



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea  
**SCIENZE BIOLOGICHE**

**Sviluppo di cellule endoteliali tumorali umane immortalizzate da neoplasie renali**

**“Development of Immortalized Human Tumor Endothelial Cells from Renal Cancer”**

Tesi di Laurea di:  
Anna Fabrizi

Anno accademico:  
2019/2020

Docente referente:  
Dott.ssa Maura Benedetti

# ABSTRACT

- **Introduzione:** Sviluppo di cellule endoteliali tumorali rese immortali per studiare l'angiogenesi tumorale e testare farmaci anti-angiogenetici
- **Materiali e Metodi:** Sono state isolate TECs (tumor endothelial cells) e NECs (normal endothelial cells) umane e sono state rese immortali tramite trasduzione di SV40 antigene T grande e telomerasi umana
- **Risultati:** le TECs mostrano un fenotipo diverso rispetto alle NECs, e una differente risposta ai farmaci antineoplastici
- **Conclusioni:** h-imTECs (immortalized human TECs) posso essere un valido strumento per lo screening di nuovi farmaci anti-angiogenesi tumorale più selettivi e mirati

# INTRODUZIONE

## ***Cosa si intende per tumore?***

Crescita incontrollata e scoordinata di un gruppo di cellule, a scapito dell'omeostasi tissutale, dovuta ad alterazioni del patrimonio genetico cellulare.

## ***Cos'è l'angiogenesi?***

È il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli già esistenti che rappresenta un fattore determinante nello sviluppo tumorale.

## ***VEGF***

Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) è capace di **stimolare la proliferazione** delle cellule endoteliali e la formazione di nuovi vasi.

E' il principale bersaglio dei farmaci anti-angiogenesi come il *bevacizumab*, che **inibisce la crescita dei vasi**.

Tuttavia questo metodo comporta gravi effetti collaterali.

## ***In questo studio...***

Sono state studiate le cellule endoteliali (ECs) coinvolte nel processo angiogenetico, al fine di identificare un bersaglio più selettivo per la valutazione di farmaci antiangiogenetici e ridurre i loro effetti collaterali.

# MATERIALE E METODI

- Prelievo dei **campioni di EC umane da tessuto tumorale renale e da tessuto normale**, inserimento in una soluzione di *Hank's Balanced Salt* e fissaggio con formalina
- **Isolamento degli hTEC e degli hNEC** e messa in coltura
- **Trasduzione di TECs e NECs** con il virus SV40 e hTERT, per ottenere cellule immortalizzate h-imTECs e h-imNECs poi **purificate e analizzate** tramite citometria a flusso (FACSAria II)
- **Isolamento** del RNA delle ECs tramite RT-PCR per analizzare l'espressione di SV40 e hTERT
- **Determinazione del Tempo di raddoppio (PD)** cellulare utilizzando l'equazione:  
 $PD\ time = \log(\text{numero di cellule finale}) - \log(\text{numero di c.iniziale})$
- **Valutazione della morfologia cellulare**
- **Osservazione al microscopio invertito** (Olympus, Tokyo, Giappone) delle colonie cellulari, cresciute su soft agar

# RISULTATI

## 2.1. Formazione di h-imCE

Le Ecs sono state rese immortali tramite transfezione con virus SV40 e hTERT e l'avvenuta immortalizzazione è stata confermata utilizzando HMVEC, come controllo negative, e cellule A375SM e cellule MS1, come controllo positive.

La presenza di SV40 e di hTERT, è stata infatti confermata nelle cellule h-imNECs, h-imTECs e imHMVECs e non in HMVEC (Figura 1A).

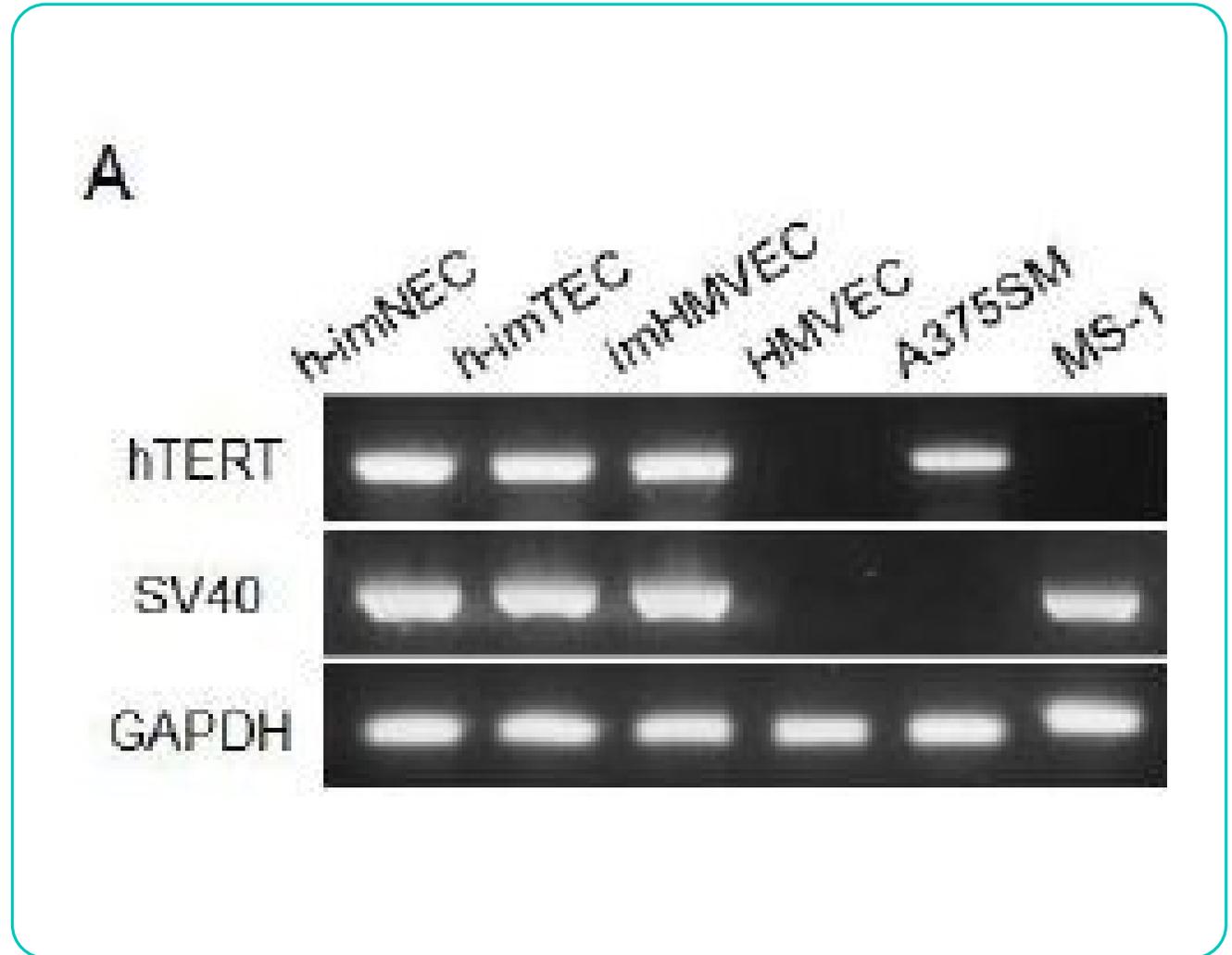


Figura 1A

# RISULTATI

## 2.1. Formazione di h-imCE

Per verificare la purezza di ECs trasdotte, i segnali di fluorescenza di mCherry e Venus sono stati analizzati mediante citometria a flusso.

Come mostrato in Figura 1B, sono stati rilevati entrambi i segnali dell'antigene T grande mCherry-SV40 e Venus-hTERT ogni CE trasfettato ad alti livelli.

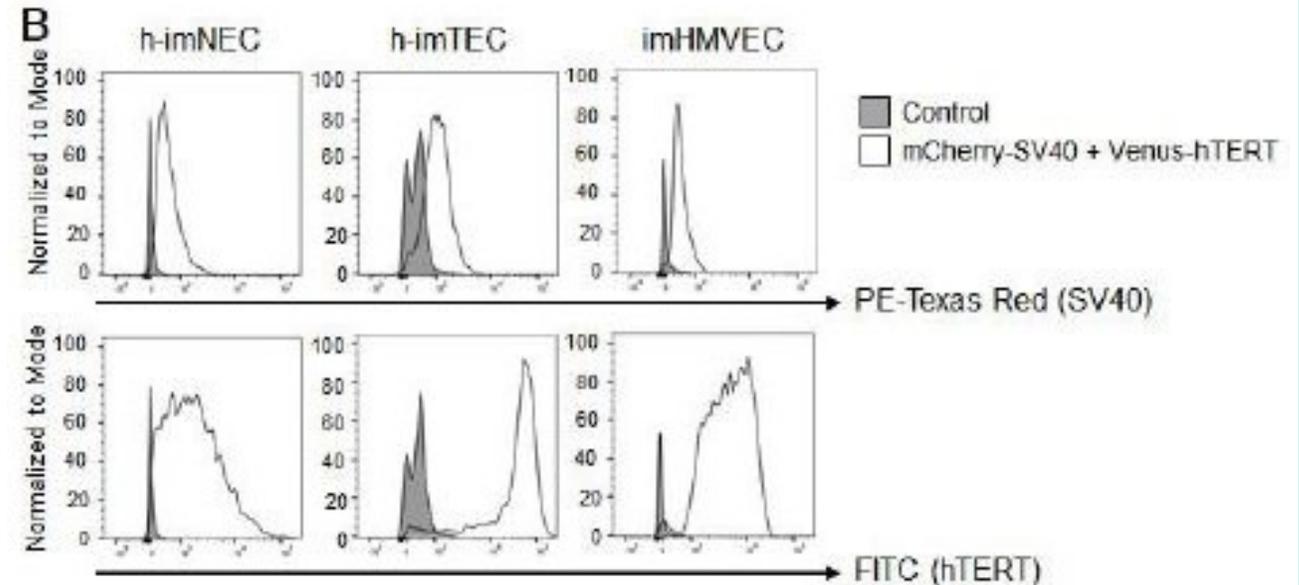


Figura 1B

# RISULTATI

## 2.2 Durata della vita di h.imECs

Per analizzare se la trasduzione dell'antigene T SV40 e di hTERT hanno prolungato la vita delle CE, è stata analizzata la proliferazione di ogni cellula CE mediante conteggio delle cellule (tempo di raddoppio).

Tutte le **CE non immortalizzate** arrestano la crescita dopo circa 20 giorni (Figura 2A).

Al contrario, tutte le **CE immortalizzate** hanno continuato la proliferazione dopo 100-120 raddoppiando la popolazione (PD).

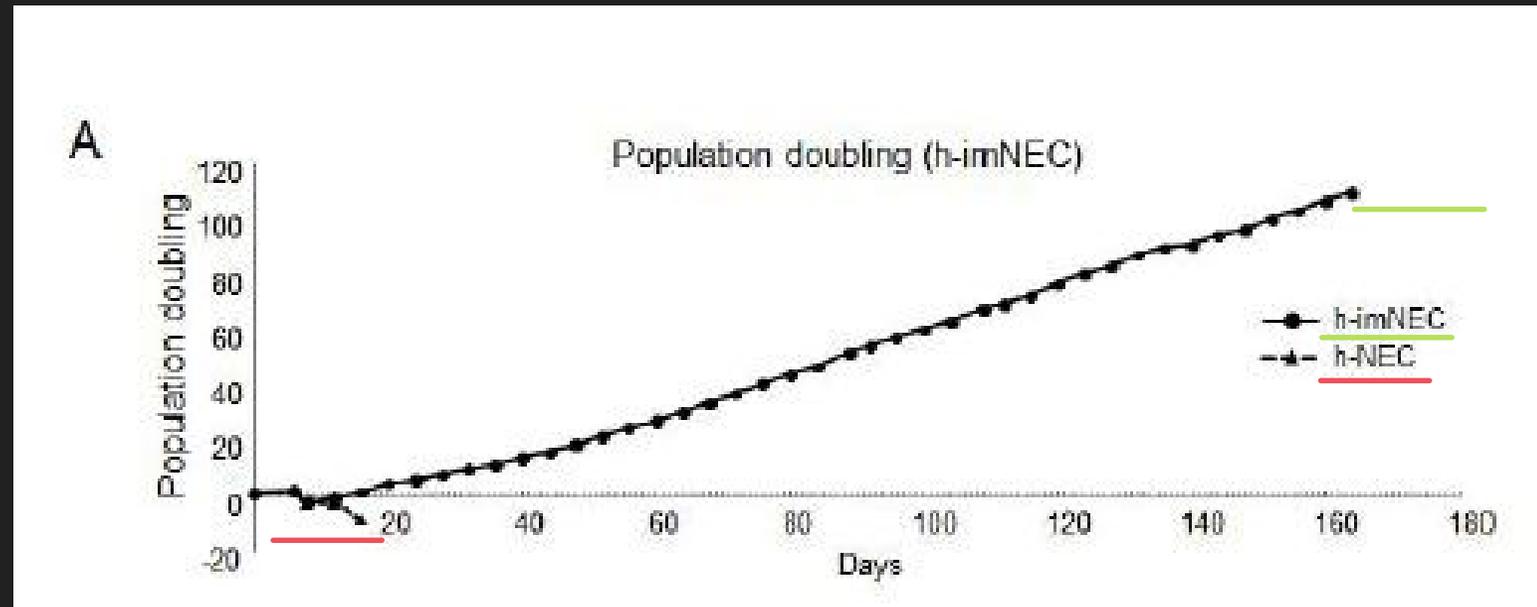
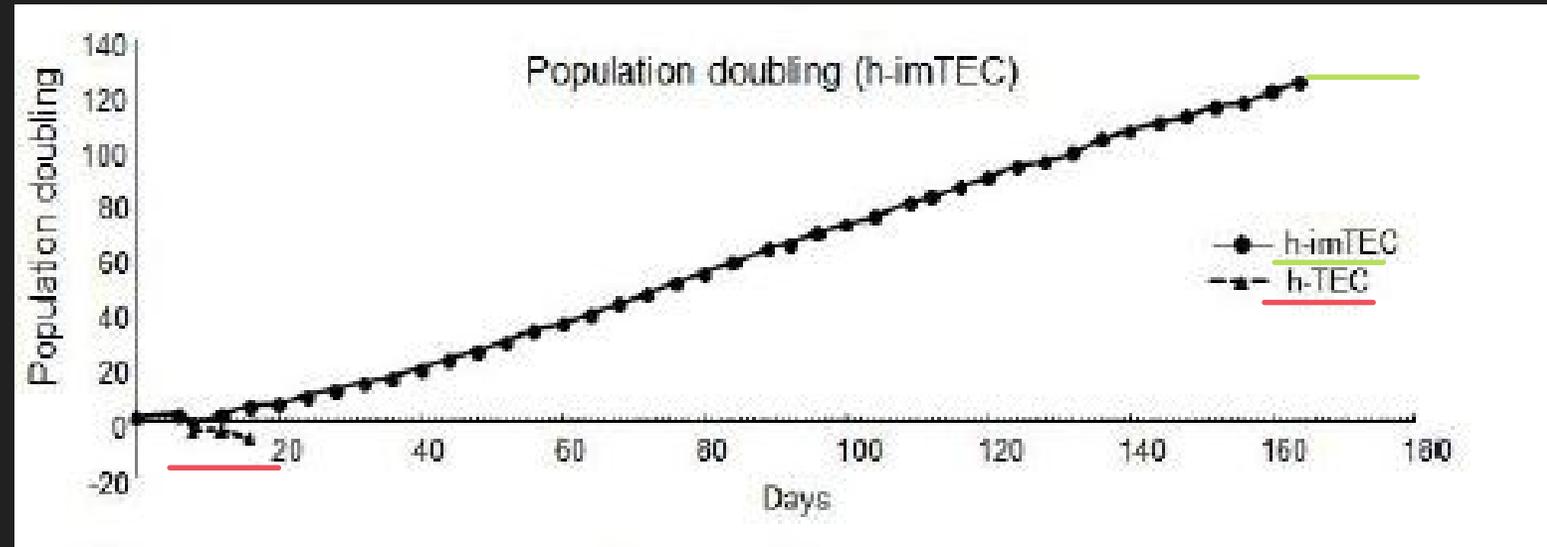


Figura 2A

Nako et al., 2019 Int. J. Mol. Sci; 20,4595



# RISULTATI

## 2.3 Mantenimento delle caratteristiche endoteliali nelle EC immortalizzate

Dall'osservazione al microscopio delle CEs si è potuto verificare che le h-imCEs hanno mantenuto la loro forma cellulare, anche dopo essere state immortalizzate con SV40 e hTERT. (Figura 3A particolare delle h-imNECs)

In secondo luogo, nessuna formazione di colonie è stata osservata in h-imNECs, h-imTECs, e imHMVECs in confronto con il controllo positivo A375SM.

Il che dimostra che non possono crescere in maniera "anchorage-independent". (Figura 3E)

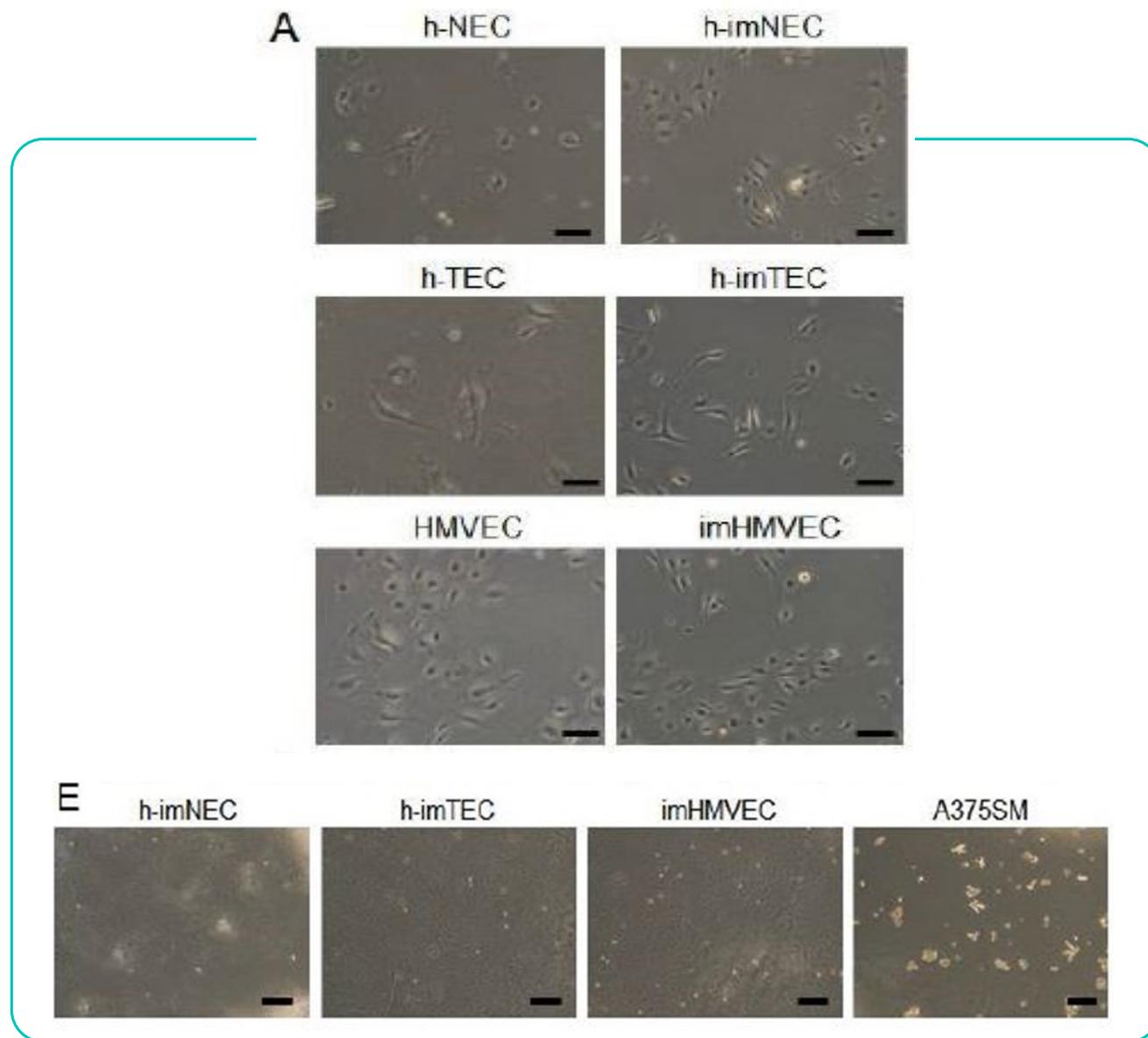


Figura 3 A,E

# RISULTATI

## 2.4 Mantenimento dei caratteri specifici delle TEC nelle EC immortalizzate

E' stato visto come nelle **TECs** rispetto alle NECs, **si ha una differente espressione** di geni coinvolti nella progressione tumorale come *biglycan (Bgn)* e *lisylossidasi (Lox)*.

*Bgn* è coinvolto nella migrazione delle TEC e nella formazione del tubo, e stimola le cellule tumorali a metastatizzare nei polmoni.

*Lox* è un enzima che catalizza la formazione di aldeidi in precursori del collagene e elastina così formando legami cross-link.

# RISULTATI

## 2.4 Mantenimento dei caratteri specifici delle TEC nelle EC immortalate

E' stato visto come le **TECs** rispetto alle NECs, **aumentano la regolazione** di *biglycan* (*Bgn*) e *lisylossidasi* (*Lox*).

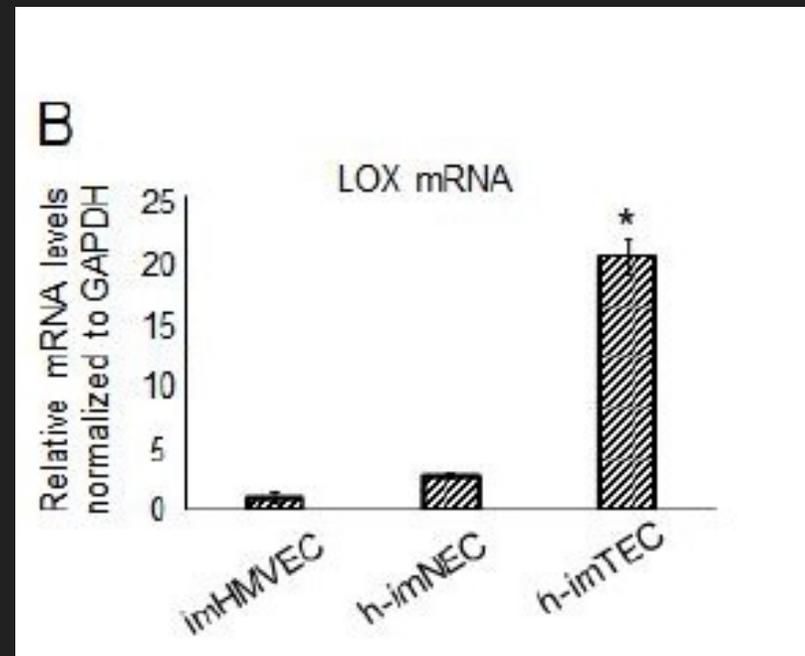
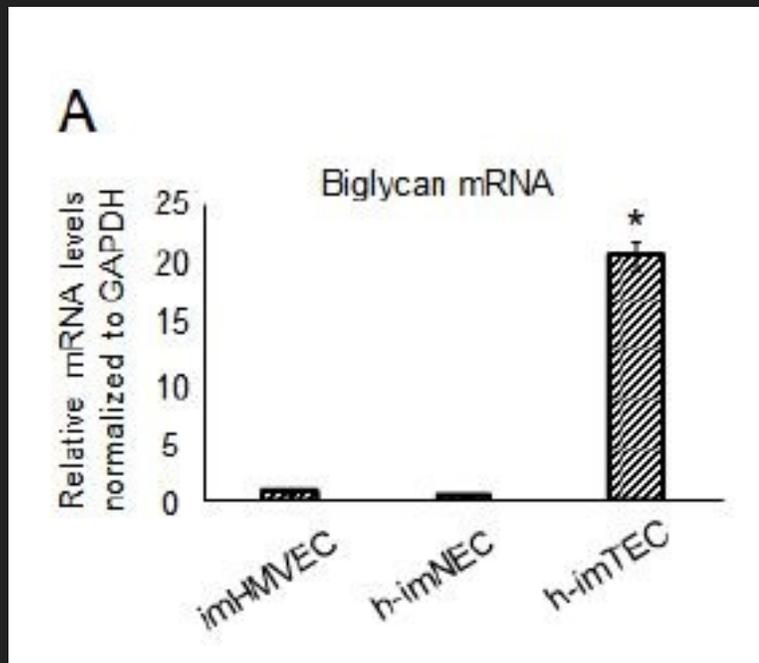


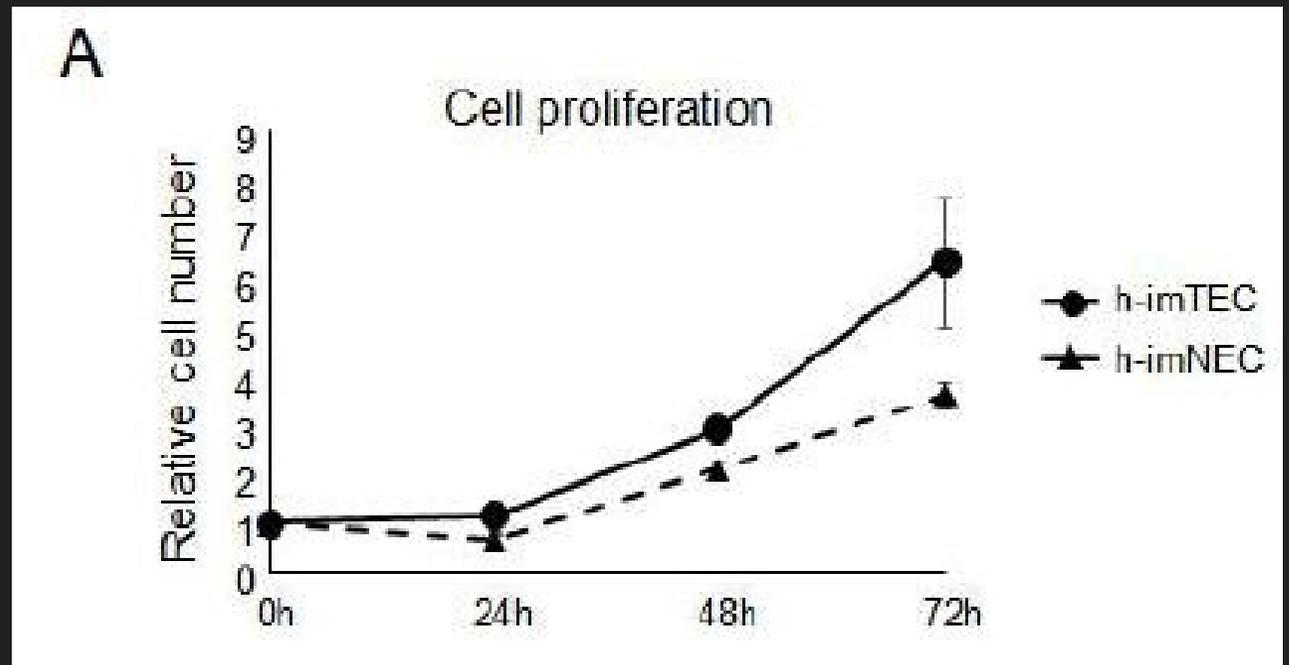
Figura 4 A,B

# RISULTATI

## 2.4 Mantenimento dei caratteri specifici delle TEC nelle EC immortalate

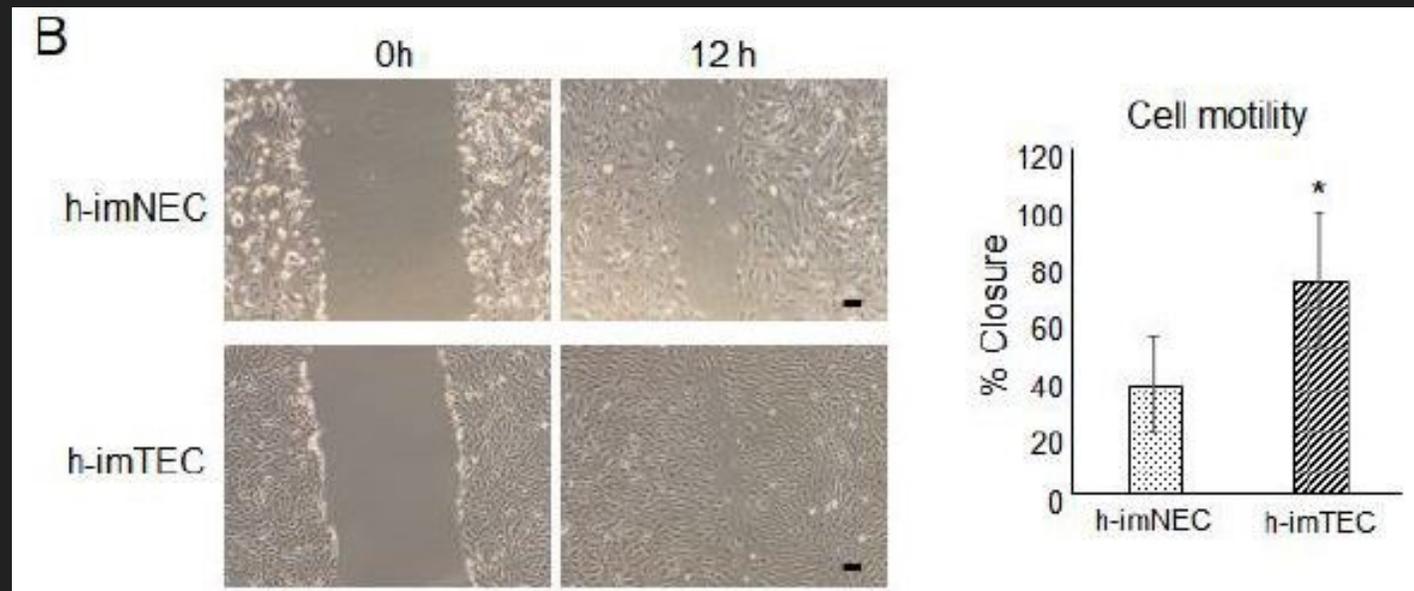
Analizzando poi la proliferazione attraverso il conteggio delle cellule, si è osservato che **h-imTECs** effettivamente **prolifera più velocemente di h-imNECs** (Figura 5A).

Inoltre, è stato eseguito un test di motilità per verificare la capacità di migrazione tra h-imNECs e h-imTECs. **h-imTECs è migrato più velocemente di h-imNECs** (Figura 5B).



Nako et al., 2019 Int. J. Mol. Sci; 20,4595

Figura 5 A,B



# RISULTATI

## 2.4 Mantenimento dei caratteri specifici delle TEC nelle EC immortalate

Le **analisi del cariotipo** da Q-banding hanno, in oltre, dimostrato che h-imTECs presentano cariotipi più complessi e con più anomalie rispetto a h-imNECs. (Figura 6A)

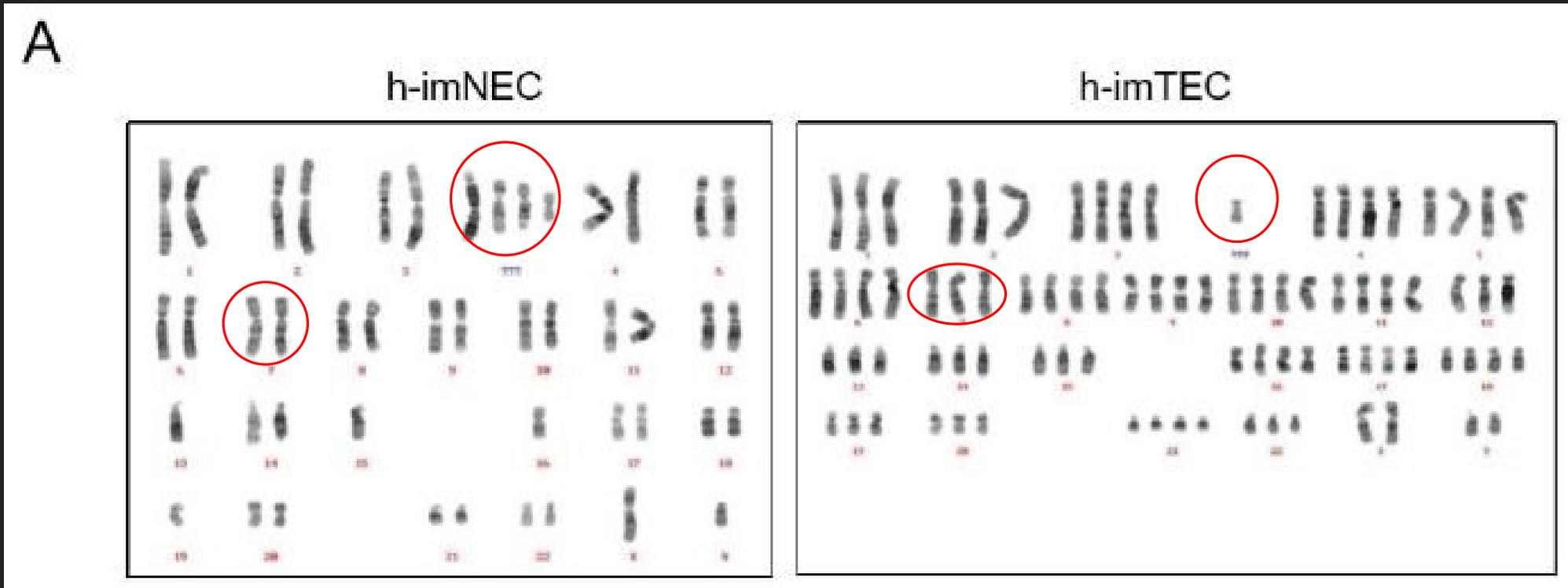


Figura 6°  
Nako et al., 2019 Int. J. Mol. Sci; 20,4595

# RISULTATI

## 2.4 Mantenimento dei caratteri specifici delle TEC nelle EC immortalate

Confrontando la risposta delle h-imNECs e h-imTECs al farmaco antitumorale *Paclitaxel*, si può vedere come a dosi elevate, il farmaco agisca in modo importante sia sulle TECs che sulle NECs. (Figura 6D)

Infine le CE immortalizzate sono state trattate con *Bevacizumab*, farmaco antiangiogenico. Esso ha **inibito più specificatamente la sopravvivenza delle TECs** rispetto alle h-imNEC e h-imHMVEC. (Figura 7)

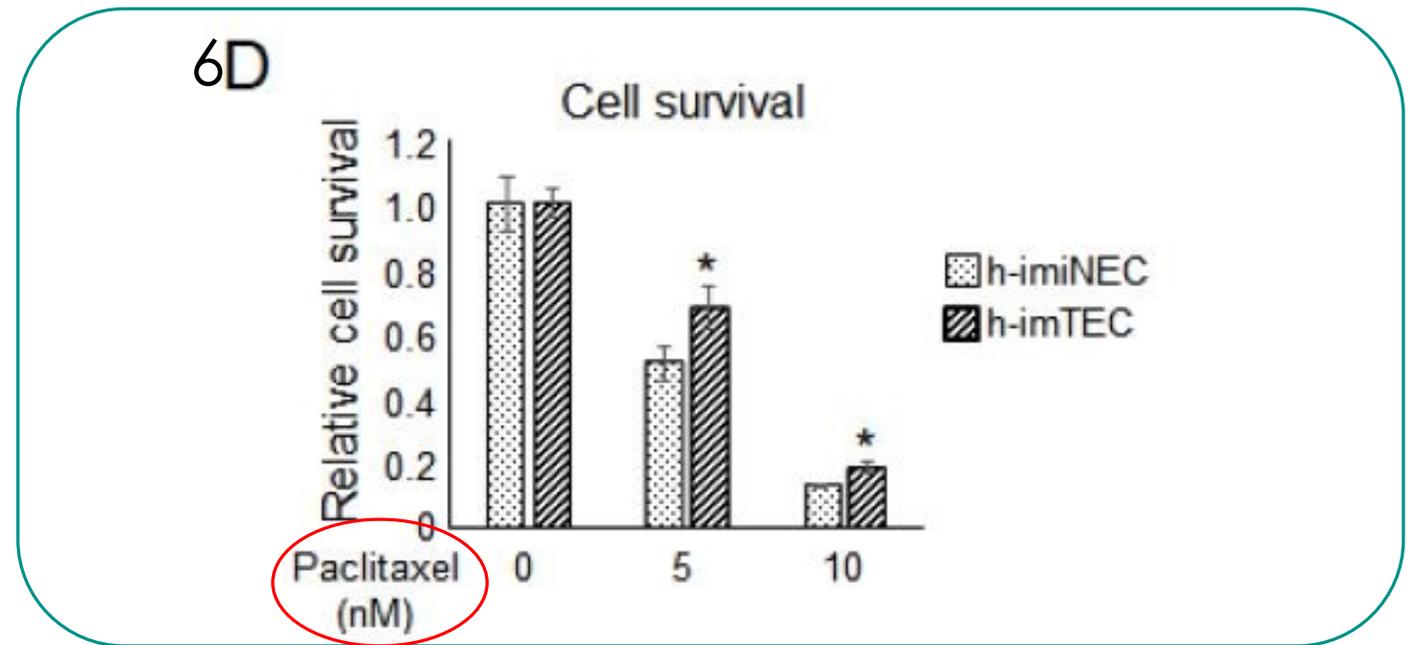
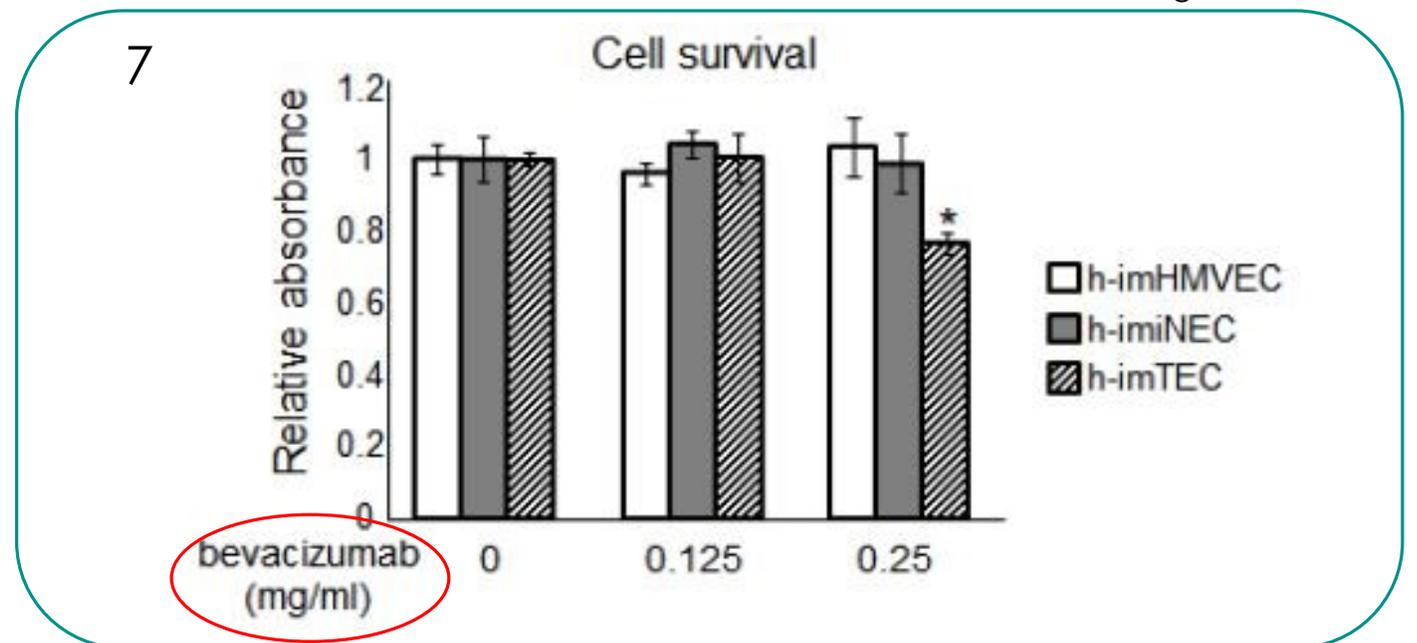


Figura 6D-7



# CONCLUSIONI

- Le TECs immortalizzate, utilizzando SV40 e la telomerasi, presentano una sovraespressione dei geni *Bgn* e *Lox*.
- Le h-imTECs presentano maggiori anomalie cromosomiche rispetto a h-imNECs.
- Il Bevacizumab ha inibito maggiormente la proliferazione delle TECs e rispetto alle NECs.

**Dunque queste cellule possono essere utili per testare in maniera maggiormente selettiva i farmaci anti-angiogenetici.**

# BIBLIOGRAFIA:

Nako Maishi, Hiroshi Kikuchi, Masumi Sato, Hiroko Nagao-Kitamoto, Dorcas A. Annan, Shogo Baba, Takayuki Hojo, Misa Yanagiya, Yusuke Ohba, Genichiro Ishii, Kenkichi Masutomi, Nobuo Shinohara, Yasuhiro Hida and Kyoko Hida 2019. Development of Immortalized Human Tumor Endothelial Cells from Renal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(18), 4595; <https://doi.org/10.3390/ijms20184595>