2 μ M singoli e in combinazione per tempi di esposizione crescenti. Le proteine (p53 e PARP 40 μ g; p21 e MDM2 60 μ g) sono state analizzate mediante western blotting.

Le medesime considerazioni si possono fare osservando i livelli di MDM2: la sua espressione è più elevata nei trattamenti associati, per entrambe le combinazioni, anche se l'effetto induttivo, possibilmente dovuto a p53, si rende più intenso dalle 24 ore in poi.

Abbiamo poi valutato l'espressione di due proteine a valle nei meccanismi di regolazione di p53, in particolare p21, un diretto target trascrizionale, e PARP, un enzima che viene attivato per clivaggio dalle caspasi, cioè al termine dei processi di apoptosi. PARP si dimostra debolmente clivato alle 12 ore; in particolare si evidenzia nettamente una maggiore efficacia da parte del VP16 rispetto al CDDP. Ancora maggiore è la differenza del livello di clivaggio del PARP dalle 24 ore in poi. Le combinazioni dei trattamenti comportano ancora un maggiore clivaggio della proteina nativa, che probabilmente riflette un'apoptosi più intensa rispetto ai relativi trattamenti singoli; si osservi in particolare la netta diversità nei livelli di clivaggio che esiste tra il trattamento con CDDP e quello con CDDP e Nutlin-3 insieme (figura 19). In quest'ultima condizione, infatti, il clivaggio della proteina è pressochè totale, al contrario di quanto accade in presenza del solo intercalante.

L'altro target trascrizionale osservato, p21, mostra un andamento parallelo a quello osservato per p53, suggerendo come aumentati livelli di p53 si riflettano anche in un'aumentata azione di p53 stessa. La sua espressione è decisamente maggiore nelle due condizioni di trattamento combinato; anche in questo caso si palesa la differente efficacia dei due chemioterapici: VP16 infatti determina già da solo una buona espressione di p21 contrariamente al CDDP che comporta una stimolazione minima e talora difficile da evidenziare.



Legenda

1 Controllo; 2 VCR 3 nM; 3 VCR 5 nM; 4 Nutlin; 5 VCR 3nM+Nutlin; 6 VCR 5nM+Nutlin

Fig. 20 Cellule MB1603 trattate con VCR 3 nM; VCR 5 nM; Nutlin-3 1 μ M singoli e in combinazione per tempi di esposizione crescenti. Le proteine (30 μ g) sono state analizzate mediante western blotting.

Effetti analoghi sono stati osservati quando le MB1603 sono state sottoposte ai trattamenti con vincristina (3 e 5 nM) singolarmente o in associazione con Nutlin-3. L'espressione di p53 aumenta in modo considerevole con l'aggiunta del singolo farmaco, tuttavia, l'effetto che si ottiene dalla combinazione è maggiore e si può apprezzare soprattutto alle 72 ore. Infine, anche il clivaggio di PARP è incrementato quando le cellule vengono trattate con i due farmaci contemporaneamente e l'effetto è già ben visibile alle 24 ore (figura 20).

Una valutazione analoga della variabilità di espressione di p53 e strutturale di PARP è stata eseguita per le Daoy. Le cellule sono state trattate con Nutlin-3 e CDDP singoli ed in combinazione, per tempi di esposizione prolungati, dalle 24h alle 96h, definiti dopo aver osservato che le cellule non danno risposta significativa a tempi inferiori alle 24h.

DAOY

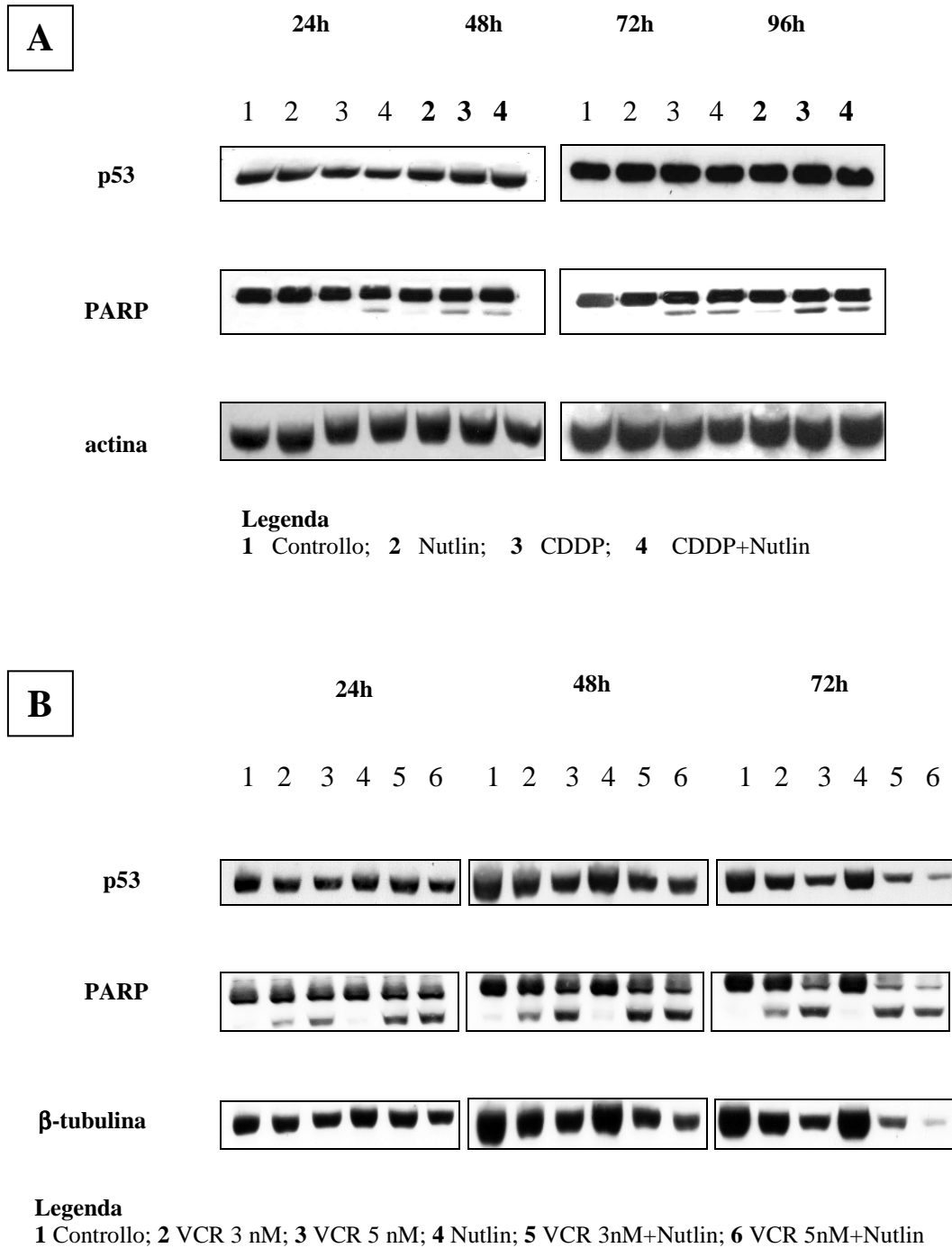


Fig. 21 **A.** Cellule di medulloblastoma, Daoy p53 mutata, trattate con Nutlin-3 e CDDP singoli e combinati a concentrazione 2 μ M per tempi crescenti di esposizione. **B.** Daoy trattate con Nutlin-3 (2 μ M) e VCR (3nM e 5 nM) singoli e combinati per tempi crescenti di esposizione. Le proteine (p53 e PARP) sono state analizzate mediante western blotting.

In questo caso, Nutlin-3 come singolo agente non determina pressochè alcun effetto, mentre si nota una certa azione in presenza dei farmaci, che si riflette principalmente nel clivaggio di PARP. L'associazione delle due molecole non comporta variazioni rispetto all'uso del CDDP singolo, confermando l'ipotesi che le cellule fossero insensibili a Nutlin-3 poiché caratterizzate da una p53 mutata (figura 21A). Analogamente il trattamento combinato VCR-Nutlin-3 sembra non causare delle grosse modifiche (figura 21B), tranne per il dosaggio 3 nM di vincristina in cui l'associazione con il nuovo farmaco sembra favorire l'attivazione dell'enzima; effetto già notato con il test di citotossicità MTT (figura 7). PARP viene clivato a partire dalle 24h, anche se si riscontra un effetto apoptotico più netto dalle 48 ore.

E' inoltre possibile osservare come l'espressione di p53 non vari significativamente in presenza dell'agente genotossico (CDDP). Infatti, p53 in queste cellule è mutata, pertanto non funzionante, quindi iper-espressa. Nel trattamento con VCR il quadro che si osserva è analogo: da segnalare come, alle 72 ore di trattamento, il segnale di β -tubulina nelle cellule trattate con VCR risulti inferiore rispetto al controllo o alle cellule trattate con solo Nutlin-3, indice di un forte danno cellulare creato dal farmaco.

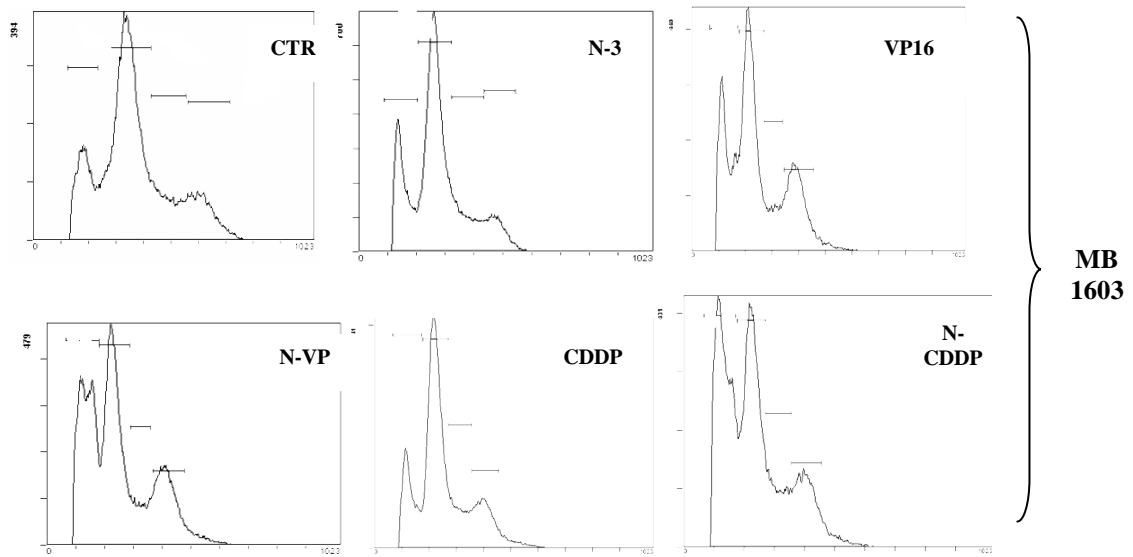
3.4 Nutlin-3 induce arresto del ciclo cellulare e stimola il processo apoptotico.

La progressione del ciclo cellulare avviene grazie all'azione di enzimi chinasi regolati da proteine note come cicline. Questi enzimi, definiti Cdk (Ciclin-Dependent Kinase) in quanto dipendenti dalle cicline, possono essere inibiti da una serie di proteine che rivestono il ruolo di "controllori" del ciclo cellulare. Tra queste vi è p21^{WAF1} che abbiamo già studiato precedentemente. Essa è un inibitore universale del ciclo cellulare. La sua interazione con le Cdk 2 e 4 e con le cicline -D ed -E determina un arresto del ciclo cellulare in fase G1/S, generando un accumulo di cellule in fase G1. [Gartel A, Serfas MS, Tyner AL, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med*, 1996, 213: 138-149]

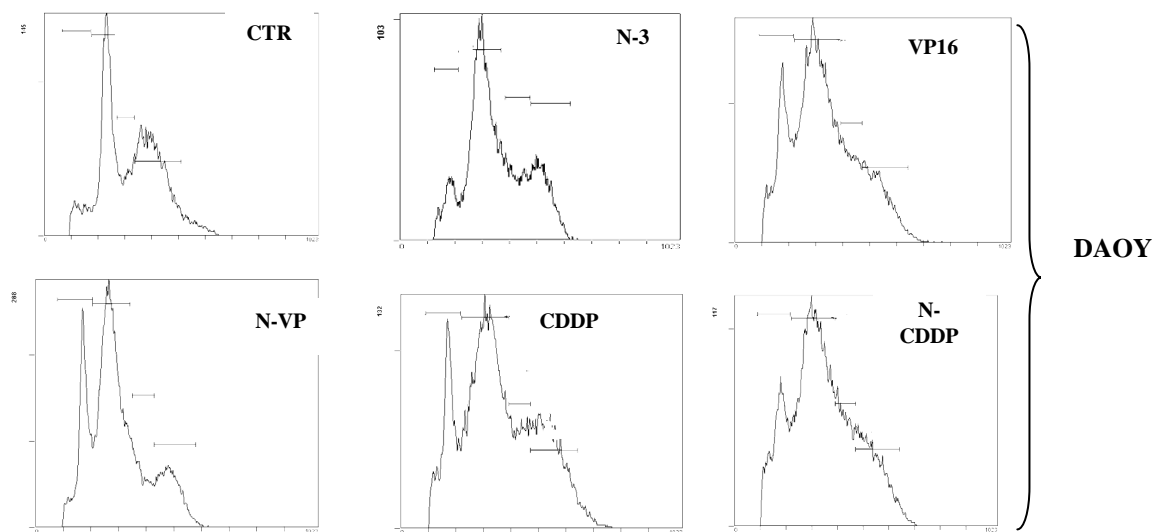
Il blocco del ciclo cellulare è il primo meccanismo che si innesca in seguito all'incremento dell'attività di p53, ed è una condizione necessaria per la cellula danneggiata, poiché permette l'attivazione dei meccanismi di correzione del danno o di morte cellulare programmata.

Pertanto un accumulo di p21^{WAF1} può essere correlato ad un innesco del processo di apoptosi. Mediante citometria a flusso è stato valutato il contenuto di DNA delle cellule coltivate in presenza dei tre differenti trattamenti e della combinazione degli stessi, quantificando la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. Poiché i processi di apoptosi determinano la frammentazione del DNA delle cellule, la percentuale di cellule vitali con contenuto di DNA inferiore alle cellule in G0/G1 può essere approssimato a quello delle cellule in apoptosi. Si osserva come l'uso della combinazione dei trattamenti determini un incremento della percentuale di cellule apoptotiche nelle MB1603 e non nelle Daoy (SubG0/G1).

24 ore



MB	subG0/G1	G0/G1	S	G2/M
Ctr	16,6	57,4	13,4	12
Nutlin	23,3	57,3	11,2	8,4
CDDP	18,4	49,9	13,2	14,7
N CDDP	34,9	35,5	12,1	13,8
V16	26,4	40,6	9,1	19,6
N VP16	34	37	8	17,1



DAOY	subG0/G1	G0/G1	S	G2/M
Ctr	7,5	33	13,1	40,1
Nutlin	9,9	51,1	16,7	18,4
CDDP	20,1	49,7	13,1	16,1
N CDDP	17,8	47,3	14,6	18,8
VP16	20,8	50,9	10,7	15
N VP16	17,8	44	12,8	22,9

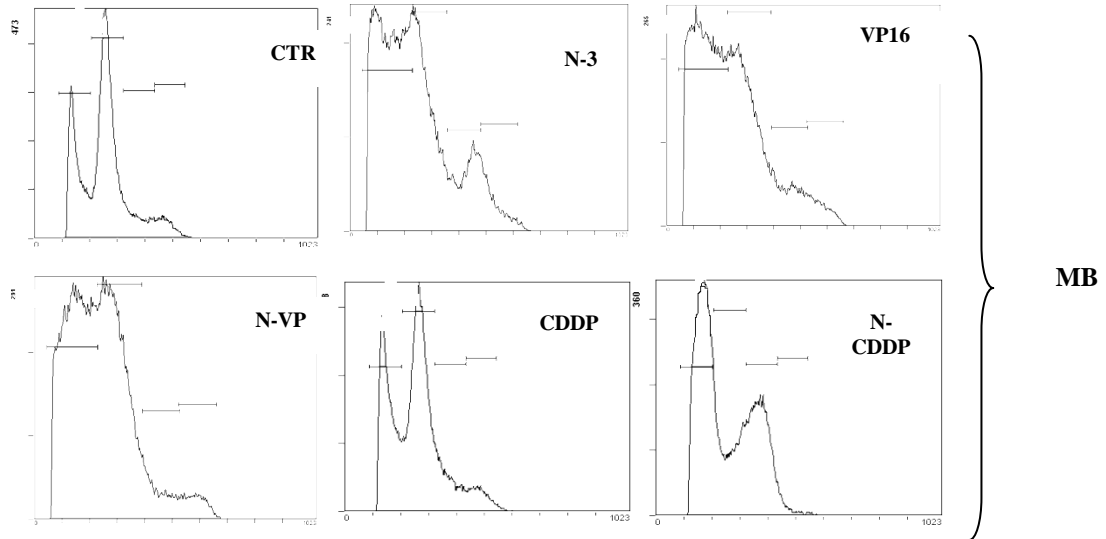
Fig. 22 Le linee di medulloblastoma (MB1603, Daoy) sono state trattate con Nutlin-3 2 μ M, CDDP 2 μ M, VP16 0,2 μ M singoli e in combinazione per 24 ore di esposizione e il loro contenuto di DNA è stato quantificato tramite citofluorimetria al fine di evidenziare l'accumulo di frammenti apoptotici maggiore per i trattamenti combinati rispetto a quelli singoli.

Le MB1603 sono cellule che crescono parzialmente in sospensione, in agglomerati: è pertanto atteso che presentino una percentuale di cellule apoptotiche leggermente più elevata delle Daoy, che crescono come mono-strato in adesione e che sono caratterizzate da percentuali di cellule in apoptosi molto basse in condizioni basali.

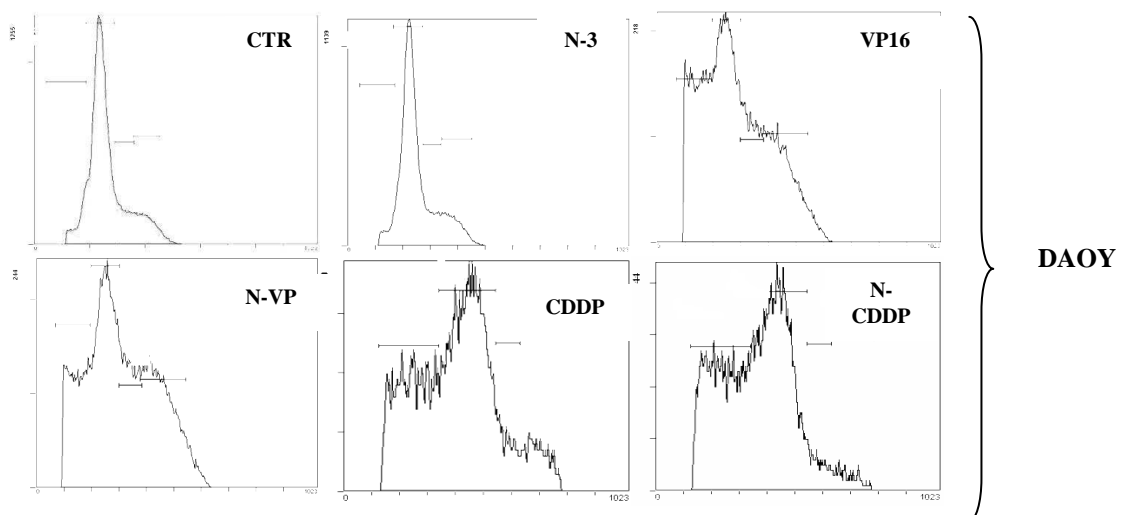
La linea cellulare MB1603, p53 *wild-type*, risponde bene al trattamento con Nutlin-3 già alle 24 ore e risulta piuttosto sensibile ai due chemioterapici. Come già osservato a livello proteico, anche qui risalta la maggior efficacia del VP16, che ad una concentrazione dieci volte inferiore al CDDP, genera una percentuale di cellule apoptotiche pari o appena superiore a quest'ultimo. La combinazione dei chemioterapici con Nutlin-3 comporta un incremento delle cellule apoptotiche del 30-50%.

Le Daoy al contrario si mostrano insensibili alla presenza di Nutlin-3 ed anche nella combinazione delle molecole non mostrano alcun incremento nella risposta apoptotica.

72 ore



MB	subG0/G1	G0/G1	S	G2/M
Ctr	27,8	54,6	10,5	6,5
Nutlin	42,3	40,5	10,5	5,6
CDDP	56	38	4,7	1,7
N CDDP	76,8	15,2	7,3	0,9
VP16	49,3	40,8	6,3	4,2
N VP16	61,4	35,4	9,1	4,7



DAOY	subG0/G1	G0/G1	S	G2/M
Ctr	9,2	66,4	11,7	11,9
Nutlin	5,6	68,2	12,7	13,5
CDDP	38,5	44,3	7,6	9,6
N CDDP	40,8	49,4	5,1	4,8
VP16	21,9	38,1	16,4	22,7
N VP16	20	32,4	17,7	28,1

Fig. 23 Le linee di medulloblastoma (MB1603, Daoy) sono state trattate con Nutlin-3 2 μ M, CDDP 2 μ M, VP16 0,2 μ M singoli e in combinazione per 72 ore di esposizione e il loro contenuto di DNA è stato quantificato tramite citofluorimetria al fine di evidenziare l'accumulo di frammenti apoptotici maggiore per i trattamenti combinati rispetto a quelli singoli.

Anche dopo 72 ore di incubazione le cellule di medulloblastoma rispondono ai trattamenti singoli e combinati. Le MB1603 presentano, come per le 24 ore, una percentuale di cellule apoptotiche maggiore nel caso dei trattamenti combinati Nutlin-3 con CDDP o Nutlin-3 con VP16.

Le Daoy anche in questo caso si rivelano completamente insensibili a Nutlin-3 sia singolo che associato alla chemioterapia.

3.5 Condensazione e frammentazione nucleare in cellule di medulloblastoma trattate con Nutlin-3 e chemioterapici.

L'apoptosi viene anche definita "morte cellulare programmata" ad indicare che, a differenza della necrosi, nella cellula apoptotica viene mantenuta l'organizzazione interna nelle prime fasi del processo, mentre il nucleo va incontro a disgregazione in strutture picnotiche più piccole. A seguito della processazione ed inattivazione delle proteine della membrana nucleare, frammenti del materiale nucleare raggiungono la membrana citoplasmatica dove verranno circondati da invaginazioni della stessa. Da qui l'aspetto a bolle (*blebbing*) tipico di una cellula apoptotica. Successivamente queste vescicole, staccandosi dalla struttura della cellula, daranno origine ai corpi apoptotici.

La morfologia dei nuclei cellulari è stata analizzata con colorazione DAPI mediante microscopia ad epifluorescenza. Le cellule di medulloblastoma, MB1603, sono state trattate con 2 μ M Nutlin-3; con 2 μ M CDDP e 1 μ M VP16, usati singolarmente e in associazione per tempi crescenti (24-72 h).

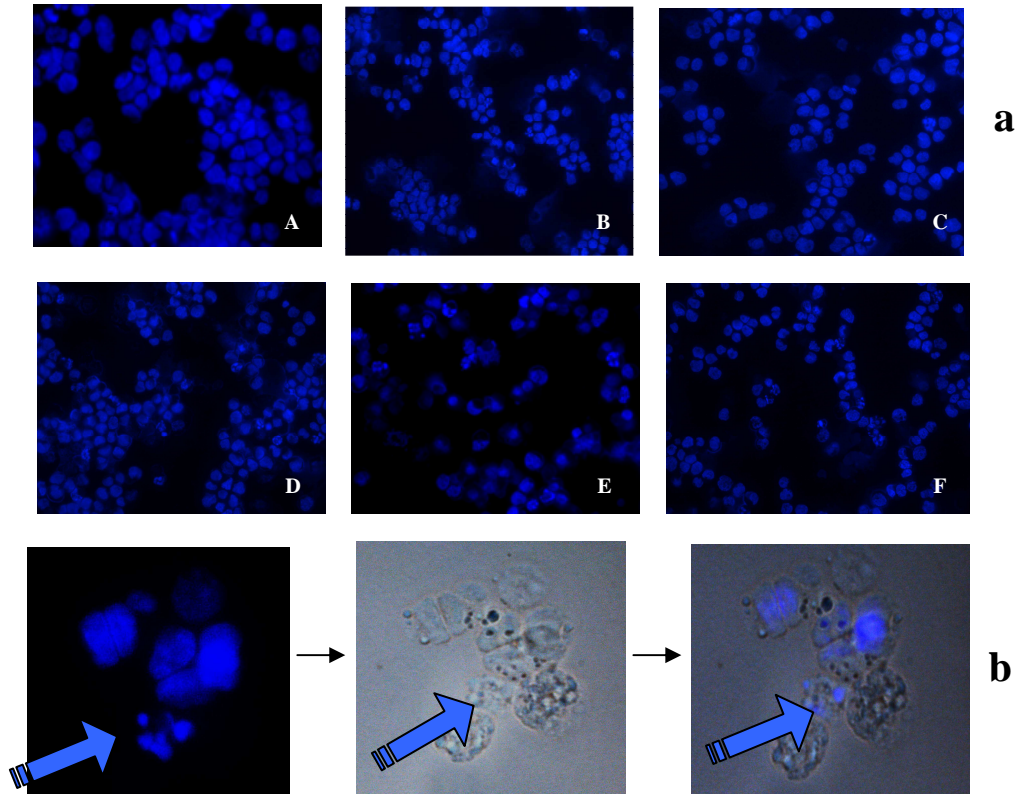
Come si può notare in figura 24 tutti i trattamenti risultano efficaci e anche Nutlin-3 da sola mostra un buon effetto. Tuttavia entrambi i trattamenti combinati determinano un incremento degli eventi apoptotici che risulta più elevato dopo 72 ore di incubazione. Sono visibili in entrambi i casi nuclei apoptotici che presentano evidente frammentazione.

L'analisi dello stato stazionario dell'inibitore p21^{WAF1} e del marcatore di apoptosi, PARP, sono stati comparati con l'analisi del ciclo cellulare. Come già osservato dalle figure 19, 20 e 21 la linea cellulare con p53 *wild-type* subisce una marcata induzione di apoptosi che è maggiore con i trattamenti combinati rispetto ai trattamenti singoli. Effetto che non si riscontra per le Daoy, che hanno p53 mutata.

L'analisi statistica della percentuale di cellule apoptotiche nei trattamenti singoli (Cisplatino, Etoposide, Nutlin-3) rispetto al trattamento combinato (Nutlin-3/Cisplatino; Nutlin-3/Etoposide) ha mostrato una differenza statisticamente significativa, con $P < 0,05$ (VP16 vs. Nutlin-3/VP16; CDDP vs. Nutlin-3/CDDP).

MB1603

24 ore



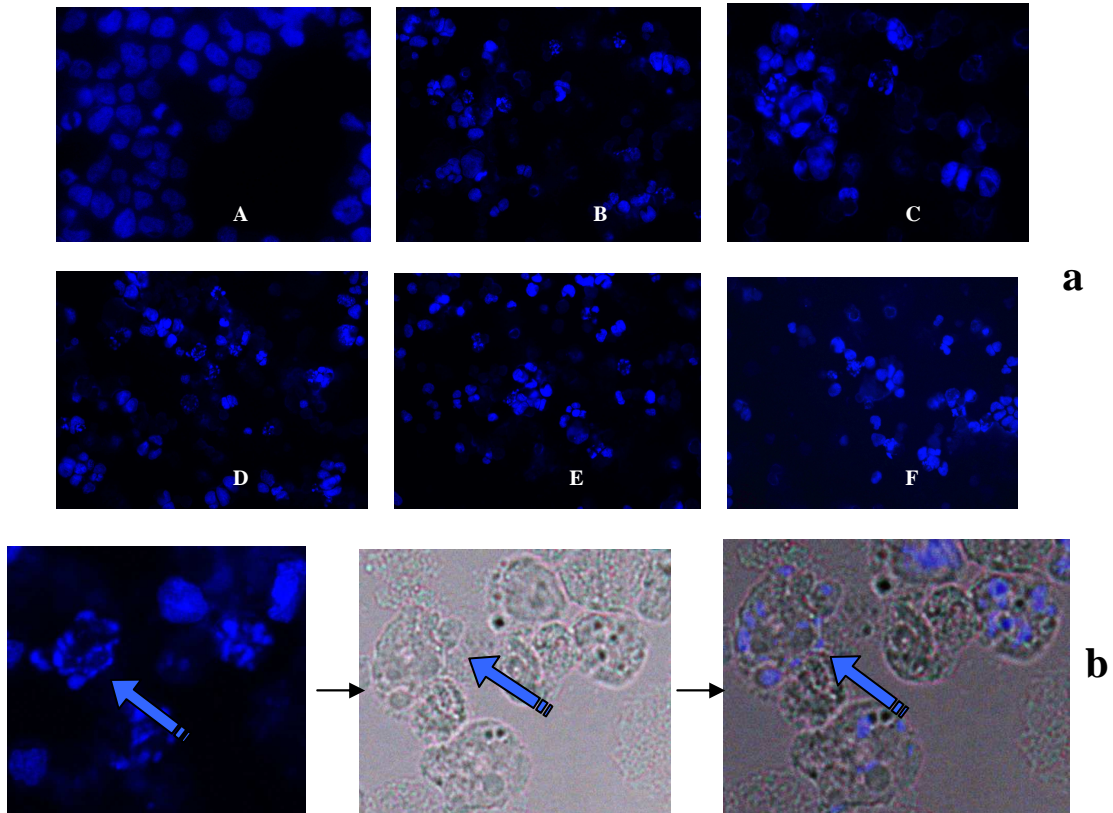
Legenda

A Controllo B Nutlin C CDDP D CDDP+Nutlin E VP16 F VP16+Nutlin

Fig. 24 (a) Cellule di medulloblastoma, MB1603 p53 wt, trattate con 2 μ M Nutlin-3; 2 μ M CDDP; 1 μ M VP16 singoli e in combinazione (vedi Legenda) per 24 ore di esposizione. Analisi morfologica nucleare eseguita mediante epifluorescenza con DAPI. (b) Valutazione della localizzazione endocellulare dei frammenti nucleari apoptotici (\rightarrow). L'immagine è stata ottenuta dalla sovrapposizione dell'acquisizione della fluorescenza DAPI ed il contrasto di fase.

MB1603

72 ore



Legenda

A Controllo B Nutlin C CDDP D CDDP+Nutlin E VP16 F VP16+Nutlin

Fig. 25 (a) Cellule di medulloblastoma, MB1603 p53 wt, trattate con 2 μ M Nutlin-3; 2 μ M CDDP; 1 μ M VP16 singoli e in combinazione per 72 ore di esposizione. Analisi morfologica nucleare eseguita mediante epifluorescenza con DAPI.

(b) Valutazione della localizzazione endocellulare dei frammenti nucleari apoptotici (\rightarrow). L'immagine è stata ottenuta dalla sovrapposizione dell'acquisizione della fluorescenza DAPI ed il contrasto di fase.

Un'ulteriore conferma dell'avvenuta frammentazione nucleare e quindi dell'attivazione del processo apoptotico, è stata ottenuta mediante valutazione citofluorometrica con metodo TUNEL in cellule MB1603. Questa tecnica consente, in maniera molto specifica, di determinare la percentuale di cellule apoptotiche nelle quali il DNA è particolarmente degradato, perché proprio a questo, l'enzima TdT (*terminal deoxynuceotidil transferase*) è in grado di legare dei nucleotidi (F-dUTP) marcati con

una sonda fluorescente. La contro-colorazione delle cellule vitali avviene con propidioioduro, il colorante che viene utilizzato anche per valutare i cicli cellulari.

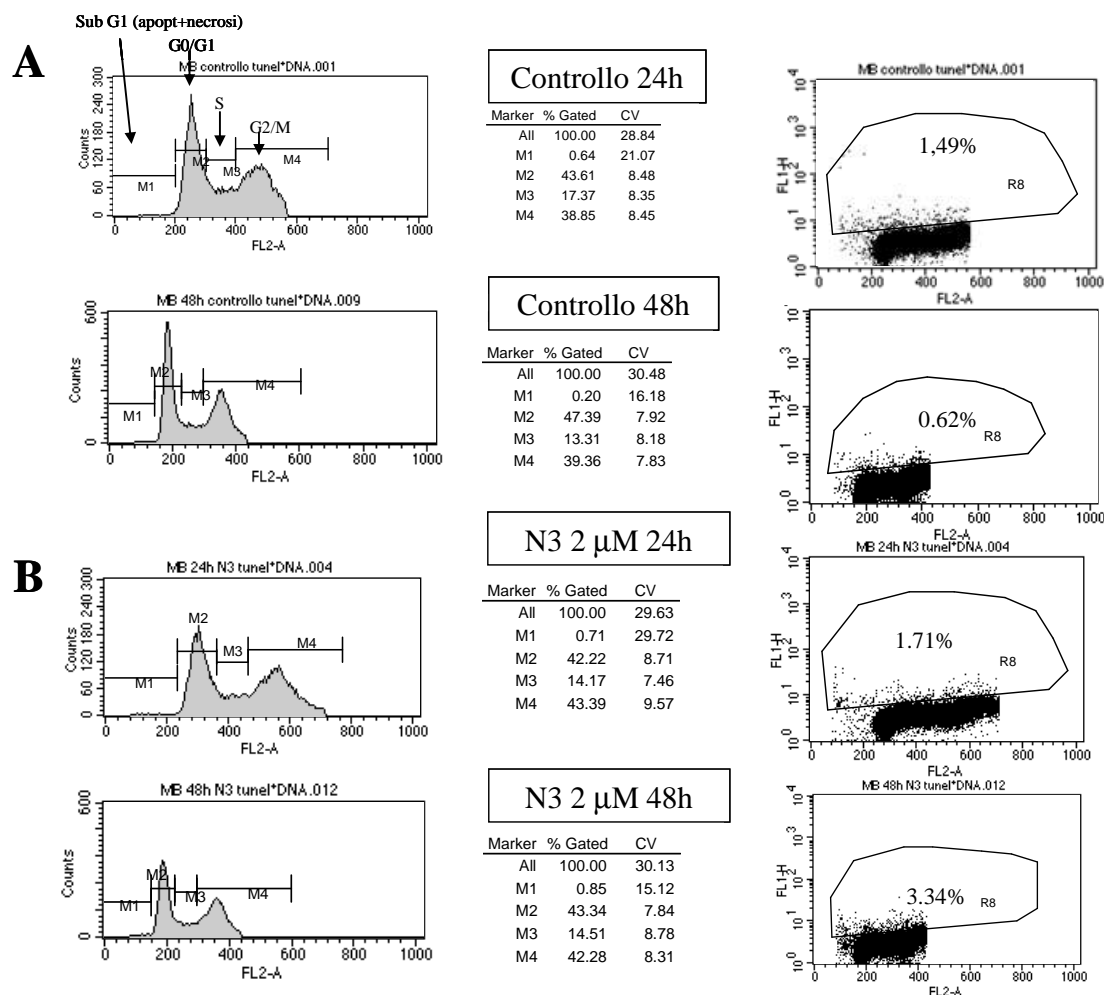


Fig. 26 Determinazione della frazione di cellule apoptotiche mediante citofluorimetria (TUNEL). **(A)** Cellule MB1603 in assenza di alcun tipo di trattamento a 24-48 ore (controllo). **(B)** Cellule MB1603 trattate con Nutlin-3 2μM per 24-48 ore.

Le cellule MB1603 sono state trattate con Nutlin-3 e con i farmaci convenzionali utilizzati singolarmente ed in combinazione con Nutlin-3; VP16 e Nutlin-3 ad una concentrazione 2 μM, VCR 3 nM, per un tempo di 24-48 ore. Come si può notare in figura 27, il trattamento con etoposide aumenta la frazione di cellule apoptotiche, che passa da 3,4% a circa il 15,6 %, dalle 24 e 48 ore (valore segnalato nei riquadri di destra) e l'effetto aumenta in maniera considerevole se viene aggiunto in combinazione Nutlin-3 (15,2% e 40%). Questo risultato assume maggiore rilevanza se si considera che

Nutlin-3 da solo si associa ad una percentuale di cellule apoptotiche alle 48 ore del 3,3% (figura 26).

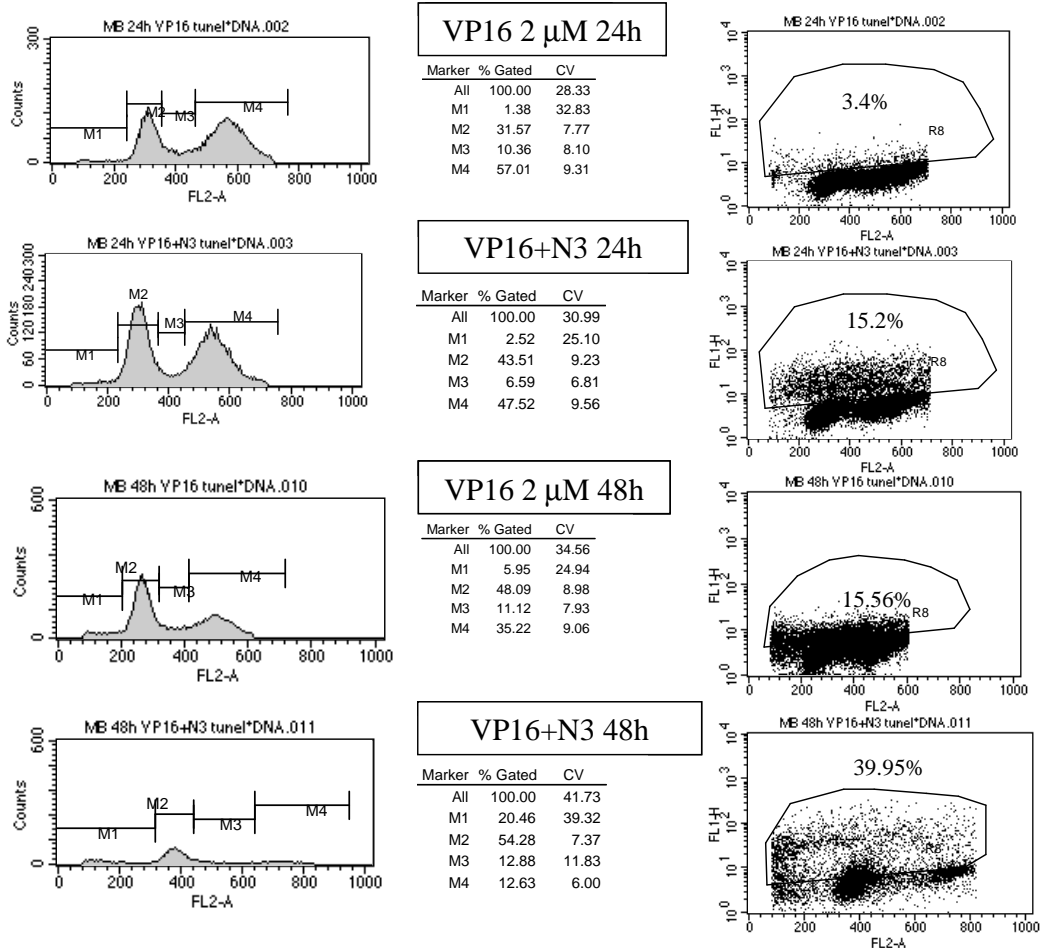


Fig. 27 Determinazione della frazione di cellule apoptotiche mediante citofluorimetria (TUNEL). Cellule di medulloblastoma, MB1603 p53 wt, trattate con VP16 2 μ M e con la combinazione Nutlin-3 2 μ M - VP16 2 μ M per 24-48 ore di esposizione.

Il trattamento con VCR associato a Nutlin-3 ha prodotto gli stessi risultati osservati per VP16 e Nutlin-3, anche se l'efficacia è risultata leggermente inferiore (figura 28). Infatti, a 48 ore dal trattamento, il segnale apoptotico cellulare raggiunge quasi il 30%, contro il 40% visto per l'etoposide combinato. La risposta alla VCR-Nutlin-3 appare più tardiva, aumentando di quasi 10 volte dalle 24 alle 48 ore, mentre un buon effetto si otteneva già dopo 24 ore con la combinazione VP16-Nutlin-3.

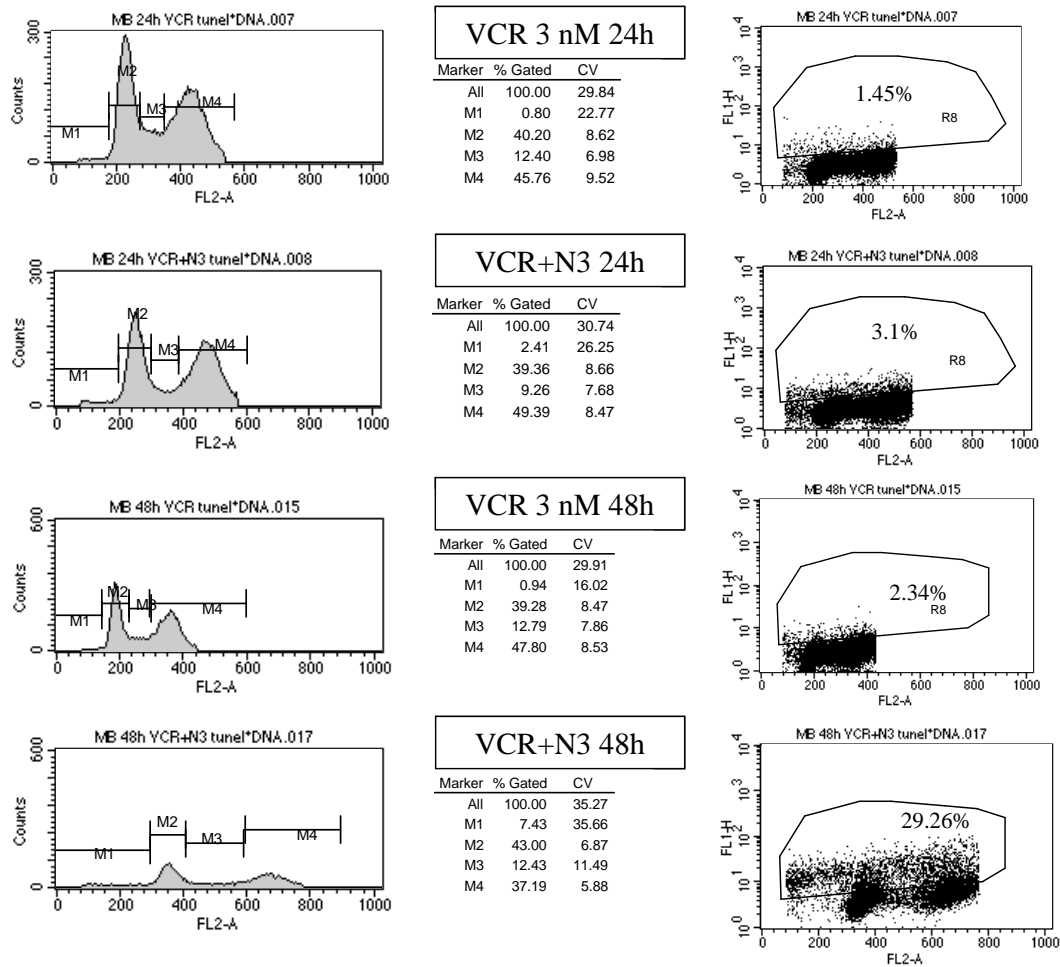


Fig. 28 Determinazione della frazione di cellule apoptotiche mediante citofluorimetria (TUNEL). Cellule MB1603 trattate con VCR 3 nM e con la combinazione Nutlin-3 2 μ M - VCR 3 nM per 24-48 ore di esposizione.

4. DISCUSSIONE

Il medulloblastoma rappresenta la neoplasia cerebrale maligna più frequente dell'età pediatrica, con importante tendenza all'invasione e disseminazione.

Benché la derivazione del tumore non sia ancora del tutto chiarita, gli studi clinici, su modello animale e cellulare mostrano come le differenti varianti morfologiche hanno istogenesi e patogenesi diverse, e presentino diversa suscettibilità al trattamento.

[Kleihues P., Luois DN, Scheithauer BW, J. Neuropath Exp.Neurol; 61,215-225,2002]

Il medulloblastoma è un tumore embrionario tipico dell'età pediatrica. Diversamente dalle neoplasie dell'età adulta, l'oncosoppressore p53 appare raramente mutata, anche se il pathway da essa regolato appare perturbato e non funzionante *[Adesina AM, Dunn ST, Moore WE, Nalbantoglu J. Pathol Res Pract 2000; 196:243-50]*. Un meccanismo possibile è l'aumentata espressione di MDM2, un'ubiquitina ligasi che, mediante ubiquitinazione della proteina p53, ne controlla il sequestro citoplasmatico e la successiva degradazione proteosomale. Se p53 viene attivata, in seguito a danno cellulare, può indurre la trascrizione di geni codificanti per proteine implicate nel controllo/arresto del ciclo cellulare (p21^{WAF}), nella riparazione del DNA e nell'innescamento della morte cellulare programmata o apoptosi (PUMA, Bax, Bac...). *[Opferman JT, GP Zambetti, Cell death and differentiation, 2006, march 24, 13, 898-901]*

L'obiettivo primario di una terapia anti tumorale è quello di indurre la morte selettiva delle cellule maligne, nelle quali uno o più meccanismi di controllo di crescita e di proliferazione cellulare sono perduti. La possibilità, pertanto, di ripristinare una o più proteine coinvolte nei controlli del destino della cellula apre interessanti prospettive nel determinare l'induzione di morte cellulare programmata potenziando la risposta alla chemioterapia tradizionale e la regressione tumorale.

Sfruttare la coppia di target molecolari p53-MDM2 come bersagli terapeutici è decisamente vantaggioso, in quanto la cellula viene minata alle basi del meccanismo di morte cellulare programmata.

Esistono diverse molecole capaci di interferire con l'eterodimero p53-MDM2. Tra le più note e utilizzate vi sono Nutlin-3, che lega direttamente MDM2 permettendo l'attivazione e la stabilizzazione di p53, e RITA, altra molecola attualmente in studio, che al contrario lega direttamente p53. *[Brown CJ, Lain S, Verma CS, Cancer, 2009, Dec., 9, 862-873]*.

Nutlin-3 è un composto che agisce come inibitore competitivo del complesso p53-MDM2 hanno scoperto una famiglia di derivati cis-imidazolinici di sintesi, chiamati Nutlins. Tale nome è la sincrasi di **Nutley inhibitors**, giacchè agiscono come inibitori. *[Roche Applied Science Roche's Xcelligence system and Realtime ready Focus Panels have been used in the analysis of nutlin-induced apoptosis. Edited by the Laboratorytalk editorial team Sep 11, 2009]*

Studi recenti hanno dimostrato che differenti linee tumorali (tra cui linee di neuroblastoma, sarcoma, Leucemia Linfatica Acuta, Glioma) sono reattive nei confronti di Nutlin-3, evidenziando un incremento marcato delle proteine responsabili della risposta apoptotica. *[Barbieri E., Mehta P., Mol.Cancer Ter., 2006, Sept, 5(9)][Villalonga-Planells R., Tortosa A., PloS ONE, April 2011, 6(4): e18588]*

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto di Nutlin-3 su una linea cellulare di Medulloblastoma che esprime p53 *wild-type* e pertanto funzionante (MB1603), con particolare attenzione alla loro sensibilizzazione nei confronti di farmaci chemioterapici di comune impiego (Cisplatino, Etoposide e Vincristina) e della radioterapia.

I nostri dati dimostrano che concentrazioni micromolari di Nutlin-3 riducono la vitalità delle cellule di medulloblastoma, in particolare per durate di trattamento oltre le 72 ore. E' interessante notare, inoltre, come, pur utilizzando una miscela racemica dei due enantiomeri "a" e "b", le cellule di medulloblastoma appaiono significativamente più sensibili al trattamento con Nutlin-3 rispetto alle altre linee cellulari riportate in letteratura *[Drakos E, Thomides A, e coll, Clin Cancer Res, 2007, 13:3380-87]*. Infatti, l'effetto citotossico di Nutlin-3 è evidente da concentrazioni di 2,5-5 µM, capaci di indurre il 70-80% di inibizione della proliferazione solo nella linea con p53 *wild-type* dopo 7 giorni di trattamento. Gli studi eseguiti su linee cellulari di Linfoma di Hodgkin mostrano una sensibilità nettamente inferiore rispetto alle linee di medulloblastoma; infatti la IC50, per 48-72 ore di trattamento, viene raggiunta solo a concentrazioni prossime a 10 µM di Nutlin-3a, enantiomero puro. Il medesimo effetto si osserva in linee cellulari di Linfoma non Hodgkin (Mantle Cell Lymphoma, MCL) dove si raggiungono concentrazioni pari a 20 µM. Nelle linee di sarcoma sono necessarie concentrazioni di 30-40 µM di Nutlin-3 per raggiungere livelli di inibizione della crescita cellulare pari al 50%. *[Tabe Y, Sebasigari D e coll, Clin Cancer Res, 2009; 15(3):933942] [Drakos E, Thomides A, e coll, Clin Cancer Res, 2007, 13:3380-87] [Hori T, Cancer Letter, 2009, doi:10.1016]*

Abbiamo analizzato i livelli di espressione basali di p53 e del suo target primario, MDM2. Le cellule di medulloblastoma MB1603 esprimono bassi livelli di p53 che, tuttavia, è attiva ed in grado di indurre l'espressione di MDM2. Esse sono cellule stabilizzate derivate da un medulloblastoma anaplastico, che si caratterizza per una maggiore espressione di MYC e MYCN, due geni che hanno come target molecolare MDM2 con conseguente inattivazione di p53. L'elevata espressione di MDM2, in questa linea cellulare, la rende un modello sperimentale ideale, per studiare *in vitro*, gli effetti di Nutlin-3. Al contrario, le Daoy, cellule con p53 mutata, sono caratterizzate da quantità molto elevate di p53, mentre hanno minori livelli di MDM2. Essendo p53 mutata nel sito di legame per il DNA, essa non conserva la sua attività trascrizionale.

Nella linea cellulare MB1603, appare evidente come Nutlin-3 sia in grado di sensibilizzare le cellule ai trattamenti chemioterapici. Infatti, da sola tale molecola è in grado di determinare un'aumentata espressione di p53 totale e l'induzione di proteine legate all'apoptosi (clivaggio del PARP, aumentata espressione di p21) ma l'effetto è significativamente più evidente nel caso di trattamenti combinati con chemioterapici. Infatti, già alla concentrazione di VP16 di 0,001 μM , si verifica una drastica riduzione della vitalità: le cellule si mantengono vitali per l'80-90% con il solo chemioterapico, mentre in combinazione con Nutlin-3 1 μM la vitalità scende al 60% ($P < 0,05$); con Nutlin-3 a concentrazioni di 2 μM l'effetto è drastico poiché si arriva ad un 25% ($P < 0,05$). Una simile risposta si ottiene anche con CDDP associato a Nutlin-3: il farmaco da solo, alla concentrazione di 0,01 μM , determina una vitalità dell'80-90%, mentre se combinato con Nutlin-3 1 μM la vitalità scende al 55-60% ($P < 0,05$); con Nutlin-3, 2 μM , si raggiunge il 35-40% ($P < 0,001$). Infine, abbiamo valutato l'associazione di Nutlin-3 alla VCR, unico farmaco tra quelli usati nel nostro studio ad indurre un blocco del ciclo cellulare e non un effetto genotossico. Il trattamento con VCR 1 nM non sembra avere alcun effetto citotossico sulla linea cellulare MB1603, il co-trattamento VCR e Nutlin-3 1 μM e 2 μM , causa una riduzione di vitalità cellulare rispettivamente al 20% e 10% ($P < 0,001$). Studi analoghi condotti su linee di Mieloma Multiplo hanno evidenziato come l'uso simultaneo di Nutlin-3a con agenti genotossici, quali melfalan e doxorubicina, produca un effetto antagonista; d'altro canto, le linee di Leucemia Mieloide Acuta e di Linfoma di Hodgkin subiscono un effetto sinergico in seguito ad esposizione a Nutlin-3 combinato con agenti citostatici. [Stuhmer T, Bargou RC, *Cell Cycle*, 2005, vol 5(1) : 39-42]

Questi nostri primi risultati sono stati confermati dagli studi di espressione proteica, in particolare nell'effetto di induzione dei target genetici specifici di p53. Nutlin-3 è efficace anche come singolo agente: essa determina un incremento tempo- e concentrazione-dipendente di p53 che, a sua volta, porta ad un'espressione maggiore di p21 e di MDM2. Dalla letteratura è noto come l'inibizione di MDM2 sia un metodo molto efficace per ottenere un maggiore effetto apoptotico indotto dall'accumulo di p53 nel nucleo e dalla sua stabilizzazione. Molteplici molecole, aventi questo eterodimero come bersaglio, sono in fase di studio ed i risultati osservati finora hanno evidenziato una significativa azione anti-proliferativa e pro-apoptotica in linee cellulari maligne. Il ruolo chiave della regolazione negativa di p53 ad opera MDM2, con conseguente stabilizzazione di p53 ed induzione del suo *pathway* apoptotico, è stato dimostrato anche mediante l'uso di oligonucleotidi antisenso. [Vassilev LT, *MolMed*, 2006,vol 13(1)]. L'effetto pro-apoptotico di Nutlin-3 si esprime nell'aumentato clivaggio di PARP che, parimenti a quanto osservato per p53, tende ad essere più netto secondo un andamento tempo- e concentrazione-dipendente. La combinazione di Nutlin-3 con i chemioterapici mostra, tuttavia, i risultati più interessanti. La stimolazione dell'espressione di MDM2 è parallela all'incremento della concentrazione di p53: in presenza di CDDP, VP16 e VCR combinati a Nutlin-3 le due proteine aumentano soprattutto dopo le 72 ore di esposizione. Lo stesso effetto si dimostra per p21, che viene solo minimamente stimolata dal CDDP singolo, mentre aumentano nettamente i suoi livelli nel trattamento combinato. Nel presente studio, invece, il VP16 ha mostrato una maggiore efficacia rispetto al CDDP, situazione che trova riscontro anche analizzando i livelli di espressione proteica. Infatti, p21 viene stimolata già dal VP16 da solo, al contrario del CDDP, che aumenta l'espressione di questa proteina solo dopo il trattamento combinato. I risultati ottenuti appaiono in linea con quanto dimostrato in ulteriori analisi relative al co-trattamento Nutlin-3/agente genotossico.

E' stato recentemente dimostrato che un effetto analogo sull'induzione di p53 e p21 si ottiene in seguito a trattamento di linee cellulari di carcinoma prostatico con Nutlin-3 (2-10 μ M) esposte a radiazioni o ambiente ipossico. Le combinazioni Nutlin-3/radioterapia o Nutlin3/ipossia determinano un incremento significativo dell'apoptosi mediante induzione di p53. Questo avvalorà l'ipotesi secondo la quale un aumento della concentrazione di p53 libera comporta una sensibilizzazione delle cellule agli agenti genotossici. [Supiot S, Hill RP, Bristow RG, *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(4):993-999]

I nostri dati dimostrano come l'associazione, radioterapia e Nutlin-3 alla concentrazione 1 μ M, può incrementare l'effetto citotossico causato dalle sole radiazioni ionizzanti sulla linea cellulare MB1603, p53 *wild-type*. Infatti, già dall'esposizione di 1 Gy, si verifica una marcata riduzione della vitalità: il trattamento radiante da solo riduce la vitalità al 90%, in combinazione con Nutlin-3 1 μ M il valore diminuisce al 30%.

L'analisi di PARP fornisce un'ulteriore evidenza della maggiore risposta nel trattamento combinato: dopo esposizione a Nutlin-3 e VP16 il suo clivaggio è totale alle 72 ore, mentre non lo è nel caso del trattamento singolo. In modo analogo, il CDDP determina un clivaggio solo parziale di PARP, che diviene però quasi totale nel trattamento combinato; infine, anche il trattamento VCR-Nutlin-3 induce una maggiore attività dell'enzima PARP rispetto al solo chemioterapico, sempre alle 72 ore. Le cellule Daoy, contrariamente a quanto finora osservato, non subiscono alcun effetto Nutlin-3 dipendente; p53 rimane invariata in presenza di qualunque trattamento. La sola proteina che modifica il suo stato basale è PARP che risulta clivato solo in presenza di chemioterapico e per lunghe esposizioni. L'inerzia delle linee cellulari con p53 mutata al trattamento con Nutlin-3, usato singolarmente e in associazione con Cisplatino o VP16, è stata osservata anche in studi eseguiti su linee tumorali di liposarcoma e carcinoma del colon. Tuttavia queste linee p53 mutate sono risultate più sensibili al trattamento combinato Cisplatino/Nutlin-3 qualora le due molecole vengano utilizzate in successione. L'effetto è attribuito alla stabilizzazione e attivazione di E2F1, fattore pro-apoptotico, in risposta all'inibizione di MDM2 e in seguito all'attivazione di altri componenti della famiglia di p53. [Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, e coll, *Oncogene*, 2007, 26:3473-3481]

Caratteristica dell' induzione di p53 è un blocco del ciclo cellulare con conseguente induzione di apoptosi, in relazione con l'accumulo progressivo di p21^{WAF1} e con l'aumentato clivaggio di PARP. p21^{WAF1} può creare complessi con diverse cicline ed indurre un accumulo della popolazione cellulare in fase G1/S. Si tratta di un evento precoce che normalmente precede tutti gli eventi di proteolisi apoptotica. [Slingerland J, Pagano M, *Regulation of the Cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer*, *Cancer* 183, 2000: 10-17] Mediante la determinazione del ciclo cellulare, la colorazione nucleare con DAPI ed il saggio TUNEL, abbiamo valutato la distribuzione della popolazione cellulare nelle cellule trattate e non, evidenziando l'esistenza di un arresto del ciclo cellulare che coincide con un incremento della percentuale di cellule apoptotiche, nettamente superiore nei co-trattamenti alle 24, 48 e 72 ore di esposizione.

Alle concentrazioni utilizzate per i trattamenti è possibile osservare una risposta apoptotica fin dalle prime 24 ore di esposizione: la percentuale di cellule in apoptosi passa dal 3,4% al 15,2% rispettivamente con aggiunta di solo VP16 e VP16-Nutlin3 e dall'1,45% al 3,1% con VCR e VCR-Nutlin-3. L'effetto è nettamente più marcato alle 48 ore dove la combinazione con l'etoposide raggiunge il 40%, mentre il chemioterapico da solo raggiunge il 15,6%; la vincristina somministrata da sola arriva al 2,3% mentre se associata a Nutlin-3 ha un effetto apoptotico circa 15 volte superiore (29%).

In conclusione, questo studio dimostra che le cellule di medulloblastoma rispondono al trattamento con Nutlin-3 in maniera dose- e tempo-dipendente e che l'esposizione contemporanea a Nutlin-3 e a chemioterapici tradizionali determina una risposta terapeutica significativamente maggiore rispetto ai singoli trattamenti.

Pertanto, possiamo affermare che la stabilizzazione di p53 mediante inibizione di MDM2 può risultare terapeuticamente vantaggiosa nel trattamento del medulloblastoma e può rappresentare un'opzione per futuri studi clinici.

Va tuttavia segnalato che molte delle nuove terapie "mirate", come ad esempio l'uso di inibitori delle metalloproteasi o di alcuni recettori per fattori di crescita, non hanno riportato in vivo i risultati sperati. Le strategie che prevedono l'attivazione di p53, in particolare, stabilizzando p53 *wild-type* o favorendo la sua sintesi rispetto a quella mutata dominante, sono in fase di rapida evoluzione. Un lavoro recente di Michaelis M. et al., indicherebbe che l'inibizione della degradazione mediante ubiquitinazione di p53 non sia sufficiente a colpire con un approccio multimodale le cellule tumorali e che, invece, possa indurre dei fenomeni di resistenza ai chemioterapici di uso corrente, richiedendo quindi un continuo monitoraggio dei pazienti sottoposti a questo trattamento. [Michaelis M., Cinati jr J., *Cell Death and Disease* (2011) 2, e243]

Strategie che sfruttano le caratteristiche molecolari delle cellule neoplastiche, diverse da quelle coinvolte nell'attività dei farmaci antineoplastici, potrebbero tuttavia portare notevoli vantaggi in termini di efficacia e di minore tossicità, e pertanto meritano di essere attentamente valutate.

5. BIBLIOGRAFIA

- 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
- Alarcon-Vergas D, Ronai Z, p53-Mdm2-the affair that never ends, *Carcinogenesis*, 2002,vol **23**, no 4, 541-547
- Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, e coll, Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1, *Oncogene*, 2007, **26**:3473-3481
- Amy M. Wilstermann, R.P. Bender, et al. Topoisomerase II-drug interaction domains: identification of substituents on etoposide that interact with the enzyme. *Biochemistry*, 2007; **46**: 8217-8225
- Ayres D.C., Loike J.D, Lignans. Chemical, biological and clinical properties, *Cambridge University Press*, Cambridge, 1990
- Bailey CC, Gnekow A, et al., Prospective randomized trial of chemotherapy given before radiotherapy in childhood medulloblastoma. International Society of Pediatric Oncology (SIOP) and GPO, *Med. Ped. Oncol.*, 1995, **25**: 166-78
- Baldwin E.L., N.Osheroff, Etoposide, Topoisomerase II and cancer, *Curr.Med.Chem-Anti-cancer agents*, 2005, **5**, 363-372
- Barbieri E., Mehta P., MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol.Cancer Ter*, 2006, Sept, **5(9)**
- Bode AM, Dong Z, Post-translational modification of p53 in tumorigenesis, *Nat.Rev.Cancer*, 2004,**4**:793-805
- Bromberg K.D, Burgin A.B, Osheroff N, A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase Ialpha, *J.Biol.Chem.* 2003, **278**: 7406-7412
- Brosh R., Rotter V., When mutants gain new power: news from the mutant p53 field. *Cancer*, 2000 Oct., **9**, 701-713
- Brown CJ, Lain S, Verma CS, Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Cancer*, 2009, Dec., **9**, 862-873

- Burden D.A., P.S.Kingma,S.J.Froelich-Ammon,et al. Topoisomerase II-Etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, USA, August 1996.
- Chipuk JE, Green DR, Dissection of p53 dependent apoptosis, *Cell Death and Differentiation*, 2006, **13**: 994-1002
- Degeterev A., Yuan J., Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature*, 2008 May, **9**, 378-390.
- Drakos E, Thomides A, e coll, *Clin Cancer Res*, 2007, **13**:3380-87
- 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.
- Eberhart C.G., J.L.Kepner,et al., Histopathologic grading of medulloblastomas, *Cancer*, 2002, January 15, **94**, 552-560
- Ellison D.W., Clifford S.C., What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma. *Eur.J.of Ped.Oncol.*, 2003, **7**, 53-56
- Espinoza-Fonseca LM, Targeting Mdm2 by the small molecule RITA: towards the development of new multi-target drugs against cancer, *Theor.Biol.Med.Model*, 2005, 2:38
- Frank AJ, Hernan R, Hollander A, Lindsev JC, Lusher ME.Fuller CE, Clifford SC, Gilbertson RJ. The tp53-Arf tumor suppressor pathway is frequently disrupted in large cell/anaplastic medulloblastoma. *Brain Res Mol Brain Res*; **121**, 137-140, 2004.
- Fry DC, Vassilev LT, Targeting protein-protein interaction for cancer therapy, *J.Mol.Med*, 2005, **83**, 955-963
- Gartel A, Serfas MS, Tyner AL, p21-negative regulator of the cell cycle, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med*, 1996, **213**: 138-149
- Gottardo N.G., A.Gajjar, Chemotherapy for malignant brain tumors of childhood, *J.of Child Neurology*, 2008, Oct, 23, **10**, 1149-1159
- Hori T, Nutlin-3 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulation of death receptor 5(DR5) in human sarcoma HOS cells and human colon cancer HCT116 cells, *Cancer Letter*, 2009, doi:10.1016.

- Howe Grant M.E., Lippard S.J., *Met. Ions. Biol. Syst.*, 1980, **11**,63
- H. Huang, L. Zhu, B. R. Reid, G. P. Drobny, P. B. Hopkins, Solution Structure of a Cisplatin-Induced DNA Interstrand Cross-Link, *Science*, 1995, **270**, 1842.
- Jacobs WB, Walsh GS, Miller FD. Neuronal survival and p73/p63/p53: a family affair. *Neuroscientist* 2004; **10**: 443-55.
- A. S. Jaggi, N. Singh, Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy, *Toxicology* 291 (2012) 1– 9
- Jamieson E.R., S.J.Lippard, Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts, *Chemical reviews*, 1999, august 6, **99(9)**, 2467-2497
- Jozwiak J., Grajkowska W., Wlodarski P., Pathogenesis of medulloblastoma and current treatment outlook, *Med.Res.Rev*, 1-17, 2006
- Kim R., Emi M., et al, Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J.of Pathology*, 2006, **208**: 319-326
- Kleihues P., Luois DN, The WHO classification of tumors of the nervous system, *J Neuropath Exp. Neurol*; **61**, 215-225, 2002.
- Kleihues P., Luois DN, Scheithauer BW, The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropath Exp.Neurol*; **61**,215-225,2002
- Lamont JM, McManamy CS, Pearson AD, Clifford S, Ellison DW. Combined histopatologic and molecular cytogenetic stratificationof medulloblastoma patients. *Clin Cancer Res*; **10**, 5482-5493, 2004.
- Lang B.H, Musial S.T, Bratain M.G, *Biochemistry* 1984, **23**, 1183-1188
- Lim.M.C., Martin R.B., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1967, **38**, 1911
- Liu L.F., Rowe T.C., Yang L., tewey K.M., Chen G.L., *J.Biol.Chem.* 1983, **258**, 15365-15370
- Macchiarulo et al. Apo- and p53-bound conformations of Mdm2 and Mdmx *J.Chem.Inf.Model*, **vol 48, No 10**,2008
- Macchiarulo A., Giacchè N., et al. Targeting the conformational transitions of Mdm2 and Mdmx: insights into dissimilarities and similarities of p53 recognition. *J.Chem.Inf.Model.*, 2008, **48, No.10**
- Malinge J. M., M. Leng, Interstrand Cross-Links in Cisplatin- or Transplatin Modified DNA, in ‘Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading

- Anticancer Drug', Ed. B. Lippert, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, **1999**, pp. 159-182
- Matsumoto M.; M.Furihata; Y.Ohtsuki Posttranslational phosphorylation of mutant p53 protein in tumor development. *Med.Mol.Morphol.* (2006) **39**:79-87
 - Michaelis M., Cinati jr J., Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells, *Cell Death and Disease* (Dec 2011) **2**, e243
 - Nørregaard A., Kristensen B.W., Effects of chemotherapeutics on organotypic corticostriatal slice cultures identified by a panel of fluorescent and immunohistochemical markers, *Neurotox Res* 2011, Dec 28
 - Olivia dalla Costa, Nutlins: a novel therapeutic strategy for inhibiting the MDM2-p53 interaction in cancer? *TSMJ*, vol **6**: 74-77.
 - Olsson A, Manzi C, Strasser A, Villunger A, How important are post-tranlational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumor suppression?, *Cell Death Differentiation*, 2007, **14**:1561-75
 - Opferman JT, GP Zambetti, Translational research? Ribosome integrity and a new p53 tumor suppressor checkpoint. *Cell death and differentiation*, 2006,march 24, **13**, 898-901
 - Osheroff N, *J.Biol.Chem*, Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turnover. 1986, **261**, 9944-9950
 - Osheroff N, Shelton E.R, Brutlag D.L, DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA, *J.Biol.Chem.* 1983, **258**, 9536-9543
 - Pawlik TM et all., Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys Jul 2004*, **59**: 928-942
 - Peyrone M.M, *Ann. Chim. Phys.*, 1844,3,193
 - Pietsch T, Taylor MD, Rutka J. Molecular pathogenesis of childhood brain tumors. *J. Neurooncol*; **52**, 57-62, 2001.
 - Pil P., Lippard, Enciclopedia of cancer, Vol I, Bertino (ed), San Diego, 1997, p.392

- Pil P., Lippard S.J., Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 12309.
- Ran Brosh, Varda Rotter, When mutants gain new power: news from the mutant p53 field. *Nature*, Israel, august 2009.
- Roche Applied Science Roche's Xcelligence system and Realtime ready Focus Panels have been used in the analysis of nutlin-induced apoptosis. *Edited by the Laboratorytalk editorial team* Sep 11, 2009
- Relling M.V, Nemenc J, Schuetz K.R, Schuetz J.D, Gonzalez F.J, Korzekwa K.R, *Mol.Pharmacol.*1994, **45**, 352-358
- Rosenberg B., Camp L.V., Krigas T., *Nature*, 1965, **205**, 698
- Sherman S.E., D.Gibson,A.H.J Wang, S.J.Lippard, X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA, *Science* 1985, oct 25, **230**, 412-417
- 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 USA* 2005; **102**: 731-6.
- Spurgers KB, NS Chari, NL Bohnenstiehl, TJ McDonnell Molecular mediators of cell death in multistep carcinogenesis: a path to targeted therapy. *Nature*, 2006, **13**, 1360-1370.
- Strother DR PI, Fisher PG, Hunter JV, Tumor of the Central Nervous System, *Principles of Ped.Onc.*, 2003,778-785
- Stuhmer T, Bargou RC, Selective pharmacologic activation of the p53-dependent pathway as a therapeutic strategy for hematologic malignancies, *Cell Cycle*, 2005, vol **5(1)**: 39-42
- Supiot S, Hill RP, Bristow RG, Nutlin-3 radiosensitizes hypoxic prostate cancer cells independent of p53, *Mol Cancer Ther*, 2008, **7(4)**:993-999
- Tabe Y, Sebasigari D e coll, MDM2 antagonist Nutlin-3 displays antiproliferative and proapoptotic activity in mantle cell lymphoma, *Clin Cancer Res*, 2009; **15(3)**:933942
- Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J., Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature*, 2008 March, **9**, 231-241.

- Takahara P. M., C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 12309.
- Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al, Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implication for therapy, *Proc.Natl.Acad.Sci*, USA 2006, **103**:1888-93
- Vassilev et al In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science*, 6 February 2004: 844-848 DOI: 10.1126/science.1092472
- Vassilev L.T, Mdm2 inhibitors for cancer therapy, *Trends in Molecular Medicine*, vol.13, No 1
- Villalonga-Planells R., Tortosa A., Activation of p53 by Nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme, *PLoS ONE*, April 2011, 6(4): e18588
- Wang Z, Jonga M, Lambros T, Exploration of liquid supercritical fluid chromatographic chiral separation and purification of Nutlin-3-A small molecule antagonist of Mdm2, *J.of Pharm.and Biom.Anal*, 2007, **45**,720-729
- Wells J.A., C.L.McClendon Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*,Dec.2007, **vol 450**, 06526
- Werner A., Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn, Braunschweig, 1905
- Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res*; 513-516, 2001.
- Wilstermann A, Anklin C, Berkowitz D.B, *Proc.Am.Ass.Cancer Res.* 2003,**135**
- Yu, L.Zhang, The transcriptional targets of p53 in apoptosis control, *Biochem. and Biophys. Res. Communic.*,2005
- Zamble D. B., S. J. Lippard, The Response of Cellular Proteins to Cisplatin – Damaged DNA, in ‘Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug’, Ed. B. Lippert, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 1999, pp. 73-110.

Ringraziamenti

Ringrazio sentitamente il Prof. Angelo Rosolen per avermi dato la possibilità di svolgere la tesi nel suo laboratorio.

Ringrazio in modo particolare il Dott. Massimiliano De Bortoli per la possibilità datami di collaborare allo sviluppo di questo studio sotto la sua sempre entusiasta supervisione.

Ringraziano tutti coloro i quali hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro: i colleghi per il supporto tecnico e morale, la Dr.ssa Alessia Bovassi per l'esecuzione degli esperimenti preliminari e Vito Barbieri (Istituto Oncologico Veneto) per la preziosa collaborazione nell'utilizzo dell'irradiatore.

Infine, ringrazio infinitamente la mia famiglia per il forte sostegno e la stima che mi hanno saputo donare.