

- Capitolo 3 -

MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari.

Le cellule di MM sono state ricavate mediante centrifugazione a 1500 rpm dell' essudato pleurico di pazienti affetti dalla neoplasia, mentre le cellule mesoteliali umane (HMC) sono state ottenute dall' essudato pleurico di tre diversi pazienti affetti da danno cardiaco e con nessuna storia di patologie maligne. L' origine mesoteliale delle cellule isolate è stata confermata mediante positività alla marcatura immunostochimica con anticorpi diretti verso citocheratina, vimentina e calretinina e assenza di marcatori epiteliali come il CEA (antigene carcinoembrionario), Leu-M1 e B72.3 (Orengo *et al.*, 1999). Le HMC, essendo cellule primarie, sono state utilizzate solo fino al sesto passaggio, prima che andassero incontro a quiescenza.

Tutte le altre linee cellulari sono state ottenute dalla ATCC (American Type Culture Collection).

Le cellule sono state coltivate nei terreni *DMEM*, *RPMI 1640* e *HAM'S-F12* (usato per le cellule di MM), arricchiti di 10-15% siero fetale bovino (FBS-Gibco), 1% glutammina, 1% penicillina/streptomina e 0.1% fungizone (Sigma). La temperatura dell' incubatore è stata mantenuta costantemente a 37° C, in un' atmosfera satura di vapore acqueo e ad una concentrazione di CO₂ pari al 5%.

I **trasfettanti** sono stati ottenuti usando il composto policationico Superfect (Qiagen) ed eseguendo una selezione successiva in terreno di coltura contenente 0.8 mg/ml di neomicina (G418-solfato, Gibco). Sono stati trasfettati il DNA genomico completo di SV40, il plasmide ricombinante pSV3neo in cui è inserito il cDNA di Tag e il plasmide vuoto pSV2neo come controllo negativo. I trasfettanti contenenti i mutanti difettivi di Tag (TagM e Tag2M, meglio illustrati nella parte sperimentale) sono stati ottenuti subclonando nel plasmide pZeoSV2 i relativi costrutti derivati da mutagenesi sitospecifica e selezionando i cloni stabilmente

trasfettati con Zeocina (Invitrogen). Gli stabili ottenuti sono stati testati in immunoblotting con anticorpi anti-Tag monoclonali (Ab-1; Oncogene Science).

Le **co-culture** sono state eseguite in *Transwell*® (Costar), piastrando le SV40-HMC nella camera posta sopra ad una membrana porosa di policarbonato (diametro dei pori: 8 µm) e le *cellule bersaglio* nella camera inferiore.

3.2 Fibre d' asbesto e asbestiformi.

Le fibre di erionite (Karain-Turchia e Oregon-USA fornite dal Dr. Skidmore), di fluoro-edenite, di amosite e crisotilo (campioni UICC) e di vetro sono state idratate in PBS in concentrazione pari a 2 mg/ml, triturate 8 volte con una siringa e sterilizzate in autoclave.

Il campione di erionite-Karain contiene una percentuale pari al 25-30% di materiale fibroso, quello statunitense è invece quasi totalmente composto da particelle fibrose. L' analisi morfologica e dimensionale delle fibre al microscopio a contrasto di fase è stata condotta montando in triacetina su vetrino piccoli campioni di fibre. La distribuzione dimensionale dei campioni UICC di amosite e crisotilo è stata invece presa dai dati di Kohyama *et al.*, 1996.

3.3 PCR e RT-PCR.

Un frammento da 172 bp, corrispondente ad una regione dell' *early region* di SV40 (nn. 4402-4574) distinta da quelle dei virus omologhi JCV e BKV, è stata amplificata mediante PCR, a partire da 250 ng di DNA genomico (1 min a 95°C, 30 s a 56°C, 16 s a 72°C per 35 cicli) con i primers:

SV5 **5'-tag att cca acc tat gga act gat-3'**

SV6 **5'-gga aag tcc ttg ggg tct tct acc-3'**

La buona qualità del DNA genomico e dei cDNA è stata verificata mediante PCR con i primers che amplificano il gene della G3PDH:

G3PDHFw **5'-acc aca gtc cat gcc atc ac -3'**

G3PDHRv **5'-tcc acc acc ctg ttg ctg ta-3'**

Un frammento del cDNA di Tag e un frammento del cDNA di HGF sono stati amplificati mediante RT-PCR (kit Sigma), a partire da 400 ng di RNA totale estratto con il metodo del guanidinio isotiocianato (Rneasi Kit, Qiagen). La miscela di reazione è stata incubata a 48°C per 45 min e, dopo inattivazione a 95°C per 2 min della retrotrascrittasi AMV-RT, si è proceduto con la amplificazione del cDNA ottenuto.

Per amplificare il cDNA di Tag si sono usati gli stessi primers sopra mostrati, mentre per l'amplificazione del cDNA di HGF si sono usati i primers:

HGFFw **5'-ggg gag agt tat cga ggt ctc -3'**

HGFRv **5'-caa act aac cat cca tcc tat g -3'**

L' ibridizzazione mediante **Southern** è stata eseguita come precedentemente descritto (Hirvonen *et al.*, 1999). Il DNA/cDNA è stato trasferito su membrane di nylon (*Hybond-N+*; Amersham), cross-linkato agli UV e fatto ibridare, dopo saturazione con DNA di sperma di salmone (Sigma), con sonde marcate con [α -³²P]dCTP (attività specifica: 3,000 Ci/mmol, Amersham) capaci di riconoscere Tag o HGF. Le sonde sono state marcate usando il Random-Primed kit (Boehringer Mannheim) e rimuovendo i nucleotidi non incorporati su colonne Sephadex G-50 (Boehringer Mannheim). Gli aspecifici sono stati rimossi dal filtro con lavaggi in tamponi a base di 0.01% SDS e SSC (10% nel primo lavaggio e 0.1% nel secondo).

3.4 Saggi biochimici.

I lisati da sottoporre ad immunoprecipitazione sono stati ottenuti lavando le cellule in tampone fosfato freddo (PBS-pH 7.4) e aggiungendo alle piastre **Buffer RIPA** a pH 7.5 freddo (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% TRITON X-100, 0.5% Sodio Deossicolato, 5mM EDTA) con aggiunta di inibitori di proteasi e fosfatasi (50µg/ml leupeptina, 10µg/ml pepstatina, 10µg/ml aprotininio, 1mM PMSF e 100µM sodio ortovanadato) (reagenti Sigma).

E' stata anche usata, allo scopo di recuperare una maggiore quantità di proteine nucleari, una **lisi totale in SDS bollente** (50% acqua, 25% Tris-HCl 1 M pH 7.4, 25% SDS 10%) seguita da rottura del DNA genomico mediante sonicatore.

I lisati sono stati chiarificati dalle membrane a 15000 rpm per 15 minuti a 4 °C e le proteine presenti sono state **quantificate** con il metodo della **BCA** (Pierce). L'acido bicinconinico (BCA) in forma di sale sodico solubile in acqua è un reagente altamente specifico per lo ione Cu^{2+} . In ambiente alcalino e in presenza di proteine, lo ione Cu^{2+} viene ridotto a Cu^{+} , il quale può essere chelato da due molecole di BCA. Il chelato che si forma è solubile in acqua ed adsorbe a 562 nm, permettendo in tal modo di quantificare la proteina, sulla base dell'assorbanza a tale lunghezza d'onda del campione esaminato.

Uguali quantità (800ng) di proteine sono state **immunoprecipitate** per 2 ore a 4 °C con 20 ng/ml di anticorpi specifici assorbiti su 40 µl di Sefaroso-proteina A (per gli Ab policlonali) / G (per gli Ab monoclonali). Gli immunocomplessi sono stati lavati nello stesso tampone di lisi e le proteine immunoprecipitate sono state eluite a 100 °C in *Laemmli buffer* in condizioni riducenti (30 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glicerolo, 2% β-mercaptoetanolo). Le proteine,

completamente denaturate, sono state quindi sottoposte a elettroforesi in gel di poliacrilamide (Acilammide-bisacrilammide 37:1 in Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.03% APS, 0.04% TEMED). I lisati prodotti con SDS bollente sono stati invece direttamente sottoposti a denaturazione e riduzione delle proteine in Laemmli buffer e caricate in uguali quantità (50 µg).

L' associazione con SDS conferisce alle proteine una carica negativa uniforme, per cui quando esse vengono poste in un campo elettrico, manifestano una velocità di migrazione direttamente proporzionale al proprio peso molecolare, che può essere valutato per confronto con una miscela di proteine standard.

Al termine dell' **SDS-PAGE** le proteine sono state sottoposte a **Western blotting** e trasferite ad un supporto di nitrocellulosa (*Hybond-C+* - Amersham) in campo elettrico in presenza di *Blotting Buffer* (Tris, Glicina, Metanolo).

Il filtro di nitrocellulosa su cui è avvenuto il trasferimento è stato lavato in acqua deionizzata per eliminare l' eccesso di metanolo e, per evidenziare l' avvenuto trasferimento, è stato colorato con una soluzione di rosso Ponceau (0.2%) in acido tricloroacetico (6%), quindi decolorato con TBS-azide (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, azide 1000x) per non danneggiare le proteine. La nitrocellulosa è stata saturata in TBS-BSA 5% per 1 ora a 45 °C, quindi incubata con gli anticorpi primari tutta la notte a 4 °C. E' seguita un' altra serie di lavaggi dagli aspecifici in TBS-TWEEN 0.1% per 30 min totali.

Il complesso proteina-anticorpo primario è stato poi marcato con un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi diluito 1:2000 in TBS-TWEEN 0.1% , nel corso di un' incubazione di 1h a temperatura ambiente. Il filtro è stato successivamente lavato per 30 min complessivi in TBS-TWEEN 0.1% . L' ultimo lavaggio è stato effettuato per 5 min in TBS (10mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl), eliminando il TWEEN che interferisce con l' attività della perossidasi.

La rivelazione delle proteine è stata effettuata con il metodo dell' ECL basato sulla chemiluminescenza.

Gli anticorpi primari usati sono stati:

- *Met* (C28, #1005, Santa Cruz Biotechnology)
- *Tag* (Ab-1, Oncogene Science)
- *fosfotirosina* (4G10, UBI)
- *fosfoAkt* (Ser 473, #9271, Cell Signaling Technology)
- *fosfoErk1/2* (Thr202-Tyr204, #9101, Sigma)
- *fosfop38* (Thr180-Tyr182 , #9219, Cell Signaling Technology)
- *fosfop65 di NF-kB* (Ser536, #3031S, Cell Signaling Technology)
- *fosfoJNK* (Thr183-Tyr185, #9251, Cell Signaling Technology)
- *Bcl-2* (Santa Cruz Biotechnology)
- *Bax* (Santa Cruz Biotechnology)
- *Ciclina D₁* (#DC56, Santa Cruz Biotechnology)
- *Ciclina E* (#HE12, Santa Cruz Biotechnology)
- *Tubulina* (B512, Sigma)
- *EGFR* (Santa Cruz Biotechnology)
- *PDGFR* (#958, Santa Cruz Biotechnology)

3.5 Immunoistochimica.

Un microarray composto da 19 campioni di tessuto di MM è stato fornito dal Tissue Procurement Facility del Fox Chase Center di Philadelphia. Pezzi di tessuto normale sono stati usati come controlli negativi. I campioni sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina, sparaffinati, reidratati e sottoposti a ricerca degli antigeni in buffer citrato 10 mM pH 6.0. Le preparazioni sono state incubate in 3% H₂O₂ per 20 min, lavate in PBS e saturate con 10% FBS per 30 min. Gli anticorpi primari per fosfo-Akt, Tag e Met sono stati rivelati con anticorpi secondari biotinilati. Le sezioni sono state colorate con il cromogeno DAB e contromarcate con ematosillina. Lo stroma non-neoplastico circostante è servito come controllo negativo interno per ogni immagine.

3.6 Trattamento con Suramina e Anticorpi bloccanti.

Cellule subconfluenti sono state esposte al detergente suramina (350 µg/ml) per 24 h, poi lavate con PBS, tripsinizzate e mantenute in sospensione in terreno di coltura contenente gli anticorpi bloccanti anti-HGF (mAb 294, R&D Systems - 10 µg/ml) per 1 h a 22 °C, quindi ripiastrate.

3.7 Inibitori di PI3K, MAPK e Ikb-α.

Abbiamo usato gli inibitori (Sigma) di PI3K (Wortmannin), Erk2 (PD98059), p38 (PD169316) e Ikb-α (Bay 11-7082) in concentrazioni finali pari a 50 nM, 30 µM, 25 µM e 10 µM rispettivamente, a meno che non sia indicato diversamente nel testo.

3.8 Analisi statistica.

I dati sono stati espressi come valori medi di tre esperimenti indipendenti \pm Deviazione Standard (SD). La significatività statistica delle differenze tra gruppi è stata valutata con test non parametrico di Mann-Whitney a due code, considerando significativi i risultati se $P < 0.05$.

3.9 Analisi della citotossicità.

Abbiamo stimolato in triplicato le cellule per 24 h (*esposizione breve*) con terreno contenente 2% FBS addizionato ad agenti tossici (fibre in varie concentrazioni, 10 μM H_2O_2 o 100 μM VP16) in presenza o meno di HGF purificato (50 ng/ml; R&D Systems).

Abbiamo anche esposto cellule SV40-HMC a due cicli da 72 h ciascuno a basse dosi (2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di fibre di amosite (*esposizione prolungata*), per poi osservare la formazione di foci a distanza di 2 mesi.

Analogo trattamento è stato eseguito su cellule HMC trattate con tutte le fibre a disposizione, ma ad un dosaggio ancora più basso (0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). La citotossicità è stata valutata dopo ogni stimolazione con saggio MTT compiuto come precedentemente descritto (Mosmann, 1983). I dati sono stati espressi come media riduzione di vitalità (citotossicità) \pm SD.

3.10 Analisi dell' apoptosi.

Abbiamo esposto per 24 h cellule subconfluenti a terreno contenente 2% FBS e differenti stimoli apoptotici (fibre in varie concentrazioni, 10 μM H_2O_2 o 100 μM VP16), in presenza o meno di HGF purificato (50 ng/ml; R&D Systems) o di anticorpi anti-HGF bloccanti (mAb 294; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; R&D Systems).

Dopo l' incubazione i pellet cellulari sono stati marcati con propidio ioduro (2.5 µg/ml; Sigma) e 2 µl di FITC-annexin-V (Alexis) e abbiamo analizzato in citofluorimetria 5000 eventi, considerando apoptotiche solo le cellule positive alla sola marcatura con annexin V.

Abbiamo valutato l' attività caspasicca e l' espressione di CD95 marcando le cellule con il kit *CaspACE FITC-VAD-FMK in situ marker* (Promega) e con anticorpi FITC-CD95 (Chemicon).

L' apoptosi è stata inoltre valutata in alcuni esperimenti esaminando la frammentazione della cromatina nei nuclei dopo colorazione per 1 h al buio con 8 µg/ml di *Hoechst* (Calbiochem) delle cellule cresciute su vetrini copri-oggetto. Le cellule sono poi state fissate a -20 °C in acetone:metanolo 1:1 per 15 min, lavate in PBS e acqua deionizzata e infine montate in 50% glicerolo in PBS. Le immagini sono state ottenute con un microscopio a fluorescenza Leica collegato a fotocamera.

3.11 Analisi della neosintesi di DNA.

Le cellule sono state esposte a terreno 2% FBS contenente o meno fibre di asbesto in presenza di 10 µM BrdU (Bromodeossiuridina). L' incorporazione di questo nucleotide nel DNA di neosintesi è stata valutata dopo 24 h mediante il *Kit Cell Proliferation* (Roche). I dati sono stati espressi come medio incremento della neosintesi di DNA rispetto al controllo non trattato ± SD.

3.12 Analisi del ciclo cellulare.

Le cellule sono state sincronizzate in fase M con 0.1 µg/ml Colcemid (Sigma) per 24 h, poi rimesse a crescere in terreno normale per 4 gg, quindi analizzate. Prima dell' analisi, sono state

lavate in PBS, fissate in etanolo 50%, lavate nuovamente in PBS e marcate a temperatura ambiente per 30 min con 50 µg/ml di Propidio Ioduro in PBS 0.1 M pH 7.2, con aggiunta di 0.5 mg/ml di RNasi per degradare l' RNA. L'analisi è stata condotta al citofluorimetro su 10000 eventi, l' analisi statistica è stata eseguita successivamente con il software WinMDI.

3.13 Analisi in microscopia elettronica.

Le cellule tripsinizzate sono state lavate in PBS, quindi fissate in tampone cacodilato-2% glutaraldeide per 12 h. In seguito il campione è stato analizzato con un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) Hitachi 800.

3.14 Analisi dell' attività trascrizionale (Electromobility Shift Assay - EMSA).

Gli estratti nucleari sono stati preparati come precedentemente descritto (Muller *et al.*, 2002). 5 µg di estratto nucleare sono stati preincubati per 10 min a temperatura ambiente in *Binding buffer* (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 20% glicerolo, 5 mM MgCl₂) e 2 µg di poli(dI-dC) (Amersham). Questa miscela è stata successivamente incubata in un volume totale di 20 µl a temperatura ambiente con una sonda marcata con γ^{32} -ATP (Promega) corrispondente ad NF-kB umano. I complessi DNA-proteina sono stati separati su gel al 6% di poliacrilammide in 0.5% TBE (Tris-Acido Borico-EDTA) e i complessi radiomarcati sono stati visualizzati mediante autoradiografia.

3.15 Saggi biologici.

3.15.1 - Disaggregazione cellulare (Scatter Assay).

Circa 1500 cellule epiteliali di rene canino (MDCK-Madin Darby Canin Kidney) sono state seminate in piastre a 96 pozzetti, in 150 µl di terreno di crescita DMEM contenente 5% FBS. Dopo l'adesione, sono state stimulate con terreno 5% FBS con o senza HGF ricombinante (rhHGF - R&D attivato in 5% FBS per 1h a 37°C) o con i terreni condizionati e senza siero delle cellule di MM, raccolti dopo 4 gg di crescita e concentrati 20 volte in concentratori a basso assorbimento proteico (cut-off 10 KDa). Dopo 24 ore, l'effetto di dissociazione cellulare è stato osservato al microscopio a contrasto di fase, dopo fissaggio delle cellule con formaldeide all'11% in PBS per 15 min e colorazione con cristal violetto per 15 min.

3.15.2 - Saggio di proliferazione.

Le cellule sono state fissate in glutaraldeide 11% in PBS e colorate in cristal violetto a vari tempi dalle stimolazioni. Il colorante è stato eluito in acido acetico al 10% e l' $Abs_{595\text{ nm}}$ dell'eluato è stata misurata con un lettore ELISA. I dati sono stati espressi come valori medi di $Abs_{595\text{ nm}} \pm SD$.

3.15.3 - Saggio di crescita delle HUVEC.

I terreni condizionati delle cellule mesoteliali trasfettate e dei MM, raccolti dopo 4 gg di crescita in 2% FBS e concentrati 20 volte in concentratori a basso assorbimento proteico (cut-off 10 Kda) sono stati sottoposti a quantificazione del VEGF contenuto con kit ELISA commerciale (R&D Systems).

Il terreno condizionato e concentrato è stato diluito 1:1 con terreno di coltura (Medium 199-Gibco) delle HUVEC (Human Umbelical Vein Cells) ed è stata monitorata la crescita mediante conta cellulare dopo 24h e 48 h, usando come controllo positivo la stimolazione con 10 ng/ml di rhVEGF (R&D Systems) e come controllo negativo le HUVEC non stimulate.

3.15.4 - Saggio di trasformazione (Focus Forming Assay).

Le cellule sopravvissute al trattamento prolungato con fibre d' asbesto, dopo 2 mesi sono state piastrate in triplicato in piastre da 10 cm² e cresciute fino all' osservazione microscopica dei *foci*. Il risultato è stato espresso come media del numero di foci per cellule piastrate \pm SD. I foci sono stati tripsinizzati, raccolti e cresciuti come cloni indipendenti. I dati qui riportati si riferiscono ad un *pool* di cloni, ossia ad una miscela rappresentativa delle cellule dei diversi foci ottenuti.

3.16 Analisi al MALDI e all' LCQ.

I campioni sono stati sottoposti a SDS-PAGE su gel di poliacrilammide-30,8% PDA. Le bande separate sono state evidenziate mediante colorazione con Comassie Brilliant Blue (CBB) o con Silver Staining, quindi sono state escisse dal gel mediante una lama pulita, decolorate ed essiccate con una soluzione al 30% di CH₃CN in 50 mM Acido Borico (BA) per 15 min.

Le proteine contenute hanno poi subito riduzione dei ponti disolfuro con 10mM Ditiotreitolo (DTT) per 30 min a 56° C e sono state alchilate con 55mM iodoacetamide (IAA) per 30 min al buio in agitazione, allo scopo di favorire la successiva analisi. Le bande sono poi state essiccate con 30% acetonitrile (ACN) in 50 mM BA e con 50 % ACN, 50% NH₄HCO₃ per 10 min finchè il gel si è ristretto ed è diventato biancastro per via della disidratazione.

Le proteine presenti nel gel sono state quindi digerite con 6.25 ng/ml di tripsina in 50 mM BA per tutta la notte a 37 °C, quindi i peptidi sono stati recuperati gradualmente esponendo il gel a 1% acido trifluoroacetico (TFA) per recuperare i peptidi idrofilici e poi a 0.1% TFA in 50% ACN per recuperare i peptidi idrofobici. Il liquido raccolto dopo i vari passaggi in questi solventi è stato concentrato in speed vacuum fino ad un volume di 2-5 μ l, quindi iniettato direttamente

nell'HPLC dell' LCQ oppure deposto su placca MALDI dopo l'essiccamento sulla medesima placca sonicata della matrice 4-HCCA scelta per la co-cristallizzazione.

Le *colonne IMAC* sono state preparate come precedentemente descritto (Ficarro *et al.*, 2002).

Gli spettri ottenuti sono stati *calibrati* usando il software *Data Explorer*, usando i valori di massa dei picchi di riferimento della tripsina, copresente nello spettro della proteina in esame. Infine la lista delle masse corrispondenti ai picchi dello spettro calibrato sono state confrontate con quelle contenute nei Database di *MASCOT* per risalire alla natura della proteina e alle eventuali modificazioni, tra cui le fosforilazioni, presenti in alcuni peptidi.