

- Capitolo 4 -

RISULTATI

***Correlazione tra infezione virale
e attivazione di proto-oncogeni***

4.1 Il sistema HGF/Met nel MM pleurico.

Il mesotelioma maligno pleurico è una patologia caratterizzata a livello cellulare da spiccate proprietà di crescita e di migrazione.

In passato, sono stati condotti diversi studi sui fattori di crescita potenzialmente responsabili di questi fenomeni, tra cui il fattore pleiotropico solubile HGF (Klominek *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 1998), visto il suo coinvolgimento in eventi biologici quali proliferazione, motilità, invasività, morfogenesi e apoptosi. Come già illustrato nella parte introduttiva, in condizioni fisiologiche, in seguito al legame con il suo ligando HGF, il recettore tirosina chinasi Met è attivato ed è in grado di innescare la trasduzione del segnale, che induce nelle cellule numerosi effetti biologici (Naldini *et al.*, 1991). E' stato dimostrato in alcuni tipi di tumore, tra cui anche il MM, che Met è costitutivamente attivo (Klominek *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 1998), in alcuni casi perché si instaura un **meccanismo autocrino**, mediante il quale HGF e Met vengono espressi contemporaneamente nella stessa cellula, che in questo modo si auto-stimola a proliferare e a migrare (Ferracini *et al.*, 1995).

Inoltre, in letteratura sono stati riportati molteplici casi di alterazioni cromosomiche associate al MM pleurico, tra le quali alcune proprio a carico del locus di HGF e a quello del recettore tirosina chinasi Met (Popescu *et al.*, 1988), alcune delle quali potrebbero essere implicate in una deregolata espressione del recettore, del suo ligando o di entrambi.

Un altro dato interessante già noto riguarda l' espressione del recettore dell' attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (**uPA**), indotta in cellule mesoteliali dall' esposizione alle fibre di asbesto (Perkins *et al.*, 1999). Il recettore di uPA (**uPAR**) è coinvolto nelle complesse reazioni dell' attività proteasica che è alla base del processo di attivazione di HGF a partire dal suo precursore, biologicamente inattivo (Naldini *et al.*, 1995). Questo dato potrebbe far ipotizzare

che, in cellule nelle quali SV40 induce l' espressione di HGF, l' asbesto possa agire rinforzando l' effetto indotto dal virus, mediante una più efficiente attivazione del ligando di Met.

Inoltre, è stato dimostrato che l' attivazione di Met è in grado a sua volta di attivare l'espressione di uPA (Besser *et al.*, 1997) e ciò porta a immaginare uno scenario nel quale asbesto e sistema HGF/Met rinforzino a vicenda i propri effetti, ma solo in presenza di SV40.

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.

4.2 Correlazione tra attivazione costitutiva di Met ed espressione di Tag nel MM pleurico.

In un pannello di nove linee cellulari stabilizzate, mediante immunoprecipitazione seguita da immunoblotting con anticorpi anti-Met e anti-fosfotirosina, è stato dimostrato che Met è espresso da un' alta percentuale di linee (7 su 9) (**Fig. 17A**) e che in due di esse (MMP e MMCa) è fosforilato in tirosina in assenza di stimolazione con HGF esogeno (**Fig. 17B**).

Inoltre, nel genoma delle linee MMP e MMCa, mediante PCR e Southern blotting con sonde specifiche, abbiamo potuto mettere in evidenza sequenze dell' *early region* del virus SV40 (**Fig. 17C**) che sono risultate trascrizionalmente attive (**Fig. 17D**). Invece, nelle altre cinque linee di mesotelioma, dove Met è stato trovato espresso ma non autonomamente fosforilato in tirosina, il genoma del virus SV40 e la proteina Tag sono risultati assenti, suggerendo una specifica correlazione tra espressione di Tag e attivazione di Met.

La presenza di SV40 è stata inoltre confermata attraverso l'osservazione al TEM di virioni di SV40 in cellule MMP (**Fig. 17E**).

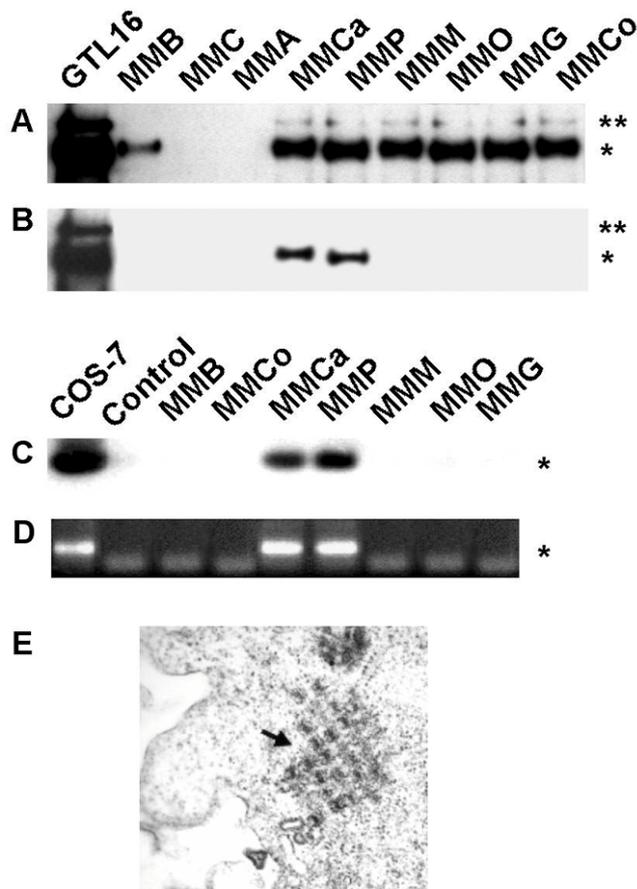


Fig. 17. Espressione di Met e Tag in linee di MM. (A) Uguali quantità di proteine solubilizzate sono state immunoprecipitate con anticorpi anti-Met e sottoposte a immunoblotting con gli stessi anticorpi. Gli asterischi indicano il precursore pr170^{MET} (**) e la catena β del recettore (p145^{MET})(*). (B) Lo stesso filtro è stato poi incubato con anticorpi anti-fosfotirosina. (C) La sequenza di Tag (*) nucleotidi 4402-4574) è stata amplificata mediante PCR a partire da DNA genomico. (D) L' RT-PCR è stata eseguita su cellule di MM e COS-7 per amplificare un frammento del cDNA di Tag (172 bp), indicato dall'asterisco. (E) Particelle "SV40-like" osservate in microscopia elettronica condotta sulla linea di mesotelioma MMP. Ingrandimento originale: x 40,000.

Allo scopo di chiarire meglio il rapporto tra espressione della *early region* virale di SV40 e l'attivazione di Met, abbiamo realizzato opportuni trasfettanti in cellule mesoteliali umane (HMC). In HMC trasfettate con il genoma completo di SV40 (SV40-HMC) o con il solo cDNA di Tag (Tag-HMC), l'attivazione costitutiva di Met, assente nelle HMC di origine, è risultata associata ad un aumento di ingresso in fase S del ciclo cellulare (35%) rispetto alle HMC (**Fig. 18**), in cui la fase S non era distinguibile, indicando un considerevole aumento di proliferazione, conseguente all'espressione della *early region* virale.

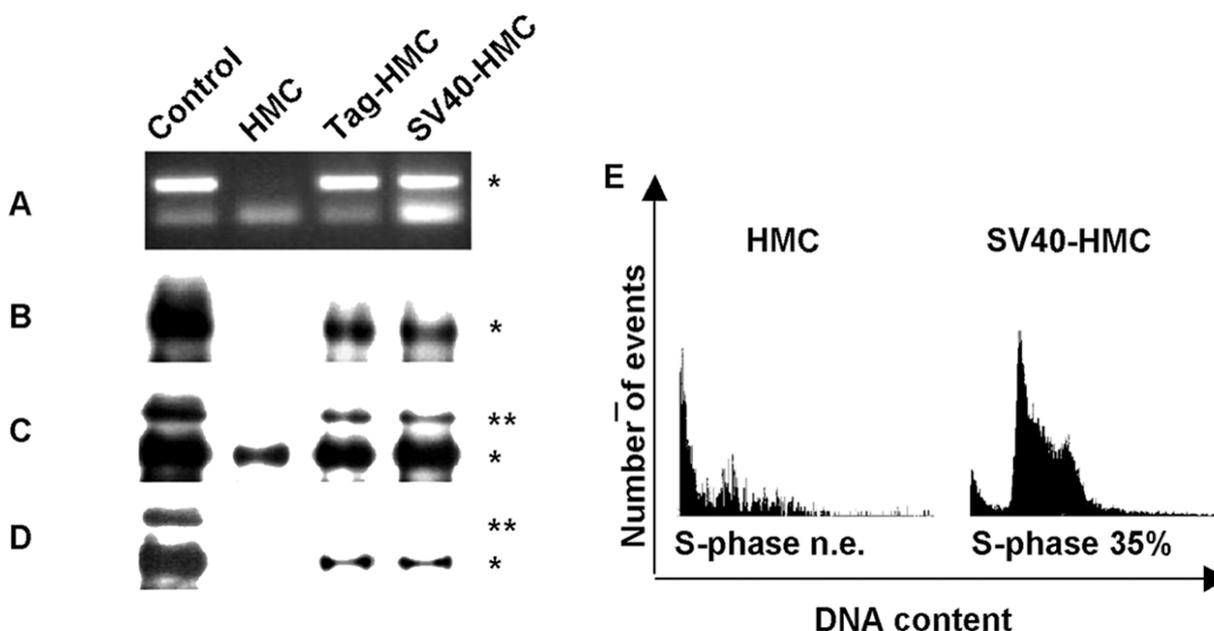


Fig. 18. Tag-HMC e SV40-HMC. (A) Una specifica sequenza di Tag (*) è stata amplificata per PCR dal DNA genomico delle linee COS-7 (controllo), HMC, Tag-HMC e SV40-HMC. (B) La proteina Tag (*) è stata immunoprecipitata dai lisati cellulari e rilevata con anticorpi anti-Tag. (C) Immunoblotting eseguito su Met immunoprecipitato con anticorpi anti-Met. La linea GTL-16 è stata usata come controllo di espressione e fosforilazione di Met. Gli asterischi indicano il precursore $pr170^{MET}$ (**) e la catena β del recettore ($p145^{MET}$)(*). (D) Lo stesso filtro è stato poi incubato con anticorpi anti-fosfotirosina. (E) Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare di HMC prima (*sinistra*) e dopo (*destra*) la trasfezione con il DNA di SV40.

4.3 Semi-permissività del mesotelio umano ad SV40.

I Polyomavirus possono produrre sia un' infezione produttiva, generando nuove particelle virali e lisando al termine del proprio ciclo replicativo le cellule ospite **permissive**, sia integrarsi nelle cellule ospite qualora siano **non permissive** e sfruttarle per sintetizzare le sole proteine tumorigeniche della *early region*, senza però né replicare il genoma né formare virioni completi. Questa seconda opzione porta alla trasformazione delle cellule infettate ed è generalmente la più interessante dal punto di vista della tumorigenesi.

L' analisi al microscopio ottico delle Tag-HMC e delle SV40-HMC ci ha portato ad osservare 72 ore dopo la trasfezione, l' acquisizione di morfologia fibroblastoide, spesso associata ad un comportamento invasivo. Al microscopio elettronico a trasmissione (in collaborazione con il Dr. Strizzi, Univ. Chieti, Italia) sono stati invece osservati **clusters di virioni** assemblati solo nelle SV40-HMC che, essendo state trasfettate con l' intero genoma virale, possono sintetizzare anche le proteine capsidiche. Questo indica la presenza di un' infezione produttiva in atto nel nostro modello (**Fig. 20E**).

Per verificare gli effetti della vicinanza tra cellule infettate da SV40, come appunto le SV40-HMC, e altre cellule SV40 negative, abbiamo eseguito **esperimenti di co-coltura** usando il sistema dei *Transwell*, che consente la crescita di popolazioni cellulari distinte in due camere separate da un setto poroso attraversabile solo da soluti e piccole particelle come i virus. Con questo sistema abbiamo dimostrato la capacità di SV40 rilasciato da cellule SV40-HMC di infettare cellule epiteliali permissive di scimmia (CV-1), HMC e cellule epiteliali murine (BNL CL) (**Fig. 19**). Come atteso, la linea permissiva CV-1 ha subito già dopo 4 giorni di co-coltura i primi segni di crisi (vacuolizzazione, perdita di adesione e morte), accompagnati da espressione di Tag e rilascio di virioni completi raccolti nel surnatante. Inoltre entro i successivi 5 giorni di infezione è sopraggiunta la lisi completa (**Fig. 19A-B-C**).

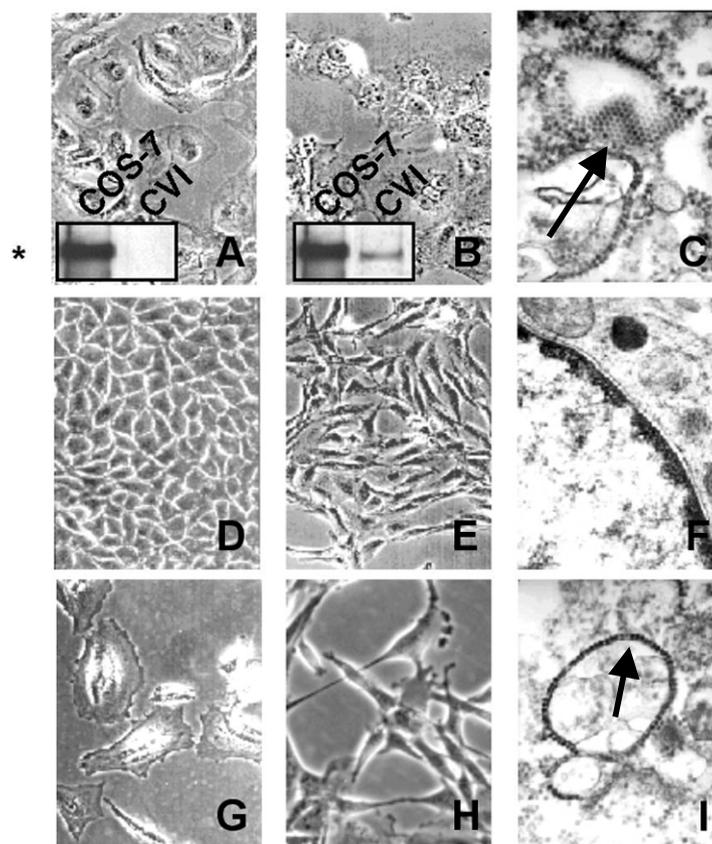


Fig. 19. Morfologia dopo co-cultura con cellule SV40-HMC. La morfologia delle cellule bersaglio CV-1 (A),BNL CL (D),HMC (G) è cambiata dopo la co-cultura con le SV40-HMC (B,E,H). Virioni di SV40 sono stati osservati al TEM. (C,I), ma non nella linea non permissiva BNL CL (F). La linea CV-1 ha subito vacuolizzazione e lisi, accompagnata da espressione di Tag (B), immunoprecipitata dai lisati cellulari e rilevata con anticorpi anti-Tag. Ingrandimenti originali: A-B-D-E-G-H, x320;C, x50,000;F-I, x40,000.

Le BNL CL sono cellule murine che esprimono Met in forma non attivata (**Fig. 20B-C**). Esse sono risultate non permissive, in quanto non è stata osservata replicazione di virus in seguito alla co-cultura (**Fig. 19F**), mentre sono state rilevate presenza di sequenze genomiche virali (**Fig. 20A**) ed espressione di Tag (**Fig. 20D**), che suggeriscono l' integrazione dell' *early region* virale nel genoma ospite, oltre ad attivazione costitutiva di Met (**Fig. 20C**) dovuta ad autocrinia (**Fig. 22-23**), acquisizione di morfologia fibroblastoide (**Fig. 19D-E**) ed ingresso in fase S del ciclo cellulare (**Fig. 21**).

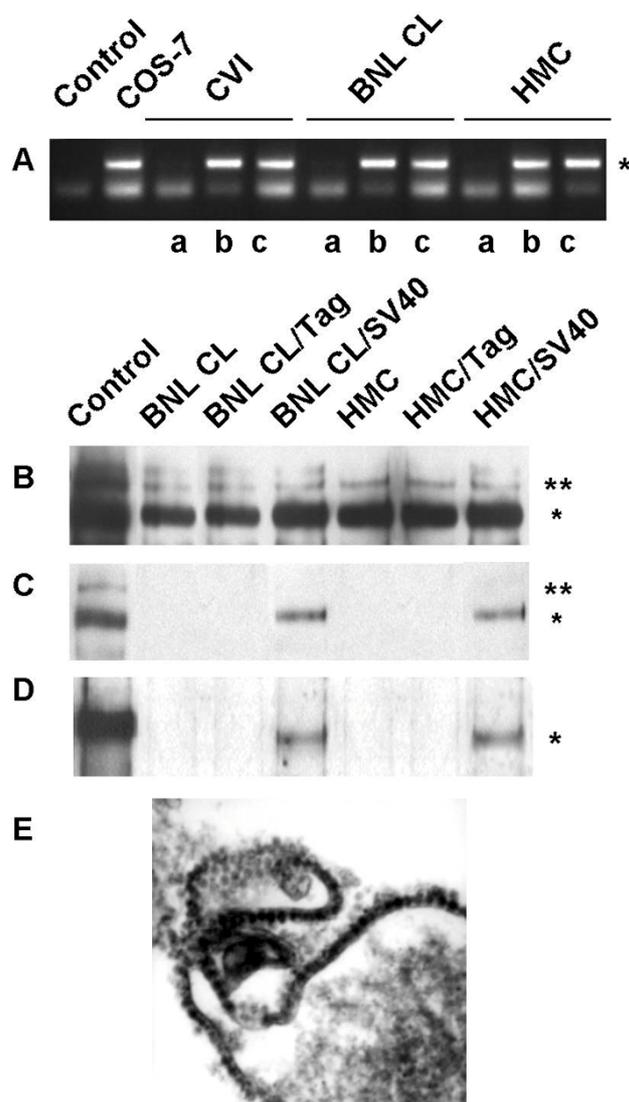
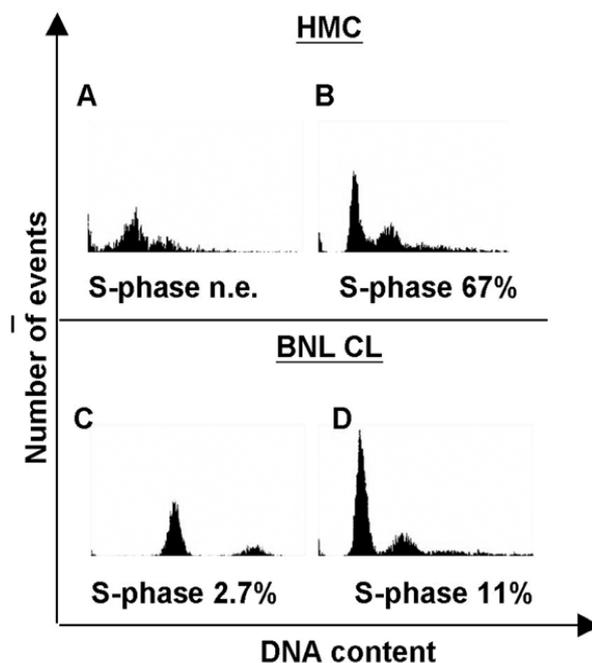


Fig. 20. Esperimenti di co-coltura. A) Una specifica sequenza di Tag (*) è stata amplificata per PCR dal DNA genomico delle linee CV-1, BNL CL e HMC. La PCR senza DNA e con il DNA della linea COS-7 sono state eseguite come controlli negativo e positivo. La figura mostra l' amplificato dopo co-coltura con la linea Tag-HMC (a) e con la linea SV40-HMC (b). La stessa reazione di PCR è stata anche eseguita sui terreni, in seguito a co-coltura con la linea SV40-HMC (c). (B) I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-Met e saggati con gli stessi anticorpi e (C) con anticorpi anti-fosfotirosina. Gli asterischi indicano il precursore $pr170^{MET}$ (**) e la catena β del recettore ($p145^{MET}$)(*). La proteina Tag (*) è stata immunoprecipitata dai lisati cellulari e rilevata con anticorpi anti-Tag. (E) Virioni di SV40 visibili in microscopia elettronica condotta sulla linea SV40-HMC. Ingrandimento originale: x60,000.

Analoghi risultati sono stati osservati nelle HMC sottoposte a co-coltura con SV40-HMC (HMC/SV40) che però sono risultate **semi-permissive** in quanto, pur avendo ereditato dalle SV40-HMC la capacità di infettare altre cellule, consentono la replicazione di SV40 solo a basso titolo (**Fig. 19**), senza pertanto indurre effetti citopatici evidenti come nel caso delle CV-1. Questa particolare condizione consente alla cellula mesoteliale infettata un duplice vantaggio, in quanto essa assume le proprietà di una cellula trasformata non permissiva, ma al tempo stesso, come una cellula permissiva, rilascia virioni, anche se in minori quantità, e pertanto rappresenta un vero e proprio serbatoio di particelle virali.

Fig. 21. Ciclo cellulare dopo co-coltura con cellule SV40-HMC. Analisi al citofluorimetro prima (A e C) e dopo (B e D) co-coltura.



4.4 L' espressione di Tag induce autocrinia HGF/Met.

I terreni condizionati delle BNL CL sottoposte a co-coltura con SV40-HMC (BNL CL/SV40) e dei due mesoteliomi Tag positivi (MMP e MMCa) hanno indotto *attività scatter* sulle cellule MDCK, che esprimono Met e che rispondono alla presenza di HGF dissociandosi le une dalle altre e assumendo fenotipo migratorio. Per confermare l' espressione di HGF da parte di queste cellule, dei trasfettanti e delle altre linee co-colturate si sono ricercate sequenze specifiche del trascritto mediante RT-PCR (**Fig. 22**).

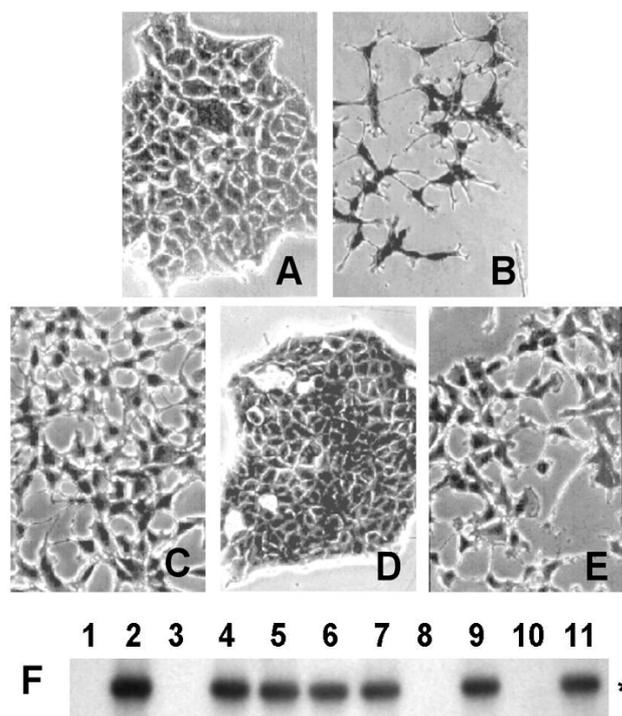


Fig. 22. Espressione di HGF. La figura mostra MDCK non trattate (A), MDCK stimulate con HGF ricombinante (B) e con i terreni condizionati delle linee MMP (C), MMM (MM Tag-negativo-D), BNL CL/SV40 (E). Ingrandimento originale: 320x. (F) RT-PCR e ibridazione con sonda per HGF (nucleotidi:646-1533).

Le linee cellulari che esprimono Met attivato (MMP: 4, MMCa: 5, Tag-HMC: 6, SV40-HMC: 7, HMC/SV40: 9, BNL CL/SV40: 11) mostrano espressione di HGF (*), mentre il cDNA di HGF non è stato amplificato in MMM (3), in HMC/Tag (8) e in BNL CL (10) così come nel controllo di RT-PCR senza RNA (1). La linea MRC5 (2) è stata usata come controllo di espressione di HGF.

A conferma dell' esistenza dell' autocrinia HGF/Met e della sua implicazione negli effetti biologici osservati sulle cellule in coltura, i trattamenti con suramina, blando detergente e con specifici anticorpi bloccanti anti-HGF hanno ridotto la fosforilazione di Met in tutte le cellule Tag positive e hanno parzialmente revertito il fenotipo fibroblastoide delle BNL CL/SV40 (**Fig. 23**).

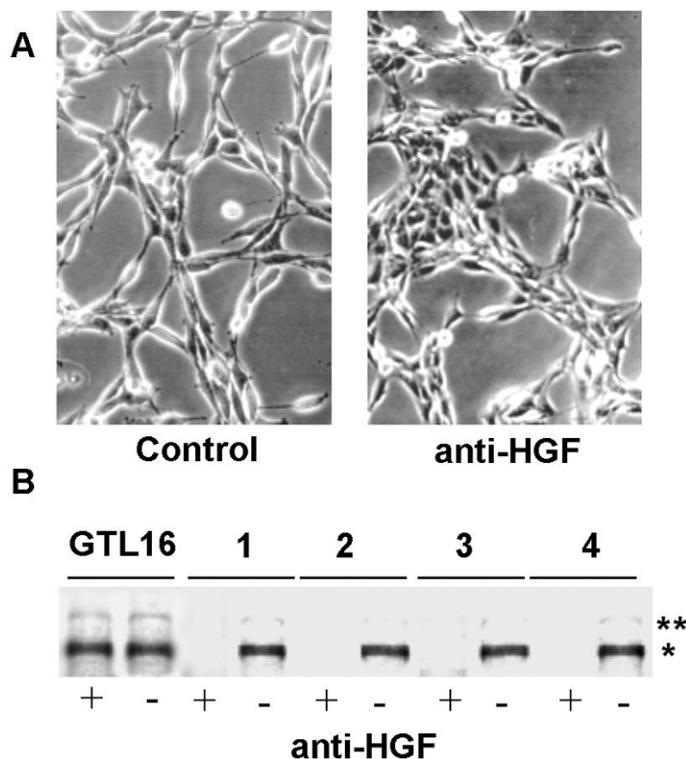


Fig.23. Circuito autocrino HGF/Met. (A) Le cellule della linea BNL CL/SV40 sono state fotografate prima (*sinistra*) e dopo (*destra*) un trattamento con anticorpi bloccanti anti-HGF, che ha condotto ad una parziale reversione del fenotipo fibroblastoide. Ingrandimento originale: 320x. (B) Fosforilazione di Met nelle linee MMP (1), SV40–HMC (2), HMC/SV40 (3) e BNL CL/SV40 con (+) e senza (-) trattamento con anticorpi anti-HGF bloccanti. Uguali quantità di proteine solubilizzate sono state immunoprecipitate con anticorpi anti-Met e sottoposte ad immunoblotting con anticorpi anti-fosfotirosina. Gli asterischi indicano il precursore pr170^{MET} (**) e la catena β del recettore (p145^{MET})(*). La linea di carcinoma gastrico GTL16 conserva la fosforilazione dopo il trattamento con gli anticorpi bloccanti per via dell' iperespressione di Met.

4.5 L' autocrinia HGF/Met indotta da Tag è Rb-dipendente.

E' stato riportato in cellule MDCK che Tag può indurre espressione di HGF in modo Rb-dipendente (Martel *et al.*, 1997). Per cercare di comprendere il meccanismo di induzione dell'espressione di HGF in cellule mesoteliali Tag-positive, abbiamo trasfettato le HMC con due mutanti difettivi di Tag :

- **TagM**, incapace di legarsi a Rb per via della mutazione E107→K
- **Tag2M**, che non può legare né Rb né p53 per via della mutazione addizionale D402→E.

Mediante immunoblotting e RT-PCR abbiamo dimostrato che l' espressione di HGF è indotta dal legame di Tag a Rb, poiché è sufficiente la sola mutazione E107→K per non osservare più né attivazione di Met né espressione di HGF (**Fig. 24**).

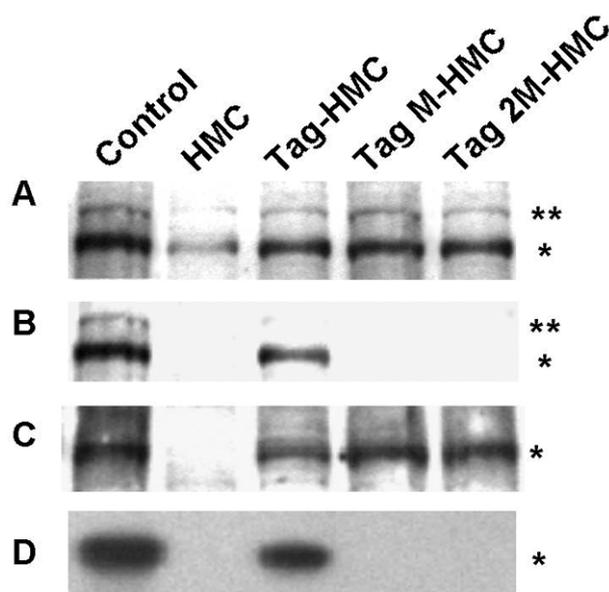


Fig. 24. Dipendenza dell' autocrinia da Rb.

(A) Uguali quantità di proteine solubilizzate sono state immunoprecipitate con anticorpi anti-Met e sottoposte a immunoblotting con gli stessi anticorpi. Gli asterischi indicano il precursore $pr170^{MET}$ (**) e la catena β del recettore ($p145^{MET}$)(*). (B) Lo stesso filtro è stato poi incubato con anticorpi anti-fosfotirosina (C). La proteina Tag (*) è stata immunoprecipitata dai lisati cellulari e rilevata con anticorpi anti-Tag, usando la linea COS-7 come controllo di espressione. (D) RT-PCR e ibridazione con sonda per HGF (nucleotidi:646-1533). La linea MRC5 è stata usata come controllo di 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**, che può essere indotto dal solo Tag 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**).

4.6 La early region di SV40 induce autocrinia VEGF/Flt1.

Recentemente è stata dimostrata in pazienti affetti da MM una correlazione tra ridotta sopravvivenza e aumentata espressione del fattore di crescita VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Strizzi *et al.*, 2001). In particolare, è stato proposto che VEGF, in aggiunta alle sue proprietà angiogeniche, possa contribuire alla riduzione di sopravvivenza dei pazienti stimolando direttamente la crescita delle cellule di MM, attraverso un circuito autocrino.

E' stato inoltre dimostrato in cellule endoteliali che il rilascio di HGF è in grado di agire sulla regolazione di espressione sia di **VEGF** sia del suo recettore tirosina chinasi **flt-1** (Wojta *et al.*, 1999), anche se questo meccanismo deve ancora essere approfondito in cellule mesoteliali e di MM.

Nel corso di una collaborazione con il Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze dell'Università "G. D' Annunzio" di Chieti, è stata valutata nelle 9 linee di MM a nostra disposizione e nei trasfettanti SV40-HMC e Tag-HMC il livello di VEGF secreto. Abbiamo così potuto dimostrare con saggio immunoenzimatico che il fattore è secreto a livelli decisamente superiori nelle cellule mesoteliali e di MM Tag positive e in misura pressoché doppia nelle SV40-HMC rispetto alle Tag-HMC (**Fig. 25**), suggerendo un' implicazione di entrambi gli antigeni T della *early region* virale nella regolazione della sintesi di VEGF.

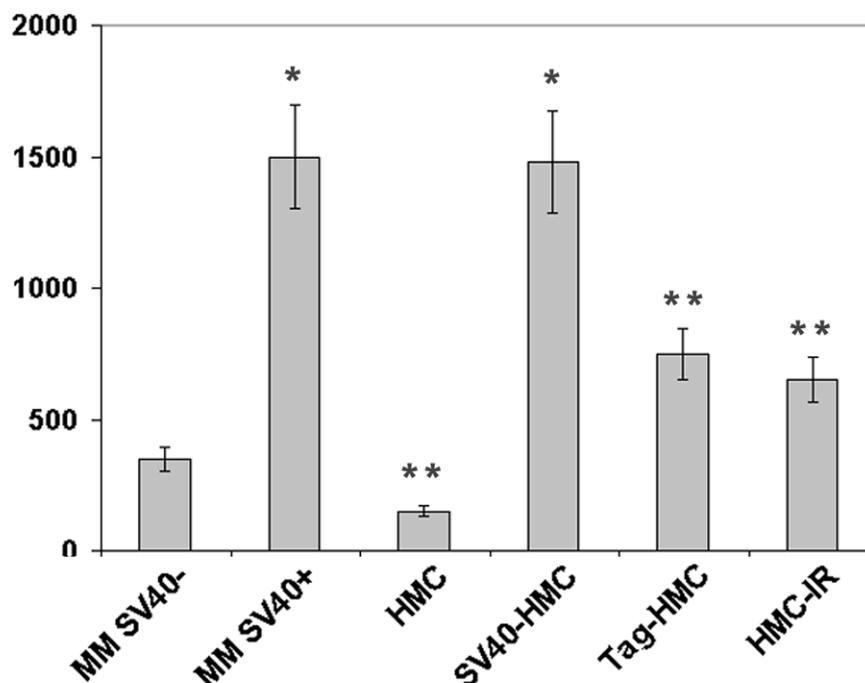


Fig. 25. Quantificazione con saggio ELISA di VEGF nel surnatante di cellule Tag-positive e negative. Il valore osservato nelle Tag-HMC è diverso da quello osservato nelle HMC trasfettate con il plasmide vuoto di controllo (HMC-IR) ai limiti della significatività ($P=0.05$). * $P < 0.01$; ** $P < 0.05$.

Abbiamo in seguito voluto verificare l' effetto indotto dal surnatante dei MM SV40-positivi, cresciuti in carenza di siero, su cellule HUVEC (Human Umbelical Vein Cells) che proliferano in risposta al VEGF. La curva di crescita ottenuta è risultata comparabile a quella generata dopo stimolazione con rh-VEGF, il fattore purificato disponibile commercialmente. L' aggiunta di anticorpi bloccanti anti-VEGF non ha invece ridotto in modo statisticamente significativo la crescita delle HUVEC, suggerendo che altri fattori di crescita presenti nel terreno condizionato (ad esempio HGF) abbiano potuto comunque stimolare la proliferazione (**Fig. 26**) (Cacciotti et al., 2002).

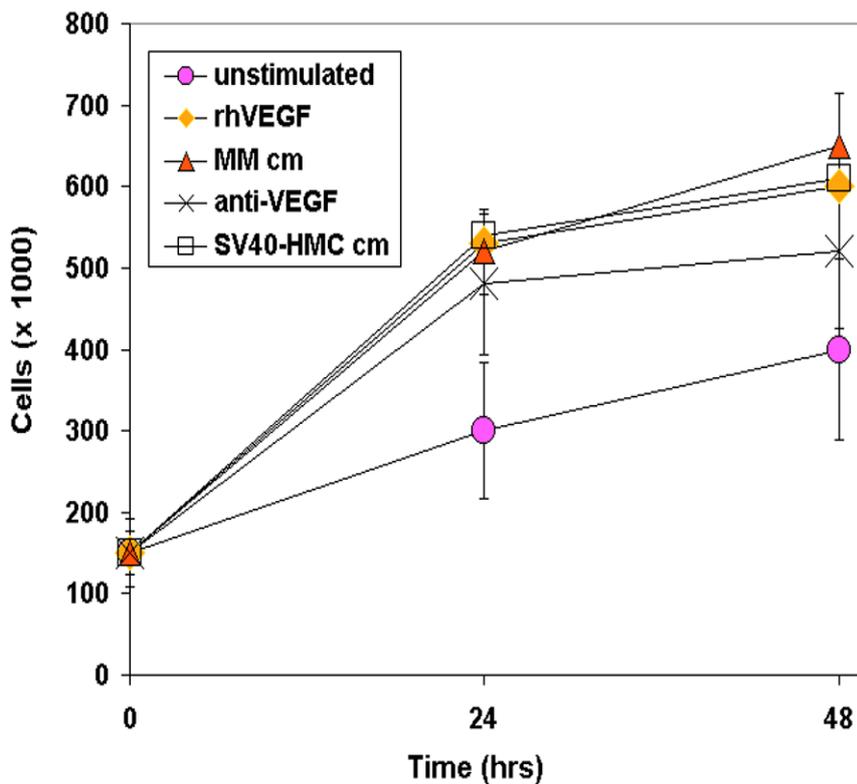


Fig. 26. Curva di crescita delle HUVEC. I valori ottenuti a 24 h e 48 h differiscono in modo significativo dal controllo non trattato sia nel caso del trattamento con il surnatante (cm: conditioned medium) del MM SV40-positivo ($P < 0.01$), sia con quello di SV40-HMC ($P < 0.01$), sia con rh-VEGF ($P = 0.01$). Gli anticorpi bloccanti anti-VEGF hanno prodotto una riduzione non significativa ($P > 0.05$).