

- Capitolo 7 -

***RISULTATI***

***Analisi in Spettrometria di Massa***

***degli effetti di SV40 sul profilo di fosforilazione in tirosina***

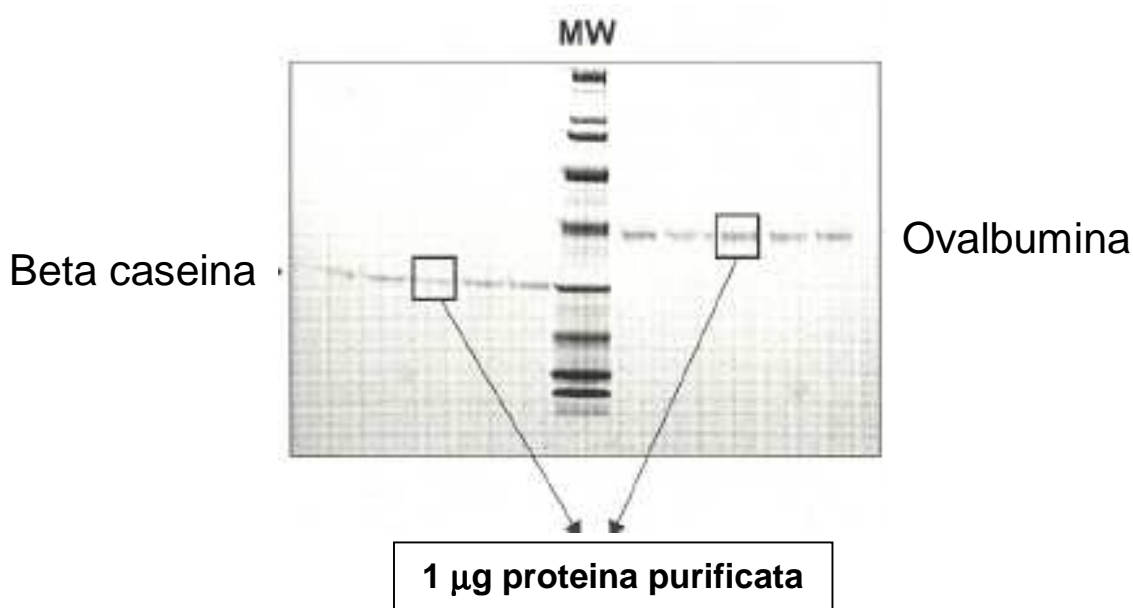
***7.1 Analisi mediante Spettrometria di Massa di standards proteici fosforilati***

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, abbiamo voluto studiare le diversità nel profilo 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 in Svizzera.

La prima fase del lavoro è stata volta alla messa a punto della metodica ottimale per l'analisi mediante spettrometria di massa (MS) di proteine fosforilate. L'analisi è stata condotta su due standards commerciali purificati provvisti di residui di Serina fosforilati in posizione già nota, la **fosfo-ovalbumina di pollo** e la **fosfo-beta caseina umana**.

Per una più agevole interpretazione degli spettri, le metodiche di preparazione dei campioni sono brevemente illustrate qui di seguito, anche se il protocollo completo è stato inserito nella sezione *Materiali e Metodi*. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e la loro presenza nel gel di poliacrilammide è stata rivelata mediante colorazione CBB (Comassie Brilliant Blue) (**Fig. 42**).

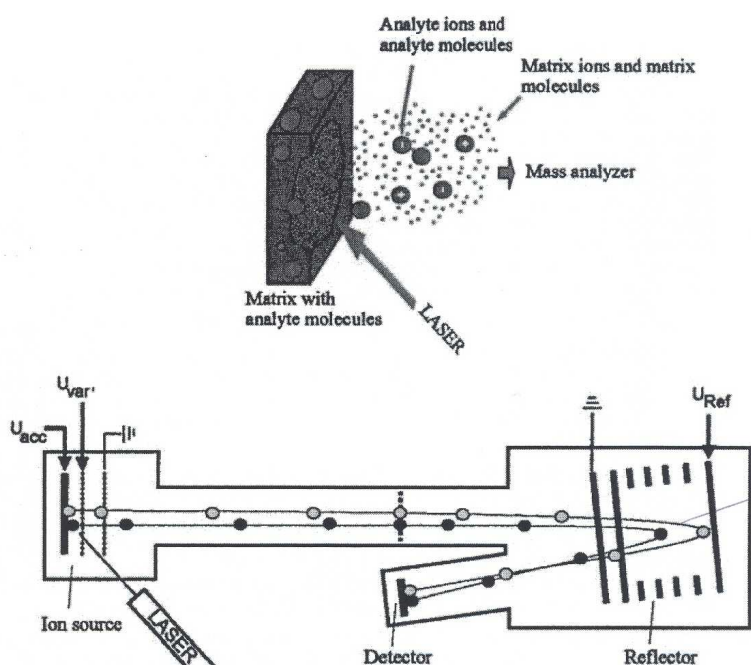


**Fig. 42. Preparazione dei campioni da analizzare mediante spettrometria di massa** E' mostrato in alto un gel di acrilamide-30,8% PDA su cui sono stati caricati 1 ug/lane di standard fosforilati corrispondenti a 23 pmol di ovalbumina e a 43 pmol di beta caseina.

Le bande di interesse sono state escisse da gel e decolorate onde evitare interferenze del Comassie con l'analisi in massa. In seguito alle procedure di riduzione dei ponti disolfuro delle proteine 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.

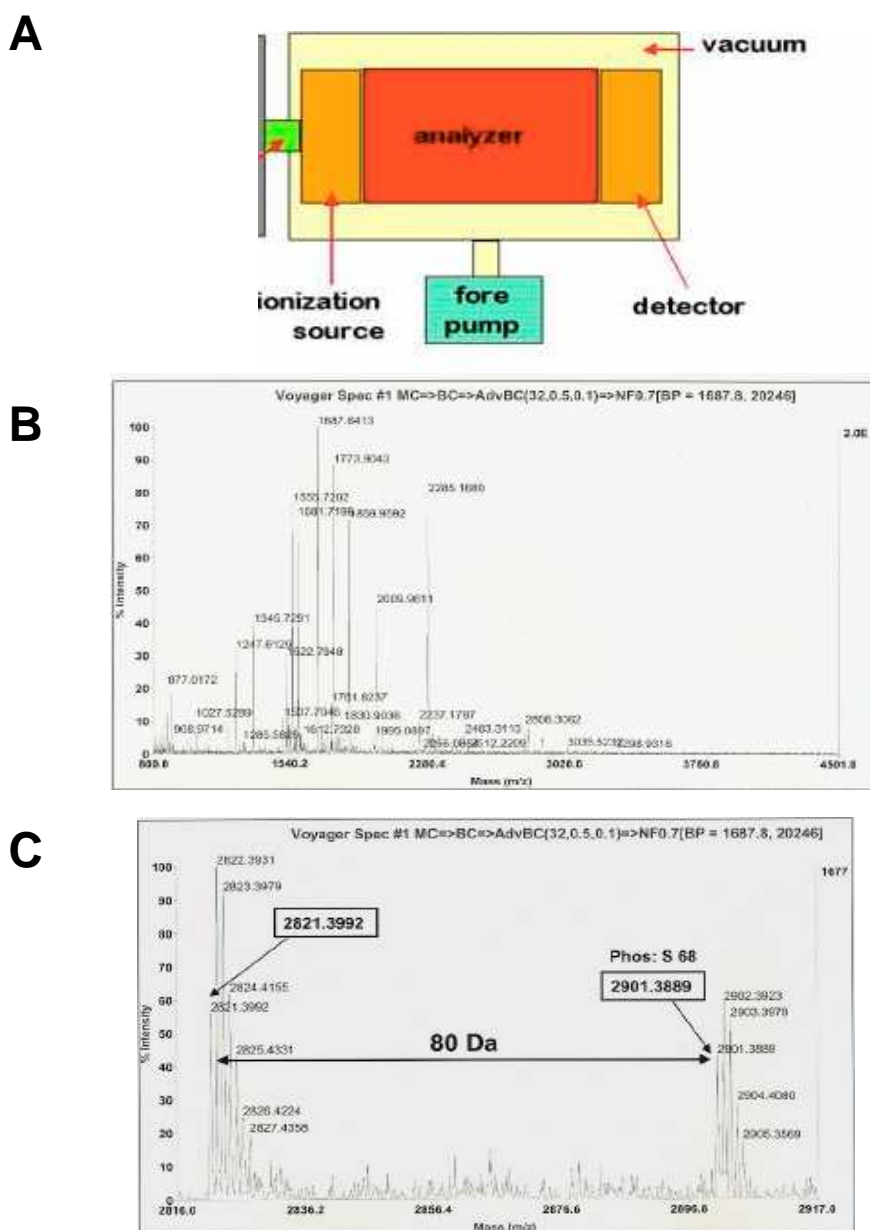
## 7.2 MALDI-MS-TOF.

La prima analisi è stata condotta in **MALDI-MS-TOF**, lavorando sul campione co-cristallizzato su apposito supporto metallico con la matrice 4HCCA (acido alfa-ciano-4-idrossibenzoico), contenente un anello aromatico capace di potenziare il processo di assorbimento delle radiazioni del laser e la ionizzazione. Nel MALDI (**Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization**) ogni emissione 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**) (**Fig.43**) direttamente proporzionale alla loro massa e allo stesso rapporto m/z (massa/carica), in quanto gli ioni prodotti dal MALDI sono sempre monocarica (Fathi *et al.*, 2003).



**Fig. 43. MALDI-MS-TOF.** In alto è mostrata la placca di metallo su cui viene depositato il campione co-cristallizzato con la matrice. In basso lo schema dello strumento.

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 alle specie ioniche prodotte dal laser (**Fig. 44**).

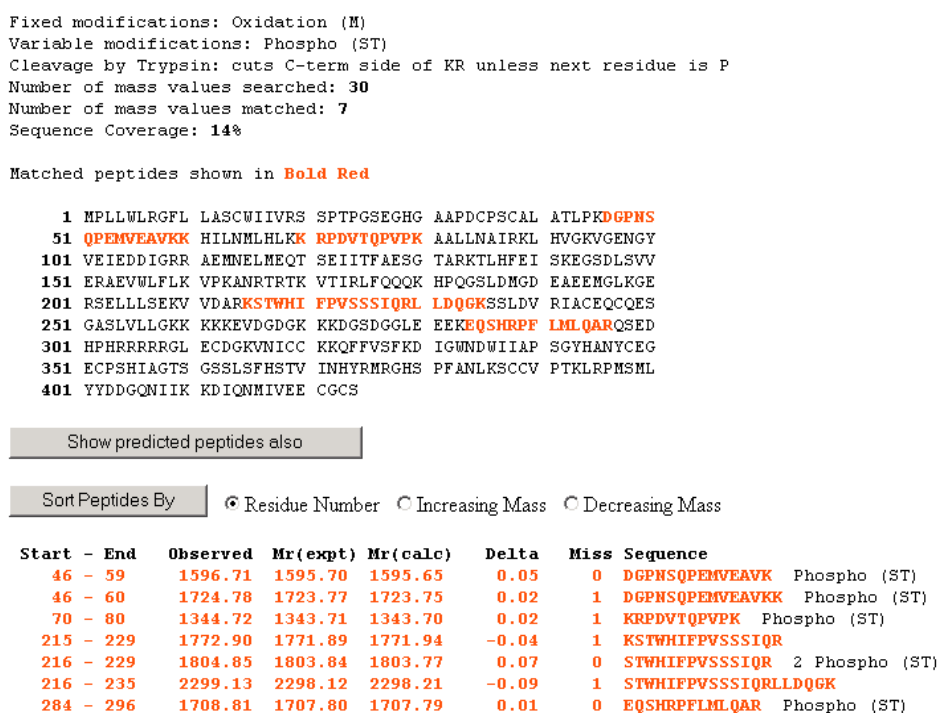


**Fig.44. MALDI-MS-TOF.** (A) Componenti-base di un MALDI. (B) Esempio di spettro ottenuto **7.3 Ricerca delle modificazioni mediante analisi degli shifts di massa** di due peptidi ionizzati aventi i rapporti  $m/z$  spostati di 80 Da l' uno rispetto all' altro, segno di una possibile fosforilazione presente confermata poi mediante software.

Risultati – Analisi in Spettrometria di Massa degli effetti di SV40 sul profilo di fosforilazione in tirosina

Mediante opportuni software è possibile ricavare l'intera serie dei valori m/z presenti nello spettro e confrontarla con serie già presenti in banche dati relative a proteine note sottoposte a digestione con tripsina, in modo da risalire alla natura dell'analita e persino ad eventuali modificazioni come le fosforilazioni, le glicosilazioni e così via (**Fig. 45**).

Se infatti ad esempio vengono trovati nello stesso spettro due picchi con differenza m/z pari



**Fig. 45. Analisi di uno spettro.** E' mostrato un esempio di risultato ottenibile con il software Mascot di ExPasy. In alto sono rappresentati in rosso i peptidi identificati in una delle proteine potenzialmente corrispondenti al campione analizzato, in basso le masse dei peptidi identificati sulla base della vicinanza tra massa attesa (*expected*) e sperimentale (*calculated*) alcuni dei quali però hanno una sequenza non rinvenibile nella proteina, suggerendo che il campione non sia effettivamente la proteina sopra indicata.

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 (**Fig. 44C**). Questi **shifts di massa** caratteristici consentono di individuare altre particolari modificazioni in modo del tutto analogo.

Per quanto riguarda la fosforilazione, è una modificazione che interessa residui di Serina al 90%, di Treonina al 9.5% e di Tirosina allo 0.5%. Si stima che il 2-5% delle proteine cellulari sia rappresentato da chinasi e che potenzialmente 1/3 delle proteine sia fosforilato.

Le **riduzioni di m/z importanti ai fini dell' identificazione di una fosforilazione in MALDI** sono:

**pSer e pThr**

- 63  $\text{PO}_2^-$

- 79  $\text{PO}_3^-$

- 97  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$

- 80 o - 98  $[(\text{M}+\text{H})-\text{H}_3\text{PO}_4]^-$

**pTyr**

- 63  $\text{PO}_2^-$

- 79  $\text{PO}_3^-$

- 80  $[(\text{M}+\text{H})\text{H}_3\text{PO}_4]^-$

Questi valori si dimezzano (ad esempio - 49 qualora  $z=+2$  se  $[(\text{M}+2\text{H})-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2+}$ ) usando ionizzazioni diverse da quelle del MALDI, che generano ioni multicarica.

Per quanto riguarda le fosforilazioni, erano attese 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. 46**).

Beta-caseina

**5 residui fosforilati:**

S30, S32, S33, S34, S50

(S30, S32, S33, S34 sugli stessi peptidi triptici)

Ovalbumina

**4 residui fosforilati:**

S68, S344, S236, S240

(S236 e S240 sugli stessi peptidi triptici)

**Fig. 46. Fosforilazioni attese negli standards commerciali fosfo-beta-caseina e fosfo-Ovalbumina.**

Nello spettro di entrambi gli analiti abbiamo però ritrovato solo i picchi fosforilati corrispondenti ai peptidi contenenti non più di una serina fosforilata, confermando una difficoltà generalmente riscontrata nell' individuare i peptidi plurifosforilati (Ficarro *et al.*, 12002).

Anche se entrambe le proteine sono state identificate in modo significativo, il risultato dell'analisi è stato migliore con l' ovalbumina (**Fig. 48A**) che con la beta-caseina (**Fig. 48B**) per quanto riguarda il numero dei peptidi identificati dal software, da cui dipende un punteggio corrispondente alla significatività del risultato.

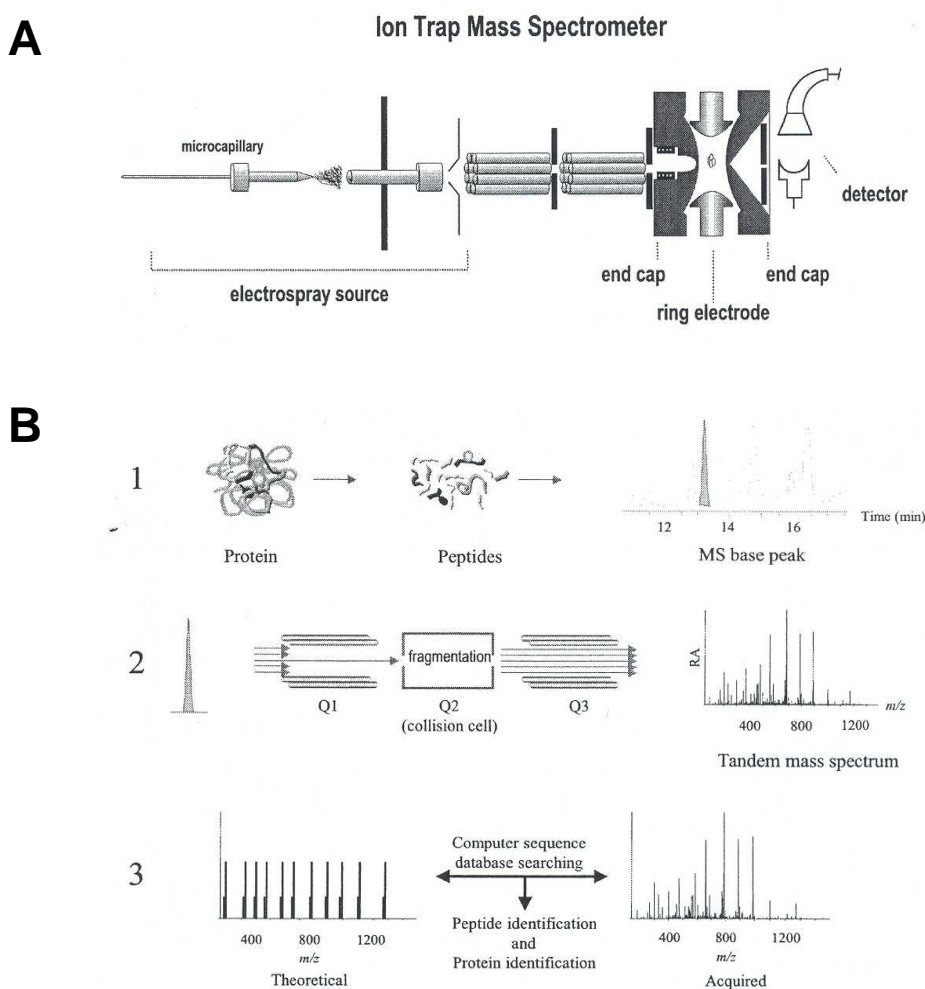
#### **7.4 LCQ (Liquid Chromatography Quadruple).**

L' analisi in MALDI-TOF ha il vantaggio della relativa rapidità nell' identificazione degli analiti mentre l' analisi mediante **LCQ (Liquid Chromatography Quadrupole)** è molto più informativa perché gli ioni, prodotti in continuo sotto forma di spray, a partire dal campione sottoposto ad



HPLC sono sia mono sia multicarica.

Il vantaggio è che è possibile avere conferma nello stesso spettro della presenza di un certo peptide, poiché esso può essere osservato più volte ma con diversi gradi di ionizzazione. Inoltre è possibile “catturare” in una **trappola ionica** peptidi ionizzati di interesse aventi un particolare rapporto  $m/z$  selezionato ed eseguire, dopo la prima analisi in massa, una successiva frammentazione di questi stessi peptidi per ottenere uno spettro **MS/MS**, da cui è possibile risalire all’ esatta sequenza amminoacidica del peptide frammentato (**Fig. 47**). L’ analisi con



**Fig. 47. LCQ.** (A) Schema di un trappola ionica come quella dell’ LCQ. (B) Strategia di identificazione di una proteina fosforilata. 1-Digestione triptica e scelta dallo spettro MS della specie  $m/z$  corrispondente ad un peptide potenzialmente fosforilato in base allo shift di massa; 2-Cattura e frammentazione di tale ione selezionato nella trappola ionica e produzione dello spettro MS/MS; 3-Confronto tra questo spettro e spettri teorici in database.

Risultati – Analisi in Spettrometria di Massa degli effetti di SV40 sul profilo di fosforilazione in tirosina

questo strumento è stata pertanto eseguita in vista di dover identificare non soltanto i peptidi fosforilati ma anche gli eventuali residui portatori della modificazione deducibili usando database o apposite tabelle contenenti le masse dei singoli amminoacidi.

**A**

Massa	M.C.	Modificazioni	Fosforilazioni in Serina	
4122,15	1		S236,S240	4282,08
3863,01	0		S236,S240	4022,94
4636,31	1	CysCAM 4693,33	S 68	4773,28
3763,83	1		S 344	3843,79
3180,53	1	CysCAM 3237,55	S 344	3317,49
2764,34	1	CysCAM 2821,36	S 68	2901,30
2008,95	0		S 344	2088,91
2374,15	0	CysCAM 2431,17	S 68	2511,11

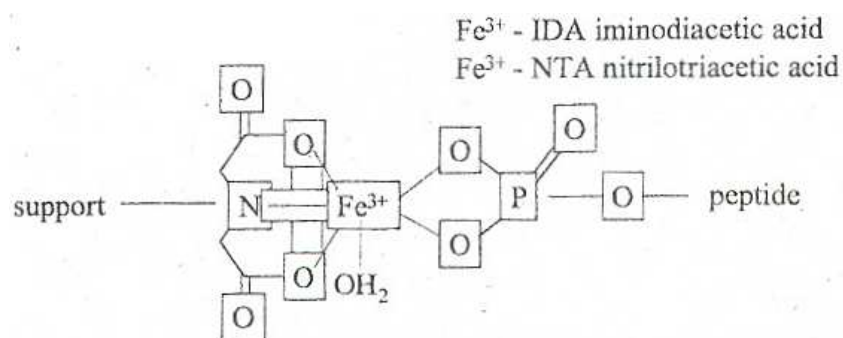
**B**

Massa	M.C.	Mod.	Fosforilazioni in Serina	
7279,70	1		S50	7359,66
3001,50	1		S30,32,33,34	3081,5-3161,5-3241,5- 3321,39
2802,40	1		S30,32,33,34	2882,4-2962,4-3024,4- 3122,27
2643,30	0		S30,32,33,34	2726,3-2806,3-2886,3- 2966,16
2352,10	1		S50	2432,05
1981,86	0		S50	2061,83

**Fig.48. Risultati dell' analisi.** La tabella riporta i peptidi fosforilati attesi ottenibili mediante digestione triptica teorica della fosfo-ovalbumina (A) e della beta-caseina (B), eseguita mediante lo strumento *Peptide Mass*. Nella prima colonna sono riportate le masse attese dei peptidi monoisotopici, nella seconda il numero di residui di lisina o arginina presenti nel peptide che la tripsina non ha tagliato (M.C. = Missed Cleavage), nella terza la massa effettiva dei peptidi dovuta a modificazioni occorse in fase di preparazione del campione (in tal caso, la carbamilazione delle cisteine che porta ad un aumento di massa pari a 57 Da), infine nella ultima sono riportate le serine fosforilate contenute in ciascun peptide e il peso del peptide fosforilato pari alla massa (o massa modificata dalla carbamilazione) più gli 80 Da del gruppo fosfato (o suoi multipli in presenza di più Ser fosforilate). Sono state rappresentate in viola le identificazioni al MALDI, in verde quelle all' LCQ e in rosso quelle con entrambi gli strumenti.

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 (**Fig. 48**).

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 (**Fig. 49**).



**Fig. 49. Schema dell' interazione tra la resina POROS in colonne IMAC e i fosfopeptidi.**

In questo caso i campioni sono stati direttamente iniettati nelle colonne IMAC attivate per consentire l' arricchimento e l' eluato è stato analizzato all' LCQ. 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 per via di tempi troppo limitati di ritenzione in colonna dell' analita a contatto con gli ioni  $Fe^{3+}$ . 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).

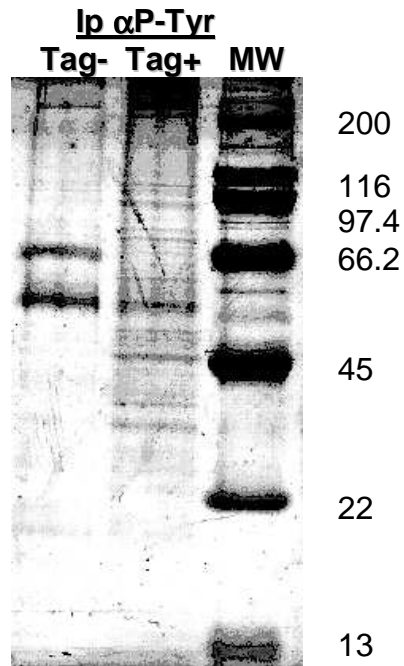
### **7.5 Analisi dei profili di fosforilazione in cellule Tag-positive e Tag-negative.**

A questo punto siamo passati all'analisi dei nostri campioni. Cellule di mesotelioma SV40 positive e negative tenute in basso siero per 24 ore, allo scopo di evitare interferenza delle proteine sieriche, 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 nei lisati cellulari e quindi un basso segnale, corrispondente a fosfoproteine immunoprecipitate rivelato dalla colorazione sia con Comassie sia con il più sensibile nitrato d'argento (Silver staining). Ciò ha reso impossibile l'escissione delle bande da gel per svolgere l'analisi vera e propria benchè sia comunque emersa l'esistenza di notevoli differenze nel profilo di fosforilazione in tirosina tra cellule di mesotelioma SV40 negative e positive (**Fig. 50**).

Un basso livello di fosforilazione in tirosina dopo immunoprecipitazione è stato riscontrato anche in cellule SV40-HMC, 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 di altre modificazioni a carico di proteine, ma insufficienti per ricavare dei dati su campioni poco concentrati come i nostri. Nonostante ciò abbiamo potuto constatare che i profili di fosforilazione sono realmente diversi tra cellule Tag negative e positive, a conferma della correlazione tra attività chinasi ed infezione virale da SV40 e di una cooperazione tra meccanismi cellulari e virali nella tumorigenesi del MM pleurico.



**Fig.50. Differenze nel profilo di fosforilazione di cellule di Mesotelioma SV40 positive e negative.** Gel colorato con Silver Staining su cui sono stati caricati lisati cellulari in Ripa immunoprecipitati con anticorpi anti-fosfotirosina (6 mg di proteina totale immunoprecipitata).