

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA

**Dottorato di Ricerca in
Biotecnologie Cellulari e Molecolari**

Ciclo XX

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/14

**Inibizione selettiva del gene *MYCN*
mediante PNA (acidi peptido nucleici) anti-gene
nel rhabdomyosarcoma umano.**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa

PAOLA STROCCHI

Presentata da:

Dott.ssa

STEFANIA PURGATO

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof.

LANFRANCO MASOTTI

Esame finale anno 2008

Indice

INDICE	2
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Il Rhabdomyosarcoma (RMS)	5
1.1.1 Epidemiologia ed aspetti clinici.....	5
1.1.2 Aspetti istologici	6
1.1.3 Patogenesi molecolare del RMS	7
1.2 Il Gene MYCN	10
1.2.1 La famiglia dei geni MYC e la loro struttura	10
1.2.2 MYCN: il gene, l'mRNA e la proteina	11
1.2.3 Sovraespressione ed amplificazione di MYCN	13
1.2.4 Amplificazione di MYCN nel rhabdomyosarcoma	14
1.2.5 MYCN come <i>target</i> terapeutico.....	15
1.2.5.1 Immunoterapia	15
1.2.5.2 Piccole molecole inibitrici	16
1.2.5.3 Oligonucleotidi antisenso	16
1.3 PNA (<i>Peptide Nucleic Acid</i>)	17
1.3.1 Struttura dei PNA.....	17
1.3.2 Sintesi e purificazione.....	18
1.3.3 Proprietà chimico-fisiche	18
1.3.4 Modulazione dell'espressione genica	20
1.3.5 <i>Uptake</i> dei PNA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	22
1.3.6 Altre applicazioni dei PNA.....	24
2. SCOPO DELLA TESI.....	26
3. MATERIALI E METODI.....	28
3.1 Colture cellulari	28

3.2 FISH (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)	30
3.2.1 Preparazione di metafasi ed interfasi	30
3.2.2 FISH.....	31
3.3 Progettazione e sintesi dei PNA	32
3.4 Trattamento delle cellule con PNA_{wt} e PNA_{mut}	34
3.5 Localizzazione intracellulare del PNA	35
3.6 Estrazione dell'RNA	35
3.7 Retrotrascrizione e <i>Real-Time</i> PCR	37
3.8 Estrazione delle proteine e <i>western blot</i>	40
3.8.1 Estrazione delle proteine.....	40
3.8.2 Separazione elettroforetica delle proteine.....	41
3.8.3 <i>Western blot</i>	42
3.9 Valutazione della morfologia e dell'attività metabolica cellulare	43
3.10 Valutazione dell'apoptosi	43
3.11 Analisi dell'espressione genica mediante <i>microarray Affymetrix</i>	44
3.11.1 Preparazione dell'RNA poliadenilato di controllo	44
3.11.2 Sintesi del primo filamento di cDNA	45
3.11.3 Sintesi del secondo filamento di cDNA.....	45
3.11.4 Purificazione del doppio filamento di cDNA	45
3.11.5 Sintesi di cRNA biotinilato.....	46
3.11.6 Purificazione e quantificazione del cRNA biotinilato	46
3.11.7 Quantificazione e frammentazione del cRNA	47
3.11.8 Ibridizzazione.....	47
3.11.9 Lavaggi e marcatura del campione	48
3.11.10 Quantificazione del segnale da un immagine scansionata.....	49
3.11.11 Normalizzazione e filtraggio dei dati.....	50
3.12 Studi <i>in vivo</i>	52
3.12.1 Modello murino	52

3.12.2	Trattamento <i>in vivo</i> con il PNA	52
3.12.3	Valutazione del tumore mediante micro-PET (<i>Positron Emission Tomography</i>)	53
3.12.4	Analisi di tossicità in vivo del PNA.....	55
5.	RISULTATI.....	56
5.1	Amplificazione di <i>MYCN</i> nelle linee cellulari di RMS.....	56
5.2	Espressione di <i>MYCN</i> nelle linee cellulari di RMS	56
5.3	Espressione di <i>PAX-FKHR</i> nelle linee cellulari di RMS	58
5.4	Ingresso nel nucleo del PNA anti-gene anti- <i>MYCN</i>	59
5.5	Il PNA anti-gene anti- <i>MYCN</i> inibisce l'espressione di <i>MYCN</i> nelle cellule che esprimono <i>MYCN</i>	60
5.6	Il PNA anti-gene anti- <i>MYCN</i> induce modificazioni della morfologia nelle cellule di rhabdomyosarcoma con <i>MYCN</i> amplificato	62
5.7	Il PNA anti-gene anti- <i>MYCN</i> riduce l'attività metabolica cellulare nelle cellule di rhabdomyosarcoma con <i>MYCN</i> amplificato	62
5.8	Il PNA anti-gene anti- <i>MYCN</i> induce apoptosi nelle cellule RH30.....	64
5.9	Analisi dell'espressione genica mediante <i>microarray</i> Affymetrix.....	65
5.10	Validazione dei geni differenzialmente espressi.....	67
5.11	Il PNA anti-gene anti- <i>MYCN</i> inibisce la crescita tumorale <i>in vivo</i>	69
5.12	Il PNA anti-gene anti- <i>MYCN</i> non mostra alterazioni istologiche nei tessuti esaminati	71
6.	DISCUSSIONE.....	73
	BIBLIOGRAFIA	81
	Abbreviazioni utilizzate nel testo.....	92

1. Introduzione

1.1 Il Rhabdomyosarcoma (RMS)

1.1.1 Epidemiologia ed aspetti clinici

I sarcomi dei tessuti molli sono neoplasie che in età pediatrica costituiscono per frequenza (8%) il quinto gruppo dei tumori dopo leucemie, tumori del sistema nervoso centrale (SNC), neuroblastomi e linfomi [1].

Il rhabdomyosarcoma (RMS) è il più frequente sarcoma dei tessuti molli, rappresenta il 4-5% dei tumori pediatrici, ed è il terzo tumore solido extracranico del bambino, dopo il neuroblastoma e il tumore di Wilms. L'incidenza annuale è di 5,3 casi/milione di bambini tra 0 e 14 anni [2]. Nel 65% dei casi il RMS è diagnosticato in bambini con meno di 6 anni di età, con prevalenza fra i 2 e i 5 anni. C'è una lieve predisposizione della malattia nei maschi (58%) (figura 1).

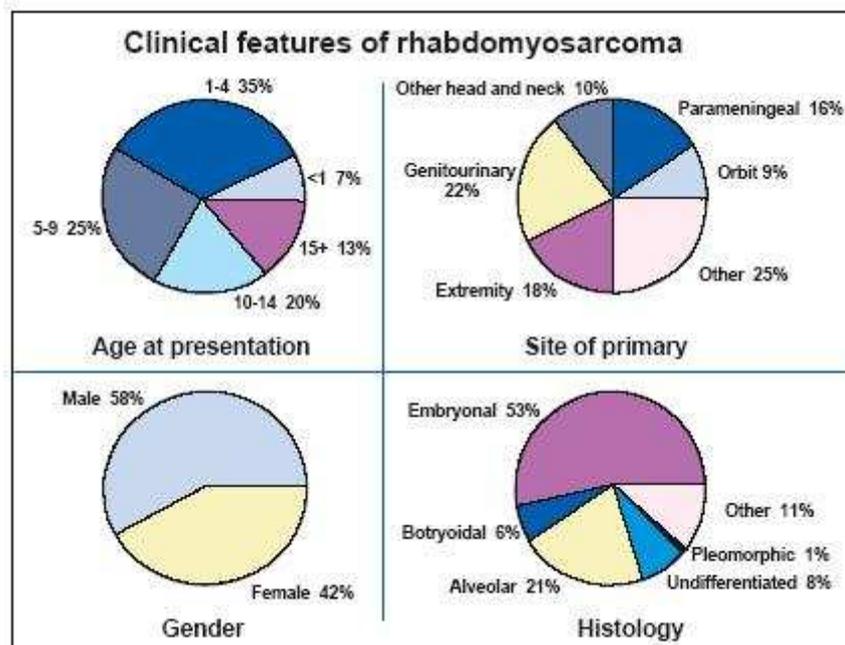


Figura 1. Aspetti clinici del rhabdomyosarcoma (dati da *Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I, II e III* [3, 4]). Età alla diagnosi: l'età media alla diagnosi è di 5 anni e più dei 2/3 dei casi sono diagnosticati prima dei 10 anni. Sito del tumore primario: approssimativamente il 35% dei tumori insorge in testa e collo; le altre sedi più frequenti sono il tratto urogenitale e le estremità. Sesso: vi è una leggera predisposizione della malattia nei maschi (58%). Istologia: più del 50% dei tumori sono di tipo embrionale.

Il RMS ha origine dalle cellule mesenchimali primitive, ha insorgenza ubiquitaria, inclusi siti in cui non vi sono normalmente muscoli, e tende ad infiltrare le strutture adiacenti la sede di insorgenza disseminando per via linfatica e/o ematica. Le sedi più comuni del tumore primario sono il tratto urogenitale (24%), la regione parameningea (16%), gli arti (19%), le orbite (9%) e altre aree di testa e collo (10%) (figura 1) [5].

L'eziologia del RMS è sconosciuta e la maggior parte dei casi si presenta sporadicamente, sebbene alcune sindromi famigliari, come la Neurofibromatosi di tipo 1, la sindrome di Li-Fraumeni, la sindrome di Costello e la sindrome Beckwith-Wiedemann, sembrano associate ad un rischio maggiore di sviluppare il tumore [6].

1.1.2 Aspetti istologici

Il RMS appartiene alla categoria dei tumori a piccole cellule blu rotonde (che comprende anche il neuroblastoma, il PNET (*Primitive Neuroectodermal Tumors*) e il linfoma) con differenziazione in senso muscolare. Secondo *l'International Classification for Childhood Sarcomas* (ICCS), i RMS possono essere divisi nei diversi sottotipi: RMS botrioide, RMS a cellule fusate (Leiomiomatoso), RMS embrionale (ERMS), RMS alveolare (ARMS) e RMS indifferenziato (tabella 1) [7].

International Classification of Rhabdomyosarcoma	
Superior prognosis	
Botryoid rhabdomyosarcoma	
Spindle cell rhabdomyosarcoma	
Intermediate prognosis	
Embryonal rhabdomyosarcoma	
Poor prognosis	
Alveolar rhabdomyosarcoma	
Undifferentiated sarcoma	

Tabella 1. Classificazione dei raddomiosarcomi secondo *l'International Classification for Childhood Sarcomas* (ICSS) [7].

Approssimativamente il 60% dei RMS sono embrionali (figura 2A) ed hanno una prognosi favorevole, mentre circa il 30% sono alveolari (figura 2B) e sono più aggressivi [8]. Questi due sottotipi istologici di RMS hanno alterazioni genetiche distinte che possono giocare un ruolo nella patogenesi del tumore [9].

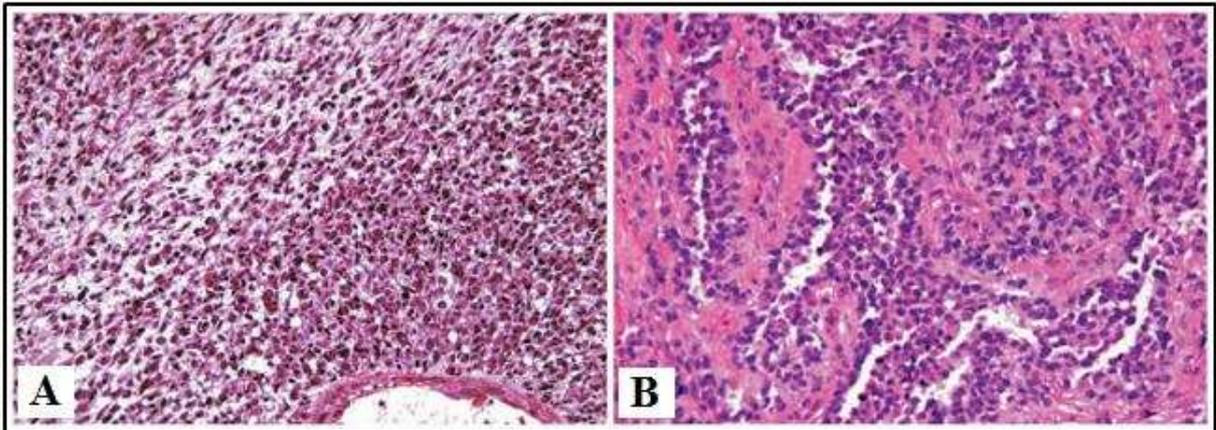


Figura 2. Caratteristiche istologiche del rhabdomyosarcoma embrionale (A) ed alveolare (B), osservato al microscopio ottico (200 X) dopo colorazione con ematossilina-eosina. (A) L'ERMS è contraddistinto da cellule a forma di fuso con un aspetto ricco di stroma. (B) L'ARMS è caratterizzato da cellule piccole, rotonde e densamente impacchettate intorno a spazi che assomigliano agli alveoli polmonari [7].

1.1.3 Patogenesi molecolare del RMS

L'analisi citogenetica dei tumori ARMS ha identificato due distinte traslocazioni cromosomiche caratteristiche, la $t(2;13)(q35;q14)$ presente nel 55% dei casi e la variante $t(1;13)(p36;q14)$ trovata nel 22% dei casi [10, 11]. Tali traslocazioni coinvolgono i geni *PAX3* e *PAX7* localizzati, rispettivamente, sui cromosomi 2 e 1 ed il gene *FKHR* (o *FOXO1*) localizzato sul cromosoma 13 (figura 3) [12].

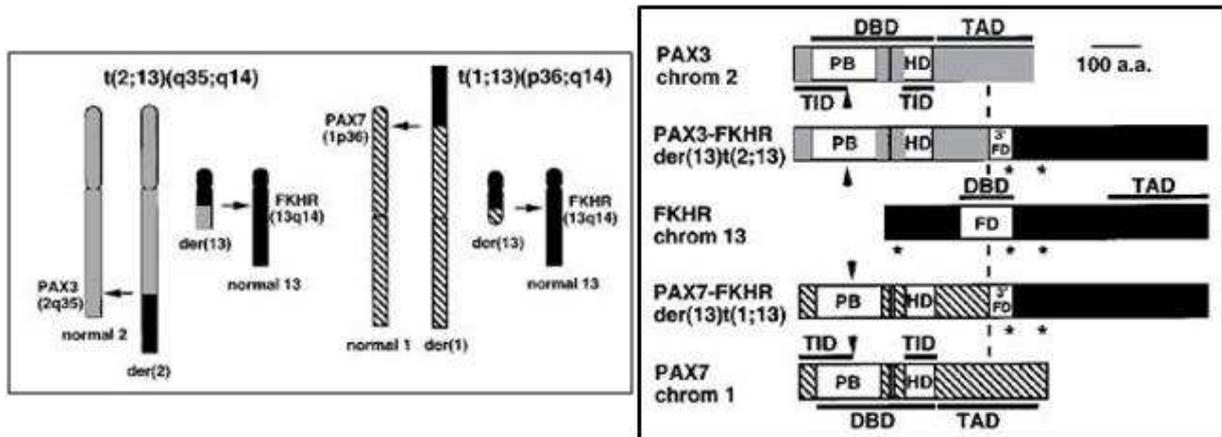


Figura 3. Traslocazioni $t(2;13)(q35;q14)$ e $t(1;13)(p36;q14)$ caratteristiche dell'ARMS (PB: *Paired Box*; HD: *Homeodomain*; FD: dominio *fork head*; DBD: dominio di legame al DNA; TAD: dominio di attivazione trascrizionale; TID: dominio di inibizione trascrizionale).

PAX3 e *PAX7* appartengono alla famiglia dei fattori di trascrizione *paired box*, caratterizzata dal DNA *binding domain paired box*, identificato per la prima volta in *Drosophila* [13]. Nell'uomo i membri di questa famiglia sono 9 e hanno un ruolo nel controllo trascrizionale durante l'embriogenesi [13] e durante lo sviluppo neuromuscolare precoce [14]. *PAX3* e *PAX7* codificano per proteine molto simili, contenenti un *DNA binding domain* N-terminale, costituito dal *paired box domain*, dall'octapeptide e da una completa *homeobox*, ed un dominio C-terminale ricco in prolina, serina e treonina. L'organizzazione genica è molto simile. Sia *PAX3* che *PAX7* presentano 9 esoni: gli esoni 2, 3 e 4 codificano per il *paired box domain*, mentre l'*homeodomain* è codificato dagli esoni 5 e 6 e il dominio di transattivazione è codificato dagli esoni 6, 7 e 8. I breakpoint nelle traslocazioni $t(2;13)$ e $t(1;13)$ sono all'interno del settimo introne di entrambi i geni, mantenendo intatto il dominio N-terminale di legame al DNA e separandolo da una parte essenziale del dominio di transattivazione (figura 3) [15, 16].

FKHR (detto anche *FOXO1*) appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione *fork head* (*FOX*), nei quali il dominio *fork head* costituisce un'unità funzionale necessaria e sufficiente per il legame al DNA. I geni *FOX* hanno diversi ruoli tra cui il controllo dello sviluppo dell'embrione ed il controllo dell'espressione genica tessuto specifica nell'adulto. Il gene *FKHR*

presenta 3 esoni: il dominio *fork head* è codificato dagli esoni 1 e in parte 2, ed il dominio di attivazione trascrizionale è codificato dall'esone 2. Il *breakpoint* della traslocazione *PAX-FKHR* avviene all'interno del primo esone, causando la distruzione del dominio *fork head* di legame al DNA e la fusione tra il dominio C-terminale di transattivazione di Fkhr ed il dominio N-terminale di legame al DNA di Pax (figura 3). Le proteine di fusione Pax-Fkhr attivano la trascrizione nei siti di legame di Pax, ma con potenza fino a 10 volte maggiore rispetto al corrispondente *wild-type*. Ciò è dovuto all'insensibilità del dominio di attivazione di Fkhr agli effetti inibitori dei domini di inibizione all'N-terminale di Pax [17]. Le proteine di fusione sono inibitori del differenziamento miogenico e dell'apoptosi e, conseguentemente, hanno un potente effetto oncogeno. Pax3-Fkhr ha un potere trasformante maggiore di Pax7-Fkhr [18]. Ciò correla con le caratteristiche cliniche del tumore; infatti uno studio del *Children's Cancer Group* [19] ha indicato che l'espressione di *PAX3-FKHR* è correlata con un tipo particolarmente aggressivo di ARMS, che più frequentemente presenta metastasi e coinvolgimento midollare.

Nell'ARMS le proteine di fusione Pax3-Fkhr e Pax7-Fkhr risultano sovraespresse rispetto alle proteine *wild-type* [19]. Mentre la sovraespressione di Pax7-Fkhr deriva da un secondo evento genetico quale l'amplificazione del gene di fusione [20], la sovraespressione di Pax3-Fkhr sembra derivare dalla sinergia tra gli elementi regolatori di Pax3 e Fkhr [19].

Il RMS embrionale è caratterizzato dalla perdita dell'eterozigosi (LOH) nel locus 11p15 con perdita dell'informazione genetica materna e duplicazione di quella paterna. Questa regione è di particolare interesse perché è il sito di localizzazione del gene *IGF2* (*Insulin-like Growth Factor 2*), che codifica per l'omonimo fattore di crescita. In un tessuto normale, compreso il muscolo fetale, l'espressione di *IGF2* avviene per mezzo dell'allele paterno. In alcuni casi di RMS, sia ARMS che ERMS, si verifica l'espressione di entrambi gli alleli, dovuta alla perdita dell'*imprinting* (LOI). In questo tumore, sia la LOH con disomia paterna sia la LOI con espressione di entrambi gli alleli può portare alla sovraespressione di *IGF2* [21]. In presenza di

anomalie del cromosoma 11p15 è stata vista l'associazione del RMS con la sindrome di Beckwith-Wiedemann [22]. La sovraespressione del gene *IGF2* è presente in entrambi i sottotipi di RMS e stimola la crescita delle cellule tumorali.

Uno studio di CGH (*Comparative Genomic Hybridisation*) ha indicato che gli ERMS sono caratterizzati anche da replicazioni di DNA nei cromosomi 2, 7, 8, 11, 12, 13 e 17 [18].

Diversi studi hanno anche dimostrato nei RMS la presenza dell'amplificazione o della sovraespressione di alcuni oncogeni, come l'attivazione dell'oncogene *RAS* e l'espressione aberrante dell'oncogene *MET*. Negli ultimi anni è stata posta particolare attenzione sui geni della famiglia *MYC*. L'amplificazione di *MYCN* è riscontrata in tumori primari e in linee cellulari di RMS, sia ARMS che ERMS, ed è associata ad una prognosi infausta negli ARMS [23].

1.2 Il Gene *MYCN*

1.2.1 La famiglia dei geni *MYC* e la loro struttura

La famiglia di geni *MYC* codifica per un gruppo di fosfoproteine nucleari, che svolgono un ruolo nella proliferazione e nella regolazione del ciclo cellulare, nel differenziamento, nell'apoptosi, nell'instabilità genomica e nella trasformazione neoplastica [24]. I geni *MYC* possono essere attivati attraverso diversi meccanismi di riarrangiamento genetico, quali l'amplificazione genica [25], la traslocazione cromosomiale [26], l'inserzione provirale [27], la trasduzione retrovirale [28].

Il gene *MYC* (o *c-Myc*) è stato scoperto, per primo, attraverso la sua omologia con v-myc, il gene trasformante del virus MC29 della mielocitosi aviaria [29]. Altri due membri della famiglia, *MYCN* e *MYCL*, sono stati scoperti più tardi attraverso la loro omologia con v-myc nelle sequenze amplificate delle cellule di neuroblastoma [30] e del tumore del polmone a piccole cellule, rispettivamente [31]. Appartengono a questa famiglia almeno altri tre geni:

MYCS, *MYCB* e *MYCP*. *MYCS* e *MYCB* appaiono altamente interessanti perché, al contrario di *MYC*, *MYCN* e *MYCL*, sembra che le proteine da essi codificate sopprimano la trasformazione neoplastica [32-34]. Invece *MYCP* è uno pseudogene che deriva da una regione di *MYCL* [35].

1.2.2 *MYCN*: il gene, l'mRNA e la proteina

MYCN è stato originariamente clonato nel 1983, identificando una sequenza di DNA amplificato con parziale omologia con il proto-oncogene *MYC*, in linee cellulari di neuroblastoma [30, 36]. Il gene *MYCN* è normalmente localizzato sul braccio corto distale del cromosoma 2 e mediante l'ibridizzazione *in situ* è stato mappato nella regione 2p23-24 [37]. Il gene è composto da tre esoni (figura 4A): il primo non trascritto e gli altri due codificanti la proteina. La trascrizione di *MYCN* è piuttosto complessa, poiché inizia in numerosi siti che sono sotto il controllo di due promotori. La molteplicità dei siti d'inizio si combina con lo *splicing* alternativo per generare due forme di mRNA. I messaggeri hanno diverse sequenze *leader* 5' (primi esoni alternativi del gene), ma corpi identici (secondo e terzo esone del gene). Entrambe le forme di mRNA sono instabili, con un'emivita breve (15 minuti) e codificano per le due proteine N-myc di 65 e 67 kD [38].

N-myc è una fosfoproteina localizzata nella matrice nucleare ed ha una breve emivita (30-50 minuti) [39]. Ha regioni di elevata omologia con Myc (identità complessiva del 38%) [40] e, come le altre proteine della famiglia *MYC*, è costituita da:

- un dominio N-terminale di transattivazione contenente Myc *Boxes* I (MbI) e II (MbII);
- una regione intermedia non strutturata;
- una regione C-terminale contenente un dominio basico (BR), coinvolto nel legame sequenza-specifica con il DNA, e un motivo *helix-loop-helix/leucine zipper* (bHLH-LZ), che media il legame al DNA e l'interazione con altre proteine bHLH-LZ, come Max e Mad [41] (figura 4A).

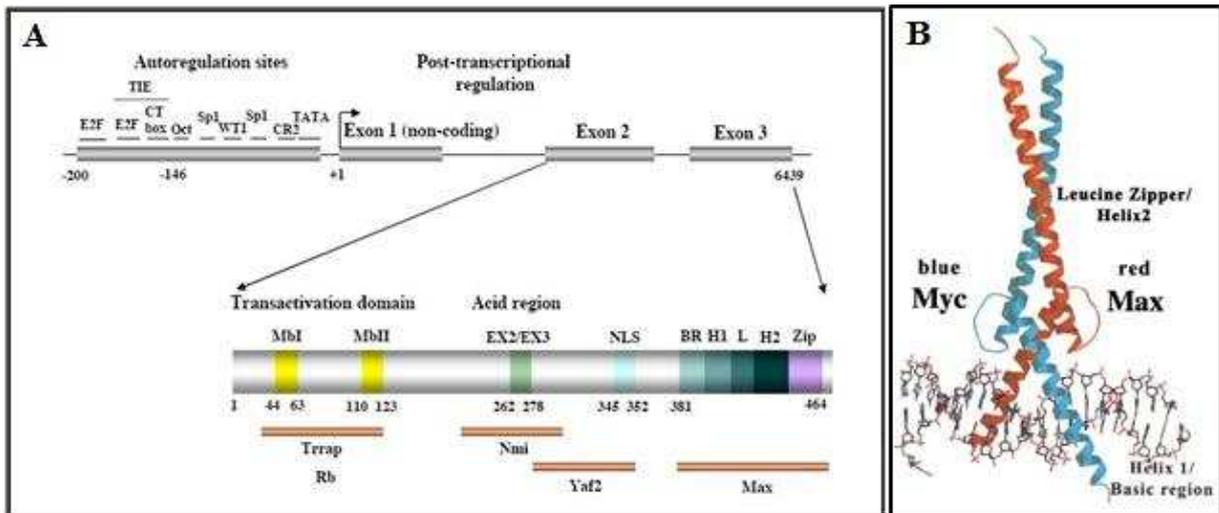


Figura 4. (A) Struttura del gene *MYCN* e della proteina N-myc [42]. (B) Struttura dell'eterodimero Myc/Max legato al DNA.

Per legarsi al DNA, N-myc deve prima dimerizzare con Max (Figura 4B) [43, 44]. In seguito al legame con il DNA, la proteina regola l'espressione genica [45] e interviene nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare [46]. Il dimero N-myc/Max si lega al DNA in modo specifico alla sequenza CACGTG, denominata *E-box* [47]. Un altro sito di legame tra N-myc e il DNA è costituito dalla sequenza asimmetrica CATGTG. Il dominio transattivatore di N-myc, posto all'N-terminale, è coinvolto nell'equilibrio tra segnali apoptotici e proliferativi [48] e costituisce anche il sito di legame di proteine che regolano l'attività di N-myc. L'attività dei dimeri N-myc/Max è regolata in parte da un'altra proteina, Mad, che forma eterodimeri con Max e antagonizza l'attivazione trascrizionale di Myc/Max. Gli eterodimeri N-myc/Max possono attivare numerosi geni a valle, che comprendono: *MRP1* (*multidrug resistance protein-1*), il regolatore della proliferazione cellulare *PTMA* (*prothymosin alpha*), *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*), il regolatore del ciclo cellulare *ID2* (*inhibitor of DNA binding 2*), *MCM7* (*minichromosome maintenance complex component 7*), *LIF* (*leukaemia inhibitory factor*), *PAX3*, *ODC1* (*ornithine decarboxylase 1*), *IGF1R* (*insulin-like growth factor 1 receptor*) e *MDM2* [42]. Molto probabilmente N-myc, analogamente a Myc, è anche in grado di reprimere l'attività di altri geni specifici, tuttavia i meccanismi molecolari alla base di questi

processi non sono ancora noti. I geni repressi dalla proteina non sembrano essere implicati in un'interazione diretta della proteina con il DNA; infatti Myc viene portata a livello dei promotori per mezzo di interazioni proteina-proteina con fattori di trascrizione positivi, come Miz-1, Sp1 (*Specificity Protein-1*), TFII-I (*Transcription Factor II-I*), NF-Y (*Nuclear Factor Y*) e YY1 (*Yinyang-1*), o reclutando attivamente proteine corepressive [49, 50].

Durante lo sviluppo della cresta neurale *MYCN* è inizialmente espresso nell'intera popolazione cellulare. L'elevata espressione provoca una massiva migrazione ventrale della popolazione della cresta neurale e, successivamente, queste cellule migrate nei gangli e nel midollo spinale vanno incontro a differenziamento neuronale. L'espressione è spenta nel periodo successivo alla colonizzazione dei gangli e del midollo spinale, tranne che per le cellule sottoposte al differenziamento neuronale. Caratteristicamente le cellule della cresta neurale continuano a dividersi anche in seguito al differenziamento. Ne risulta che *MYCN* è coinvolto nella regolazione del destino della cresta neurale in due aspetti: migrazione ventrale e differenziamento neuronale [51].

MYCN funziona come un classico oncogene dominante. L'espressione forzata di *MYCN* può trasformare cellule normali, di solito in cooperazione con l'oncogene *RAS*. La sovraespressione di *MYCN* può liberare i fibroblasti embrionali dalla senescenza [52], e l'aggiunta di un RNA antisenso contro *MYCN* alle linee cellulari di neuroblastoma che sovraesprimono *MYCN* può ridurre la proliferazione o indurre il differenziamento e/o l'apoptosi [53, 54]. Inoltre, la sovraespressione di *MYCN* umano nel neuroectoderma del topo transgenico produce, in modo dose-dipendente, tumori che assomigliano al neuroblastoma [55].

1.2.3 Sovraespressione ed amplificazione di *MYCN*

L'espressione aberrante di *MYCN*, comunemente (sebbene non esclusivamente) associata all'amplificazione genica, è stata dimostrata in vari tumori. In particolare, nel neuroblastoma la sovraespressione di *MYCN* rappresenta un marcatore di prognosi infausta; è presente nella

maggior parte dei casi e, nel 25-30% di questi, è associata ad amplificazione della sequenza genica [56-58]. Altri tumori in cui l'amplificazione di *MYCN* è stata dimostrata sono: il retinoblastoma [59], il medulloblastoma [60], il glioblastoma [61], l'astrocitoma e il tumore di Wilms [62], il tumore del polmone a piccole cellule [63] ed il linfoma anaplastico a grandi cellule [64]. La sovraespressione di *MYCN* (senza amplificazione) è anche una importante caratteristica dei carcinomi della mammella, nei quali correla con uno specifico stadio clinico, grado istologico e prognosi clinica [65].

1.2.4 Amplificazione di *MYCN* nel rhabdomyosarcoma

Numerosi studi hanno dimostrato l'amplificazione di *MYCN* nel rhabdomyosarcoma. Studi iniziali condotti utilizzando le tecniche *Southern blotting* [66, 67] e FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) [68], avevano suggerito che l'amplificazione di *MYCN* fosse specifica ed esclusiva per gli ARMS e non presente negli ERMS [66, 69]. Invece vari studi più recenti hanno dimostrato la presenza dell'amplificazione di *MYCN* in entrambi i sottotipi [23, 69, 70]. Uno studio, condotto prevalentemente su campioni biotipici di RMS, ha confermato la presenza di espressione dell'oncogene *MYCN*, sia come trascritto sia come proteina, su tutti i campioni considerati, mentre ha riscontrato la presenza di amplificazione solo in uno dei campioni, suggerendo l'ipotesi che anche la sola espressione dell'oncogene possa contribuire all'acquisizione dell'aspetto maligno, indipendentemente o meno dallo stato di amplificazione [69]. Williamson *et al.* [23] hanno esaminato l'espressione nell'amplificazione di *MYCN* in 113 casi di RMS utilizzando la PCR quantitativa ed hanno rilevato un'amplificazione di *MYCN* significativa (definita come un aumento di almeno quattro volte del numero di copie del gene rispetto al normale) nel 25% degli ARMS e nel 16% degli ERMS. Il numero di copie geniche era significativamente maggiore negli ARMS rispetto agli ERMS, ma l'amplificazione non era esclusiva degli ARMS. Sebbene un aumentato numero di copie di *MYCN* fosse chiaramente associato con una prognosi infausta negli ARMS, questa correlazione non era presente negli

ERMS. Anche l'espressione di *MYCN* (a livello di mRNA) era significativamente maggiore negli ARMS rispetto agli ERMS, con associazione tra elevati livelli di espressione e scarsa sopravvivenza libera da malattia dei pazienti. Quindi, negli ARMS (in cui il numero di copie geniche di *MYCN* e l'espressione sembrano correlate) sia l'amplificazione sia l'aumentata espressione sono associate a prognosi infausta. Invece, negli ERMS un numero elevato di copie geniche non necessariamente porta ad un'aumentata espressione genica e non c'è una chiara correlazione con la prognosi clinica. Inoltre è stato dimostrato che N-myc *in vitro* regola positivamente l'attività del promotore di *PAX3* legandosi ad una *E-box* non canonica [71], suggerendo che N-myc *in vivo* è in grado di regolare l'espressione dell'oncogene *PAX3*, e quindi anche del gene di fusione *PAX3-FKHR*.

1.2.5 *MYCN* come *target* terapeutico

L'importanza di *MYCN* nell'oncogenesi del neuroblastoma e potenzialmente di altri tumori compreso il rhabdomyosarcoma, associata alla mancanza di espressione nelle cellule adulte non maligne, rende *MYCN* un importante *target* per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche. Numerose strategie sono in studio [42], sebbene tutte siano correntemente in stadio precoce e nessuna abbia raggiunto la fase clinica per il trattamento del RMS.

1.2.5.1 Immunoterapia

Un approccio immunoterapeutico consiste nel produrre linfociti T citotossici (CTL) indirizzati contro epitopi presentati dalle cellule tumorali sulle molecole MHC di classe I. L'espressione della proteina N-myc può essere utilizzata come marcatore specifico delle cellule tumorali e bersaglio molecolare dell'immunoterapia. Ad esempio, Sarkar e Nuchtern [72] hanno utilizzato un peptide di 9 aa derivato da N-myc per produrre, dai linfociti di sangue periferico di donatori sani e pazienti con neuroblastoma, linfociti T citotossici che specificamente uccidono linee cellulari di neuroblastoma con *MYCN* amplificato.

Alternativamente, c'è un crescente interesse verso un vaccino anti-tumorale, in cui nel paziente viene stimolata una risposta immune citotossica e tumore-specifica in seguito alla somministrazione di un vaccino comprendente peptidi tumore-specifici (compresi potenzialmente quelli derivati da N-myc). Sebbene questi approcci siano ancora lontani dal raggiungimento degli studi clinici nel trattamento del rhabdomyosarcoma, c'è una crescente evidenza dell'efficacia dell'immunoterapia e dei vaccini nel trattamento di vari tumori [73].

1.2.5.2 Piccole molecole inibitrici

N-myc, come gli altri membri della famiglia Myc, svolge il suo ruolo formando eterodimeri con Max che attivano la trascrizione di altri geni. Quindi un potenziale meccanismo per inibire N-myc consiste nell'impedire la dimerizzazione N-myc/Max. Berg *et al.* [74] hanno utilizzato la tecnica FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) per valutare la capacità di circa 7000 molecole organiche per di inibire la dimerizzazione N-myc/Max. Quattro composti sono stati identificati e la loro efficacia è stata confermata mediante le tecniche ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) ed EMSA (*Electrophoretic Mobility-Shift Assays*).

Uno studio alternativo per valutare potenziali inibitori di N-myc è stato svolto da Lu *et al.* [75]. Un'analisi iniziale di 2800 composti ha individuato fra questi 5 molecole come possibili inibitori, ulteriori valutazioni sono in corso.

1.2.5.3 Oligonucleotidi antisenso

Farmaci analoghi degli acidi nucleici si sono mostrati efficaci per l'inibizione di *MYCN* in modelli *in vitro* e *in vivo* di neuroblastoma, suggerendo che queste molecole possano essere utilizzate nel trattamento del RMS con *MYCN* amplificato. In una linea cellulare di neuroblastoma umano, un oligonucleotide antisenso diretto contro i codoni 2-7 di *MYCN* si è mostrato efficace nel ridurre l'espressione della proteina N-myc, inibendo la divisione cellulare e promuovendo il differenziamento [53]. Successivamente gli oligonucleotidi antisenso sono

stati utilizzati in un modello murino di neuroblastoma [55, 76] ed hanno indotto una significativa riduzione dell'incidenza dei tumori o della massa tumorale. Questi dati alimentano la speranza che gli oligonucleotidi antisenso diretti contro *MYCN* possano essere utilizzati nel trattamento del neuroblastoma e potenzialmente anche nel RMS con *MYCN* amplificato.

Un approccio alternativo per inibire *MYCN* è l'uso degli RNA *interference* [77]. Questi sono stati utilizzati contro altri RNA *target* nella terapia di altri tumori [78]; un problema chiave per l'utilizzo nella terapia clinica è rappresentato dalla farmacocinetica di tali molecole.

Una difficoltà associata all'uso degli oligonucleotidi antisenso nella pratica clinica è la suscettibilità di queste molecole alla rapida degradazione ad opera delle nucleasi. Tra le varie alternative che sono state sviluppate, gli Acidi Peptido-Nucleici (PNA), mostrano una maggiore stabilità ed una più lunga durata d'azione.

1.3 PNA (*Peptide Nucleic Acid*)

1.3.1 Struttura dei PNA

I PNA sono analoghi sintetici degli acidi nucleici, in cui il normale scheletro fosfodiesterico è sostituito da una catena pseudo-peptidica formata da monomeri di N-(2-amminoetil)glicina. Le basi azotate sono legate covalentemente a questa struttura poliammidica attraverso un ponte metilen-carbonilico (figura 5) [79, 80]. Dal punto di vista chimico i PNA non sono né un peptide né un acido nucleico e questa struttura atipica conferisce loro numerosi vantaggi rispetto agli altri analoghi del DNA. Nonostante queste modificazioni rispetto agli acidi nucleici naturali, i PNA si legano in modo sequenza specifico al DNA e all'RNA secondo le regole di appaiamento di Watson-Crick [80]. I PNA sono molecole non ioniche e achirali, e la mancanza di repulsione elettrostatica tra i filamenti rende i *duplex* ibridi PNA/DNA e PNA/RNA maggiormente stabili rispetto ai naturali omo- ed etero-*duplex* [81]. Inoltre non

essendo substrato di enzimi idrolitici come proteasi e nucleasi, i PNA non vengono degradati nelle cellule e sono estremamente stabili nei fluidi biologici [82].

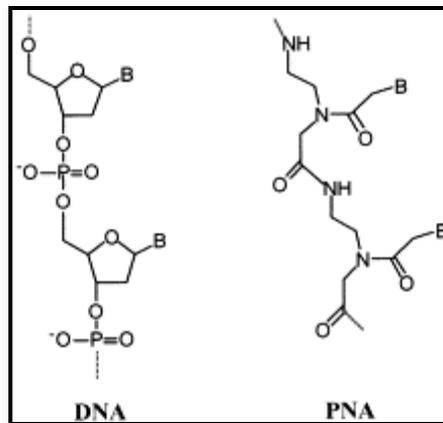


Figura 5. Struttura chimica di DNA e PNA.

1.3.2 Sintesi e purificazione

I PNA possono essere preparati seguendo i protocolli *standard* di sintesi in fase solida per i peptidi [83], utilizzando resine come supporto. Modificazioni post-sintetiche dei PNA possono essere introdotte accoppiando i gruppi desiderati a residui di lisina o cisteina inseriti nel PNA [84]. I PNA possono contenere anche modificazioni dello scheletro o una struttura chimerica, come ad esempio le chimere PNA/DNA costituite da un oligomero PNA fuso ad un oligomero DNA [85]. Dopo la sintesi, la procedura prevede il distacco del PNA dal supporto solido e la purificazione tramite HPLC.

1.3.3 Proprietà chimico-fisiche

Poiché i PNA e il DNA non hanno gruppi funzionali in comune ad eccezione delle basi azotate, la stabilità chimica del PNA differisce in modo significativo da quella del DNA.

I PNA sono composti neutri e quindi hanno una scarsa solubilità in acqua rispetto al DNA. I PNA sono molecole stabili; tuttavia alcune instabilità chimiche possono derivare dal gruppo funzionale NH_2 libero all'estremo amminico [86]. Le molecole neutre di PNA hanno la tendenza a formare aggregati in modo dipendente dalla sequenza nucleotidica. La solubilità del

PNA è legata anche alla lunghezza dell'oligomero e al rapporto purine:pirimidine [87]. Alcune recenti modificazioni, inclusa l'incorporazione di residui di lisina carichi positivamente, hanno mostrato un miglioramento della solubilità. Per aumentare la solubilità in acqua, possono anche essere introdotte cariche negative, specialmente nelle chimere PNA/DNA. Le proteine che riconoscono il DNA non interagiscono con i PNA della stessa sequenza nucleotidica, probabilmente per la mancanza delle interazioni elettrostatiche con lo scheletro [88].

I coefficienti di estinzione dei monomeri dei PNA non sono ben caratterizzati come quelli di DNA e RNA. Ci si aspetta che gli oligomeri dei PNA abbiano coefficienti di estinzione diversi a quelli di DNA e RNA, poiché lo scheletro peptidico dovrebbe perturbare diversamente il sistema π delle nucleobasi. Per questo motivo, per tutti gli scopi pratici, la concentrazione di un oligomero PNA è determinata misurando l'assorbanza a 260 nm a 80°C [89]. A tale temperatura, le basi azotate sono considerate completamente distaccate e la perturbazione del sistema π da parte dello scheletro peptidico è assunto come meno importante.

I PNA possono ibridizzare con sequenze complementari di DNA o RNA, secondo due schemi:

- i PNA contenenti le quattro basi azotate naturali ibridizzano con gli acidi nucleici complementari seguendo le regole di appaiamento delle basi di Watson-Crick. Si forma un *duplex* PNA/DNA o PNA/RNA che assomiglia alla forma B del DNA (figura 6A) [90, 91];
- i PNA contenenti solo pirimidine (T o C) possono ibridizzare con sequenze complementari di DNA a doppio filamento. In questo caso, il PNA invade la doppia elica del DNA e ibridizza con la sequenza *target*, mentre il secondo filamento di DNA viene allontanato e forma un "D-loop" [79]. Si forma così un *triplex* PNA/DNA/PNA, in cui una parte del PNA si lega alla sequenza *target* secondo le regole *standard* di appaiamento di Watson-Crick, mentre l'altra porzione del PNA forma il terzo filamento del *triplex* con un appaiamento Hoogstein (figura 6D-E) [80].

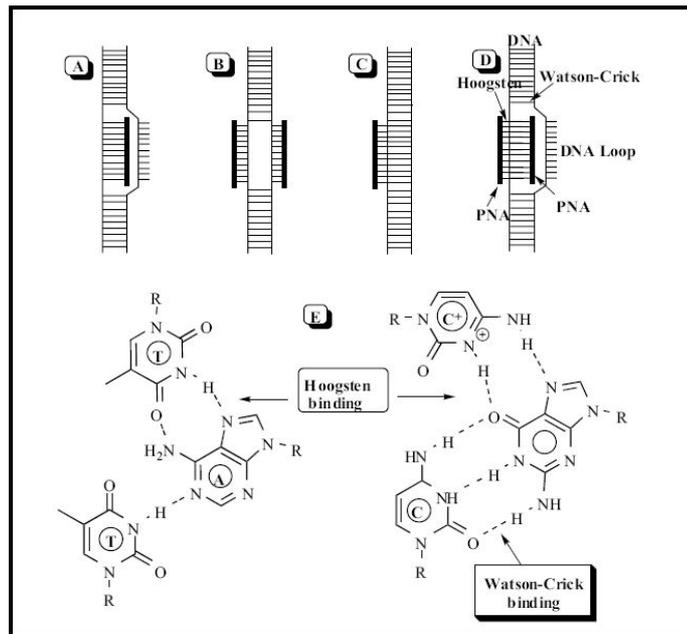


Figura 6. Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi di legame dei PNA al DNA a doppio filamento. (A) Invasione nella doppia elica di DNA e formazione del *duplex* PNA/DNA, tipico dei PNA omopurinici. (B) Formazione di un doppio *duplex* PNA-DNA, possibile solo per PNA contenenti nucleo basi modificate. (C) Struttura a tripla elica PNA/DNA/DNA formata dai PNA omopirimidinici ricchi in citidine. (D) Complesso *triplex* PNA/DNA/PNA con formazione del “D-loop”. (E) Legami a idrogeno negli appaiamenti di Watson-Crick e Hoogsteen [92].

L’ibridizzazione PNA-acido nucleico è molto sensibile ai *mismatch*; infatti si è visto che i PNA si legano preferenzialmente alle sequenze complementari, più debolmente a quelle che contengono un *mismatch* e non si appaiano a quelle contenenti due *mismatch* [93].

1.3.4 Modulazione dell’espressione genica

L’elevata stabilità *in vivo*, la specifica ibridizzazione con gli acidi nucleici e la mancanza di tossicità, anche a concentrazioni relativamente elevate, hanno reso i PNA molecole promettenti per le applicazioni terapeutiche. Grazie alla loro abilità nel legarsi sia al DNA sia all’RNA, la prima applicazione dei PNA è stata quella di agenti anti-gene o antisense. I PNA sono in grado di bloccare l’espressione genica attraverso due strategie generali:

- inibizione della trascrizione attraverso il legame al DNA (strategia anti-gene) (figura 7a);
- inibizione della traduzione attraverso il legame all’ mRNA (strategia antisense) (figura 7b).

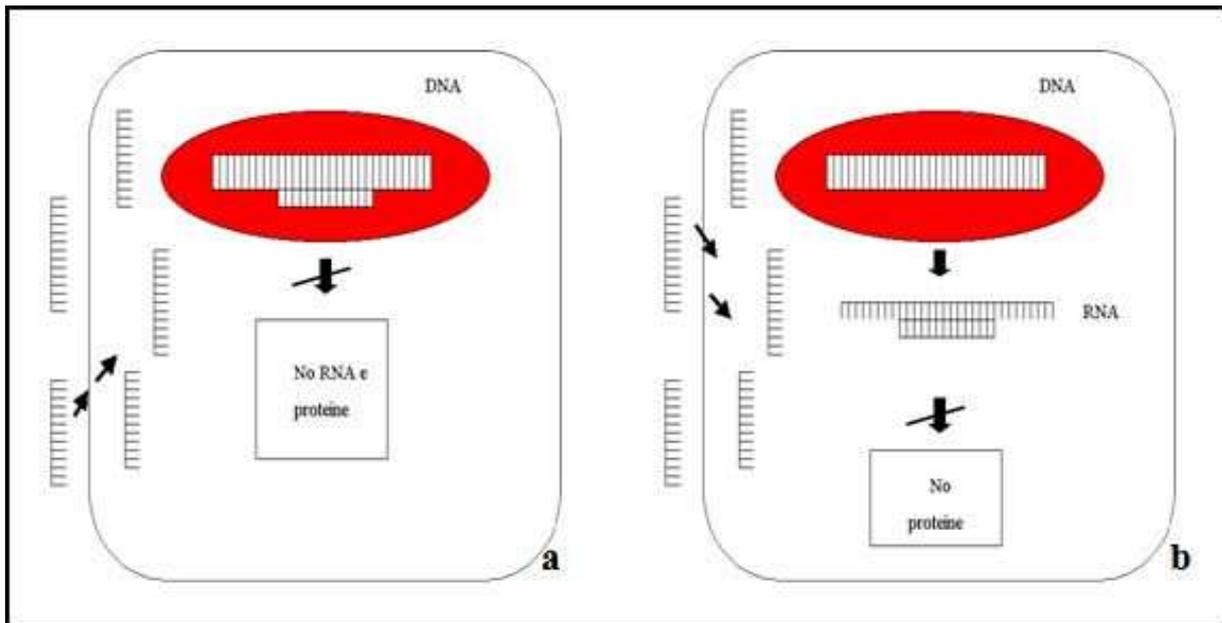


Figura 7. Strategia anti-gene (a) e antisenso(b) dei PNA.

Secondo la strategia anti-gene, i PNA possono arrestare il processo trascrizionale grazie alla loro capacità di invadere la doppia elica del DNA e formare un complesso o una stabile struttura *triplex*. Si legano al DNA per inibire l'iniziazione e l'allungamento della RNA polimerasi [94-96]. Essi possono anche essere progettati per legarsi ai siti di legame per i fattori di trascrizione all'interno del promotore, inibendo in questo modo il legame e l'azione dei corrispondenti fattori di trascrizione [97]. I PNA contro la regione del promotore possono formare un complesso stabile PNA-DNA, che riduce l'accesso al DNA alla polimerasi. I complessi PNA-DNA localizzati lontano a valle del promotore possono anche bloccare efficientemente la progressione della polimerasi e l'allungamento della trascrizione e perciò produrre RNA trascritti troncati; il *target* del PNA deve essere presente nel gene d'interesse. I *triplex* PNA₂/DNA arrestano la trascrizione *in vitro* e sono capaci di agire come un agente anti-gene [98]. Uno dei maggiori ostacoli incontrati nell'utilizzo dei PNA come agenti anti-gene è rappresentato dal fatto che l'invasione della doppia elica e la formazione del complesso PNA/DNA sono piuttosto lente in condizioni fisiologiche [99]. Numerose modificazioni dei PNA hanno mostrato miglioramenti in termini di legame. Inoltre, in condizioni fisiologiche, il

legame dei PNA al DNA plasmidico superavvolto è più veloce di quello al DNA lineare [100]. Quindi poiché il DNA cromosomico trascrizionalmente attivo di solito è superavvolto negativamente, può agire meglio come *target* del legame del PNA *in vivo*. Inoltre è stato visto che il legame dei PNA al DNA a doppio filamento è aumentato quando il DNA viene trascritto ed il legame avviene circa tre volte più efficientemente quando il *target* del PNA è situato sul filamento non stampo del DNA [99].

La strategia antisense dei PNA, invece, si basa sull'ingombro sterico, che provoca un blocco del processamento dell'RNA, del trasporto nel citoplasma o della traduzione. I risultati degli esperimenti *in vitro* sulla traduzione hanno dimostrato che i PNA sono capaci di inibire la traduzione del *target* ibridizzando con lo *start codon* AUG [101]. I PNA possono utilizzare diversi meccanismi per bloccare o alterare l'espressione genica, essenzialmente a seconda del loro *target* all'interno dell'mRNA. Quando ibridizzano con il 5'UTR, i PNA possono impedire il legame del ribosoma, mentre quando si legano lungo il trascritto possono bloccare l'allungamento del peptide. I PNA possono anche bloccare i siti di *splicing* e alterare la produzione delle varianti di *splicing*. In questi tre meccanismi l'mRNA rimane intatto e l'efficacia dell'approccio può essere valutato osservando la diminuita o alterata espressione della proteina. I PNA che formano *triplex* sono in grado di ostacolare la traduzione nella regione codificante dell'mRNA. Si è anche visto che miscele di diversi PNA inibiscono la traduzione anche ad una concentrazione molto inferiore a quella utilizzata per ciascuno di essi da solo [102].

1.3.5 Uptake dei PNA *in vitro* e *in vivo*

Lo scarso *uptake* cellulare dei PNA è considerato il maggiore ostacolo nella prospettiva di utilizzare i PNA come agenti terapeutici.

Usando vescicole fosfolipidiche (liposomi) come modello di membrane cellulari, Wittung e collaboratori hanno dimostrato che i PNA hanno un velocità di efflusso dai liposomi molto

lenta ($t_{1/2}$ di 5.5 e 11 giorni per due PNA di 10 nucleotidi) [103]. Da questi esperimenti si evince che l'entrata dei PNA nelle cellule, per diffusione passiva, è molto lenta. Anche in altri studi, è stato dimostrato che l'entrata dei PNA in alcune cellule e linee cellulari è eccessivamente lenta o addirittura non individuabile.

In contrasto, numerosi gruppi hanno trovato che il PNA entra in alcuni tipi di cellule, suggerendo specifici meccanismi di trasporto per queste molecole [95]. È stato riportato, in studi sia *in vitro* sia *in vivo*, che i PNA entrano nelle cellule neuronali di ratto. In neuroni di ratto in coltura, i PNA entrano nelle cellule e mostrano un'inibizione dell'espressione dei geni *target*, dipendente dalla dose e dal tempo [104]. L'*uptake* da parte dei neuroni è stato mostrato anche *in vivo*. Quando iniettati nel cervello del ratto, i PNA sono in grado di diminuire l'espressione del gene *target* mostrando un'attività antisense [105]. Inoltre, numerosi gruppi hanno dimostrato che, iniettati per via endovenosa o intraperitoneale nei ratti, i PNA possono attraversare la barriera emato-encefalica ed entrare nei neuroni, provocando una risposta antisense [95, 104].

Successivamente si è visto che è possibile indurre l'*uptake* di PNA anche da parte di mioblasti, fibroblasti, linfociti e altri tipi cellulari, usando elevate concentrazioni di PNA e lunghi tempi di incubazione [98, 106]. Quindi l'*uptake* dei PNA sembra dipendere dal tipo cellulare.

Pertanto per facilitare l'*uptake* dei PNA nelle cellule eucariotiche sono stati proposti numerosi metodi. Questi comprendono:

- permeabilizzazione della membrana cellulare con lisolectina [96] o detergenti come Tween [107];
- temporanea permeabilizzazione con streptolisina O [108];
- modificazione dei PNA con motivi idrofobici [109];
- impiego di vescicole di trasporto, quali i liposomi [110];

- coniugazione del PNA a ligandi recettoriali o ad anticorpi che inducono l'endocitosi recettore-mediata dei rispettivi coniugati [111];
- coniugazione con peptidi che promuovono la traslocazione attraverso la membrana cellulare [112] e il *targeting* in compartimenti specifici [113]. La classe dei cosiddetti CPP (*Cell Penetrating Peptides*) sta crescendo rapidamente. Ad esempio differenti studi hanno dimostrato che i peptidi *Penetratin* [114] e *Transportan* [112] sono in grado di trasportare i PNA attraverso la membrana citoplasmatica in cellule eucariotiche. Inoltre costrutti PNA-NLS (*Nuclear Localisation Signal*) aumentano l'*uptake* cellulare dei PNA, facilitano il loro trasporto dal citoplasma al nucleo e aumentano la stabilità del *duplex* PNA/DNA mediante interazioni elettrostatiche [113, 115];
- legame del PNA ad una sequenza di DNA in una catena oligonucleotidica lineare e coniugazione della chimera PNA/DNA con lipidi cationici [116];
- microiniezione [94];
- elettroporazione.

1.3.6 Altre applicazioni dei PNA

Sebbene inizialmente siano stati utilizzati come agenti antisense e anti-gene, i PNA hanno recentemente trovato altre applicazioni in biologia molecolare. Tra queste, le principali sono:

- inibitori di alcuni enzimi, come telomerasi, trascrittasi inversa ed elicasi [107, 117, 118];
- mutagenesi sito-specifica [108];
- attivazione dell'espressione di geni endogeni [119, 120];
- coniugazione di vettori plasmidici con peptidi, proteine, farmaci e marcatori [121, 122];
- aumentata amplificazione tramite PCR [123];
- *Real-Time* PCR [124];
- ibridizzazione con PNA come alternativa all'ibridizzazione Southern [125];
- tecnica PARC (*PNA-Assisted Rare Cleavage*) [126];

- sistemi di enzimi di restrizione artificiali [127];
- determinazione della lunghezza dei telomeri [128];
- purificazione degli acidi nucleici [129];
- PNA come uno strumento diagnostico per l'analisi delle mutazioni genetiche mediante PCR (*PNA-Directed PCR Clamping*) [130, 131];
- *screening* delle mutazioni genetiche con elettroforesi capillare [132];
- PNA come sonda per acidi nucleici biosensori [133]
- PNA come sonda nella PNA-FISH [128].

I PNA sono stati recentemente utilizzati anche in una nuova applicazione terapeutica extracellulare: un complesso anticorpo/PNA è utilizzato per legare antigeni tumore specifici sulla superficie delle cellule tumorali *in vivo*. Successivamente viene aggiunto un secondo PNA complementare, legato ad un appropriato radioisotopo. Questo processo concentra l'isotopo in prossimità delle cellule tumorali, danneggiandole, senza colpire le cellule normali [99].

2. Scopo della tesi

L'amplificazione e/o l'espressione dell'oncogene *MYCN* è una peculiarità di numerosi tumori pediatrici, tra cui il rhabdomyosarcoma (RMS). A causa del ristretto *pattern* di espressione di *MYCN* dopo la nascita, gli effetti collaterali dell'inibizione, anche sistemica, di *MYCN* dovrebbero essere moderati, quindi *MYCN* è un *target* ideale per una terapia efficace, paziente specifica e non tossica. Nel laboratorio presso il quale è stato svolto il progetto del dottorato, i PNA (acidi peptido nucleici) sono stati precedentemente utilizzati per l'inibizione di *MYCN* nel neuroblastoma [134, 135].

Lo scopo del progetto di ricerca è stato la valutazione dell'effetto antitumorale di un PNA anti-gene anti-*MYCN*, sia *in vitro*, utilizzando diverse linee cellulari umane di ARMS ed ERMS, che *in vivo* utilizzando un modello murino di *xenograft* di rhabdomyosarcoma alveolare umano.

In vitro, lo studio si è avviato con una valutazione dell'amplificazione e dell'espressione genica di *MYCN* nelle linee cellulari di RMS, mediante FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), *Real-Time* PCR e *western blot*. Sono stati sintetizzati un PNA anti-gene anti-*MYCN* diretto contro una sequenza unica dell'esone 2 del gene *MYCN*, un PNA mutato, che presenta mutazioni in 3 nucleotidi, per valutare la specificità d'azione del PNA anti-gene, e un PNA anti-*MYCN* marcato con rodamina per valutarne l'ingresso e la localizzazione intracellulare. È stata quindi valutata l'attività del PNA anti-gene anti-*MYCN* nei confronti dell'espressione di *MYCN*, mediante *Real-Time* PCR e *western blot*, e su alcune funzioni cellulari, come la vitalità e l'apoptosi. Sulla linea cellulare RH30 è stato condotto uno studio per valutare i geni direttamente regolati (indotti o repressi) da *MYCN* e gli effetti indotti dal PNA anti-gene anti-*MYCN* sull'espressione genica *in toto*, utilizzando la tecnologia dei *microarray* ad oligonucleotidi dell'Affymetrix. I risultati ottenuti sono stati confermati mediante *Real-Time* PCR e *western blot* e i principali geni indotti e repressi dal trattamento sono stati studiati anche in altre linee cellulari di RMS.

In vivo l'effetto del trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* è stato valutato, utilizzando un modello murino di *xenograft* di ARMS umano, mediante *imaging* molecolare *Real-Time* utilizzando la micro-PET. Al termine del trattamento è stata condotta una valutazione istologica dell'effetto del PNA anti-gene anti-*MYCN* sui principali organi, mediante colorazione ematossilina-eosina ed osservazione al microscopio ottico.

3. Materiali e metodi

3.1 Colture cellulari

Negli esperimenti *in vitro* sono state utilizzate diverse linee cellulari umane di rhabdomiosarcoma:

- ARMS: RH30, RH4, RH28, RMZ-RC2
- ERMS: RH36, SMS-CTR, CCA e RD.

Le cellule RH30, RH4, RH28, RH36, SMS-CTR e RD sono state gentilmente fornite dal Dott. Rosolen della Clinica di Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Infine, le cellule RMZ-RC2 e CCA sono state gentilmente fornite dal Prof. Lollini del Dipartimento di Patologia Sperimentale dell'Università di Bologna.

La linea cellulare RH30 è stata ottenuta da una metastasi midollare di un rhabdomiosarcoma alveolare indifferenziato di un ragazzo di 17 anni. Le cellule presentano un cariotipo complesso con numerose anomalie numeriche e strutturali, come la traslocazione $t(2;13)(q35;q14)$, l'amplificazione del gene di fusione PAX3-FKHR [136], una mutazione del gene p53 ed esprimono elevati livelli di miogenina e myoD [137].

La linea cellulare RH4 è stata ottenuta da un rhabdomiosarcoma alveolare di una bambina di 11 anni [138]. Le cellule presentano un cariotipo con 45-49 cromosomi e la traslocazione $t(2;13)(q37;q14)$ [138, 139].

La linea cellulare RH28 è stata ottenuta da una metastasi di rhabdomiosarcoma alveolare localizzata in un linfonodo ascellare [140]. Dal punto di vista citogenetico, le cellule hanno un cariotipo circa tetraploide e sono caratterizzate dalla traslocazione $t(2;13)(q35;q14)$ [140].

La linea cellulare RMZ-RC2 è stata ottenuta da una metastasi midollare di un rhabdomiosarcoma alveolare umano. Le cellule RMZ possono differenziare *in vitro* lungo il

pathway miogenico; la maggior parte delle cellule esprimono desmina e una minoranza esprimono miosina embrionale. Il clone RC2 mantiene le proprietà differenziative della linea RMZ, ma crescono più rapidamente [141]. Le cellule RMZ-RC2 hanno un cariotipo circa tetraploide e presentano la traslocazione criptica $t(1;13)(p36;q14)$ e le concomitanti amplificazioni del gene di fusione *PAX7-FKHR* e dei geni *MYCN* e *MET* [136, 139].

La linea cellulare RH36 è stata ottenuta da un rhabdomiosarcoma embrionale di un ragazzo di 15 anni [142]. L'analisi citogenetica è risultata difficile a causa dell'elevato numero di cromosomi (iperpentaploide). Una metafase completa è stata analizzata mediante SKY ed ha mostrato 124 cromosomi, ma è stato impossibile definire il cariotipo cellulare [143].

La linea cellulare SMS-CTR è stata ottenuta da un rhabdomiosarcoma embrionale primario di un bambino di 1 anno. Le cellule presentano la perdita dell'eterozigosi nel locus 11p15, tipica degli ERMS, e una mutazione dell'oncogene *P53* [142].

La linea cellulare CCA è stata ottenuta da un rhabdomiosarcoma embrionale umano [144]. Queste cellule presentano un *pattern* di differenziamento miogenico precoce (esprimono desmina e, in parte, miosina) e sono tumorigeniche nei topi nudi dopo iniezione per via sottocutanea o intramuscolo [144]. Le cellule CCA presentano un cariotipo con 54 cromosomi e numerose anomalie cromosomiche strutturali, tra le quali la $t(1;13)(p36;q23)$ [145].

Infine, la linea cellulare RD è stata ottenuta da un rhabdomiosarcoma embrionale pelvico di una bambina caucasica di 7 anni [146]. L'analisi citogenetica, mediante SKY (*Spectral Karyotyping*), M-FISH (*Multicolor-FISH*) e CGH (*Comparative Genomic Hybridization*), ha mostrato che le cellule hanno cariotipo complesso formato da 43-51 cromosomi con numerosi riarrangiamenti cromosomici [143].

Le cellule di queste linee cellulari di RMS crescono adese formando un *monolayer*. Le cellule RH-30, RH-4 e RD sono state mantenute in coltura a 37 °C e al 5% di CO₂, in terreno RPMI

1640 addizionato di FBS al 10%, L-glutammina 2mM e antibiotici penicillina/streptomicina all'1%. Le cellule RH-28 e SMS-CTR sono state coltivate a 37 °C e al 7% di CO₂, in terreno RPMI 1640 addizionato di FBS al 10%, L-glutammina 2mM e penicillina/streptomicina all'1%. Infine, le cellule RH-36, RMZ-RC2 e CCA sono state mantenute a 37 °C e al 7% di CO₂, in DMEM addizionato di FBS al 10% FBS, L-glutammina 2mM e penicillina/streptomicina all'1%. Quando necessario, le cellule sono state staccate dalla fiasca mediante un'incubazione di 5 minuti a 37°C con tripsina (2,5 mg/ml), successivamente neutralizzata con terreno completo.

3.2 FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

3.2.1 Preparazione di metafasi ed interfasi

Per ottenere le metafasi e le interfasi da analizzare mediante FISH, le cellule in coltura devono essere nella fase esponenziale di crescita e non devono avere raggiunto la confluenza. Al mezzo di coltura sono stati aggiunti 10 µl/ml di Colcemid (GIBCO), per bloccare le cellule in mitosi, quindi, la fiasca è stata posta nuovamente nell'incubatore, con il tappo chiuso, per 90 minuti. Successivamente le cellule sono state trasferite in una Falcon da 15 ml e centrifugate per 10 minuti a 300 x g. Il *pellet* è stato risospeso in 10 ml di soluzione ipotonica (KCl 0,075M) (Invitrogen), posta precedentemente nel bagnetto a 37°C e, al fine di indurre la lisi, le cellule sono state incubate per 20 minuti a 37°C nel bagnetto termostatico. La soluzione fissante, costituita da alcool metilico e acido acetico glaciale in un rapporto di 3:1, è stata preparata e mantenuta a 4°C. Durante il pre-fissaggio, che permette di fissare i cromosomi per non farli disperdere, sono stati aggiunti 0,5 ml di fissativo, senza eliminare il sovrnatante, e, dopo una delicata risospensione, il campione è stato centrifugato per 10 minuti a 300 x g. Durante il fissaggio, invece, dopo aver eliminato con attenzione il sovrnatante, molto lentamente sono stati aggiunti 10 ml di fissativo, il *pellet* è stato risospeso e centrifugato per 10 minuti a 300 x g. Sono stati fatti 4 lavaggi con 8-10 ml di fissativo, centrifugando ogni volta per 10 minuti a 300

x g. Al termine dell'ultimo lavaggio le cellule sono state risospese in fissativo. Per ottenere un'adeguata apertura delle metafasi 2-3 gocce di preparato sono state fatte cadere su un vetrino, immerso precedentemente in etanolo. I vetrini con le metafasi e le interfasi sono stati lasciati asciugare per tre giorni, per poi procedere con la FISH.

3.2.2 FISH

I vetrini con le metafasi e le interfasi sono stati incubati in SSC 2X (SSC 20X: sodio citrato 0,3 M, NaCl 3M, pH 7) a 37°C per 30 minuti e poi deidratati con passaggi di 2 minuti in *coupling jars* contenenti etanolo a concentrazioni sempre maggiori (70%, 85% e 100%). Quindi i vetrini sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente. La soluzione denaturante, costituita da formamide deionizzata (70%), è stata incubata in un bagnetto termostatico a 73°C per almeno 30 minuti e la denaturazione del campione è stata eseguita immergendo i vetrini nella soluzione denaturante per 5 minuti. I vetrini sono stati successivamente deidratati per 2 minuti in etanolo freddo (-20°C) al 70%, 85% e 100% e sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente. La sonda utilizzata è una sonda LSI (*Locus-Specific Identifier*) *MYCN* (2p24.1) a singolo colore (arancione) (Vysis) (figura 8), che viene utilizzata, sia in metafase che in interfase, per rilevare il numero di copie genomiche di *MYCN*. In condizioni normali, all'interno di un nucleo ibridato, la sonda per *MYCN* dà luogo a due segnali di fluorescenza, ognuno dei quali corrisponde all'ibridizzazione con il gene *MYCN*, in posizione distale del braccio corto del cromosoma 2 nella regione 2p23-24. Al contrario, nelle cellule tumorali maggiore è l'amplificazione dell'oncogene e maggiore è il numero dei segnali di fluorescenza emessi.

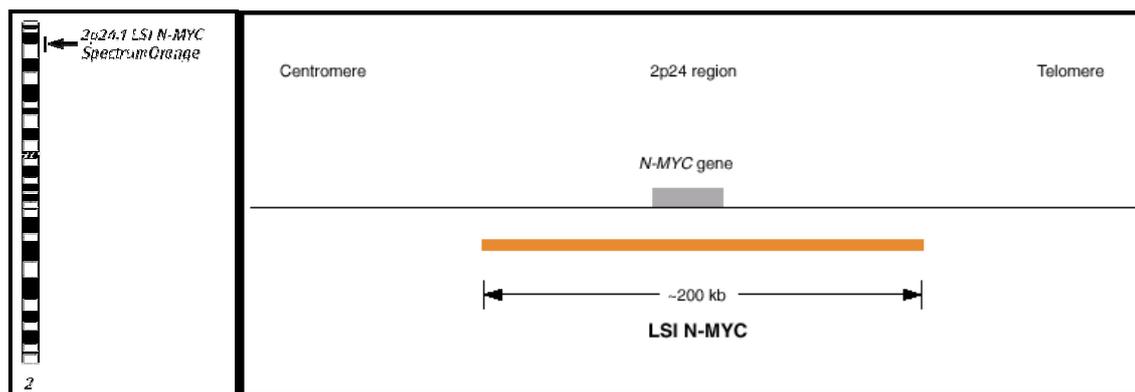


Figura 8. Rappresentazione schematica della regione di ibridizzazione della sonda LSI *MYCN* (2p24.1) (Vysis), che contiene una sequenza di DNA unica e specifica per l'oncogene *MYCN* localizzato sul cromosoma 2.

Per preparare e denaturare la sonda, è stato necessario miscelare per ogni vetrino 7 μ l di *hybridization buffer*, 1 μ l di sonda e 2 μ l di acqua sterile. La *mix* contenente la sonda è stata incubata a 73°C per 5 minuti. Sui vetrini completamente asciutti sono stati applicati i 10 μ l della *mix* e sono stati coperti con un vetrino coprioggetto. I vetrini sono stati posti in camera umida e incubati a 37°C *overnight*.

Il secondo giorno, la soluzione 0,4X SSC/0,3% NP-40 è stata messa a 73°C almeno 30 minuti prima dell'uso. Il vetrino coprioggetto è stato tolto e i vetrini sono stati immersi, per 2 minuti, nella soluzione a 73°C e successivamente, per altri 2 minuti, nella soluzione 2X SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente. I vetrini sono stati lasciati ad asciugare al buio e sono stati aggiunti 10 μ l di contro colorante (DAPI II) e il vetrino coprioggetto. I vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza BX-51 (Olympus), utilizzando il programma CytoVision.

3.3 Progettazione e sintesi dei PNA

Per la progettazione dei PNA, in laboratorio è stato sviluppato un programma in linguaggio C per generare popolazioni di PNA seguendo alcune regole specifiche:

- lunghezza massima: 18 basi

- lunghezza minima: 12 basi
- numero massimo di purine in una sequenza di 10 residui: 6
- numero massimo di G consecutive: 3.

Il programma di omologia BLAST è stato utilizzato per verificare la specificità della sequenze.

Poiché per svolgere la sua funzione anti-gene il PNA deve entrare nel nucleo delle cellule, il PNA è stato coniugato all'estremità N-terminale con un peptide NLS (*Nuclear Localisation Signal*), con sequenza amminoacidica PKKKRKV, in grado di mediare il trasferimento attraverso la membrana nucleare e di aumentare la stabilità del *duplex* PNA/DNA mediante interazioni elettrostatiche [115].

Per il disegno del PNA anti-gene anti-*MYCN* (PNA_{wt}) è stata selezionata una sequenza unica dell'esone 2 di *MYCN* (bp 1650-1665: 5'-ATGCCGGGCATGATCT-3'; Genbank accession no. M13241). Il PNA_{wt} ibridizza con il filamento antisenso del gene (tabella 2).

Lo stesso PNA anti-gene anti-*MYCN* è anche stato sintetizzato e coniugato con rodamina per verificarne l'ingresso e la localizzazione intracellulare.

Per valutare la specificità d'azione del PNA_{wt} è stato sintetizzato un PNA anti-gene anti-*MYCN* mutato (PNA_{mut}) che presenta la sostituzione di tre basi rispetto al PNA_{wt} (tabella 2).

I PNA sono stati sintetizzati nei laboratori del Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale dell'Università di Parma, utilizzando la procedura di sintesi per peptidi in fase solida, seguita da purificazione mediante HPLC. I PNA sono stati sciolti in acqua bidistillata e sono stati quantificati mediante lettura allo spettrofotometro (Beckman) a 260 nm.

PNA	Sequenza	Peso molecolare	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
PNA _{wt} -NLS	5'-H-ATGCCGGGCATGATCT- PKKKRKV-NH ₂ -3'	5234	154100
PNA _{mut} -NLS	5'-H-GTGCCGAGCATGGTCT- PKKKRKV-NH ₂ -3'	5250	158460

Tabella 2. Sequenza, peso molecolare e coefficiente di estinzione molare (ϵ) dei PNA utilizzati nello studio.

3.4 Trattamento delle cellule con PNA_{wt} e PNA_{mut}

Gli esperimenti di trattamento con il PNA_{wt} o PNA_{mut} sono stati condotti su tutte le linee cellulari di RMS: RH30, RH4, RH28, RMZ-RC2, RH36, SMS-CTR, CCA e RD. A seconda del tipo di analisi da effettuare le cellule sono state seminate in condizioni differenti:

- per la valutazione dell'*uptake* cellulare e dell'apoptosi, le cellule sono state seminate in *slide-flask*, 4×10^5 cellule in 2 ml di terreno per *slide-flask*;
- per l'estrazione dell'RNA per la valutazione mediante *Real-Time PCR*, le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti, 1×10^5 cellule in 500 μ l di terreno per pozzetto;
- per l'estrazione dell'RNA per la valutazione mediante *microarray* e l'estrazione delle proteine, le cellule sono state seminate in fiasche T25, 1×10^6 cellule in 1500 μ l di terreno per T25;
- per la valutazione della vitalità cellulare mediante ATPlite, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti, 5×10^3 cellule in 100 μ l di terreno per pozzetto.

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. Dopo 12 ore dalla piastratura le cellule, che hanno aderito al fondo del pozzetto/fiasca, sono state trattate con il PNA_{wt} o il PNA_{mut} in terreno OPTIMEM, addizionato di L-glutamina 2mM e antibiotici penicillina/streptomicina all'1%, ma senza FBS. I PNA sono stati utilizzati alle concentrazioni 10 o 20 μ M. Le concentrazioni sono state scelte sulla base degli studi condotti precedentemente [135]. Dopo 6 ore è stato aggiunto l'FBS ad una concentrazione del 4%. Dopo il trattamento le cellule sono state tenute per 6, 12, 24, 48, 72, 96 o 120 ore nell'incubatore a 37°C e 5% di CO₂. Nei

trattamenti con durata superiore a 3 giorni, la somministrazione dei PNA è stata ripetuta dopo 72 ore. Le cellule non trattate (controllo) sono state sottoposte allo stesso procedimento, ma senza aggiungere i PNA.

3.5 Localizzazione intracellulare del PNA

Per verificare l'ingresso del PNA-NLS nel nucleo delle cellule, è stato utilizzato un PNA-NLS coniugato con rodamina. L'esperimento è stato condotto su cellule RH30 e SMS. Le cellule sono state trattate con PNA-NLS rodaminato (10 μ M). Dopo 2 ore dal trattamento, il vetrino delle *slide-flask* è stato staccato, lavato due volte con PBS e poi fissato in paraformaldeide al 4% a 4°C per 30 minuti. L'analisi al microscopio a fluorescenza è stata effettuata mediante un microscopio ECLIPSE TE2000S (Nikon) e il programma PathVision.

3.6 Estrazione dell'RNA

Negli esperimenti di valutazione dell'espressione genica mediante *Real-Time* PCR, l'estrazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando il *kit RNeasy Mini Kit* della QIAGEN, che permette di isolare l'RNA totale anche a partire da piccole quantità di cellule. Le cellule sono state centrifugate per una prima volta nel terreno a 300 x g, poi sono state lavate in PBS, centrifugando di nuovo alla stessa velocità, per eliminare ogni residuo di terreno che avrebbe potuto ridurre l'efficienza di estrazione. Il *pellet* è stato risospeso in 350 μ l di soluzione lisante, costituita da β -mercaptoetanololo e *Buffer RLT* in proporzione 1:100. Il lisato di cellule è stato omogeneizzato aspirandolo per 20 volte con una siringa con un ago 20 G (0.9 mm di diametro) ed è stato aggiunto ad esso un volume di etanolo al 70%, per aggiustare le condizioni di legame. 700 μ l di campione sono stati trasferiti in una colonnina (*RNeasy mini column*) posta in un *collection tube* e centrifugati per 15 secondi a 8000 x g, per fare adsorbire l'RNA dalla membrana. Sono stati aggiunti 350 μ l di *Buffer RW1* e centrifugati per 15 secondi a 8000 x g.

Per rimuovere completamente il DNA è stata aggiunta alla membrana una *mix* costituita da 10 µl di DNasi I e 70 µl di *Buffer RDD* ed è stata lasciata a temperatura ambiente per 15 minuti. Quindi sono stati aggiunti 350 µl di *Buffer RWI* alla colonnina e sono stati centrifugati per 15 secondi a 8000 x g. La colonnina è stata trasferita in un nuovo *collection tube* da 2 ml, sono stati aggiunti 500 µl di *Buffer RPE* e sono stati centrifugati per 15 secondi a 8000 x g. E' stato fatto un ulteriore lavaggio col *Buffer RPE* ed è stato centrifugato per 2 minuti a 8000 x g, per asciugare la membrana. La colonnina è stata trasferita in un nuovo *collection tube* da 1.5 ml e l'RNA è stato eluito aggiungendo 60 µl di *RNase-free water* direttamente sulla membrana e centrifugando per 1 minuto a 8000 x g.

Negli esperimenti di analisi dell'espressione genica mediante *microarray*, l'RNA è stato estratto utilizzando il "*TRIzol reagent*" (Invitrogen). Le cellule sono state centrifugate per una prima volta nel terreno a 300 x g, poi sono state lavate in PBS, centrifugando di nuovo alla stessa velocità, per eliminare ogni residuo di terreno che avrebbe potuto ridurre l'efficienza di estrazione. Il *pellet* è stato risospeso in 1 ml di TRIzol (una soluzione monofasica di fenolo acido e guanidinio isotiocianato), per lisare le cellule. La lisi è stata seguita dall'estrazione con cloroformio: sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e dopo un'agitazione di 15 secondi mediante *vortex*, i campioni sono stati centrifugati a 12000 x g per 15 minuti a 4°C. Il campione risulta quindi separato in tre fasi: una fase acquosa trasparente contenente l'RNA, una fase intermedia bianca contenente il DNA ed una fase rosa contenente le proteine. La fase acquosa è stata raccolta in una nuova provetta e il DNA è stato precipitato per aggiunta di 500 µl di isopropanolo. Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, l'RNA è stato precipitato con una centrifugazione a 12000 x g per 10 minuti a 4°C. Infine, l'RNA è stato lavato con 800 µl di etanolo 75% e risospeso in acqua *RNase-free*.

L'RNA totale estratto è stato quantificato mediante una doppia lettura allo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) ad una lunghezza d'onda di 260 nm.

3.7 Retrotrascrizione e *Real-Time* PCR

L'RNA estratto è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando la retrotrascrittasi inversa "Superscript™ II" (INVITROGEN™). La reazione di retrotrascrizione prevede la preparazione di un prima *mix* contenente, per ogni campione, 1 µl di dNTP 10 mM, 1 µl di *Random hexamers* 0,4 µM, 500 ng-1 µg di RNA totale e H₂O sterile per portare a volume di 10 µl. Tale *mix* è stata posta nel termociclatore (PTC 225; Mj Research, Watertown, MA) a 65°C per 5 minuti (per denaturare l'RNA e i *Random hexamers*) e poi a 4°C per 1 minuto. Quindi ad ogni campione è stata aggiunta una seconda *mix*, costituita da 2 µl di Buffer 10X, 4 µl di MgCl₂ 25 mM, 2 µl di DTT 0.1 M e 1 µl di RNasi OUT 40 U/µl ed il tutto è stato posto nel termociclatore a 42°C per 2 minuti. Successivamente è stato aggiunto alla miscela di reazione 1 µl di Superscript II e la retrotrascrizione è stata effettuata con il seguente programma: 42°C per 50 minuti, 70°C per 15 minuti e 4°C fino allo *step* successivo. Infine è stato aggiunto 1 µl di RNasi H ad ogni campione, che è stato incubato a 37°C per 20 minuti.

La PCR quantitativa *Real-Time* è stata realizzata utilizzando la metodica *SYBR Green*. Questo saggio di quantificazione si basa sull'incremento della fluorescenza, in seguito ad amplificazione del template, causato dal legame della molecola *SYBR Green* al solco minore del DNA a doppio filamento. Non è possibile misurare i primi cicli, perché il segnale emesso è troppo basso, ma è comunque possibile misurare la fluorescenza dei cicli all'interno della fase di crescita esponenziale. Per ogni campione si ottiene un grafico con la sua curva di amplificazione, questa curva si distingue dal segnale di *background* tanto prima quanto maggiore è la quantità iniziale di template. È stata eseguita una PCR quantitativa relativa, in cui la quantità di cDNA del gene d'interesse è stata rapportata a quella del cDNA dei geni di controllo endogeno. Sono stati selezionati tre geni di controllo, implicati in meccanismi cellulari diversi: *ACTB* (*actin beta*), *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e *ATP5B* (*ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polipeptide*).

Sono state progettate e utilizzate le seguenti coppie di *primers*:

ACTB antisenso: 5' - CAG CGG AAG CGC TCA TTG CCA ATG G-3'

ACTB senso: 5' - TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A -3'

ADAM10 antisenso: 5' - CCA CAA ATA GGT TGG CCA GA -3'

ADAM10 senso: 5' - GCA ACA TCT GGG GAC AAA CT -3'

ATP5B antisenso: 5' - ATG GGT CCC ACC ATA TAG AAG G -3'

ATP5B senso: 5' - GTC TTC ACA GGT CAT ATG GGG A -3'

BMP5 antisenso: 5' - CGC TGG TGA GAA AAA TCC TTG T -3'

BMP5 senso: 5' - TCT AGC CAG CCT CCA TGA TAC C -3'

CBX4 antisenso: 5' - CTC CGG TTC CCA CGT GTT AT -3'

CBX4 senso: 5' - GTG GAG AGC ATC GAG AAG AAG C -3'

CDK9 antisenso: 5' - CAG CGT GAA CTT GAC CAA AAC A -3'

CDK9 senso: 5' - CGA ACC AAA GCT TCC CCC TAT -3'

DTX3 antisenso: 5' - GAA CTC CTG GGT TTG GGT GTT -3'

DTX3 senso: 5' - AGC TAT GAG AAG TAC GGC ACC A -3'

EIF4E antisenso: 5' - ATC AGC CGC AGG TTT GCT T -3'

EIF4E senso: 5' - AAT CCC CCG ACT ACA GAA GAG G -3'

FKHR antisenso: 5' - CTG TGG ATT GAG CAT CCA CC -3'

GADPH antisenso: 5' - CTT GAT TTT GGA GGG ATC TCGC -3'

GAPDH senso: 5' - CCA ATA TGA TTC CAC CCA TGG C -3'

GDF15 antisenso: 5' - GGA CAG CCG GAA CAG AGC CC -3'

GDF15 senso: 5' - CTG CAG TCC GGA TAC TCA CGC -3'

MET antisenso: 5' - GAG GGG TTG ATG GTC CTG AT -3'

MET senso: 5' - CAG CGA AGT CCT CTT AAC AT -3'

MSX2 antisenso: 5' - CCG ATT GGT CTT GTG TTT CC -3'

MSX2 senso: 5' - AAT TCA GAA GAT GGA GCG GC -3'

MYC antisenso: 5' - GAG CCT GCC TCT TTT CCA CA -3'

MYC senso: 5' - GCG ACT CTG AGG AGG AAC AAG A -3'

MYCN antisenso: 5' - TGA CCA CGT CGA TTT CTT CCT -3'

MYCN senso: 5' - CGA CCA CAA GGC CCT CAG T -3'

P21 antisenso: 5' - GGC GTT TGG AGT GGT AGA AA -3'

P21 senso: 5' - GGT TGG CTC CTG CCT GCT TA -3'

PAX3 antisenso: 5' - TAC CTG AGG TGA GAG GCC ATT G -3'

PAX3 senso: 5' - GCA CTG TAC ACC AAA GCA CG -3'

PAX7 antisenso: 5' - GGT TGG CTC CTG CCT GCT TA -3'

PAX7 senso: 5' - CCC ACT ACC CAG ACA TAT AC -3'

PLK4 antisenso: 5' - CTT CTG CAA ATC TGG ATG GC -3'

PLK4 senso: 5' - CAC CTC AGA CTG AAA CCG TAC AA -3'

TIAL1 antisenso: 5'- CAG ACG CAA TTC CTC CAC AGT A -3'

TIAL1 senso: 5'- CTC GTA AAC CAC CTG CAC CTA A -3'

La miscela di reazione per l'amplificazione è costituita da *SYBR Green Master Mix* 1X (Roche), 300 nM di ciascun *primer* e 10 ng di cDNA, in un volume finale di 20 µl. E' stata allestita una reazione in triplicato per ogni coppia campione-*primer* e, sempre in triplicato, controlli negativi per ogni coppia di *primers*. Le condizioni di PCR sono state valutate secondo il programma: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti e 50 cicli di 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto. A PCR completata la temperatura è stata fatta salire da 60°C a 95°C in 20 minuti, generando delle curve di *melting* che forniscono un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di dimeri di *primers*. La reazione è stata realizzata utilizzando il *GeneAmp 5700 Sequence Detection System* (Applied Biosystem).

3.8 Estrazione delle proteine e *western blot*

3.8.1 Estrazione delle proteine

L'estrazione delle proteine è stata effettuata in modo differente a seconda della localizzazione intracellulare della proteina da analizzare. Le proteine N-myc, Myc e Met sono state valutate in estratti proteici totali, mentre le proteine Fkhr e p21 sono state analizzate in estratti proteici nucleari.

Le proteine totali sono state estratte risospendendo il *pellet* delle cellule in una soluzione lisante composta da KH₂PO₄ 0,1M pH 7,5, Igepal 1%, β-glicerolfosfato 0,1 mM e l'inibitore delle proteasi Complete (Roche). Dopo 10 minuti di incubazione a 0°C (in ghiaccio), il campione è stato centrifugato a 15000 x g per 3 minuti a 4°C ed è stato prelevato il sovrantante contenente le proteine cellulari totali.

Le proteine nucleari sono state estratte utilizzando due *buffer*:

- *buffer* A composto da 10 mM Hepes pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,4% Igepal e Complete (Roche);
- *buffer* B composto da 20 mM Hepes pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glicerolo, 1 mM DTT e Complete (Roche).

Alle cellule adese è stato aggiunto il *buffer* A e, dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente, il lisato è stato centrifugato a 15000 x g per 3 minuti a 4°C. Il *pellet* è stato risospeso nel *buffer* B e lasciato in agitazione vigorosa per 2 ore a 4°C. Dopo una centrifugazione a 15000 x g per 5 minuti a 4°C, è stato prelevato il sovrantante contenente le proteine cellulari nucleari.

Le proteine sono state quantificate con il metodo Lowry [147] e la curva *standard* è stata costruita utilizzando quantità note della proteina BSA (*Bovine Serum Albumine*), mediante lettura allo spettrofotometro a 660 nm (Beckman).

3.8.2 Separazione elettroforetica delle proteine

Le proteine sono state separate mediante gel elettroforesi monodimensionale in condizioni denaturanti (SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophore*) secondo il metodo di Laemmli [148]. I campioni, contenenti 30 µg di proteine, sono stati solubilizzati mediante incubazione a 95°C per 5 minuti, dopo aver aggiunto *Laemmli sample buffer* 2X (Tris 125 mM pH 7, SDS 4%, glicerolo 20%, β-mercaptoetanolo 10% e blu di bromofenolo 0,004%) e acqua fino ad un volume di circa 20 µl. In seguito alla preparazione del *separating gel* al 7-10% (acrilamide 7-10%, Tris 375 mM pH 8.8, SDS 0,1%, APS 0,1%, TEMED 0,1%) e dello *stacking gel* al 4% (acrilammide 4%, Tris 125 mM pH 6.8, SDS 0,1%, APS 0,1%, TEMED 0,1%), i campioni sono stati caricati nel gel elettroforetico e fatti correre a 160 V per circa 60-90 minuti in *electrophoresis buffer* (Tris 125 mM, glicina 0,96 M e SDS 0,5%). E' stato utilizzato il marcatore di peso molecolare *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard* (Invitrogen).

3.8.3 Western blot

Le proteine separate mediante SDS-PAGE sono state trasferite su membrana di PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*, Hybond-P, Amersham Biosciences) mediante *western blot* [149] utilizzando il sistema *wet* della Bio-Rad (*Mini Trans-Blot Cell*). La membrana è stata attivata in metanolo per 10 secondi e quindi riequilibrata in acqua per 5 minuti. Spugne e filtri, prima dell'uso, sono stati messi a bagno nel *transfer buffer* (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 10%), quindi sono stati assemblati spugna-filtro-gel-membrana-filtro-spugna ed il trasferimento è stato eseguito in *transfer buffer* a 250 mA per 2 ore. La membrana è stata sottoposta a successive incubazioni di 1 ora a temperatura ambiente con la soluzione di *blocking* (PBS, Tween 0.2% e latte 5%), con l'anticorpo primario e, dopo 3 lavaggi in PBS e Tween 0.2%, con il corrispondente anticorpo secondario. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti in PBS, Tween 0,2% e BSA 3,5%.

Anticorpi primari utilizzati:

- c-Myc: *mouse monoclonal IgG* (Ab-2, Oncogene)
- Fkhr: *goat polyclonal IgG* (C-20, Santa Cruz Biotechnology)
- Met: *rabbit polyclonal IgG* (C-12, Santa Cruz Biotechnology)
- N-myc: *mouse monoclonal IgG* (NCM II 100, Calbiochem)
- P21: *rabbit polyclonal IgG* (C-19, Santa Cruz Biotechnology).

Anticorpi secondari utilizzati:

- *Sheep anti-mouse IgG-HRP* (*horseradish peroxidase*) (Amersham Biosciences)
- *Donkey anti-rabbit IgG-HRP* (Amersham Biosciences)
- *Donkey anti-goat IgG-HRP* (Santa Cruz Biotechnology).

La membrana è stata lavata 3 volte in PBS e Tween 0.2% per 5 minuti ed è stata incubata per 1-2 minuti al buio con la soluzione *ECL Detection* (Amersham Biosciences). La rilevazione è stata fatta al ChemiDoc (Biorad), utilizzando il programma QuantityOne.

3.9 Valutazione della morfologia e dell'attività metabolica cellulare

La morfologia delle cellule è stata valutata osservando, al microscopio ECLIPSE TE2000S (Nikon) utilizzando il programma PathVision, le cellule RH30 dopo 24 e 48 ore dal trattamento con il PNA_{wt} o il PNA_{mut} 10 μ M.

L'attività metabolica cellulare è stata valutata in seguito a trattamento con PNA_{wt} o PNA_{mut} in tutte le linee cellulari di RMS (RH30, RH4, RH28, RMZ-RC2, RH36, SMS-CTR, CCA e RD), utilizzando il saggio dell'ATPLite (*Luminescence ATP detection Assay System*, PerkinElmer). Questo sistema è basato sul monitoraggio della quantità di ATP (*Adenosine TriPhosphate*) cellulare e viene comunemente utilizzato per valutare gli effetti citotossici, citostatici e proliferativi di numerosi farmaci e composti biologici [150-152]. Le cellule di RMS sono state trattate con PNA_{wt} o PNA_{mut} 10 μ M in un volume finale di 100 μ l di terreno, nelle piastre da 96 pozzetti. Dopo 24, 48, 72, 96 o 120 ore di trattamento, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 μ l di soluzione lisante e la piastra è stata posta in agitazione per 5 minuti, per far fuoriuscire l'ATP dalle cellule e renderlo valutabile. Successivamente sono stati aggiunti, in ogni pozzetto, 50 μ l di soluzione substrato, che permette di stabilizzare la reazione dell'ATP, e la piastra è stata nuovamente messa in agitazione per 5 minuti. Dopo 10 minuti di incubazione al buio, la luminescenza è stata letta utilizzando il lettore di piastre *Infinite 200* (Tecan).

3.10 Valutazione dell'apoptosi

L'apoptosi è stata valutata su vetrino mediante immunistochemica, utilizzando il kit *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* (Roche), che è basato sulla tecnologia TUNEL (*Terminal-transferase-mediated dUTP Nick End Labelling*). Uno degli eventi caratteristici della morte cellulare per apoptosi è la frammentazione del DNA genomico, che può essere identificata, in una reazione enzimatica, marcando gli estremi 3'-OH liberi del DNA con nucleotidi modificati. Nella reazione TUNEL la marcatura delle rotture del DNA avviene ad opera dell'enzima TdT

(*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*), che catalizza la polimerizzazione di nucleotidi marcati con fluoresceina agli estremi 3'-OH liberi del DNA.

Le cellule RH-30 sono state piastrate in *slide-flask* e dopo 12 ore sono state trattate con PNA_{wt} o PNA_{mut} alle concentrazioni 10 o 20 µM. Dopo 24 e 48 ore di trattamento i vetrini con le cellule adese sono stati staccati dalla fiasca e fissati mediante un'incubazione con *Fixation solution* (4% paraformaldeide in PBS, pH7,4) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in PBS, i vetrini sono stati incubati prima con *Blocking solution* (3% H₂O₂ in metanolo) per 10 minuti a temperatura ambiente e poi, dopo un ulteriore lavaggio in PBS, con *Permeabilisation solution* (0,1% Triton X-100 in 0,1% sodio citrato) per 2 minuti a 0°C (in ghiaccio). I vetrini sono stati lavati due volte in PBS, incubati con 50 µl di *TUNEL reaction mixture* (*Label solution* + *Enzyme solution*) per 1 ora a 37°C al buio e, dopo tre ulteriori lavaggi in PBS, sono stati osservati al microscopio a fluorescenza ECLIPSE TE2000S (Nikon) utilizzando il programma PathVision.

3.11 Analisi dell'espressione genica mediante *microarray* Affymetrix

Per l'analisi dell'espressione genica sono stati utilizzati i *chip* "HG_U133_2" dell'Affymetrix, (Affymetrix: "Genechip® Human Genome U133 version 2"). Per l'ibridizzazione su vetrino sono stati utilizzati i campioni RH30 controllo e trattati con PNA_{wt} e PNA_{mut} dopo 12 ore di trattamento. L'analisi è stata effettuata seguendo il protocollo dell'Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

3.11.1 Preparazione dell'RNA poliadenilato di controllo

Per monitorare il processo di marcatura è stato aggiunto direttamente all'interno del campione un controllo esogeno positivo: Poly-A *Control Stock* diluito di 10000 volte. All'interno di ogni *array* sono presenti dei *probe* per geni di *B. subtilis* non presenti nei genomi eucariotici: *lys*, *phe*, *thr*, and *dap*. Tali geni vengono sintetizzati *in vitro* e i trascritti poliadenilati sono stati

premiscelati a concentrazioni note nel campione, in modo da essere amplificati e marcati insieme al campione.

3.11.2 Sintesi del primo filamento di cDNA

L'RNA del campione mescolato con l'RNA poliadenilato di controllo è stato utilizzato per la sintesi del primo filamento di cDNA.

La *MIX1* (1-5 µg di RNA estratto, 2 µl di RNA poly-A diluiti, 2 µl del *primer* T7-oligo(dT) 50 µM e acqua *RNase-free* per raggiungere il volume finale di 12µl) è stata preparata ed incubata a 70°C per 10 minuti, al fine di denaturare l'RNA. Quindi è stata raffreddata a 4°C per 2 minuti, sono stati aggiunti 7 µl di *MIX2* (4 µl di *buffer 5X First-Strand cDNA*, 2 µl di DTT 0,1 M e 1 µl di dNTP *mix* 10 mM) e il tutto è stato incubato a 42°C per 2 minuti. A questo punto, è stato aggiunto alla miscela di reazione 1 µl di Superscript II RT e la sintesi del primo filamento di cDNA è stata effettuata a 42°C per 1 ora. Alla fine del processo di sintesi il tutto è stato portato a 4°C per 2 minuti.

3.11.3 Sintesi del secondo filamento di cDNA

Il secondo filamento di cDNA è stato sintetizzato aggiungendo al primo stampo neo-sintetizzato 130 µl di *MIX3* (91 µl di acqua sterile, 30 µl del *buffer 5X Second-Strand cDNA*, 3 µl di dNTP *mix* 10 mM, 1 µl di E.Coli DNA Ligasi 10 U/µl, 4 µl di E.coli DNA Polimerasi I 10 U/µl, 1 µl di E.coli RNasi H 2U/µl e 1 µl di RNase H). Il campione è stato messo in incubazione per 2 ore a 16°C, successivamente sono stati aggiunti 2 µl di T4 DNA Polimerasi (10 U) ed il tutto è stato incubato per altri 5 minuti a 16°C. Infine sono stati aggiunti 10 µl di EDTA (0,5M).

3.11.4 Purificazione del doppio filamento di cDNA

Per purificare il doppio filamento di cDNA, sono stati aggiunti 600 µl di *cDNA Binding Buffer* al cDNA precedentemente ottenuto. La miscela è stata trasferita nella colonnina *cDNA Cleanup*

Spin Column ed è stata centrifugata per 1 minuto a 8000 x g, eliminando il *flow-through*. La *spin column* è stata trasferita in un nuovo *collection tube* da 2 ml, sono stati aggiunti 750 µl di cDNA *Wash Buffer* e sono stati centrifugati per 1 minuto a 8000 x g, eliminando il *flow-through*. La *spin column* è stata centrifugata per 5 minuti a 15000 x g fino a completa asciugatura della membrana, eliminando alla fine sia il *flow-through* che il *collection tube*. La *spin column* è stata quindi trasferita in un nuovo *collection tube* da 1,5 ml, e sono stati aggiunti 14 µl di cDNA *Elution Buffer* al centro della membrana. Dopo un'incubazione di 1 minuto a temperatura ambiente, è stata fatta una centrifugazione per 1 minuto a 15000 x g.

3.11.5 Sintesi di cRNA biotinilato

Il cRNA *target* è stato biotinilato attraverso una trascrizione in vitro (IVT), in modo tale da risultare marcato con nucleotidi coniugati con la biotina. La reazione è stata allestita in un volume finale di 40 µl: 12 µl di cDNA (tutto il cDNA purificato), 4 µl di IVT *Labeling buffer* 10X, 12 µl di IVT *Labeling NTP Mix*, 4 µl di IVT *Labeling Enzyme Mix* e acqua *RNase-free* a volume. Il tutto è stato incubato a 37°C per 16 ore in un termociclatore.

3.11.6 Purificazione e quantificazione del cRNA biotinilato

Per purificare il cRNA biotinilato, alla reazione precedente sono stati aggiunti 60 µl di acqua *RNase-free* (IVT), 350 µl di IVT *cRNA Binding Buffer* e 250 µl di etanolo (96-100%). Il campione (700 µl) è stato trasferito nella colonnina *IVT cRNA Cleanup Spin Column*, collocata precedentemente in un *collection tube* da 2 ml, ed è stato centrifugato per 15 secondi a ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm). Eliminati il *flow-through* e il *collection tube*, la *spin column* è stata trasferita in un nuovo *collection tube* da 2ml, sono stati aggiunti 500 µl di IVT *cRNA Wash Buffer* nella *spin column* ed è stata centrifugata per 15 secondi a ≥ 8000 x g, eliminando il *flow-through*. Successivamente sono stati aggiunti 500 µl di etanolo 80% (v/v) e la colonnina è stata centrifugata per 15 secondi a ≥ 8000 x g, scartando il *flow-through*. La *spin column* è stata centrifugata, con il tappo aperto, per 5 minuti a 15000 x g ed è stata trasferita in un nuovo

collection tube. Il cRNA è stato eluito aggiungendo 11 µl di acqua *RNase-free* direttamente al centro della membrana e centrifugando per 1 minuto a 15000 x g. Il passaggio dell'eluizione è stato ripetuto una seconda volta.

3.11.7 Quantificazione e frammentazione del cRNA

Il cRNA è stato quantificato mediante una doppia lettura allo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 ad una lunghezza d'onda di 260 nm.

La frammentazione del cRNA *target* prima dell'ibridizzazione sul *GeneChip probe array* è una fase molto importante per la buona riuscita del saggio. Il cRNA utilizzato per la frammentazione deve essere molto concentrato per avere un volume ridotto durante il processo, al fine di limitare la concentrazione del magnesio nel *cocktail* finale di ibridizzazione. La reazione di frammentazione è stata allestita in un volume finale di 30 µl, aggiungendo 6 µl del *buffer* di frammentazione 5X a 15 µg di cRNA biotilato. La miscela è stata incubata per 35 minuti a 94°C e successivamente raffreddata a 4°C.

Un normale processo di frammentazione genera una distribuzione di frammenti di RNA che vanno da 35 a 200 basi. La frammentazione è stata controllata su gel di agarosio al 2%.

3.11.8 Ibridizzazione

Il cRNA precedentemente frammentato è stato unito alla miscela di ibridizzazione nel seguente modo:

- 10 µg di cRNA frammentato
- 3,3 µl di Oligonucleotide B2 di controllo 3nM (Affymetrix)
- 10 µl Controllo Eucariotico di Ibridizzazione 20X (bioB, bioC, bioD, cre), (Affymetrix)
- 2 µl di DNA di sperma di aringa 10mg/ml (Promega Corporation)
- 2 µl di BSA acetilato 50 mg/ml (Invitrogen Life Technologies)
- 100 µl del *buffer* di ibridizzazione 2X*

- 20 µl di DMSO
- H₂O per arrivare ad un volume finale di 200 µl

* Buffer di ibridizzazione 2X (50 ml):

- 8,3 ml di MES stock 12X**
- 17,7 ml di NaCl 5M
- 4,0 ml di EDTA 0,5M
- 0,1 ml di Tween 20 al 10%
- 19,9 ml di acqua

**MES Stock 12X pH 6,6 (1000 ml):

- 70,4 g di MES-free acido monoidratato
- 193,3 g MES Sodium Salt
- 800 ml di acqua sterile *RNase-free*

La miscela di ibridizzazione è stata incubata per 5 minuti a 99°C, al fine di denaturare il campione. Nel frattempo l'*array* è stato equilibrato con un volume appropriato di *buffer* di ibridizzazione 1X, in rotazione per 10 minuti a 45°C. Il *cocktail* di ibridizzazione è stato portato a 45°C per 5 minuti ed infine centrifugato a 15000 x g per 5 minuti, al fine di rimuovere eventuali sostanze insolubili. Il *buffer* di ibridizzazione 1X è stato rimosso dall'*array* e 130 µl della miscela di ibridizzazione sono stati inseriti, mediante micropipette sterili, nell'*array*. La reazione di ibridizzazione è stata effettuata per circa 16 ore a 45°C in rotazione (60 rpm).

3.11.9 Lavaggi e marcatura del campione

Per i lavaggi e per la marcatura sono stati preparati i seguenti *buffer*:

1) *Buffer* per i lavaggi:

- Wash Buffer A: *Wash Buffer* Non-Stringente (6X SSPE, 0,01% Tween-20)
(20X SSPE: 3M NaCl, 0,2M NaH₂PO₄, 0,02M EDTA)

- Wash Buffer B: *Wash Buffer* Stringente (100 mM MES, 0,1M NaCl, 0,01% Tween-20)

2) *Buffer* per la marcatura:

- Soluzione SAPE: 600 μ l di *stain buffer* 2X (100 mM MES, 1M NaCl, 0.05% Tween-20), 48 μ l di BSA 50 mg/ml, 12 μ l di Streptavidina Ficoeritrina (SAPE) 1mg/ml e 540 μ l di acqua sterile (il tutto è stato diviso in due aliquote da 600 μ l che sono state utilizzate rispettivamente per gli *stain* 1 e 3).
- Soluzione anticorpale: 300 μ l di *stain buffer* 2X, 24 μ l di BSA 50 mg/ml, 6 μ l di *Goat* IgG stock 10 mg/ml, 3,6 μ l di anticorpi biotinilati 0,5 mg/ml e 266,4 μ l di acqua sterile.

Trascorse le 16 ore di ibridizzazione, il *cocktail* di ibridizzazione è stato rimosso e l'*array* è stato completamente riempito con il *buffer* di ibridizzazione non stringente (*Wash Buffer A*). Il vetrino è stato inserito nella *fluidic station 450*, dove sono stati impostati i seguenti *step* di lavaggio e marcatura:

- Lavaggio 1 di post ibridizzazione: 10 cicli a 25°C in *wash Buffer A*
- Lavaggio 2 di post ibridizzazione: 4 cicli a 50°C in *wash Buffer B*
- Marcatura: 10' in soluzione SAPE a 25°C
- Lavaggio post marcatura: 10 cicli a 25°C in *wash Buffer A*
- Seconda marcatura: 10' in soluzione anticorpale a 25°C
- Terza marcatura: 10' in soluzione SAPE a 25°C
- Lavaggio finale: 15 cicli a 30°C in *wash Buffer A*
- Temperatura finale di 25°C.

3.11.10 Quantificazione del segnale da un immagine scansionata.

Il risultato della scansione consiste in un'immagine dalla quale è possibile ottenere le informazioni, in termini quantitativi, relative all'espressione dei geni presenti sul vetrino. Il *file*

di immagine, che si ottiene dalla scansione diretta del vetrino, è un *file* .dat di circa 50 MB costituito da $\sim 10^7$ pixel, è una mappa d'intensità in due dimensioni della superficie del *microarray* ed i segnali di fluorescenza sono immagazzinati nei suoi pixel. Ogni *spot* del *microarray* è formato da 10x10 pixel, ognuno dei quali contiene un'informazione quantitativa dello *spot*, relativa al segnale più il rumore di fondo. Per prima cosa è necessario identificare la posizione di ogni *spot* sul supporto. Ciò avviene grazie all'allineamento sull'immagine di una griglia in modo tale da poter delimitare il segnale relativo ai diversi *probe*, nonché poter collegare lo schema degli *spot* ad un file allegato, che contiene le informazioni relative alle sonde, tra cui il nome del gene corrispondente ed i codici d'identificazione nelle banche dati genomiche. Una volta che gli *spot* sono stati identificati, è necessario separare il contributo del segnale da quello del *background*. Il rumore di fondo viene calcolato come la deviazione standard del 2% dei segnali di una particolare area costituita da 16 o più regioni dell'*array*. Al termine del filtraggio si ottiene, in un .cel *file*, un'immagine di 8x8 pixel rappresentativa del segnale di fluorescenza di ciascun *probe* privato del rumore di fondo. Il .cel *file* è un *file* numerico in cui sono immagazzinate le informazioni relative alla quantità di fluorescenza di ciascun *probe* sull'*array*. Per ottenere una misura quantitativa dell'espressione di ciascun gene nei vari campioni è necessario integrare l'informazione quantitativa di ogni *probe* appartenente ad un *probe set*. L'algoritmo MAS5, implementato nel *software* GCOS (Affymetrix), utilizza la metodica della *Tukey Biweight*, che per ogni *probe set* calcola la media pesata di ogni coppia di sonde PM (*Perfect Match*)-MM (*Mismatch*).

3.11.11 Normalizzazione e filtraggio dei dati.

L'obiettivo dell'esperimento di *microarray* si fonda sull'identificazione dei geni differenziali; tuttavia, è possibile che alcuni geni apparentemente differenziali siano in realtà falsi positivi, dovuti ad errori sistematici e variabilità sperimentale (variazioni che derivano da errori nella preparazione del campione, dalla realizzazione o dal processamento degli *array*: marcatura,

ibridizzazione e scannerizzazione). Si deve perciò introdurre una fase di normalizzazione dei dati.

La normalizzazione serve per rendere confrontabili i dati provenienti da *array*, e quindi campioni, diversi. La normalizzazione dei dati dei *microarray* viene effettuata sull'intero *set* di geni presenti sul vetrino. I presupposti di tale normalizzazione sono:

- i geni presenti sul vetrino sono un campionamento ampio e rappresentativo di tutti i geni espressi dal campione;
- la maggior parte dei geni espressi dai vari campioni non varia significativamente nelle condizioni sperimentali analizzate, ovvero il trascrittoma globale della cellula è costante e solo una piccola percentuale dei geni varia la propria espressione nei diversi campioni.

La normalizzazione dei dati nel metodo dell'algoritmo MAS5 viene effettuata tramite *scaling*: l'intensità di ogni *probe set* viene "scalata" in modo da rendere l'intensità media di tutti i *probe set*, in ogni *array*, pari ad un'intensità *target* decisa dall'utente, che di solito viene posta a 500.

Dopo la normalizzazione si procede con il filtraggio dei dati: vengono eliminati tutti quei *probe set* che non sono espressi in nessun campione, ovvero che vengono definiti "assenti" dall'algoritmo di *detection* in tutti i campioni.

I geni differenziali sono stati selezionati identificando, in primo luogo, tutti i geni definiti "increased" o "decreased" dall'algoritmo *change* dell'analisi di *comparison* nei campioni PNA_{wt} vs CTRL e PNA_{wt} vs PNA_{mut}, quindi, sono stati scelti solo quelli con un *Log ratio* >1 o <-1 (*Fold change* >2).

3.12 Studi *in vivo*

3.12.1 Modello murino

Gli studi *in vivo* sono stati eseguiti su un modello murino *xenograft* di rhabdomiosarcoma alveolare, che è stato messo a punto in uno studio precedente [153]. Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico Scientifico dell'Università di Bologna (prot. N° 47621-x/6 e prot. N° 46903-x/6) e condotti nel Centro unificato di Ricerca Biomedica Applicata (CRBA, www.CRBA.it).

Topi nudi CD1 dell'età di 6 settimane sono stati acquistati dai Laboratori Charles River e, per farli ambientare prima di iniziare gli esperimenti, sono stati tenuti nello stabulario con cibo ed acqua *ad libitum* per una settimana. Un totale di 7×10^6 cellule RH30, in fase di crescita logaritmica, sono state centrifugate e risospese in 100 μ l di soluzione fisiologica. Le sospensioni cellulari sono state iniettate sottocute, con una siringa da insulina, nel dorso dei topi anestetizzati con Zoletil 50 (10 μ l intramuscolo).

3.12.2 Trattamento *in vivo* con il PNA

I topi sono stati divisi in tre gruppi:

- I) 8 topi sono stati trattati con PNA_{wt} risospeso in soluzione fisiologica;
- II) 8 topi sono stati trattati con PNA_{mut} risospeso in soluzione fisiologica;
- III) 8 topi sono stati trattati con soluzione fisiologica seguendo le stesse modalità.

Le iniezioni sono state eseguite per via intraperitoneale con PNA_{wt} o PNA_{mut} 50mg/kg in 100 μ l di soluzione fisiologica, le prime tre ogni 24 ore e le successive ogni 48 ore. Il trattamento complessivamente è durato 17 giorni. Durante tutto lo studio sono stati monitorati il peso e il comportamento generale di ogni topo. Al termine dello studio i topi sono stati sacrificati e sottoposti ad autopsia.

3.12.3 Valutazione del tumore mediante micro-PET (*Positron Emission*

Tomography)

La Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) è una tecnica non invasiva della Medicina Nucleare sviluppata a metà degli anni '70, che permette la ricostruzione tridimensionale degli organi nei quali si distribuiscono i radiotraccianti (radioisotopi associati a specifiche molecole), all'interno di un soggetto vivo [154, 155]. La PET si sta affermando come tecnica di *imaging* molecolare per la specificità e l'accuratezza superiori alle comuni tecniche di diagnosi per immagini (come TAC (Tomografia Assiale Computerizzata) e MR (Risonanza Magnetica)) ed i principali campi di applicazione sono l'oncologia, la neurologia e la cardiologia. La micro-PET è un tomografo PET creato per studi sui piccoli animali da esperimento (topi, ratti, cavie, etc.), che permette di realizzare studi longitudinali su animali vivi, che non devono essere sacrificati per ogni analisi, diminuendo notevolmente il numero di animali utilizzati. Un radiotracciante molto utilizzato nell'*imaging* dei tumori è il ^{18}F -FDG (2- ^{18}F fluoro-2deossi-D-glucosio), un precursore del glucosio che, iniettato nel sangue, viene trasportato all'interno delle cellule e si accumula in quelle che, come le cellule cancerose, hanno un elevato metabolismo cellulare.

Tutti gli animali sono stati sottoposti a ^{18}F -FDG-micro-PET due giorni dopo l'inoculo delle cellule e sono stati utilizzati per lo studio solo i topi con un segnale positivo nella sede dell'inoculo, perché, sulla base degli studi condotti precedentemente [153], i topi risultati negativi avevano una scarsa probabilità di sviluppare il tumore. Tutti gli animali sono stati sottoposti a tre successive analisi micro-PET: 5, 14 e 20 giorni dopo l'inoculo. L'intera procedura diagnostica è stata svolta, come precedentemente descritta [153], presso la Medicina Nucleare dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria S.Orsola-Malpighi e consiste di questi passaggi fondamentali:

1. Prima anestesia: Sevofluorane 3-5% e ossigeno 1 l/min.
2. Iniezione intravenosa del radiofarmaco: 20 MBq di ^{18}F -FDG, in un volume di 100 μl .

3. Tempo di *uptake* (60 minuti): durante questo periodo l'animale è sveglio.
4. Seconda anestesia: Sevofluorane 3-5% e ossigeno 1 l/min.
5. Acquisizione delle immagini: le immagini sono state acquisite utilizzando un Tomografo ad Emissione di Positroni per piccoli animali (eXplore Vista DR, GE) per un tempo complessivo di acquisizione di 20 minuti in un singolo *step*.
6. Recupero: l'anestesia viene interrotta e l'animale viene posto in una camera riscaldata fino al completo recupero.
7. Ricostruzione delle immagini: le immagini vengono ricostruite iterative (OSEM 2D) e lette nei tre piani (assiale, sagittale e coronale).
8. Interpretazione delle immagini:
 - Interpretazione visiva: viene eseguita due giorni dopo l'inoculo delle cellule e l'analisi è considerata positiva se vi è un'area di aumentato *uptake* di FDG in corrispondenza del sito di inoculo.
 - Analisi semi-quantitativa: viene eseguita per ogni tumore identificato, utilizzando il valore TBR (*Target to Background Ratio*). La regione di interesse (ROI) è posizionata sull'area più attiva della massa neoplastica e il *Background* ROI è posizionato sul polmone. TBR viene calcolato con la formula:
$$\text{TBR} = \text{valore massimo in ROI} / \text{valore medio in Background ROI}$$
9. Analisi statistica: il TBR della prima scansione è stato confrontato con il TBR delle scansioni successive (quattro complessivamente), mediante il test t di Student [156]. La significatività statistica tra i valori sperimentali è stata determinata utilizzando il test t e la differenza è stata considerata significativa se $p < 0,05$.

3.12.4 Analisi di tossicità in vivo del PNA

Per valutare il potenziale effetto tossico del PNA_{wt}, è stata effettuata un'analisi istologica in tutti i principali organi, in topi transgenici 129X1/SvJ sottoposti allo stesso schema di trattamento con PNA_{wt} o soluzione fisiologica. Sono stati valutati: cuore, polmoni, fegato, pancreas, ghiandole parotidi, esofago, intestino, reni, ghiandole surrenali, utero, ovaie, milza, timo, cervello, midollo osseo e sangue periferico. Gli organi sono stati messi in paraffina, tagliati al microtomo e valutati in vetrini dopo colorazione con ematossilina-eosina. Per valutare le cellule del midollo osseo e del sangue periferico, è stata utilizzata la colorazione con May-Grunwald-Giemsa.

Per la colorazione ematossilina-eosina, i vetrini con sezioni di tessuto sono stati sottoposti ad incubazioni successive in toluolo, etanolo 100%, etanolo 95%, etanolo 70%, acqua distillata, ematossilina, acqua distillata, eosina, acqua distillata, etanolo (3 volte) e toluolo (2 volte). Dopo aver montato il vetrino coprioggetto, i campioni sono stati osservati al microscopio ottico.

Per la colorazione con May-Grunwald-Giemsa, i vetrini con gli strisci di sangue sono stati sottoposti ad incubazione con May-Grunwald per 3 minuti e, dopo un lavaggio in acqua, con Giemsa per 7 minuti. Dopo un ulteriore lavaggio in acqua distillata, è stato montato il vetrino copri oggetto ed i campioni sono stati osservati al microscopio ottico.

5. Risultati

5.1 Amplificazione di *MYCN* nelle linee cellulari di RMS

Per caratterizzare lo stato di amplificazione dell'oncogene *MYCN* nelle linee cellulari di RMS utilizzate negli studi *in vitro*, il numero di copie geniche di *MYCN* è stato valutato mediante FISH. Dall'analisi sulle 4 linee cellulari di ARMS (RH30, RH4, RH28 e RMZ-RC2), è emerso che tutte presentano amplificazione genica, con numerose copie di *MYCN* (figura 9A-D). Invece, l'analisi sulle linee cellulari di ERMS (RH36, SMS-CTR, CCA e RD) ha indicato che le cellule RH36 e SMS-CTR presentano multiple copie (4-5 copie) di *MYCN* (figura 9E-F), mentre le CCA e RD hanno solo i due segnali normali (figura 9G-H).

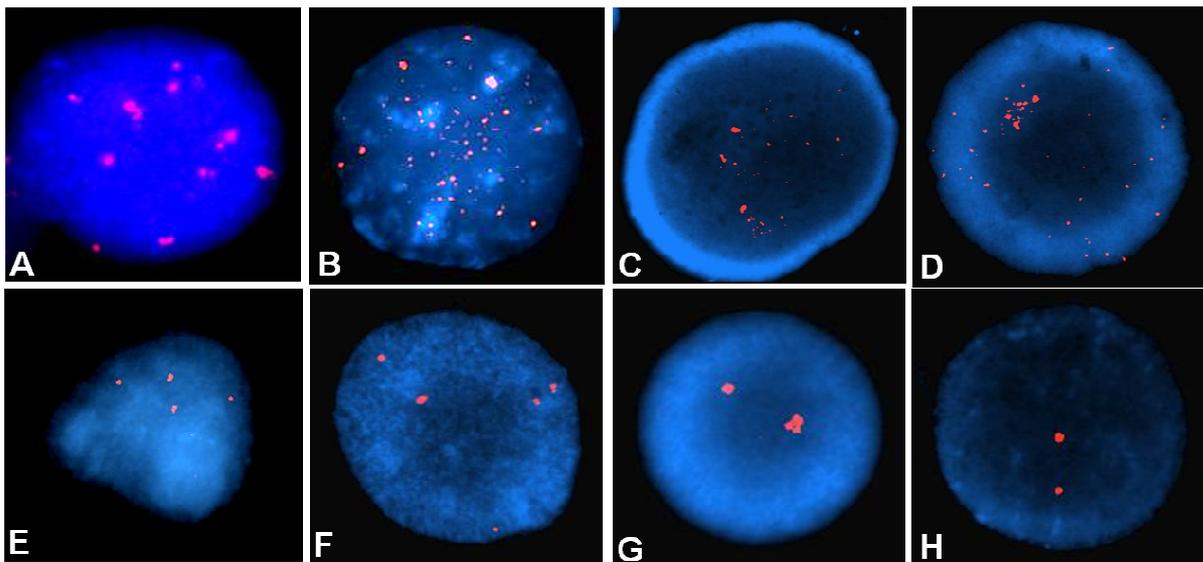


Figura 9. FISH su interfasi delle linee cellulari di RMS. ARMS: RH30 (A), RH4 (B), RH28 (C) e RMZ-RC2 (D). ERMS: RH36 (E), SMS-CTR (F), CCA (G) e RD (H).

5.2 Espressione di *MYCN* nelle linee cellulari di RMS

L'espressione dell'oncogene *MYCN* nelle linee cellulari di RMS (RH30, RH4, RH28, RMZ-RC2, RH36, SMS-CTR, CCA e RD) è stata valutata, in primo luogo, a livello di mRNA, mediante analisi quantitativa *Real-Time* PCR. L'analisi è stata realizzata normalizzando la

media dei Ct di *MYCN* rispetto alla media dei Ct dei geni *housekeeping* (*ACTB*, *GAPDH* e *ATP5B*). Si è osservato che l'espressione di *MYCN* è maggiore nelle linee cellulari di ARMS, rispetto alle linee di ERMS ed in particolare le cellule RD non esprimono *MYCN* (figura 10).

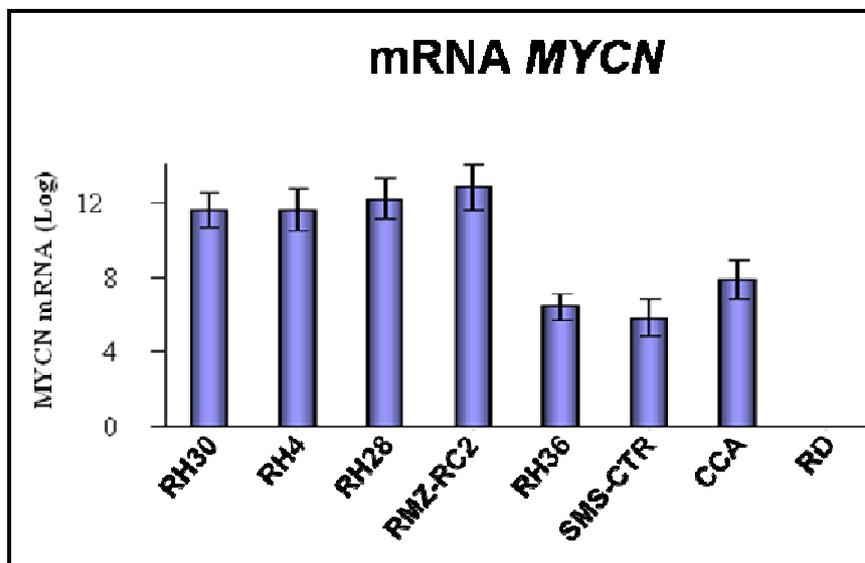


Figura 10. Valutazione dell'espressione genica di *MYCN* mediante *Real-Time* PCR nelle linee cellulari di RMS.

Quindi, l'espressione di *MYCN* è stata valutata anche a livello di proteina, mediante *western blot*. I livelli di proteina N-myc nelle varie linee cellulari di RMS sono stati confrontati con quelli della proteina Beta-actina. L'analisi delle proteine ha confermato che N-myc è maggiormente espressa negli ARMS rispetto agli ERMS ed, in particolare, le cellule RD non esprimono la proteina (figura 11).



Figura 11. Valutazione dell'espressione della proteina N-myc nelle linee cellulari di RMS mediante *western blot*. Ogni campione rappresenta una quantità di proteine pari a 30 µg.

5.3 Espressione di *PAX-FKHR* nelle linee cellulari di RMS

L'espressione dei trascritti di fusione *PAX3-FKHR* e *PAX7-FKHR* è stata valutata, mediante analisi quantitativa *Real-Time* PCR, nelle linee cellulari di RMS (RH30, RH4, RH28, RMZ-RC2, RH36, SMS-CTR, CCA e RD). L'analisi è stata realizzata normalizzando la media dei Ct di *PAX-FKHR* rispetto alla media dei Ct dei geni *housekeeping* (*ACTB*, *GAPDH* e *ATP5B*). Si è osservato che le cellule RH30, RH4 e RH28 esprimono *PAX3-FKHR*, le RMZ-RC2 esprimono *PAX7-FKHR* e le cellule di ERMS non presentano i trascritti di fusione (figura 12).

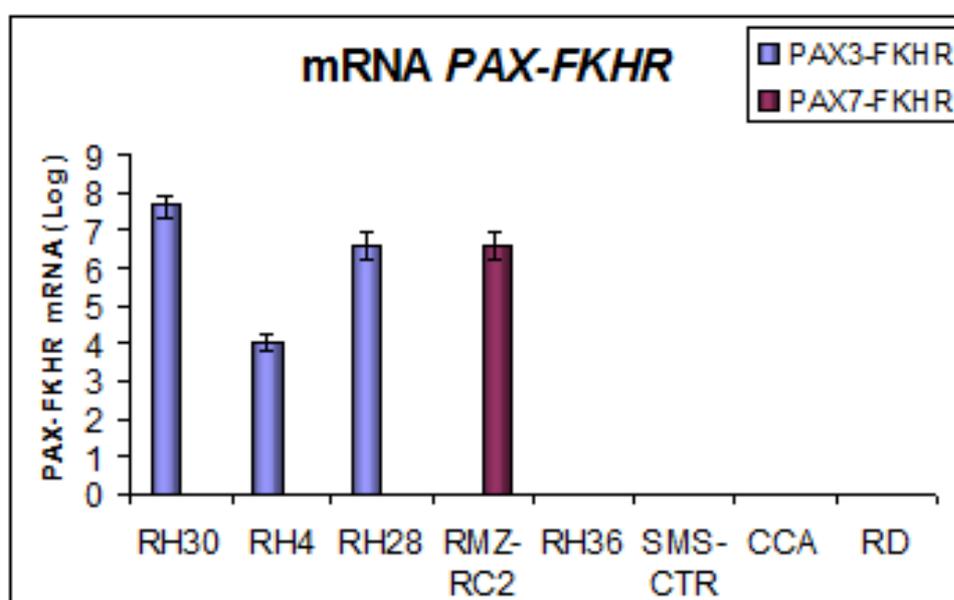


Figura 12. Valutazione dell'espressione dei trascritti di fusione *PAX3-FKHR* e *PAX7-FKHR*, mediante *Real-Time* PCR, nelle linee cellulari di RMS.

Successivamente, l'espressione delle proteine di fusione Pax-Fkhr è stata valutata mediante *western blot*, utilizzando un anticorpo contro la regione C-terminale di Fkhr. L'analisi ha indicato che, nelle linee cellulari di ARMS, sono espresse sia la proteina *wild-type* sia quella riarrangiata, mentre, nelle linee cellulari di ERMS, è presente solo la proteina *wild-type* (figura 13).

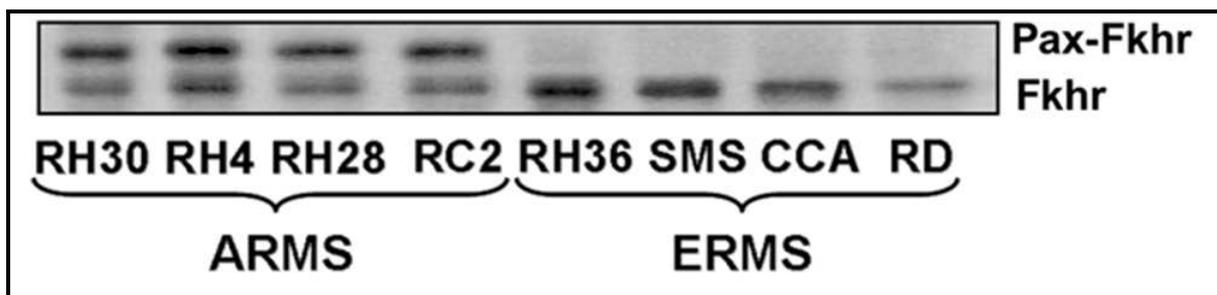


Figura 13. Valutazione dell'espressione della proteina Fkhr nelle linee cellulari di RMS mediante *western blot*. Ogni campione rappresenta una quantità di proteine pari a 30 μ g.

5.4 Ingresso nel nucleo del PNA anti-gene anti-MYCN

Per valutare la capacità del PNA_{wt} (coniugato all'NLS) di penetrare nelle cellule umane di RMS e verificarne la localizzazione intracellulare, le cellule RH30 (ARMS) e SMS-CTR (ERMS) sono state trattate con il PNA_{wt} coniugato con rodamina a concentrazione 10 μ M. Le immagini al microscopio a fluorescenza hanno mostrato che, già dopo 2 ore dal trattamento, il PNA_{wt}-NLS rodaminato è penetrato nelle cellule di RMS e si è accumulato a livello del nucleo (figura 14).

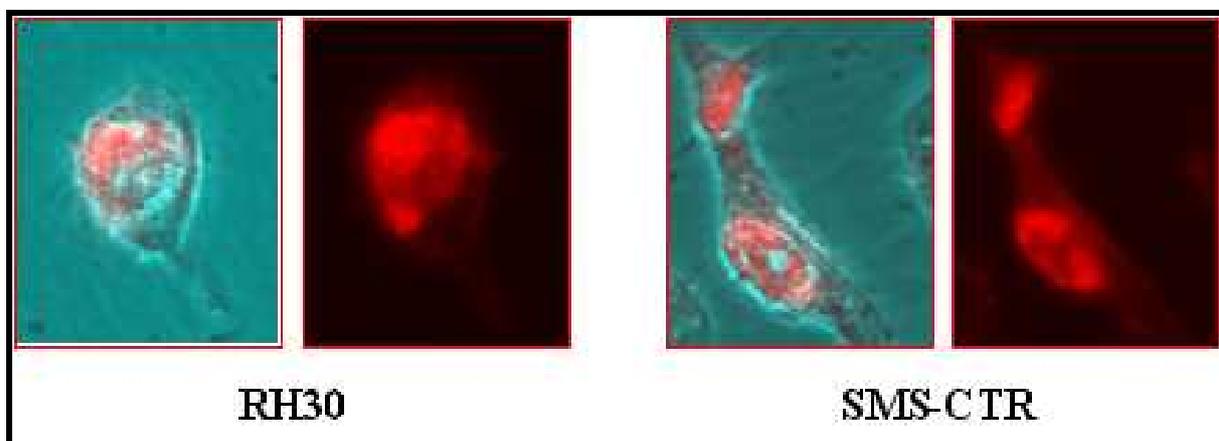


Figura 14. Ingresso nel nucleo del PNA in cellule RH30 e SMS-CTR dopo 2 ore di trattamento con PNA (10 μ M).

5.5 Il PNA anti-gene anti-MYCN inibisce l'espressione di MYCN nelle cellule che esprimono MYCN

Per verificare l'effetto anti-gene del PNA_{wt} è stata valutata l'espressione di *MYCN* dopo 12 ore di trattamento con PNA_{wt} o PNA_{mut} (10 μ M) in tutte le linee cellulari di RMS (RH30, RH4, RH28, RMZ-RC2, RH36, SMS-CTR, CCA e RD). L'analisi mediante *Real-Time* PCR ha mostrato che il trattamento con il PNA_{wt} inibisce l'espressione di *MYCN* in tutte le cellule di RMS che esprimono l'oncogene. L'inibizione è circa del 60% nelle cellule di ERMS (RH36, SMS-CTR e CCA) e nelle RMZ-RC2 (ARMS) e raggiunge il 70% nelle altre cellule di ARMS (RH30, RH4 e RH28) (figura 15).

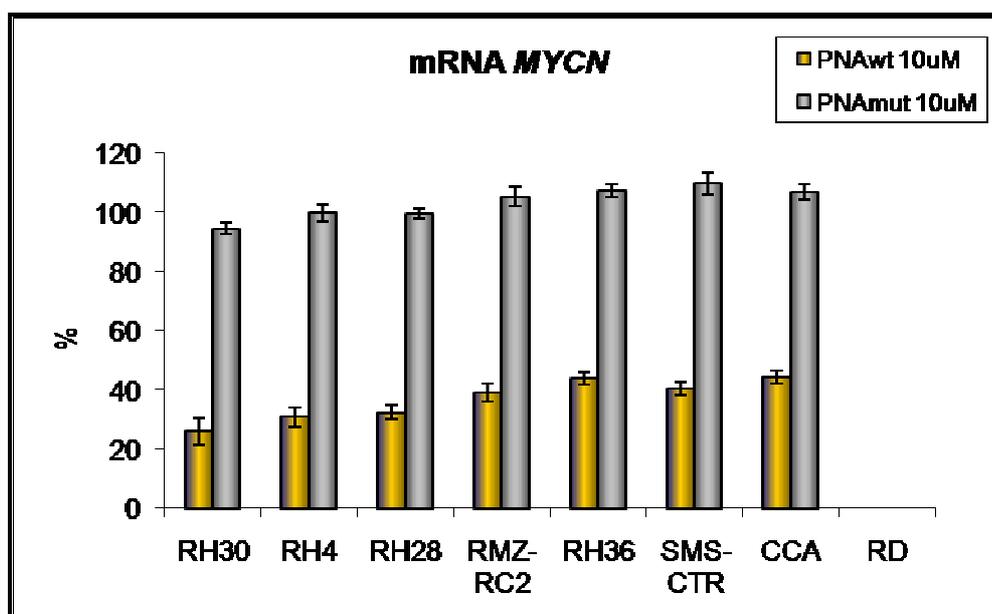


Figura 15. Valutazione dell'espressione di *MYCN*, a livello di mRNA, nelle linee cellulari di RMS, dopo 12 ore di trattamento con PNA_{wt} e PNA_{mut} (10 μ M).

L'espressione di *MYCN* è stata analizzata più approfonditamente nelle cellule RH30 a livello di mRNA e di proteina, dopo 6 e 12 ore di trattamento con PNA_{wt} o PNA_{mut} (10 o 20 μ M). L'analisi mediante *Real-Time* PCR ha mostrato che il trattamento con PNA_{wt} (10 μ M) riduce i livelli di mRNA circa del 65 e 75%, rispettivamente, dopo 6 e 12 ore, e il trattamento con PNA_{wt} (20 μ M) inibisce la trascrizione circa del 75 e 80%, rispettivamente, dopo 6 e 12 ore

(figura 16). Invece, il trattamento con PNA_{mut} (10 e 20 μ M) non modifica la trascrizione del gene *MYCN*, indicando che l'effetto del trattamento è altamente sequenza-specifico (figura 16).

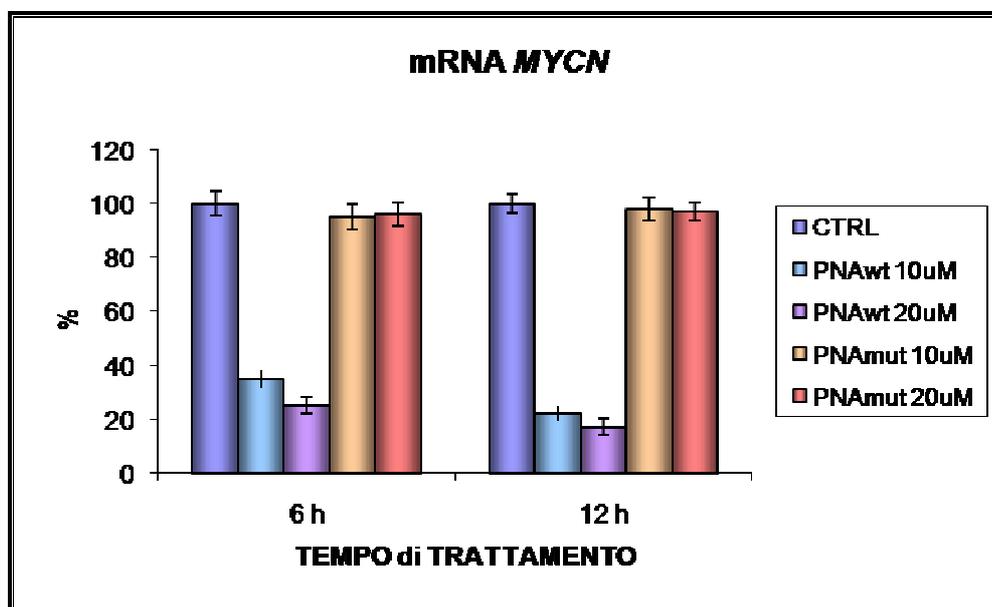


Figura 16. Valutazione dell'espressione di *MYCN*, a livello di mRNA, in cellule RH30, dopo 6 e 12 ore di trattamento con PNA_{wt} e PNA_{mut} (10 e 20 μ M).

L'analisi mediante *western blot* ha mostrato che il trattamento con PNA_{wt} inibisce la sintesi della proteina N-myc, alla concentrazione di 20 μ M, osservata dopo 6 ore dal trattamento e l'effetto risulta molto più evidente ad entrambe le concentrazioni dopo 12 ore (figura 17). Analogamente a ciò che si è visto a livello di mRNA, il trattamento con PNA_{mut} 10 e 20 μ M non modifica l'espressione della proteina N-myc, indicando che l'effetto del trattamento è altamente sequenza-specifico (figura 17).

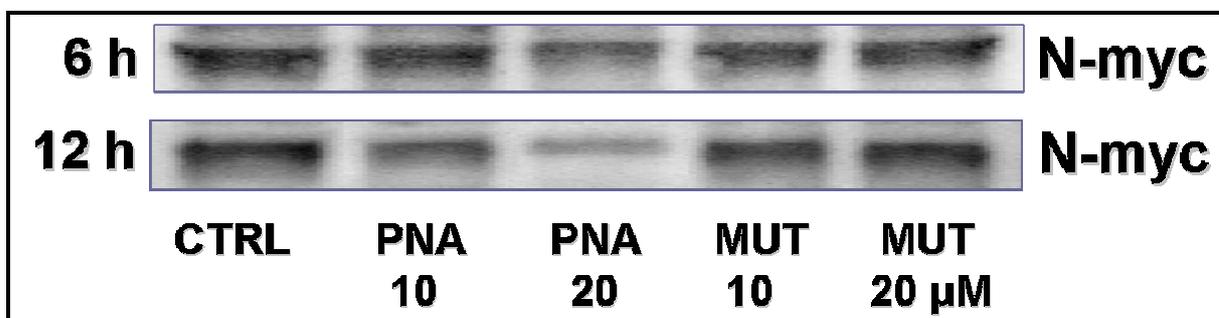


Figura 17. Valutazione dell'espressione di *MYCN*, a livello di proteina, in cellule RH30, dopo 6 e 12 ore di trattamento con PNA_{wt} e PNA_{mut} (10 e 20 μ M). Ogni campione rappresenta una quantità di proteine pari a 30 μ g.

5.6 Il PNA anti-gene anti-*MYCN* induce modificazioni della morfologia nelle cellule di rhabdomyosarcoma con *MYCN* amplificato

La morfologia cellulare è stata valutata sulle cellule RH30 dopo 24 o 48 ore di trattamento con PNA_{wt} o PNA_{mut} (10 μ M), osservando le cellule al microscopio ottico. Dopo 24 ore di trattamento, l'effetto del PNA_{wt} è evidente a livello della morfologia cellulare, che risulta alterata (figura 18). L'effetto appare accentuato dopo 48 ore di trattamento (figura 18). Le cellule trattate perdono la loro morfologia caratteristica con prolungamenti ed assumono un aspetto globoso. Il PNA_{mut}, invece, non altera la morfologia cellulare (figura 18), confermando la specificità d'azione del PNA_{wt}.

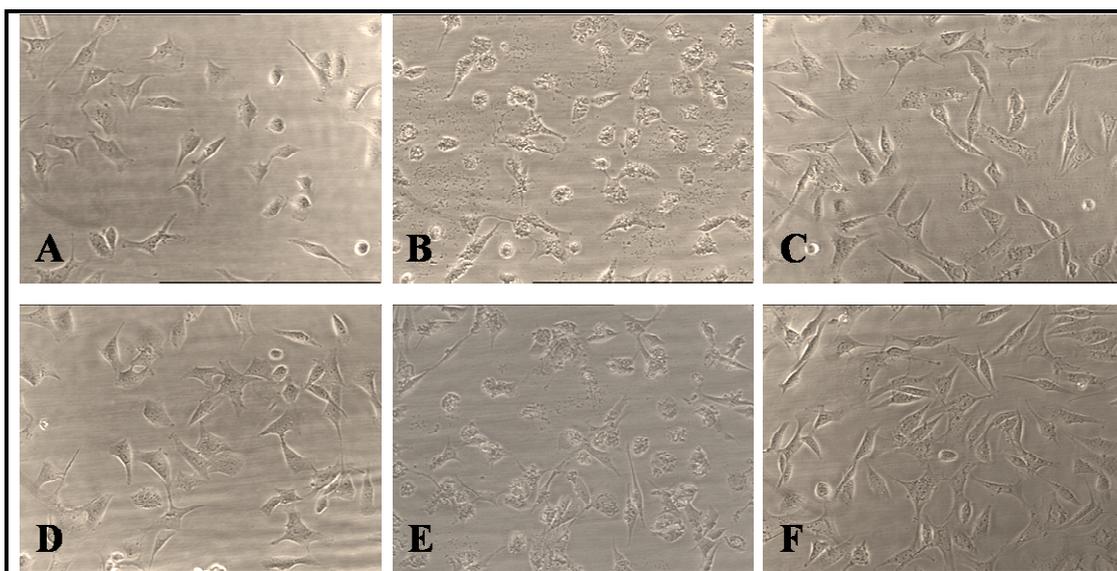
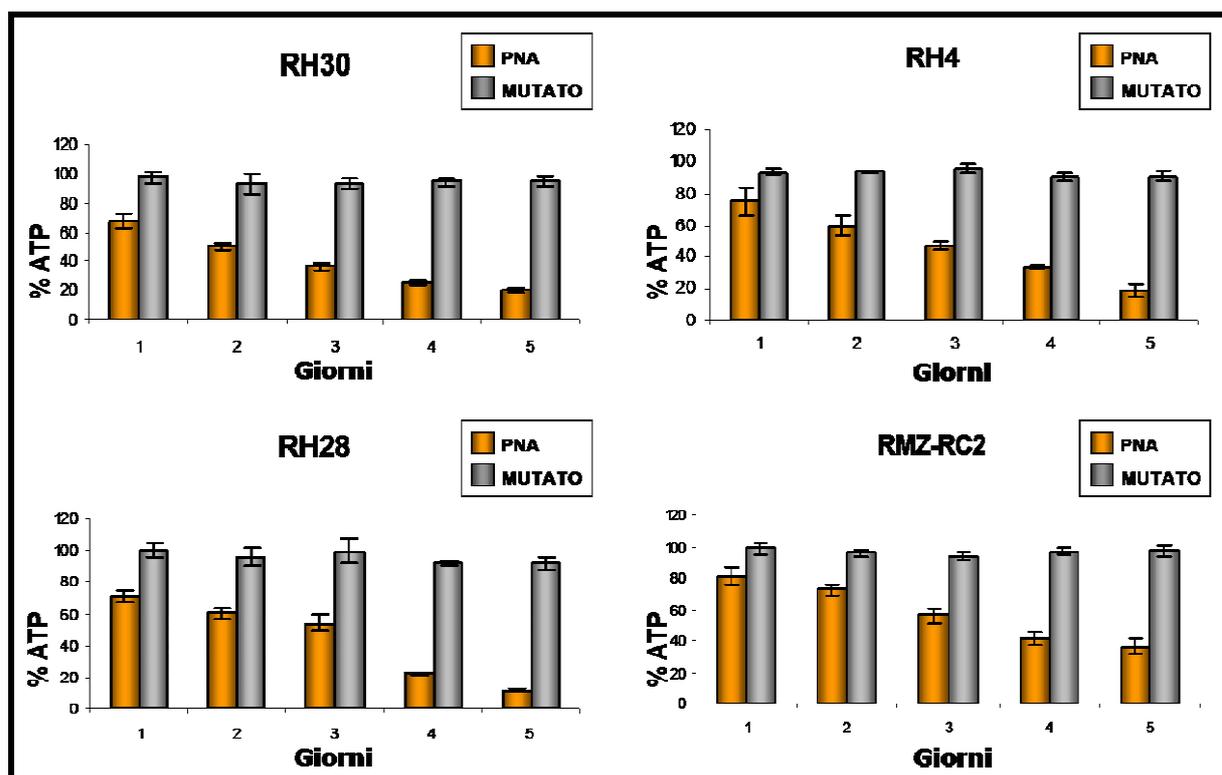


Figura 18. Osservazione al microscopio ottico delle cellule RH30 dopo 24 o 48 ore di trattamento con PNA_{wt} o PNA_{mut} (10 μ M). A: CTRL 24h; B: PNA_{wt} 24h; C: PNA_{mut} 24h; D: CTRL 48h; E: PNA_{wt} 48h; F: PNA_{mut} 48h.

5.7 Il PNA anti-gene anti-*MYCN* riduce l'attività metabolica cellulare nelle cellule di rhabdomyosarcoma con *MYCN* amplificato

Per valutare l'effetto antitumorale del PNA_{wt}, le cellule RH30, RH4, RH28, RMZ-RC2, CCA, SMS-CTR, RH36 e RD sono state trattate con PNA_{wt} e PNA_{mut} (10 μ M) e l'attività metabolica

cellulare è stata quantificata, mediante il *kit* ATPlite, dopo 24, 48, 72, 96 e 120 ore di trattamento. L'attività metabolica cellulare è fortemente ridotta nelle cellule di ARMS, che presentano l'amplificazione ed un'elevata espressione di *MYCN*. Ad esempio, la riduzione dell'ATP raggiunge circa il 90% nelle cellule RH28, dopo 120 ore di trattamento (figura 19). Per quanto riguarda le cellule di ERMS, l'attività metabolica cellulare è inibita circa del 50% dopo 120 ore di trattamento nelle CCA, SMS-CTR e RH36 che esprimono *MYCN*, mentre il PNA_{wt} non ha effetto sulle cellule RD che non esprimono *MYCN* (figura 19). Questo risultato è un ulteriore indicatore della specificità dell'effetto anti-gene anti-*MYCN* del PNA_{wt}. Il PNA_{mut} non ha effetti sull'attività metabolica in nessuna linea cellulare (figura 19), indicando anche la mancanza di citotossicità del trattamento con PNA.



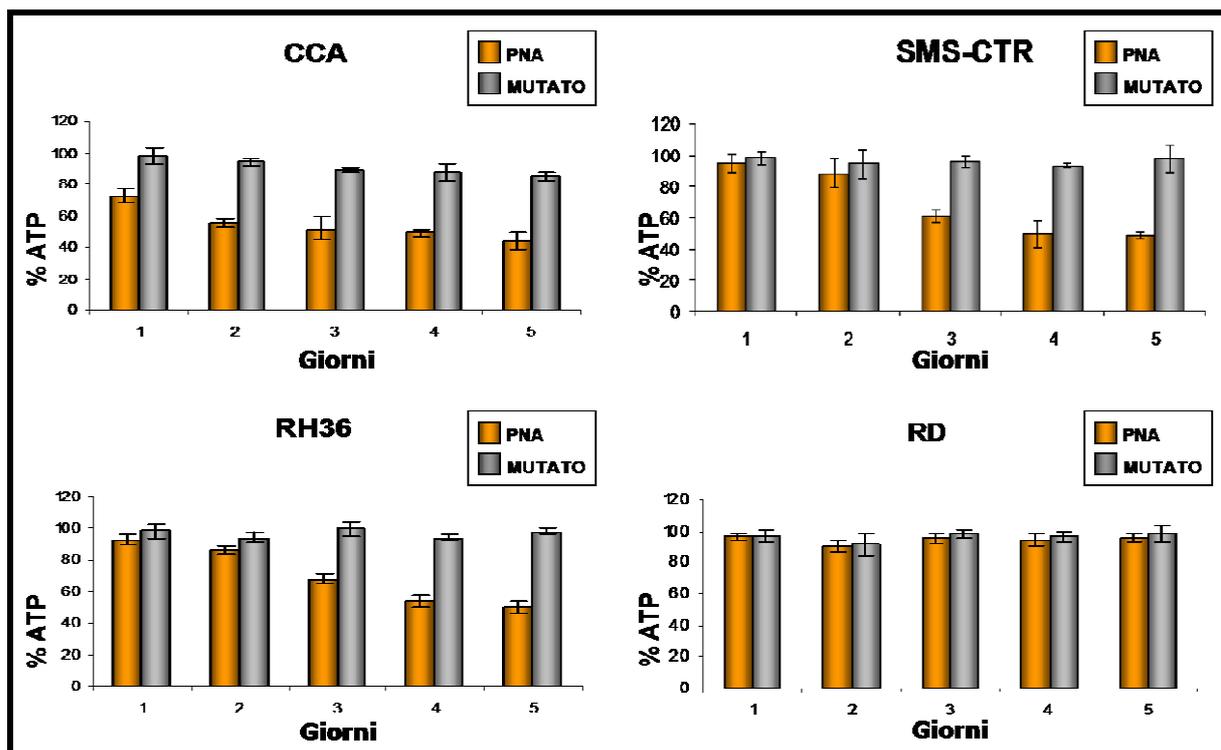


Figura 19. Valutazione dell'attività metabolica cellulare nelle linee di RMS dopo trattamento con PNAwt e PNAmut (10 µM) dopo 24, 48, 72, 96 e 120 ore, mediante il kit ATPlite.

5.8 Il PNA anti-gene anti-MYCN induce apoptosi nelle cellule RH30

Al fine di caratterizzare l'effetto biologico del PNA_{wt}, è stato eseguito un saggio per verificare se la morte cellulare associata al trattamento fosse riconducibile ad un fenomeno apoptotico. L'apoptosi è stata valutata su vetrino, mediante TUNEL, in cellule RH30 dopo 24 e 48 ore di trattamento con PNA_{wt} e PNA_{mut} 10 e 20 µM. L'analisi ha mostrato che, in seguito a trattamento con PNA_{wt} (10 µM), le cellule in apoptosi rappresentano circa il 30% ed il 50% dopo, rispettivamente, 24 e 48 ore, mentre, con il PNA_{wt} (20 µM), le cellule in apoptosi raggiungono il 40% ed il 70% dopo, rispettivamente, 24 e 48 ore (figura 20).

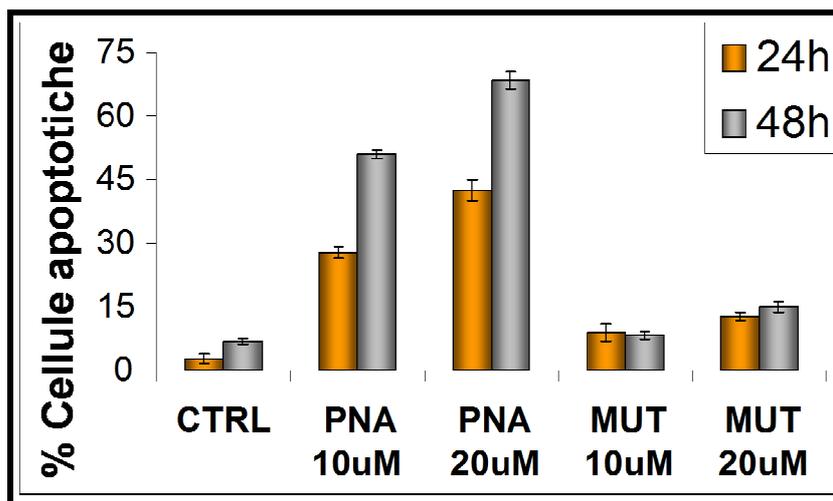


Figura 20. Valutazione dell'apoptosi dopo 24 e 48 ore di trattamento con PNA_{wt} e PNA_{mut} (10 e 20 μ M), mediante la tecnica TUNEL.

5.9 Analisi dell'espressione genica mediante *microarray* Affymetrix

Per identificare i geni coinvolti effettivamente nel meccanismo di azione del PNA_{wt}, è stato eseguito uno studio di analisi di espressione genica attraverso *microarray* Affymetrix sulla linea cellulare RH30 controllo e dopo 12 ore di trattamento con PNA_{wt} e PNA_{mut} (10 μ M). In seguito all'analisi dei risultati ottenuti sono stati individuati i geni differenzialmente espressi nelle cellule trattate con PNA_{wt} rispetto ai controlli e ai trattati con PNA_{mut}. In particolare sono stati individuati:

- 70 geni indotti dal trattamento con PNA_{wt}
- 125 geni repressi dal trattamento con PNA_{wt}.

Invece, il trattamento con PNA_{mut} non altera in modo significativo l'espressione genica; infatti analizzando il profilo globale dell'espressione genica e calcolando il coefficiente di correlazione fra i vari campioni abbiamo ottenuto i valori:

$$\text{PNA}_{\text{wt}} \text{ vs } \text{PNA}_{\text{mut}} \quad (r^2)=0,751$$

$$\text{PNA}_{\text{wt}} \text{ vs } \text{CTRL} \quad (r^2)=0,732$$

$$\text{PNA}_{\text{mut}} \text{ vs CTRL } (r^2)=0,920$$

Ciò dimostra che il profilo di espressione del campione trattato con PNA_{mut} non differisce dal controllo, mentre il PNA_{wt} induce una modificazione dell'espressione genica sia rispetto al controllo che rispetto al trattato con PNA_{mut} .

I geni indotti e repressi sono stati caratterizzati attraverso l'analisi di Gene Ontology, utilizzando il *database* DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) [157]. Tra i geni indotti dal trattamento con il PNA_{wt} , 26 sono coinvolti nell'adesione cellulare, 7 nella trascrizione ad opera della RNA polimerasi II e 66 in altri processi cellulari (figura 21).

Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
GOTERM_BP_ALL	homophilic cell adhesion	RT		23	26,4	8,2E-29	2,8E-25
GOTERM_BP_ALL	cell-cell adhesion	RT		23	26,4	7,2E-24	1,2E-20
GOTERM_BP_ALL	cell adhesion	RT		26	29,9	8,2E-17	1,3E-13
GOTERM_BP_ALL	transcription from RNA polymerase II promoter	RT		7	8,0	2,4E-2	1,0E0
GOTERM_BP_ALL	cellular process	RT		66	75,9	3,2E-2	1,0E0
GOTERM_BP_ALL	calcium-dependent cell-cell adhesion	RT		2	2,3	9,1E-2	1,0E0

Figura 21 Analisi di Gene Ontology sui processi biologici in cui sono coinvolti i geni indotti dal trattamento con il PNA_{wt} .

Tra i geni repressi dal trattamento con il PNA_{wt} , 59 sono coinvolti nel metabolismo cellulare, 11 nel ciclo cellulare, 10 nella regolazione negativa dei processi cellulari e 26 nella trasduzione del segnale (figura 22).

Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
GOTERM_BP_3	primary metabolism	RT		59	48,4	7,1E-3	8,5E-1
GOTERM_BP_3	macromolecule metabolism	RT		41	33,6	7,3E-3	6,2E-1
GOTERM_BP_3	cell cycle	RT		11	9,0	1,1E-2	6,3E-1
GOTERM_BP_3	cellular metabolism	RT		59	48,4	1,8E-2	7,0E-1
GOTERM_BP_3	negative regulation of cellular process	RT		10	8,2	2,8E-2	7,8E-1
GOTERM_BP_3	negative regulation of physiological process	RT		9	7,4	4,8E-2	8,9E-1
GOTERM_BP_3	cell organization and biogenesis	RT		15	12,3	7,4E-2	9,5E-1
GOTERM_BP_3	signal transduction	RT		26	21,3	9,8E-2	9,7E-1

Figura 22. Analisi di Gene Ontology sui suoi processi biologici in cui sono coinvolti i geni repressi dal trattamento con il PNA_{wt} .

Tra i geni identificati come indotti e repressi dal trattamento con il PNA_{wt} sono stati individuati alcuni geni particolarmente interessanti, perché coinvolti in ciclo cellulare, apoptosi, motilità cellulare, metastatizzazione, angiogenesi e miogenesi.

5.10 Validazione dei geni differenzialmente espressi

I dati ottenuti, dall'analisi mediante *microarray*, sui geni *TIAL1*, *P21*, *BTG2*, *GDF15*, *MSX2*, *CBX4*, *DTX3*, *MET*, *PLK4*, *CDK9*, *EIF4E*, *BMP5* ed *ADAM10* sono stati validati mediante *Real-Time* PCR sulle cellule RH30 dopo 12 ore di trattamento con PNA_{wt} (figura 23). Gli stessi geni sono quindi stati valutati su tutte le linee di RMS utilizzate nello studio, sottoposte anch'esse a 12 ore di trattamento con PNA_{wt}, per valutare un loro possibile coinvolgimento nella tumorigenesi degli ARMS e degli ERMS, come *target* di *MYCN* (figura 23).

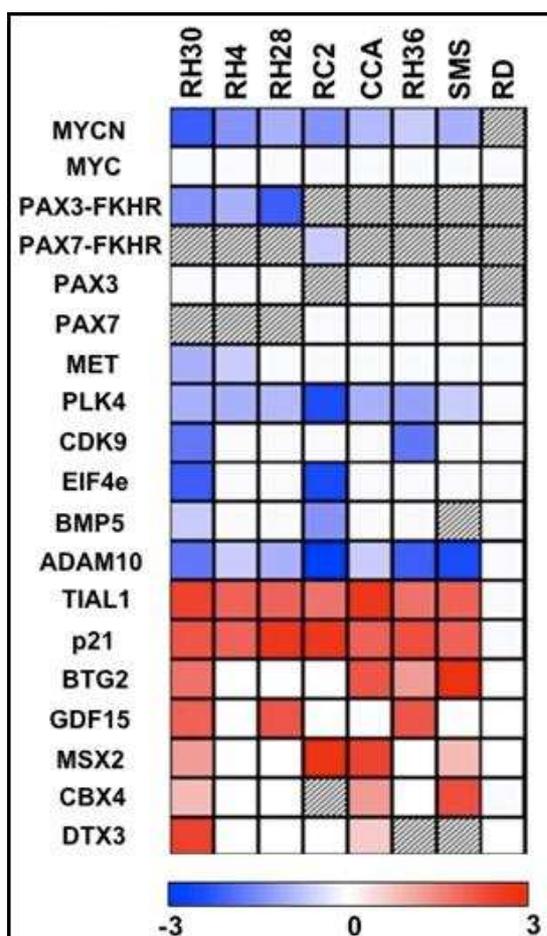


Figura 23. Valutazione dell'espressione genica mediante *Real-Time* PCR su tutte le linee cellulari di RMS dopo trattamento con PNA_{wt}.

Come si può osservare dalla figura 23, alcuni geni come *PLK4*, *ADAM10*, *TIAL1* e *p21* sono risultati target di *MYCN* in tutte, o nella maggior parte, delle linee cellulari, sia di ARMS che di ERMS, suggerendo che potrebbero essere target di *MYCN* in tutti i RMS. Invece, nelle cellule RD, che non esprimono *MYCN*, il trattamento con PNA_{wt} non induce modificazioni sull'espressione di questi geni, confermando che sono *target* specifici di *MYCN*.

Su tutte le linee cellulari di ARMS è stata valutato anche l'effetto del PNA_{wt} sull'espressione dei geni *MYC*, *PAX* e dei geni di fusione *PAX-FKHR*. In tutte le linee, il PNA_{wt} non modifica l'espressione di *MYCN* (figura 23), indicando che l'effetto del PNA_{wt} è specifico per *MYCN*. Inoltre, l'inibizione di *MYCN* causata dal PNA_{wt} determina un'inibizione anche dell'espressione dei geni di fusione *PAX-FKHR*, ma non dei geni *wild-type* (figura 23).

L'espressione di alcuni dei geni differenzialmente espressi è stata valutata anche a livello di proteina, mediante *western blot*, su cellule RH30. Le proteine Myc, Fkhr e Pax3-Fkhr, Met e p21 sono state analizzate in cellule RH30 controllo e trattate con PNA_{wt} e PNA_{mut} (10 e 20 μ M) per 12 ore. Il trattamento con PNA_{wt} non ha effetti sull'espressione delle proteine Myc e Fkhr *wild type*, ma inibisce l'espressione della proteina di fusione Pax3-Fkhr e di Met ed induce l'espressione di p21 (figura 24).

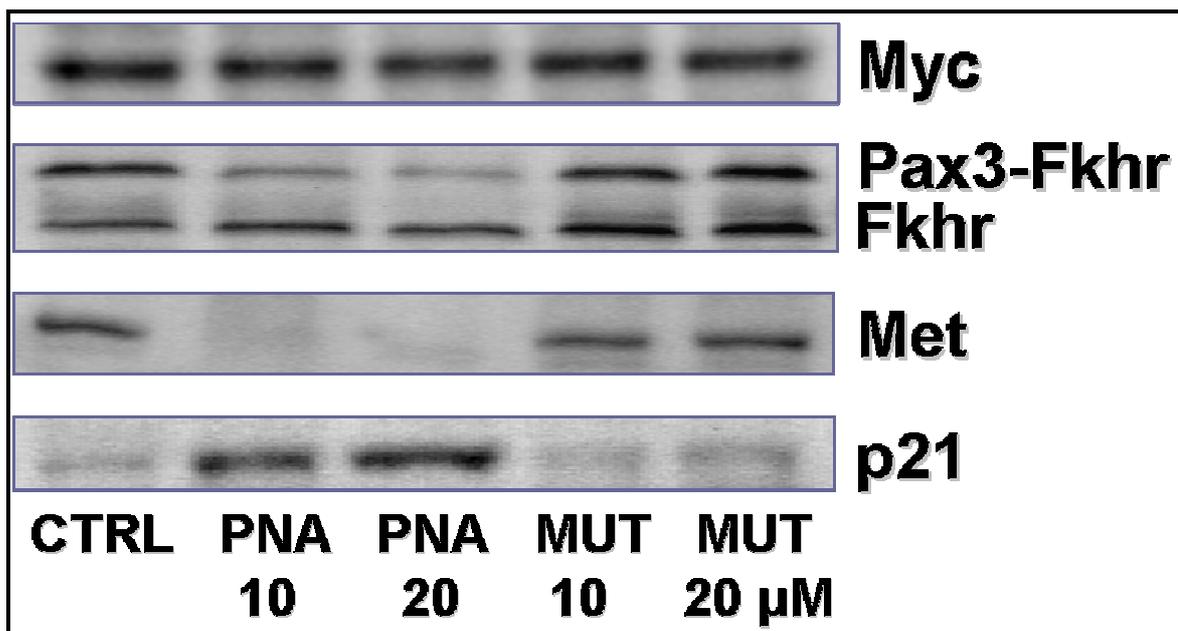


Figura 24. Valutazione, mediante *western blot*, delle proteine Fkhr, Pax3-Fkhr, Met e p21 in cellule RH30 controllo e trattate con PNA_{wt} e PNA_{mut} 10 e 20 μ M. Ogni campione rappresenta una quantità di proteine pari a 30 μ g.

5.11 Il PNA anti-gene anti-MYCN inibisce la crescita tumorale *in vivo*

Per verificare l'effetto tumorale del PNA_{wt} *in vivo*, topi nudi con *xenograft* di ARMS umano sono stati trattati per via intraperitoneale con 10 somministrazioni di PNA_{wt} o PNA_{mut} (50 mg/kg) o di soluzione fisiologica, nell'arco di 17 giorni. La crescita tumorale è stata valutata mediante micro-PET con il tracciante ¹⁸F-FDG. Il segnale metabolico tumorale è stato quantificato attraverso il valore TBR (*Target to Background Ratio*). Dopo l'inoculo delle cellule RH30, il TBR aumenta progressivamente per i tumori dei topi controlli e trattati con PNA_{mut}, mentre si riduce nei topi trattati con PNA_{wt} (figura 25).

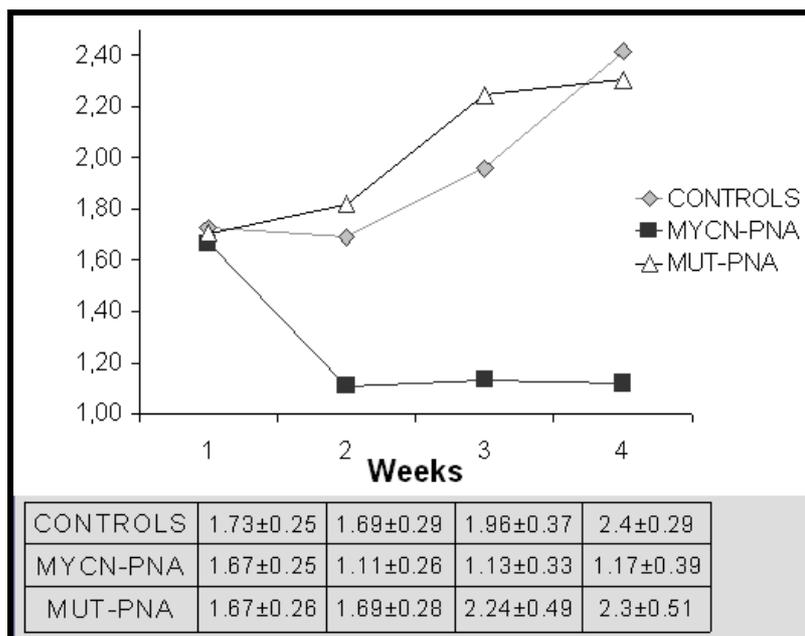


Figura 25. Valori di TBR (*Target to Background Ratio*) nei topi controllo e trattati con PNA_{wt} e PNA_{mut}.

L'analisi al termine del trattamento con il PNA_{wt} ha mostrato una completa eliminazione del segnale metabolico tumorale nel 70% dei casi (figura 26) e una riduzione del segnale nel restante 30% degli animali. Invece, il trattamento con PNA_{mut} non ha manifestato effetti (figura 26), in accordo con i risultati ottenuti *in vitro*.

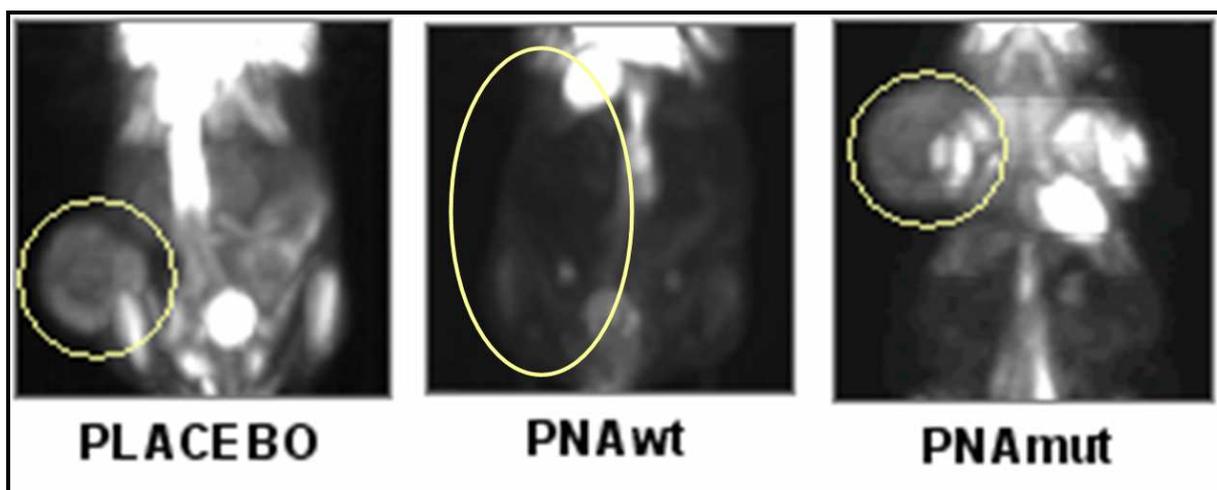
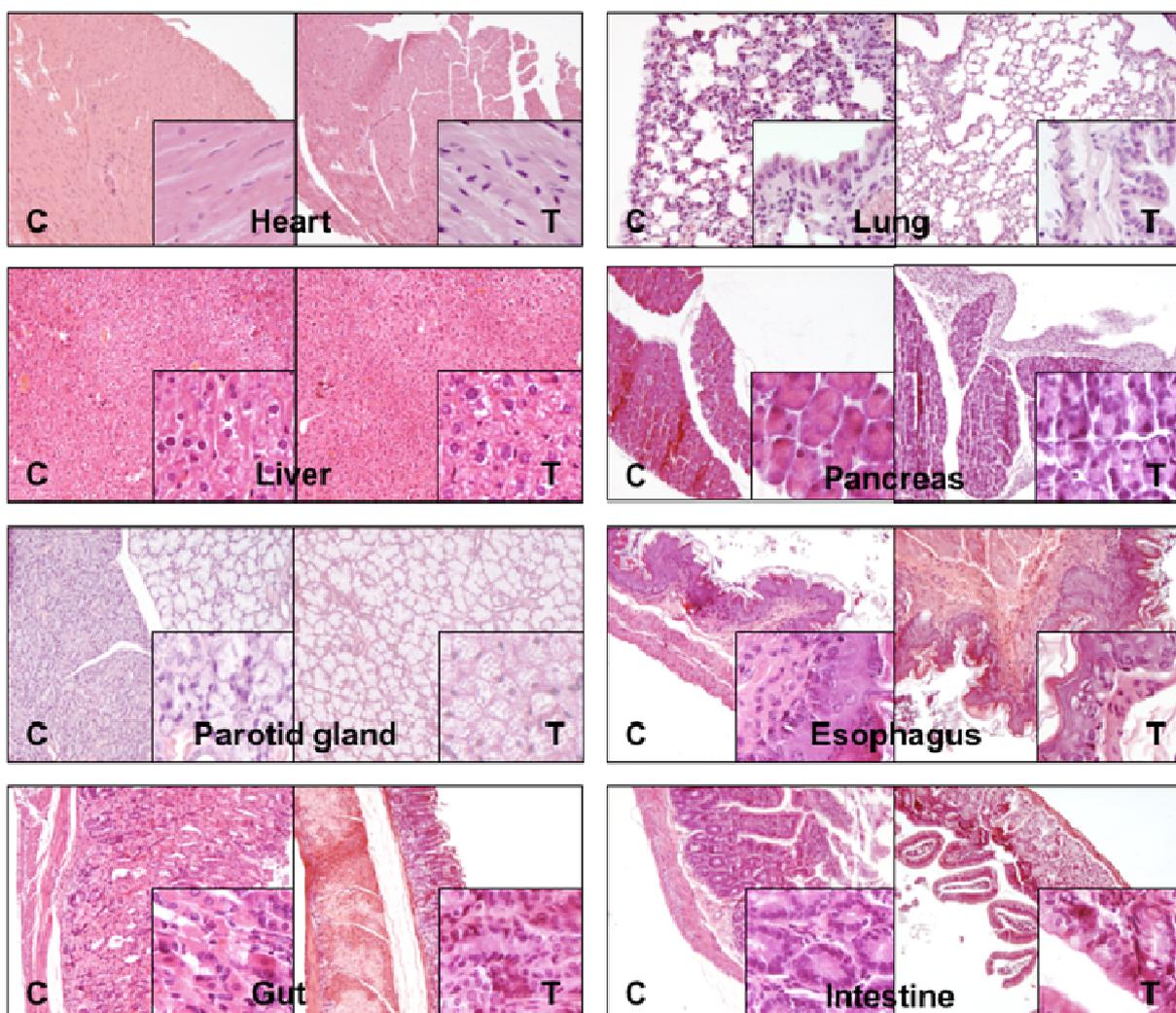


Figura 26. Immagini di micro-PET su topi controllo o trattati con PNA_{wt} o PNA_{mut}.

5.12 Il PNA anti-gene anti-MYCN non mostra alterazioni istologiche nei

tessuti esaminati

Per valutare il potenziale effetto tossico del PNA_{wt}, è stata effettuata un'analisi istologica in tutti i principali organi, in topi trattati con placebo o con PNA_{wt}. L'analisi non ha mostrato alterazioni anatomo-patologiche significative nei tessuti dei topi trattati, rispetto a quelli dei topi controllo (figura 27), indicando che il PNA_{wt} non altera la morfologia cellulare dei principali organi, dopo 20 giorni di trattamento.



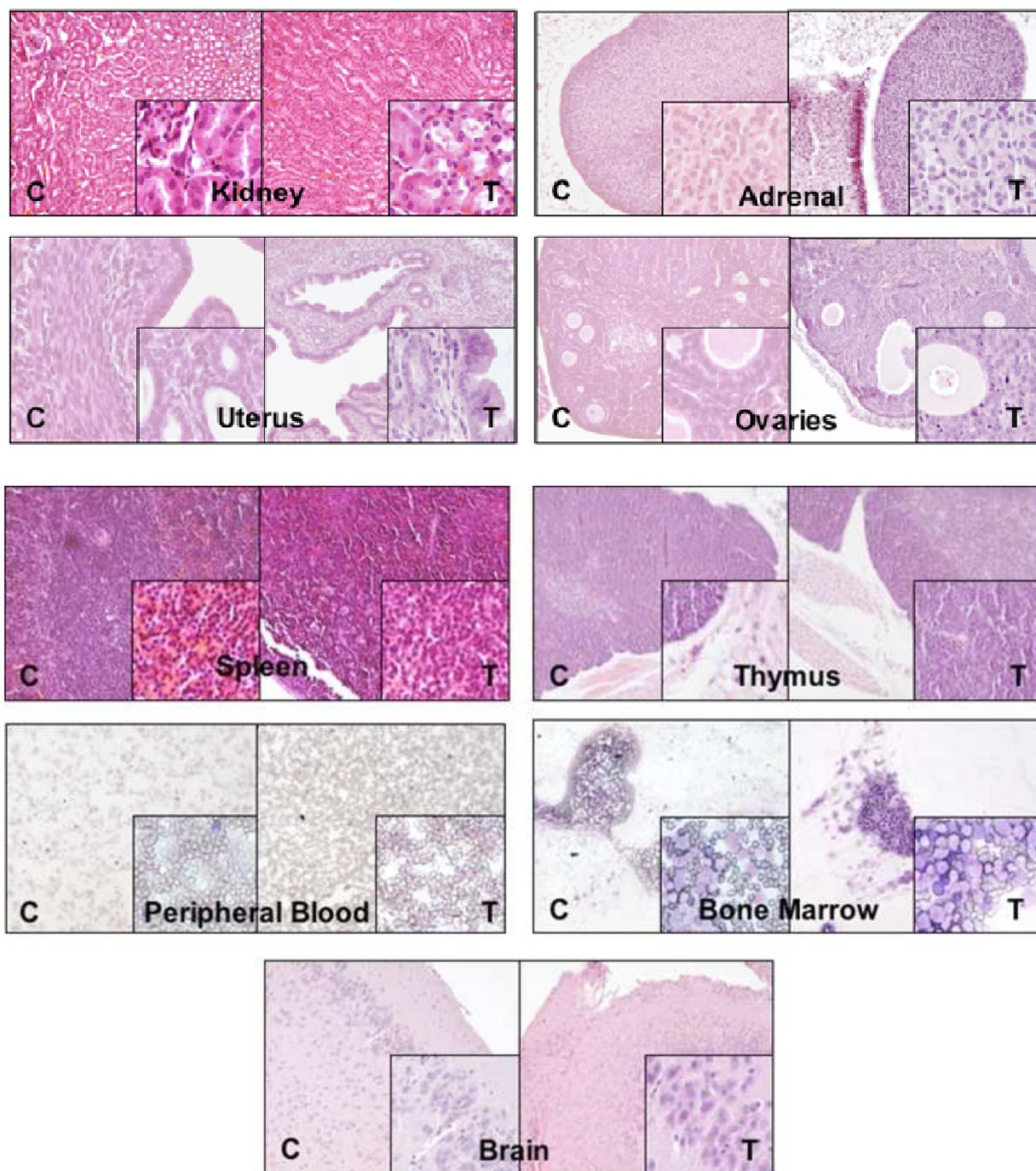


Figura 27. Analisi istologica dei principali organi dopo trattamento con PNA_{wt} (colorazione con ematossilina-eosina o con May-Grunwald-Giemsa). C: topi trattati con soluzione fisiologica; T: topi trattati con PNA_{wt} .

6. Discussione

Oggi, il trattamento del rhabdomyosarcoma (RMS) prevede un approccio multimodale, che combina la chemioterapia con la chirurgia e la radioterapia e che ha permesso di migliorare notevolmente la prognosi e di raggiungere, complessivamente, una sopravvivenza a 5 anni superiore al 70% [158]. Ciò nonostante, alcuni fattori prognostici negativi, come l'istologia alveolare, l'età del paziente inferiore ai 10 anni e la presenza di metastasi, definiscono una classe di RMS ad alto rischio, con prospettiva di vita breve e che necessita di nuove strategie terapeutiche. La potenziale importanza di *MYCN* nell'oncogenesi del RMS (sia ARMS che ERMS), associata alla mancanza di espressione nei tessuti adulti non tumorali, lo rende un bersaglio interessante per lo sviluppo di nuove terapie nei tumori che esprimono *MYCN*.

Nel laboratorio presso il quale è stato svolto lo studio del dottorato (Laboratorio di Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli", presso la Clinica Pediatrica del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna, Prof. Andrea Pession), sono stati sviluppati un PNA (acido peptidico nucleico) antisense [134] e un PNA anti-gene specifici per *MYCN* [135]. È stato dimostrato *in vitro*, in linee cellulari di neuroblastoma, che il PNA antisense anti-*MYCN*, complementare alla sequenza dell'mRNA, inibisce l'espressione della proteina N-myc, riducendo la proliferazione cellulare ed inducendo un blocco del ciclo cellulare in fase G1 [134]. Successivamente è stato sintetizzato un PNA anti-gene complementare al filamento codificante del DNA, per inibire l'espressione genica a livello trascrizionale. La somministrazione di questo PNA anti-gene, in linee cellulari di neuroblastoma, ha causato un'inibizione dell'espressione di *MYCN* a livelli di mRNA e di proteina ed una riduzione della proliferazione maggiore rispetto al PNA antisense [135]. La maggiore efficacia della strategia anti-gene rispetto a quella antisense deriva, da un lato, dal fatto che il numero di *target* a livello di DNA (copie geniche) è inferiore al numero di trascritti (anche in presenza di amplificazione

di *MYCN*) e, dall'altro, dal fatto che probabilmente l'effetto del PNA ha maggiore durata a livello del DNA piuttosto che a livello degli mRNA, che sono più instabili.

Lo scopo del progetto di ricerca di questo dottorato è stato la valutazione dell'effetto antitumorale di un PNA anti-gene anti-*MYCN* nel rhabdomiosarcoma, *in vitro*, su linee cellulari umane di ARMS ed ERMS, ed *in vivo*, utilizzando un modello murino di *xenograft* di rhabdomiosarcoma alveolare umano.

Le linee cellulari di RMS sono state caratterizzate per l'amplificazione e l'espressione genica di *MYCN*, indicando, in accordo con gli studi presenti in letteratura [23], che il numero di copie geniche e l'espressione di *MYCN* è maggiore negli ARMS che negli ERMS e che negli ARMS il numero di copie geniche e i livelli di mRNA sono tra loro correlati.

Il PNA anti-gene anti-*MYCN* coniugato ad un segnale di localizzazione nucleare (NLS) penetra nelle cellule di RMS, si localizza a livello del nucleo (figura 14) e blocca specificamente la trascrizione e la traduzione di *MYCN* (figure 15-17). La specificità dell'effetto del PNA anti-gene anti-*MYCN* è dimostrata dalla mancanza di effetto di un PNA mutato, che presenta la sostituzione di tre basi (figure 15-17). Poiché il PNA anti-gene anti-*MYCN* ha sequenza complementare al filamento antisense del gene, l'unico meccanismo d'azione possibile è l'attività anti-gene con inibizione della trascrizione, mentre può essere escluso un effetto antisense sul trascritto.

Il blocco specifico della trascrizione e della traduzione di *MYCN* determina un'inibizione della crescita cellulare, proporzionale all'espressione dell'oncogene, e che, quindi, è maggiore nelle linee cellulari di ARMS rispetto a quelle di ERMS (figura 19). L'effetto sequenza-specifico del PNA anti-gene è confermato, anche in questo caso, dalla mancanza di efficacia del trattamento con PNA mutato (figura 19). Inoltre, nella linea cellulare RD (ERMS), che non esprime *MYCN*, il PNA anti-gene non mostra effetti sulla crescita cellulare (figura 19), dando un'ulteriore prova della sua specificità d'azione. L'effetto gene-specifico del trattamento con il PNA anti-gene è

stato confermato anche verificando che il PNA anti-gene anti-*MYCN* non modifica la trascrizione e la traduzione del gene *MYC* (figure 23-24).

L'analisi quantitativa dell'ATP cellulare ha quindi indicato che il trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* inibisce l'attività metabolica cellulare, effetto che corrisponde ad una riduzione della vitalità cellulare (figura 19). L'analisi TUNEL ha indicato che l'effetto biologico del PNA anti-gene anti-*MYCN* è riconducibile, almeno in parte, ad un fenomeno di induzione dell'apoptosi (figura 20).

Per identificare i geni coinvolti effettivamente nel meccanismo di azione del PNA anti-gene anti-*MYCN*, è stato eseguito uno studio di analisi di espressione genica attraverso *microarray* Affymetrix sulla linea cellulare RH30 e l'analisi ha evidenziato una serie di geni che sono indotti o repressi dal trattamento e che, quindi, sono potenziali target di *MYCN* e potrebbero anche essere coinvolti nel processo di oncogenesi del rhabdomyosarcoma. Tra i geni indotti o repressi, ne sono stati selezionati alcuni di particolare interesse, perché coinvolti in processi cellulari, quali il ciclo cellulare, la regolazione della sintesi proteica, la motilità cellulare, la metastatizzazione e lo sviluppo muscolare. I cambiamenti nell'espressione dei geni più rilevanti sono stati confermati in *Real-Time* PCR e gli stessi geni sono stati valutati dopo trattamento con PNA anti-gene anti-*MYCN* in tutte le linee cellulari di RMS.

E' stato osservato che l'inibizione di *MYCN*, mediante il trattamento con il PNA anti-gene, causa la repressione dei geni di fusione *PAX3-FKHR* e *PAX7-FKHR* nelle linee di ARMS, mentre non altera la trascrizione dei geni *wild-type* *PAX3* e *PAX7* (figura 23). La riduzione dei livelli di proteina Pax3-Fkhr è stata confermata nelle cellule RH30, mediante *western blot* (figura 24). Questo risultato è in accordo con gli studi che hanno dimostrato che N-myc regola positivamente l'attività del promotore di *PAX3*, legandosi ad una *E-box* non canonica, ed è in grado di regolare l'espressione dell'oncogene *PAX3*, e quindi anche di *PAX3-FKHR* [71]. Inoltre, questo risultato è molto interessante perché i riarrangiamenti *PAX-FKHR* sono specifici

ed altamente ricorrenti negli ARMS clinicamente più aggressivi [20], e le proteine di fusione sono inibitori del differenziamento miogenico e dell'apoptosi [18]. Poiché è stato visto che l'inibizione di *PAX3-FKHR* provoca apoptosi [159], possiamo ipotizzare che parte dell'effetto apoptotico, che si osserva in seguito al trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* (figura 20), sia mediato dall'inibizione di *PAX3-FKHR*. A supporto di questa ipotesi, l'analisi di espressione genica mediante *microarray* ha indicato, tra i geni inibiti dal trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN*, i geni *MET* e *ADAM10*, che sono stati precedentemente indicati come *target* di *PAX3-FKHR* [160]. Il proto-oncogene *MET* (*hepatocyte growth factor receptor*) codifica per il recettore del fattore di crescita degli epatociti (HGF). HGF e Met hanno un ruolo importante nella crescita tumorale e nella metastatizzazione. L'attivazione di *MET* regola numerose risposte cellulari, quali sopravvivenza, morfogenesi, adesione, migrazione ed angiogenesi, e la deregolazione di *MET* è stata riportata in numerosi tumori [161]. E' stato anche dimostrato che Met è necessaria per la migrazione delle cellule miogeniche ed è un *target* di Pax3 durante lo sviluppo embrionale dei muscoli scheletrici [162]. Invece, il gene *ADAM10* codifica per una disintegrina-metalloproteinasi che processa le proteine legate alla membrana e le rende solubili. ADAM10 agisce su molte molecole associate a proliferazione tumorale, differenziamento, adesione e migrazione [163], ed è coinvolta nei processi di invasione e metastatizzazione tumorale [164]. Il fatto che *ADAM10* sia inibito dal trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* in tutte le linee cellulari di RMS, e non solo in quelle di ARMS con riarrangiamento *PAX3-FKHR* (figura 23), potrebbe indicare un suo ruolo importante nella tumorigenesi, indipendentemente da *PAX3-FKHR*.

Altri geni che sono coinvolti nel differenziamento mesenchimale e la cui espressione è, rispettivamente, repressa e indotta dal trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* sono *BMP5* e *MSX2* (figura 23). Il gene *BMP5* (*bone morphogenetic protein 5*) è coinvolto nel differenziamento e nei processi di condrogenesi ed osteogenesi. Nel tumore alla prostata è stato osservato un incremento del numero di copie geniche ed una conseguente alterazione

dell'espressione di *BMP5* [165]. Invece, il gene *MSX2* (*MSH homeobox 2*) è coinvolto nello sviluppo scheletrico ed è un target delle proteine BMP. E' stata osservata una correlazione tra N-myc e *MSX2* nello sviluppo scheletrico degli arti, mentre la sovraespressione di *MSX2* è stata rilevata nei tumori pancreatici, nei quali *MSX2* ha un ruolo di inibizione dell'apoptosi [166].

In tutte le linee cellulari di RMS, il trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* inibisce l'espressione di *PLK4* (*polo-like kinase 4*). La proteina Plk4 è una serina-treonina chinasi che regola la progressione del ciclo cellulare, della mitosi e della citocinesi, controllando la formazione dei centrioli [167]. Inoltre, come *target* di p53, regola la risposta al danno del DNA e l'apoptosi [168]. E' stato anche visto che l'espressione di Plk4 è alterata in alcuni tumori, come il cancro colon-rettale e l'epatoma [169]. Un altro gene coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e represso dal trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* è *CDK9* (*cyclin-dependent kinase 9*). La proteina Cdk9 è una chinasi ciclina-dipendente coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare e della trascrizione ad opera della RNA polimerasi II. Inoltre, sembra che Cdk9 abbia un ruolo anche nella miogenesi, in quanto è stato osservato che la sovraespressione del complesso Cdk9/ciclina T2a promuove il differenziamento muscolare [170]. Infine, studi su cellule tumorali ematopoietiche hanno mostrato che l'inibizione di Cdk9 induce apoptosi, suggerendo l'utilizzo di inibitori delle Cdk nella terapia antitumorale [171]. Quindi, la repressione di *PLK4* e *CDK9*, che è stata osservata in seguito al trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* (figura 23), è coerente con l'effetto antitumorale e pro-apoptotico dello stesso PNA.

Un altro gene che partecipa alla regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi, ma che è fortemente indotto dal trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* è *P21* (o *CDKN1A*, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) (figura 23). La proteina p21 si lega ed inibisce le chinasi ciclina-dipendenti, bloccando la progressione del ciclo; inoltre, come *target* di p53, inibisce la proliferazione cellulare e può indurre apoptosi in risposta a danno del DNA. In letteratura vi

sono numerosi studi che dimostrano che *P21* è un gene *target* della repressione di *MYC* [172] e di *MYCN* in linee cellulari di neuroblastoma [173]. I nostri risultati, a livello di mRNA e di proteina (figure 23-24), indicano che *P21* potrebbe essere un *target* della repressione di *MYCN* anche nei RMS che esprimono *MYCN*, sia ARMS che ERMS.

Altri geni *target* di p53 che vengono indotti dal trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* sono *BTG2* e *GDF15* (figura 23). Il gene *BTG2* (*BTG family, member 2*) è coinvolto nella regolazione di molte funzioni cellulari, quali proliferazione, differenziamento, riparo del danno del DNA e apoptosi [174]. L'espressione di *BTG2* è alterata in numerosi tumori e studi di espressione sulle cellule leucemiche hanno indicato che il trattamento con agenti pro-apoptotici determina un aumento dell'espressione di *BTG2*, analogamente a quanto è stato osservato dopo la somministrazione del PNA (figura 23). Il gene *GDF15* (*growth differentiation factor 15*) codifica per un fattore di crescita e di differenziamento della famiglia TGF-beta (*Transforming Growth Factor beta*), che è altamente espresso nella placenta [175]. Recentemente è stato anche dimostrato che *GDF15* è un *target* trascrizionale di p53, partecipando alla regolazione dell'apoptosi [176] e che la sua espressione è alterata in numerosi tumori, tra cui il carcinoma gastrico [177], prostatico [178] ed epatocellulare [179]. Studi di espressione genica su cellule di carcinoma alla mammella hanno dimostrato che il trattamento con un agente antitumorale induce l'espressione di geni apoptotici tra cui *GDF15* [180], in analogia con ciò che si osserva sulle cellule di RMS, in seguito al trattamento con il PNA (figura 23).

Il trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* modifica anche l'espressione di geni coinvolti principalmente nella regolazione della sintesi proteica, quali *TIAL1* (*TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein like 1*) e *EIF4E* (Eukaryotic translation initiation factor 4E). La proteina TIAR (*related to TIA1*) si lega all'RNA ed ha diversi ruoli regolatori, a seconda del sito di legame al trascritto, quali controllo della traduzione, *splicing* e apoptosi [181]. Legandosi al 3'-UTR dei trascritti, inibisce la sintesi proteica di numerosi fattori, come *EIF4E*

e *MYC* [182], ed in alcuni sistemi cellulari induce apoptosi o attraverso la frammentazione del DNA o attraverso la via di Fas [183]. La proteina eIF4E è un regolatore chiave della traduzione e gioca un ruolo simile a N-myc. Un aumento dei livelli di eIF4E incrementa la traduzione di proteine coinvolte nella proliferazione cellulare e la degenerazione maligna nelle cellule tumorali, ed è stato riscontrato nel carcinoma alla mammella, nel carcinoma squamocellulare del distretto testa-collo e nel neuroblastoma [184]. E' stato precedentemente dimostrato che *EIF4E* è un gene *target* di Myc [185]. L'induzione di *TIAL1* e la repressione di *EIF4E*, che sono stati osservati in seguito al trattamento con il PNA (figura 23), sono coerenti con l'effetto antitumorale e pro-apoptotico del PNA.

Altri geni, la cui espressione viene indotta dal trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN*, sono *CBX4* e *DTX3*. Il gene *CBX4* (*chromobox homolog 4*) codifica per una proteina del gruppo PcG (*Poycomb group*), che interagisce con le altre proteine PcG e funziona come repressore trascrizionale. Inoltre, Cbx4 promuove la SUMOilazione di altri repressori trascrizionali e della DNA metiltransferasi Dnmt3a [186], è un repressore di *MYC* ed ha una funzione anti-apoptotica [187]. Invece, il gene *DTX3* (*deltex 3 homolog*) è un regolatore positivo o negativo del *pathway* di Notch, a seconda del contesto cellulare e della fase dello sviluppo (miogenesi, neurogenesi e linfogenesi). La proteina Deltex3 agisce come ubiquitina-ligasi *in vitro* e potrebbe regolare il *pathway* di Notch attraverso questa sua attività [188].

Nello studio *in vivo*, utilizzando un modello murino di *xenograft* di ARMS umano, l'attività metabolica tumorale è stata valutata mediante micro-PET e il trattamento con il PNA anti-gene anti-*MYCN* ha portato ad una completa eliminazione del segnale metabolico del tumore nella maggior parte (70%) dei casi e ad una riduzione del segnale nel restante 30% degli animali (figure 25-26). Invece, in accordo con i risultati ottenuti *in vitro*, il trattamento con il PNA mutato non ha evidenziato alcun effetto (figure 25-26). Un aspetto molto interessante, alla luce di una futura applicazione nei pazienti, consiste nel fatto che la strategia anti-gene del PNA non

necessita di una continua somministrazione della molecola, ma il trattamento è risultato efficace anche con somministrazioni a giorni alterni. L'efficacia dei PNA *in vivo* è stata precedentemente dimostrata contro *target* diversi da *MYCN*. Studi su ratti hanno mostrato che un PNA contro l'angiotensinogeno, somministrato per via intraperitoneale, è risultato efficace nel ridurre la pressione sanguigna e i livelli plasmatici di angiotensina I [189]. Recentemente uno studio *in vivo*, con un PNA anti-gene diretto contro una regione regolatrice di *MYC*, ha indicato che la molecola inibisce l'espressione del gene nel linfoma di Burkitt, ha una lunga emivita nei tessuti e non ha effetti di tossicità [190]. Lo stesso PNA non ha mostrato effetti di immunogenicità [191]. In accordo con questi risultati, la valutazione istologica che è stata eseguita nei principali organi, al termine del trattamento, non ha evidenziato alterazioni anatomo-patologiche (figura 27), indicando che il PNA non provoca alterazioni istopatologiche nei tessuti esaminati.

Complessivamente, i risultati ottenuti *in vitro* ed *in vivo* in questo studio sostengono fortemente lo sviluppo di una terapia genica contro *MYCN* per il trattamento dei RMS, in particolare per gli ARMS a prognosi sfavorevole, e per gli altri tumori che presentano amplificazione e/o esprimono *MYCN*.

Bibliografia

1. Pastore, G., et al., *Childhood soft tissue sarcomas incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project*. Eur J Cancer, 2006. **42**(13): p. 2136-49.
2. IARC, ed. *International incidence of childhood cancer, 1998*. Vol. II. IARC Scientific Publication No. 144. 1998.
3. Hays, D.M., et al., *Children with vesical rhabdomyosarcoma (RMS) treated by partial cystectomy with neoadjuvant or adjuvant chemotherapy, with or without radiotherapy. A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS) Committee*. J Pediatr Hematol Oncol, 1995. **17**(1): p. 46-52.
4. Regine, W.F., et al., *Local tumor control in rhabdomyosarcoma following low-dose irradiation: comparison of group II and select group III patients*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995. **31**(3): p. 485-91.
5. Meyer, W.H. and S.L. Spunt, *Soft tissue sarcomas of childhood*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(3): p. 269-80.
6. Xia, S.J., J.G. Pressey, and F.G. Barr, *Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma*. Cancer Biol Ther, 2002. **1**(2): p. 97-104.
7. Parham, D.M. and D.A. Ellison, *Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(10): p. 1454-65.
8. Stevens, M.C., *Treatment for childhood rhabdomyosarcoma: the cost of cure*. Lancet Oncol, 2005. **6**(2): p. 77-84.
9. Moretti, A., et al., *Cell division cycle control in embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas*. Eur J Cancer, 2002. **38**(17): p. 2290-9.
10. Shapiro, D.N., et al., *Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma*. Cancer Res, 1993. **53**(21): p. 5108-12.
11. Kelly, K.M., et al., *Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma*. J Clin Oncol, 1997. **15**(5): p. 1831-6.
12. Barr, F.G., *Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5736-46.
13. Tremblay, P. and P. Gruss, *Pax: genes for mice and men*. Pharmacol Ther, 1994. **61**(1-2): p. 205-26.
14. Goulding, M.D., et al., *Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis*. Embo J, 1991. **10**(5): p. 1135-47.
15. Kelly, K.M., R.B. Womer, and F.G. Barr, *PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions in rhabdomyosarcoma*. J Pediatr Hematol Oncol, 1998. **20**(5): p. 517-8.
16. Fitzgerald, J.C., A.M. Scherr, and F.G. Barr, *Structural analysis of PAX7 rearrangements in alveolar rhabdomyosarcoma*. Cancer Genet Cytogenet, 2000. **117**(1): p. 37-40.

17. Barr, F.G., *Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma*. J Pediatr Hematol Oncol, 1997. **19**(6): p. 483-91.
18. Gallego Melcon, S. and J. Sanchez de Toledo Codina, *Molecular biology of rhabdomyosarcoma*. Clin Transl Oncol, 2007. **9**(7): p. 415-9.
19. Davis, R.J. and F.G. Barr, *Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8047-51.
20. Barr, F.G., et al., *In vivo amplification of the PAX3-FKHR and PAX7-FKHR fusion genes in alveolar rhabdomyosarcoma*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(1): p. 15-21.
21. Zhan, S., D.N. Shapiro, and L.J. Helman, *Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 445-8.
22. Smith, A.C., et al., *Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome*. Pediatr Dev Pathol, 2001. **4**(6): p. 550-8.
23. Williamson, D., et al., *Relationship between MYCN copy number and expression in rhabdomyosarcomas and correlation with adverse prognosis in the alveolar subtype*. J Clin Oncol, 2005. **23**(4): p. 880-8.
24. Grandori, C., et al., *The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 653-99.
25. Dalla-Favera, R., F. Wong-Staal, and R.C. Gallo, *Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient*. Nature, 1982. **299**(5878): p. 61-3.
26. Magrath, I., *The pathogenesis of Burkitt's lymphoma*. Adv Cancer Res, 1990. **55**: p. 133-270.
27. Payne, G.S., J.M. Bishop, and H.E. Varmus, *Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas*. Nature, 1982. **295**(5846): p. 209-14.
28. Neil, J.C., et al., *The role of feline leukaemia virus in naturally occurring leukaemias*. Cancer Surv, 1987. **6**(1): p. 117-37.
29. Vennstrom, B., et al., *Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29*. J Virol, 1982. **42**(3): p. 773-9.
30. Schwab, M., et al., *Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour*. Nature, 1983. **305**(5931): p. 245-8.
31. Nau, M.M., et al., *L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer*. Nature, 1985. **318**(6041): p. 69-73.
32. Sugiyama, A., et al., *Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9144-8.
33. Asai, A., et al., *The s-Myc protein having the ability to induce apoptosis is selectively expressed in rat embryo chondrocytes*. Oncogene, 1994. **9**(8): p. 2345-52.
34. Resar, L.M., et al., *B-myc inhibits neoplastic transformation and transcriptional activation by c-myc*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(2): p. 1130-6.

35. DePinho, R.A., N. Schreiber-Agus, and F.W. Alt, *myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells*. *Adv Cancer Res*, 1991. **57**: p. 1-46.
36. Kohl, N.E., et al., *Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas*. *Cell*, 1983. **35**(2 Pt 1): p. 359-67.
37. Schwab, M., et al., *Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc*. *Nature*, 1984. **308**(5956): p. 288-91.
38. Stanton, L.W. and J.M. Bishop, *Alternative processing of RNA transcribed from NMYC*. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(12): p. 4266-72.
39. Ramsay, G., et al., *Human proto-oncogene N-myc encodes nuclear proteins that bind DNA*. *Mol Cell Biol*, 1986. **6**(12): p. 4450-7.
40. Slamon, D.J., et al., *Identification and characterization of the protein encoded by the human N-myc oncogene*. *Science*, 1986. **232**(4751): p. 768-72.
41. Nakajima, H., et al., *Inactivation of the N-myc gene product by single amino acid substitution of leucine residues located in the leucine-zipper region*. *Oncogene*, 1989. **4**(8): p. 999-1002.
42. Pession, A. and R. Tonelli, *The MYCN oncogene as a specific and selective drug target for peripheral and central nervous system tumors*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005. **5**(4): p. 273-83.
43. Wenzel, A., et al., *The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells*. *Embo J*, 1991. **10**(12): p. 3703-12.
44. Ma, A., et al., *DNA binding by N- and L-Myc proteins*. *Oncogene*, 1993. **8**(4): p. 1093-8.
45. Slack, A., et al., *The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(3): p. 731-6.
46. Koskinen, P.J. and K. Alitalo, *Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death*. *Semin Cancer Biol*, 1993. **4**(1): p. 3-12.
47. Solomon, D.L., B. Amati, and H. Land, *Distinct DNA binding preferences for the c-Myc/Max and Max/Max dimers*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(23): p. 5372-6.
48. Chang, D.W., et al., *The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(12): p. 4309-19.
49. Brenner, C., et al., *Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor*. *Embo J*, 2005. **24**(2): p. 336-46.
50. Adhikary, S. and M. Eilers, *Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(8): p. 635-45.
51. Wakamatsu, Y., et al., *Regulation of the neural crest cell fate by N-myc: promotion of ventral migration and neuronal differentiation*. *Development*, 1997. **124**(10): p. 1953-62.
52. Schwab, M. and J.M. Bishop, *Sustained expression of the human protooncogene MYCN rescues rat embryo cells from senescence*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(24): p. 9585-9.
53. Negroni, A., et al., *Decrease of proliferation rate and induction of differentiation by a MYCN antisense DNA oligomer in a human neuroblastoma cell line*. *Cell Growth Differ*, 1991. **2**(10): p. 511-8.

54. Schmidt, M.L., et al., *The biological effects of antisense N-myc expression in human neuroblastoma*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(2): p. 171-8.
55. Weiss, W.A., et al., *Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice*. Embo J, 1997. **16**(11): p. 2985-95.
56. Nisen, P.D., et al., *N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma*. J Natl Cancer Inst, 1988. **80**(20): p. 1633-7.
57. Pession, A., et al., *N-myc amplification and cell proliferation rate in human neuroblastoma*. J Pathol, 1997. **183**(3): p. 339-44.
58. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 203-16.
59. Lee, W.H., A.L. Murphree, and W.F. Benedict, *Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma*. Nature, 1984. **309**(5967): p. 458-60.
60. Aldosari, N., et al., *MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group*. Arch Pathol Lab Med, 2002. **126**(5): p. 540-4.
61. Hui, A.B., et al., *Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization*. Lab Invest, 2001. **81**(5): p. 717-23.
62. Strieder, V. and W. Lutz, *Regulation of N-myc expression in development and disease*. Cancer Lett, 2002. **180**(2): p. 107-19.
63. Lui, W.O., D.M. Tanenbaum, and C. Larsson, *High level amplification of 1p32-33 and 2p22-24 in small cell lung carcinomas*. Int J Oncol, 2001. **19**(3): p. 451-7.
64. Mao, X., et al., *Genetic alterations in primary cutaneous CD30+ anaplastic large cell lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **37**(2): p. 176-85.
65. Mizukami, Y., et al., *N-myc protein expression in human breast carcinoma: prognostic implications*. Anticancer Res, 1995. **15**(6B): p. 2899-905.
66. Dias, P., et al., *N-myc gene is amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS*. Int J Cancer, 1990. **45**(4): p. 593-6.
67. Driman, D., et al., *MYCN gene amplification in rhabdomyosarcoma*. Cancer, 1994. **73**(8): p. 2231-7.
68. Hachitanda, Y., et al., *N-myc gene amplification in rhabdomyosarcoma detected by fluorescence in situ hybridization: its correlation with histologic features*. Mod Pathol, 1998. **11**(12): p. 1222-7.
69. Toffolatti, L., et al., *MYCN expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and tumour samples*. J Pathol, 2002. **196**(4): p. 450-8.
70. Gil-Benso, R., et al., *Cytogenetic and molecular findings related to rhabdomyosarcoma. An analysis of seven cases*. Cancer Genet Cytogenet, 2003. **144**(2): p. 125-33.
71. Harris, R.G., et al., *The expression of the developmentally regulated proto-oncogene Pax-3 is modulated by N-Myc*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 34815-25.

72. Sarkar, A.K. and J.G. Nuchtern, *Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes*. *Cancer Res*, 2000. **60**(7): p. 1908-13.
73. Stevenson, F.K., *Update on cancer vaccines*. *Curr Opin Oncol*, 2005. **17**(6): p. 573-7.
74. Berg, T., et al., *Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(6): p. 3830-5.
75. Lu, X., A. Pearson, and J. Lunec, *The MYCN oncoprotein as a drug development target*. *Cancer Lett*, 2003. **197**(1-2): p. 125-30.
76. Burkhart, C.A., et al., *Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(18): p. 1394-403.
77. Mocellin, S., R. Costa, and D. Nitti, *RNA interference: ready to silence cancer?* *J Mol Med*, 2006. **84**(1): p. 4-15.
78. Godfrey, A., et al., *Inhibiting primary effusion lymphoma by lentiviral vectors encoding short hairpin RNA*. *Blood*, 2005. **105**(6): p. 2510-8.
79. Nielsen, P.E., et al., *Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide*. *Science*, 1991. **254**(5037): p. 1497-500.
80. Egholm, M., et al., *PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules*. *Nature*, 1993. **365**(6446): p. 566-8.
81. Egholm, M., et al., *Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(2): p. 217-22.
82. Demidov, V.V., et al., *Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts*. *Biochem Pharmacol*, 1994. **48**(6): p. 1310-3.
83. Merrifield, B., *Solid phase synthesis*. *Science*, 1986. **232**(4748): p. 341-7.
84. Christensen, L., et al., *Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids*. *J Pept Sci*, 1995. **1**(3): p. 175-83.
85. Uhlmann, E., *Peptide nucleic acids (PNA) and PNA-DNA chimeras: from high binding affinity towards biological function*. *Biol Chem*, 1998. **379**(8-9): p. 1045-52.
86. Eriksson, M., et al., *Sequence dependent N-terminal rearrangement and degradation of peptide nucleic acid (PNA) in aqueous solution*. *Nouv J Chim*, 1998. **22**: p. 1055-9.
87. Hyrup, B. and P.E. Nielsen, *Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications*. *Bioorg Med Chem*, 1996. **4**(1): p. 5-23.
88. Kurg, R., U. Langel, and M. Ustav, *Inhibition of the bovine papillomavirus E2 protein activity by peptide nucleic acid*. *Virus Res*, 2000. **66**(1): p. 39-50.
89. Kuhn, H., et al., *Kinetic sequence discrimination of cationic bis-PNAs upon targeting of double-stranded DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(2): p. 582-7.
90. Brown, S.C., et al., *NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA*. *Science*, 1994. **265**(5173): p. 777-80.
91. Wittung, P., et al., *DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid*. *Nature*, 1994. **368**(6471): p. 561-3.

92. Porcheddu, A. and G. Giacomelli, *Peptide nucleic acids (PNAs), a chemical overview*. *Curr Med Chem*, 2005. **12**(22): p. 2561-99.
93. Nielsen, P.E., et al., *Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and anti-gene agents*. *Anticancer Drug Des*, 1993. **8**(1): p. 53-63.
94. Hanvey, J.C., et al., *Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids*. *Science*, 1992. **258**(5087): p. 1481-5.
95. Tyler, B.M., et al., *Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i.p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(12): p. 7053-8.
96. Boffa, L.C., et al., *Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA-binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(22): p. 13228-33.
97. Vickers, T.A., et al., *Inhibition of NF-kappa B specific transcriptional activation by PNA strand invasion*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(15): p. 3003-8.
98. Ray, A. and B. Norden, *Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future*. *Faseb J*, 2000. **14**(9): p. 1041-60.
99. Karkare, S. and D. Bhatnagar, *Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006. **71**(5): p. 575-86.
100. Bentin, T. and P.E. Nielsen, *Enhanced peptide nucleic acid binding to supercoiled DNA: possible implications for DNA "breathing" dynamics*. *Biochemistry*, 1996. **35**(27): p. 8863-9.
101. Knudsen, H. and P.E. Nielsen, *Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs*. *Nucleic Acids Res*, 1996. **24**(3): p. 494-500.
102. Mologni, L., et al., *Additive antisense effects of different PNAs on the in vitro translation of the PML/RARalpha gene*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(8): p. 1934-8.
103. Wittung, P., et al., *Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acid*. *FEBS Lett*, 1995. **375**(3): p. 27-9.
104. Aldrian-Herrada, G., et al., *A peptide nucleic acid (PNA) is more rapidly internalized in cultured neurons when coupled to a retro-inverso delivery peptide. The antisense activity depresses the target mRNA and protein in magnocellular oxytocin neurons*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(21): p. 4910-6.
105. Tyler, B.M., et al., *Specific gene blockade shows that peptide nucleic acids readily enter neuronal cells in vivo*. *FEBS Lett*, 1998. **421**(3): p. 280-4.
106. Sei, S., et al., *Identification of a key target sequence to block human immunodeficiency virus type 1 replication within the gag-pol transframe domain*. *J Virol*, 2000. **74**(10): p. 4621-33.
107. Norton, J.C., et al., *Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids*. *Nat Biotechnol*, 1996. **14**(5): p. 615-9.
108. Faruqi, A.F., M. Egholm, and P.M. Glazer, *Peptide nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1398-403.

109. Branden, L.J., A.J. Mohamed, and C.I. Smith, *A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(8): p. 784-7.
110. Nastruzzi, C., et al., *Liposomes as carriers for DNA-PNA hybrids*. J Control Release, 2000. **68**(2): p. 237-49.
111. Basu, S. and E. Wickstrom, *Synthesis and characterization of a peptide nucleic acid conjugated to a D-peptide analog of insulin-like growth factor 1 for increased cellular uptake*. Bioconj Chem, 1997. **8**(4): p. 481-8.
112. Pooga, M., et al., *Cell penetration by transportan*. Faseb J, 1998. **12**(1): p. 67-77.
113. Cutrona, G., et al., *Effects in live cells of a c-myc anti-gene PNA linked to a nuclear localization signal*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(3): p. 300-3.
114. Derossi, D., et al., *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10444-50.
115. Faccini, A., et al., *Circular dichroism study of DNA binding by a potential anticancer peptide nucleic acid targeted against the MYCN oncogene*. Chirality, 2008. **20**(3-4): p. 494-500.
116. Hamilton, S.E., et al., *Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase*. Chem Biol, 1999. **6**(6): p. 343-51.
117. Koppelhus, U., et al., *Efficient in vitro inhibition of HIV-1 gag reverse transcription by peptide nucleic acid (PNA) at minimal ratios of PNA/RNA*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(11): p. 2167-73.
118. Bastide, L., et al., *Inhibition of a DNA-helicase by peptide nucleic acids*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(2): p. 551-4.
119. Wang, G., et al., *Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated induction of human gamma-globin gene expression*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(13): p. 2806-13.
120. Mollegaard, N.E., et al., *Peptide nucleic acid.DNA strand displacement loops as artificial transcription promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3892-5.
121. Wilson, G.L., et al., *Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 22025-32.
122. Zelphati, O., et al., *Gene chemistry: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(1): p. 15-24.
123. Demers, D.B., et al., *Enhanced PCR amplification of VNTR locus DIS80 using peptide nucleic acid (PNA)*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(15): p. 3050-5.
124. Fiandaca, M.J., et al., *Self-reporting PNA/DNA primers for PCR analysis*. Genome Res, 2001. **11**(4): p. 609-13.
125. Perry-O'Keefe, H., et al., *Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to southern hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14670-5.
126. Veselkov, A.G., et al., *A new class of genome rare cutters*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(13): p. 2483-7.
127. Demidov, V., et al., *Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(9): p. 2103-7.

128. Lansdorp, P.M., et al., *Heterogeneity in telomere length of human chromosomes*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(5): p. 685-91.
129. Orum, H., et al., *Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection*. Biotechniques, 1995. **19**(3): p. 472-80.
130. Orum, H., et al., *Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(23): p. 5332-6.
131. Thiede, C., et al., *Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(5): p. 983-4.
132. Carlsson, C., et al., *Screening for genetic mutations*. Nature, 1996. **380**(6571): p. 207.
133. Palecek, E., et al., *Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage*. Biosens Bioelectron, 1998. **13**(6): p. 621-8.
134. Pession, A., et al., *Targeted inhibition of NMYC by peptide nucleic acid in N-myc amplified human neuroblastoma cells: cell-cycle inhibition with induction of neuronal cell differentiation and apoptosis*. Int J Oncol, 2004. **24**(2): p. 265-72.
135. Tonelli, R., et al., *Anti-gene peptide nucleic acid specifically inhibits MYCN expression in human neuroblastoma cells leading to cell growth inhibition and apoptosis*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(5): p. 779-86.
136. Rodriguez-Perales, S., et al., *Molecular cytogenetic characterization of rhabdomyosarcoma cell lines*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. **148**(1): p. 35-43.
137. Douglass, E.C., et al., *A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma*. Cytogenet Cell Genet, 1987. **45**(3-4): p. 148-55.
138. Wang-Wuu, S., et al., *Chromosomal analysis of sixteen human rhabdomyosarcomas*. Cancer Res, 1988. **48**(4): p. 983-7.
139. Frascella, E., et al., *Concomitant amplification and expression of PAX7-FKHR and MYCN in a human rhabdomyosarcoma cell line carrying a cryptic t(1;13)(p36;q14)*. Cancer Genet Cytogenet, 2000. **121**(2): p. 139-45.
140. Hazelton, B.J., et al., *Characterization of cell lines derived from xenografts of childhood rhabdomyosarcoma*. Cancer Res, 1987. **47**(16): p. 4501-7.
141. Nanni, P., et al., *RMZ: a new cell line from a human alveolar rhabdomyosarcoma. In vitro expression of embryonic myosin*. Br J Cancer, 1986. **54**(6): p. 1009-14.
142. Kouraklis, G., et al., *Myc oncogene expression and nude mouse tumorigenicity and metastasis formation are higher in alveolar than embryonal rhabdomyosarcoma cell lines*. Pediatr Res, 1999. **45**(4 Pt 1): p. 552-8.
143. Roberts, I., et al., *Molecular cytogenetic analysis consistently identifies translocations involving chromosomes 1, 2 and 15 in five embryonal rhabdomyosarcoma cell lines and a PAX-FOXO1A fusion gene negative alveolar rhabdomyosarcoma cell line*. Cytogenet Cell Genet, 2001. **95**(3-4): p. 134-42.

144. De Giovanni, C., et al., *Metastatic ability and differentiative properties of a new cell line of human embryonal rhabdomyosarcoma (CCA)*. Anticancer Res, 1989. **9**(6): p. 1943-9.
145. Magnani, I., et al., *Karyotypic characterization of a new human embryonal rhabdomyosarcoma cell line*. Cancer Genet Cytogenet, 1991. **54**(1): p. 83-9.
146. McAllister, R.M., et al., *Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma*. Cancer, 1969. **24**(3): p. 520-6.
147. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
148. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
149. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
150. Kangas, L., M. Gronroos, and A.L. Nieminen, *Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro*. Med Biol, 1984. **62**(6): p. 338-43.
151. Crouch, S.P., et al., *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity*. J Immunol Methods, 1993. **160**(1): p. 81-8.
152. Storer, R.D., et al., *Revalidation of the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds*. Mutat Res, 1996. **368**(2): p. 59-101.
153. Nanni, C., et al., *FDG small animal PET permits early detection of malignant cells in a xenograft murine model*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007. **34**(5): p. 755-62.
154. Phelps, M.E., *Inaugural article: positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9226-33.
155. Phelps, M.E., et al., *Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography*. J Nucl Med, 1975. **16**(3): p. 210-24.
156. Raju, T.N., *William Sealy Gosset and William A. Silverman: two "students" of science*. Pediatrics, 2005. **116**(3): p. 732-5.
157. Dennis, G., Jr., et al., *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. Genome Biol, 2003. **4**(5): p. P3.
158. Stevens, M.C., et al., *Treatment of nonmetastatic rhabdomyosarcoma in childhood and adolescence: third study of the International Society of Paediatric Oncology--SIOP Malignant Mesenchymal Tumor 89*. J Clin Oncol, 2005. **23**(12): p. 2618-28.
159. Bernasconi, M., et al., *Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of PAX proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13164-9.

160. Davicioni, E., et al., *Identification of a PAX-FKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas*. *Cancer Res*, 2006. **66**(14): p. 6936-46.
161. Lesko, E. and M. Majka, *The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 1271-80.
162. Asakura, A. and M.A. Rudnicki, *Rhabdomyosarcomagenesis-Novel pathway found*. *Cancer Cell*, 2003. **4**(6): p. 421-2.
163. Moss, M.L., et al., *ADAM10 as a target for anti-cancer therapy*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008. **9**(1): p. 2-8.
164. Mochizuki, S. and Y. Okada, *ADAMs in cancer cell proliferation and progression*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(5): p. 621-8.
165. Doak, S.H., et al., *Bone morphogenic factor gene dosage abnormalities in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007. **176**(2): p. 161-5.
166. Hamada, S., et al., *MSX2 overexpression inhibits gemcitabine-induced caspase-3 activity in pancreatic cancer cells*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(43): p. 6867-70.
167. Rodrigues-Martins, A., et al., *Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis*. *Science*, 2007. **316**(5827): p. 1046-50.
168. Winkles, J.A. and G.F. Alberts, *Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues*. *Oncogene*, 2005. **24**(2): p. 260-6.
169. Swallow, C.J., et al., *Sak/Plk4 and mitotic fidelity*. *Oncogene*, 2005. **24**(2): p. 306-12.
170. De Falco, M. and A. De Luca, *Involvement of cdk's and cyclins in muscle differentiation*. *Eur J Histochem*, 2006. **50**(1): p. 19-23.
171. Shapiro, G.I., *Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(11): p. 1770-83.
172. Gartel, A.L. and S.K. Radhakrishnan, *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences*. *Cancer Res*, 2005. **65**(10): p. 3980-5.
173. Bell, E., J. Lunec, and D.A. Tweddle, *Cell cycle regulation targets of MYCN identified by gene expression microarrays*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(10): p. 1249-56.
174. Tirone, F., *The gene PC3(TIS21/BTG2), prototype member of the PC3/BTG/TOB family: regulator in control of cell growth, differentiation, and DNA repair?* *J Cell Physiol*, 2001. **187**(2): p. 155-65.
175. Yokoyama-Kobayashi, M., et al., *Human cDNA encoding a novel TGF-beta superfamily protein highly expressed in placenta*. *J Biochem*, 1997. **122**(3): p. 622-6.
176. Osada, M., et al., *A p53-type response element in the GDF15 promoter confers high specificity for p53 activation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **354**(4): p. 913-8.
177. Katoh, M., *Dysregulation of stem cell signaling network due to germline mutation, SNP, helicobacter pylori infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2007. **6**(6): p. 832-9.

178. Huang, C.Y., et al., *Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(19): p. 5825-33.
179. Zimmers, T.A., et al., *Effect of in vivo loss of GDF-15 on hepatocellular carcinogenesis*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008.
180. Einbond, L.S., et al., *Gene expression analysis of the mechanisms whereby black cohosh inhibits human breast cancer cell growth*. Anticancer Res, 2007. **27**(2): p. 697-712.
181. Suswam, E.A., et al., *Novel DNA-binding properties of the RNA-binding protein TIAR*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(14): p. 4507-18.
182. Mazan-Mamczarz, K., et al., *Translational repression by RNA-binding protein TIAR*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(7): p. 2716-27.
183. Taupin, J.L., et al., *The RNA-binding protein TIAR is translocated from the nucleus to the cytoplasm during Fas-mediated apoptotic cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1629-33.
184. Parker, A., et al., *Eukaryotic initiation factor 4E staining as a clinical marker in pediatric neuroblastoma*. J Pediatr Hematol Oncol, 2004. **26**(8): p. 484-7.
185. Schmidt, E.V., *The role of c-myc in regulation of translation initiation*. Oncogene, 2004. **23**(18): p. 3217-21.
186. Li, B., et al., *Polycomb protein Cbx4 promotes SUMO modification of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a*. Biochem J, 2007. **405**(2): p. 369-78.
187. Satijn, D.P., et al., *Interference with the expression of a novel human polycomb protein, hPc2, results in cellular transformation and apoptosis*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(10): p. 6076-86.
188. Takeyama, K., et al., *The BAL-binding protein BBAP and related Deltex family members exhibit ubiquitin-protein isopeptide ligase activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21930-7.
189. McMahon, B.M., et al., *Peptide nucleic acids specifically cause antigene effects in vivo by systemic injection*. Life Sci, 2002. **71**(3): p. 325-37.
190. Boffa, L.C., et al., *Therapeutically promising PNA complementary to a regulatory sequence for c-myc: pharmacokinetics in an animal model of human Burkitt's lymphoma*. Oligonucleotides, 2005. **15**(2): p. 85-93.
191. Cutrona, G., et al., *The peptide nucleic acid targeted to a regulatory sequence of the translocated c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma lacks immunogenicity: follow-up characterization of PNAEmu-NLS*. Oligonucleotides, 2007. **17**(1): p. 146-50.

Abbreviazioni utilizzate nel testo

ARMS RMS alveolare

ATP *Adenosine TriPhosphate*

bHLH-LZ motivo *helix-loop-helix/leucine zipper*

BSA *Bovine Serum Albumine*

CGH *Comparative Genomic Hybridization*

CPP *Cell Penetratine Peptides*

CTL Linfociti T Citotossici

ELISA *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*

EMSA *Electrophoretic Mobility-Shift Assays*

ERMS RMS embrionale

FISH *Fluorescence In Situ Hybridization*

FRET *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

HRP *Horseradish Peroxidase*

ICCS *International Classification for Childhood Sarcomas*

LOH *Loss Of Heterozigosity*

LOI *Loss Of Imprinting*

LSI *Sonda Locus Specific Identifier*

MbI *Myc Boxes I*

MbII *Myc Boxes II*

M-FISH *Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization*

MM *Mismatch*

MR	Risonanza Magnetica
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
PARC	<i>PNA-Assisted Rare Cleavage</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PM	<i>Perfect Match</i>
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
PNA _{mut}	PNA mutato
PNA _{wt}	PNA <i>wild-type</i>
PNET	<i>Primitive Neuroectodermal Tumors</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
ROI	<i>Region Of Interest</i>
RMS	Rabdomiosarcoma
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophore</i>
SKY	<i>Spectral Karyotyping</i>
SNC	Sistema Nervoso Centrale
TAC	Tomografia Assiale Computerizzata
TBR	<i>Target to Background Ratio</i>
TdT	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i>
TUNEL	<i>Terminal-transferase-mediated dUTP Nick End Labelling</i>