

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA “LA SAPIENZA”

PRIMA E SECONDA FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E SPECIALITÀ MEDICHE



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN TECNOLOGIE BIOMEDICHE IN MEDICINA CLINICA

XXVI CICLO

*Tesi di Dottorato*

IL CONTROLLO EPIGENETICO DI GENI ONCOSOPPRESSORI  
NELLE CELLULE STAMINALI NEURONALI NORMALI E DI  
MEDULLOBLASTOMA

RELATORE

*Dr. Agnese Po*

CANDIDATA

Begalli Federica

*Matricola n. 984916*

CORRELATORE

*Dr. Evelina Miele*

*Anno accademico 2012 – 2013*

*The good thing about Science is that it's true  
whether or not you believe in it.*

*N. deGrasse Tyson*

# IL CONTROLLO EPIGENETICO DI GENI ONCOSOPPRESSORI NELLE CELLULE STAMINALI NEURONALI NORMALI E DI MEDULLOBLASTOMA

CAPITOLO I: LE CELLULE STAMINALI NEURONALI	6
<b>1.1. Le cellule staminali</b>	<b>7</b>
1.1.1. <i>Il concetto di cellule staminali</i>	7
1.1.2. <i>Le cellule staminali neuronali</i>	8
1.1.3. <i>Le cellule staminali tumorali</i>	9
CAPITOLO II: LA VIA DEL SEGNALE DI HEDGEHOG NEL CERVELLO	10
<b>2.1. La via del segnale di Hedgehog</b>	<b>11</b>
2.1.1. <i>La scoperta del gene Hedgehog</i>	11
2.1.2. <i>L'attività della via del segnale di Hedgehog: attivatore o repressore?</i>	12
2.1.3. <i>Patched: un recettore inusuale</i>	13
2.1.4. <i>L'attivazione di Smoothened</i>	14
2.1.5. <i>La via del segnale di Hedgehog ed il cilium</i>	15
2.1.6. <i>La trasduzione del segnale all'interno della cellula</i>	18
<b>2.2. La via di trasduzione di Hedgehog ed il cervello</b>	<b>19</b>
2.2.1. <i>Sintesi e trasporto di Sonic Hedgehog nel cervello</i>	19
2.2.2. <i>La zona sub-ventricolare</i>	20
2.2.3. <i>Il controllo dei precursori nella zona sub-ventricolare</i>	21
2.2.4. <i>Sonic Hedgehog e l'ippocampo</i>	22
2.2.5. <i>Lo sviluppo del cervelletto</i>	23
2.2.6. <i>Sonic Hedgehog e lo sviluppo cerebellare</i>	24
2.2.7. <i>Sonic Hedgehog e le cellule staminali neuronali</i>	25
2.2.8. <i>Hedgehog e Nanog nelle cellule staminali neuronali</i>	25
2.2.9. <i>La via del segnale di Hedgehog ed i tumori: il caso del medulloblastoma</i>	25

CAPITOLO III: I MICRORNA	28
<b>3.1. I microRNA</b>	<b>29</b>
3.1.1. <i>La scoperta e la funzione dei microRNA</i>	29
3.1.2. <i>La produzione e la maturazione dei microRNA</i>	29
<b>3.2. I microRNA nei tumori</b>	<b>31</b>
3.2.1. <i>I microRNA nelle neoplasie</i>	31
3.2.2. <i>I microRNA nel medulloblastoma</i>	33
CAPITOLO IV: LA REGOLAZIONE EPIGENETICA	35
<b>4.1. L'eredità epigenetica</b>	<b>36</b>
4.1.1. <i>L'epigenetica</i>	36
<b>4.2. Il rimodellamento dei nucleosomi</b>	<b>37</b>
4.2.1. <i>La mobilizzazione dei nucleosomi</i>	37
4.2.2. <i>Le varianti istoniche</i>	37
<b>4.3. Le modificazioni istoniche</b>	<b>38</b>
4.3.1. <i>Il codice istonico</i>	38
4.3.2. <i>Il complesso proteico Polycomb</i>	39
4.3.3. <i>Il complesso proteico Trithorax</i>	40
4.3.4. <i>I domini bivalenti</i>	41
<b>4.4. La metilazione del DNA</b>	<b>42</b>
4.4.1. <i>La metilazione del DNA nelle isole CpG</i>	42
CAPITOLO V: IL MICRORNA-326 NELLE CELLULE STAMINALI NEURONALI NORMALI E TUMORALI	44
<b>5.1. Scopo del lavoro</b>	<b>45</b>
5.1.1. <i>Le basi del progetto</i>	45
5.1.2. <i>Il microRNA-326</i>	45

<b>5.2. Materiali e metodi</b>	<b>46</b>
5.2.1. <i>Isolamento dell'RNA e RT-qPCR</i>	46
5.2.2. <i>Quantificazione dei livelli di microRNA</i>	47
5.2.3. <i>Immunostochimica</i>	47
5.2.4. <i>Colture e trattamenti cellulari</i>	47
5.2.5. <i>La mutagenesi sito-diretta</i>	47
5.2.6. <i>L'immuno-precipitazione della cromatina</i>	48
5.2.7. <i>Analisi Western blot</i>	48
5.2.8. <i>Il saggio di luciferasi</i>	48
5.2.9. <i>Il trattamento bisulfito e l'amplificazione tramite PCR</i>	48
5.2.10. <i>Immunofluorescenza</i>	49
5.2.11. <i>Saggio di proliferazione cellulare</i>	49
5.2.12. <i>Sintesi del composto MC2055</i>	49
<b>5.3. Risultati</b>	<b>50</b>
5.3.1. <i>L'espressione del microRNA-326 nelle cellule staminali neuronali normali e tumorali.</i>	50
5.3.2. <i>Il microRNA-326 controlla la staminalità grazie a due target Smo e Gli2.</i>	51
5.3.3. <i>La sequenza regolatoria del microRNA-326 è in comune con il suo gene ospitante.</i>	53
5.3.4. <i>La <math>\beta</math>-arrestina1 regola negativamente la proliferazione delle cellule staminali.</i>	53
5.3.5. <i>Il primo livello di repressione trascrizionale: la metilazione del DNA.</i>	54
5.3.6. <i>Il secondo livello di repressione trascrizionale: il dominio bivalente.</i>	56
5.3.7. <i>Modulare l'espressione di <math>\beta</math>-arrestina1 e microRNA-326 nelle cellule staminali tumorali.</i>	57
<b>5.4. Discussione</b>	<b>58</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>62</b>

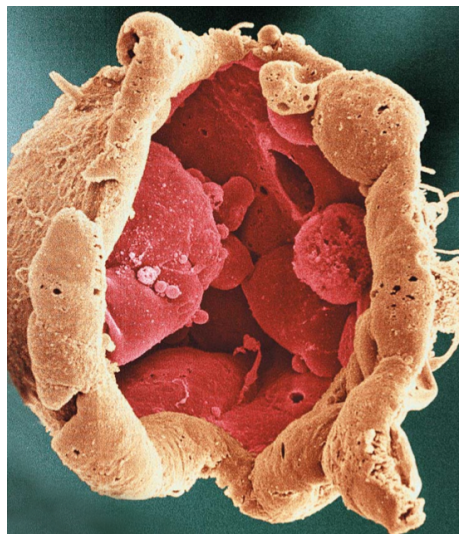
## CAPITOLO I: LE CELLULE STAMINALI NEURONALI

## 1.1. Le cellule staminali

### 1.1.1. Il concetto di cellule staminali

Sono stati effettuati enormi progressi nella ricerca sulle cellule staminali da quando venne stabilita la prima linea di cellule staminali embrionali umane (Thomson et al. 1998). Il termine “cellule staminali” è apparso per la prima volta nella letteratura scientifica almeno 140 anni fa. Originariamente era utilizzato dagli embriologi per descrivere le cellule germinali (Ramalho-Santos and Willenbring 2007). Nel 1961, Till e McCulloch hanno effettuato sulla milza il saggio di clonalità per stabilire l’abilità di auto-rinnovamento delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) murine. Dopo questi esperimenti il potenziale differenziativo e l’abilità di auto-rinnovamento sono stati considerati due fondamenti delle proprietà delle cellule staminali.

Il gold standard delle cellule staminali è l’ovocita fertilizzato che produce un organismo con una miriade di tipi cellulari specializzati, incluse le cellule staminali germinative (GSCs) addette alla formazione delle cellule per la riproduzione. Un embrione sviluppa ai primi stadi un guscio esterno di protezione, il trofoblasto, di supporto alle cellule indifferenziate della massa interna, le cellule pluripotenti staminali embrionali (ESCs) che daranno origine all’individuo (*Figura 1*). Più il processo di sviluppo va avanti, più le cellule staminali embrionali pluripotenti scompaiono per lasciare il posto alle cellule staminali somatiche (SSCs), più ristrette dal punto di vista



**Figura 1** - Blastocisti umana. Embrione dai cinque ai sei giorni dopo la fecondazione. La blastocisti è aperta e mostra la massa cellulare interna di colore rosso.

differenziativo, che danno origine ai tessuti e agli organi.

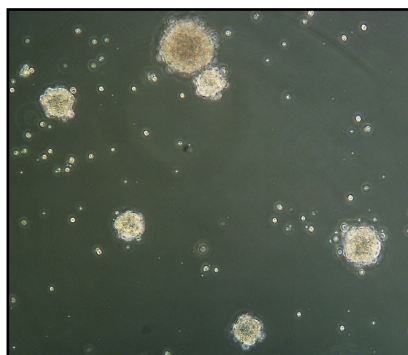
Nonostante la diversificazione cellulare sia in gran parte completa nel momento della nascita o poco dopo, gli organi devono possedere un meccanismo per sostituire le cellule che muoiono per l’omeostasi fisiologica del tessuto o per un danno. Per soddisfare questa necessità nel mammifero adulto, molti tessuti in via di sviluppo creano una riserva per il resto della loro vita di cellule staminali somatiche. Tali cellule mantengono alcune delle caratteristiche versatili delle cellule staminali embrionali, inclusa la capacità di auto-rinnovamento indefinito, ovvero generare mediante divisione asimmetrica una cellula che si indirizzerà verso il differenziamento per mantenere l’omeostasi del tessuto ed un’altra che manterrà le caratteristiche della cellula staminale ed andrà a

Anche se il privilegio di differenziare in quasi tutti i tipi cellulari sembra essere riservato alle cellule staminali embrionali più versatili, le cellule staminali adulte, che risiedono all'interno di un organo o di un tessuto, sono in grado di differenziare almeno in uno (unipotenti) o, più frequentemente, in più linee cellulari (multipotenti). Data l'importanza nel corso della vita di un organismo le cellule staminali vengono generalmente preservate all'interno di una nicchia protettiva. Tale ambiente non è composto esclusivamente da cellule staminali ma anche da diverse cellule differenziate che secernono e organizzano un ricco ambiente extracellulare che permette alle cellule staminali di manifestare le loro caratteristiche uniche, inclusa l'abilità di auto-rinnovamento, mentre viene inibito il loro repertorio differenziativo.

### 1.1.2. Le cellule staminali neuronali

Le cellule staminali adulte, al fine di mantenere l'omeostasi cellulare e l'integrità durante la vita dell'organismo, possiedono delle caratteristiche funzionali peculiari che forniscono anche i criteri fondamentali per riconoscerle e classificarle. Le cellule staminali, infatti, sono cellule altamente indifferenziate che possiedono un significativo potenziale proliferativo, un'ampia possibilità di sviluppo e una capacità intrinseca di auto-perpetuazione, meglio nota come auto-rinnovamento.

Storicamente le cellule staminali emopoietiche (HSCs) sono state le prime a fornire un utile modello funzionale al fine di disegnare strategie per investigare le altre cellule staminali adulte (Morrison et al. 1997). A causa dell'enorme numero di cellule del sangue che vengono generate dalle HSC ogni giorno, è stato possibile sviluppare un saggio funzionale *in vivo* dove le cellule staminali sono identificate dalla loro capacità di ricostituire il compartimento emopoietico dopo l'ablazione. Inoltre, è stato possibile caratterizzare i marcatori espressi su queste cellule, tuttavia, la loro caratteristica più significativa è la resistenza ad un'estensiva proliferazione in coltura.



**Figura 2** - Cellule staminali neuronali. Foto in contrasto di fase di cellule staminali neuronali derivate dal cervelletto.

Quando si paragona la funzione delle cellule staminali emopoietiche con le cellule staminali neuronali, i due sistemi sembrano ai poli opposti di uno spettro funzionale. Nelle cellule staminali neuronali (NSCs), a causa della quiescenza globale e della rigidità strutturale del parenchima cerebrale, il classico paradigma della ricostituzione sperimentale dopo l'ablazione del compartimento staminale è effettuata raramente per studiare e caratterizzare le NSCs. Per questo, lo studio delle cellule staminali neuronali è stato svolto principalmente *in vitro*, grazie anche alla loro incredibile capacità di proliferare in coltura (Figura 2).

Le cellule staminali neuronali sono state identificate in molte aree del cervello adulto, in particolare, esistono evidenze che tali cellule risiedono anche nel cervelletto postnatale, ovvero in via di sviluppo. Grazie a studi svolti tramite la citometria a flusso è stato possibile purificare tali cellule in cervelletti di topi sette giorni dopo la nascita (Lee et al. 2005). La caratterizzazione delle



cellule così ottenute ha evidenziato l'espressione di marcatori di staminalità quali Prominina1, Sox2 e Musashi.

Le cellule staminali neuronali cerebellari proliferano in risposta a bFGF ed EGF generando neurosfere *in vitro* con proprietà di auto-rinnovamento (Reynolds and Weiss, 1992; Reynolds and Weiss, 1996; Vescovi et al. 1993; Po et al, 2010). È stato, inoltre, dimostrato che tali cellule sono in grado di differenziare sia *in vitro* che dopo trapianto in topi neonati, in neuroni e cellule della glia.

L'approccio delle neurosfere rappresenta un metodo di coltura senza siero e selettivo in cui la maggior parte delle cellule in differenziamento o differenziate muoiono rapidamente. In questo terreno, invece, le cellule staminali neuronali rispondono agli stimoli di mitogeni, si dividono e danno origine a neurosfere che possono essere dissociate e ripiastrate per generare neurosfere secondarie. Questo saggio è semplice e rappresenta un buon metodo per l'isolamento, l'espansione e l'identificazione delle cellule staminali neuronali ed è diventato un metodo per studiare le popolazioni di cellule staminali *in vitro*.

### 1.1.3. Le cellule staminali tumorali

Il cancro è una patologia multigenica complessa e durante una parte significativa del XX secolo gli studiosi del cancro hanno spiegato il processo di generazione e progressione mediante un modello stocastico. Una cellula o un gruppo di cellule diventa tumorigenico dopo una mutazione iniziale, somatica o germinale. Il successivo accumulo di mutazioni somatiche ha come risultato un vantaggio proliferativo e di sopravvivenza dei cloni selezionati. I cloni predominanti, con l'abilità di produrre cellule tumorali identiche, mantengono la massa tumorale ed hanno l'abilità di iniziare altri tumori dopo il trapianto. Questo modello assume che il cancro è composto da un gruppo di cloni con tassi di crescita simili e, quindi, i tumori hanno una morfologia omogenea. Inoltre, tale modello indica che tutte le cellule tumorali possono iniziare e propagare un tumore.

Nonostante i numerosi utilizzi, questo modello ha due limiti importanti basati sulle osservazioni dei dati sperimentali. In primo luogo, i tumori sono morfologicamente, fenotipicamente e funzionalmente eterogenei. Non tutte le cellule tumorali sembrano simili e i modelli di differenziamento possono essere distinti. In secondo luogo, il modello stocastico predice che ogni singola cellula cancerosa può iniziare un tumore. Le osservazioni sperimentali, invece, mostrano che un ampio numero di cellule deve essere trasferito per poter generare un tumore.

Negli ultimi anni è stato proposto un modello alternativo per l'evoluzione del cancro. Questo nuovo modello stabilisce l'esistenza di un ordine gerarchico dove una cellula tessuto-specifica, chiamata "*cancer stem cell*" acquisisce o mantiene le proprietà di auto-rinnovamento, multipotenza e di generazione di un tumore sia *in vitro* che *in vivo*. Tale popolazione è costituita da rare cellule ed è l'unica con la capacità di generare e mantenere un tumore, di permettere la propagazione tumorale, di colonizzare siti distanti o di trapiantare il tumore in altri esseri viventi. Le altre cellule formanti il tumore saranno cellule che si amplificano transientemente e cellule mature con un'abilità di iniziare o mantenere il tumore limitata o nulla.

L'ipotesi delle cellule staminali tumorali (CSCs) suggerisce che la propagazione del tumore è normalmente guidata dalla sottopopolazione di cellule cancerose con proprietà staminali. La definizione funzionale di CSCs è, quindi, una cellula con l'abilità di iniziare un tumore (tumor initiating cells). Questa descrizione è basata sui principi della biologia delle cellule staminali. In maniera simile alle cellule staminali normali, le CSCs formeranno anche il tessuto tumorale andando incontro a modificazioni epigenetiche e differenziando in progenie fenotipicamente diverse che daranno origine alla massa tumorale.

## CAPITOLO II: LA VIA DEL SEGNALE DI HEDGEHOG NEL CERVELLO

## 2.1. La via del segnale di Hedgehog

### 2.1.1. La scoperta del gene Hedgehog

I geni Hedgehog (Hh) devono la loro scoperta al lavoro pionieristico di Nüsslein-Volhard e Wieschaus nel 1980, che vinsero per ciò il Premio Nobel nel 1995 (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). I due autori identificarono una serie di mutazioni in *Drosophila* che interrompono il corretto sviluppo della larva. Durante queste ricerche si imbatterono in un fenotipo larvale che mostrava la duplicazione dei dentelli, dei processi cuticolari simili a spine e presenti nella metà anteriore di ogni segmento, con la contemporanea perdita della cuticola nuda. L'aspetto risultante di una serie di dentelli che si proiettano dalla cuticola della larva lungo tutto il corpo ha, evidentemente, ricordato ai ricercatori gli aculei del riccio da cui deriva l'origine del nome di questi geni.

Sulla base dei fenotipi di questi animali mutanti, Nüsslein-Volhard e Wieschaus proposero che tali geni regolassero la disposizione di ogni segmento del corpo della larva attraverso geni individuali che distinguessero le subregioni del disegno di segmentazione e furono, per queste loro caratteristiche, chiamati “*segment-polarity*”, ovvero geni della polarità dei segmenti.

Oggigiorno è ormai noto il ruolo centrale di *hh* in *Drosophila* nel regolare le ali (Mohler 1988; Basler and Struhl 1994; Tabata and Kornberg 1994), le zampe (Diaz-Benjumea et al. 1994) e i dischi oculari (Heberlein et al. 1995; Dominguez 1999). Hedgehog svolge un ruolo in *Drosophila* anche in molti altri processi, inclusa la migrazione delle cellule germinali (Deshpande et al. 2001), lo sviluppo della lamina ottica (Huang and Kunes 1996, 1998), delle gonadi (Forbes et al. 1996; Zhang and Kalederon 2000), dell'addome (Struhl et al. 1997), dell'intestino (Pankratz and Hoch 1995) e del sistema tracheale (Glazer and Shilo 2001).

I geni *hh* sono stati identificati in molti altri invertebrati ed una notevole eccezione è rappresentata dal nematode *Caenorhabditis elegans*, che non possiede ortologi di *hh* (Aspöck et al. 1999) ma ha molti geni che codificano per proteine omologhe al recettore di Hh, Patched (Kuwabara et al. 2000).

I geni hedgehog dei vertebrati sono stati per la prima volta riportati nel 1993, a seguito di una collaborazione di tre gruppi di ricerca che hanno indagato in tre specie di animali differenti: pesci, polli e topi (Echelard et al. 1993; Krauss et al. 1993; Riddle et al. 1993). Vi furono diverse sorprese in queste scoperte iniziali, anzitutto a differenza del moscerino della frutta, che possiede un solo gene *hh*, esistono nei vertebrati diversi geni correlati. Furono identificati tre geni *hh* nel topo: *Desert Hedgehog (Dhh)*, *Indian Hedgehog (Ihh)* e *Sonic Hedgehog (Shh)* (Echelard et al. 1993). *Dhh* è il più correlato con Hedgehog di *Drosophila*, *Ihh* e *Shh* sono maggiormente correlati tra di loro e rappresentano un evento di duplicazione più recente. In secondo luogo, fu osservata l'espressione di Shh nelle tre zone centrali dello sviluppo dell'embrione nei vertebrati: la notocorda, la lamina ventrale del tubo neurale e la zona di polarizzazione (zone of polarizing activity, ZPA), in una popolazione di cellule mesenchimali apicali e posteriori, nell'intestino e negli arti.

Precedenti studi sullo sviluppo della piastra neurale avevano mostrato l'importanza dei segnali provenienti dalla notocorda e dalla lamina ventrale del tubo neurale nella ventralizzazione del tubo neurale, mentre nel caso degli arti molte evidenze avevano sottolineato il ruolo della ZPA nella regolazione della polarità anteriore. Diversi esperimenti successivi hanno fornito le prove che Shh regola la polarità ventrale nel tubo neurale mentre negli arti la polarità antero-posteriore.

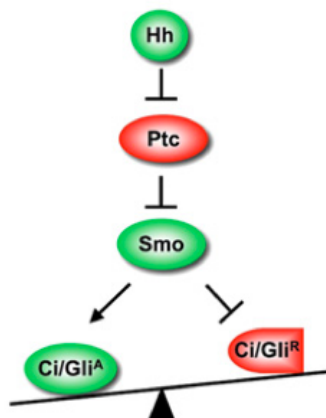
Queste fondamentali osservazioni preliminari hanno avuto modo, in seguito, di essere approfondite per rivelare i meccanismi di sviluppo di queste strutture. Inoltre, è stato possibile scoprire che le proteine Hh sono implicate in una serie molto vasta di processi nello sviluppo

dell'embrione che spaziano dalla stimolazione della morfogenesi cardiaca alla regolazione dell'asse destro-sinistro (definendo l'asse sinistro) nell'embrione, dalla separazione della trachea e dell'esofago (determinando l'asse antero-posteriore dell'intestino) allo sviluppo delle cellule peritubulari, maturazione dei testicoli, interazione con le cellule del Sertoli e del Leydig nello sviluppo della linea germinale maschile, dalla proliferazione delle cellule staminali emopoietiche alla differenziazione dei timociti, dalla sopravvivenza nella cresta neurale nel cranio e morfogenesi facciale alla proliferazione/sopravvivenza/morte dei precursori neuronali. Questi sono solo pochi esempi del coinvolgimento delle proteine Hh nei vari processi dell'organismo ed esistono poche parti del corpo dei vertebrati che non siano influenzate in qualche modo dal segnale di Hh.

Nonostante il ruolo preciso del segnale di Hh sia ancora sotto esame, è chiaro che queste molecole possono evocare diverse risposte in base al contesto in cui operano. Questa via del segnale, quindi, è stata riscontrata essere coinvolta nella regolazione del destino, nella proliferazione e nella sopravvivenza di un vasto numero di cellule bersaglio. La via può avere un raggio d'azione ampio o corto, una funzione diretta o indiretta e può essere un'azione concentrazione dipendente, evocando diverse risposte molecolari a determinati livelli di concentrazione (cioè possiede una classica funzione di morfogeno).

### 2.1.2. L'attività della via del segnale di Hedgehog: attivatore o repressore?

Hedgehog esercita la sua influenza biologica attraverso una cascata di segnali che culmina in un'alterazione del bilancio tra le forme attivatorie e repressorie della famiglia di fattori trascrizionali Gli (Glioma-Associated Oncogene Homolog) che possiedono un dominio di legame al DNA "zinc-finger". Il sistema di ricezione di Hedgehog consiste in una proteina a dodici domini transmembrana, Patched (Ptc) e in un recettore a sette domini transmembrana Smoothened (Smo) per la trasduzione del segnale attraverso la membrana (Ingham and McMahon 2001). In assenza di Hedgehog, Patched blocca l'attività di Smoothened e le proteine Gli vengono processate proteoliticamente per generare una forma troncata al carbossi-terminale Gli<sup>R</sup> che reprime attivamente un gruppo di geni target di Hedgehog. Quando Hedgehog lega Patched, viene meno l'inibizione di Smoothened che può così svolgere la sua funzione di trasduttore del segnale



**Figura 3** - Semplificazione della via di trasduzione del segnale di Hedgehog. L'attivazione del segnale da parte di Hedgehog causa uno sbilanciamento verso la forma attiva dei fattori trascrizionali Ci/Gli.

Mentre in *Drosophila* è presente un solo gene *hh* e un solo omologo di Gli, *Cubitus interruptus* (Ci), la trasduzione del segnale nei vertebrati coinvolge sia ligandi multipli (Shh, Ihh e Dhh), sia più fattori trascrizionali della famiglia Gli (Gli1, Gli2 e Gli3) (Ingham and McMahon 2001). La funzione Gli<sup>R</sup> nei vertebrati è largamente svolta da Gli3, mentre la funzione primaria di Gli<sup>A</sup> è svolta soprattutto da Gli2. Gli1 è un fattore trascrizionale a valle della via del segnale di Hedgehog ma che a sua volta funziona da attivatore della via ed agisce come rinforzo per l'attività Gli<sup>A</sup>.

Attraverso l'analisi di topi mutanti per Gli2 e Gli3 sono state scoperte diverse ed inaspettate funzioni di Gli<sup>A</sup> e Gli<sup>R</sup> in vari processi dipendenti da Hh durante lo sviluppo embrionale. Ad esempio, Shh agisce da mitogeno e promuove la proliferazione cellulare in molti tessuti sia embrionali che adulti. Nell'epidermide embrionale Gli<sup>A</sup> è il principale effettore della proliferazione cellulare mediata da Shh (Mill et al 2003). Una overespressione di Gli1 o Gli2 può indurre l'insorgenza spontanea di tumore alla pelle (Grachtchouk et al. 2000; Nilsson et al. 2000). La perdita di funzione di Gli3 ha minimi effetti sullo sviluppo del follicolo pilifero e non è in grado di ripristinare la proliferazione cellulare nella pelle dei topi Shh -/- (Mill et al. 2005). In molti altri tessuti la funzione di Gli<sup>A</sup> non sembra essenziale al fine di mantenere la proliferazione cellulare dipendente da Shh e la funzione di Shh sembra essere in primo luogo quella di prevenire l'azione di Gli3/Gli<sup>R</sup>. Vi sono evidenze che Gli3<sup>R</sup> possa bloccare la via del segnale di Wnt attraverso il legame con la  $\beta$ -catenina inibendone la sua funzione di attivatore trascrizionale (Ulloa et al. 2007).

In aggiunta alla regolazione della proliferazione, il segnale di Shh gioca anche un ruolo critico nella sopravvivenza e nell'indirizzamento dei progenitori neurali nella corda spinale in posizione ventrale, attraverso l'inibizione di Gli3 (Litingtung and Chang 2000). La via del segnale di Shh utilizza Gli<sup>A</sup> e Gli<sup>R</sup> in vari modi per poter controllare l'espressione di un distinto gruppo di proteine con homeo-dominio in differenti popolazioni di progenitori cellulari (Wijgerde et al. 2002). In maniera simile, Gli<sup>A</sup> e Gli<sup>R</sup> influenzano differenti gruppi di geni durante lo sviluppo dello sclerotomo indotto da Shh (Buttitta et al. 2003). Come Gli<sup>A</sup> e Gli<sup>R</sup> regolino l'espressione di differenti gruppi di geni non è noto poiché essi legano sequenze consensus e regioni genomiche simili (Hallikas et al. 2006; Vokes et al. 2007, 2008). È possibile che altre vie di segnale o fattori trascrizionali influenzino l'espressione dei geni target di Gli. Inoltre, le proteine Gli come Gli3 possono legare le sequenze dei promotori indirettamente tramite il legame con altre proteine leganti il DNA.

### 2.1.3. *Patched: un recettore inusuale*

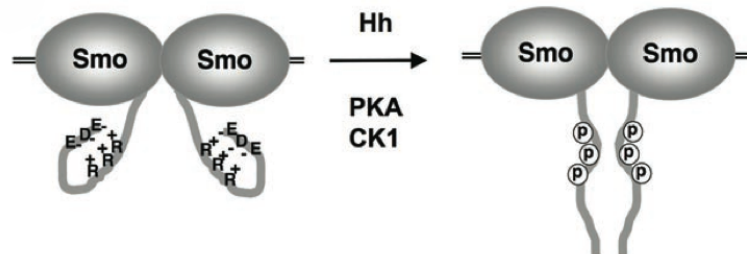
A differenza delle altre vie del segnale dove i recettori agiscono come trasduttori del segnale per attivare la via dopo il legame con il ligando, Patched (Ptc) funziona come un inibitore della via, bloccando l'attivazione in assenza del ligando Hh. Patched è omologo alla famiglia RND, trasportatori procariotici guidati dalla forza protonica. Il recettore Ptc conserva molte caratteristiche peculiari dei trasportatori RND-like che sono essenziali per l'azione catalitica di Ptc nell'inibizione di Smo. Esiste l'interessante possibilità che i trasportatori Ptc permettano l'ingresso a piccole molecole endogene antagoniste di Smo (Taipale et al. 2002). Sono noti, infatti, numerosi composti, naturali o sintetici, che possono inibire o attivare la via di Hh a livello di Smoothened.

Nelle cellule in coltura, Ptc induce la secrezione della Pro-Vitamina D3. Sia la Pro-Vitamina D3 sia la Vitamina D3, ad alte concentrazioni, inibiscono la via del segnale di Hh (Bijlsma et al. 2006). Due studi hanno identificato l'oxisterolo, che si trova a valle della Vitamina D3 nella via biosintetica del colesterolo, come regolatore positivo del segnale di Hh, agendo ad un livello a monte di Smo (Corcoran and Scott 2006; Dwyer et al. 2007).

#### 2.1.4. L'attivazione di Smoothened

Il segnale cellulare, attraverso i recettori transmembrana, è generalmente attivato attraverso due modi principali: la multimerizzazione di recettori monomerici, che porta all'avvicinamento delle code citoplasmatiche degli stessi recettori, come è stato dimostrato per i recettori tirosin-chinasici (RTKs), oppure da cambi conformazionali, esemplificato dai membri della famiglia di recettori accoppiati a proteine G (GPCR). Nonostante Smoothened sia strutturalmente correlato con la famiglia dei GPCRs, questo recettore trasduce il segnale di Hh mediante un'associazione diretta con dei complessi citoplasmatici facenti parte della via del segnale, piuttosto che tramite l'associazione con le proteine G trimeriche (Jia and Jiang 2006). Sembra che Smoothened preservi le caratteristiche strutturali dei GPCRs come dimerizzazione/oligomerizzazione e modificazioni conformazionali indotte dal ligando.

In *Drosophila* Hedgehog induce la fosforilazione di Smoothened mediante la PKA e CK1, portando all'attivazione e all'accumulo di Smo sulla superficie cellulare (Jia et al. 2004). Varianti di Smo deficienti per la fosforilazione, come Smo chimerici con le code C-terminali citoplasmatiche rimpiazzate da quelle del recettore di Wnt/Wg Frizzled 2 (Fz2), inibiscono l'attività della proteina Smo endogena (Jia et al. 2004; Apionishev et al. 2005; Hooper 2003). Gli effetti dominanti negativi di queste varianti di Smo possono essere spiegati dalla formazione di dimeri inattivi tra la variante esogena e il *wild type* endogeno di Smo. Mediante esperimenti di *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) sono state ricavate evidenze che Smoothened formi costitutivamente dimeri/oligomeri tramite le sue regioni N-terminali. Le code citoplasmatiche C-terminali in un dimero sono situate a distanza ma vengono avvicinate in risposta ad Hh, in maniera simile ad un cambio



**Figura 4** - Hedgehog induce un cambio conformazionale e la dimerizzazione delle code al C-ter attraverso la fosforilazione. La conformazione inattiva di Smo nelle code C-ter è mantenuta da interazioni elettrostatiche. Hh induce la fosforilazione in più siti rompendo le interazioni elettrostatiche portando ad un cambio conformazionale nelle code C-ter ed alla loro dimerizzazione.

conformazionale (Zaho et al. 2007a) (Figura 4).

L'avvicinamento delle code C-ter di Smo sembra svolgere un ruolo fondamentale per l'attivazione della via di Hh. Mutazioni puntiformi che inibiscono la dimerizzazione compromettono l'attività di Smo che può essere parzialmente ripristinata attraverso una dimerizzazione forzata con sistemi eterologhi. Inoltre, l'induzione del raggruppamento delle code C-ter di Smo è sufficiente per promuovere l'attivazione della via di Hh. Smoothened è un recettore con caratteristiche quasi uniche nel suo genere, infatti mostra le proprietà di entrambe le classi recettoriali GPCR e RTK. Da una parte Smoothened esiste in dimeri preformati come in molti GPCRs. Dall'altra parte l'attività di Smoothened è promossa dalla maggior vicinanza delle code citoplasmatiche come avviene nei RTKs.

La fosforilazione nelle code citoplasmatiche di Smo sembra avvenire ad opera della PKA e

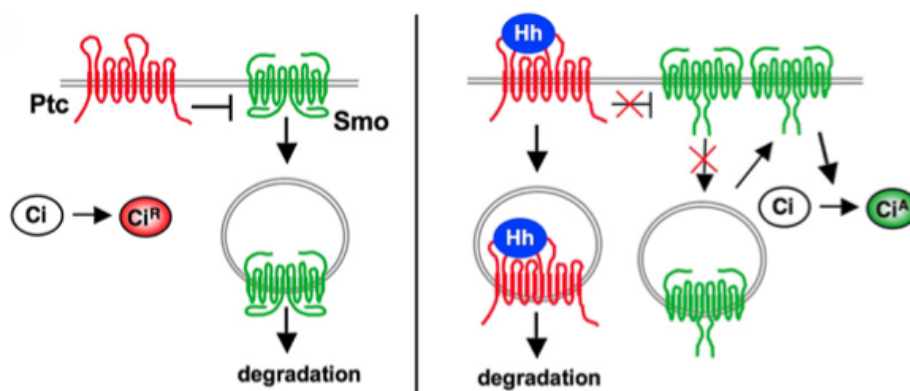
inibendo farmacologicamente la PKA si ha un blocco del cambio conformazionale indotto da Hh. Mutazioni che mimano la fosforilazione promuovono la conformazione attiva indipendentemente dalla presenza di Hh. È interessante notare che il grado di cambiamento conformazionale nelle code C-ter di Smo è proporzionale al livello di fosforilazione. È possibile che esistano una serie di stati conformazionali di Smo dipendenti dai livelli di Hh e dalla fosforilazione di Smo. L'altra alternativa è che alti livelli di fosforilazione delle code citoplasmatiche spostino l'ago della bilancia tra conformazione attiva ed inattiva verso la prima delle due.

Mediante l'analisi di mutanti per delezione sito-diretta, è stato possibile identificare un raggruppamento di Arginine che regolano negativamente l'attività e l'accumulo di Smo sulla superficie cellulare. Questi gruppi di Arg sono localizzati in regioni adiacenti ai siti di fosforilazione per PKA/CK1, nella regione centrale delle code di Smo, denominata SAID (Smo auto-inhibitory domain). La delezione di SAID ha effetti simili alla mutazione multipla dei gruppi di Arg, in entrambi i casi si ha come risultato un recettore Smo variante che si accumula sulla superficie cellulare e mostra costitutivamente alti livelli di attività. Il motivo di Arg mantiene le code C-ter di Smo in una conformazione chiusa ed inattiva tramite interazioni elettrostatiche. La fosforilazione dei siti adiacenti al motivo di Arg tramite la PKA/CK1 rompe queste interazioni, probabilmente neutralizzando le cariche positive del motivo di Arginine.

Nonostante i motivi funzionalmente rilevanti nelle code citoplasmatiche di Smo non siano conservati tra *Drosophila* e vertebrati, Smo nei mammiferi potrebbe essere regolato in maniera analoga da un lungo frammento di residui basici, data la sua fosforilazione tramite la chinasi dei GPCR, GSK2 che è regolata positivamente dal segnale di Hh (Chen et al. 2004; Meloni et al. 2006); GSK2 e forse altre chinasi potrebbero sostituire PKA/CK1 per la regolazione di Smo nei vertebrati.

### 2.1.5. La via del segnale di Hedgehog ed il cilium

In *Drosophila* Ptc inibisce la presenza di Smo sulla superficie cellulare promuovendone l'endocitosi e la degradazione. Hh induce una distribuzione subcellulare opposta, con l'accumulo di Smo sulla superficie cellulare e Ptc all'interno del citoplasma (Denef et al. 2000; Jia et al. 2004; Zhu et al. 2003). Come Hh e Ptc regolino il traffico di Smo non è ancora del tutto chiaro ma si sa che è, almeno in parte, mediato dalla fosforilazione di Smo nei motivi ricchi di Arg delle code citoplasmatiche (Figura 5). Nei mammiferi è stata osservata una relazione simile per Ptc1 e Smo

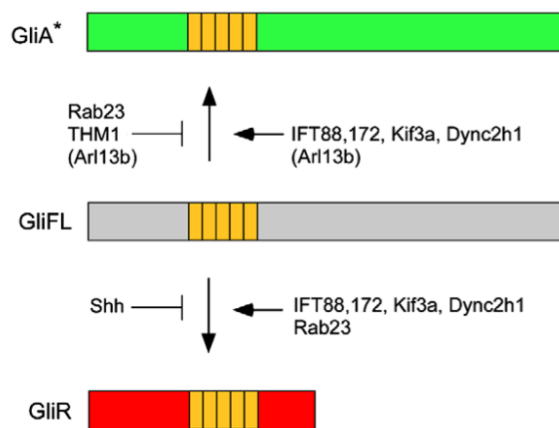


**Figura 5** - Regolazione del traffico di Smo e della sua conformazione in *Drosophila*. L'assenza di Hh permette a Ptc di inibire la fosforilazione di Smo e ne promuove, invece, la degradazione tramite endocitosi. Il legame di Hh con Ptc stimola l'iperfosforilazione di Smo che ne incrementa la presenza in membrana. Inoltre, la fosforilazione di Smo promuove il cambio conformazionale che porta all'oligomerizzazione delle code citoplasmatiche.

Il cilium primario è un singolo microtubulo che si proietta dalla superficie della cellula e, normalmente, non è motile. Dato che origina dal centriolo che in interfase è presente nel citoplasma di tutte le cellule, virtualmente tutte le cellule non in divisione dell'organismo potrebbero avere il cilium primario. Il centriolo organizza una proiezione di microtubuli chiamata assonema che risulta la struttura centrale del cilium. Nel cilium primario l'assonema consiste in nove coppie di microtubuli (disposizione 9+0), questo lo distingue dalle cilia mobili che hanno una coppia di microtubuli centrali aggiuntivi (disposizione 9+2).

Tutti i componenti richiesti per l'assemblaggio del cilium e la sua funzione sono trasportati da un processo di trasporto intra-flagellare (IFT). Questo trasporto coinvolge il movimento delle particelle proteiche lungo l'assonema del cilium tramite l'ancoraggio delle proteine Heterotrimeric motor kinesin-2 al microtubulo. Questo traffico anterogrado è bilanciato da uno retrogrado che trasporta le particelle grazie al motore di dineina. La via retrograda è responsabile per i movimenti delle molecole dal cilium al corpo cellulare. Le proteine coinvolte in questa via sono state classificate come complesso IFT A o B che facilitano in primo luogo il trasporto retrogrado (IFT A) o anterogrado (IFT B), anche se il ruolo del complesso A può cambiare tra organismi differenti.

Attraverso screening genetici in topo sono stati individuati una serie di componenti del cilium che sono richiesti per la trasduzione del segnale di Shh. In particolare, diverse proteine del complesso IFT B, incluse IFT88/polaris e IFT172/wimple, sono necessarie per la risposta a Shh e sono richieste sia per il processamento dei fattori trascrizionali Gli nella forma di repressori sia per la conversione delle proteine Gli a lunghezza completa in potenti attivatori trascrizionali (Haycraft et al. 2005; Haungfu and Anderson 2005; Huangfu et al. 2003; Liu et al. 2005). Mutazioni in questi geni, come nel gene che codifica per Kif3a, una subunità della chinesina, motore dell'IFT anterogrado, portano a difetti correlati con Hh nello sviluppo nel tubo neurale e ad una moltitudine di altre anomalie (Huangfu et al. 2003). In contrasto, mutazioni nel complesso proteico IFT A THM1 causano un'attivazione del segnale di Hh, mentre Gli3 viene tagliato nella sua forma di repressore (Tran et al. 2008). Questo suggerisce che l'IFT anterogrado è richiesto per la formazione dei Gli<sup>A</sup>, passaggio inibito dall'IFT retrogrado. Tuttavia è da notare che mutanti nel motore del IFT retrogrado Dync2h1 somigliano ai mutanti per il complesso IFT B poiché non mostrano attivazione



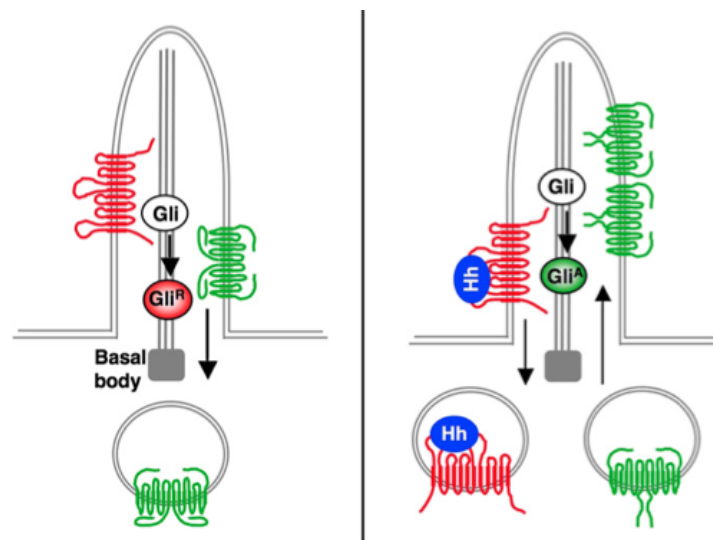
**Figura 6** - Regolazione delle proteine Gli. La conversione della proteina Gli a lunghezza completa (GliFL) a potente attivatore trascrizionale, richiede le proteine del complesso IFT B, i motori di entrambi i tipi di trasporti, ma è regolata negativamente dal complesso IFT A come THM1. Il taglio proteolitico per generare la forma Gli<sup>R</sup> necessita del complesso IFT B ed i motori di entrambi i trasporti.



Ift122 mostrano dei complessi fenotipi neurali e degli arti che suggerisce un danneggiamento del segnale di Hh dovuto a difetti sia nei Gli<sup>A</sup> sia nei Gli<sup>R</sup> (Cortellino et al. 2009). È possibile che le differenze osservate nello stato di attivazione di Hh siano collegate in parte alla delezione totale (Dynch2h1, Ift122) o parziale (THM1) del trasporto retrogrado nei diversi mutanti.

Di particolare interesse è la mutazione *hennin* (*Hnn*) che rompe il complesso *Arl13b* (Caspary et al. 2007). I membri di questa famiglia di proteine sono noti componenti del macchinario di trasporto. Le cilia mutanti per *Hnn* mostrano difetti strutturali e un certo numero di osservazioni suggeriscono che *Arl13b* sia richiesto per l'assemblaggio e il mantenimento dell'assonema. I mutanti per *Hnn* sono caratterizzati da un normale processamento ed attività della forma repressoria della proteina Gli3. In contrasto, sono presenti bassi livelli di Gli<sup>A</sup>. È quindi probabile che il fenotipo di *Hnn* sia dovuto principalmente agli effetti sui Gli<sup>A</sup>. Questi studi suggeriscono che la formazione dei Gli<sup>R</sup> e dei Gli<sup>A</sup> sono regolate in maniera indipendente e che i mutanti per *Arl13b* possono regolare i Gli<sup>R</sup> ma non i Gli<sup>A</sup>. Questi risultati supportano l'idea che il cilium primario agisca come un organello dinamico per regolare i passaggi fondamentali nella via di Hh (Figura 6).

Il coinvolgimento delle cilia nel segnale di Shh è stato ulteriormente supportato dalle scoperte che i maggiori componenti di questa via di trasduzione del segnale, inclusi Ptc, Smo, SuFu e le proteine Gli a lunghezza completa, localizzano nel cilium primario (Corbit et al. 2005; Haycraft et al. 2005; Rohatgi et al. 2007). Inoltre, lo stesso Shh è stato visto localizzare adiacente al corpo basale nei progenitori neurali durante lo stimolo attivo di Hh (Chamberlain et al. 2008). È stato proposto un modello in cui il cilium primario agisca come un sensore di Shh extracellulare e che la localizzazione di Ptc nel cilium inibisca il segnale tramite l'esclusione di Smo dalla membrana del cilium stesso (Rohatgi et al. 2007). In accordo con questo modello, l'attivazione della trasduzione del segnale, a seguito del legame del ligando, è ottenuta tramite la simultanea rimozione di Ptc e la localizzazione di Smo sulla membrana del cilium (Figura 7). In aggiunta, è stato osservato che la  $\beta$ -arrestina2, richiesta per l'endocitosi di Smo, media l'interazione di Smo con Kif3a e quindi la localizzazione di Smo nelle cilia primarie (Kovacs et al. 2008). La stessa  $\beta$ -arrestina2 localizza nel cilium primario nelle cellule quiescenti ed è probabilmente coinvolta nella ciliogenesi (Molla-



**Figura 7** - Regolazione del traffico di Smo e della sua conformazione nei mammiferi. In assenza di Hh Ptc risiede nel cilium primario e previene l'accumulo sulla membrana del cilium di Smo. Il legame di Hh a Ptc promuove l'uscita di Ptc dal cilium permettendo, quindi, l'accumulo di Smo sulla membrana del cilium. Hh induce, inoltre, il cambio conformazionale nelle code citoplasmatiche di Smo.

### 2.1.6. La trasduzione del segnale all'interno della cellula

I sistemi di trasduzione del segnale all'interno della cellula sono divergenti in *Drosophila* e nei mammiferi ma entrambi culminano nell'attivazione dei fattori trascrizionali Ci/Gli latenti. L'attività di Ci/Gli è regolata da molteplici meccanismi inclusi fosforilazione, proteolisi, localizzazione cellulare, acetilazione ed interazione proteiche. PKA, GSK3 e CKI fosforilano molteplici siti nella regione carbossi-terminale di Ci/Gli e causano il reclutamento di Slimb/ $\beta$ -TRCP, una subunità dell'E3 ubiquitina-ligasi SCF (Jiang 2006; Smelkinston et al. 2007). L'ubiquitinazione da parte di SCF indirizza Ci/Gli verso la via di degradazione mediata dal proteasoma. Attraverso questa via viene rimosso metà del dominio C-ter ed ha come risultato una forma troncata della proteina che possiede ancora il dominio "zinc-finger" di legame al DNA e la regione N-ter che recluta corepressori. Come il proteasoma degradi selettivamente solo una metà del C-ter non è ancora completamente chiarito ma sembra svolgere un ruolo chiave in questo processo il dominio PDD (processing determinant domain) situato tra il sito di legame a Slimb/ $\beta$ -TRCP e lo "zinc-finger" di legame al DNA (Pan and Wang 2007a; Wang and Price 2008). Delezioni di questo dominio da Ci causano la sua completa degradazione. Il dominio PDD in Gli3 agisce più efficientemente rispetto a Gli2 nel promuovere la degradazione parziale.

In *Drosophila*, il processamento di Ci dipende dalla Kinesin-like protein Costal2 (Cos2) che agisce come ponte per avvicinare Ci e le sue chinasi, portando, quindi, ad una fosforilazione efficiente (Zhang et al. 2005). Utilizzando acquisizioni di immagini in cellule vive, uno studio ha rivelato che Cos2 può muoversi lungo i microtubuli (Farzan et al. 2008). Una mutazione puntiforme nel sito di legame per l'ATP nel dominio motorio di Cos2 abolisce la sua motilità così come la sua abilità di promuovere il processamento di Ci. In contrasto l'overespressione o l'eliminazione dell'espressione dell'omologo nei mammiferi di Cos2, inclusi Kif7 e Kif27, nelle cellule in coltura non perturba l'attività del segnale di Hh. È stato suggerito che il ruolo di ponte di Cos2 in *Drosophila* potrebbe corrispondere a quello del cilium primario nei mammiferi, dato che la produzione di Gli<sup>R</sup> viene compromessa in topo con difetti della formazione e/o nella funzione del cilium primario. Poiché le zone dei centromeri, che danno origine al cilium primario, sono ricche di proteasomi, le proteine Gli potrebbero essere fosforilate nel cilium e poi indirizzate verso i proteasomi associati ai centromeri per la proteolisi.

Le proteine Ci/Gli vengono regolate anche attraverso un meccanismo di controllo della loro localizzazione cellulare e quindi anche della loro attività di fattori trascrizionali. In *Drosophila* Ci forma un complesso con Cos2 e la chinasi Ser/Thr Fused (Fu) che impedisce a Ci la traslocazione nucleare (Wang and Jiang 2004). L'attività di Ci a lunghezza completa è bloccata dal legame stechiometrico con SuFu che sembra essere il meccanismo predominante di restrizione dell'attività di Ci quando la proteolisi di Ci è bloccata (Smelkinston et al. 2007). Una differenza fondamentale tra *Drosophila* e mammiferi nella trasduzione del segnale di Hh, risiede nel ruolo di SuFu. In *Drosophila* la perdita di SuFu non evoca il segnale di Hh, probabilmente a causa della presenza di molteplici meccanismi inibitori. Nei mammiferi, tuttavia, la perdita di SuFu porta all'attivazione della via di Hh in maniera simile alla perdita di Ptc1 (Svard et al. 2006; Varjosalo et al. 2006), indicando SuFu come maggior inibitore dell'attività di Gli. SuFu potrebbe aver assunto un ruolo inibitorio più importante nei mammiferi a causa dell'esistenza di più forme di Gli<sup>A</sup>. La proteina SuFu può impedire la localizzazione nucleare e sopprimere l'attività dei fattori trascrizionali Gli attraverso il reclutamento di complessi co-repressori (Cheng and Bishop 2002). SuFu potrebbe aver adottato nuove funzioni durante l'evoluzione, infatti, è stato riscontrato nel cilium primario dove avviene il processamento dei fattori trascrizionali Gli.

Recentemente è stato individuato un nuovo meccanismo di regolazione dell'inibizione dei fattori trascrizionali Gli1 e Gli2 nei mammiferi. L'acetilazione di Gli1 sul residuo K518 rappresenta, infatti, un segnale inibitorio, così come l'acetilazione di Gli2. La deacetilazione mediata da HDAC1 è responsabile dell'attivazione della via del segnale di Hh e rappresenta un feedback positivo in quanto upregolata dalla stessa via di Hh. Inoltre, un differente meccanismo di acetilazione sembra avvenire in Gli3 la cui attività di repressore trascrizionale è stata attribuita all'interazione mediata da Ski della sua regione N-ter con HDAC portando, probabilmente, alla deacetilazione istonica. È stata, inoltre, identificata una nuova funzione di REN come inibitore della via di Hh. Infatti, questa proteina è un adattatore del complesso E3 ubiquitina-ligasi Cul3 che porta alla degradazione di HDAC1 e, di conseguenza, all'acetilazione di Gli1 e all'inibizione della sua attività trascrizionale (Canettieri et al. 2010).

In condizioni fisiologiche il segnale di Hh mantiene i progenitori dei granuli cerebellari (GCPs) proliferanti ed indifferenziati, mentre la sua terminazione causa nei GCPs l'uscita dal ciclo cellulare e il conseguente differenziamento. Il fattore trascrizionale Gli1 viene indirizzato dalla proteina Numb verso una degradazione proteasoma dipendente. Infatti, Numb recluta l'E3 ubiquitina-ligasi Itch che indirizza Gli1 verso la via del proteasoma. Numb risulta, quindi, un inibitore della via del segnale di Hh e, nei GCPs, induce arresto del ciclo cellulare e differenziamento neurale (Di Marcotullio et al. 2006).

## **2.2. La via di trasduzione di Hedgehog ed il cervello**

### *2.2.1. Sintesi e trasporto di Sonic Hedgehog nel cervello*

L'analisi della distribuzione della proteina di Shh ha rivelato che l'espressione della forma attiva della proteina ShhN, di 22kDa, è molto alta dopo la nascita, si riduce significativamente durante la prima settimana postnatale e torna a livelli alti nella vita adulta. Questi risultati hanno suggerito che oltre al suo importante ruolo nello sviluppo del cervello, Shh abbia anche altre funzioni nel sistema nervoso centrale adulto.

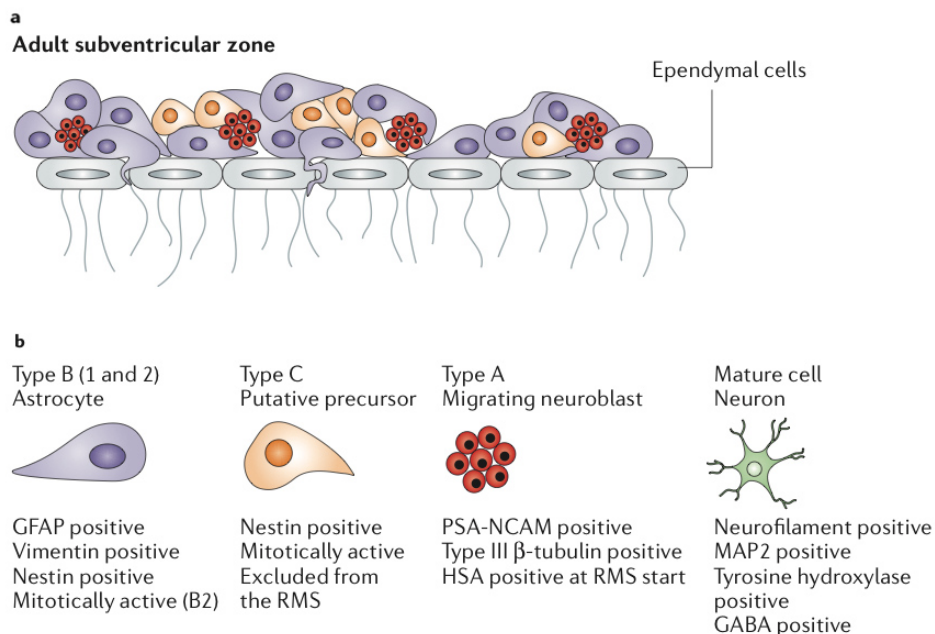
Nel cervello adulto ShhN è stato riscontrato arricchito nella frazione legata alla membrana rispetto alla bassa e scarsamente identificabile frazione solubile. La proteina Shh non tagliata, che corrisponde ad un peptide di 47kDa, non è stata osservata a suggerire che nel cervello il precursore proteico ha una vita breve ed è rapidamente processato. Nel cervello postnatale la visualizzazione immunoistochimica di ShhN è stata prima riportata nel cervello di pollo, in particolare nelle cellule di Purkinje, in accordo con il rilevamento dell'mRNA di Shh (Dahmane and Ruiz-i-Altaba 1999). Nel cervello dei roditori questa visualizzazione è rimasta a lungo senza successo a causa della natura di ShhN e la sua conformazione, fino a quando non fu visibile una colorazione nel soma delle cellule del Purkinje al giorno P5, nello strato molecolare in via di sviluppo e la zona esterna dello strato di granuli interno (Gritli-Linde et al. 2001). Al giorno P15 la presenza di Shh è stata rilevata soprattutto nel telencefalo ventrale, in particolare nell'accumbens ventrale, nella corteccia entorinale, nel setto ventrale lungo la via di migrazione rostrale (RMS), all'interno del III strato della corteccia cerebrale e lungo il corpo calloso (Machold et al. 2003). Una popolazione di assoni positivi a Shh è stata osservata nel setto mediano. Questa localizzazione è concorde con i dati che descrivono le fibre setto-ippocampali come sorgente di ShhN nell'ippocampo e l'individuazione di ShhN nella regione ippocampale CA3 e l'ilus. È in accordo anche con osservazioni che hanno rivelato il trasporto assonale di ShhN nelle cellule gangliari retiniche che si proiettano verso i collicoli superiori. Il trasporto di Hh e la sua secrezione lungo gli assoni fotorecettori era stato già

osservato in *Drosophila* (Huang and Kunes 1996).

Come precedentemente osservato in *Drosophila*, ShhN è associato con il colesterolo e arricchito in sfingolipidi ancorati alla membrana cellulare nel tessuto cerebrale di roditori adulti. La secrezione di ShhN coinvolge la proteina a 12 domini transmembrana Dispatched, facente parte della famiglia di pompe batteriche guidate da gradiente protonico. Le interazioni con i proteoglicani eparan-solfati (HSPGs) sembrano essere ugualmente coinvolte, infatti, ShhN possiede all’N-ter una sequenza Cardin-Weintraub, responsabile del legame con i HSPGs. Mutazioni in questo dominio causano una diminuzione dell’attività proliferativa indotta da ShhN sui precursori dei granuli. L’enzima secreto Solfatasi1 che modula lo stato dei HSPGs, induce l’accumulo di Shh nelle vicinanze dei progenitori delle cellule neurali. Una deficienza nei HSGPs, chiamata perlecan, porta a microcefalia nei topi perché vi è una diminuzione della proliferazione dei gangli dell’eminenza mediana, correlata con un’insufficiente attivazione del segnale di Shh.

### 2.2.2. La zona sub-ventricolare

La zona sub-ventricolare (Sub ventricular zone, SVZ), localizzata tra il ventricolo laterale e il parenchima dello striato, è una delle maggiori regioni neurogene in cui si generano nuovi neuroni durante tutta la vita. Nonostante le molteplici controversie sulla loro identità e natura, un sottogruppo delle cellule della SVZ che esprime il marker *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) è stato identificato come probabili cellule staminali neurali adulte (Doetsch et al. 1999). Questa popolazione di cellule è in grado di ricostruire l’intera struttura neurogenetica quando tutte le altre cellule mitoticamente attive sono state ablate. Tale sottopopolazione di cellule staminali neurali adulte simili ad astrociti è chiamata cellule di tipo B, sono relativamente quiescenti e rappresentano un piccolo gruppo rispetto a tutta la popolazione astrocitaria della zona sub-ventricolare. Si



**Figura 8** - Organizzazione della zona sub-ventricolare. a) La struttura nella zona sub-ventricolare, mostra l’organizzazione e la disposizione delle cellule staminali e dei precursori. GABA: acido  $\gamma$ -aminobutirrico; GFAP: glial fibrillary acid protein; HSA: Heat-stable antigen; MAP2: microtubule-associated protein 1; NCAM1: neural cell adhesion molecule 1; PSA: polysialic acid; RMS: Rostral migratory stream. b) Il compartimento delle cellule staminali.

generano delle cellule progenitrici che si dividono transientemente, chiamate cellule di tipo C. I progenitori mantengono la caratteristica di pluripotenza e danno origine a progenitori più maturi che sono ristretti nel differenziamento verso i neuroni e sono chiamati cellule di tipo A (*Figura 8*).

Le cellule di tipo A possono migrare in piccoli gruppi attraverso l'estensione rostrale della zona sub-ventricolare (RMS) verso il bulbo olfattivo, dove vengono integrati come nuovi interneuroni nello strato corticale. È interessante notare che la zona sub-ventricolare sembra essere presente anche nel cervello umano adulto (Sanai et al. 2004; Quiñones-Hinojosa et al. 2006). Tuttavia, nell'uomo, le cellule appena generate non migrano in gruppi verso il bulbo olfattivo, invece, lasciano la regione periventricolare come singole cellule la cui destinazione è ancora ignota.

Nella SVZ di roditore pochi giorni postnatale è riscontrabile la maggior parte dei componenti della via del segnale di Shh. Questi profili di espressione sono abbastanza conservati nell'età adulta. È stato dimostrato che Shh, Ptc e Gli3 sono espressi nella SVZ, nella RMS e nel bulbo olfattivo, mentre Gli1 è presente solamente nella SVZ e RMS (Papanikolaou et al. 2008). ShhN è stato riscontrato non solo nella SVZ ma anche nel liquido cerebrospinale (CSF). È stato ipotizzato, ma non ancora dimostrato, che ShhN venga prodotto dalle cellule della parete del terzo ventricolo, che mostrano un'alta espressione di Shh, e trasportato attraverso il CSF e potenzialmente raccolto nella SVZ.

Nelle cellule B si è riscontrata l'espressione di Gli1. Attraverso un topo transgenico Gli1-nLacZ è stato possibile dimostrare che solamente le cellule staminali e la loro immediata progenie esprimevano Gli1, infatti il marker era presente esclusivamente nella SVZ e non nella RMS (Ahn and Joyner 2005). Tuttavia i neuroblasti migranti sono cellule responsive al segnale di Hh, dato che esprimono Ptc.

### *2.2.3. Il controllo dei precursori nella zona sub-ventricolare*

L'iniezione di un ShhN ricombinante all'interno del cervello di topo e di ratto è seguita dalla trascrizione di Ptc nella SVZ. Questa è stata la prima osservazione a sostegno dell'ipotesi che questa via del segnale fosse attiva all'interno del sistema nervoso centrale adulto (CNS) (Charytoniuk et al. 2002). L'attivazione farmacologica della via di Hh tramite la somministrazione di agonisti di Smo in topi adulti incrementa il numero delle cellule proliferanti nella SVZ ed aumenta l'espressione di Gli1 in queste cellule. L'inibizione farmacologica della via di trasduzione di Hh, mediante iniezioni sistemiche di Ciclopamina, un antagonista di Smo, risulta in una diminuzione dell'espressione di Gli1 e Gli3 e della proliferazione delle cellule della SVZ. In presenza dell'Epidermal Growth Factor (EGF), Shh è stato caratterizzato come fattore mitogenico per le cellule adulte della SVZ che sono in grado di formare neurosfere (Palma et al. 2005).

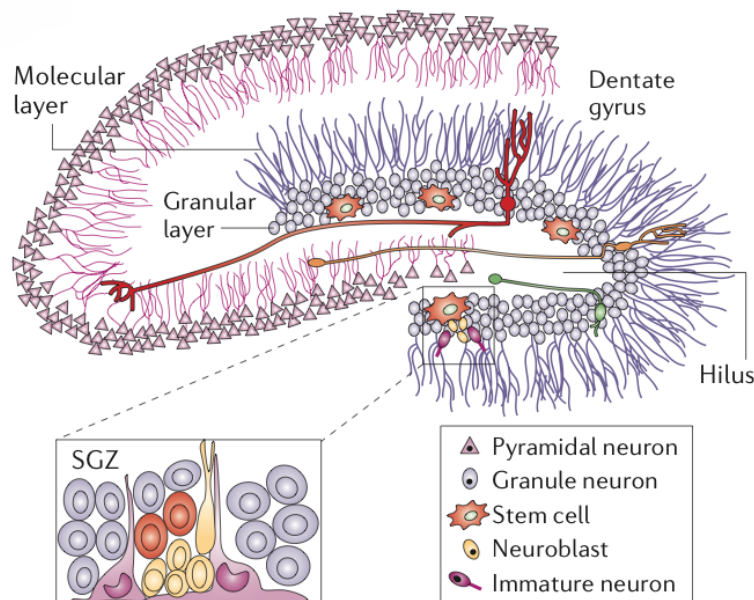
Un importante esperimento è stato effettuato mediante l'utilizzo di topi in cui la rimozione della via del segnale di Shh avviene tramite il gene della ricombinasi Cre è sotto il controllo del promotore della nestina, un marker ubiquitario neurale che si attiva al giorno embrionale E12,5 e le sequenze Lox, invece, includono il gene di Smo. In questi animali, quindi, la ricombinazione mediata da Cre risulta in una perdita di Smo a partire dal giorno E12,5. Il segnale di Shh è principalmente richiesto nel telecefalo per l'oligodendrogenesi e il mantenimento della popolazione di progenitori neurali adulti (Machold et al. 2003). Nonostante alla nascita la SVZ risulti normale, questa regione è largamente danneggiata a partire dal giorno P8 con un incremento della morte cellulare. Sia le cellule staminali che le cellule che si amplificano transientemente si perdono nella vita postnatale. In contrasto, i neuroblasti migranti si espandono drammaticamente, la maggior parte fallisce la migrazione nel bulbo ottico e sono, infine, persi dal giorno P30, probabilmente a causa della riduzione del ligando Slit1 nelle cellule migranti. Presi insieme questi dati portano alla conclusione che la via di trasduzione di Hh è necessaria per il mantenimento delle cellule di tipo B

e C e, indirettamente, per la migrazione dei neuroni che sono generati dalla nicchia delle cellule staminali (Balordi and Fishell 2007).

L'espressione di Ptc nei neuroblasti migranti nel topo adulto dalla SVZ ha portato ad indagare gli altri possibili ruoli del segnale di Shh. Questi studi hanno proposto Shh come fattore di ritenzione per i neuroblasti esistenti nella SVZ. Esperimenti di perdita o acquisto di funzione utilizzando vettori adenovirali per trasferire Shh o il suo antagonista Hhip nella SVZ hanno suggerito che ShhN, individuato nella SVZ e nel CSF, è un fattore chemo-attrattivo per i neuroblasti migranti. Questa ipotesi è stata confermata attraverso trapianti di cellule esprimenti Shh sulla RMS di topi adulti: la chemo-attrazione esercitata da queste cellule induce l'accumulo dei neuroblasti e la deviazione della loro normale via di migrazione. Shh mostra anche un'attività chemo-attrattiva *in vitro* sui progenitori neurali derivati dalla SVZ, effetto bloccato da antagonisti di Smo. Shh, quindi, modula i neuroblasti nella loro uscita dalla SVZ probabilmente trattenendo le cellule all'interno della nicchia e prevenendo la loro progressione attraverso la RMS verso il bulbo ottico (Angot et al. 2008).

#### 2.2.4. Sonic Hedgehog e l'ippocampo

La zona sub-granulare (SGZ) è localizzata tra lo strato dei granuli dell'ippocampo e l'ilio e contiene astrociti strettamente associati con vasi sanguigni a formare dei foci di cellule proliferanti. L'organizzazione gerarchica di questo sistema neurogenico sia nel topo che nell'uomo è simile a quella riscontrata nella SVZ. Gli astrociti della SGZ operano, in maniera simile ai loro equivalenti nella SVZ, come cellule staminali neurali e danno origine a precursori che si amplificano transientemente chiamati cellule di tipo D. Da queste cellule di tipo D si originano i precursori neurali che migrano a breve distanza e vanno ad integrarsi funzionalmente nello strato dei granuli



**Figura 9** - Organizzazione della zona sub-granulare. Una regione neurogenica addizionale è stata riscontrata nella zona sub-granulare che è localizzata nel giro dentato dell'ippocampo. L'organizzazione gerarchica sembra simile a quella riscontrata nella SVZ in cui le cellule staminali di tipo B danno origine a precursori che si amplificano transientemente, cellule di tipo D che, eventualmente, generano i neuroni granulari di tipo G. Questi ultimi si integrano funzionalmente nello strato granulare.

Attraverso l'uso di un vettore virale adeno-associato che rilasciava Shh o attraverso somministrazioni orali di agonisti di Hh è stato possibile notare l'aumento delle cellule proliferanti nella SGZ. Questi dati hanno identificato Shh come regolatore delle cellule staminali neurali adulte nell'ippocampo. È stato proposto un ruolo critico per la via di trasduzione di Shh attraverso il cilium primario nella regolazione dei progenitori ippocampali postnatali. Topi deficienti per Smo nei precursori neurali positivi al marker GFAP mostrano difetti nella neurogenesi nell'ippocampo che si riflette in un giro dentato molto piccolo, una diminuzione marcata della proliferazione e pochi neuroni generati. Questo fenotipo è simile a quello osservato in topi in cui è assente la proteina Kif3a nelle cellule positive per GFAP. Questi topi mostrano difetti nella ciliogenesi, danneggiamento nella via del segnale di Shh nei precursori dei neuroni granulari e l'assenza degli astrociti radiali che svolgono la funzione di cellule staminali nella SGZ. Gli1 è stato riscontrato come unico fattore Gli che viene indotto trascrizionalmente a seguito dell'attivazione della via di Shh nella SGZ ed è richiesto per il self-renewal nelle cellule staminali neurali postnatali (Galvin et al. 2008). In quest'area l'espressione di Gli1 è associata con l'up-regolazione dei geni pro-apoptodici e i geni che governano la transizione G2-M che possono essere correlati con l'abilità unica delle cellule staminali di mantenere una stretta regolazione sulla progressione del ciclo cellulare. Lo sviluppo dell'ippocampo nell'embrione e nel mantenimento delle cellule staminali neurali richiede la regolazione di Shh dipendente da Sox2 (Favaro et al. 2009).

#### *2.2.5. Lo sviluppo del cervelletto*

Durante i primi stadi della formazione del tubo neurale, Shh è secreto dalle cellule della linea mediana della notocorda e della lamina ventrale e dirige lo sviluppo di specifici tipi cellulari in una maniera dose-dipendente (Krauss et al. 1993; Echelard et al. 1993; Roelink et al. 1994; Ericson et al. 1996). Ad esempio, Shh induce il differenziamento in neuroni dopaminergici e serotonergici nel mesencefalo centrale e nel romboencefalo (Ye et al. 1998), in motoneuroni e oligodendrociti nella corda spinale (Soula et al. 2001). Topi e uomini in cui è assente la via del segnale di Shh sviluppano oloprosencefalia e ciclopia a causa della carenza nella suddivisione ventrale e al fallimento della separazione dei due lobi del prosencefalo (Roessler et al. 1996; Belloni et al. 1996; Chiang et al. 1996).

Dopo un periodo iniziale in cui Shh è indispensabile per il differenziamento ventrale, negli stadi embrionali tardivi e nei primi stadi postnatali, Shh è principalmente espresso nel cervello dorsale, incluso il cervelletto (Dahmane and Ruiz i Altaba 1999; Wallace 1999; Wechsler-Reya and Scott 1999), neocorteccia, tectum (Dahmane et al. 2001) e ippocampo (Dahmane et al. 2001; Lai et al. 2003; Machold et al. 2003), ed in altre aree tra cui amigdala e setto.

Il cervelletto si sviluppa dalla regione dorsale del mesencefalo ed anteriore del romboencefalo e svolge numerose funzioni tra cui il controllo motorio e dell'equilibrio (Altman and Bayer 1997). Queste funzioni sono finemente regolate dai neuroni granulari (cellule dei granuli, GCs), la specie neuronale più rappresentativa all'interno del cervello.

Lo sviluppo del cervelletto si protrae per un periodo piuttosto ampio che, nell'uomo, spazia dalla quarta settimana di età gestazionale, al ventesimo mese dopo la nascita. Nel primo stadio la zona cerebellare si definisce mediante un ispessimento della lamina alare a livello della giunzione tra cervello medio ed il primo rombomero. Questa zona, definita organizzatore istmico, esprime una serie di geni i cui prodotti sono critici per regolare lo sviluppo del futuro tronco encefalico e del cervelletto.

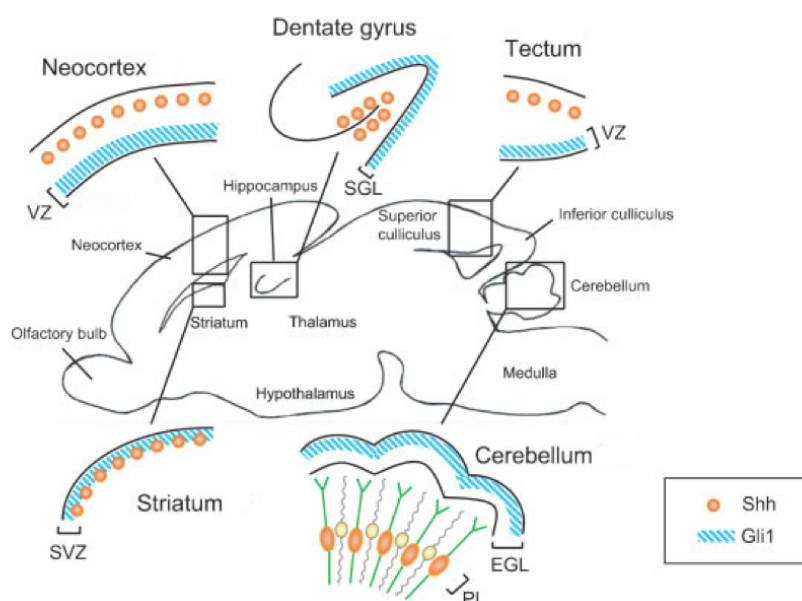
In un primo momento le cellule neuroepiteliali, nate in prossimità del quarto ventricolo, migrano in due direzioni. La migrazione dorsale, che avviene tra l'ottava e la tredicesima settimana

del periodo gestazionale, porta alla formazione dei nuclei cerebellari profondi e dello strato delle cellule del Purkinje. Successivamente si genera una seconda ondata di migrazione cellulare che procede verso la superficie del cervelletto in via di sviluppo e va a costituire lo strato dei granuli esterno (EGL). In un periodo ancora più tardivo queste cellule vanno incontro ad un'intensa proliferazione ed una successiva migrazione verso l'interno delle strutture cerebellari. Quest'ultima migrazione avviene lungo le fibre gliali radiali e garantisce la formazione dello strato dei granuli interno (IGL). Durante lo sviluppo, che avviene nella vita postnatale, lo strato dei granuli esterno scompare gradualmente e si costituisce la corteccia cerebellare che riveste perifericamente tutta la superficie del cervelletto.

### 2.2.6. Sonic Hedgehog e lo sviluppo cerebellare

I meccanismi che regolano lo sviluppo del cervelletto sono stati largamente studiati. Tra tutti i fattori che partecipano alla crescita cerebellare, molte ricerche hanno sottolineato il ruolo di Sonic Hedgehog nel controllare la proliferazione dei granuli cerebellari durante gli stadi tardivi dell'embriogenesi e dopo la nascita (Dahmane and Ruiz i Altaba 1999; Wallace 1999; Wechsler-Reya and Scott 1999).

La via del segnale di Sonic Hedgehog controlla lo sviluppo del cervelletto attraverso molteplici vie. In primo luogo viene prodotto dalle cellule del Purkinje e regola la proliferazione dei granuli cerebellari. Trattamenti con Shh ricombinante di GCPs di pollo o di topo inducono proliferazione e mantengono uno stato indifferenziato, mentre l'inibizione *in vitro* con un anticorpo bloccante Shh causa una diminuzione della proliferazione. *In vivo* l'inibizione della via del segnale di Shh causa una marcata diminuzione del tasso proliferativo nella EGL. In secondo luogo, la via del segnale di Shh controlla lo sviluppo del cervelletto inducendo il differenziamento della glia di Bergmann. Inoltre, l'inibizione del segnale di Shh *in vivo* porta allo sviluppo di un cervelletto ipoplastico con un'anormale foliazione (Corrales et al. 2006). Risultati consistenti sono stati rilevati con l'ablazione di Shh nel cervelletto che hanno dimostrato la diminuzione della proliferazione nei



**Figura 10** - Rappresentazione schematica dell'espressione di Shh e Gli1. PL = Strato delle cellule del Purkinje. Le cellule del Purkinje secernono Shh che influenza lo strato germinale esterno.



foliazione del cervelletto (Lewis et al. 2004).

I tre fattori trascrizionali Gli sono espressi nel cervelletto in sviluppo. Gli1, Gli2 e Gli3 sono stati riscontrati nello strato delle cellule del Purkinje e nell'EGL, anche se i livelli di Gli3 sono bassi. Questo suggerisce un'azione a distanza di Shh rispetto alla sua sorgente: le cellule che secernono questa glicoproteina sono localizzate nello strato gangliare. Shh regola la proliferazione delle cellule nella zona germinativa, EGL che esprime Gli1 (*Figura 10*).

### 2.2.7. *Sonic Hedgehog e le cellule staminali neuronali*

È stato dimostrato che in aggiunta ai GCPs, noti target di Hedgehog (Dahmane and Ruiz i Altaba 1999; Wallace 1999; Wechsler-Reya and Scott 1999), anche le cellule staminali neuronali sono oggetto dell'attività di Hedgehog (Po et al. 2010). In questo nuovo contesto l'attività di Hedgehog ha come risultato un incremento dell'espressione dei geni marcatori di staminalità, Nanog incluso. Tale dato è supportato da altre due evidenze: la maggior presenza di Gli1 nelle cellule positive per la Prominina1 in tessuti cerebellari di topo (Stecca and Ruiz i Altaba 2009) e l'espansione delle NSCs cerebellari osservata in modelli murini in cui la via del segnale di Hedgehog è stata attivata artificialmente (esempio: topi transgenici nestin-Gli1 o animali con delezioni di Ptc1 o attivazioni di Smo nelle NSCs esprimenti GFAP) (Schuller et al. 2008; Yang et al. 2008; Stecca and Ruiz i Altaba 2009). Questi risultati evidenziano il duplice ruolo della via del segnale di Hedgehog: mantenere le proprietà staminali delle NSCs cerebellari e sostenere la proliferazione della linea dei GCPs. Il dualismo di funzioni di Hh potrebbe essere spiegato dalla diversa cooperazione con i segnali dipendenti dal microambiente coinvolti nel controllo dell'espressione di specifici geni nelle NSCs e nei GCPs.

### 2.2.8. *Hedgehog e Nanog nelle cellule staminali neuronali*

Nanog è stato precedentemente identificato come uno dei determinanti intrinseci dell'attività di Hh nelle cellule staminali neuronali, mentre nei GCPs Shh non è in grado di aumentare l'espressione di questo fattore trascrizionale. Nonostante sia noto che Nanog è un fattore critico per mantenere la pluripotenza e l'autorinnovamento nelle cellule staminali embrionali (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003), è stato descritto attivo anche nelle NSCs cerebellari postnatali dove agisce da fattore di staminalità (Po et al. 2010). È stato proposto un modello in cui Nanog ha il ruolo di mediatore critico degli effetti di Hedgehog sulle cellule staminali neuronali. Nanog e l'attività di Hh sono coespressi specificatamente nelle cellule staminali neuronali cerebellari postnatali e sono essenziali per guidare l'autorinnovamento. È stato, inoltre, dimostrato che Nanog è a valle della via di trasduzione del segnale di Hedgehog dato che è necessario per l'autorinnovamento mediato da Hh. Quest'attività promuovente le caratteristiche staminali è sostenuta dall'attivazione trascrizionale di Nanog grazie al legame *in vivo* di Gli1 e Gli2 a specifici elementi cis-regolatori situati sul promotore di Nanog. Questo evento è conservato nelle cellule sia murine che umane. Queste osservazioni provvedono a sostenere il ruolo di Hh/Gli nell'attivare geni di pluripotenza critici nelle cellule staminali neuronali cerebellari postnatali.

### 2.2.9. *La via del segnale di Hedgehog ed i tumori: il caso del medulloblastoma*

Il medulloblastoma è classificato come tumore neuroectodermico primitivo del cervelletto, è il tumore maligno al cervello più comune nei bambini (Polkinghorn and Tarbell 2007; Marino 2005).

Gli attuali regimi di trattamento sono chirurgia, irradiazione cranio-spinale e chemioterapia che hanno come risultato un tasso di sopravvivenza di circa il 60% a cinque anni. I trattamenti, comunque, causano spesso degli effetti collaterali permanenti nei sopravvissuti, come deficienza cognitiva, disfunzioni endocrine e disordini psichiatrici.

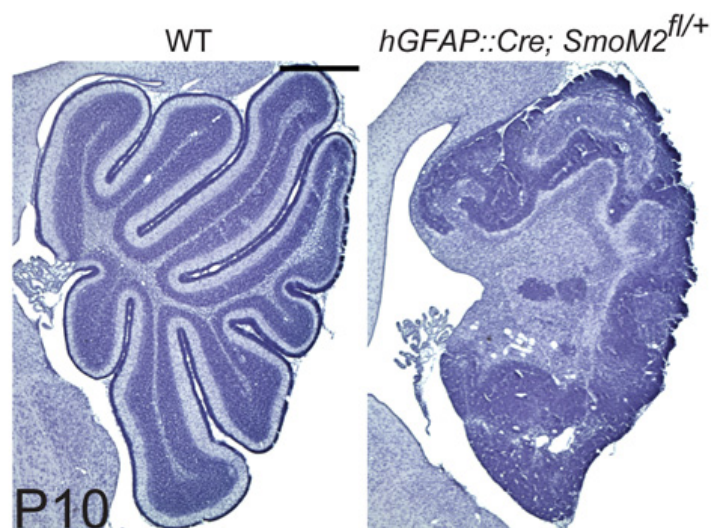
Un collegamento tra la via del segnale di Hedgehog e l'eziologia del medulloblastoma, in particolare del sottotipo desmoplastico, è stata inizialmente stabilita nei pazienti con sindrome di Gorlin (Schofield et al. 1995). Il 3-5% di questi pazienti sviluppano medulloblastoma, che costituisce 1-2% di tutti i casi di tale tumore (Evans et al. 1991). Le mutazioni con perdita di funzione di Ptc1 sono state riscontrate anche nel 10-20% dei casi di medulloblastoma sporadico (Pietsch et al. 1997; Raffel et al. 1997; Xie et al. 1997; Wolter et al. 1997). Meno frequenti sono le mutazioni di Smo e SuFu (Pastorino et al. 2009; Reifenberger et al. 1998; Taylor et al. 2002; Koch et al. 2004; Zurawel et al. 2000; Scott et al. 2006). L'analisi di espressione dei geni target della via di Hedgehog nei medulloblastoma ha rivelato che una grande frazione di questi tumori, maggiore di quella con mutazioni rilevabili nei componenti della via, mostra una via di trasduzione di Hh attiva, indicando altri metodi per attivare questo segnale (Thompson et al. 2006).

Durante il normale sviluppo del cervelletto i progenitori/precursori dei granuli (GCPs), che originano dal labbro rombico vicino alla zona ventricolare, proliferano intensamente nello strato granulare/germinativo esterno (EGL) sulla superficie cerebellare (Wechsler-Reya and Scott 2001). I GCPs rispondono a Shh secreto dalle cellule del Purkinje, quindi con un'attivazione di tipo paracrino. Shh è per i GCPs un segnale mitogenico e in concomitanza con la proliferazione, queste cellule migrano dall'EGL attraverso lo strato delle cellule del Purkinje per formare lo strato dei granuli interno (IGL) (Wechsler-Reya and Scott 1999; Dahmane and Ruiz i Altaba 1999; Wallace 1999). Lungo la loro strada verso l'IGL, i GCPs diventano non responsivi ai segnali mitogenici, escono dal ciclo cellulare e differenziano in cellule dei granuli mature. Si pensa che quando la via del segnale di Hedgehog sia costitutivamente accesa, a causa di mutazioni oncogeniche, continui anche la proliferazione dei GCPs che porta alla formazione del medulloblastoma.

Modelli sperimentali murini hanno facilitato la comprensione della patogenesi molecolare dello sviluppo del medulloblastoma indotto da Hedgehog. L'inattivazione del gene Ptc1 è ottenuta tramite la delezione di parte dell'esone 1 e tutto l'esone 2. È stata riscontrata letale nei topi Ptc1  $-/-$  al giorno embrionale E9 e E10.5, tali embrioni mostravano un fallimento nella chiusura del tubo neurale, una crescita spropositata del tubo neurale nelle pieghe della testa e del mesencefalo e malformazioni cardiache. Il modello murino, geneticamente equivalente a pazienti con sindrome di Gorlin, è, quindi, il topo Ptc1  $+/-$  il quale sviluppa medulloblastoma con un'incidenza annua del 15-43% in base al background genetico (Goodrich et al. 1997; Svärd et al. 2009; Wetmore et al. 2000; Ayrault et al. 2009). Sottoponendo i topi Ptc1  $+/-$  a radiazioni ionizzanti durante la prima settimana postnatale aumenta l'incidenza di medulloblastoma fino all'80% (Pazzaglia et al. 2002; Pazzaglia et al. 2006). L'irradiazione dopo questo periodo non ha alcun effetto sull'incidenza del tumore cerebellare, rivelando una finestra temporale critica per la sensibilità al danno indotto dalle radiazioni che correla con il periodo di rapida espansione dei GCPs e la loro migrazione nell'IGL. Questa migrazione cellulare normalmente termina entro le tre settimane di età nei topi wild type, ma nel 70-80% dei topi Ptc1  $+/-$  di età dalle tre alle otto settimane sono riscontrabili ancora delle cellule proliferanti sulla superficie del cervelletto (Oliver et al. 2005; Kim et al. 2003). Queste cellule pro-neoplastiche somigliano morfologicamente ai GCPs ma hanno perso l'espressione dell'allele Ptc1 rimanente (Berman et al. 2002) e sono le cellule responsabili dello sviluppo del medulloblastoma (Kessler et al. 2009).

Il ruolo principale dell'attività di Hedgehog è come morfogeno nello sviluppo del tubo neurale, nei GCPs, invece, il ruolo fondamentale è come mitogeno e/o fattore di sopravvivenza.

Il quesito riguardante le cellule che originano il medulloblastoma è stato a lungo dibattuto (Eberhart 2007; Read et al. 2006). Due studi recenti hanno provveduto a fornire una risposta a questa domanda (Yang et al. 2008; Schüller et al. 2008). L'attivazione condizionale della via di Hedgehog attraverso una delezione omozigote tessuto-specifica di *Ptc1* oppure l'attivazione dell'oncogene *SmoM2* durante lo sviluppo embrionale mediata dal transgene *Math1-Cre*, hanno il risultato comune di sviluppare medulloblastoma in tutti i topi (Figura 11). Il transgene *Math1-Cre* è espresso nei GCPs derivati dal labbro rombico a partire dal giorno embrionale (E) 14,5 ma anche precedentemente in altre cellule derivate dal labbro rombico al giorno E10,5 destinate a lasciare il cervelletto e a diventare neuroni e nuclei profondi. Utilizzando un transgene inducibile *Math1-Cre*, *Cre* media la delezione di *Ptc1* prima al giorno E10,5 senza produrre alcun tumore, in seguito anche dal giorno E14,5 fino al giorno P10 in cui causa la formazione di medulloblastoma. Questo risultato evidenzia che solo le cellule *Math1+* *Ptc1-*, indirizzate verso la linea dei GCP possono contribuire allo sviluppo del tumore. È interessante sottolineare che la maggior parte dei GCPs *Math1+* e *Ptc1-* si localizzano nell'EGL e possono ancora differenziare e migrare appropriatamente attraverso lo strato delle cellule del Purkinje per formare l'IGL suggerendo che, probabilmente, siano necessarie



**Figura 11 -** Immunoistochimica di cervelletto normale e di medulloblastoma. Nel pannello a sinistra è fotografato un cervelletto normale a P10, nel pannello a destra un cervelletto P10 con medulloblastoma, causato dall'espressione nei GCPs di *SmoM2*.

ulteriori perdite per ottenere la trasformazione completa.

Nella gerarchia cellulare, prima dell'indirizzamento verso la linea dei GCPs vi sono le cellule staminali neuronali (NSCs), residenti nella zona ventricolare. La delezione di *Ptc1* o l'espressione di *SmoM2* in queste cellule, mediata dal transgene *hGFAP-Cre*, causa medulloblastoma in tutti i topi con una diminuzione del periodo di latenza rispetto ai tumori mediati da *Math1-Cre*. Oltre i GCPs, le cellule staminali neuronali danno origine ad altre cellule neuronali e gliali ma la delezione di *Ptc1* non produce altri tumori se non il medulloblastoma. È quindi probabile che le origini cellulari, oltre ai GCPs, potrebbero essere le NSC che originano dalla zona ventricolare. Tuttavia, se la mutazione oncogenica che porta all'attivazione della via del segnale di Hedgehog avviene nelle NSCs, solo quelle cellule che si differenzieranno verso la linea dei GCPs svilupperanno tumore e quindi sarà presente solo medulloblastoma.

## CAPITOLO III: I MICRORNA

### 3.1. I microRNA

#### 3.1.1. La scoperta e la funzione dei microRNA

I microRNA (miRNA) furono, per un lungo periodo di tempo, poco considerati in quanto si riteneva che la funzione degli RNA fosse esclusivamente quella di dare origine a proteine. Secondo tale principio questi corti filamenti di RNA venivano scartati, a volte addirittura etichettati come prodotti di degradazione di RNA più lunghi. Questa concezione venne scossa nel 1993 dal gruppo di Ambros, il quale scoprì che in *C.Elegans* un gene, *Lin-4*, regolatore della divisione cellulare, inizialmente dava origine ad un RNA di 61 nucleotidi che, in un secondo momento, veniva processato per generare un RNA di 22 nucleotidi. Tale RNA risultò perfettamente complementare ad un tratto della regione 3'UTR del gene *Lin-14*. Oltre a questa peculiarità venne osservato che sia la proteina sia il messaggero di *Lin-14* subivano un abbattimento della concentrazione quando *Lin-4* veniva espresso. Questa importante scoperta non ebbe un adeguato riscontro in quanto non esistono ortologhi di *Lin-4* in altre specie. Quando però nel 2000, sempre in *C.Elegans*, il gruppo di Reinhart scoprì il gene *Let-7* avente funzione analoga a *Lin-4* ed ortologhi sia in *Drosophila* che nell'uomo, venne riportata alla luce l'esistenza di questi piccoli RNA: i microRNA. Questi studi rivelarono che gli RNA giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della sintesi proteica.

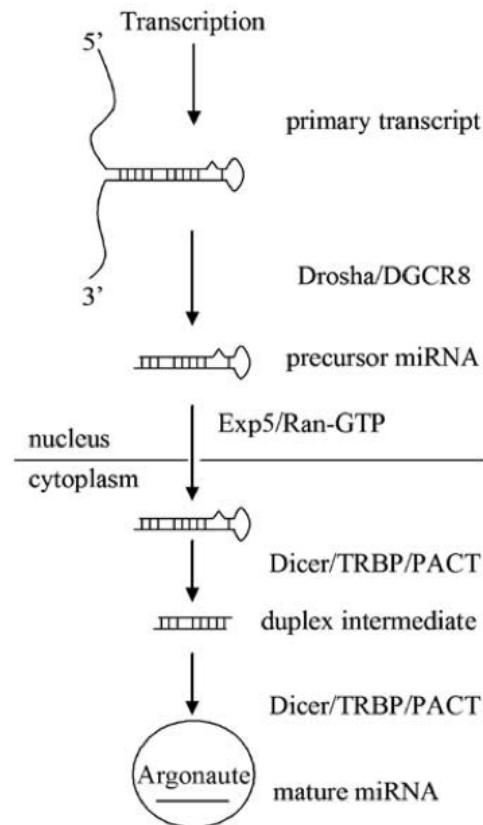
Queste piccole molecole di RNA endogeno lunghe circa 18-25 nucleotidi, sembrano essere coinvolte essenzialmente nella regolazione post-trascrizionale degli mRNA: essi possiedono una sequenza complementare alla regione 3'UTR di uno o più RNA messaggeri. Il legame del microRNA con l'mRNA target ha come primo effetto l'inibizione della traslazione dei ribosomi sul messaggero, impedendone la traduzione in proteina. I microRNA, però, agiscono soprattutto sulla stabilità dell'mRNA: esistono difatti due modi con cui interagiscono con il target. Il primo implica un appaiamento completo in cui la sequenza del microRNA ha un'omologia del 100% con la sequenza target. Questo favorisce la degradazione dell'mRNA con una riduzione sia della proteina sia del messaggero che la codifica. Il secondo meccanismo prevede un appaiamento parziale con il target, determinando così una destabilizzazione dell'mRNA e una modulazione dei livelli di traduzione della proteina.

I microRNA sono dei meccanismi di regolazione conservati a partire dal *C.Elegans* fino all'uomo: ciò permette di dedurre la loro importanza durante la fase dello sviluppo e il ruolo chiave che ricoprono nei sistemi di regolazione dell'individuo adulto.

#### 3.1.2. La produzione e la maturazione dei microRNA

I microRNA sono degli RNA regolatori lunghi approssimativamente 22 nucleotidi e sono espressi in organismi multicellulari. La sequenza dei microRNA è generalmente diversa, anche se un residuo U è più rappresentato al loro 5' terminale (Lau et al, 2001). In base all'omologia di sequenza i microRNA possono essere raggruppati in sotto-famiglie e molte di queste sono conservate evolutivamente. Molti microRNA hanno un'espressione dipendente dallo stadio di sviluppo e dalle caratteristiche cellulari.

Quando Ambros e colleghi hanno riportato la scoperta e l'analisi del primo microRNA, *lin-4*, fornirono anche un primo scorcio del meccanismo di maturazione di questi piccoli RNA. Gli autori dimostrarono, infatti, che esistono due specie di RNA, una di 22 nucleotidi e la seconda, meno abbondante, di 60 nucleotidi. Il gruppo ipotizzò che la specie attiva fosse la specie corta di 22 nucleotidi, mentre la specie più lunga fosse un intermedio post-trascrizionale. Tale intermedio



*Figura 12 - Rappresentazione schematica del processo maturativo dei microRNA. Nel pannello superiore i processi che avvengono nel nucleo, nel pannello inferiore nel citoplasma.*

formava una struttura secondaria a forcina nella quale la specie di 22 nucleotidi era presente su uno dei due bracci (Lee et al, 1993).

La trascrizione è un potenziale checkpoint nell'espressione dei microRNA. È ormai noto che i miRNA vengono trascritti come parte di un trascritto primario più lungo (anche superiore ad 1kb) contenente al 5' il cappuccio di 7-metil guanosina e al 3' la coda di poli(A). Queste modificazioni sono caratteristiche dei trascritti della RNA polimerasi II (Pol II), come i pre-mRNA. Le attuali evidenze indicano che la maggior parte dei miRNA sono prodotti dalla Pol II, anche se la RNA polimerasi III può, a volte, essere coinvolta. Il dato che la maggior parte dei microRNA sia trascritta dalla Pol II spiega parzialmente la diversa espressione dei microRNA all'interno delle cellule, infatti i promotori della Pol II sono altamente regolati e possono variare ampiamente riguardo l'abbondanza di trascrizione.

Un'analisi genomica ha rivelato che oltre il 50% dei microRNA nei mammiferi è localizzato all'interno delle regioni introniche sia annotate come geni codificanti proteine, sia non codificanti. Tali microRNA possono, quindi, utilizzare il trascritto del loro gene ospite come vettore, anche se è possibile che alcuni di essi siano trascritti separatamente grazie alla presenza di promotori interni. Altri microRNA sono localizzati all'interno di regioni esoniche ed hanno il loro promotore indipendente tramite cui vengono trascritti (Rodriguez et al, 2004).

Dal trascritto primario, potenzialmente lungo anche più di 1kb, l'RNA deve sottostare a vari passaggi di processamento (Figura 12). Il primo passo è la generazione, all'interno del nucleo, di una forcina di RNA lunga approssimativamente 60 nucleotidi, chiamato precursore del miRNA (pre-miRNA). Tale precursore viene processato mediante un enzima chiamato Drosha, il quale appartiene ad una classe di endonucleasi di tipo RNaseIII. Il prodotto di questa reazione ha,

generalmente, un 5' fosfato e un 3' ossidrilico con 2 nucleotidi in più nel 3' terminale. Da solo Drosha esibisce una scarsa attività enzimatica e richiede, per espletare le sue funzioni, la subunità regolatoria contenente due siti di legame per RNA a doppio filamento, chiamata DGCR8 nell'uomo e Pasha in *Drosophila*.

Il pre-miR viene esportato dal nucleo nel citoplasma mediante l'Esportina 5 (Exp5) e il suo cofattore Ran-GTP. Exp5 è specializzata nel legare RNA contenente mini-eliche con un'estremità al 3' in eccesso. Nel citoplasma il GTP viene idrolizzato a GDP ed il complesso Exp5/Ran-GDP rilascia il pre-miR.

Una volta nel citoplasma, il pre-miR viene processato da un altro enzima, Dicer, sempre della classe delle RNase III. La maggior parte delle proteine Dicer contiene un dominio, PAZ, di circa 130 amminoacidi che lega preferenzialmente le estremità 3' a singolo filamento di RNA a doppio filamento. Dato che i pre-miR generati da Drosha nel nucleo contengono all'estremità 3' due nucleotidi non complementari, Dicer è in grado di riconoscere tale sito tramite il suo dominio PAZ e taglia il doppio filamento a circa 20 nucleotidi di distanza. Il prodotto di quest'azione enzimatica è un miRNA duplex che contiene approssimativamente due nucleotidi 3' non appaiati ad entrambe le estremità. Come Drosha nel nucleo, anche Dicer necessita di proteine con un dominio per l'RNA a doppio filamento, come TRBP e PACT nell'uomo. Questi cofattori aumentano l'affinità per gli RNA e trasferiscono i miRNA all'ultimo passaggio del loro processamento, le proteine Argonaute.

Dicer produce, quindi, un intermedio duplex di RNA di cui, generalmente, solo uno dei due filamenti viene mantenuto e rilevato all'interno della cellula. La scelta riguardo a quale dei due filamenti debba essere mantenuto non è ben chiara, sembra che il filamento con l'idrogeno meno stabile al 5' terminale venga stabilizzato e diventi il miRNA maturo. Questa teoria spiegherebbe perché molti miRNA hanno al 5' terminale un residuo U. Dicer o il complesso da esso formato, interagisce con una famiglia di proteine altamente conservate, Argonaute. I microRNA maturi vengono trasferiti alle proteine Argonaute con le quali formano il complesso di silencing. Le proteine Argonaute possiedono due domini: PAZ e PIWI. Il primo è lo stesso dominio presente su Dicer deputato al riconoscimento del microRNA. Il secondo dominio possiede un canale carico positivamente che gli conferisce la proprietà di legare l'RNA carico negativamente. Inoltre, il dominio PIWI sembra possedere una struttura simile ad una RNAasi H, il che lascia ipotizzare che sia il responsabile della degradazione degli mRNA bersaglio (Kim, 2005). Successivamente al legame della proteina Argonaute, viene reclutato il complesso RNA-induced-silencing-complex (RISC). Tale complesso è lo stesso coinvolto nell'RNA interference (RNAi) e porta a maturazione il microRNA. Infatti, solo il filamento riconosciuto e legato da RISC diviene il miR maturo mentre il filamento opposto (miRNA\*) viene degradato tramite due meccanismi alternativi. Il primo meccanismo prevede la presenza della proteina Ago2, unica proteina umana in grado di aprire il doppio filamento dei miRNA. Il secondo implica una capacità del complesso RISC che, tramite un sistema di rotolamento e senza effettuare tagli, rimuove il filamento transitorio (Esquela-Kerschere and Slack, 2006). In aggiunta ad essere gli effettori del silencing, le proteine Argonaute possono contribuire alla biogenesi dei miRNA tramite selezione o legame ai miRNA, ma anche tramite stabilizzazione del miRNA maturo (Parker et al. 2006).

## **3.2. I microRNA nei tumori**

### *3.2.1. I microRNA nelle neoplasie*

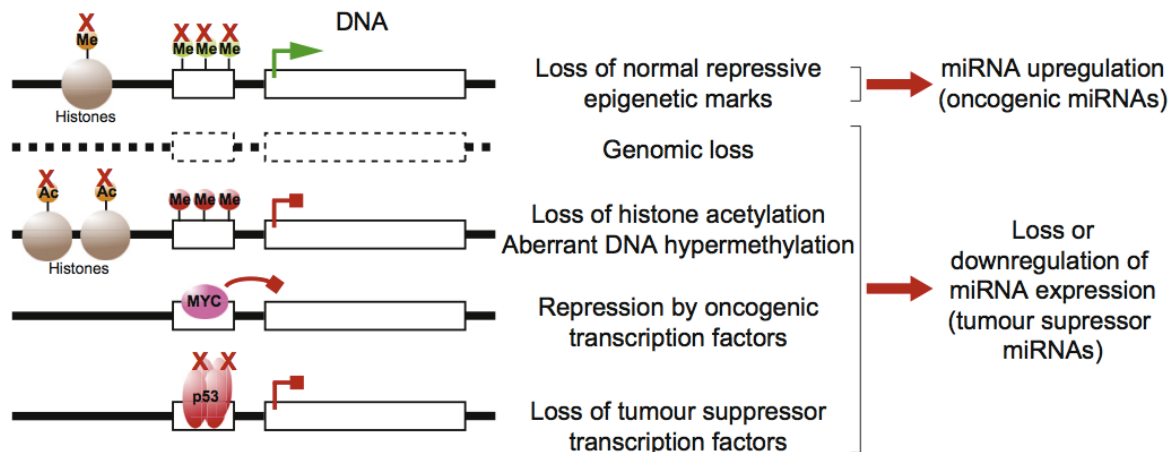
Nonostante i microRNA siano stati inizialmente descritti nel 1993, è stato solo dopo la loro caratterizzazione in diverse specie (2001) che permise di far emergere l'importanza di questi piccoli RNA endogeni nei processi fisiologici e patologici. Microarray e dati di espressione in un vasto

spettro di tumori hanno evidenziato che l'espressione aberrante dei miRNA non è un'eccezione, bensì quasi una regola (Lu et al 2005; Croce et al, 2009). Più recentemente tramite modelli murini in cui un miRNA era over-espresso o ablatato, è stato dimostrato il collegamento tra i miRNA e lo sviluppo del tumore. Grazie a queste evidenze i microRNA stanno rapidamente entrando nella clinica come biomarcatori e possibili target terapeutici (Iorio e Croce, 2012; Kasinski and Slack 2011).

I microRNA fisiologicamente fanno parte di un circuito a feedback ed attraverso il loro effetto conferiscono forza ai processi biologici principali. I miRNA possono servire per incrementare la precisione dell'espressione genica attraverso l'attenuazione della produzione di proteine. Inoltre, alcuni miRNA possono servire come interruttori per una particolare via di differenziamento. Conseguentemente a tali effetti, la perdita della funzione di un microRNA può causare un incremento della plasticità cellulare, de-differenziamento e una maggiore propensione per la trasformazione oncogenica. È interessante notare come i miRNA giochino un ruolo chiave anche nelle cellule staminali e durante il loro differenziamento. È stato dimostrato recentemente che un singolo cluster di microRNA può produrre cellule staminali indotte (iPSC) se overespresso in fibroblasti umani e murini (Anokye-Danso et al, 2011).

L'integrazione molto stretta che i microRNA hanno all'interno di circuiti regolatori della cellula può anche costituire un punto debole, dove la deregolazione di un piccolo sottogruppo di microRNA può profondamente modificare l'espressione genica e guidare la cellula verso la trasformazione neoplastica (Figura 13). Attualmente più di 1400 microRNA umani sono stati identificati e il loro potenziale di azione è enorme, difatti è stato predetto che più del 60% degli mRNA possano essere regolati dai miRNA. La regolazione da parte di questi piccoli RNA endogeni sembra, quindi, essere la strategia più abbondante di regolazione trascrizionale.

La letteratura riguardante i microRNA e il cancro è enorme ed estremamente differenziata



**Figura 13** - Rappresentazione schematica delle possibili implicazioni dei microRNA nella tumorigenesi. Il primo caso mostra microRNA oncogenici che vengono riespressi in maniera aberrante. I successivi esempi sono riguardati la perdita di espressione che implica una funzione oncosoppressoria dei miR.

non solo a causa della funzione multipla di molti microRNA che hanno come bersaglio molteplici trascritti, ma anche a causa di famiglie di miRNA con sequenza simile e di differenti miRNA con uguale bersaglio. La loro funzione, inoltre, può essere contesto-dipendente, difatti un microRNA può risultare up-regolato in alcuni tipi di tumore ma down-regolato in altri. I tumori spesso presentano livelli ridotti di miRNA maturi come conseguenza di perdite genetiche, silenziamento epigenetico, difetti nella via di biogenesi oppure diffusa repressione trascrizionale. L'importanza generale dei microRNA nel tumore è enfatizzata dal fatto che approssimativamente il 50% dei geni



amplificate nei tumori umani. I microRNA si sono dimostrati in grado di distinguere non solo il tessuto normale da quello tumorale ma anche di caratterizzare i diversi sottogruppi di uno stesso tipo di tumore, possono essere utilizzati come biomarcatori di prognosi tumorale, inoltre i livelli dei microRNA possono essere predittivi per la responsività ad un trattamento farmacologico.

### 3.2.2. *I microRNA nel medulloblastoma*

La scoperta che i microRNA giocano un ruolo importante in un'ampia varietà di tumori umani attraverso la regolazione di vari oncogeni e oncosoppressori ha portato i microRNA ad essere considerati come potenziali target per terapie antitumorali. I tumori più studiati a livello della deregolazione dei microRNA sono il tumore alla mammella e le leucemie, poco è stato studiato riguardo le alterazioni dei microRNA nel medulloblastoma. Ferretti et al. hanno condotto uno dei primi studi sul profilo di espressione dei microRNA nel medulloblastoma (Ferretti et al. 2008). Sono stati sottoposti a screening 250 microRNA in 31 campioni di medulloblastoma primario e sono stati identificati 34 miR differenzialmente espressi tra medulloblastoma controllato da Sonic Hedgehog (circa il 50% dei casi) e medulloblastoma non controllato da questa via del segnale. In questo studio sono stati identificati 3 microRNA down-regolati nel medulloblastoma Hedgehog dipendente, miR-125b, miR-326 e miR-324-5p. Tali microRNA hanno come target l'attivatore della via del segnale di Hedgehog, Smoothed, inoltre il miR-324-5p ha come bersaglio anche il fattore trascrizionale Gli1. In questo studio viene evidenziata anche una possibile anomalia genetica come causa della perdita della funzione del microRNA-324-5p. Infatti, tale miR è contenuto in una regione genica del cromosoma 17p che risulta essere una delle delezioni più frequenti nel medulloblastoma. In tale regione cromosomica sono contenuti, oltre al miR, anche i tumor suppressor p53 e HIC1 ma anche l'antagonista della via del segnale REN (De Smaele et al. 2004).

In un differente studio condotto successivamente da Ferretti et al, sono stati analizzati 248 microRNA in campioni di medulloblastoma e sono stati rilevati 248 miR differenzialmente espressi tra tumori e tessuto cerebellare normale sia adulto che fetale (Ferretti et al. 2009). In tale analisi sono stati individuati in particolare due microRNA, miR-9 e miR-125a, come downregolati nel medulloblastoma ed hanno come target l'isoforma tronca del recettore della neurotropina (TrkC).

Attraverso la comparazione tra medulloblastoma e cervelletto normale fetale è stato possibile identificare un cluster di microRNA upregolato nei medulloblastoma Hedgehog dipendenti rispetto a quelli non Hedgehog dipendenti, il cluster 17-92 (Northcott et al. 2009). Tale cluster di microRNA è indotto da N-myc nei precursori cerebellari neuronali trattati con Sonic Hedgehog, questa evidenza indica che il cluster di microRNA 17-92 è un effettore positivo degli effetti proliferativi della via del segnale di Hedgehog. Nello stesso anno un altro gruppo ha identificato 26 microRNA upregolati e 24 microRNA downregolati in cellule isolate da medulloblastoma spontanei in topi geneticamente modificati Ink4c<sup>-/-</sup>;Ptch1<sup>+/-</sup> e Ink4c<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup> paragonati a cervelletti di topi maturi. Dei 26 microRNA overespressi, nove sono risultati codificanti il cluster 17-92. Tre microRNA appartenenti a questo cluster (miR-92, miR-19a e miR-20) sono risultati upregolati anche nei medulloblastoma Hedgehog correlati. Tali osservazioni evidenziano una collaborazione funzionale tra il cluster 17-92 e la via del segnale di Hedgehog (Uziel et al. 2009).

Sono stati identificati due geni di microRNA (miR-30b e miR-30d) localizzati in una regione comunemente amplificata nel medulloblastoma, adiacente al locus di MYC sul cromosoma 8q24. Tali microRNA sono stati trovati upregolati in un sottogruppo di medulloblastoma primari (Lu et al. 2009).

Il cluster 183-96-182 è stato riscontrato upregolato nei medulloblastoma non Hedgehog controllato ed, in particolar modo, il miR-182 è significativamente upregolato in medulloblastoma

metastatici (Bai et al. 2012). In seguito è stato dimostrato che tale cluster è coinvolto nella soppressione di geni associati all'apoptosi e la regolazione dell'asse PI3K/AKT/mTOR (Weeraratne et al, 2011).

Venkataraman et al, hanno osservato che molti dei microRNA coinvolti nel normale differenziamento neuronale sono significativamente down-regolati nel medulloblastoma. In particolar modo il miR-128a è stato dimostrato un antagonista dell'oncogene Bmi1 (Venkataraman et al, 2010).

Molti microRNA possono influenzare la tumorigenesi attraverso la loro azione di tumor suppressor, come ad esempio il miR-34a che se over-espresso in cellule di medulloblastoma induce apoptosi e ripristina la sensibilità a chemioterapici (Weeraratne et al. 2011). Garzia et al. hanno scoperto che il miR-199b-5p regola negativamente le cellule staminali di medulloblastoma attraverso la regolazione dell'effettore di Notch1, HES1 (Garzia et al. 2009).

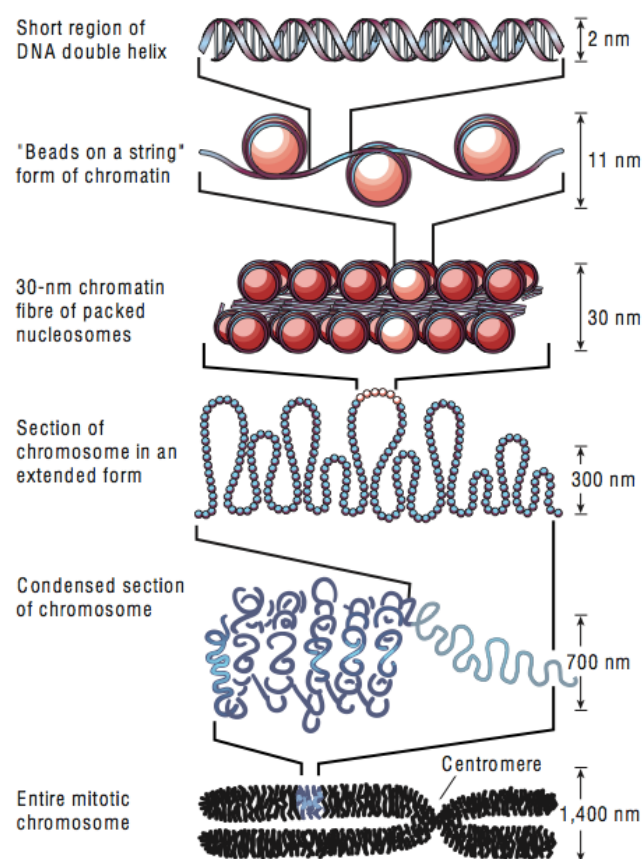
## CAPITOLO IV: LA REGOLAZIONE EPIGENETICA

## 4.1. L'eredità epigenetica

### 4.1.1. L'epigenetica

L'epigenetica è definita come un'informazione cellulare che può essere ereditata durante la divisione cellulare e che prescinde dalla sequenza del DNA (Feinberg and Tycko, 2004). È ormai evidente che tale eredità è coinvolta nel controllo fisiologico dell'espressione genica e per questa sua funzione risulta coinvolta anche nell'insorgenza dei tumori.

Il cancro è una patologia dello sviluppo e il dirottare i principali processi biologici, centrali per il normale sviluppo embrionale, è una caratteristica fondamentale delle neoplasie umane. Il normale sviluppo embrionale è un processo finemente regolato che risulta nella creazione di centinaia di diversi tipi cellulari a partire da una singola cellula staminale. Questo processo di



**Figura 14 - Condensamento del DNA.** Organizzazione della struttura cromatinica a partire dal cromosoma mitotico in basso, per finire con la doppia elica di DNA in alto.

progressiva specificazione e differenziamento cellulare è dipendente dalla regolazione epigenetica.

Nelle cellule eucariotiche il DNA all'interno del nucleo forma un complesso con le proteine che viene chiamato cromatina, tale struttura permette al DNA di essere condensato in un volume minore. Quando la cromatina viene estesa ed osservata attraverso un microscopio, la struttura somiglia a una collana di perle, ognuna di queste piccole perle è chiamata nucleosoma ed ha un diametro di approssimativamente 11nm. Il nucleosoma è il componente fondamentale della cromatina ed è costituito da una parte di DNA impacchettato intorno a una porzione centrale composta da proteine (*Figura 14*). Le proteine basiche che compongono la porzione centrale del

istonico. Ogni ottamero istonico è composto da due copie di ognuna delle proteine istoniche H2A, H2B, H3 e H4. La catena di nucleosomi è quindi impacchettata in una spirale di 30nm che viene chiamata solenoide, dove una proteina istonica addizionale, l'istone H1, è associata con il nucleosoma per mantenere la struttura.

I segnali regolatori che entrano nel nucleo incontrano la struttura cromatinica non il singolo filamento di DNA. La forma più compatta della cromatina, eterocromatina, è inaccessibile e per questo non è un buon template per la trascrizione. L'eucromatina, invece, è la forma più lassa della cromatina e, quindi, più accessibile ai fattori trascrizionali e alle RNA polimerasi. Il passaggio verso una forma più o meno accessibile della cromatina è dato dalle modificazioni a cui sono soggetti i suoi componenti. Tali modificazioni costituiscono l'eredità epigenetica (Felsenfeld and Croudine, 2003). Esistono tre principali meccanismi epigenetici: le modificazioni sulle code istoniche, il rimodellamento dei nucleosomi e la metilazione del DNA.

## 4.2. Il rimodellamento dei nucleosomi

### 4.2.1. La mobilizzazione dei nucleosomi

I fattori trascrizionali regolano l'espressione attraverso il legame a specifici siti sul DNA, le sequenze regolatorie nelle prossimità del gene. Nonostante alcune di queste sequenze possono essere accessibili nel segmento di DNA esterno al nucleosoma, oppure nel segmento che unisce due nucleosomi, la maggior parte di tali sequenze è sepolta all'interno del nucleosoma. I fattori trascrizionali vengono, quindi, aiutati dai complessi di rimodellamento della cromatina che cambiano continuamente la posizione dei nucleosomi lungo il filamento di DNA e modificano le interazioni istone-DNA.

I complessi di rimodellamento della cromatina mobilizzano i nucleosomi causando lo spostamento lungo il DNA degli ottameri istonici. Ogni complesso contiene una proteina con attività ATPasica, la quale provvede all'energia necessaria per questa reazione. Molti complessi sono membri della famiglia SWI/SNF che include SWI/SNF in umano, RSC in lievito, Brahma in *Drosophila*. I membri di questa famiglia posseggono simili subunità con dominio elicasi, ma variano i cofattori coinvolti nel complesso. Un'altra sottofamiglia SWI/SNF è basata sulla presenza del dominio elicasi ISWI che si combina con altre proteine a formare complessi NURF, CHRAC e ACF in *Drosophila*, e RSF in umano. Una terza sottofamiglia è basata sul dominio elicasi Mi-2 (Felsenfeld and Croudine, 2003).

I complessi di mobilizzazione differiscono nei meccanismi attraverso cui rompono la struttura del nucleosoma e sono associati con cofattori che gli permettono un'interazione selettiva con le altre proteine regolatorie. Il rimodellamento nucleosomico è critico per un normale differenziamento cellulare. La subunità centrale del complesso SWI/SNF, SNF5, è un noto oncosoppressore che è stato riscontrato mutato in tumori pediatrici rabdoidi maligni. Mutazioni di altri membri del complesso SWI/SNF sono importanti anche in diverse neoplasie adulte (Lawlor and Thilde, 2012).

### 4.2.2. Le varianti istoniche

Nella maggior parte degli organismi esistono copie multiple dei geni codificanti le proteine istoniche. Questi geni sono altamente simili in termini di sequenza, vengono espressi primariamente durante la fase S del ciclo cellulare e codificano per la riserva cellulare di istoni. Gli istoni sono noti

essere tra le proteine evolutivamente più lente, esistono però delle varianti non alleliche della maggior parte degli istoni che possono presentare delle differenze significative in termini di sequenza. Alcune di queste varianti ha caratteristiche biofisiche differenti che possono alterare le proprietà del nucleosoma, altre, invece, localizzano in specifiche regioni del genoma.

Le varianti istoniche sono generalmente presenti come gene a singola copia e la loro espressione non è ristretta durante la fase S del ciclo cellulare ma sono espressi durante tutto il ciclo. A differenza dei sottotipi maggiori, i geni codificanti le varianti contengono introni ed i trascritti sono spesso poli-adenilati, si pensa che queste caratteristiche siano importanti per la regolazione post-trascrizionale.

Alcune varianti si scambiano al posto degli istoni pre-esistenti durante lo sviluppo e il differenziamento, per questa loro caratteristica vengono chiamati istoni sostitutivi (Brandt et al, 1979). Queste sostituzioni hanno spesso come risultato che le varianti divengono le specie predominanti in cellule differenziate (Wunsch et al, 1991).

Le osservazioni sulle varianti istoniche hanno portato a comprendere che tali proteine hanno delle funzioni regolatorie sulle dinamiche della cromatina. Infatti è noto che tali varianti possono influenzare l'attivazione e la repressione genica, l'impacchettamento della cromatina, la ricombinazione, l'inattivazione del cromosoma X, il riparo del DNA, la segregazione cromosomica e anche la funzione e la formazione dei cinetocore (Kanakaka and Biggins, 2005).

### **4.3. Le modificazioni istoniche**

#### *4.3.1. Il codice istonico*

Gli istoni H3 e H4 hanno delle lunghe code N-terminali che fuoriescono dal nucleosoma, tali code possono essere modificate covalentemente in diversi punti. Le modificazioni delle code istoniche includono metilazione, acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, SUMOilazione, citrullinazione e ADP-ribosilazione. Queste modificazioni post-traduzionali alterano l'interazione del DNA con gli istoni e possono agire in diversi processi biologici, come la regolazione genica, il riparo del DNA e la condensazione cromosomica.

Una modificazione post-traduzionale degli istoni che altera l'espressione genica è l'acetilazione. Gli istoni possono essere acetilati e deacetilati su residui di lisina nelle code N-terminali e sulla superficie della struttura del nucleosoma come parte della regolazione della trascrizione. Generalmente questa modificazione è catalizzata da enzimi chiamati istone acetiltransferasi (HAT) o istone deacetilasi (HDAC). La fonte del gruppo acetile necessario per questa reazione proviene dall'Acetil-Coenzima A.

L'acetilazione porta una carica negativa che tende a neutralizzare la carica positiva degli istoni, così facendo diminuisce l'interazione dell'istone con il DNA carico negativamente. Come conseguenza la cromatina condensata viene trasformata in una struttura più rilassata che è associata ad un livello maggiore di trascrizione. Questo fenomeno può essere revertito dall'azione delle HDAC. Negli ultimi anni questo modello è stato scosso dalla scoperta che i geni trascrizionalmente attivi esibiscono un rapido turnover di acetilazione istonica, questo comporta che le HAT e le HDAC agiscono continuamente sulla coda istonica. Questo comportamento sembra essere correlato alla presenza di un'altra modificazione, la metilazione.

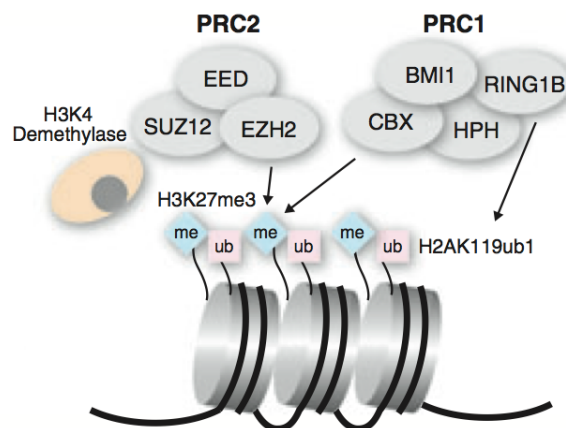
La metilazione istonica è un'altra modificazione epigenetica chiave per la regolazione dell'espressione genica. Il risultato della metilazione istonica sull'espressione genica dipende in gran parte dal residuo e dal grado di metilazione. Gli istoni possono essere metilati sulle lisine (K) e sulle arginine (R) le quali contengono entrambe dei gruppi amminici che conferiscono basicità ed

idrofobicità. La metilazione sulle lisine può essere mono-, di- o tri-, mentre sulle arginine la metilazione può avvenire solamente come mono- o di-. Ogni aggiunta del gruppo metile su ogni residuo richiede un gruppo specifico di enzimi con vari substrati e cofattori. Generalmente, la metilazione sulle arginine richiede un complesso che include delle arginine metil-transferasi (PRMT), mentre sulle lisine richiede specifiche iston metil-transferasi (HMT) le quali contengono un dominio SET conservato evolutivamente.

#### 4.3.2. Il complesso proteico Polycomb

Le proteine del gruppo Polycomb (PcG) sono state identificate inizialmente in *Drosophila melanogaster* come geni importanti per lo sviluppo e repressori dei geni omeotici, necessari per la formazione dell'asse dell'organismo. Nei moscerini i complessi Polycomb sono reclutati sulla cromatina a livello degli elementi responsivi a polycomb (PRE) e tale interazione porta al silenziamento dei geni bersaglio. La preservazione a livello evolutivo dei geni PcG dal lievito all'uomo sottolinea l'importanza di queste proteine nel normale sviluppo.

Le proteine PcG formano dei complessi che giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento della repressione trascrizionale dei geni target. Le proteine PcG sono classificate in almeno due complessi funzionali multimerici, denominati complesso repressorio Polycomb (PRC):



**Figura 15** - I complessi repressori Polycomb. PRC2 trimetila la lisina 27 sull'istone H3 permettendo così il legame di PRC1 che compatta ulteriormente il nucleosoma grazie all'ubiquitinazione dell'istone H2 sulla lisina 119. Inoltre è stata osservata una demetilasi H3K4 associata a PRC2.

il complesso di iniziazione, PRC2, e il complesso di mantenimento PRC1.

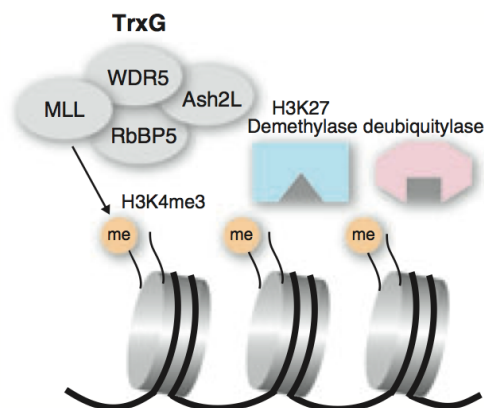
Il complesso umano PRC2 è composto da tre componenti principali: EZH2 (Enhancer of Zeste homolog 2), EED e Suz12. Tale complesso possiede l'attività enzimatica specifica per la trimetilazione dell'istone H3 sulla lisina 27 (H3K27me3) e la mono e dimetilazione dell'istone H1 al residuo lisina 26 (H1K26me1/me2). H3K27 è una modificazione istonica di tipo repressivo, essenziale per l'azione svolta dai PcG, è stato suggerito che tale modificazione recluti PRC1 sulla cromatina.

Il complesso PRC1, invece, contiene quattro componenti principali: RING1B, BMI1, HPH e CBX. PRC1 ha un'attività di E3 ubiquitina ligasi e svolge la sua azione mono-ubiquitinando l'istone H2A alla lisina 119 (H2AK119ub1). Tale modificazione è stata suggerita essere centrale nell'azione repressoria svolta da questo complesso proteico, sembra infatti coinvolta nel bloccare i

In mammifero i PRE sono poco caratterizzati ed è stato ipotizzato un differente modello di reclutamento di questi complessi al DNA. In questo modello, PRC2 viene reclutato mediante proteine accessorie, come YY1, inducendo H2K27me3. Esistono molti fattori trascrizionali che possono associarsi al complesso PRC2 e contribuire al reclutamento di questo complesso sul DNA. Inoltre, vi sono evidenze sperimentali sempre più crescenti che i lunghi RNA non codificanti (ncRNA) potrebbero funzionare come reclutatori e possono interagire con PRC2. H3K27me3 serve da sito di legame per CBX, uno dei componenti di PRC1. Diverse proteine della famiglia CBX possiedono un dominio altamente conservato per il legame a questa modificazione istonica e partecipano alla repressione mediata da PRC1 (Konuma et al. 2011).

#### 4.3.3. Il complesso proteico Trithorax

Alcuni anni dopo la scoperta dei geni PcG, è stato identificato il membro fondatore del gruppo di proteine Trithorax (TrxG), TRX, caratterizzato come regolatore positivo dei geni HOX. In seguito, sono state identificate altre proteine appartenenti al gruppo TrxG tramite screening di mutanti che perdevano la funzione dei geni HOX o per soppressione del fenotipo dipendente da PcG. Le proteine TrxG regolano, come avviene con le proteine PcG, molti geni, grazie alla loro abilità di rimodellamento della cromatina mediante la metilazione degli istoni. Tali proteine sono coinvolte



**Figura 16** - Il complesso di proteine Trithorax. Il complesso TrxG metila la lisina 4 sull'istone 3, marcatore di attivazione trascrizionale. Recentemente la demetilasi specifica per H3K272/3 è stata identificata all'interno del complesso.

nel mantenimento dello stato attivo della cromatina e, quindi, sono coinvolte nella tumorigenesi, nel autorinnovamento delle cellule staminali embrionali, nella scelta del fato cellulare e nella proliferazione. Sono, inoltre, implicate nell'inattivazione del cromosoma X, nell'apoptosi, nella regolazione del ciclo cellulare, nella plasticità durante la crescita, nella rigenerazione, nella risposta a stimoli di stress. Non è chiaro se queste azioni vengano svolte solo tramite l'azione di agonista di PcG oppure grazie ad una attivazione globale dell'espressione genica.

Le proteine TrxG sono evolutivamente conservate e possono essere suddivise in tre classi basate sulla loro funzione molecolare. La prima classe include dei fattori contenenti il dominio SET, che possono metilare le code istoniche. La seconda classe contiene i fattori che sono in grado di portare avanti il rimodellamento cromatinico dipendete da ATP. La terza classe include le proteine TrxG che possono legare direttamente sequenze di DNA.

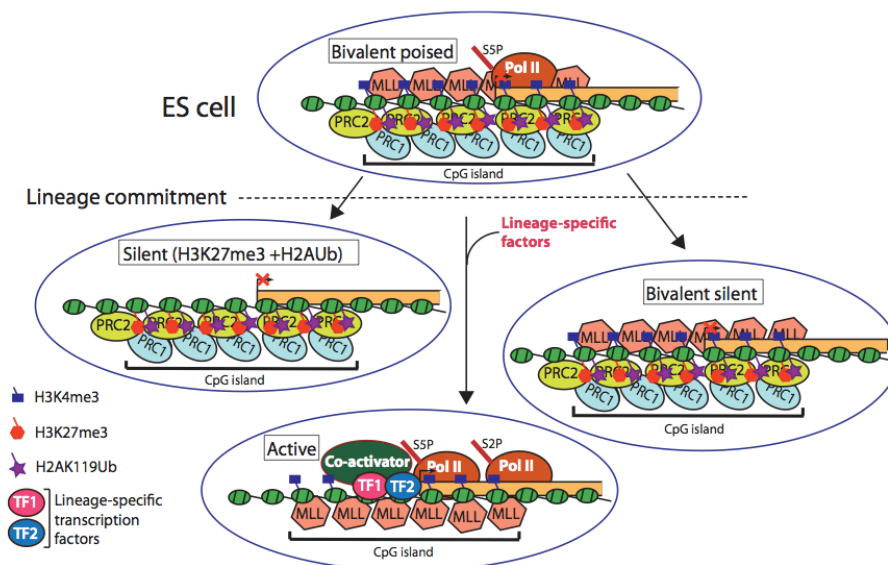


complessi multiproteici. La trimetilazione della lisina 4 sull'istone H3 (H3K4me3) è un marcatore di geni attivi trascrizionalmente. Il primo complesso ad essere stato identificato con attività istone metil-transferasica su tale lisina è il complesso di lievito contenente il dominio Set1, denominato COMPASS. Il primo complesso simile a COMPASS identificato in mammifero è stato il complesso MLL1 che possiede molteplici omologhi in piante e animali. Nei mammiferi sono presenti sei complessi relazionati a COMPASS le cui funzioni sono essenziali e non ridondanti.

Nel moscerino i complessi TrxG legano il DNA su specifici elementi chiamati elementi responsivi a TrxG (TRE), queste regioni spesso coincidono con quelli di PCG (PRE). Nei mammiferi MLL1 e MLL2 possiedono un dominio CXXC, un tipo di zinc finger che riconosce le isole CpG non metilate. Il reclutamento del gruppo TrxG può essere effettuato anche tramite altre proteine, lunghi filamenti di RNA non codificanti (lncRNA) ma anche grazie a modificazioni istoniche pre-esistenti (Schettengrub et al. 2011).

#### 4.3.4. I domini bivalenti

Nonostante la decodificazione dei marcatori istonici come H3K4me3 e H3K27me3 sia ancora lontana dall'essere completamente compresa, studi sul genoma hanno permesso di ottenere degli indizi su come questi specifici marcatori possano funzionare. Studi di mappatura sul genoma hanno rivelato che marcatori come H3K4me1, H3K27ac e H3K4me3 sono riscontrati in geni trascrizionalmente attivi (enhancer i primi due, promotori l'ultimo), mentre H3K27me3 è uno dei



**Figura 17 - Modello per la funzione del dominio bivalente.** Dopo lo stimolo differenziativo esistono due alternative per la risoluzione del dominio bivalente, la perdita del marcatore repressorio H3K27me3 oppure la perdita del marcatore attivatorio H3K4me3.

marcatori dei promotori non attivi. Nonostante queste correlazioni persistano virtualmente in tutti i tipi cellulari di mammifero, alcuni pattern di marcatori cromatinici sembrano essere più specificamente delle cellule embrionali staminali. Esiste un gran numero di promotori di geni implicati nello sviluppo che sono simultaneamente marcati dall'attivatore H3K4me3 e dal repressore H3K27me3. Questi pattern di marcatori istonici opposti sullo stesso promotore sono stati chiamati "domini bivalenti", termine inizialmente coniato da Bernstein et al. (2006). Anche se inizialmente descritti nelle cellule staminali embrionali, dove sono predominanti, successive

potenziale. I geni bivalenti sono geni che sono in uno stato di predisposizione, rendendo possibile una loro attivazione rapida sotto opportuni stimoli differenziativi e di sviluppo (Bernstein et al, 2006; Azuara et al, 2006).

La maggior parte di questi geni bivalenti codifica per fattori trascrizionali di importanza nello sviluppo. Nonostante la presenza del marcatore H3K4me3, tali geni sono espressi solamente a bassi livelli. Durante il differenziamento, alcuni geni vengono espressi e perdono il marcatore H3K27me3, mentre altri vengono silenziati e perdono il marcatore H3K4me3. Queste osservazioni hanno portato all'ipotesi che i domini bivalenti mantengono i geni di sviluppo in uno stato silenziato nelle cellule staminali embrionali, mentre li mantengono pronti ad una successiva espressione durante il differenziamento (Bernstein et al, 2006; Azuara et al, 2006).

Diversi lavori hanno evidenziato l'esistenza di domini bivalenti nelle cellule tumorali ed il collegamento tra i domini bivalenti nelle cellule staminali embrionali ed i geni deregolati nel tumore (Voigt et al. 2013). Diversi tipi di cellule tumorali mostrano geni bivalenti parzialmente sovrapposti con il set di geni bivalenti presenti nelle cellule staminali embrionali (Rodriguez et al. 2008; Bapat et al. 2010). Tuttavia questi geni presentano spesso metilazione del DNA nelle cellule tumorali e, quindi, sono completamente silenziati. Loci bivalenti nelle cellule staminali embrionali sono trovati spesso con il DNA iper-metilato nelle cellule tumorali adulte ed è stato speculato che la bivalenza o la presenza delle proteine PcG possano predisporre tali geni ad una successiva iper-metilazione del DNA (Ohm et al. 2007; Schlesinger et al. 2007; Widschwendter et al. 2007), è stato inoltre dimostrata l'associazione fisica tra EZH2 e le DNA metil-transferasi (Viré et al, 2006).

#### **4.4. La metilazione del DNA**

##### *4.4.1. La metilazione del DNA nelle isole CpG*

Due articoli fondamentali nel 1975 hanno suggerito indipendentemente che la metilazione dei residui delle citosine nel contesto dei dinucleotidi CpG (*C plus G*) potesse servire come una marcatura epigenetica nei vertebrati. Tali articoli proposero che le sequenze possano essere metilate *de novo* e che questa metilazione possa essere ereditata attraverso le divisioni delle cellule somatiche mediante un meccanismo che coinvolge un enzima che riconosce palindromi CpG emimetilati, inoltre venne proposto che la presenza dei gruppi metile possa essere letta da delle proteine leganti di DNA e che la metilazione del DNA possa portare al silenziamento genico (Hollyday and Pugh, 1975; Riggs, 1975). Nonostante diversi di questi punti si siano rivelati corretti, la relazione tra la metilazione del DNA e il silenziamento genico non si è dimostrata semplice da dimostrare.

La maggior parte dei lavori in animali si è focalizzata sulla presenza di 5-metil-citosina (5mC) nel contesto delle sequenze CpG. La metilazione sparsa di altre sequenze è stata osservata solo recentemente nei mammiferi e la sua funzione non è ancora nota.

La comprensione delle funzioni della metilazione del DNA richiede la considerazione della distribuzione della metilazione sull'intero genoma. Più della metà dei geni nel genoma dei vertebrati contiene corte (circa 1kb) regioni ricche di CpG, note come isole CpG (CGI), assenti nel resto del genoma. Dato che la 5mC può essere convertita in tiamina attraverso la deaminazione spontanea o enzimatica, si pensa che la perdita delle isole CpG lungo il genoma si dovuta alla deaminazione delle sequenze metilate nelle linee germinali. Si pensa che le CGI esistano perché sono metilate solo transientemente nelle linee germinali. Tuttavia, esistono molte discussioni riguardo la definizione di CGI e, nonostante la densità delle CpG sui promotori di mammifero ha una distribuzione bimodale, esistono delle regioni con densità intermedie (Jones, 2012).

Nelle cellule germinali di animale i geni che controllano il differenziamento sono metilati e trascrizionalmente inattivi. Tuttavia, esistono almeno due momenti nello sviluppo, nelle cellule germinali e negli embrioni pre-impianto, durante i quali i pattern di metilazione sono riprogrammati generando un potenziale di sviluppo più ampio. Dopo la fecondazione, il genoma paterno viene sottoposto a una rapida perdita della metilazione del DNA durante le prime divisioni cellulari, suggerendo una partecipazione attiva delle DNA demetilasi. Contrariamente, il genoma materno viene demetilato gradualmente in quello che sembra un processo passivo. Come conseguenza di questa demetilazione genomica durante lo sviluppo embrionale, i geni essenziali per le cellule staminali sono attivati, suggerendo che la metilazione del DNA esistente deve essere cancellata, in particolar modo sui promotori dei geni essenziali per la pluripotenza come NANOG e OCT3/4. È interessante notare che la metilazione del DNA nei geni essenziali per le cellule staminali è associata primariamente alle sequenze codificanti e non ai promotori. Inoltre, quasi un quarto di tutte le metilazioni identificate nelle cellule staminali embrionali è localizzata non in un contesto CG, suggerendo che le tali cellule possano utilizzare diversi meccanismi di metilazione per condizionare la regolazione genica (Tollervey and Lunyak, 2012).

La metilazione *de novo* del DNA è catalizzata dagli enzimi DNMT3A e DNMT3B e viene mantenuta dalla metil-transferasi DNMT1, con la partecipazione da parte delle DNMT3A e DNMT3B. Il pattern di metilazione del DNA è guidato in parte dalla sequenza primaria del DNA ed è influenzato dalle variazioni della linea germinale. Negli animali la demetilazione del DNA viene svolta dalle citosine deaminasi in concerto con le DNA glicosilasi.

Nella maggior parte degli eucarioti la metilazione del sito al 5' delle citosine (5-mC) risulta nella repressione trascrizionale attraverso il legame con le proteine MBD che, a loro volta, fanno parte dei complessi di rimodellamento della cromatina. Tali proteine leganti il DNA metilato possiedono due possibili domini di riconoscimento del DNA, domini di legame con le metil-CpG (MBD) oppure zinc finger C2H2. Le proteine contenenti il dominio MBD includono MBD1, MBD2, MBD4 and MeCP2, mentre le proteine Kaiso (ZBTB33), ZBTB4 e ZBTB38 utilizzano lo zinc finger per legare il DNA. Le proteine MBD e Kaiso sembrano essere coinvolte nella repressione trascrizionale mediata dal DNA metilato nel promotore dei geni (Shen and Laird, 2013).

Spesso in vari tipi di tumore è stato riscontrato uno stato di ipermetilazione del DNA nelle isole CpG, un cambiamento ricorrente nella progressione tumorale precoce e nelle lesioni premaligne. Tale anomalia porta ad un anormale silenziamento genico che incide sull'espressione di geni oncosoppressori e che, quindi, porta un vantaggio di sopravvivenza alle cellule sottoposte a condizioni di stress croniche. Inoltre, è stato dimostrato che le alterazioni che portano allo stato trascrizionalmente represso della cromatina associate con i promotori dei geni silenziati nelle cellule tumorali ricordano le modificazioni cromatiniche inerenti gli stessi geni nelle cellule staminali embrionali normali. Nelle condizioni embrionali queste alterazioni possono aiutare nel prevenire che le cellule staminali o i precursori si convertano verso cellule commissionate al differenziamento finché non programmato. È stato ipotizzato che i pattern sulla cromatina possano rendere gruppi di geni più vulnerabili ad errori che risultano in una maggior metilazione del DNA durante le prime fasi di progressione tumorale (Ohm et al. 2007; Schlesinger et al. 2007; Widschwendter et al. 2007).

CAPITOLO V: IL MICRORNA-326 NELLE CELLULE STAMINALI  
NEURONALI NORMALI E TUMORALI

## 5.1. Scopo del lavoro

### 5.1.1. Le basi del progetto

La via del segnale di Hedgehog ha un ruolo centrale nello sviluppo cellulare e nella tumorigenesi in molteplici linee tissutali, entrambi questi processi sono sostenuti dalle cellule staminali. La via del segnale di Hedgehog sostiene le cellule staminali neuronali postnatali del prosencefalo nella zona subventricolare (SVZ), nell'ippocampo (Ahn and Joyner 2005; Lai et al. 2003; Machold et al. 2003; Palma et al. 2005; Palma and Ruiz i Altaba, 2004), così come le cellule staminali neuronali cerebellari, le cellule staminali tumorali di glioma e le cellule staminali di medulloblastoma (Clement et al. 2007; Stecca and Ruiz i Altaba 2009; Po et al. 2010).

Un organo in cui è evidente la funzione della via del segnale di Hedgehog è il cervelletto in cui tale via di trasduzione del segnale è necessaria per mantenere indifferenziati i progenitori dei granuli cerebellari (GCPs) (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999) ed è una delle cause di insorgenza del medulloblastoma (Mb) (Ruiz i Altaba 2006). Nel medulloblastoma, infatti, può avvenire un'attivazione aberrante della via del segnale di Hedgehog come conseguenza di cambiamenti genetici ed epigenetici che affliggono vari componenti della via di trasduzione. Ad esempio, la mutazione che causa la perdita di funzione di Ptc1 mima il rilascio indotto dal ligando dell'inibizione sul trasduttore Smo, portando ad un'attivazione costitutiva della via. Gli effettori a valle dell'attività di Smo sono i fattori trascrizionali Gli che agiscono su un set di geni promuovendo la proliferazione e diminuendo il differenziamento cellulare.

I microRNA sono delle piccole molecole di RNA che regolano a livello post-trascrizionale l'espressione genetica. Alcune di queste molecole sono state già caratterizzate come modulatori della via del segnale di Hedgehog e sono risultate diversamente espresse nel medulloblastoma.

Nonostante le caratteristiche già emerse di tali molecole come marcatori tumorali, di progressione o di prognosi della malattia, pochi sono gli studi che indagano la regolazione trascrizionale dei microRNA evidenziandone i meccanismi che potrebbero portare ad una loro successiva deregolazione all'interno di un contesto tumorale.

### 5.1.2. Il microRNA-326

Ferretti et al, hanno dimostrato per primi il coinvolgimento del microRNA-326 in un contesto cellulare cerebellare, ne hanno, inoltre, dimostrato una significativa diminuzione nei livelli di espressione in campioni di medulloblastoma umano ed in particolar modo in medulloblastoma dipendenti dalla via di trasduzione di Hedgehog (Ferretti et al. 2008). Nel contesto dei granuli cerebellari e del medulloblastoma è stato dimostrato che il microRNA-326 agisce a livello del recettore di Sonic Hedgehog, Smoothed, causandone la diminuzione di espressione proteica e, quindi, antagonizzando la funzione pro-proliferativa di questa via del segnale.

Successivamente è stato riscontrato un ruolo di questo microRNA anche a livello dei glioma e glioblastoma. È stato difatti dimostrato nel 2009 dal Kefas et al. che il microRNA-326 è un inibitore della via di trasduzione di Notch e a sua volta viene inibito dalla via stessa (Kefas et al. 2009). Kefas et al, hanno dimostrato come il microRNA-326 in tale contesto cellulare agisca a livello della via di trasduzione di Notch avendo direttamente come target Notch1 e Notch2. È stato inoltre evidenziato come tale miR sia meno presente nel tessuto tumorale di glioblastoma in relazione con il tessuto cerebrale normale e tale ridotta espressione avviene non per difetti nel processamento, bensì a causa di una ridotta trascrizione del microRNA e del suo gene ospitante.

Uno studio successivo ha dimostrato la correlazione tra il microRNA-326 e la piruvato chinasi di tipo M2. Tale enzima è presente nel glioma mentre è assente nel tessuto cerebrale normale ed è stato dimostrato che una deplezione svolge un'azione citotossica nei confronti delle cellule di glioma, infatti se silenziata, viene riscontrata una maggior apoptosi e un abbassamento dell'attività metabolica di tali cellule (Kefas et al. 2010).

Sempre a livello cerebrale, nel glioma e nel glioblastoma, il microRNA-326 è stato dimostrato un buon marcatore di patologia, la sua ridotta espressione è associata a uno stato patologico avanzato (Wang et al. 2012), mentre una sua espressione indica, in combinazione anche con altri microRNA, abbastanza accuratamente una sopravvivenza media maggiore e una minor incidenza di recidive (Qiu et al. 2013). Inoltre, il miR-326 ha come bersaglio, nel glioblastoma, la proteina NOB1, la quale sembra essere coinvolta nella tumorigenesi mediante interazioni con il proteasoma 26S (Zhou et al, 2013).

Il microRNA-326 è stato dimostrato coinvolto anche nel differenziamento del tessuto adiposo a partire da cellule staminali del tessuto adiposo stesso (Tang et al. 2009) e nel tumore alla mammella dove correla negativamente con la resistenza a molteplici farmaci chemioterapici (Liang et al. 2009).

I livelli di espressione del miR-326 sono stati correlati anche in patologie di carattere immunitario quali la sclerosi multipla, la leucemia cronica mieloide ed il diabete di tipo 1. Nella sclerosi multipla il miR-326 è coinvolto nella maturazione delle cellule TH-17 tramite la modulazione di Ets-1. Questo implica che livelli di espressione elevati del miR-326 causano livelli elevati di cellule TH-17 che correlano con patologia in pazienti con un ritorno di sclerosi multipla (Du et al. 2009). Per quanto riguarda la leucemia cronica mieloide i livelli di miR-326 sono inversamente correlati con i livelli di espressione di Smoothed, come già descritto nel medulloblastoma (Babashah et al. 2013). Nel diabete di tipo 1 è stato riscontrato un livello aumentato di espressione del miR-326 nei pazienti che avevano un'autoimmunità delle isole pancreatiche in atto (Sebastiani et al. 2011).

Un altro ruolo come potenziale marcatore del miR-326 è nel tumore al polmone in cui riveste un ruolo nello sviluppo delle metastasi. È stato evidenziato, difatti, in uno studio che i livelli circolanti nel sangue di questo microRNA sono associati allo sviluppo di metastasi all'osso (Valencia et al. 2012).

È evidente che l'espressione del microRNA-326 è stata studiata in vari casi patologici ma attualmente in nessuno di tali casi è stata studiata la regolazione trascrizionale di questo microRNA nonostante ci siano già state evidenze che i livelli di espressione del miR-326 possano essere direttamente ricondotti a una disfunzione trascrizionale. Scopo di questo lavoro è, quindi, analizzare nel dettaglio i meccanismi che portano all'alterazione dei livelli di espressione del microRNA-326 ed indagare approfonditamente la sua funzione all'interno delle cellule staminali neuronali normali e di medulloblastoma per poter meglio apprezzare la relazione con la via del segnale di Hedgehog.

## **5.2. Materiali e metodi**

### *5.2.1. Isolamento dell'RNA e RT-qPCR*

L'RNA totale è stato isolato mediante l'uso del Tri-Reagent (Ambion) secondo le procedure indicate dalla ditta, la quantificazione dei campioni è stata eseguita utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop (ThermoScientific). La retro-trascrizione è stata svolta utilizzando il kit *High Capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystem) e la quantificazione dell'espressione dell'mRNA è stata eseguita tramite RT-qPCR dei geni analizzati con lo strumento ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem), mediante l'utilizzo delle sonde Taqman in accordo con il

protocollo della ditta (Applied Biosystem). Ogni reazione di amplificazione è stata eseguita in triplicato e la media dei tre cicli di threshold è stata utilizzata per calcolare la quantità dei trascritti nei campioni (SDS 2.3 software, Applied Biosystem). La quantificazione dell'mRNA è espressa come il rapporto tra il gene studiato e il calibratore o verso la media dei campioni di controllo. Tutti i valori sono normalizzati verso i controlli endogeni  $\beta$ -actin,  $\beta$ 2-microglobulina, HPRT.

### 5.2.2. *Quantificazione dei livelli di microRNA*

L'analisi è stata eseguita su campioni di RNA utilizzando il sistema dei primers a forcilla specifici per la retrotrascrizione (Applied Biosystem) e, susseguentemente, la RT-qPCR è stata svolta mediante delle sonde TaqMan specifiche per il microRNA (Applied Biosystem) nella macchina ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem). I livelli di espressione del microRNA sono stati normalizzati con l'RNU6B.

### 5.2.3. *Immunoistochimica*

Le sezioni inglobate in paraffina da tessuti cerebellari umani normali (Abcam) e di medulloblastoma sono state colorate con l'anticorpo anti  $\beta$ -arrestina1 (Santa Cruz) con una diluizione 1:200. L'antigene è stato smascherato mediante la proteinasiK (Dako).

### 5.2.4. *Colture e trattamenti cellulari*

Se non specificato diversamente, i terreni di coltura ed i supplementi sono stati comprati da Gibco-Invitrogen (Life Science) mentre i composti chimici dalla Sigma-Aldrich.

Le neurosfere umane e murine sono state ottenute come precedentemente descritto (Po et al, 2010) e coltivate in un terreno selettivo: DMEM/F12 con 0.6% di glucosio, 25mg/ml insulina, 60mg/ml N-acetil-L-cisteina, 2mg/ml eparina, 20ng/ml EGF, 20ng/ml bFGF (Peprotech, Rocky Hill, NL), 1X penicillina-streptomicina e il supplemento B27 senza vitamina A.

Per il saggio della formazione di neurosfere, le cellule sono state piastrate ad una densità clonare (1-2 cells/mm<sup>2</sup>) in supporti da 96 pozzetti e coltivate nel mezzo selettivo per le cellule staminali.

Per indurre il differenziamento le neurosfere sono state dissociate meccanicamente e mediante una soluzione non enzimatica (Sigma) e piastrate in piastre pre-trattate con D-poliornitina, utilizzando il mezzo di differenziamento (DMEM/F12 con il supplemento N2, 2mg/ml eparina, 0.6% glucosio, 60mg/ml N-acetil-L-cisteina, 1% siero di vitello e PDGF 10ng/ml o acido retinoico 2 $\mu$ M).

Le transfezioni plasmidiche sono state effettuate mediante l'elettroporatore Amaxa nucleofector (Lonza), secondo le procedure indicate dalla ditta. Il vettore del miR-326 è stato comprato da GeneCopeia (Mmir3333-MR01), il vettore  $\beta$ -arrestina1 è stato comprato da Addgene (Luttrell LM et al, 1999).

Le cellule sono state trattate a concentrazioni crescenti di MC2055 (10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) per 48h e 4 giorni.

### 5.2.5. *La mutagenesi sito-diretta*

L'intero sito di legame del miR-326 è stato deletato utilizzando il kit QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). La reazione è stata eseguita in accordo alle procedure descritte dalla ditta utilizzando i seguenti primers:

Fw: cccagggcagcaaactcaggaccaactccaaa  
Rw: ttggagttggtcctgagtttctgcctggg

### 5.2.6. *L'immuno-precipitazione della cromatina*

L'immuno-precipitazione della cromatina è stata eseguita come precedentemente descritto (Canettieri et al, 2010; Po et al, 2010). Il DNA ottenuto è stato amplificato attraverso PCR standard con primers sulla regione regolatoria murina e umana di  $\beta$ -arrestina1/miR-326 utilizzando come controllo il gene dell'actina. I seguenti anticorpi sono stati utilizzati per l'immunoprecipitazione: rabbit polyclonal Trimethyl-Histone H3 (Lys 27) (Millipore), rabbit polyclonal Histone H3 (tri methyl K4) (Abcam), rabbit polyclonal EZH2 (Active Motif).

I primers utilizzati per amplificare la regione regolatoria sono:

hARRB1ChIP F: ACACCCAGCATTGGCCGGCAGCCGCA  
hARRB1ChIP R: CTGTCAGCAAGAATGTGTTGACCGAGGCG  
mArrb1\_ChIP\_N\_Fw: CATAACGCGCGCTCACAC  
mArrb1\_ChIP\_N\_Rev: ACTCACCGTGTCCCTTTGTCG

### 5.2.7. *Analisi Western blot*

Le cellule sono state lisate con il Buffer RIPA come precedentemente descritto (Po et al, 2010), i lisati sono stati separati su un gel di acrilamide 8% e trasferiti secondo procedure standard. I seguenti anticorpi sono stati utilizzati: anti- $\beta$ -arrestin1 K-16 (sc-8182; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti- $\beta$ -arrestin1 (BD Bioscience), anti-Gli1 H-300 (sc-20687; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-Gli2 H-300 (sc-28674; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-mouse Nanog (Cosmo Bio Co, Japan), anti-Smo N-19 (sc-6366; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-mouse  $\beta$ III Tubulin (MAB 1637 Millipore), anti-Sox2 (MAB4343 Millipore), anti-Actin I-19 (sc-1616; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-GAPDH (ab8245; Abcam), anti-NeuN (MAB 377; Millipore), anti-Zic1 (ab72692; Abcam), anti-Oct4 (ab19857; Abcam), anti-Sp1 1C6 (sc-420X; Santa Cruz Biotechnology, CA). Anticorpi secondari coniugati con HRP (Santa Cruz Biotechnology, CA) sono stati utilizzati in combinazione con il moltiplicatore di chemiluminescenza (ECL Amersham, Amersham UK).

### 5.2.8. *Il saggio di luciferasi*

Il sito di legame putativo del miR-326 sul 3'UTR di Gli2 è stato identificato mediante un'analisi bioinformatica utilizzando la combinazione con il software miRanda e l'algoritmo Target Scan (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>). L'intera regione del 3'UTR di Gli2 murino è stata acquistata da GeneCopeia nel vettore pEZX-MT01 (MmiT025993-MT01). Tale costrutto è stato utilizzato per ottenere un mutante delecto dell'intero sito di legame per il miR-326.

Le cellule staminali neuronali sono state transfettate in supporti da 24 pozzetti con 80ng del plasmide contenente la regione 3'UTR di Gli1 (Ferretti et al, 2008), Gli2 wt e Gli2 mutante e 420ng del vettore del miR-326 oppure con il vettore vuoto e 5ng del vettore di controllo pRL-CMV-Renilla Luciferase, con il Fugene 6transfection (Promega). Le cellule sono state raccolte e testate dopo 24h dalla trasfezione, con il kit di luciferasi (Promega). Tutti i dati riguardandi l'attività luciferasica sono presentati come una media  $\pm$ s.d. dei valori di almeno tre esperimenti in triplicato.

### 5.2.9. *Il trattamento bisulfite e l'amplificazione tramite PCR*



L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il kit Qiap DNA mini (Qiagen). Il DNA così ottenuto è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop (ThermoScientific) e trattato con il kit EpiTect Bisulfite (Qiagen). Il DNA convertito è stato utilizzato per amplificare tramite PCR la regione regolatoria murina e umana di  $\beta$ -arrestina1/miR-326 con i seguenti primers:

Human MeFw: TTGTTAGTAAGAATGTGTTGATCGAGGC

Human MeRw: CAACATTAACCGACAACCGCA

Human UnFw: TTGTTAGTAAGAATGTGTTGATTGAGGTGT

Human UnRw: ACACCCAACAATAACCAACAACCAC

Mouse MeFw: TTTTATTTTTTTGGGCGCGTATAC

Mouse MeRw: GTCCAAACTAAAAAATCCCCGAC

Mouse UnFw: TTTTATTTTTTTGGGTGTGTATATGT

Mouse UnRw: CATCCAAACTAAAAAATCCCCAAC

Come controlli positivi sono stati utilizzati per umano EpiTect PCR control DNA set (Qiagen) e per murino Universal Methylated mouse DNA standard (Zymo Research).

#### 5.2.10. Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è stata eseguita come precedentemente descritto (Po et al, 2010). Gli anticorpi primari utilizzati sono: anti-mouse Nanog (Cosmo Bio Co, Japan).

#### 5.2.11. Saggio di proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è stata valutata mediante l'incorporazione di BrdU (Roche, Basel, Switzerland) dopo 8h di incubazione. Le cellule sono state piastrate su chamber slides (Lab-Tek) pre-trattate con poli-lisina e lasciate aderire per 3h. Successivamente sono state fissate con paraformaldeide 4%, permeabilizzate con 0.1% di Triton X-100, la rilevazione della BrdU (Roche, Basel, Switzerland) è stata effettuata utilizzando l'anticorpo primario secondo il protocollo della ditta, completando la colorazione come un'immunofluorescenza. I Nuclei sono stati contro-colorati con il reagente Hoechst. Sono stati contati almeno 300 nuclei in triplicato e il numero delle cellule BrdU-positive è stato registrato.

#### 5.2.12. Sintesi del composto MC2055

MC2055 [(3E,5E)-1-benzil-3,5-bis(3-bromo-4-idrossibenzilidene)piperidin-4-one] è stato sintetizzato come già descritto (Cheng et al, 2011).

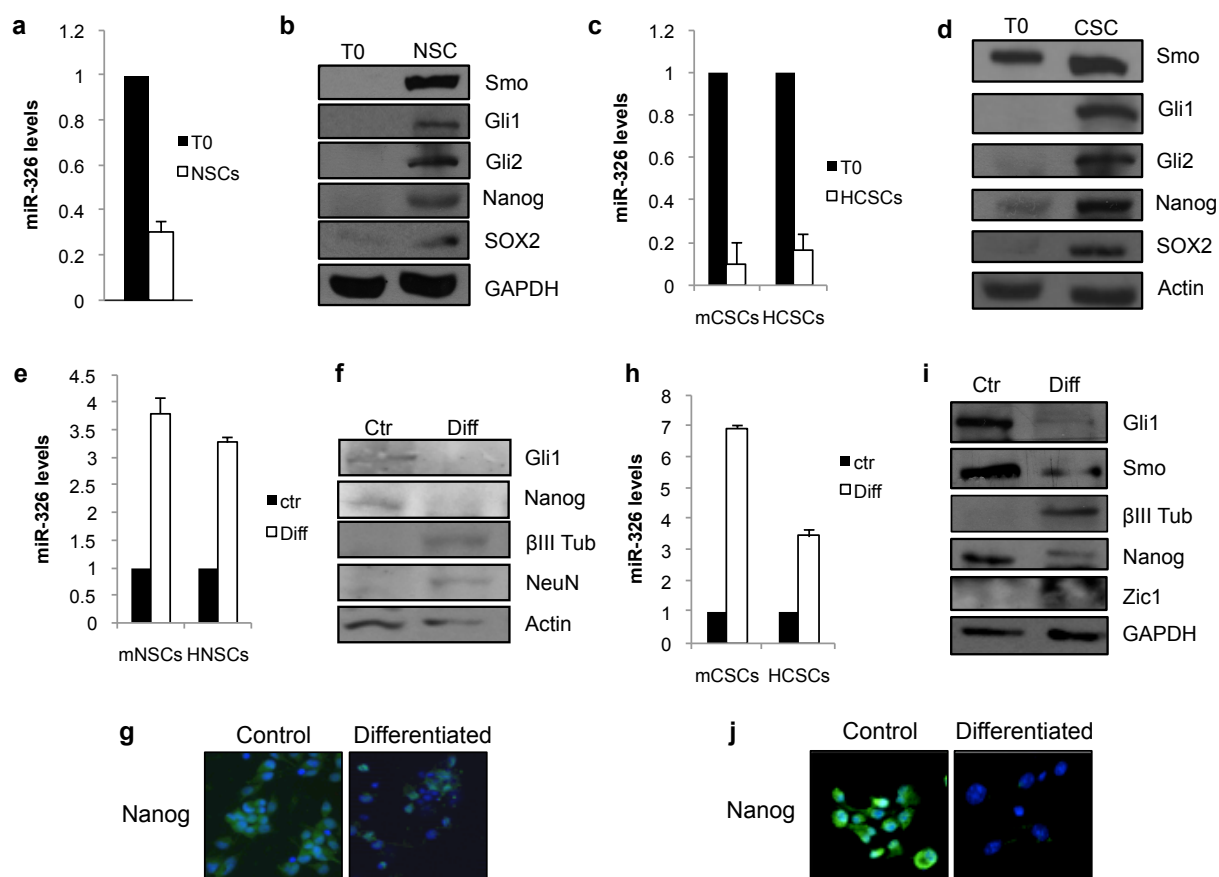
Saggio per EZH2. Reagenti: Buffer di reazione; 50mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1% DMSO. Condizioni di reazione: EZH2: complesso di EZH2 umano (GenBank Accession No. NM\_004456), (amminoacidi 2-end) con tag di istidina N-terminale, MW=86 kDa, EED umano (NM\_003797) (amminoacidi 2-end) con flag-tag N-terminale, MW=51 kDa, SUZ12 umano (NM\_015355) (amminoacidi 2-end) con tag di istidina N-terminale, MW=87 kDa, AEBP2 umano (NM\_153207) (amminoacidi 2-end) con tag di istidina N-terminale, MW=53 kDa e RbAp48 (NM\_005610) (amminoacidi 2-end) con tag di istidina N-terminale, MW=48 kDa, espresse contemporaneamente nel sistema di espressione di baculovirus. Substrato: 5 $\mu$ M istone H3. Donatore di metile: 1  $\mu$ M S-adenosil-L-[metil-<sup>3</sup>H]metionina. Enzima: 100nM di complesso EZH2. Procedura di reazione: preparare la concentrazione di substrato indicata nel buffer di reazione preparato fresco, aggiungere EZH2 alla soluzione di substrato e mischiare gentilmente, aggiungere il composto in DMSO nella mix di reazione di EZH2 utilizzando Acoustic Technology (Echo 550, LabCyte Inc. Sunnyvale, CA) in un range di nanolitri, incubare per 15

minuti, aggiungere la  $^3\text{H-SAM}$  alla mix per iniziare la reazione, incubare per 1 ora a  $30^\circ\text{C}$ , piazzare la miscela di reazione su un filtro di carta per il rilevamento. I dati sono stati analizzati utilizzando Excel e GraphPad Prism 5 software per il fit delle curve  $\text{IC}_{50}$ . S-adenosil-L-omocisteina (SAH) è stata utilizzata come composto di riferimento.

### 5.3. Risultati

#### 5.3.1. L'espressione del microRNA-326 nelle cellule staminali neuronali normali e tumorali.

Come precedentemente descritto, nelle cellule staminali neuronali normali (NSCs) e di medulloblastoma (CSCs) la via del segnale di Hh ha un ruolo non solo come promotore della proliferazione cellulare, bensì anche di controllo trascrizionale dei geni correlati con la staminalità, come Nanog (Po et al, 2010). A causa del ruolo chiave svolto da Hh nel controllo del destino delle cellule staminali neuronali abbiamo voluto indagare la funzione del microRNA-326 in quanto antagonista della via del segnale di Hh (Ferretti et al, 2008). Abbiamo, quindi, analizzato i livelli di espressione del microRNA nelle cellule formanti neurosfere rispetto alla massa cellulare iniziale. Il microRNA-326 risulta, come atteso, poco espresso sia nelle cellule staminali neuronali normali (Figura 18a) in cui sono espressi i marcatori di staminalità e della via del segnale di Hedgehog



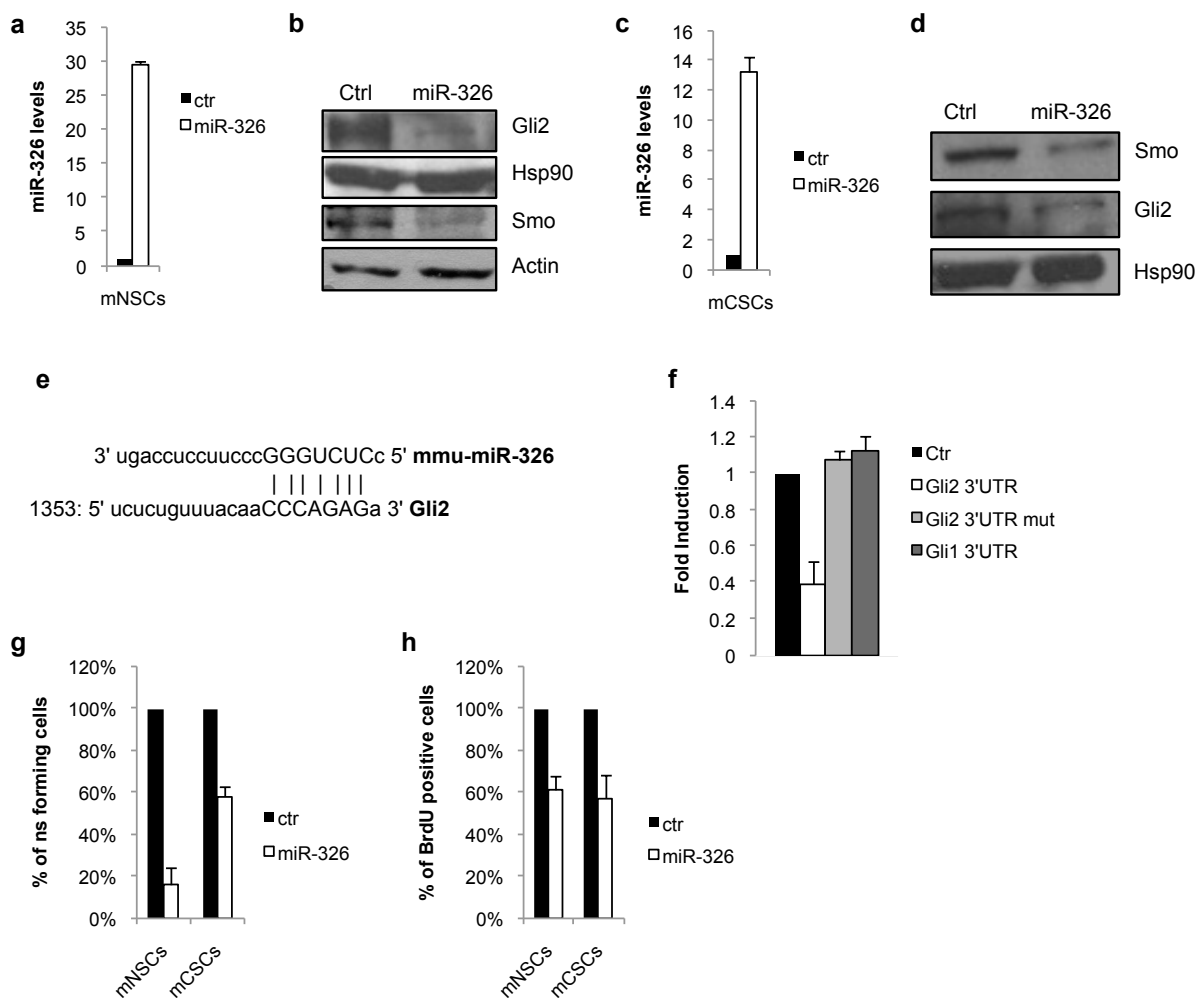
**Figura 18** - Profilo di espressione del microRNA-326. RT-qPCR per valutare i livelli del miR-326 in: a) NSCs rapportate alla massa del cervelletto iniziale, c) nelle CSCs murine ed umane confrontate verso la massa tumorale iniziale. e) NSCs murine ed umane durante il differenziamento. h) CSCs murine ed umane in differenziamento. Analisi in Western Blot per valutare i livelli di espressione dei geni di staminalità in b) NSCs, d) CSCs. Analisi in Western Blot per marcatori di staminalità e differenziamento in f) NSCs e i) CSCs. Analisi di immunofluorescenza del marcatore di staminalità Nanog (verde) in cellule staminali differenziate g) normali j) tumorali, i nuclei sono stati controcolorati con DAPI (blu).

(Figura 18b). Il microRNA-326 è poco espresso anche nelle cellule staminali di medulloblastoma (Figura 18c), in cui, come per le normali, sono presenti i marcatori della via del segnale di Hedgehog e di staminalità (Figura 18d).

Inoltre, quando indotto il differenziamento di tali cellule, è indotta anche l'espressione del microRNA-326. In particolare, con entrambi gli agenti utilizzati, ovvero PDGF e RA (Figura 18f, 18g, 18i, 18j), sia le cellule staminali neuronali normali che di medulloblastoma risultano esprimere marcatori di differenzialmento neuronale contemporaneamente al miR-326 (Figura 18e-j), mentre risulta meno espresso il marcatore di staminalità Nanog (Figura 18g, 18j).

### 5.3.2. Il microRNA-326 controlla la staminalità grazie a due target Smo e Gli2.

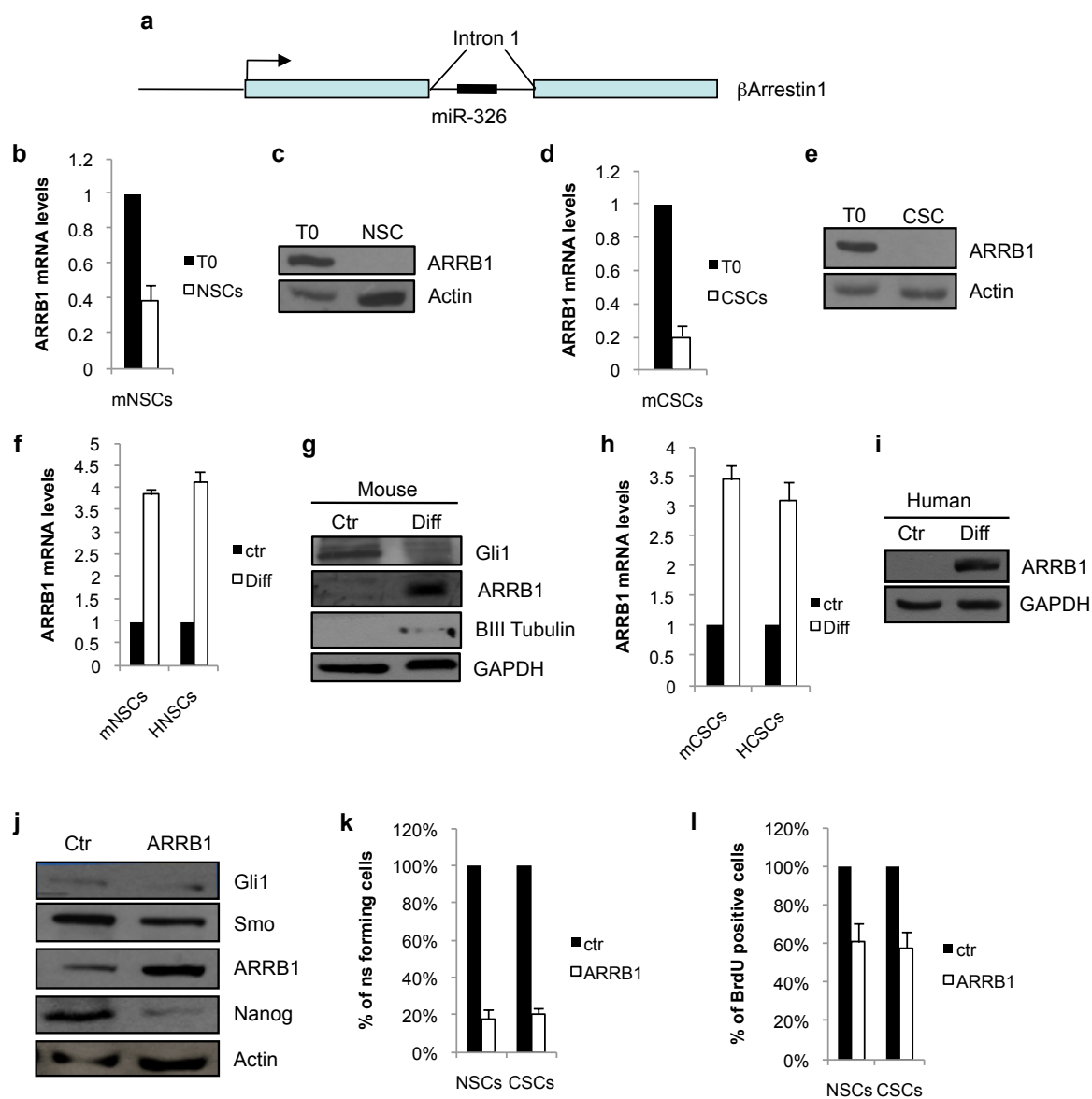
La correlazione inversa tra il microRNA-326 e la via del segnale di Hh ci ha indotti ad indagare il suo ruolo nelle cellule staminali. L'overespressione del microRNA-326 riduce i livelli proteici di Smoothened anche nelle NSCs e CSCs (Figura 19a-d), confermando i dati precedentemente ottenuti nei granuli cerebellari (GCPs) (Ferretti et al, 2008). Inoltre abbiamo osservato una contemporanea diminuzione dei livelli proteici di Gli2.



**Figura 19** - La funzione del microRNA-326. a) RT-qPCR dell'overespressione del microRNA-326 in NSCs. b) Western Blot analisi per Smo e Gli2. c) RT-qPCR dell'overespressione del microRNA-326 nelle CSCs. d) Analisi Western Blot per Smo e Gli2. e) Analisi bioinformatica del legame putativo del miR-326 con Gli2. f) Saggi luciferasici con i costrutti 3'UTR Gli2, 3'UTR Gli2 mutante e 3'UTR Gli1. g) Saggio di clonogenicità effettuato su cellule overesprimenti il miR-326. h) Saggio di captazione di BrdU nelle cellule murine ed umane sia normali che tumorali.

Analizzando ulteriormente i possibili target del microRNA-326 abbiamo evidenziato tramite un'analisi bioinformatica che il 3'UTR del fattore trascrizionale Gli2 è un target putativo del miR-326 (Figura 19e). Quando overespresso il miR-326, difatti, reprime la traduzione del costrutto in cui il 3'UTR di Gli2 è stato fuso alla Renilla luciferasi, come controllo non vi è alcun effetto nel costrutto mutante in cui la regione di legame con il miR-326 è stata deleta oppure utilizzando il costrutto del 3'UTR di Gli1 (Figura 19f).

Data questa peculiarità di bloccare la via del segnale di Hh su due livelli, Smo e Gli2, abbiamo investigato gli effetti dell'overespressione del miR-326 all'interno delle cellule staminali neuronali evidenziando la sua abilità di diminuirne la capacità clonogenica ed il tasso di proliferazione (Figura 19g, 19h), controllando così le proprietà delle cellule staminali grazie al suo intervento sulla via del segnale di Hh.

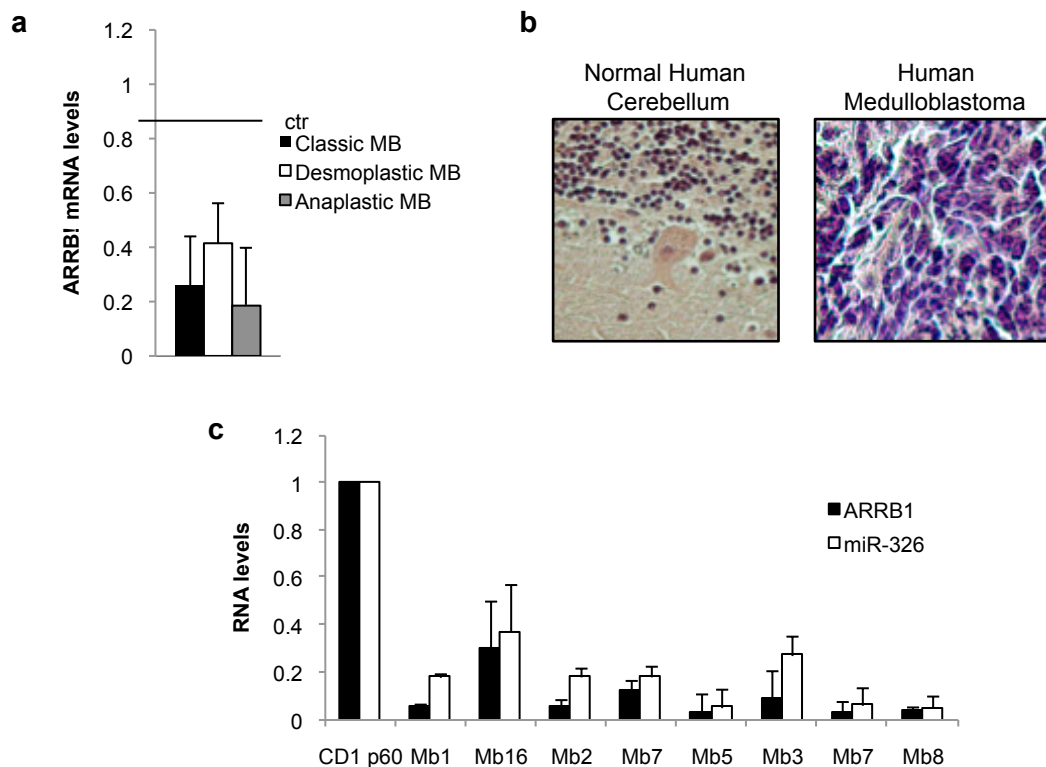


**Figura 20** - Le modulazioni della  $\beta$ -arrestina1. a) Rappresentazione schematica della localizzazione del gene del miR-326 all'interno del gene della  $\beta$ -arrestina1. RT-qPCR dei livelli di  $\beta$ -arrestina1 in b) NSCs; d) CSCs; f) NSCs murine ed umane durante differenziamento; h) in CSCs murine ed umane durante differenziamento. Western Blot analisi per i livelli di ARRB1 in c) NSCs. e) CSCs. g) NSCs durante differenziamento; i) CSCs durante il differenziamento. j) Analisi Western Blot dei livelli di ARRB1 dopo overespressione. k) Saggio di clonogenicit  nelle cellule overesprimenti ARRB1. l) Saggio di captazione di BrdU.

### 5.3.3. La sequenza regolatoria del microRNA-326 è in comune con il suo gene ospitante.

Il gene codificante per il microRNA-326 è localizzato nel primo introne della  $\beta$ -arrestina1 (ARRB1) sia nel topo che nell'uomo e mappa rispettivamente sui cromosomi 7q e 11q (Figura 20a). Come precedentemente ipotizzato in un'analisi predittiva dei promotori di miR intronici (Monteys et al, 2010), il miR-326 non presenta alcuna regione regolatoria specifica, bensì condivide la regolazione con il suo gene ospitante, la  $\beta$ -arrestina1. Difatti, abbiamo osservato che la  $\beta$ -arrestina1 presenta lo stesso pattern di espressione del miR-326, ovvero, i suoi livelli di espressione sono molto bassi nelle NSCs e CSCs (Figura 20b-e) e viene riespressa durante il differenziamento (Figura 20f-i). Inoltre, se overespressa in cellule staminali neuronali (Figura 20j), la  $\beta$ -arrestina1 causa, specularmente al miR-326, una riduzione della capacità clonogenica (Figura 20k) ed una riduzione della proliferazione (Figura 20l).

Abbiamo analizzato l'espressione della  $\beta$ -arrestina1 in campioni umani di medulloblastoma nei quali in precedenza erano stati riscontrati bassi livelli di espressione del miR-326 (Ferretti et al, 2008). La  $\beta$ -arrestina1 risulta debolmente espressa in tutti i campioni analizzati, a riprova della conformità nel pattern di espressione con il miR-326. Tale dato di espressione è stato convalidato inoltre anche in campioni tumorali di medulloblastoma murino (Figura 21c).

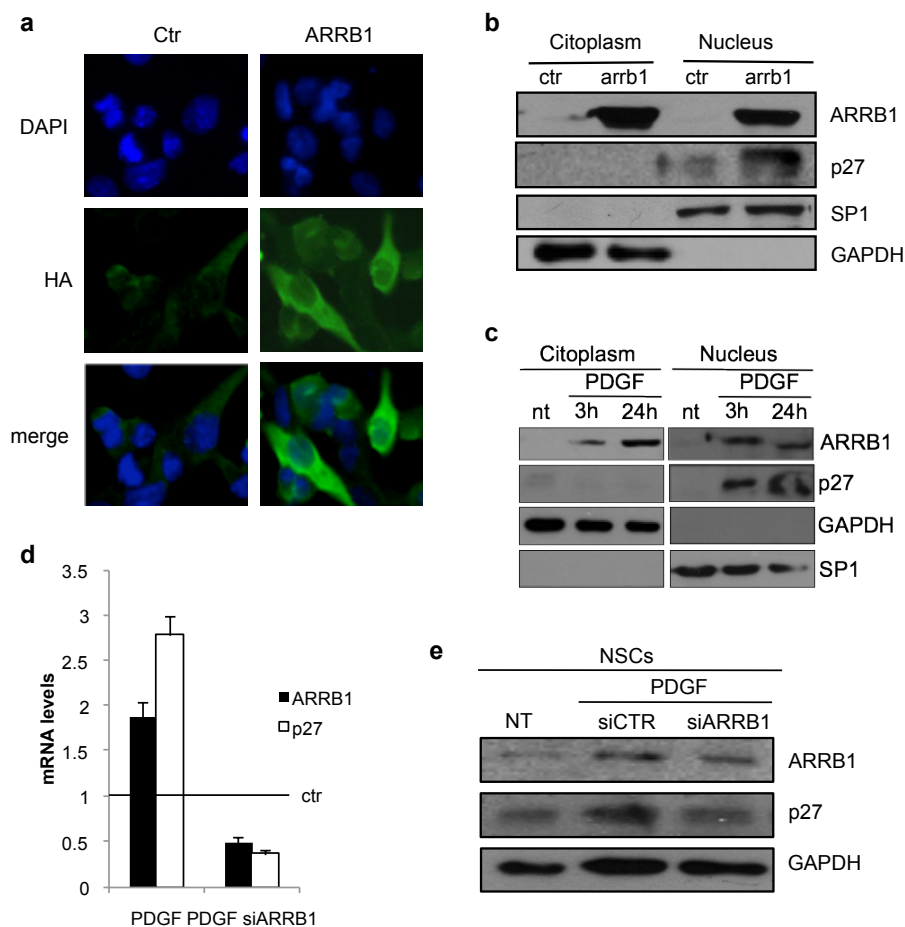


**Figura 21** - L'espressione della  $\beta$ -arrestina1 e del miR-326 nei medulloblastoma. a) RT-qPCR per ARRB1, su 45 campioni umani di medulloblastoma suddivisi in base al grado tumorale. b) Immunoistochimica per ARRB1 su tessuto umano normale (a sinistra) e di medulloblastoma anaplastico (a destra). c) RT-qPCR per ARRB1 e miR-326 sui campioni di medulloblastoma murini.

### 5.3.4. La $\beta$ -arrestina1 regola negativamente la proliferazione delle cellule staminali.

Studi precedenti hanno rivelato la funzione della  $\beta$ -arrestina1 come proteina shuttle tra citoplasma e nucleo. Proprio nel nucleo svolge la sua funzione come regolatore trascrizionale dell'inibitore

ciclina-dipendente p27, inducendone l'espressione e causando, quindi, l'arresto del ciclo cellulare (Kang et al, 2005; Parathath et al, 2010). Considerato tale ruolo in altri sistemi cellulari, abbiamo dimostrato che quando overespressa nelle NSCs,  $\beta$ -arrestina1 migra nel nucleo ed attiva p27 (Figura 22a, 22b).

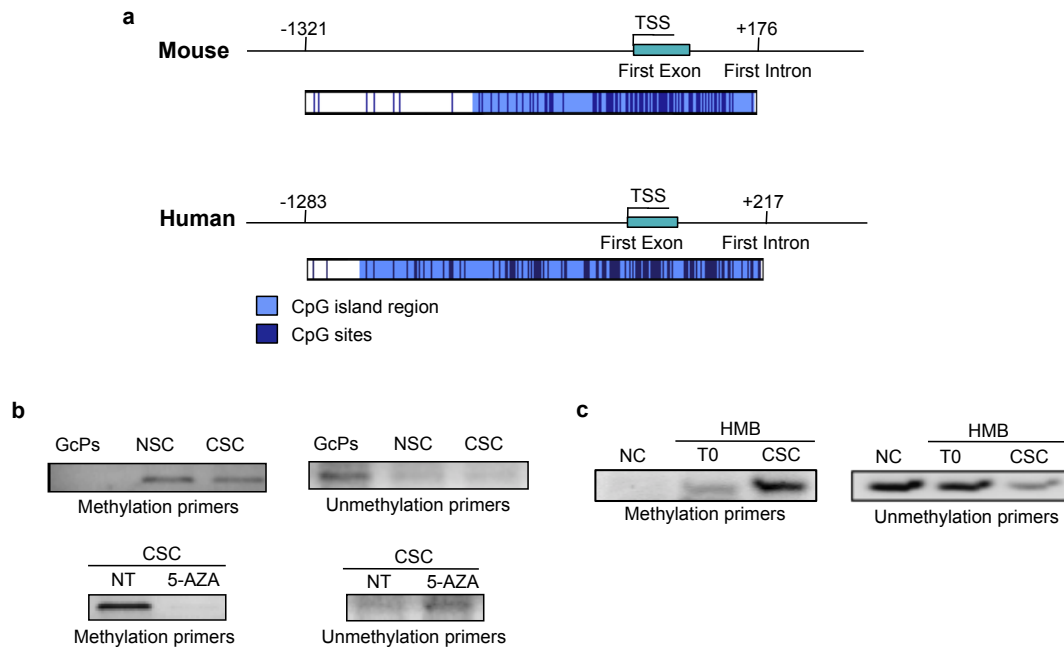


**Figura 22** - La funzione della  $\beta$ -arrestina1. a) Immunofluorescenza per ARR1, in verde, in cellule overesprimenti ARR1 e nel controllo. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI, in blu. b) Analisi Western Blot in estratti citoplasmatici e nucleari di NSCs per evidenziare la sublocalizzazione cellulare della ARR1 e la sua capacit  di indurre p27. c) Analisi Western Blot per la localizzazione nucleare della ARR1 e p27 durante differenziamento. d) RT-qPCR per ARR1 e p27 durante il differenziamento in cellule wt e silenziate per ARR1. e) Western Blot analisi per confermare la riduzione di espressione di ARR1 e p27 nelle cellule silenziate rispetto al controllo.

Abbiamo, inoltre, riprodotto tale dato nel sistema pi  fisiologico del differenziamento delle cellule staminali e difatti, la  $\beta$ -arrestina1 si accumula progressivamente nel nucleo durante il differenziamento, contemporaneamente a p27 (Figura 22c). Come controllo abbiamo silenziato la  $\beta$ -arrestina1 durante il differenziamento ed effettivamente vi   una diminuzione di p27 dove la  $\beta$ -arrestina1 viene meno (Figura 22d, 22e), confermando la funzione della  $\beta$ -arrestina1 nel blocco del ciclo cellulare anche nelle NSCs e CSCs. Pertanto, i due geni, miR-326 e  $\beta$ -arrestina1, utilizzano meccanismi diversi per raggiungere il fine comune di bloccare la proliferazione delle cellule staminali neuronali normali e tumorali.

### 5.3.5. Il primo livello di repressione trascrizionale: la metilazione del DNA.

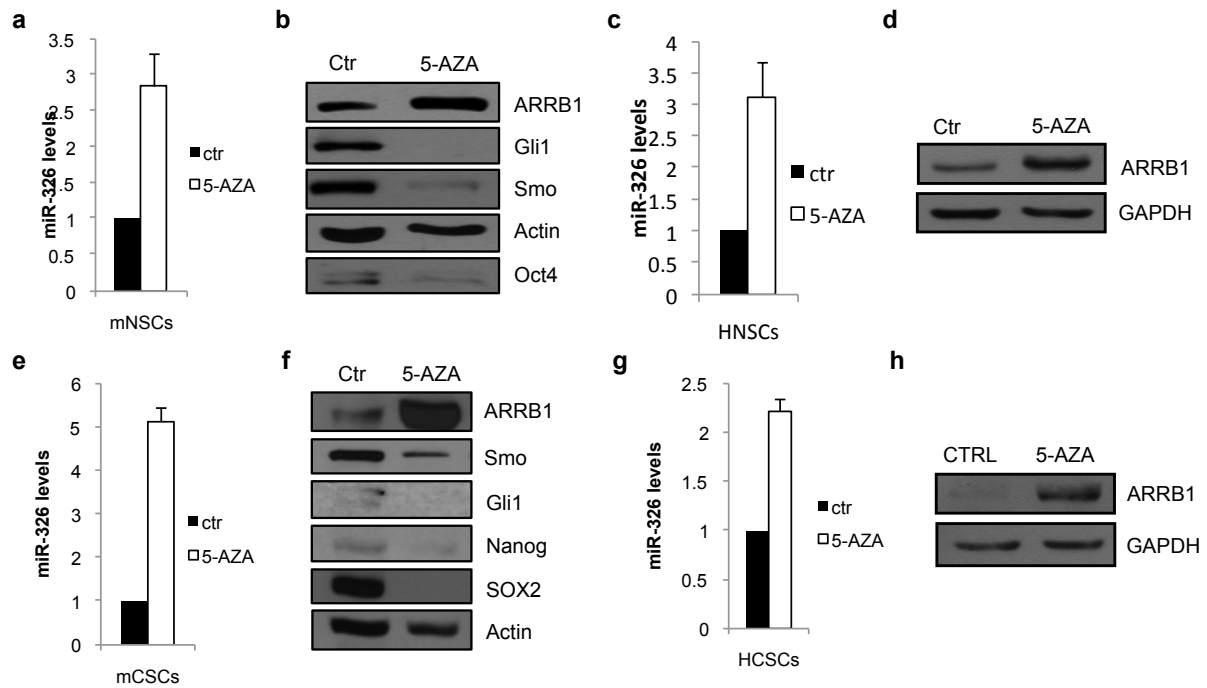
La capacit  dei due geni miR-326 e ARR1 di competere con la proliferazione e la staminalit  delle NSCs e CSCs ci ha portati a studiare la regione regolatoria dei due geni, per poter comprendere ed



**Figura 23** - La metilazione delle isole CpG. a) Rappresentazione schematica delle regioni regolatorie dei geni *ARRB1* e *miR-326* con la presenza delle isole CpG ottenuta tramite analisi con *DBCAT* software. b) PCR dopo trattamento bisulfito con due coppie differenti di primers, per la metilazione (a sinistra) e per la non metilazione (a destra). Nel pannello superiore vengono mostrati i granuli cerebellari, NSCs e CSCs. Nel pannello inferiore sono riportate le CSCs trattate con 5-AZA. c) PCR dopo trattamento bisulfito su campioni umani (NC=cervelletto normale), primers metilati (a sinistra) e non metilati (a destra).

eventualmente modulare la loro trascrizione. La regione regolatoria individuata spazia dal promotore fino a parte del primo introne; in tale regione abbiamo notato diverse isole CpG sia nel gene murino che umano (*Figura 23a*). Tale evidenza ha suggerito un possibile ruolo della metilazione nella regolazione trascrizionale di questi geni. Per tale motivo abbiamo investigato lo stato di metilazione delle isole CpG tramite PCR dopo trattamento con bisulfito. Questi esperimenti hanno evidenziato la presenza di isole metilate in entrambe le regioni regolatorie di topo e di uomo (*Figura 23b, 23c*). Abbiamo, infatti, evidenziato isole metilate nelle NSCs e CSCs murine che vengono eliminate in seguito al trattamento con l'agente demetilante 5'-aza-2'-deossycytidine (5-AZA) (*Figura 23b*). Isole metilate sono state riscontrate anche in CSCs umane, mentre sono assenti nel cervelletto normale (NC) (*Figura 23c*).

A conferma del ruolo chiave svolto dalla metilazione nella regolazione trascrizionale della  $\beta$ -arrestina1 e del *miR-326*, entrambi i geni vengono indotti in seguito al trattamento con l'agente demetilante 5-AZA (*Figura 24a-h*).



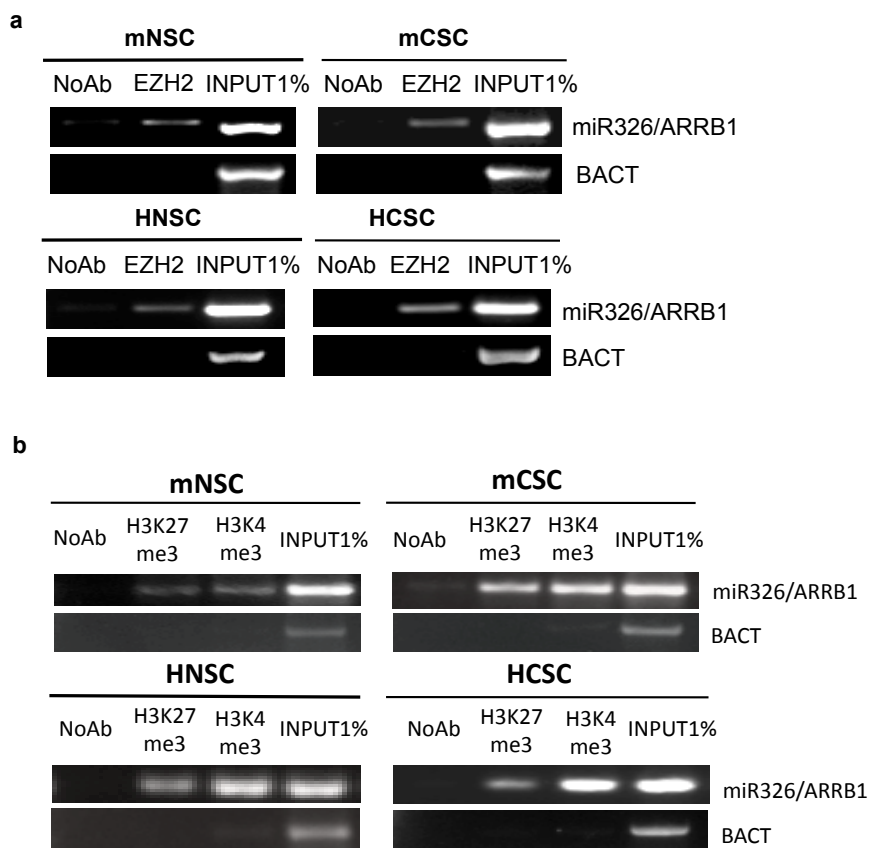
**Figura 24** - L'agente demetilante 5-AZA. RT-qPCR per miR-326 in a) NSCs murine; c) NSCs umane; e) CSCs murine; g) CSCs umane. Western Blot analisi per i livelli di ARRBB1 dopo trattamento con 5-AZA in b) NSCs murine; d) NSCs umane; f) CSCs murine; h) CSCs umane. Nelle stesse cellule sono stati analizzati i livelli dei marcatori di staminalità e della via del segnale di Hedgehog quali Gli1, Smo, Oct4, Nanog, Sox2.

### 5.3.6. Il secondo livello di repressione trascrizionale: il dominio bivalente.

Precedentemente è stato dimostrato che la metilazione nelle isole CpG correla con la presenza della proteina del complesso Polycomb 2 (PRC2), Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2) ed è stata dimostrata l'associazione di questa proteina con le DNA metil-transferasi (Viré et al, 2006). Alla luce di tale relazione abbiamo investigato la presenza sul nostro promotore di EZH2 che, difatti, risulta presente in tutti i modelli di cellule staminali utilizzati (Figura 25a).

La proteina EZH2 è direttamente coinvolta nella trimetilazione della lisina 27 sull'istone H3 (H3K27me3); tale marcatore istonico è un repressore trascrizionale e fa parte del binomio repressorio caratteristico delle cellule staminali, il dominio bivalente (Bernstein BE et al, 2006; Azuara V et al, 2006). Abbiamo, quindi, investigato la presenza dei marcatori istonici caratteristici del dominio bivalente, H3K27me3 e H3K4me3, sulla regione regolatoria di  $\beta$ -arrestina1 e miR-326. I nostri risultati evidenziano che tali geni sono sotto il controllo di un dominio bivalente (Figura 26b) e quindi si trovano in uno stato di repressione ma sono pronti per essere attivati precocemente durante lo sviluppo e il differenziamento.





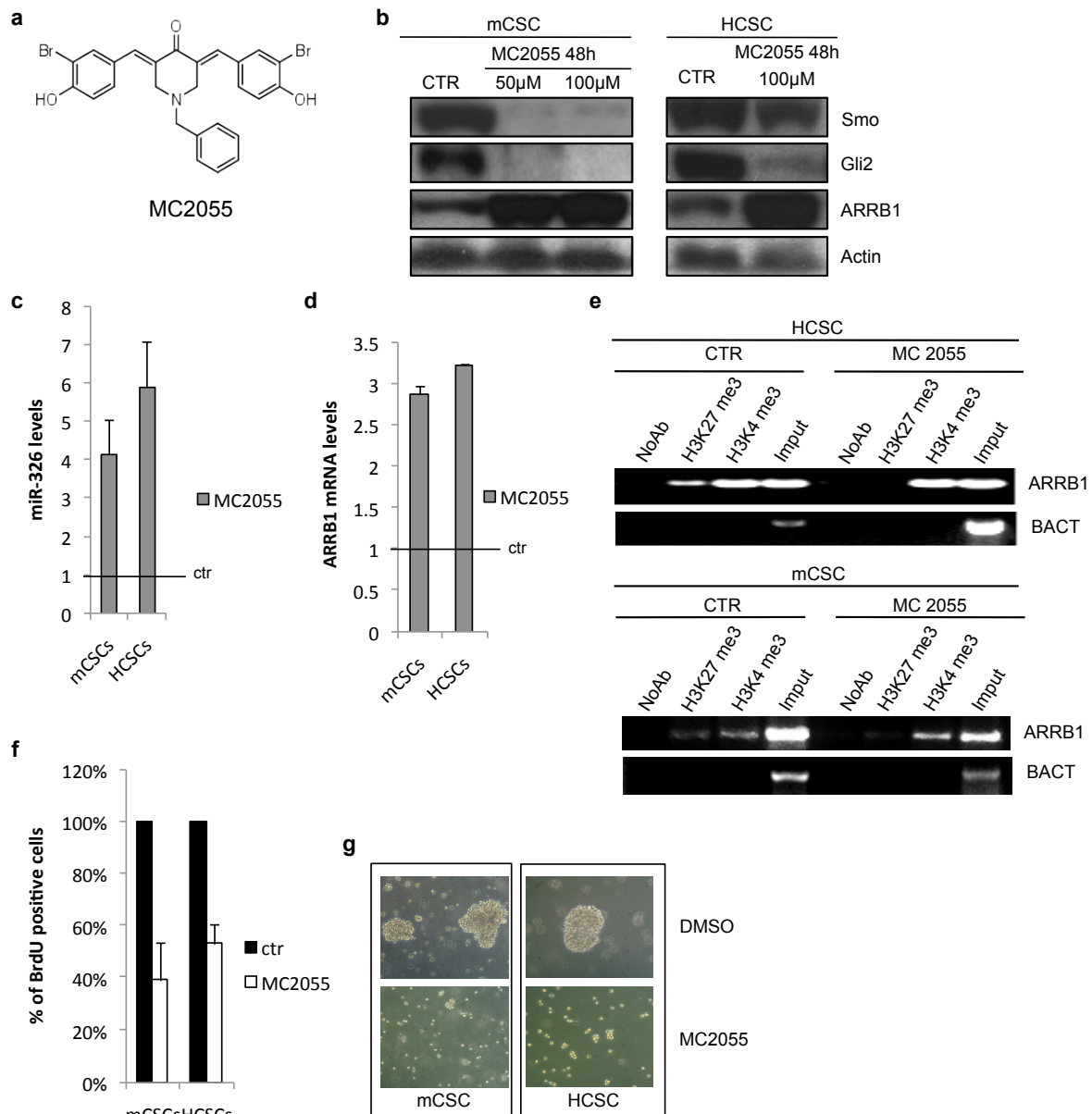
**Figura 25** - Il dominio bivalente. Analisi tramite ChIP della regione regolatoria di ARRB1 e miR-326. Il controllo dell'esperimento è stato effettuato tramite primers sulla  $\beta$ -actina (BACT). a) ChIP per la presenza di EZH2. b) ChIP per i marcatori istonici del dominio bivalente, H3K27me3 e H3K4me3.

### 5.3.7. Modulare l'espressione di $\beta$ -arrestina1 e microRNA-326 nelle cellule staminali tumorali.

Per modulare l'espressione di  $\beta$ -arrestina1 e miR-326 nelle cellule staminali neuronali di medulloblastoma, abbiamo utilizzato un farmaco precedentemente descritto come inibitore di CARM1 (Cheng et al, 2011). Grazie alla sua stretta somiglianza con alcuni inibitori di EZH2 recentemente descritti (Valente et al, 2012), il (3E,5E)-1-benzil-3,5-bis(3bromo-4-idrossibenzilidene)piperidina-4-one (MC2055) (Figura 26a) è stato testato come inibitore di EZH2 ed è stato riscontrato che tale composto inibisce EZH2 ad una concentrazione micromolare ( $IC_{50} = 9.9 \mu M$ ).

Il composto MC2055 è stato utilizzato per trattare le cellule staminali tumorali sia umane che murine mostrando un incremento della  $\beta$ -arrestina1 e del miR-326 (Figura 26b-d). Il trattamento delle cellule con il composto MC2055 causa la risoluzione del dominio bivalente portando all'espressione dei due geni. Infatti, nella regione regolatoria di  $\beta$ -arrestina1 e miR-326, dopo trattamento con MC2055, non è più presente il marcatore istonico H3K27me3 (Figura 26e).

Coerentemente con gli effetti dei due geni all'interno del sistema cellulare staminale, il trattamento con MC2055 causa una diminuzione della proliferazione (Figura 26f, 26g).



**Figura 26** - Il composto MC2055 e la modulazione del dominio bivalente. a) Formula chimica del composto MC2055. b) Analisi Western Blot dopo trattamento delle CSCs con MC2055 dei livelli di espressione delle proteine Smo, Gli2 e ARRB1. Livelli di RNA dopo trattamento con il farmaco in c) dei microRNA-326, in d) della ARRB1. e) ChIP per i marcatori del dominio bivalente dopo trattamento con il composto MC2055. f) Saggio di captazione di BrdU. g) Foto al microscopio in contrasto di fase che evidenzia la sofferenza delle CSCs dopo trattamento con MC2055.

## 5.4. Discussione

Meccanismi aberranti di sviluppo neuronale e cerebellare possono portare alla formazione del medulloblastoma, il più frequente tumore cerebrale maligno in età infantile. In tale neoplasia si può riscontrare un'attivazione anomala della via del segnale di Hedgehog come conseguenza di cambiamenti genetici ed epigenetici che colpiscono vari componenti della via del segnale. Negli ultimi anni è stato proposto un modello gerarchico per l'evoluzione del cancro, in cui le *cancer stem cells* (CSCs) acquisiscono o mantengono le proprietà di auto-rinnovamento, multipotenza e di generazione di un tumore. Tale modello ha trovato applicazione anche nel medulloblastoma in

quanto sono state osservate CSCs sia in topo che in uomo (Po et al, 2010). Inoltre, è stato possibile dimostrare la correlazione tra la via del segnale di Hedgehog e tali cellule tumorali (Po et al, 2010) la cui presenza può comportare una maggior resistenza alle terapie classiche e probabilità di recidiva.

Studi precedenti hanno dimostrato che i microRNA svolgono un ruolo essenziale nell'influenzare la tumorigenesi del medulloblastoma. Grazie alle loro abilità di controllare molteplici target e di inibire alcune tra le maggiori vie del segnale, è stato dimostrato che i microRNA sono in grado di indurre apoptosi e ripristinare la sensibilità ai chemioterapici in linee cellulari di medulloblastoma (Weeraratne et al. 2011; Grazia et al, 2009). Il microRNA-326 è già stato descritto essere assente nelle patologie tumorali cerebrali e coinvolto nella modulazione di vie del segnale quali Hedgehog e Notch (Ferretti et al, 2008; Kefas et al, 2009; Kefas et al, 2010). In particolar modo, è stato descritto come interagisca con la via del segnale di Hedgehog modulando negativamente l'espressione del recettore attivatorio Smo nei granuli cerebellari (Ferretti et al, 2008).

Durante mio lavoro di dottorato abbiamo dimostrato come il microRNA-326 svolga un'azione repressoria della via del segnale di Hedgehog anche nelle cellule staminali neuronali, non solo attraverso l'abbattimento proteico di Smo, bensì anche attraverso la modulazione del fattore trascrizionale Gli2, essenziale per l'attività trascrizionale di Hedgehog. Inoltre abbiamo osservato come esso sia in grado di reprimere la proliferazione e la capacità clonogenica di tali cellule, sottolineando un'eventuale applicazione come target terapeutico nel medulloblastoma.

Il miR-326 è localizzato all'interno del gene della  $\beta$ -arrestina1, con cui condivide il promotore. La  $\beta$ -arrestina1 agisce inducendo un blocco proliferativo grazie alla sua azione di attivatore trascrizionale per p27 (Kang et al, 2005; Parathath et al, 2010). I nostri dati indicano che la  $\beta$ -arrestina1 svolge tale funzione anche nelle cellule staminali neuronali. Inoltre, tale gene è anch'esso in grado di diminuire la capacità proliferativa e clonogenica delle cellule staminali. Abbiamo, quindi, dimostrato l'importanza dei due geni, miR-326 e  $\beta$ -arrestina1, nelle cellule staminali neuronali dove, pur adottando strategie diverse, sono entrambi in grado di reprimere la proliferazione e la capacità clonogenica.

Abbiamo dimostrato che la bassa espressione dei due geni è una caratteristica non solo delle cellule staminali neuronali normali e tumorali, ma è conservata anche nella massa tumorale. Difatti i livelli del miR-326 e della  $\beta$ -arrestina1 sono bassi in tutti i campioni analizzati, l'andamento, inoltre, sembra propendere per una più marcata diminuzione nei medulloblastoma anaplastici, seppur non è stato possibile accertarne la significatività a causa del numero ridotto di campioni analizzati. Sarà pertanto fondamentale confermare questo dato ampliando la casistica dei campioni analizzati.

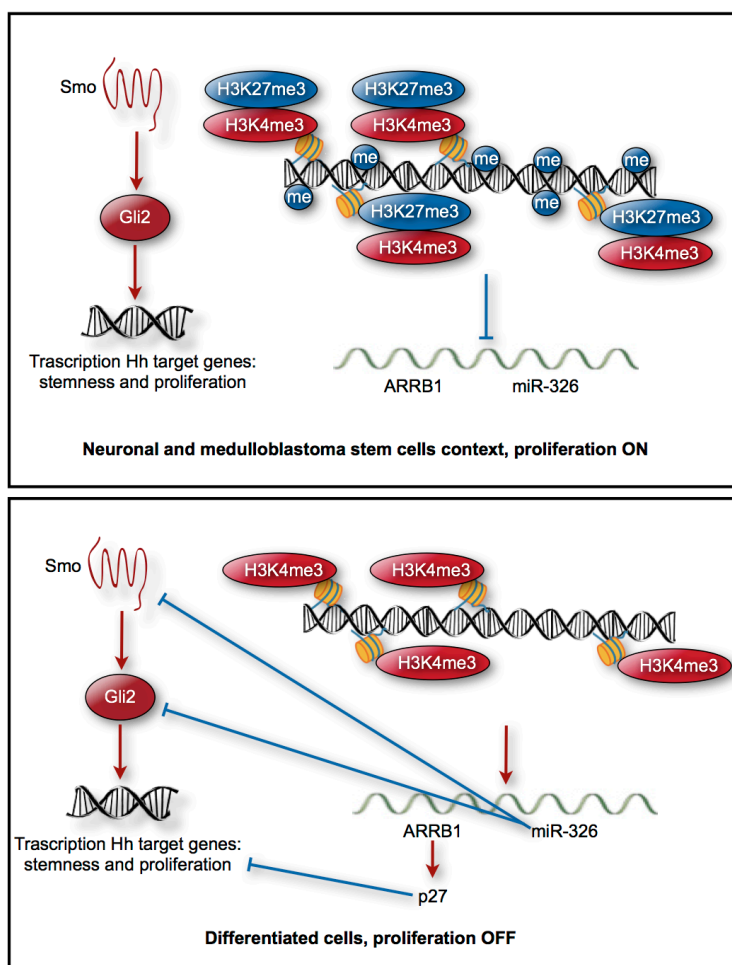
È noto in letteratura che le delezioni interessanti la regione genica della  $\beta$ -arrestina1 e del miR-326 sono presenti solo in bassa percentuale, il 25% dei casi di medulloblastoma (Michiels et al, 2002; Yin et al, 2001). Tale evidenza trova conferma nello screening da noi effettuato (dati non mostrati) in cui, in accordo con la letteratura, la delezione sul cromosoma 11q è presente solo nel 24% dei casi, quindi non è in grado di spiegare l'assenza dei due geni osservata in tutti i casi analizzati.

I nostri dati indicano che i ridotti livelli di espressione del microRNA-326 e della  $\beta$ -arrestina1 nelle cellule staminali neuronali sono dovuti principalmente a due meccanismi: la metilazione del DNA nelle isole CpG e la presenza di un dominio bivalente sulla regione regolatoria dei due geni.

La presenza di isole CpG metilate nella regione regolatoria dei due geni, nonché l'induzione di  $\beta$ -arrestina1 e miR-326 dopo trattamento con 5-AZA indicano chiaramente che i due geni sono regolati epigeneticamente tramite metilazione del DNA nelle isole CpG. Tale metilazione è

estremamente marcata nel comparto delle cellule staminali, presente nella massa tumorale e completamente assente nel cervelletto normale. La repressione trascrizionale dei due geni che avviene nel medulloblastoma ricorda, quindi, la repressione che viene effettuata nelle cellule staminali al fine di bloccare il differenziamento.

A conferma della nota correlazione tra pattern cromatinici ed ipermetilazione nel cancro, ampiamente discussa in letteratura (Ohm et al. 2007; Schlesinger et al. 2007; Widschwendter et al. 2007), abbiamo dimostrato, inoltre, che lo stato della configurazione della cromatina associato con la regione regolatoria del miR-326 e  $\beta$ -arrestina1 è mantenuto in uno stato bivalente sia nelle NSCs che nelle CSCs, dimostrando l'importanza dei due geni nello sviluppo e nel differenziamento



**Figura 27** - Schema rappresentativo dei meccanismi di inibizione. Il pannello superiore rappresenta uno stato cellulare di attiva proliferazione in cui la cellula staminale mantiene la via del segnale di Hedgehog attiva mentre reprime il miR-326 e la  $\beta$ -arrestina1. Il pannello inferiore rappresenta lo stato di una cellula differenziata che mantiene la via del segnale di Hedgehog repressa mentre esprime i geni miR-326 e  $\beta$ -arrestina1.

neuronale e giustificando l'ipermetilazione osservata nel tumore.

Il modello da noi sviluppato riguardo la repressione trascrizionale che avviene sui geni miR-326 e  $\beta$ -arrestina1 comporta la presenza del dominio bivalente e la metilazione del DNA in cellule proliferanti; in seguito a differenziamento il dominio bivalente si risolve lasciando sul promotore solamente il marcatore attivatorio H3K4me3 con conseguente assenza di metilazione (Figura 27a, 27b).

Alla luce del modello proposto abbiamo dimostrato che la modulazione dell'espressione del miR-326 e della  $\beta$ -arrestina1 avviene tramite la risoluzione del dominio bivalente, evocando un

ma non delle cellule differenziate e, inoltre, le cellule staminali neuronali derivanti dal cervelletto sono esaurite nel primo periodo di vita post-natale (13 giorni dopo la nascita per il topo, dati non mostrati).

Infatti, il composto MC2055, inibitore di EZH2, è in grado di determinare la risoluzione del dominio bivalente causando un'attivazione della trascrizione del miR-326 e della  $\beta$ -arrestina1 e, conseguentemente, il blocco proliferativo. È importante sottolineare come un simile trattamento possa essere di aiuto in un'eventuale chemioterapia post-operatoria, al fine di diminuire il numero di recidive agendo direttamente sulle cellule staminali tumorali. Sono, ovviamente, necessari studi successivi su modelli animali in modo da stabilire se il composto sia in grado di mantenere queste sue abilità anche su tumori *in vivo*, senza causare una tossicità elevata sul tessuto normale.

## Bibliografia

- Ahn S, Joyner AL (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic Hedgehog. *Nature* 437: 894–897
- Altman J, Bayer SA. 1997. Development of the cerebellar system in relation to its evolution, structure, and function. New York: CRC Press
- Angot E, Loulier K, Nguyen-Ba-Charvet K, T. Gadeau A, P. Ruat M, and Traiffort E. (2008) Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells* 26, 2311–2320
- Anokye-Danso, F, Trivedi, C.M, Juhr, D, Gupta, M, Cui, Z, Tian, Y, Zhang, Y, Yang, W, Gruber, P.J, Epstein, J.A, Morrisey, E.E. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376e388.
- Ayrault O, Zindy F, Reh J, Sherr C.J, Roussel M.F. (2009) Two tumor suppressors, p27Kip1 and Patched-1, collaborate to prevent medulloblastoma. *Mol. Cancer Res.* 7: 33–40
- Apionishev S, Katanayeva NM, Marks SA, Kalderon D, Tomlinson A. (2005) Drosophila Smoothed phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nature Cell. Biol.* 7:86-92
- Aspöck, G, Kagoshima, H, Niklaus, G, and Burglin, T. (1999) Caenorhabditis elegans has scores of hedgehog-related genes: Sequence and expression analysis. *Genome Res.* 9: 909–23
- Azuara V, Perry P, Sauer S, Spiyakoy M, Jørgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merkschlager M, Fisher AG. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol.* 8(5):532-8. Epub 2006 Mar 29.
- Babashah S, Sadeghizadeh M, Hajifathali A, Tavirani MR, Zomorod MS, Ghadiani M, Soleimani M. (2013). Targeting of the signal transducer Smo links microRNA-326 to the oncogenic Hedgehog pathway in CD34+ CML stem/progenitor cells. *Int J Cancer* 1;133(3):579-89. doi: 10.1002/ijc.28043. Epub 2013 Mar 13.
- Bai AH, Milde T, Remke M, Rolli CG, Hielscher T, Cho YJ, Kool M, Nortchott PA, Jugold M, Bazhin AV, Eicmüller SB, Kulozik AE, Pscherer A, Benner A, Taylor MD, Pomeroy SL, Kemkemmer R, Witt O, Korhunoy A, Lichter P, Pfister SM. (2012). MicroRNA-182 promotes leptomeningeal spread of non-sonic hedgehog-medulloblastoma. *Acta Neuropathol.* 123:529–38.
- Balordi F, and Fishell G. (2007) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J. Neurosci.* 27, 5936–5947
- Bapat SA, Jin V, Berry N, Balch C, Sharma N, Kurrey N, Zhang S, Fang F, Lan X, Li M, Kennedy B, Bigsby RM, Huang TH, Nephew KP. (2010). Multivalent epigenetic marks confer microenvironment-responsive epigenetic plasticity to ovarian cancer cells. *Epigenetics.* 5(8):716-29. Epub 2010 Nov 1.
- Basler, K. and Struhl, G. (1994) Compartment boundaries and the control of Drosophila limb pattern by Hedgehog protein. *Nature* 368: 208–214
- Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW. 1996. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:353–356
- Berman D.M, Karhadkar S.S, Hallahan A.R, Pritchard J.I, Eberhart C.G, Watkins D.N, Chen J.K, Cooper M.K, Taipale J, Olson J.M, Beachy P.A. (2002) Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297: 1559–1561
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 125(2):315-26.

- Bijlsma M.F. Speck CA, Zivkovic D, Van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP. (2006) Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol.* Jul;4(8):e232.
- Brandt WF, Strickland WN, Strickland M, Carlisle L, Woods D, Von Holt C. (1979). A histone programme during the life cycle of the sea urchin. *Eur J Biochem.* 94(1):1-10
- Buttitta, L. Mo, R. Hui, C.C. and Fan, C.M. (2003). Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* 130, 6233–6243
- Canettieri G, Di Marcotullio L, Greco A, Coni S, Antonucci L, Infante P, Pietrosanti L, De Smaele E, Ferretti E, Miele E, Pelloni M, De Simone G, Pedone EM, Gallinari P, Giorgi A, Steinkuhler C, Vitagliano L, Pedone C, Schininà ME, Screpanti I et Gulino A. (2010) Histone deacetylase and Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation. *Nat Cell Biol* 12: 132–142
- Casparly, T. Larkins, C.E. Anderson, K.V. (2007) The graded response to sonic hedgehog depends on cilia architecture. *Dev. Cell* 12, 767–778
- Chamberlain, C.E. Jeong, J. Guo, C. Allen, B.L. and McMahon, A.P. (2008). Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Development* 135, 1097–1106
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643–655
- Charytoniuk D. Traiffort E. Hantraye P. Hermel J. M. Galdes A. and Ruat M. (2002) Intrastratial sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2351–2357
- Chen, W. Ren, X.R. Nelson, C.D. Barak, L.S. Chen, J.K. Beachy, P.A. de Sauvage, F. and Lefkowitz, R.J. (2004). Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* 306, 2257–2260
- Cheng D, Valente S, Castelano S, Sbardella G, Di Santo R, Costi R, Bedford MT, Mai A. (2011). Novel 3,5-bis(bromohydroxybenzylidene)piperidin-4-ones as coactivator-associated arginine methyltransferase 1 inhibitors: enzyme selectivity and cellular activity. *J Med Chem.* 54(13):4928-32. doi: 10.1021/jm200453n.
- Cheng, S.Y. and Bishop, J.M. (2002). Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5442–5447
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407–413
- Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A (2007) HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* 17: 165–172
- Corbit, K.C. Aanstad, P. Singla, V. Norman, A.R. Stainier, D.Y. Reiter, J.F. (2005) Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018–1021
- Corcoran, R.B. and Scott, M.P. (2006). Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8408–8413
- Corrales J.M.D. Blaess S. Mahoney E.M. and Joyner A. (2006). The level of Sonic Hedgehog signaling complexity of cerebellar foliation. *Development* 133, 1811-1821
- Cortellino, S. Wang, C. Wang, B. Bassi, M.R. Caretti, E. Champeval, D. Calmont, A. Jarnik, M. Burch, J. Zaret, K.S. Larue, L. Bellacosa, A. (2009) Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the sonic hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene *Ift122/Wdr10*, partially overlapping with the DNA repair gene *Med1/Mbd4*. *Dev. Biol.* 325, 225–237
- Croce, C.M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 10, 704e714.
- Dahmane N, Ruiz i Altaba A (1999) Sonic Hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126:3089–3100

- Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, Weiner H, Ruiz i Altaba A. 2001. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128:5201–5212
- Denef, N. Neubuser, D. Perez, L. and Cohen, S.M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* 102, 521–531
- Deshpande, G. Swanhart, L. Chiang, P. and Schedl, P. (2001) Hedgehog signaling in germ cell migration. *Cell* 106: 759–769
- De Smaele E. Di Marcotullio L. Ferretti E. Screpanti I. Alesse E. Gulino A. (2004). Chromosome 17p deletion in human medulloblastoma. A missing checkpoint in the Hedgehog Pathway. *Cell Cycle* 3:10, e111-e-114
- Diaz-Benjumea, F.J. Cohen, B. and Cohen, S.M. (1994) Cell interaction between compartments establishes the proximal–distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* 372: 175–179
- Dillon N. (2012). Factor mediated gene priming in pluripotent stem cells sets the stage for lineage specification. *Bioessays*. 34(3):194-204. doi: 10.1002/bies.201100137. Epub 2012 Jan 13.
- Di Marcotullio L, Ferretti E, Greco A, De Smaele E, Po A, Sico MA, Alimandi M, Giannini G, Maroder M, Screpanti I, Gulino A (2006) Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol* 8: 1415–1423
- Doetsch F. Caille, I. Lim, D. A. Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716
- Dominguez, M. (1999) Dual role for Hedgehog in the regulation of the proneural gene *atonal* during ommatidia development. *Development* 126: 2345–2353
- Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z, Pei G. (2009). MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 10(12):1252-9. doi: 10.1038/ni.1798. Epub 2009 Oct 18
- Dwyer, J.R. Sever, N. Carlson, M. Nelson, S.F. Beachy, P.A. and Parhami, F. (2007). Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J. Biol. Chem.* 282, 8959–8968
- Eberhart C.G. (2007) In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 18: 59–69
- Echelard, Y. Epstein, D.J. St-Jacques, B. Shen, L. Mohler, J. McMahon, J.A. and McMahon, A.P. (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417–1430
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87:661–673
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. (2006). Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6:259–69.
- Evans D.G. Farndon P.A. Burnell L.D. Gattamaneni H.R. Birch J.M. (1991) The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma, *Br. J. Cancer* 64: 959–961
- Farzan, S.F. Ascano, M. Jr. Ogden, S.K. Sanial, M. Brigui, A. Plessis, A. and Robbins, D.J. (2008). Costal2 Functions as a Kinesin-like Protein in the Hedgehog Signal Transduction Pathway. *Curr. Biol.* 18, 1215–1220
- Favaro R. Valotta M. Ferri A. L. Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V, Nicolis SK. (2009) Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat. Neurosci.* 12, 1248–1256
- Feinberg AP, Tycko B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4(2):143-53.
- Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. (2003). *Nature* 421(6921):448-53



- Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, Paganelli A, Di Marcotullio L, Caffarelli E, Screpanti I, Bozzoni I, Gulino A. (2008) Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J.* 27: 2616–2627
- Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, Di Rocco C, Ricciardi R, Giangaspero F, Farcomeni A, Nofroni I, Laneve P, Gioia U, Caffarelli E, Bozzoni I, Screpanti I, Gulino A. (2009). MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer.* Feb 1;124(3):568-77. doi: 10.1002/ijc.23948
- Forbes, A.J. Lin, H. Ingham, P.W. and Spradling, A.C. (1996) Hedgehog is required for the proliferation and specification of somatic cells during egg chamber assembly in *Drosophila* oogenesis. *Development* 122: 1125–1135
- Galvin K. E. Ye H. Erstad D. J. Feddersen R. and Wetmore C. (2008) Gli1 induces G2/M arrest and apoptosis in hippocampal but not tumor-derived neural stem cells. *Stem Cells* 26, 1027–1036
- Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D, Esposito V, Galeone A, Nvas L, Esposito S, Gargiulo S, Fattet S, Donofrio V, Cinalli G, Brunetti A, Vecchio LD, Northcott PA, Delattre, Delattre O, Taylor MD, Iolascon A, Zollo M. (2009). MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One.* 4:e4998
- Glazer, L. and Shilo, B. (2001) Hedgehog signaling patterns the tracheal branches. *Development* 128: 1599–1606
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277: 1109–1113
- Grachtchouk, M. Mo, R. Yu, S. Zhang, X. Sasaki, H. Hui, C.C. and Dlugosz, A.A. (2000). Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. *Nat. Genet.* 24, 216–217
- Gritli-Linde A, Lewis P, McMahon A. P. and Linde A. (2001) The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides. *Dev. Biol.* 236, 364–386
- Hallikas, O. Palin, K. Sinjushina, N. Rautiainen, R. Partanen, J. Ukkonen, E. and Taipale, J. (2006). Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell* 124, 47–59
- Haycraft, C.J. Banizs, B. Aydin-Son, Y. Zhang, Q. Michaud, E.J. Yoder, B.K. (2005) Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 1, e53
- Heberlein, U. Singh, C. Luk, A. and Donohoe, T. (1995) Growth and differentiation in the *Drosophila* eye coordinated by hedgehog. *Nature* 373: 709–711
- Holliday R, Pugh JE. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187(4173):226-32.
- Hooper JE. (2003) Smoothed translates Hedgehog levels into distinct responses. *Development.*130:3951-63
- Huang, Z. and Kunes, S. (1996) Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* 86: 411–422.
- Huang, Z. and Kunes, S. (1998) Signals transmitted along retinal axons in *Drosophila*: Hedgehog signal reception and the cell circuitry of lamina cartridge assembly. *Development* 125: 3753–3764
- Huangfu, D. Anderson, K.V. (2005) Cilia and hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11325–11330
- Huangfu, D. Liu, A. Rakeman, A.S. Murcia, N.S. Niswander, L. Anderson, K.V. (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83–87
- Ingham, P.W. and McMahon, A.P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15: 3059-3087
- Iorio, M.V. Croce, C.M. (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* 4, 143e159.

- Jansson MD, Lund AH. (2012). MicroRNA and cancer. *Mol Oncol.* Dec;6(6):590-610. doi: 10.1016/j.molonc.2012.09.006. Epub 2012 Oct 9
- Jia, J. Tong, C. Wang, B. Luo, L. and Jiang, J. (2004) Hedgehog Signalling Activity of Smoothed Requires Phosphorylation by Protein Kinase A and Casein Kinase I. *Nature* 432, 1045–1050
- Jia J. Jiang J. (2006) Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:1249-65
- Jiang, J. (2006). Regulation of Hh/Gli signaling by dual ubiquitin pathways. *Cell Cycle* 5, 2457–2463
- Jones PA. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 13(7): 484-92. doi: 10.1038/nrg3230.
- Kamakaka RT, Biggins S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev.* 19(3):295-310.
- Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, Zhang M, Bao G, Wang F, Zhang X, Yang R, Fan F, Chen X, Pei G, Ma L. (2005). A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell.* 123(5):833-47
- Kasinski, A.L. Slack, F.J. (2011). Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 11, 849e864
- Kefas B, Comeau L, Floyd DH, Selevertov O, Godlewski J, Schmittgen T, Jiang J, Di Pierro CG, Li Y, Chiocca EA, Lee J, Fine H, Abounader R, Lawler S, Purow B. (2009). The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors. *J Neurosci* 29(48):15161-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4966-09.2009
- Kefas B, Comeau L, Erdle N, Montgomery E, Amos S, Purow B. (2010). Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells. *Neuro Oncol.* 12(11):1102-12. doi: 10.1093/neuonc/noq080. Epub 2010 Jul 28
- Kessler J.D. Hasegawa H. Brun S.N. Yang Z.J. Dutton J.W. Wang F. Wechsler-Reya R.J. (2009) N-myc alters the fate of preneoplastic cells in a mouse model of medulloblastoma, *Genes Dev.* 23: 157–170
- Kim JK, Gabel HW, Kamath RS, Tewari M, Pasquinelli A, Rual JF, Kennedy S, Dybbs M, Bertin N, Kaplan JM, Vidal M, Ruykum G. (2005). Functional genomic analysis of RNA interference in *C. elegans*. *Science* May 20;308(5725): 1164-7. Epub 2005 Mar 24
- Kim J.Y. Nelson A.L. Algon S.A. Graves O. Sturla L.M. Goumnerova L.C. Rowitch D.H. Segal R.A. Pomeroy S.L. (2003) Medulloblastoma tumorigenesis diverges from cerebellar granule cell differentiation in patched heterozygous mice. *Dev. Biol.* 263: 50–66
- Koch A. Waha A. Hartmann W. Milde U. Goodyer C.G. Sorensen N. Berthold F. Digon-Sontgerath B. Kratzschmar J. Wiestler O.D. Pietsch T. (2004) No evidence for mutations or altered expression of the Suppressor of Fused gene (SUFU) in primitive neuroectodermal tumours. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30: 532–539
- Konuma T, Oguro H, Iwama A. (2010). Role of the polycomb group proteins in hematopoietic stem cells. *Dev Growth Differ.* 52(6):505-16. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01191.x
- Kovacs, J.J. Whalen, E.J. Liu, R. Xiao, K. Kim, J. Chen, M. Wang, J. Chen, W. Lefkowitz, R.J. (2008)  $\beta$ -Arrestin-mediated localization of smoothed to the primary cilium. *Science* 320, 1777–1781
- Krauss, S. Concordet, J.-P. and Ingham, P.W. (1993) A function-ally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog is expressed in tissues with polarising activity in zebrafish embryos. *Cell* 75: 1431–1444
- Kuwabara, P.E. Lee, M.-H. Schedl, T. and Jefferis, G.S.X.E. (2000) A *C. elegans* patched gene, *ptc-1*, functions in germ-line cytokinesis. *Genes & Dev.* 14: 1933–1944
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic Hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6: 21–27

- Lau, N.C. Lim, L.P. Weinstein, E.G. Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858e862.
- Lawlor ER, Thiele CJ. (2012). Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res.* 18(10):2768-79. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1921.
- Lee A, Kessler JD, Read TA, Kaiser C, Corbeil D, Huttner WB, Johnson JE, Wechsler-Reya RJ (2005) Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* 8: 723–729
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* Dec 3;75(5):843-54.
- Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP. 2004. Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol* 270:393–410
- Liang Z, Wu H, Xia J, Li Y, Zhang Y, Huang K, Wagar N, Yoon Y, Cho HT, Scala S, Shim H. (2009). Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochem Pharmacol.* 15;79(6):817-24. doi: 10.1016/j.bcp.2009.10.017. Epub 2009 Oct 31.
- Litingtung, Y. and Chiang, C. (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between *Shh* and *Gli3*. *Nat. Neurosci.* 3, 979–985
- Liu, A. Wang, B. Niswander, L.A. (2005) Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of *Gli* transcription factors. *Development* 132, 3103– 3111
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–8
- Lu Y, Ryan SL, Elliott DJ, Bignell GR, Futreal PA, Ellison DW, Bailey S, Clifford SC. (2009). Amplification and overexpression of Hsa-miR-30b, Hsa- miR-30d and KHDRBS3 at 8q24.22-q24.23 in medulloblastoma. *PLoS One.* 4:e615
- Luttrell LM, ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science.* 283(5402):655-61
- Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G (2003) Sonic Hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39: 937–950
- Marino S. (2005) Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control, *Trends Mol. Med.* 11: 17–22
- Meloni, A.R. Fralish, G.B. Kelly, P. Salahpour, A. Chen, J.K. Wechsler-Reya, R.J. Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (2006). Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7550–7560
- Michiels EM, Weiss MW, Hoovers JM, Baak JP, Voute PA, Baas F, Hermsen MA. (2002). Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. *J Pediatr Hematol Oncol.* 24(3): 205-10.
- Mill, P. Mo, R. Fu, H. Grachtchouk, M. Kim, P.C. Dlugosz, A.A. and Hui, C.C. (2003). Sonic hedgehog-dependent activation of *Gli2* is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev.* 17, 282–294
- Mill, P. Mo, R. Hu, M.C. Dagnino, L. Rosenblum, N.D. and Hui, C.C. (2005). *Shh* controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on *N-Myc*. *Dev. Cell* 9, 293–303
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631–642

- Mohler, J. (1988) Requirements for hedgehog, a segment polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* 120: 1061–1072.
- Molla-Herman, A. Boularan, C. Ghossoub, R. Scott, M.G. Burtey, A. Zarka, M. Saunier, S. Concordet, J.P. Marullo, S. Benmerah, A. (2008) Targeting of beta-arrestin2 to the centrosome and primary cilium: role in cell proliferation control. *PLoS ONE* 3, e3728
- Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, Davidson BL. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*. 16(3):495-505. doi: 10.1261/rna.1731910. Epub 2010 Jan 14
- Morrison S.J. Wright D.E. Cheshier S.H. Weissman I.L. (1997). Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Curr Opin Immunol*. 9: 216-221
- Nilsson, M. Unden, A.B. Krause, D. Malmqwist, U. Raza, K. Zaphiropoulos, P.G. and Toftgard, R. (2000). Induction of basal cell carcinomas and trichoe-pitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3438–3443
- Northcott P.A. Fernandez L.A. Hagan J.P. Ellison D.W. Grajkowska W. Gillespie Y. Grundy R. Van Meter T. Rutka J.T. Croce C.M. Kenney A.M. Taylor M.D. (2009) The miR-17/92 polycistron is up-regulated in sonic hedgehog-driven medulloblastomas and induced by N-myc in sonic hedgehog-treated cerebellar neural precursors. *Cancer Res*. 69: 3249–3255
- Nüsslein-Volhard and Wieschaus (1980) Mutation affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 30;287(5785):795-801
- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohamed HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Warkins DN, Herman JG, Bavlin SB. (2007). A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*. 39(2): 237-42. Epub 2007 Jan 9.
- Oliver T.G. Read T.A. Kessler J.D. Mehmeti A. Wells J.F. Huynh T.T. Lin S.M. Wechsler-Reya R.J. (2005) Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Development* 132: 2425–2439
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic Hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132: 335–344
- Palma V, Ruiz i Altaba A (2004) Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 131: 337–345
- Pan G, Thomson JA (2007) Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 17: 42–49
- Pankratz, M. and Hoch, M. (1995) Control of epithelial morphogenesis by cell signaling and integrin molecules in the *Drosophila* foregut. *Development* 121: 1885–1898
- Papanikolaou T. Lenington J. B. Betz A. Figueiredo C. Salamone J. D. and Conover J. C. (2008) In vitro generation of dopaminergic neurons from adult subventricular zone neural progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 17, 157–172
- Parathath SR, Mainwaring LA, Fernandez-L A, Guldal CG, Nahlé Z, Kenney AM. (2010).  $\beta$ -Arrestin-1 links mitogenic sonic hedgehog signaling to the cell cycle exit machinery in neural precursors. *Cell Cycle*. 9(19):4013-24. Epub 2010 Oct 11.
- Parker JS, Roe SM, Barford D. (2006). Molecular mechanism of target RNA transcript recognition by Argonaute-guide complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 71:45-50
- Pastorino L. Ghiorzo P. Nasti S. Battistuzzi L. Cusano R. Marzocchi C. Garre M.L. Clementi M. Scarra G.B. (2009) Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 149A: 1539–1543

- Pazzaglia S, Mancuso M, Atkinson M.J, Tanori M, Rebessi S, Majo V.D, Covelli V, Hahn H, Saran A. (2002) High incidence of medulloblastoma following X-ray- irradiation of newborn Ptc1 heterozygous mice. *Oncogene* 21: 7580–7584
- Pazzaglia S, Tanori M, Mancuso M, Rebessi S, Leonardi S, Di Majo V, Covelli V, Atkinson M.J, Hahn H, Saran A. (2006) Linking DNA damage to medulloblastoma tumorigenesis in patched heterozygous knockout mice. *Oncogene* 25: 1165–1173
- Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sorensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf H.K, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler O.D, Wicking C. (1997) Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched, *Cancer Res.* 57: 2085–2088
- Po A, Ferretti E, Miele E, De Smaele E, Paganelli A, Canettieri G, Coni S, Di Marcotullio L, Biffoni M, Massimi L, Di Rocco C, Screpanti I, Gulino A. (2010). Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *EMBO J.* 2010 Aug 4;29(15):2646-58. doi: 10.1038/emboj.2010.131. Epub 2010 Jun 25.
- Polkinghorn W.R, Tarbell N.J. (2007) Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 4: 295–304
- Qiu S, Lin S, Hu D, Feng Y, Tan Y, Peng Y. (2013). Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *J Transl Med.* 11:10. doi: 10.1186/1479-5876-11-10
- Quiñones-Hinajosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger M.S, Garcia-Verdugo J.M, Alvarez-Buylla A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 20;494(3):415-34
- Raffel C, Jenkins R.B, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults D.W, James C.D. (1997) Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations, *Cancer Res.* 57: 842–845
- Ramalho-Santos M, Willenbring H. (2007) On the origin of the term ‘stem cell’. *Cell Stem Cell.* 1: 35–38
- Read T.A, Hegedus B, Wechsler-Reya R, Gutmann D.H. (2006) The neurobiology of neurooncology. *Ann. Neurol.* 60: 3–11
- Reifenberger J, Wolter M, Weber R.G, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, Reifenberger G. (1998) Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res.* 58: 1798–1803
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* Feb 24;403(6772):901-6.
- Richly H, Aloia L, Di Croce L. (2011). Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell Death Dis.* 2:e204. doi: 10.1038/cddis.2011.84.
- Riddle, R, Johnson, R, Laufer, E, and Tabin, C. (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401–1416
- Riggs AD. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* 14(1):9-25.
- Reynolds B.A. and Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 255:1707-1710
- Reynolds B.A. and Weiss S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Bio.* 175,1-13
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* Oct;14(10A):1902-10. Epub 2004 Sep 13

- Rodriguez J, Muñoz M, Vives L, Frangou CG, Groudine M, Peinado MA. (2008). Bivalent domains enforce transcriptional memory of DNA methylated genes in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(50):19809-14. doi: 10.1073/pnas.0810133105. Epub 2008 Dec 5.
- Roelink H, Augsburger A, Heemskerk J, Korzh V, Norlin S, Ruiz i Altaba A, Tanabe Y, Placzek M, Edlund T, Jessell TM, et al. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76:761–775
- Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M. 1996. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:357–360.
- Rohatgi, R. Milenkovic, L. Scott, M.P. 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372–376
- Ruiz i Altaba A (2006) Hedgehog-Gli Signaling in Human Disease. Georgetown: Plenum Publisher
- Sanai N, Tramontin A.D, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro N.M, Gupta N, Kunwar S, Lawton M.T, McDermott M.W, Parsa A.T, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger M.S, Alvarez-Buylla A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 19;427(6976):685-6
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H. (2007). Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*. 39(2):232-6. Epub 2006 Dec 31
- Schofield D, West D.C, Anthony D.C, Marshal R, Sklar J. (1995) Correlation of loss of heterozygosity at chromosome 9q with histological subtype in medulloblastomas, *Am. J. Pathol*. 146: 472–480
- Schofield R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25
- Schuettengruber B, Martinez AM, Iovino N, Cavalli G. (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12(12):799-814. doi: 10.1038/nrm3230
- Schüller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG, Huillard E, Sun T, Ligon AH, Qian Y, Ma Q, Alvarez-Buylla A, McMahon AP, Rowitch DH, Ligon KL (2008) Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* 14: 123–134
- Scott D.K, Straughton D, Cole M, Bailey S, Ellison D.W, Clifford S.C. (2006) Identification and analysis of tumor suppressor loci at chromosome 10q23.3– 10q25.3 in medulloblastoma. *Cell Cycle* 5: 2381–2389
- Sebastiani G, Grieco FA, Spagnuolo I, Galleri L, Cataldo D, Dotta F. (2011). Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes Metab Res Rev*. 27(8):862-6. doi: 10.1002/dmrr.1262.
- Shen H, Laird PW. (2013). Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*. 153(1):38-55. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.008.
- Smelkinson, M.G, Zhou, Q, and Kalderon, D. (2007). Regulation of Ci- SCFSlimb binding, Ci proteolysis, and hedgehog pathway activity by Ci phosphorylation. *Dev. Cell* 13, 481–495
- Soula C, Danesin C, Kan P, Grob M, Poncet C, Cochard P. (2001). Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development* 128:1369–1379
- Stecca B, Ruiz i Altaba A (2009) A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO J* 28: 663–676
- Struhl, G, Barbash, D, and Lawrence, P. (1997) Hedgehog organizes the pattern and polarity of epidermal cells in the *Drosophila* abdomen. *Development* 124: 2143–2154

- Svärd, J. Heby-Henricson, K. Persson-Lek, M. Rozell, B. Lauth, M. Bergstrom, A. Ericson, J. Toftgard, R. and Teglund, S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev. Cell* 10, 187–197
- Svärd J. Rozell B. Toftgård R. Teglund S. (2009) Tumor suppressor gene co-operativity in compound Patched1 and suppressor of fused heterozygous mutant mice. *Mol. Carcinog.* 48: 408–419
- Tabata, T. and Kornberg, T. (1994) Hedgehog is a signalling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 76: 89–102
- Taipale, J. Cooper, M.K. Maiti, T. and Beachy, P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418, 892–897
- Tang YF, Zhang Y, Li XY, Li C, Tian W, Liu L. (2009). Expression of miR-31, miR-125b-5p, and miR-326 in the adipogenic differentiation process of adipose-derived stem cells. *OMICS* 13(4):331-6. doi: 10.1089/omi.2009.0017
- Taylor M.D. Liu L. Raffel C. Hui C.C. Mainprize T.G. Zhang X. Agatep R. Chiappa S. Gao L. Lowrance A. Hao A. Goldstein A.M. Stavrou T. Scherer S.W. Dura W.T. Wainwright B. Squire J.A. Rutka J.T. Hogg D. (2002) Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma, *Nat. Genet.* 31: 306–310
- Thomson J.A. Itskovitz-Eldor J. Shapiro S.S. Waknitz M.A. Swiergiel J.J. Marshall V.S. Jones J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282: 1145–1147
- Thompson M.C. Fuller C. Hogg T.L. Dalton J. Finkelstein D. Lau C.C. Chintagumpala M. Adesina A. Ashley D.M. Kellie S.J. Taylor M.D. Curran T. Gajjar A. Gilbertson R.J. (2006) Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J. Clin. Oncol.* 24: 1924–1931
- Tollervey JR, Lunvak VV. (2012). Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics.* 7(8):823-40. doi: 10.4161/epi.21141. Epub 2012 Jul 18
- Tran, P.V. Haycraft, C.J. Besschetnova, T.Y. Turbe-Doan, A. Stottmann, R.W. Herron, B.J. Chesebro, A.L. Qiu, H. Scherz, P.J. Shah, J.V. Yoder, B.K. Beier, D.R. (2008) THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat. Genet.* 40, 403–410
- Ulloa, F. Itasaki, N. and Briscoe, J. (2007). Inhibitory Gli3 activity negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Curr. Biol.* 17, 545–550
- Uziel T. Karginov F.V. Xie S. Parker J.S. Wang Y.D. Gajjar A. He L. Ellison D. Gilbertson R.J. Hannon G. Roussel M.F. (2009) The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 2812–2817
- Valencia K, Martin-Fernandez M, Zanduetta C, Ormazabal C, Martinez-Canarias S, Bandres E, De la Piedra C, Lecanda F. (2012). miR-326 associates with biochemical markers of bone turnover in lung cancer bone metastasis. *Bone.* 52(1):532-9. doi: 10.1016/j.bone.2012.10.033. Epub 2012 Nov 7
- Valente S, Lepore I, Dell'Aversana C, Tardugno M, Castellano S, Sbardella G, Tomassi S, Di Maro S, Novellino E, Di Santo R, Costi R, Altucci L, Mai A. (2012). Identification of PR-SET7 and EZH2 selective inhibitors inducing cell death in human leukemia U937 cells. *Biochimie.* 94(11):2308-13. doi: 10.1016/j.biochi.2012.06.003.
- Varjosalo, M. Li, S.P. and Taipale, J. (2006). Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Dev. Cell* 10, 177–186
- Venkataraman S, Alimova I, Fan R, Harris P, Foreman N, Vibhakar R. (2010). MicroRNA 128a increases intracellular ROS level by targeting Bmi-1 and inhibits medulloblastoma cancer cell growth by promoting senescence. *PLoS One.* 5:e10748.
- Vescovi A.L. Reynolds B.A. Fraser D.D. Weiss S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron.* 11:851-966

- Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, De Launoit Y, Fuks F. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 439(7078):871-4. Epub 2005 Dec 14.
- Voigt P, Tee WW, Reinberg D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes Dev*. 27(12):1318-38. doi: 10.1101/gad.219626.113.
- Vokes, S.A. Ji, H. McCuine, S. Tenzen, T. Giles, S. Zhong, S. Longabaugh, W.J. Davidson, E.H. Wong, W.H. and McMahon, A.P. (2007). Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. *Development* 134, 1977–1989
- Vokes, S.A. Ji, H. Wong, W.H. and McMahon, A.P. (2008). A genome-scale analysis of the cis-regulatory circuitry underlying sonic hedgehog-mediated patterning of the mammalian limb. *Genes Dev*. 22, 2651–2663
- Wallace VA (1999) Purkinje-cell-derived Sonic Hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 9: 445–448
- Wang, G. and Jiang, J. (2004). Multiple Cos2/Ci interactions regulate Ci sub-cellular localization through microtubule dependent and independent mechanisms. *Dev. Biol.* 268, 493–505
- Wang S, Lu S, Geng S, Ma S, Liang Z, Jiao B. (2013). Expression and clinical significance of microRNA-326 in human glioma miR-326 expression in glioma. *Med Oncol*. 30(1):373. doi: 10.1007/s12032-012-0373-y. Epub 2013 Jan 6.
- Wang, Y. and Price, M.A. (2008). A unique protection signal in Cubitus interruptus prevents its complete proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5555–5568
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP (1999) Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22: 103–114
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP. (2001) The developmental biology of brain tumors. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 385–428
- Weeraratne SD, Amani V, Neiss A, Teider N, Scott DK, Pomeroy SL, Cho YJ. (2011). MiR-34a confers chemosensitivity through modulation of MAGE-A and p53 in medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 13:165–75
- Wetmore C. Eberhart D.E. Curran T. (2000) The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched, *Cancer Res*. 60: 2239–2246
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW. (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet*. 39(2):157-8. Epub 2006 Dec 31.
- Wijgerde, M. McMahon, J.A. Rule, M. and McMahon, A.P. (2002). A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes Dev*. 16, 2849–2864
- Wolter M. Reifenberger J. Sommer C. Ruzicka T. Reifenberger G. (1997) Mutations in the human homologue of the *Drosophila* segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*. 57: 2581–2585
- Wunsch AM, Reinhardt K, Lough J. (1991). Normal transitions in synthesis of replacement histones H2A.Z and H3.3 during differentiation of dystrophic myotube cells. A brief note. *Mech Ageing Dev*. 59(3):299-305
- Xie J. Johnson R.L. Zhang X. Bare J.W. Waldman F.M. Cogen P.H. Menon A.G. Warren R.S. Chen L.C. Scott M.P. Epstein E.H. Jr. (1997) Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors, *Cancer Res*. 57: 2369–2372
- Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonlous M, Schuller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ, Wechsler-Reya RJ (2008) Medulloblastoma can be initiated by deletion of patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14: 135–145
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93:755–766



- Yin XL, Pang JC, Liu YH, Chong EY, Cheng Y, Poon WS, Ng HK. (2001). Analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 10q, 11, and 16 in medulloblastomas. *J Neurosurg.* 94(5):799-805.
- Zhang, W. Zhao, Y. Tong, C. Wang, G. Wang, B. Jia, J. and Jiang, J. (2005). Hedgehog-regulated costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of cubitus interruptus. *Dev. Cell* 8, 267–278
- Zhang, Y. and Kalderon, D. (2000) Regulation of cell proliferation and patterning in *Drosophila* oogenesis by Hedgehog signaling. *Development* 127: 2165–2176
- ZhaoY, TongC, JiangJ. (2007a) Hedgehog regulates Smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature.* 450:252-8
- Zhi F, Wang S, Wang R, Xia X, Yang Y. (2013). From small to big: microRNAs as new players in medulloblastomas. *Tumour Biol.* 34(1):9-15. doi: 10.1007/s13277-012-0579-9. Epub 2012 Nov 25
- Zhou J, Xu T, Yan Y, Qin R, Wang H, Zhang X, Huang Y, Wang Y, Lu Y, Fu D, Chen J, (2013). MicroRNA-326 Functions as a Tumor Suppressor in Glioma by Targeting the Nin One Binding Protein (NOB1). *PLoS One* 15;8(7):e68469. doi: 10.1371/journal.pone.0068469. Print 2013.
- Zhu, A.J. Zheng, L. Suyama, K. and Scott, M.P. (2003). Altered localization of *Drosophila* Smoothed protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev.* 17, 1240–1252
- Zurawel R.H. Allen C. Chiappa S. Cato W. Biegel J. Cogen P. de Sauvage F. Raffel C. (2000) Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 27: 44–51