**NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI PER IL PIU’ COMUNE TUMORE CEREBRALE DELL’INFANZIA: IL MEDULLOBLASTOMA**

**Analisi del ruolo di ß-catenina nel medulloblastoma mediante un approccio farmacologico**

Giovanna Cenacchi

Cristiano Renna, Roberta Salaroli

Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie

Università di Bologna

Introduzione

Il Medulloblastoma (MB) è un tumore embrionale costituito cioè da cellule ancora non completamente differenziate in senso neuronale o gliale ed è localizzato principalmente nel cervelletto, in particolare nel verme, la porzione più “antica” o negli emisferi cerebellari. Il MB rappresenta il tumore cerebrale più comune nell’infanzia secondo solo ai tumori di origine ematologica. L’età più frequente di insorgenza è tra i 4 e 7 anni, ma può insorgere anche nell’adulto sebbene con minore frequenza. Una delle sue principali caratteristiche è quella di avere la capacità di disseminare attraverso il liquido cefalorachidiano e tale disseminazione metastatica è comune in circa il 30% dei pazienti. La disseminazione al di fuori del sistema nervoso centrale è estremamente rara a differenza delle altre neoplasie non cerebrali.

Il trattamento del MB prevede ad oggi un trattamento multimodale consistente nella resezione chirurgica quanto più estesa possibile, nella radio e chemioterapia: tale trattamento ha portato ad una lungo-sopravvivenza in circa 2/3 dei pazienti. Tuttavia, la tossicità correlata al trattamento terapeutico ha un forte impatto in termini di effetti collaterali che includono, ma non sono gli unici, declino cognitivo con perdita di circa 4 punti IQ per anno, squilibri endocrini e correlati alla crescita, perdita dell’udito e insorgenza di neoplasie secondarie, tutto ciò portando ad una significativa diminuzione della qualità di vita. Pertanto è fondamentale poter definire strategie terapeutiche alternative in grado di ridurre al minimo la tossicità dei trattamenti di lunga durata. In tale ottica appare di fondamentale importanza una più precisa definizione della stratificazione del rischio che fino ad oggi si è basata fondamentalmente su criteri di tipo clinico ed istopatologico (età di insorgenza, presenza di metastasi alla diagnosi e presenza di residuo neoplastico dopo la resezione chirurgica). I pazienti vengono cosi divisi in due classi: ad alto rischio (metastasi alla diagnosi, età <3 anni e tumore residuo >1,5cm) e a rischio “standard”. La classificazione istologica ha sicuramente introdotto parametri per una migliore definizione della prognosi ed in particolare una diagnosi istopatologica di MB a grandi cellule o anaplastico si associa all’alto rischio, mentre la diagnosi di MB desmoplastico o ad estesa nodularità si associa al rischio “standard”, quindi, ad una prognosi più favorevole. Recentemente fattori molecolari come l’espressione nucleare della ß-catenina ed un aumentato livello di espressione dell’RNA messaggero del recettore della neurotrofina, TrkC, sono stati oggetto di approfondimento e correlati ad un outcome favorevole, mentre tumori con amplificazione di c-myc e squilibri del cromosoma 17 mostrano una prognosi peggiore. Nonostante gli indubbi vantaggi derivanti da tale classificazione clinica la risposta ai trattamenti terapeutici e l’outcome dei pazienti è sempre eterogeneo limitato anche da fattori non identificati di radio e chemio-resistenza. Mentre i trattamenti terapeutici non hanno subito modificazioni considerevoli, negli ultimi anni molti progressi sono stati fatti nella comprensione dei complessi meccanismi molecolari e nella biologia del tumore che hanno portato ad una più precisa definizione delle classi di rischio e risultano promettenti per l’ individuazione di marker terapeutici personalizzati che porterebbero ad una profonda rivoluzione di paradigma nell’approccio al MB.

L’approccio molecolare allo studio del MB ha portato negli ultimi anni, sulla base di tecniche di genomica/trascriptomica alla suddivisione del MB in sottogruppi che sicuramente permetteranno di introdurre marcatori molecolari nei futuri trials clinici. Il sottogruppo A è caratterizzato in particolare dal pathway di signalling WNT, il sottogruppo B dal pathway Hh e i sottogruppi C e D dall’espressione di marcatori di differenziazione neuronale e di geni di fotorecettori. Nel MB il pathway WNT è attivato in modo aberrante in circa il 18-25% dei tumori e questo sottogruppo appare caratterizzato da un’età di incidenza del tumore tra i 6 e i 12 anni, dalla positività di espressione di ß catenina nucleare, dall’tipo istologico classico e dalla presenza di metastasi alla diagnosi più bassa rispetto agli altri sottogruppi. Il più importante effetto dell’attivazione del sistema WNT sembra essere legato, nel sottogruppo A, ad un’acquisizione da parte delle cellule di una minore capacità invasiva come evidenziato sperimentalmente che potrebbe giustificare la bassa frequenza di malattia metastatica alla diagnosi.

Gli enzimi poly ADP-ribose polymerase (PARPs) costituiscono una superfamiglia di proteine coinvolte nel meccanismo della parsilazione che gioca un ruolo molto importante in numerosi meccanismi cellulari tra cui la individuazione del danno al DNA ed il suo riparo. In particolare, un membro di tale famiglia, la PARP5, altrimenti conosciuta come Tanchirasi, TNKS, risulta un regolatore del pathway di WNT inducendo la degradazione di axina nel citoplasma e portando quindi a stabilizzazione della ß catenina che trasloca al nucleo attivandone la funzione di trascrizione.

Quindi l’inibizione di TNKS antagonizza WNT: è stato dimostrato che tale sistema viene attivato in modo aberrante anche nel MB desmoplastico (sottogruppo B) confermando quindi il ruolo importante e verosimilmente ambiguo di WNT nel MB. Le radiazioni ionizzanti inducono danno nella doppia elica del DNA: l’utilizzo di farmaci radio-sensibilizzanti è correlato alla capacità di riparo del DNA che, inibita, potrebbe rappresentare un meccanismo per aumentare l’efficacia della terapia con conseguente riduzione delle dosi e calo di tossicità. Il nostro lavoro di ricerca si è quindi proposto di testare l’efficacia di un inibitore altamente specifico di TNKS rappresentato dalla *small molecule*, XAV939, in un modello *in vitro* costituito da linee cellulari di MB umano, per valutarne le sua potenzialità come radio sensibilizzante

Materiali e Metodi

Le linee cellulari di MB umano, DAOY and ONS-76 sono state trattate con XAV939 e/o radiazioni ionizzanti, RI, (raggi γ alla dose di 2 Gy): sono stati valutate la capacità proliferativa, la curva di crescita, la mortalità cellulare e la capacità di formare colonie aderenti. Sono state inoltre studiate l’espressione, mediante Western Blotting, di Axina, β-catenina e DNA-PKcs in risposta al trattamento con XAV939.

Risultati

Il trattamento con XAV939 sulle linee cellulari di MB risulta nell'inibizione del pathway di WNT, in un consistente calo delle capacità clonogeniche e proliferative delle cellule neoplastiche non correlate ad un incremento della mortalità cellulare, ciò dimostrandone una bassa tossicità. Il co-trattamento XAV939 e RI induce un ulteriore inibizione della proliferazione cellulare e della capacità di formare colonie: evidentemente XAV939 inibisce l’efficacia di riparo del DNA dopo l’irradiazione. Non è stato osservato un significativo aumento della mortalità rispetto alle cellule di controllo. In seguito alla somministrazione di una seconda dose di RI (2 Gy), nelle linee trattate anche con XAV939 la mortalità cellulare appare raddoppiata rispetto ai controlli.

Discussione e Conclusioni

Recentemente è cresciuto l’interesse dei ricercatori nei confronti delle proteine della famiglia PARP per il loro importante coinvolgimento nei meccanismi di riparo del DNA. Gli inibitori di PARP vengono quindi sviluppati e studiati come sensibilizzanti alla chemio o radioterapia e potenziali nuovi farmaci per futuri trials (per alcuni di essi si parla di valutazione di fase III). Inoltre, studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che l’inibizione del pathway di WNT (mediante *small molecules* con attività su PPA, un diretto regolatore di ß catenina, o contro il pathway PI3K/Akt che interferisce con WNT mediante un cross-talk con GSK-3β), sopprime la crescita del MB, promuovendo l’arresto del ciclo cellulare ed attivando l’apoptosi. La valutazione della proliferazione cellulare dopo RI viene quindi considerata un valido test per definire la radiosensibilità e dare informazioni utili sulle capacità proliferative delle cellule superstiti. I nostro dati, quindi, suggeriscono che l’inibizione di TNKS induce un aumento della radiosensibilità delle linee cellulari di MB e diminuzione della capacità clonogenica in seguito anche all’associazione con il trattamento RI. Ipotizziamo che la tale sensibilità sia indotta da una minore capacità di riparo del DNA: a tale scopo abbiamo utilizzato un saggio di Comet Assay per evidenziare e quantificare il danno al DNA.

In conclusione il trattamento con XAV939 promuove la soppressione dell’attività di TNKS PARP e quindi di conseguenza quella di WNT e del pathway di DNA-PK che significa in ultima analisi un miglioramento della radiosensibilità delle linee cellulari di MB. L’inibizione di TNKS, infatti, altera la potenzialità proliferativa e di formazione di cloni ed aumenta la mortalità cellulare. Considerati nell’insieme i nostri dati ottenuti dalla sperimentazione in vitro suggeriscono che TNKS possa rappresentare quindi un target potenziale per il miglioramento dell’efficacia dell’approccio terapeutico tradizionale. Inoltre, possono costituire la base per ulteriori studi *in vivo* volti alla validazione della efficienza del trattamento radioterapico per ridurne contestualmente la dose, pur mantenendone l’efficacia e diminuendone gli effetti tossici nei lungo sopravviventi.

*Bibliografia essenziale*

1. Dregalla RC, Zhou J, Idate RR., Battaglia CLR, et Al. (2010) Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs. Aging, 2, 691-708
2. Eberhart CG (2011) Molecular diagnostics in embryonal brain tumors. Brain Pathol 21: 96-104.
3. Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, et Al. (2011) Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. Acta Neuropathol 121: 381-396.
4. Fattet S, Haberler C, Legoix P, Varlet P, et Al. (2009) Beta-catenin status in pediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. J Pathol 218: 86-94.
5. Gajjar A, Chintagumpala M, Ashley D, Kellie S, et Al. (2006) Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): Long-term results from a prospective, multicentre trial. Lancet Oncol 7:813-820.
6. Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K, Friedrich C, et Al. (2014).Recent developments and current concepts in medulloblastoma. Cancer Treatment Reviews xxx xxx–xxx
7. Giangaspero F, Eberhart CG, Haapasalo H, Pietsch T, et Al.. Medulloblastoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavanee WK Eds. WHO Classification of tumors of the Central Nervous System. Lyon: IARC; 2007: 132-140.
8. Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, et Al.(2010) Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. Nature 468: 1095-1099.
9. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, et Al. (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. Acta Neuropathol 123:473-84.
10. Narwal M, Venkannagari H, Lehtiö L. [Structural basis of selective inhibition of human tankyrases.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22233320) J Med Chem. 2012 , 55,1360-7.
11. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, et Al. (2011) Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. J Clin Oncol. 29: 1408-1414.
12. Pfister SM, Korshunov A, Kool M, Hasselblatt M, et Al. (2010) Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. Acta Neuropathol 120: 553-566.
13. Pöschl J, Grammel D; Dorostkar M.M,Batash R, et Al. (2013) Constitutive activation of beta-catenin in neural progenitors results in disrupted proliferation and migration of neurons within the central nervous system. Dev Biol 374:319-32
14. Rogers HA, Miller S, Lowe J, Brundler MA, et Al. (2009) An investigation of WNT pathway activation and association with survival in central nervous system primitive neuroectodermal tumours (CNS PNET). Br J Cancer 100:1292–1302.
15. Salaroli R, Di Tomaso T, Ronchi A, Ceccarelli C, et Al. (2008) Radiobiologic response of medulloblastoma cell lines: involvement of beta-catenin?. J Neurooncol 90:243-251.
16. Shih-Min A. Huang, Yuji M. Mishina, et Al. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signaling. Nature 461, 614-620
17. Tang B, Wang J, Fang J, Jiang B, et Al.. (2012) Expression of TNKS1 is correlated with pathologic grade and Wnt/b-catenin pathway in human astrocytomas. Journal of Clinical Neuroscience 19, 139–143