

Patogenesi molecolare dei diversi istotipi di carcinoma della tiroide: ruolo del gene NBS1 nella genesi dei tumori solidi sensibili alle radiazioni ionizzanti

S. Matera^a, S. Ursi^a, B. De Laurentiis^b, A. Marchetti^c, S. Martinotti^c, E. Toniato^c

^aUnità di Patologia Clinica, Ospedale S.S. Annunziata, Università degli Studi "G. D'Annunzio", Chieti

^bIstituto di Ricerca Clinica, Casa di Cura "Villa Serena", Castel Sant'Angelo, Pescara

^cDipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Cattedra di Anatomia Patologica, Università degli Studi "G. D'Annunzio", Chieti

Riassunto

Il carcinoma della tiroide non è una malattia frequente e la diagnosi e cura non sono semplici. Gli studi di epidemiologia non sembrano dimostrare (ad eccezione della tre rare varianti di carcinoma midollare tiroide presenti nella sindrome MEN II il cui gene responsabile è il proto-oncogene RET) l'influenza di fattori eredo-familiari. Esistono dei fattori di rischio, che predispongono all'insorgenza di questo tumore. Nel caso dei tumori della tiroide, il principale fattore di rischio è l'esposizione alle radiazioni ionizzanti. Il nostro gruppo di ricerca si è occupato del ruolo del gene NBS1 (gene che fa parte di un sistema di riparazione del DNA) nella patogenesi dei tumori solidi indotti da radiazioni ionizzanti. Sono state esaminate 20 linee cellulari: 13 di tumori della mammella, 6 di tumori ovarici e una di tumore del colon (tumori sensibili alle radiazioni ionizzanti). La linea cellulare SW626 di colon mostra una inserzione di 50 nucleotidi dall'introne 2 con formazione di un codone di stop

(TAG). Il passo successivo è stato quello di individuare in vivo, la presenza di lesioni e/o alterazioni del processing dell'RNA di Nibrina (in particolare di evidenziare l'introne criptico già descritto nella linea cellulare SW626 di colon). Abbiamo analizzato l'mRNA estratto da 16 biopsie di tumori ovarici, da 10 biopsie di tumori polmonari e da 10 biopsie di tessuto polmonare normale. L'introne criptico è stato rilevato nel 43,75% dei tumori ovarici e in tutti i tumori polmonari. Inoltre, abbiamo evidenziato che: 1) l'espressione dell'introne è maggiore nel tessuto tumorale polmonare rispetto al tessuto normale polmonare degli stessi pazienti; 2) il livello di espressione dell'introne è maggiore nel tessuto normale dei pazienti con tumore polmonare rispetto al sangue dei volontari. La valutazione del meccanismo e del grado di riparazione del DNA può essere utilizzato come marker di orientamento terapeutico e di progressione della malattia.

Summary

Molecular pathogenesis of different histotypes of thyroid carcinoma: the role of NBS1 gene in the pathogenesis of solid tumors induced by ionizing radiation

The carcinoma of the thyroid is not a frequent disease and the diagnosis and cure are not simple. The studies of epidemiology do not seem to demonstrate (with the exception of the three rare variants of medullary carcinoma thyroid present in syndrome MEN II whose responsible gene is proto-oncogene the RET) the influence of inheritance factors. There are some risk factors that predispose to this tumor. The main factor of risk of the tumors of the thyroid is the exposure to the ionic radiation. Our re-

search group has taken care of the role of gene NBS1 (gene that takes part to a system of repair of the DNA) in the pathogenesis of the inducing solid tumors induced by ionizing radiation. 20 cellular lines have been examined: 13 of breast cancer, 6 of ovarian cancer and one of colon cancer (cancers sensitive to the ionizing radiations). SW626 colon's cellular line shows an insertion of 50 nucleotides from number 2 introne with formation of a codon of stop (TAG). The next step has been to localize the presence in vivo of lesions and/or alterations of nibrina's RNA processing (in particular the location of the cryptic introne already described in SW626 colon's cellular line). We analyzed the mRNA extracted from 16 biopsies of ovarian tumours, 10 biopsies of pulmonary tumours and 10 biopsies

of normal pulmonary tissue. The cryptic introne has been found in 43.75% of the ovarian tumours and in all the pulmonary ones. Moreover, we have demonstrated that: 1) the expression of the introne is greater in the pulmonary tumoural tissue than in the normal pulmonary tissue one of the same patients; 2) the expression of the introne

is greater in the normal tissue of the patients with pulmonary tumour compared with the blood of the volunteers. The evaluation of the mechanism and of the degree of DNA repair could be used as marker for directing therapy and assessing the disease progression.

Key-words: double strand breakpoint, ionic radiation, nibrin.

Introduzione

Il carcinoma della tiroide non è una malattia frequente, e per fortuna, le sue forme più diffuse, possono essere curate e guarite nella maggior parte dei casi.

Ma diagnosi e cura di questo tumore non sono semplici, perché chiamano in gioco discipline diverse e un assetto organizzativo complesso. Occorre la collaborazione, infatti, della chirurgia, della medicina nucleare e della radioterapia, ma anche dell'oncologia medica, della pediatria e, per i tumori familiari, della patologia molecolare oncologica.

Epidemiologia

Abbiamo visto che i tumori tiroidei sono abbastanza rari, complessivamente rappresentano l'1% circa di tutti i tumori; colpiscono le donne (in Italia, circa 1600 casi all'anno) più degli uomini (circa 400), ma nel sesso maschile sono più aggressivi.

Il tumore della tiroide si riscontra in tutte le età.

L'incidenza del carcinoma tiroideo è progressivamente aumentata nell'ultimo ventennio.

L'istotipo più frequente del carcinoma della tiroide è il papillare (oltre l'80%), seguito dal carcinoma follicolare (circa il 10%), dal carcinoma midollare (4%) e dal carcinoma anaplastico (2%).

Classificazione

- *Tumore differenziato papillare* è il più frequente, circa il 70% di tutti i tumori della tiroide sono di questo tipo. E' anche il meno aggressivo, raramente produce metastasi a distanza.
- *Tumore differenziato follicolare* è più aggressivo del papillare, ma fortunatamente è anch'esso differenziato e questo è importante soprattutto per la terapia con lo iodio in quanto le cellule tiroidee sono le uniche in grado di captare lo iodio.
- *Tumore anaplastico o indifferenziato* in questo caso le possibilità di guarigione sono scarse e dipendono in buona parte dalla tempestività con cui la neoplasia viene diagnosticata e curata.
- *Tumore midollare* è una delle forme più aggressive di tumore della tiroide. Attraverso il circolo sanguigno la neoplasia può estendersi rapidamente, anche in organi distanti del corpo.

Gli studi di epidemiologia descrittiva non sembrano dimostrare (ad eccezione della rara forma di carcinoma midollare follicolare non associato ad altre endocrinopatie e i carcinomi midollari della tiroide associati alla sindrome poliendocrina MEN II A e alla sindrome poliendocrina MEN II B) l'influenza di fattori eredito-familiari.

Il gene responsabile delle tre varianti della sindrome

MEN II è stato identificato nel proto-oncogene RET (10q11.2), costituito da 21 esoni distribuiti in una porzione genomica di circa 55 Kb. L'RNA messaggero trascritto dal proto-oncogene RET contiene le informazioni per la sintesi di una proteina trans membrana ad attività tirosin-chinasica. Il recettore RET è deputato alla trasduzione di segnali di controllo della proliferazione e/o del differenziamento e/o della migrazione delle cellule derivate dalle creste neurali. Specifiche mutazioni puntiformi *missense* (che provocano la sostituzione di amminoacidi cruciali del recettore RET) sono responsabili dei diversi fenotipi MEN II.

In particolare, nella maggior parte dei casi di MEN II A sono presenti mutazioni *missense* a livello di una delle 5 cisteine (presenti tra l'esone 10 e 11) del dominio extracellulare del recettore; al contrario nella maggior parte dei casi di sindrome MEN II B è da ricondurre alla presenza di un'unica mutazione puntiforme *missense* nel dominio tirosin-chinasico di RET (esone 16).

L'effetto biologico delle mutazioni MEN II è stato ampiamente investigato, dimostrando per le sostituzioni a livello dei residui di cisteina (tipici dei fenotipi MEN II A e FMTC) un'attivazione del recettore RET dovuta a dimezzazione spontanea e un cambiamento nella specificità di substrato del recettore per le mutazioni a livello del dominio tirosin-chinasico (tipica del fenotipo MEN II B); determinando così un proliferazione incontrollata delle cellule tiroidee.

Tali mutazioni geniche, trasmesse da una generazione all'altra, determinano in chi le eredita non la probabilità, ma la certezza di andare incontro, prima o poi, a un tumore midollare della tiroide.

Sono, quindi, stati messi a punto dei percorsi diagnostici e terapeutici in caso di pazienti affetti da carcinoma midollare; a tali pazienti, con un semplice prelievo ematico, si effettua un test di biologia molecolare; se tale esame rileva mutazioni sul gene RET, l'indagine viene estesa ai familiari: figli, genitori, fratelli, parenti stretti. Subito dopo, a chi è portatore delle alterazioni geniche responsabili del tumore viene proposta una terapia preventiva, cioè l'asportazione della tiroide, anche in assenza di qualsiasi sintomo clinico.

La causa specifica della maggior parte dei tumori tiroidei è quindi sconosciuta (il carcinoma midollare della tiroide rappresenta il 5-10% di tutti i tumori tiroidei); si suppone che molti casi siano quindi dovuti a mutazioni spontanee del DNA cellulare.

Esistono dunque dei fattori di rischio, cioè delle situazioni personali (instabilità) e/o ambientali (carenza di iodio o esposizione alle radiazioni) che predispongono all'insorgenza di un tumore.

Nel caso dei tumori della tiroide, il principale fattore di rischio è l'esposizione alle radiazioni ionizzanti; nelle aree

intorno a Chernobyl, dopo l'esplosione del reattore nucleare, i tumori della tiroide dei bambini sono passati da una frequenza di un caso l'anno per milione a 100 casi l'anno. Gli istotipi più frequenti erano le varianti solida e follicolare del carcinoma tiroideo papillare. In seguito all'esposizione alle radiazioni ionizzanti, vi è un aumentato rischio per quasi tutte le leucemie acute, per i tumori dello stomaco, colon, polmone, apparato urinario, ovaio, mammella, linfomi non-Hodgkin, tumori del fegato, della vescica e della cute.

Come già detto gli studi di epidemiologia descrittiva non sembrano dimostrare l'influenza di fattori eredito-familiari, tuttavia, esistono dati che fanno ipotizzare una certa familiarità per il carcinoma papillare della tiroide (*nella sindrome di Nijmegen sono stati osservati casi di carcinoma papillare della tiroide*).

In circa il 3-5 % dei pazienti affetti da carcinoma tiroideo è possibile riscontrare un'anamnesi familiare positiva per neoplasie della tiroide nei congiunti di primo grado. Il carcinoma tiroideo familiare non midollare (CTFNM) (quindi non ereditario) riguarda casi di carcinoma tiroideo, quasi sempre di istotipo papillare, che si manifestano in componenti dello stesso nucleo familiare. In questi soggetti l'aggressività del tumore è maggiore rispetto a quella osservata nella popolazione generale (elevata frequenza di multifocalità ed un più elevato tasso di recidiva) rispetto ai soggetti con carcinoma tiroideo papillare sporadico.

Probabilmente, tale predisposizione è legata a geni frequenti nella popolazione generale (NBS1 è stato trovato nei volontari sani), ma con debole penetranza, che non sono ancora stati identificati.

In alcune sindromi familiari associate ad un'elevata prevalenza di patologia nodulare tiroidea e carcinoma tiroideo, i fattori genetici ne sono certamente responsabili.

Nella poliposi familiare del colon, il rischio di sviluppare il carcinoma papillare della tiroide, è circa 100 volte più elevato rispetto al rischio osservato nella popolazione generale.

Quindi, i tumori della tiroide che originano dall'epitelio follicolare (il carcinoma papillare, l'adenoma e il carcinoma follicolare), benché l'esatta eziologia molecolare e patogenetica del tumore sia conosciuta solo in parte, mostrano frequenti alterazioni genetiche, alcune delle quali possono essere considerate specifiche. Le alterazioni genetiche più frequenti rilevate dagli studi di biologia molecolare nel corso degli ultimi 20 anni, sono principalmente quelle responsabili dell'attivazione oncogenica di geni come BRAF, RET, NTRK1, RAS, MET e del silenziamento di geni oncosoppressori come p53, RASSF1A, PTEN, PPAR γ ed inibitori di CDK. La recente introduzione delle tecnologie per lo studio globale dell'espressione genica ha prodotto nuove classi di biomarcatori che ora sono al vaglio di estese procedure di validazione.

Il nostro gruppo di ricerca dell'Università di Chieti diretto dal Prof. Martinotti, si è occupato del ruolo del gene NBS1 (gene che fa parte di un sistema di riparazione del DNA che quindi preserva la stabilità genomica) nella patogenesi dei tumori solidi indotti da radiazioni ionizzanti.

Come ho già detto, è quindi accertato il valore eziologico delle radiazioni ionizzanti nella patogenesi del carcinoma papillare della tiroide, ma come per gli altri tumori

radio indotti, non sembra esistere una dose soglia al di sotto della quale il rischio di carcinoma della tiroide è nullo.

Il rischio maggiore si verifica quando l'esposizione ai raggi UV coincide con la suscettibilità genetica individuale (in linea teorica, si ritiene che per questi tumori sporadici esista quindi una controparte ereditaria); in questi pazienti l'insorgenza di tumori è la risultanza di un accumulo di numerosi eventi (dovuti a sistemi di riparazione del DNA) che non funzionando non riparano le mutazioni che possono presentarsi in oncogeni e oncosoppressori. L'evoluzione clonale delle cellule neoplastiche avviene probabilmente a seguito di un'accresciuta instabilità genetica la quale, a sua volta, aumenterebbe la probabilità di ulteriori anomalie genetiche e la loro successiva selezione.

Le radiazioni ionizzanti o l'irradiazione con raggi ultravioletti danneggiano la struttura chimica dei nucleotidi. Infatti le radiazioni ionizzanti (raggi x, radiazioni alfa, beta, gamma, neutroni) deaminano le basi e provocano mutazioni cromosomiche rompendo i ponti fosfodiesterici su entrambe le catene causando al DNA modificazione di basi o SSB o DSB; l'esposizione alla luce ultravioletta invece destabilizza i legami idrogeno tra basi complementari determinando un cross-linking delle basi pirimidiniche (TT, CC, CT) con formazione di dimeri di timidina (non sono complementari) che determinano un ostacolo alla normale replicazione del DNA. Anche il calore è un mutageno di natura fisica.

Esistono anche altri tipi di insulti esterni come: i legami covalenti di alcuni gruppi chimici con basi nucleotidiche (ad es. l'alchilazione).

La cellula risponde ai danni del DNA con l'attivazione del checkpoint, ossia di meccanismi di sorveglianza che regolano vari aspetti del metabolismo cellulare, capace di inibire la replicazione del DNA (che verrà riparato da sistemi di riparazione) o di portare la cellula in apoptosi (cioè la sua morte programmata).

Tali meccanismi di riparazione sono diversi a seconda del tipo di danno e dell'agente che lo ha causato e spesso, come vedremo più avanti, si possono complessare tra loro al fine di rendere stabile il nostro genoma.

Il Nucleotide Excision Repair (NER) è un sistema di riparazione del DNA che ripara un'ampia varietà di lesioni originate da agenti chimici e fisici. Agisce clivando un oligonucleotide di 16-20 basi azotate rimuovendo così i dimeri di timidina formati in seguito all'esposizione ai raggi ultravioletti.

Il Base Excision Repair (BER) è un ulteriore sistema di riparazione del DNA per escissione. Ripara i danni di natura endogena, l'idrolisi delle basi azotate, la deamminazione (G, A, C), le rotture di uno dei due filamenti.

Un altro sistema di riparazione è rappresentato dal Mismatch Repair (MMR) che ripara errori dovuti alla formazione di basi non appaiate (mismatch) durante il processo di replicazione. La replicazione del DNA ad ogni evento mitotico, deve obbligatoriamente avere un sistema di correzione preciso poiché qualsiasi errore può determinare mutazioni trasmissibili alle future generazioni cellulari. Un buon livello di fedeltà nella replicazione del DNA è garantita dalla DNA polimerasi, enzima che catalizza la giusta incorporazione delle basi durante la sintesi (A-T, G-C).

In alcuni casi però, si possono verificare errori di accoppiamento, come l'appaiamento di una adenina con una guanina; in tal caso il primo sistema ad intervenire nella riparazione del DNA, durante la fase di replicazione, è l'attività proofreading (correttore di bozze) 3'-5' esonucleasica della stessa DNA polimerasi.

Nel caso in cui siano presenti sequenze microsattelliti nel DNA (ad es. CA repeats), particolarmente sensibili all'infedeltà di replicazione, anche il meccanismo proofreading può fallire. In tal caso può effettuare errori (slippage) aggiungendo o sottraendo copie di sequenze ripetitive nel DNA in corso di sintesi; il meccanismo deputato alla correzione di questi errori è rappresentato dal Mismatch Repair (MMR).

Il complesso NBS1-MRE11-RAD50 è uno dei principali sistemi di riparazione del DNA che intervengono in seguito a DBS (rottura di entrambi i filamenti del DNA) sotto l'effetto di radiazioni ionizzanti, radicali liberi e agenti chimici (es. farmaci radio mimetici come la bleiomicina) e quindi agli insulti esterni che causano tumori alla tiroide.

Inoltre, sempre al fine di preservare la stabilità genomica, le proteine del MMR cioè le DNA repair protein (MSH2, MLH1, MSH6, ATM, BLM), il sistema formato da RAD50-MRE11-NBS1, il fattore di replicazione C, insieme a BRCA1, formano un complesso denominato BASC (BRCA1 associated surveillance complex), che funziona come un sensore per riparare i danni del DNA a doppia elica.

E' interessante notare che molti geni facenti parte del complesso BASC, presentano sequenze ripetitive mononucleotidiche (cioè dei microsattelliti) nelle regioni codificanti:

- un tratto (A) 9 in RAD50 e BLM;
- un tratto (A) 9 in BRAC1;
- un tratto (C) 8 in MSH6;
- un tratto (A) 7 in NBS1;
- un tratto (T) 7 in ATM.

Queste regioni microsattelliti ho già detto che sono sensibili agli errori di replicazione del DNA; tale sensibilità può causare mutazioni nei suddetti geni, "supervisor" della stabilità genomica, ma può far sì che questi geni siano anche utilizzati come target dell'instabilità genomica.

Oggetto del nostro studio è la proteina nibrina che fa parte di un complesso multiproteico insieme a MRE11 e RAD50.

Questo complesso gioca un ruolo importante nel riparare i danni del DNA indotti da radiazioni ionizzanti o sostanze radio mimetiche quindi da insulti esterni che sono uno dei due possibili tipi di errore (il secondo tipo è la formazione di basi non appaiate durante il processo di replicazione) che possono alterare la sequenza nucleotidica inducendo mutazioni e quindi alterando la stabilità genomica cioè la capacità di assicurare che la trasmissione dell'informazione genetica alle future generazioni cellulari sia fedele al corredo cromosomico della cellula progenitrice i cui elementi essenziali sono la precisione nella replicazione del DNA e la riparazione degli errori di lettura prodotti durante la sintesi del DNA (che è contestuale alla fase S del ciclo cellulare).

Una porzione significativa di sindromi neoplastiche ereditarie si associa a inattivazione di geni che controllano i

meccanismi di riparazione del danno al DNA, è verosimile che, in tali sindromi, la stessa mutazione ereditata nella linea germinale, predisponga le cellule dell'organismo ad accumulare addizionali mutazioni somatiche (sugli alleli residui) in geni oncosoppressori e più raramente in oncogeni, a causa della ridotta efficienza nella riparazione del DNA e di conseguenza della ridotta stabilità genomica.

Secondo tale modello le varie lesioni molecolari riscontrate in alcuni tipi di tumore (vedi tumori della tiroide radio indotti) sarebbero causate dall'instabilità genomica e successivamente selezionate in base al vantaggio proliferativo conferito alla cellula tumorale.

Come già detto sono vari i geni e i complessi genici che intervengono nella riparazione del DNA al fine di preservare la stabilità genomica. In particolare il complesso NBS1-MRE11-RAD50 (che fa parte del complesso BASC) oggetto del nostro studio attiva il checkpoint di fase S del ciclo cellulare cioè l'intervallo di tempo che intercorre tra il completamento della mitosi di una cellula parentale e il completamento della successiva mitosi di una cellula figlia.

In questo lasso di tempo le cellule proliferanti, prima di dividersi, raddoppiano la loro massa e duplicano le strutture cellulari in modo da fornire alle cellule figlie tutti i componenti indispensabili per iniziare un nuovo ciclo di accrescimento e svolgere quindi la loro funzione.

Il complesso NBS1-MRE11-RAD50 grazie alla sua proteina nibrina e insieme ad altre proteine (P53), induce l'iperespressione di fattori in grado di inibire la progressione del ciclo cellulare attivando il checkpoint di fase S del ciclo cellulare, fase caratterizzata dalla replicazione e dalla sintesi di enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici.

Quindi, in caso di lesioni a DBS del DNA indotte da radiazioni ionizzanti, l'attivazione del checkpoint del ciclo cellulare permette di riparare il danno del DNA oppure determina la morte delle cellule per apoptosi.

L'inattivazione della nibrina e di conseguenza del complesso di cui fa parte, abroga questo meccanismo di controllo del ciclo cellulare e permette l'espansione di cellule recanti un DNA danneggiato. NBS1 sembra anche modulare il controllo delle transizioni G1/S e G2/M.

Il complesso NBS1-MRE11-RAD50 inoltre individua e ripara i siti di rottura a doppio strand del DNA, formando foci sui siti di danno del DNA indotto da radiazioni ionizzanti o da sostanze radio mimetiche o da processi fisiologici (es. la ricombinazione dei geni delle Ig, la meiosi).

Mutazioni dei geni di questo complesso possono determinare severi quadri clinici; infatti mutazioni di NBS1 causano la sindrome di Nijmegen (NBS) malattia autosomica recessiva caratterizzata da microcefalia, dismorfie cranio-facciali, deficit dell'accrescimento, immunodeficienza sia umorale (IgG e/o IgA) che cellulare (linfociti B), predisposizione al cancro in giovane età (leucemie, linfomi, neuroblastomi in alcuni casi tumore papillare della tiroide) e alterazioni del ciclo cellulare.

Questa sindrome è considerata una variante dell'Atassia-Teleangectasia (AT), malattia autosomica recessiva dovuta a mutazioni del gene ATM, una chinasi che agisce come trasduttore del danno del DNA.

Queste due sindromi hanno in comune l'instabilità ge-

nomica e la sensibilità cellulare e cromosomica alle radiazioni ionizzanti.

Struttura del gene NBS1

Il gene NBS1, responsabile della NBS, mappa sul cromosoma 8q21, occupa una regione di 50 Kb di DNA genomico ed è costituito da 16 esoni che codificano per un polipeptide di 754aa. con massa di 85 Kd denominata nibrina o P95.

Le mutazioni note, causa di malattia sono state identificate negli esoni 6-10 e provocano un arresto prematuro (stop codon) della sintesi della catena polipeptidica della nibrina. Una singola mutazione di origine Slava, 657 del 5, rende conto di oltre il 90 % di tutti gli alleli mutati nella NBS, mentre nuove distinte mutazioni sono state identificate in pazienti di gruppi etnici diversi.

Il gene NBS1 presenta nella sua porzione aminoterminale (N-terminale) due domini funzionali che occupano una regione di circa 200aa.: il dominio FHA e il dominio BRCT.

Tali domini sono stati ritrovati singolarmente nella struttura di alcune proteine che intervengono nella risposta cellulare al danno del DNA o nel controllo del ciclo cellulare, ma mai adiacenti nella stessa proteina come nella nibrina.

Nella porzione centrale della proteina si trovano diverse sequenze che costituiscono potenziali siti di fosforilazione e quindi di attivazione della proteina NBS.

Almeno due di queste sequenze, in particolare i residui di serina 278 e 343, vengono fosforilate dal gene ATM in risposta alla formazione di DSB. Recenti studi hanno confermato ciò e messo in evidenza la fosforilazione di altri residui serinici (395 e 615) della nibrina come possibili targets di ATM.

La porzione carbossi-terminale (C-terminale) di nibrina presenta un dominio che occupa gli amminoacidi che vanno da 665 a 693, per il legame con la proteina MRE11.

Funzioni del gene NBS1

Una delle funzioni più importanti del gene NBS1 è quella di avere un ruolo chiave nel riparare le rotture a doppia elica del DNA (DSB) prodotte dalle radiazioni ionizzanti, da farmaci radio mimetici o nel corso di processi fisiologici (ricombinazione dei geni delle IgG, meiosi).

La risposta cellulare alle DSB prevede l'azione combinata e concentrata dei sensori del danno, trasduttori del segnale (ATM) ed effettori del riparo.

Sono varie le evidenze sperimentali che definiscono il ruolo di nibrina nel meccanismo di riparazione del DNA.

E' stato dimostrato che la nibrina viene reclutata presso le DSB dalla interazione diretta dei suoi domini funzionali FHA e BRCT con l'istone H2AX fosforilato (γ -H1AX) sulla sua serina 139 dalla proteina ATM.

Sempre in risposta al danno del DNA indotto dalle radiazioni ionizzanti, la chinasi ATM fosforila anche NBS1 sulle serine 278 e 343 (395 e 615), un evento richiesto perché, grazie anche all'interazione diretta dei due domini con l'istone fosforilato γ -H1AX, permette l'interazione (con il dominio C-terminale legante MRE11) delle altre due proteine del complesso. Infatti in seguito al danno del DNA indotto da radiazioni, MRE11 e RAD50 vengono richia-

mate dal citoplasma al nucleo (rilocalizzazione subcellulare) e qui si uniscono all'estremità C-terminale di NBS1 localizzando così il complesso sui siti delle DSB dove formano foci, che permettono al complesso di svolgere la sua funzione nucleasica essenziale per riparare il danno al DNA.

Inoltre la fosforilazione dei residui serinici è richiesta anche per l'attivazione del checkpoint del ciclo cellulare.

Il gene NBS1 e il suo complesso agiscono nella cascata ATM-dipendente del checkpoint del ciclo cellulare, forse come modificatore/adattatore del segnale in pathway multipli. Il checkpoint di fase S è mediato da due vie parallele, una delle quali coinvolge ATM, NBS1 e SMC1.

La nibrina sembra anche modulare la fosforilazione da parte di ATM di altri due substrati, quali P53 e ChK2, nel controllo delle transizioni G1/S e G2/M.

Infatti le cellule NBS non solo non sono in grado di formare i foci sui siti di danno a double-strand del DNA, ma nemmeno di arrestare la sintesi del DNA (checkpoint in fase S) dopo irradiazione; inoltre mostrano anche un controllo deficitario dei checkpoints che regolano le transizioni delle fasi G1/S e G2/M, essendo incapaci di bloccare l'ingresso sia nella fase S che in mitosi (quindi le cellule NBS non solo non sono in grado di riparare il DNA, ma non regolando più le transizioni, si moltiplicano).

Noi abbiamo studiato nibrina attraverso l'mRNA estratto da linee cellulari tumorali, in questo modo oltre alle sequenze codificanti del gene (esoni) è stato possibile studiare anche eventuali aberrazioni dello splicing e quindi del rimodellamento che l'mRNA subiva (eliminando gli introni) in seguito alla trascrizione, passando dal compartimento nucleare a quello citoplasmatico della cellula per poi formare la proteina NBS.

Sono state esaminate 20 linee cellulari: 13 di tumori della mammella, 6 di tumori ovarici e una di tumore del colon (*tumori sensibili alle radiazioni ionizzanti*). Sono stati identificati 4 polimorfismi già descritti in letteratura, ed inoltre in 3 linee cellulari sono state individuate 3 diverse mutazioni responsabili della produzione di proteine tronche o aberranti; in particolare la linea cellulare SW626 mostra una inserzione di 50 nucleotidi dall'introne 2 con formazione di un codone di stop (TAG). Questi 50 nucleotidi sono fiancheggiati dai canonici siti di splicing TG-AG.

Le mutazioni che determinano la formazione della proteina tronca di NBS1 descritte nelle linee cellulari MCF7 e SW626 interessano il dominio FHA, dominio che permette al complesso di trovare e legare il sito di rottura.

Il passo successivo è stato quello di analizzare da una serie di campioni tumorali, in particolare da tumori del Povaio e del polmone (radiosensibili come il carcinoma papillare della tiroide), il livello di espressione del gene NBS1, utilizzando come matrice l'RNA estratto da biopsie di tessuto tumorale. Il razionale è quello di evidenziare in vivo, la presenza di lesioni e/o alterazioni del processing dell'RNA di nibrina (in particolare di evidenziare l'introne criptico già descritto nella linea cellulare SW626 di colon).

Abbiamo analizzato l'mRNA estratto da 16 biopsie di tumori ovarici, da 10 biopsie di tumori polmonari e da 10 biopsie di tessuto polmonare normale proveniente dagli stessi pazienti con tumore polmonare; abbiamo retrotrascritto e amplificato, con due distinte PCR l'RNA dei tu-

mori ovarici e in un'unica reazione di PCR (one step) l'RNA dei tumori polmonari, utilizzando primer specifici per amplificare la regione del gene interessata dall'aberrazione dello splicing tra gli esoni 2-3 (NBS1 564 pb). Dall'analisi delle loro sequenze ottenute, è stata evidenziata la presenza dell'introne 2 criptico, descritto nello studio condotto sulle linee cellulari, rappresentato da un doppio picco nel fero-gramma del cDNA tumorale, capace di allungare il trascritto fisiologico di 50pb. Tale introne criptico è splaisato attraverso i canonici siti di accettazione e donazione dello splicing. Abbiamo quindi isolato e amplificato tale introne criptico per poterlo poi sequenziare; il frame di lettura (dell'introne criptico) presenta un sito di terminazione TAG che cade entro le prime 6 basi del trascritto intronico, producendo un trascritto tronco. Questo introne criptico è stato trovato nel 43.7% dei tumori ovarici (7 introni criptici su 16 sequenze analizzate) e su tutti i tumori polmonari (PCR one step più sensibile); inoltre tale introne è stato trovato anche nei tessuti normali polmonari degli stessi pazienti. Alla luce di quest'ultimo dato inatteso, abbiamo analizzato il sangue (linfociti) di 10 volontari sani, al fine di valutare la presenza o meno dell'introne criptico; dall'analisi delle sequenze di questi volontari, abbiamo evidenziato la presenza dell'introne criptico. In base ai dati fin qui ottenuti, per valutare e confrontare il livello di espressione dell'introne, abbiamo amplificato l'introne criptico del tessuto tumorale polmonare, del tessuto normale polmonare e dei linfociti (sangue) dei volontari sani in un'unica reazione di PCR in modo da avere le stesse condizioni stechiometriche e per evitare le possibili variabili che possono incorrere facendo PCR distinte. Dall'analisi dei risultati abbiamo evidenziato che:

- il livello di espressione cioè la capacità di riparare il DNA (inteso come spessore e intensità della bandina) dell'introne è maggiore nel tessuto tumorale polmonare rispetto al tessuto normale polmonare degli stessi pazienti;
- il livello di espressione dell'introne è maggiore nel tessuto normale dei pazienti con tumore polmonare rispetto al sangue dei volontari.

Prospettive future e conclusioni

È in fase di valutazione la possibilità di misurare e confrontare, in modo più preciso, il diverso grado di espressione del mutante (introne criptico) trovato nei vari tessuti tumorali e normali, di pazienti e nei linfociti di volontari sani con una PCR quantitativa. Inoltre, al fine di valutare l'espressione fenotipica dell'introne criptico, in particolare la capacità di riparare i danni a doppio stand del DNA indotti da irradiazione, trasferiremo il mutante in linee cellulari recettive, come i fibroblasti. In breve questo progetto prevederà l'utilizzo di cellule P53 knockout (controllo positivo), di fibroblasti normali (controllo negativo) e di cellule nelle quali trasferiremo quantità scalari di introne; queste cellule saranno sottoposte a irradiazione e quindi confrontate per valutare se l'introne stesso impedisce la formazione dei foci nucleari, evidentemente non presenti nelle cellule senza la proteina P53.

La valutazione del meccanismo e del grado di riparazione del DNA potrebbe essere utilizzato come marker di orientamento terapeutico e di progressione della malattia.

Un altro punto che vogliamo considerare è quello di vedere se questa aberrazione dello splicing rappresenta una caratteristica comune dei tumori radiosensibili e quindi vedere se è presente anche nei tumori della tiroide.

Come già sottolineato il primo punto importante è la patogenesi della trasformazione neoplastica. Nei tumori umani, a differenza delle maggior parte dei tumori animali (virus indotti), l'induzione neotrasformante avviene per perturbazione interna dell'omeostasi del DNA. Il grado di controllo della stabilità genomica (ad esempio in caso di rotture a DSB del DNA indotte da radiazioni) potrebbe essere il primo gradino di attivazione neoplastica. Si produrrebbe un'alta entropia del sistema DNA che attiverebbe una trascrizione incontrollata.

Concludendo le mutazioni del gene NBS, compreso l'introne criptico da noi trovato, una volta riscontrate in una casistica più ampia, potranno essere un valido supporto per la diagnosi precoce e la terapia; per quanto riguarda quest'ultima, ad esempio, sapere che il paziente ha una instabilità genomica dovuta a una mutazione del gene NBS1, che con il suo complesso ripara i danni del DNA indotti da radiazioni ionizzanti, potrà essere un'indicazione ulteriore nel chiarire se il percorso terapeutico di questo paziente sarà la radioterapia e/o la chemioterapia o la terapia chirurgica.

Occorre precisare che, essendo l'introduzione di queste tecnologie molto recente, i risultati finora ottenuti non sono ancora stati riprodotti e validati; perciò, devono essere considerati con cautela. I problemi più rilevanti sono ascrivibili all'eterogeneità delle casistiche, alle diverse piattaforme tecnologiche utilizzate e all'approccio statistico e bioinformatico, cruciale per l'interpretazione dei risultati.

Bibliografia

- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 2000; 14:927-39.
- Digweed M. Human genetic instability syndromes: single gene defects with increased risk of cancer. *Toxicol Lett* 1993; 67:259-81.
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 1998; 93:477-86.
- Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 2000; 25:115-9.
- Wu X, Ranganathan V, Weisman DS, Heine WF, Ciccone DN, O'Neill TB, et al. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in DNA damage response. *Nature* 2000; 405:477-82.
- Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, et al. NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 2002; 12:1846-51.
- Cerosaletti KM, Concannon P. Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation. *J Biol Chem* 2003; 278:21944-51.
- Tessitore A, Biordi L, Flati V, Toniato E, Marchetti P, Ricevuto E, et al. New mutation and protein variant of NBS1 are identified in cancer cell lines. *Genes Chromosome Cancer* 2003; 36:198-204.