

**Dottoranda: PAOLA CACCIOTTI**

**Relazione del quarto anno**

**COOPERAZIONE TRA VIRUS TRASFORMANTI E ONCOGENI  
NELLA TUMORIGENESI UMANA**

**INTRODUZIONE**

Numerosi studi condotti negli ultimi 20 anni hanno rivelato che alcuni **virus** possono essere coinvolti nella **tumorigenesi umana**. Attualmente si stima che circa il 15% dei tumori umani noti abbia un' eziologia virale (Parkin et al.,1999). I virus umani considerati più pericolosi dal punto di vista della tumorigenesi sono gli Hepadnavirus (HBV), gli Herpesvirus (EBV e HHV-8) e i Papovavirus (HPV e i Polyomavirus SV40, JCV e BKV) (Butel, 2000). E' comunque opinione comune che i virus non siano cancerogeni completi, ma piuttosto agiscano come fattori promuoventi la tumorigenesi, che necessitano della cooperazione con fattori di rischio di tipo ambientale o con i prodotti di proto-oncogeni cellulari, come i recettori tirosina chinasi (RTKs), i fattori di crescita e gli effettori del segnale proliferativo (Aaronson, 1991).

## SCOPO DEL LAVORO e RISULTATI

### Primo anno

Nel corso del primo anno di attività di dottorato di ricerca, ho svolto una indagine di tipo biomolecolare volta a chiarire se l' infezione virale possa contribuire all' attivazione di alcuni RTKs, creando condizioni ottimali per la progressione neoplastica e se possa instaurarsi una cooperazione tra meccanismi virali e cellulari in grado di favorire la tumorigenesi.

In particolare, questo studio è stato eseguito sul modello tumorale del **Mesotelioma Maligno Pleurico (MM)**, un tumore altamente aggressivo e invasivo che colpisce generalmente cellule di rivestimento della cavità pleurica, ma che occasionalmente può anche svilupparsi in sede peritoneale e paratesticolare (Patologia Sistematica e Generale; McGraw-Hill). Il MM è stato da noi considerato un ottimo modello di studio, in quanto è un tumore per il quale sono ormai più che ipotizzabili interazioni tra:

- **fattori di rischio di tipo ambientale** (esposizione a fibre d' asbesto) (Wang et al.,1987; Craighead et al.,1987; Turver et al.,1987):
- **fattori di rischio di tipo virale** (presenza ed espressione della regione precoce virale del genoma di SV40, codificante gli antigeni trasformanti "large T" o Tag e "small t" o tag) (Galateau-Salle et al.,1998, Carbone et al.,1994 e 1997; De Luca et al.,1997);
- **fattori di rischio di tipo cellulare** (attivazione costitutiva di alcuni RTKs).

Nel genoma di alcune linee cellulari continue di mesotelioma esaminate abbiamo potuto mettere in evidenza sequenze del virus **SV40** corrispondenti all'antigene T (**Tag**) e abbiamo dimostrato che esse sono trascrizionalmente attive.

I risultati ottenuti, sia in queste linee cellulari sia nei trasfettanti ottenuti a partire da cellule mesoteliali normali hanno rivelato chiaramente che Tag contribuisce all'attivazione costitutiva del recettore tirosina chinasi **Met** nel modello mesoteliale, mediante l' instaurarsi di un meccanismo autocrino, mediante il quale Met e il suo ligando **HGF** (Hepatocyte Growth Factor) vengono espressi

contemporaneamente nella stessa cellula, che in questo modo risulta auto-stimolata. Altri tumori, per esempio gli osteosarcomi, presentano lo stesso meccanismo (Ferracini et al., 1995).

Nelle cellule mesoteliali esprimenti Tag e nelle linee di mesotelioma SV40 positive è stata dimostrata l'autocrinia HGF/Met, sia mediante saggio biologico della disaggregazione cellulare o "scatter assay", condotto su cellule epiteliali di rene canino che esprimono Met (MDCK), sia mediante RT-PCR. Inoltre, un'ulteriore conferma deriva dal fatto che l'attivazione di Met è stata annullata in seguito ad incubazione con anticorpi bloccanti anti-HGF.

Inoltre, in cellule mesoteliali umane (HMC) trasfettate con il genoma completo di SV40 (SV40-HMC), l'attivazione di Met è risultata associata all'aumento della percentuale di cellule che entrano nella fase S del ciclo cellulare, acquisizione di morfologia fibroblastoide e formazione di virioni completi di SV40. Esperimenti di co-coltura hanno dimostrato inoltre la capacità delle cellule SV40-HMC di infettare cellule permissive di scimmia (CV-1), la linea murina BNL CL e le stesse HMC.

Le cellule umane (HMC) e murine (BNL CL) co-colturate con SV40-HMC sono diventate a loro volta SV40 positive e in esse è stata dimostrata acquisizione di morfologia fibroblastoide, fosforilazione costitutiva in tirosina del recettore Met, ingresso in fase S del ciclo cellulare ed espressione di HGF, mentre la linea CV-1 ha subito lisi completa dopo pochi giorni di infezione. Le cellule mesoteliali co-colturate (HMC-SV40) hanno ereditato l'infettività dalle SV40-HMC, poiché a loro volta sono state capaci di indurre lisi delle cellule CV-1.

Il trattamento delle cellule con il detergente suramina o con gli anticorpi bloccanti anti-HGF ha ridotto l'entità della fosforilazione di Met in tutte le cellule Tag positive e ha parzialmente revertito il fenotipo fibroblastoide delle BNL CL/SV40.

Infine, mediante la trasfezione di **mutanti di Tag (TagRB-HMC**, incapace di legarsi a RB e **Tag2M**, che non può legare né RB né p53), abbiamo dimostrato che l'espressione di HGF è indotta dal legame di Tag a RB, poiché nella linea TagRB-HMC non si osserva né attivazione di Met né espressione di HGF.

Questi dati indicano che l'attivazione di Met e i conseguenti effetti biologici nel nostro modello sono mediati da un circuito autocrino correlato all'espressione di

Tag, che può essere indotto mediante la sola *early region* di SV40. Inoltre, questi risultati potrebbero spiegare come sia possibile che un numero limitato di cellule SV40 positive sia sufficiente per guidare le cellule mesoteliali non infettate verso la trasformazione maligna, innescando un processo a catena, che potrebbe concorrere, insieme all' asbesto, all' induzione della tumorigenesi (Cacciotti et al., 2001).

A questi dati si aggiungono anche quelli ottenuti in collaborazione con il gruppo del Prof. Procopio dell' Università di Chieti, che dimostrano che Tag induce autocrinia anche per la coppia **VEGF-KDR** nelle linee di mesotelioma Tag positive e nelle linee mesoteliali trasfettate con il cDNA di Tag (Cacciotti et al., 2002). Un simile risultato non può che rafforzare l' ipotesi di partenza di una collaborazione tra virus e proto-oncogeni nel MM. Uno schema riassuntivo dei dati ottenuti nel corso del primo anno è illustrato in Fig.1.

## **Secondo anno**

L' attività di ricerca svolta nel secondo anno ha avuto lo scopo prevalente di chiarire i meccanismi di interazione tra il principale fattore di rischio per l'insorgenza di MM, ossia l' esposizione a fibre d'asbesto, e altri presunti fattori di rischio, ossia SV40 e i fattori di crescita frequentemente espressi in questa neoplasia. In particolare, ci è parso interessante studiare il ruolo giocato dai fattori di crescita tipici del mesotelioma rispetto al complesso fenomeno della morte cellulare indotta da asbesto.

Molti lavori hanno dimostrato che **HGF**, a seconda del modello cellulare in cui è implicato, media un effetto di **promozione** (Gohda et al.,1998; Conner et al., 1999; Araraki et al., 1998 and 1999, Wang et al., 2002) o di **protezione da apoptosi** (Bardelli et al.,96; Fan et al.,98; Bowers et al., 2000; Xiao et al., 2001), passando attraverso l'attivazione del suo recettore Met. Pertanto, e' stata nostra intenzione esaminare a fondo le relazioni fra asbesto e SV40 e verificare l'eventuale complementarità o sinergia dei diversi effetti biologici indotti dalla loro interazione.

Nella prima fase dello studio è stata esaminata la tossicità conseguente all'esposizione a fibre d' asbesto, note in letteratura per le loro capacità di indurre

danni a carico del DNA cromosomale, oltre ad altre alterazioni a carico di molecole importanti per le funzioni vitali cellulari (Mossman et al.,1996).

I dati ottenuti su cellule mesoteliali umane hanno dimostrato come la tossicità da asbesto, sensibilmente maggiore di quella indotta dalle fibre di vetro, cresca in corrispondenza dell' aumentare dei tempi di stimolazione e segua una chiara correlazione dose-risposta. Inoltre, la risposta alle fibre è risultata essere molto differente tra linee mesoteliali ottenute da diversi pazienti, suggerendo che, pur esistendo una comune tendenza del mesotelio a subire gli effetti tossici dell'asbesto, esista comunque una non trascurabile variabilità soggettiva nella sensibilità.

Correlazioni dose-risposta e tempo-risposta sono state osservate anche in linee mesoteliali trasfettate (Tag-HMC e SV40-HMC) e nei mesoteliomi da noi esaminati; il dato particolarmente rilevante è che, a parità di stimolazione, le linee Tag positive sono sempre apparse significativamente più protette rispetto ai rispettivi controlli Tag negativi, anche dopo trattamento con sostanze tossiche diverse dall' asbesto. La maggior protezione osservata è stata attribuita in parte ad alcuni domini degli antigeni T (tag e Tag) di SV40, coinvolti in modo più o meno diretto in una riduzione del processo apoptotico (Schump e Waheed, 2001; Foddis et al., 2002; Conzen et al., 1997; Rundell and Parakati, 2001) e in parte è stato dimostrato come essa dipenda dall' espressione di HGF indotta da Tag, da noi precedentemente osservata (Cacciotti et al.,2001).

Infatti, stimolando le linee cellulari a nostra disposizione con fibre d' asbesto (Amosite) o altri agenti ossidanti/non ossidanti e HGF purificato, abbiamo osservato come HGF risulti efficace nel ridurre la citotossicità e come tale riduzione sia sensibilmente più significativa nelle linee Tag negative. L'esame al citofluorimetro ha inoltre permesso di osservare che la componente prevalente di mortalità che si riduce in presenza di HGF è quella apoptotica.

Per confermare ulteriormente il ruolo giocato da HGF nella protezione da apoptosi, abbiamo confrontato al citofluorimetro la linea Tag-HMC con la linea mutante TagRB-HMC, che non esprime HGF, e abbiamo osservato che la seconda mostra una maggior tendenza ad andare in apoptosi e che, bloccando l' attività di

HGF espresso da Tag-HMC con anticorpi bloccanti specifici, l'apoptosi cresce fino a valori confrontabili con quelli misurati nella linea mutante.

Successivamente, l'analisi mediante western blotting condotta sulle nostre linee ha chiaramente rivelato come i trasduttori del segnale Akt, ERK1 e ERK2 (MAPK), spesso implicati nella protezione da apoptosi, siano molto più fosforilati nelle linee Tag positive e come tale fosforilazione sia legata alla stimolazione con HGF. Inoltre, esperimenti condotti in presenza di appositi inibitori (Wortmannina per la via di PI3K e PD98059 per la via delle MAPK) hanno rivelato che nel modello mesoteliale e nei mesoteliomi sembra essere importante ai fini della riduzione HGF-dipendente di apoptosi la via della PI3K/Akt, mentre quella delle MAPK non pare essere coinvolta in modo significativo.

Abbiamo infine riprodotto una situazione di esposizione cronica, simile a quella che potrebbe indurre in vivo una graduale trasformazione maligna del mesotelio. In seguito a trattamento a lungo termine e a basso dosaggio con fibre d'amosite, abbiamo osservato, dopo due mesi dall'inizio del trattamento, la comparsa di foci nelle cellule SV40-HMC, oltre ad un brusco cambiamento morfologico di alcune cellule, apparse ingrossate e polipoidi rispetto a quelle non trattate. Da un esame al citofluorimetro, è apparsa una sottopopolazione cellulare distinta da quella di origine, composta in buona parte da cellule prima arrestate nella fase G<sub>2</sub>/M del ciclo cellulare, poi spostate in fase S. Inoltre, esaminando la tossicità da asbesto a vari tempi dall'inizio della stimolazione prolungata, si è osservata una progressiva riduzione nel tempo della tossicità da asbesto, a conferma della "selezione clonale" ottenuta.

Uno schema riassuntivo di questi risultati è illustrato in Fig.2.

### **Terzo anno**

Nel corso del terzo anno, abbiamo caratterizzato ulteriormente le cellule derivanti dai foci di trasformazione della linea trasfettata SV40-HMC (**SV40-HMC F**), ottenuti a distanza di due mesi dall'esposizione ad un basso dosaggio di fibre di amosite.

L'incorporazione di BrdU nel DNA neosintetizzato è risultata nettamente superiore in queste cellule rispetto a cellule mesoteliali non esposte a fibre sia

SV40 negative (HMC) sia SV40 positive (SV40-HMC), a conferma del dato di ciclo cellulare ottenuto precedentemente (Fig. 3A). Inoltre, a conferma dell' avvenuta trasformazione, le cellule SV40-HMC F si sono rivelate in grado di crescere in basso siero (2%) per più di due settimane, a differenza delle cellule di partenza non esposte alle fibre.

E' stato inoltre interessante osservare come le cellule SV40-HMC F, benché dotate di attivazione costitutiva di Met e del trasduttore Akt (Fig. 3B), si siano progressivamente "sganciate" da HGF per quanto riguarda la protezione da citotossicità (Fig. 3C). Questo dato, insieme all' osservazione che nei Mesoteliomi SV40-positivi l' impiego di anticorpi bloccanti anti-HGF non è più in grado di aumentare la sensibilità alla citotossicità da asbesto, ci ha suggerito che HGF giochi un ruolo importante solo nei primi stadi della trasformazione, cioè finché le cellule mesoteliali non vanno incontro a perdita dei normali meccanismi di controllo del ciclo cellulare. In questo stadio più avanzato della trasformazione, resta invece sempre indispensabile la via della PI3K/Akt per contrastare la morte cellulare.

Inoltre per comprendere i meccanismi alla base della ridotta citotossicità mediata dalla via di PI3K/Akt da noi osservata nel modello mesoteliale e nei mesoteliomi, abbiamo esaminato tipici marcatori di apoptosi, quali l'attività caspatica, l'espressione di Bcl-2, di Bax e l'espressione del "death-receptor" CD95, noto per il suo importante ruolo nel processo apoptotico, alla luce di dati ottenuti nella linea MCF-7, che hanno mostrato come la infezione da SV40 sia correlata ad una mancanza di up-regulation di CD95 conseguente all'esposizione a stimoli apoptotici (Sheard et al., 2002).

In seguito a trattamento con etoposide (VP16), abbiamo osservato al citofluorimetro un significativo incremento di attività pan-caspasica in cellule mesoteliali (HMC) e di mesotelioma SV40 negative (MMB), mentre questo effetto non è stato praticamente osservato in cellule SV40-HMC e nel mesotelioma SV40-positivo MMCa. L'aggiunta di HGF in simultanea al VP16 ha inoltre indotto una cospicua riduzione dell' attività caspatica nelle HMC e nelle MMB.

Consistentemente con l'attivazione di Akt conseguente alla stimolazione con HGF, l'aggiunta di Wortmannina, inibitore della PI3K, ha portato ad un grosso incremento dell' attività caspatica in cellule SV40-HMC e MMCa, entrambe

esperimenti HGF. Infine, il trattamento combinato con HGF e Wortmannina ha innalzato nuovamente l'attività caspatica in cellule HMC e MMB.

Mediante esperimenti analoghi, abbiamo esaminato al citofluorimetro l'espressione del recettore del Fas Ligand, CD95. In seguito a trattamento con VP16, l'espressione di CD95 è salita in cellule HMC e MMB a livelli significativamente superiori rispetto a quelli osservati in cellule SV40-HMC e MMCa. L'aggiunta di HGF ha invece indotto una forte riduzione dell'espressione di CD95 nelle cellule SV40-negative, benché in misura diversa nelle HMC e nelle MMB.

Inoltre, il trattamento con Wortmannina di cellule SV40-positive ha indotto un cospicuo aumento di espressione di CD95, che è stato ripristinato in cellule SV40-negative mediante aggiunta in simultanea di HGF e Wortmannina.

Complessivamente questi risultati dimostrano che la via di PI3K/Akt inibisce l'aumento di attività caspatica e di espressione di CD95 conseguenti all'esposizione ad agenti tossici e forniscono almeno in parte una spiegazione dei meccanismi alla base dell'effetto anti-apoptotico da noi osservato.

L'espressione di Bcl-2 e Bax non ha invece subito modifiche sostanziali nelle stesse condizioni sperimentali, a conferma di studi precedenti che hanno mostrato come Bcl-2 abbia un ruolo secondario nella regolazione dell'apoptosi nei mesoteliomi (Soini et al., 1999). I risultati ottenuti sui marcatori di apoptosi sono schematicamente rappresentati in Fig. 4.

Infine, sono state messe a confronto fibre d'asbesto, note da tempo per la loro capacità trasformante (crisotilo, crocidolite, amosite), con fibre asbestiformi meno note, ma indubbiamente correlate al Mesotelioma Maligno Pleurico, vista l'alta incidenza di questa neoplasia tra i soggetti venuti a contatto con questi minerali per motivi lavorativi o semplicemente per esposizione ambientale. Abbiamo esaminato gli effetti dell'esposizione a breve e lungo termine su cellule mesoteliali umane, studiando la citotossicità delle fibre, la neosintesi di DNA conseguente all'esposizione alle stesse nonché le alterazioni a carico del ciclo cellulare.

Le **fibre di Fluoroedenite** o Biancavilla sono fibre d'asbesto appartenenti al gruppo mineralogico degli anfiboli, che abbondano nel comune di Biancavilla in provincia di Catania, dove numerosi casi di Mesotelioma Pleurico sono stati



registrati. Le **fibre di Erionite** appartengono mineralogicamente al gruppo delle Zeoliti. La Zeolite è un minerale appartenente agli alluminosilicati di tipo fibroso, simile per morfologia e proprietà all' Asbesto, benché il suo contenuto in Ferro sia decisamente più ridotto di quest' ultimo tipo di fibre. Può essere ottenuta sinteticamente ma si trova anche in natura in forme sia altamente dannose per la salute umana (Erionite) sia essenzialmente inerti (Mordente) (Fach et al., 2002). In particolare, l'alta incidenza di MM pleurico in alcuni villaggi della Cappadocia (Turchia) sembra essere strettamente correlata all'esposizione ambientale alle fibre di Erionite benché la cooperazione con altri fattori di rischio sia stata ipotizzata (Dumortier et al., 2001; Olut et al., 2000). La capacità dell' Erionite di indurre lesioni tumorali simili a quelle osservate nell' uomo è stata dimostrata nei ratti in seguito a inalazione (Johnson 1992) e iniezione intraperitoneale (Davis et al., 1991) o intrapleurica (Edwards et al., 1990)

Gli effetti dannosi delle fibre di Erionite sono presumibilmente dovuti al danno ossidativo esercitato sulle cellule mesoteliali, in modo del tutto analogo a quello osservato in seguito a trattamento con fibre d' Asbesto (Zoller and Zeller, 2000). Tuttavia è stato dimostrato che in cellule esposte all'Erionite la proliferazione e/o la riparazione di DNA mutato prevalgono, a parità di dosaggio, sul processo apoptotico, a differenza di quanto osservato dopo trattamento con Asbesto capace di indurre prevalentemente morte cellulare (Timblin et al., 1998). Questo spiegherebbe come mai la carcinogenicità dell' Erionite sia di oltre 200 volte maggiore in termini di dose-risposta rispetto alle fibre di Asbesto blu (Crocidolite) (Hill et al., 1992).

Abbiamo dimostrato che indipendentemente dal tipo di fibre usate la tossicità è dose-dipendente, benché superiore, a parità di dosaggio, con l'amosite e la biancavilla e che la neosintesi di DNA dopo esposizione per breve tempo (24 h) è maggiore dopo esposizione alle fibre di amosite, biancavilla ed Erionite turca.

In particolare, è emerso che a parità di dosaggio la neosintesi di DNA è quasi sempre l' effetto prevalente, soprattutto dopo esposizione ad amosite ed Erionite turca, impiegate a bassissimo dosaggio (Fig. 5A). In Western blotting abbiamo osservato una attivazione di jnk dovuta presumibilmente allo stress ossidativo da esposizione alle fibre e fosforilazione di Erk1 e 2 sostenuta fino a 24 h solo dopo

trattamento con fibre di Erionite ma non di asbesto (Fig. 5B). Curve di crescita hanno inoltre mostrato come solo le fibre di Erionite abbiano effetti significativi sulla proliferazione (Fig. 5C), segno che l'effetto prevalente indotto da un'esposizione breve ad asbesto come quella da noi testata è una compensazione ottenuta attraverso la sintesi di nuovo DNA delle mutazioni provocate dalle fibre sui cromosomi, piuttosto che un vero effetto proliferativo. Al contrario l'esposizione breve ad Erionite sembrerebbe sufficiente per innescare i primi meccanismi di trasformazione nella cellula mesoteliale.

Abbiamo poi eseguito un trattamento prolungato a basso dosaggio delle cellule mesoteliali con fibre di Erionite o Asbesto (2 cicli da 72 ore a  $0.4 \text{ ug/cm}^2$ ) allo scopo di riprodurre una sorta di esposizione "cronica". A distanza di due mesi abbiamo verificato mediante saggio di formazione di foci la capacità trasformante delle fibre. Abbiamo osservato la comparsa di foci di trasformazione solo in cellule mesoteliali esposte a fibre di Erionite del tipo sia turco sia americano, mentre nessun focus si è osservato dopo esposizione a fibre di vetro e asbesto (crisotilo, fluoroedenite e amosite) ((Fig. 6). Il pool dei foci è stato quindi caratterizzato ed è emerso che la ciclina E e la ciclina  $D_1$ , che normalmente raggiungono un picco di espressione nelle cellule che vanno in fase S, sono up-regolate nei lisati delle cellule appartenenti ai foci rispetto al mesotelio di controllo (Fig. 7A). Coerentemente con questi risultati, sono stati osservati cambiamenti significativi a livello del ciclo cellulare, con aumento delle transizioni  $G_1/S$  e  $G_2/M$ . Queste cellule tra l'altro si sono rivelate capaci di crescere in basso siero (2%) a conferma della loro potenzialità trasformante.

La caratterizzazione dei foci prodotti dalle fibre di Erionite è proseguita andando a valutare l'attivazione di alcune importanti molecole effettrici (Akt, ERK2 e il fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B) che sono risultate significativamente più fosforilate rispetto alle cellule mesoteliali di controllo (Fig. 7A). Infine sono state esaminate la risposta citotossica (Fig. 7B) e l'attività caspatica (Fig. 7C) delle cellule dei foci in seguito a trattamento con  $100 \text{ }\mu\text{M}$  VP16, noto agente apoptogeno. Questi esperimenti ci hanno consentito di concludere che le cellule dei foci sono di gran lunga più resistenti a stimoli apoptotici delle cellule mesoteliali da cui si sono originati. Questi dati fanno ipotizzare che queste cellule possiedano potenzialità

tumorigeniche *in vivo*, che andranno successivamente verificate in esperimenti di inoculo in topi nudi delle medesime cellule amplificate.

### **Quarto anno**

I nostri dati e quelli ottenuti da altri gruppi ci hanno indotto ad ipotizzare che gli antigeni tag e Tag di SV40 possano influenzare in modo diretto o indiretto lo stato di fosforilazione di importanti prodotti di proto-oncogeni, contribuendo in modo significativo alla trasformazione indotta dalle fibre di asbesto. Pertanto, il lavoro del quarto anno è stato indirizzato allo studio del diverso pattern di fosforilazione in tirosina osservabile in cellule mesoteliali e di mesotelioma SV40 positive e SV40 negative.

Questa indagine, utile a chiarire ulteriormente quali siano i meccanismi di tumorigenesi indotta da SV40, è avvenuta mediante l'uso di tecniche di proteomica, apprese durante uno stage nel Laboratorio del Dr. Garry Corthals presso il BPRG (Biomedical Proteomics Research Group) dell'Ospedale Cantonale di Ginevra.

## **RISULTATI**

### **Analisi di standard commerciali fosforilati mediante Spettrometria di Massa**

La prima fase del lavoro è stata volta alla messa a punto della metodica ottimale per l'analisi mediante spettrometria di massa di proteine fosforilate. L'analisi è stata condotta su standard commerciali purificati provvisti di residui di Serina fosforilati in posizione già nota. Nel dettaglio, abbiamo utilizzato le molecole di fosfo-ovalbumina di pollo e di fosfo-beta caseina umana risospese in acqua immediatamente prima dell'elettroforesi su gel monodimensionale di acrilamide-30,8% PDA.

La presenza delle proteine (1 ug caricato in ogni lane del gel) è stata rivelata mediante la colorazione CBB (Comassie Brilliant Blue). Le bande di interesse sono state escisse da gel per esser poi decolorate onde evitare interferenze del Comassie con l'analisi in massa. In seguito alle procedure di riduzione dei ponti

disolfuro con DTT (ditiotreitolo) e di alchilazione con IAA (iodoacetamide), entrambe modificazioni favorevoli l'analisi successiva, è stata eseguita una digestione con tripsina in gel, ossia si è aggiunta la tripsina direttamente alla banda escissa per consentire la digestione enzimatica della proteina contenuta. I peptidi ottenuti dalla frammentazione triptica in corrispondenza dei legami peptidici coinvolgenti residui basici di lisina o arginina sono stati infine estratti dal gel con TFA (acido trifluoroacetico) e con CH<sub>3</sub>CN (acetonitrile) capaci di neutralizzare la residua attività della tripsina, di estrarre i peptidi sia idrofobici sia idrofilici e infine di desalificare i campioni (Fig. 8).

### **Analisi in MALDI-MS-TOF**

La prima analisi è stata condotta in MALDI-MS-TOF ossia lavorando sul campione co-cristallizzato su supporto metallico con una matrice capace di potenziare il processo di ionizzazione prodotta dal laser. Nel MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) ogni sparo del laser genera in presenza di un alto voltaggio (+20 kV) e di vuoto spinto ( $10^{-5}$ – $10^{-8}$  Torr) sublimazione dei cristalli di matrice-analita e la loro ionizzazione. Gli ioni vengono sbalzati dalla superficie metallica a cui è stato applicato l'alto voltaggio e accelerati in un tubo fino al raggiungimento di un analizzatore in un tempo di "volo" (TOF=Time of Flight) direttamente proporzionale alla loro massa che coincide con il rapporto m/z (massa/carica), in quanto gli ioni prodotti dal MALDI sono sempre monocarica (Fathi et al., 2003).

Lo spettro prodotto dagli ioni è un grafico che riporta in ascissa il rapporto m/z e in ordinata l'intensità di ogni picco corrispondente ad ogni specie ionica prodotta dal laser. Mediante opportuni software è possibile ricavare l'intera serie dei valori m/z presenti nello spettro e confrontarli con quelli di spettri prodotti da proteine note sottoposte a digestione virtuale con tripsina, in modo da risalire alla natura dell'analita e persino ad eventuali modificazioni come le fosforilazioni, le glicosilazioni e così via.

Se infatti ad esempio vengono trovati nello stesso spettro due picchi con differenza m/z pari a 80 Da, questo significa che presumibilmente i due picchi corrispondono allo stesso peptide e che quello che pesa 80 Da in più contiene un

gruppo fosfato. Questi shift di massa caratteristici consentono di individuare altre particolari modificazioni in modo del tutto analogo. Uno schema del MALDI-MS-TOF e di un tipico spettro da esso prodotto è mostrato in Fig. 9.

I nostri campioni sono stati co-cristallizzati immediatamente prima dell'analisi con la matrice 4HCCA (acido alfa-ciano-4-idrossibenzoico) contenente un anello aromatico capace di assorbire l'energia contenuta negli UV del laser. Il risultato ottenuto è stato migliore per l'ovalbumina che per la beta-caseina per quanto riguarda il numero dei peptidi identificati e quindi il punteggio corrispondente alla significatività del risultato, anche se entrambe le proteine sono state identificate in modo significativo.

Per quanto riguarda le fosforilazioni, erano previste per la beta-caseina 5 serine fosforilate di cui 4 molto ravvicinate (S30,S32,S33,S34) e pertanto concentrate sullo stesso peptide ottenuto dal taglio con la tripsina e per la ovalbumina 4 serine fosforilate di cui 2 (S236 e S240) sullo stesso peptide (Fig. 10). Abbiamo osservato nello spettro di entrambi gli analiti solo i picchi fosforilati corrispondenti ai peptidi contenenti non più di una serina fosforilata, confermando una difficoltà generalmente riscontrata nell'individuare i peptidi pluri-fosforilati.

I risultati ottenuti con l'ovalbumina sono riportati in Tab.1, quelli ottenuti con la beta-caseina in Tab.2.

### **Analisi mediante LC-MS/MS**

L'analisi in MALDI-TOF ha il vantaggio della relativa rapidità nell'identificazione degli analiti ma l'analisi mediante LCQ (Liquid Chromatography Quadrupole) è molto più informativa perché gli ioni prodotti a partire dal campione sottoposto ad HPLC sono sia mono sia multicarica e sono prodotti in continuo sotto forma di spray (Fathi et al., 2003). Inoltre è possibile "catturare" in una trappola ionica ioni aventi un particolare rapporto m/z selezionato ed eseguire dopo la prima analisi in massa una successiva frammentazione di questi stessi ioni per ottenere uno spettro MS/MS, da cui è possibile risalire all'esatta sequenza del peptide frammentato. L'analisi con questo strumento è stata pertanto eseguita più che altro in vista di dover identificare non soltanto i peptidi fosforilati ma anche, attraverso un'analisi di sequenza, gli eventuali residui portatori della modificazione.

Anche in questo caso abbiamo ottenuto un riconoscimento significativo degli analiti ed è stato possibile anche se solo per la beta caseina identificare oltre ai peptidi monofosforilati anche un peptide contenente ben 4 serine fosforilate.

I risultati ottenuti sono illustrati in Tab.1-2 da cui risulta anche un confronto tra i dati ottenuti in MALDI-MS-TOF e quelli con l'LCQ.

### **Arricchimento su colonne IMAC di fosfopeptidi**

In previsione delle basse concentrazioni dei peptidi fosforilati nei campioni da analizzare successivamente, abbiamo cercato di mettere a punto una metodica di arricchimento di fosfopeptidi basata sull'utilizzo di colonne contenenti una resina (Poros) attivata con ioni  $Fe^{3+}$  (colonne IMAC: Immobilized Metal Affinity Chromatography) aventi un' altissima affinità per i gruppi fosfato dei fosfopeptidi carichi negativamente. In questo caso i campioni sono stati direttamente iniettati nelle colonne IMAC attivate per consentire l' arricchimento e l' eluato è stato analizzato con l'LCQ. In questo caso, le proteine sono state identificate ma purtroppo i peptidi riconosciuti non corrispondevano a peptidi fosforilati, segno che la cromatografia di affinità non ha funzionato presumibilmente perché i tempi di ritenzione in colonna dell' analita a contatto con gli ioni  $Fe^{3+}$  sono stati troppo limitati. L'analisi su colonne di calibro maggiore attivabili con più ioni  $Fe^{3+}$  non è stata eseguita per mancanza di tempo, anche se presumibilmente i risultati sarebbero stati più soddisfacenti (Salomon et al., 2003).

### **Preparazione degli estratti di cellule SV40 positive e negative**

Cellule di mesotelioma SV40 positive e negative cresciute in assenza di siero per 24 ore sono state sottoposte a lisi in tampone Ripa in presenza di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi e successivamente a immunoprecipitazione con Sepharose-Proteina G accoppiata ad anticorpi monoclonali anti-fosfotirosina (4G10, UBI) già utilizzati in lavori analoghi di analisi in massa di fosfoproteine (Ficarro et al., 2002). Il principale problema riscontrato è stata la limitata disponibilità di proteine immunoprecipitate e quindi un basso segnale corrispondente a fosfoproteine rivelato dalla colorazione in Comassie. Ciò ha reso impossibile l' escissione delle bande da gel per svolgere l' analisi vera e propria

benchè sia comunque evidente l' esistenza di differenze nel pattern di fosforilazione in tirosina tra cellule di mesotelioma SV40 negative e positive (Fig. 11).

Un basso livello di fosforilazione in tirosina dopo immunoprecipitazione è stato riscontrato anche su cellule mesoteliali SV40 positive, nonostante in questo caso si sia partiti da una quantità di proteine nel lisato superiore a quella delle analisi precedenti.

In conclusione, le metodiche apprese si sono rivelate utili allo studio dei problemi di fosforilazione o altre modificazioni a carico di proteine, ma insufficienti per ricavare dei dati su campioni poco concentrati. Questo limite all' indagine si presenta in particolare quando si vogliono individuare fosforilazioni in Tirosina che interessano solo lo 0.1% circa delle proteine totali cellulari a differenza delle ben più comuni fosforilazioni in Serina e Treonina (Ficarro et al., 2002), facilmente riscontrate anche negli standard commerciali a nostra disposizione

## **BIBLIOGRAFIA**

- Aaronson, S.A. (1991) Growth Factors and Cancer. *Science* 25, 1146-1152
- Arakaki, N., Kajihara, T., Arakaki, R., Ohnishi, T., Kazi, J.A., Nakashima, H., Daikuhara, Y. (1999) Involvement of oxidative stress in tumor cytotoxic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor. *J Biol Chem* 274, 13541-6
- Arakaki, N., Kazi, J.A., Kazihara, T., Ohnishi, T., Daikuhara, Y. (1998) Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the apoptosis signaling pathway by increasing caspase-3 activity in sarcoma 180 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 211-5
- Bardelli, A., Longati, P., Albero, D., Goruppi, S., Schneider, C., Ponzetto, C., Comoglio, P.M. (1996) HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J* 15, 6205-12
- Bowers, D.C., Fan, S., Walter, K.A., Abounader, R., Williams, J.A., Rosen, E.M., Laterra, J. (2000) Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathways. *Cancer Res* 60, 4277-83
- Butel, J.S. (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis.*, 21, 405-426.
- Cacciotti, P., Libener, R., Betta, P.G., Martini, F., Porta, C., Procopio, A., Strizzi, L., Penengo, L., Tognon, M., Mutti, L. and Gaudino, G. (2001) SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: a model for viral-

related carcinogenesis of human malignant mesothelioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12032-12037

- Cacciotti, P., Strizzi, L., Gaudino, G., Tognon, M., Libener, R., Porta, C., Vianale, G., Mutti, L. and Procopio, A. (2002) The presence of Simian-virus 40 sequences in normal or malignant mesothelial cells is associated with high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 189-93
- Carbone, M. *et al.* (1994) Simian virus 40-like sequences in human pleural mesothelioma. *Oncogene* 9, 1781-1790
- Carbone, M., Rizzo, P., Grimley, P.M., Procopio, A., Mew, D.J.Y., Shridhar, V., De Bartolomeis, A., Esposito, V., Giuliano, M.T., Steinberg, S.M., Levine, A.S., Giordano, A., Pass, H.I. (1997) Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nature Medicine* 3, 908-912
- Conner, E.A., Teramoto, T., Wirth, P.J., Kiss, A., Garfield, S., Thorgeirsson, S.S. (1999) HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1. *Carcinogenesis* 20, 583-90
- Conzen, S.D., Snay, C.A., Cole, C.N. *J Virol* 1997 Jun;71(6):4536-43 Identification of a novel antiapoptotic functional domain in simian virus 40 large T antigen.
- Craighead, J.E. (1987) Current pathogenic concepts of diffuse malignant mesothelioma. *Human Pathol.* 18, 544-547
- Davis JM, Bolton RE, Miller BG, Niven K. Mesothelioma dose response following intraperitoneal injection of mineral fibres. *Int J Exp Pathol.* 1991 Jun;72(3):263-74.
- De Luca, A., Baldi, A., Esposito, V., Howard, C.M., Bagella, L., Rizzo, P., Caputi, M., Pass, H.I., Giordano, G.G., Baldi, F., Carbone, M., Giordano, A. (1997) The retinoblastoma gene family pRb/p105, p107, pRb2/p130 and simian virus-40 large T-antigen in human mesotheliomas. *Nature Medicine* 3, 913-916
- Dumortier P, Coplu L, Broucke I, Emri S, Selcuk T, de Maertelaer V, De Vuyst P, Baris I. Erionite bodies and fibres in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of residents from Tuzkoy, Cappadocia, Turkey. *Occup Environ Med.* 2001 Apr;58(4):261-6.
- Edwards RE, Hill RJ, Brown DG, Carthew P. *Br J Cancer.* Phenotypic stability and metastatic behaviour of serially xenografted rat mesotheliomas. 1990 Aug;62(2):201-4.
- Fach E, Waldman WJ, Williams M, Long J, Meister RK, Dutta PK. Analysis of the biological and chemical reactivity of zeolite-based aluminosilicate fibers and particulates. *Environ Health Perspect.* 2002 Nov;110(11):1087-96.
- Fan, S., Wang, J.A., Yuan, R.Q., Rockwell, S., Andres, J., Zlatapolskiy, A., Goldberg, I.D., Rosen, E.M. (1998) Scatter factor protects epithelial and carcinoma cells against apoptosis induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* 17,131-41
- Fathi, M., Corthals, G., Hochstrasser, D. (2003) Mass spectrometry in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med.* 41(12):1539.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., White, F.M. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol.* 20(3):301-5.



- Ferracini, R., Di Renzo, M.F., Scotlandi, K., Baldini, N., Olivero, M., Lollini, P., Cremona, O., Campanacci, M., Comoglio, P.M. (1995) The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10, 739-749
- Foddis, R., De Rienzo, A., Broccoli, D., Bocchetta, M., Stekala, E., Rizzo, P., Tosolini, A., Grobelny, J.V., Jhanwar, S.C., Pass, H.I., Testa, J.R., Carbone, M. (2002) SV40 infection induces telomerase activity in human mesothelial cells. *Oncogene* 21, 1434-42
- Galateau-Salle, F., Bidet, P., Iwatsubo, Y., Gennetay, E., Renier, A., Letourneux, M., Pairon, J.C., Moritz, S., Brochard, P., Jaurand, M.C., Freymuth, F. (1998) SV40-like DNA sequences in pleural mesothelioma, bronchopulmonary carcinoma, and non-malignant pulmonary diseases. *J. Pathol.* 184, 252-257
- Gohda, E., Okauchi, H., Iwao, M., Yamamoto, I. (1998) Induction of apoptosis by hepatocyte growth factor/scatter factor and its augmentation by phorbol esters in Meth A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 278-83
- Hill RJ, Edwards RE, Carthew P. Early changes in the pleural mesothelium following intrapleural inoculation of the mineral fibre Erionite and the subsequent development of mesotheliomas. *J Exp Pathol (Oxford)*. 1990 Feb;71(1):105-18.
- Johnson NF. The utility of animal inhalation studies to assess the risk of mineral fiber-induced pulmonary cancer. *Prog Clin Biol Res*. 1992;374:19-36.
- Mossman, B.T., Kamp, D.W., Weitzman, S.A. (1996) Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers. *Cancer Invest* 14, 466-80
- Olut A, Firat P, Ertugrul D, Gungen Y, Emri S. Ras oncoprotein expression in Erionite- and asbestos-induced Turkish malignant pleural mesothelioma patients--a pilot study. *Respir Med*. 2001 Aug;95(8):697-8.
- Parkin, D.M., Pisani, P., Munoz, N. and Ferlay, J. (1999) The global health burden of infection associated cancers. *Cancer Surv.* 33, 5-33.
- Patologia Sistemica e Generale; McGraw-Hill. Rubin, E., Farber, J.L. McGraw-Hill
- Rundell, K. and Parakati, R. (2001) The role of the SV40 ST antigen in cell growth promotion and transformation. *Semin Cancer Biol.* 11, 5-13. Review.
- Salomon, A.R., Ficarro, S.B., Brill, L.M., Brinker, A., Phung, Q.T., Ericson, C., Sauer, K., Brock, A., Horn, D.M., Schultz, P.G., Peters, E.C. (2003) Profiling of tyrosine phosphorylation pathways in human cells using mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(2), 443-8.
- Schrupp, D.S., Waheed, I. (2001) Strategies to circumvent SV40 oncoprotein expression in malignant pleural mesotheliomas. *Semin Cancer Biol* 11, 73-80
- Sheard MA, Vojtesek B. (2002) Simian virus-40 infection inhibits DNA damage-induced enhancement of CD95 expression and function. *Oncogene* 21, 190-7
- Soini, Y., Kinnula, V., Kaarteenaho-Wiik, R., Kurttila, E., Linnainmaa, K., Paakko, P. (1999) Apoptosis and expression of apoptosis regulating proteins bcl-2, mcl-1, bcl-X, and bax in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 5(11), 3508-15.
- Timblin CR, Guthrie GD, Janssen YW, Walsh ES, Vacek P, Mossman BT. Patterns of c-fos and c-jun proto-oncogene expression, apoptosis, and proliferation in rat

- pleural mesothelial cells exposed to Erionite or asbestos fibers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998 Jul;151(1):88-97.
- Turver, C.J., Brown, R.C. (1987) The role of catalytic iron in asbestos induced lipid peroxidation and DNA-strand breakage in C3H10T1/2 cells. *Br. J. Cancer* 56,133-136
  - Wang, N.S., Jaurand, M.C., Magne, L., Kheuang, L., Pinchon, M.C., Bignon, J. (1987) The interactions between asbestos fibers and metaphase chromosomes of rat pleural mesothelial cells in culture. A scanning and transmission electron microscopy study. *Am. J. Pathol.* 126, 343-349
  - Wang, X., DeFrances, M.C., Dai, Y., Padiaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G.K., Zarnegar, R. (2002) A Mechanism of Cell Survival. Sequestration of Fas by the HGF Receptor Met. *Mol. Cell.* 9:411-21
  - Xiao, G.H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Vande Woude, G.F., Testa, J.R. (2001) Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 247-252
  - Zoller ,T., Zeller, W.J. (2000) Production of reactive oxygen species by phagocytic cells after exposure to glass wool and stone wool fibres - effect of fibre preincubation in aqueous solution. *Toxicol Lett.* 114(1-3):1-9.

## **ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA**

- Stage di proteomica e spettrometria di massa presso il BPRG (Biomedical Proteomics Research Group) di Ginevra sotto la guida del Dr. Garry Corthals (ottobre 2003-marzo 2004).
- Corso di Statistica tenuto dal Prof. Magnani (lezioni fino a fine settembre 2003)
- Seminari interni al Dipartimento di Scienze Mediche (da aprile 2004):

20-5-04: Alberto Martini - Le artriti croniche del bambino

28-5-04: Angiolo Benedetti - Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico

11-6-04: Antonio Puccetti - Virus e malattie autoimmuni

14-6-04: David Murphy - Microarray e diagnostica in medicina

14-6-04: Cristopher Day – Pitfalls of genetic studies in liver disease

15-6-04: David Murphy - Modelli transgenici di topo/ratto e applicazioni

29-6-04: Emilio Hirsch - La fosfatidil-inositolo 3-cinasi-g regola la contrattilità e l'ipertrofia cardiaca mediante funzioni dipendenti e indipendenti dalla attività lipide-cinasi

5-7-04: Armando Bartolazzi – From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions

7-7-04: Martin Ronis - Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy

## **PUBBLICAZIONI**

- Miniero, R., Tardivo, I., De Simone, M., Gubetta, .L., Orecchia, S., **Cacciotti, P.**, Gorzegno, G. (2003) Abdominal malignant mesothelioma following autologous bone marrow transplantation: a case report. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **20(8)**, 583-8.
- Sigalotti, L., Coral, S., Altomonte, M., Natali, L., Gaudino, G., **Cacciotti, P.**, Libener, R., Coalizzi, F., Vianale, G., Martini, F., Tognon, M., Jungbluth, A., Cebon, J., Maraskoysky, E., Mutti, L., Maio, M. (2002) Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br J Cancer* **86(6)**, 979-82.
- **Cacciotti, P.**, Strizzi, L., Gaudino, G., Tognon, M., Libener, R., Porta, C., Vianale, G., Mutti, L. and Procopio, A. (2002) The presence of Simian-virus 40 sequences in normal or malignant mesothelial cells is associated with high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 189-193
- **Cacciotti, P.**, Libener, R., Betta, P.G., Martini, F., Porta, C., Procopio, A., Strizzi, L., Penengo, L., Tognon, M., Mutti, L. and Gaudino, G. (2001) SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: a model for viral-related carcinogenesis of human malignant mesothelioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12032-12037