

Generazione di linee cellulari immortalizzate di medulloblastoma umano mediante espressione di una forma dominante negativa del gene *TP53*.

Data la difficoltà tecnica di trasfettare cellule di medulloblastoma umano con una forma dominante negativa del gene *TP53* in modo da garantirne un'espressione quantitativamente adeguata e stabile come proposto inizialmente, abbiamo deciso di verificare se le linee cellulari di medulloblastoma umano derivate da soggetti operati presso l'Istituto Neurologico C. Besta di Milano nel corso di due anni avessero un'alterazione molecolare a carico del gene *TP53* o di un gene correlato che ne potesse compromettere il funzionamento, al pari di quanto accade in presenza di forme dominanti negative del suddetto gene. È stato possibile ottenere l'immortalizzazione di solo due linee cellulari su venti. Le due linee cellulari immortalizzate sono state chiamate MB4 ed MB16, sono state prodotte rispettivamente da un medulloblastoma classico e da un medulloblastoma anaplastico pediatrico e hanno dimostrato di continuare a replicarsi dopo 20 passaggi in condizioni *serum-free* (DMEM/F12 + B27 w/o vitamina A) con l'aggiunta del solo FGF2 (20ng/mL) (la presenza dell'EGF, infatti, si è dimostrata superflua). In accordo con la nostra ipotesi di lavoro, nella linea MB16 abbiamo trovato una mutazione *loss-of-function* in eterozigosi nel gene *TP53* (IVS9+1G>T) associata ad una delezione del braccio corto del cromosoma 17 (17p) dove è ubicata l'altra copia del gene *TP53*; nella linea MB4, invece, è stata identificata un'amplificazione del gene *MDM2*, il cui prodotto è capace di inibire TP53. Da notare che la mutazione in eterozigosi del gene *TP53* non è stata documentata nel DNA estratto dal frammento del corrispondente tumore di origine, suggerendo che le condizioni di coltura possano avere favorito la selezione *in vitro* delle sole cellule che ne erano provviste. La linea MB16 si è inoltre dimostrata tumorigenica *in vivo*, data la formazione di una neoplasia simil-medulloblastoma dopo trapianto in topi nudi di 3×10^5 cellule. Ancorché molto preliminari, questi dati sono a supporto dell'importanza della disregolazione del TP53 quale meccanismo chiave per la generazione di linee cellulari immortalizzate di MB umano in condizioni standard di coltura *serum-free* e suggeriscono che tale disregolazione può avvenire o in modo diretto come nel caso della linea MB16 o in modo indiretto come nel caso della linea MB4.