



UNIVERSITA' DI PISA
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di laurea magistrale in Biotecnologie Molecolari ed Industriali

TESI DI LAUREA

“Materiali nanostrutturati: effetti su adesione e proliferazione cellulare”

Relatori

Prof.ssa Vittoria Raffa

Prof.ssa Luciana Dente

Dott.ssa Marianna Giannini

Candidata

Chiara Primerano

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. La cellula e le sue interazioni	3
1.2. Adesione cellulare e Meccanotrasduzione	7
1.2.1. L'importanza delle adesioni cellula-substrato	7
1.2.2. Meccanotrasduzione integrina-mediato	9
1.2.2.1. Dal substrato alla membrana cellulare	10
1.2.2.2. Dalla membrana al citoscheletro	10
1.2.2.3. Dal citoscheletro al nucleo	14
1.2.3. La proteina FAK (Focal Adesion Kinase)	15
1.3. L'adesione cellulare, il ciclo cellulare e la proliferazione cellulare	17
1.4. Influenza della strutturazione del substrato	22
1.4.1. Influenza sull'adesione cellulare	23
1.4.2. Influenza sulla polarità cellulare	25
1.4.3. Influenza sulla migrazione cellulare	27
1.4.4. Influenza sulla divisione cellulare	30
1.5. Risposta dei tessuti all'impianto di materiali	32
1.6. Il Bario titanato nano strutturato	34
1.7. Scopo della tesi	40
2. MATERIALI E METODI	41
2.1. Sintesi dei substrati	41
2.2. Colture cellulari	42
2.3. Marcatura tramite EdU	44
2.4. Studi di proliferazione cellulare: marcatura EdU per lo studio della fase G1	45
2.5. Marcatura tramite EdU delle cellule in fase S, doppia marcatura EdU-p-istoneH3	46
2.6. Marcatura EdU sui cloni MEF Tet-FAK WT, Tet-FAK F397	47
2.7. Citofluorimetria	47
2.8. Vitalità cellulare	48
2.9. Marcatura tramite fosfo-istone H3 delle cellule in fase M	49
2.10. Cell detachment assay	49
3. RISULTATI	50

3.1.	Sintesi dei substrati	50
3.2.	Studi di proliferazione cellulare: marcatura EdU	52
3.3.	Citofluorimetria: marcatura fosfo-istone H3	53
3.4.	Vitalità cellulare	54
3.5.	Studi di proliferazione cellulare: marcatura EdU per lo studio della fase G1	56
3.6.	Fosfo-istone H3	57
3.7.	Marcatura tramite EdU delle cellule in fase S, doppia marcatura EdU-p-istoneH3	57
3.8.	Marcatura EdU sui cloni MEF Tet-FAK WT, Tet-FAK F397	58
4.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	59
5.	BIBLIOGRAFIA	64

Riassunto

La meccanotrasduzione è il processo mediante il quale uno stimolo meccanico è trasferito, tramite l'adesione, dalla membrana cellulare al nucleo, con conseguente modulazione dell'espressione genica, facilitando la risposta cellulare adattativa. La meccanotrasduzione è fondamentale per processi cellulari, come la sopravvivenza delle cellule, la crescita e la differenziazione. Superfici modellate topograficamente (generalmente micro o nano-strutturate) offrono un prezioso strumento non invasivo nella valutazione della risposta cellulare a tali stimoli e una maggiore comprensione delle interazioni all'interfaccia cellula/materiale. Le informazioni che ne derivano hanno importanti risvolti nell'ingegnerizzazione di una nuova generazione di dispositivi impiantabili nei tessuti. Un importante gruppo di recettori transmembrana che collegano meccanicamente la cellula al substrato (o matrice extracellulare) sono le integrine. Uno dei numerosi meccanismi di segnalazione delle integrine dipende da una tirosina chinasi citoplasmatica mecano-sensibile chiamata FAK (Focal Adhesion Kinase). Le giunzioni chiamate "adesioni focali" influenzano profondamente la fisiologia cellulare e il loro rafforzamento è generalmente associato ad un incremento della migrazione e proliferazione cellulare.

Il presente lavoro di tesi è inserito all'interno di una ricerca più ampia che ha come scopo lo sviluppo di nuovi substrati impiantabili per la modulazione della risposta cellulare. I biomateriali, quando vengono impiantati in tessuti viventi, producono una risposta da parte di questi ultimi; giacché tale risposta causa la formazione di una capsula fibrosa che porta all'isolamento del materiale impiantato ed alla perdita dell'interfaccia, la sfida è quella di identificare materiali impiantabili che non vengano incapsulati dai fibroblasti. Studi precedenti al presente lavoro di tesi, condotti nel laboratorio della Prof. Raffa, hanno evidenziato come substrati nano-strutturati di bario titanato presentino interessanti proprietà in tal senso (Giannini et al., 2014); mentre dati riportati in letteratura suggeriscono che la nano-strutturazione possa promuovere l'adesione cellulare, il rafforzamento delle adesioni focali e la progressione del ciclo cellulare (Zheng et al., 2012), nel lavoro citato prima è stato osservato come la nano-strutturazione rallenti la progressione del ciclo cellulare, senza però in alcun modo inficiare la vitalità cellulare.

Tale meccanismo potrebbe essere efficacemente sfruttato in vivo per inibire la formazione della capsula fibrotica intorno all'impianto.

Scopo della presente tesi è quello di analizzare i meccanismi molecolari alla base di tali osservazioni sperimentali andando ad approfondire lo studio dell'effetto della nanostrutturazione su linee cellulari di fibroblasti murini, analizzandone l'influenza sull'adesione e sul ciclo cellulare e verificando se la proteina FAK svolga un ruolo significativo in tali meccanismi.

In particolare, è stato osservato che il rallentamento della progressione del ciclo cellulare dipende soltanto dalla nanostrutturazione e non dipende da nessun effetto connesso a potenziale tossicità. Inoltre i dati raccolti ci consentono di affermare che le cellule coltivate su nanotubi stazionano in fase G1 più a lungo (precisamente il doppio) rispetto al controllo. Si è riscontrato anche un leggero ritardo nella fase G2, ma nessuna variazione nella fase M. Il target molecolare dunque potenzialmente coinvolto in questo fenomeno andrebbe ricercato in un pathway importante per la transizione G1/S o per la fase G2. In aggiunta, un esperimento con l'utilizzo di fibroblasti murini embrionali con sistema FAK inducibile TET ON, sembra escludere un coinvolgimento di FAK.

L'ipotesi formulata alla luce di queste osservazioni è che il blocco dovuto alla nanostrutturazione possa dipendere da meccanismi molecolari coinvolti nella meccano-trasduzione substrato/membrana/citoscheletro/nucleo.

1. INTRODUZIONE

1.1 La cellula e le sue interazioni

Le cellule all'interno di organi e tessuti, sono incorporate in un microambiente altamente strutturato e sono molto sensibili ai vincoli geometrici e meccanici di quest'ultimo. Il microambiente cellulare, formato dalla matrice extracellulare (ECM) e dalle cellule vicine, impone specifiche condizioni al contorno, che non influenzano solo architettura cellulare e meccanica, ma anche la polarità e le funzioni della cellula. La dimensione del microambiente limita il volume cellulare e la diffusione cellulare. La sua struttura, cioè il posizionamento di cellule adiacenti, la posizione e l'orientamento delle fibre della ECM, detta le distribuzioni spaziali dell'adesione cellulare. La composizione biochimica e la rigidità del microambiente determinano i fattori coinvolti nell'adesione cellulare, e influenzano quindi vie di segnalazione intracellulare. Questi *pathways* determinano successivamente l'assemblaggio e la dinamica delle reti del citoscheletro (Figura 1).

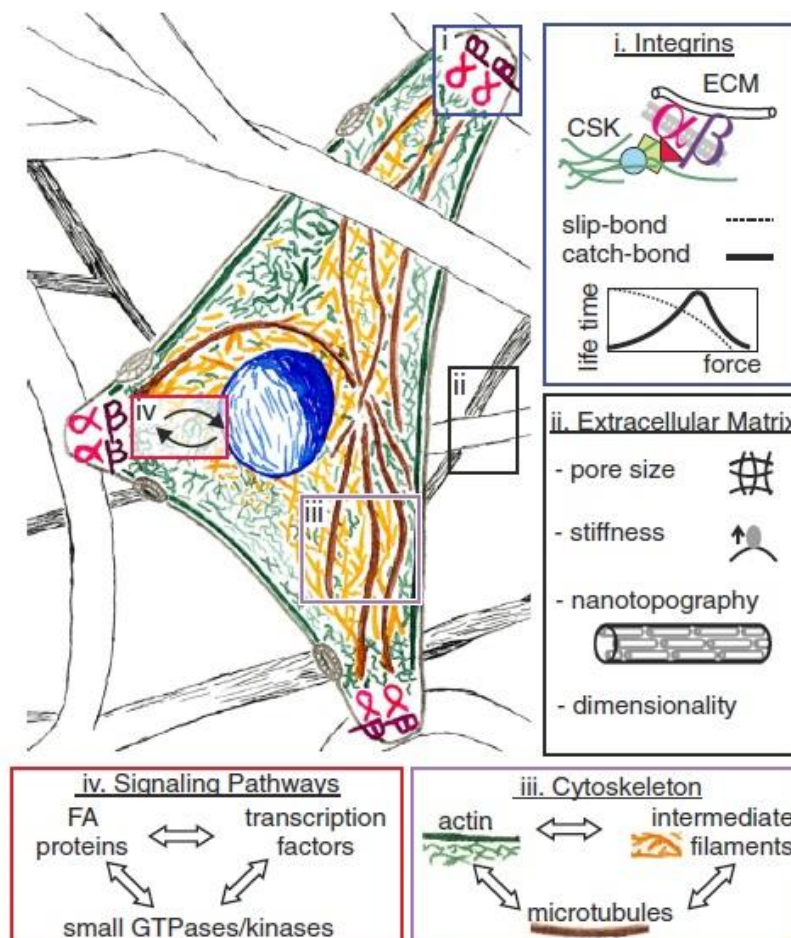


Figura 1. Schema che mostra una cellula all'interno di una rete fibrosa extracellulare 3D (Jansen et al., 2015).

Il citoscheletro è una rete che riempie lo spazio di filamenti proteici e permette alle cellule di mantenere la loro forma e resistenza meccanica. Questo consente alle cellule di sopportare forze esterne, mentre allo stesso tempo essere dinamiche e auto-deformanti. Il citoscheletro nelle cellule dei mammiferi comprende tre tipi di filamenti proteici: actina, microtubuli e filamenti intermedi. Actina e microtubuli sono filamenti polari con due estremità strutturalmente distinte, che sono in grado di generare forze di spinta e di trazione accoppiando la polimerizzazione all'idrolisi dei nucleotidi (GTP). Al contrario, i filamenti intermedi (FI) non sono polari e sono più stabili. Tutti e tre i filamenti possono essere classificati come polimeri semi flessibili influenzati dalle fluttuazioni termiche. Actina e filamenti intermedi sono generalmente considerati come la principale fonte di rigidità delle cellule, mentre i microtubuli, essendo più rigidi, possono fornire resistenza alle forze di compressione; reti purificate di actina e filamenti intermedi aumentano la loro rigidità sotto l'influenza della forza. In altre parole, queste reti possono irrigidirsi in risposta a sforzi di taglio o di trazione. Questo fenomeno permette alle cellule, per esempio, di irrigidire attivamente il proprio citoscheletro su substrati duri grazie alla contrazione dei motori di miosina. Inoltre, l'irrigidimento dei filamenti intermedi consente di evitare l'eccessiva deformazione di cellule e tessuti epiteliali (Jansen et al., 2015).

Le cellule percepiscono ed elaborano attivamente le informazioni meccaniche che vengono fornite dall'ambiente extracellulare per prendere decisioni sulla crescita, la motilità e la differenziazione. Parte di questi stimoli sono rappresentati dalle proprietà meccaniche della ECM. La ECM è un complesso reticolo proteico che forma l'impalcatura a cui le cellule aderiscono. Esso fornisce supporto meccanico alle cellule ed ai tessuti, e agisce come una riserva per fattori di crescita, citochine ed enzimi proteolitici. Ci sono due grandi classi di ECM: membrana basale e tessuto connettivo. Le membrane basali sono strutture sottili che forniscono un substrato bidimensionale (2D) su cui cellule polarizzate, quali cellule epiteliali ed endoteliali, aderiscono. I suoi componenti principali sono la laminina, collagene IV, nidogeno e proteoglicani eparan solfato. Al contrario, i tessuti connettivi forniscono uno *scaffold* 3D fibroso i cui componenti strutturali sono principalmente collagene fibrillari, proteoglicani e glicosaminoglicani. Il diametro e l'organizzazione delle fibre di collagene sono adattati alla funzione biomeccanica di ogni tessuto. Le fibrille sono, per esempio, spesse e allineate in tessuti rigidi come i tendini per garantire la resistenza alla trazione, mentre sono sottili ed organizzate in griglie nella

cornea per assicurare la trasparenza ottica. Proteoglicani e glicosaminoglicani sono macromolecole idrofile che formano una matrice di sfondo per le fibre di collagene, che facilitano la ritenzione idrica ed influenzano la migrazione delle cellule e la deposizione della ECM. Quest'ultima contiene anche componenti non strutturali che modulano le interazioni cellula-ECM. Muovendosi sotto l'influenza di forze, le proteine della ECM possono anche agire come meccanotrasduttori esponendo siti criptici e fattori di crescita (Jansen et al., 2015).

E' importante capire i meccanismi che sono alla base dell'elaborazione delle informazioni provenienti dalla ECM perché la deregolamentazione delle proprietà meccaniche della ECM è implicata in varie malattie, come il cancro e la fibrosi. Inoltre, la conoscenza della risposta cellulare agli stimoli meccanici provenienti dal microambiente cellulare può essere sfruttata per programmare, ad esempio, la differenziazione delle cellule staminali per sistemi *organ-on-chip* oppure per applicazioni in medicina rigenerativa (Jansen et al., 2015). Un'altra applicazione fondamentale di tali conoscenze consiste nell'elaborare nuove e più efficaci criteri di progettazione di *scaffold* o qualunque biomateriale inteso come impiantabile. Purtroppo, la quasi totalità degli stimoli biomeccanici provenienti dal microambiente extracellulare sono completamente annullate in condizioni di coltura cellulare classica. Nelle piastre Petri, le cellule incontrano un substrato di adesione omogeneo che è piatto, rigido e vasto, e quindi ha poco in comune con le caratteristiche *in situ* del microambiente reale (Figura 2).

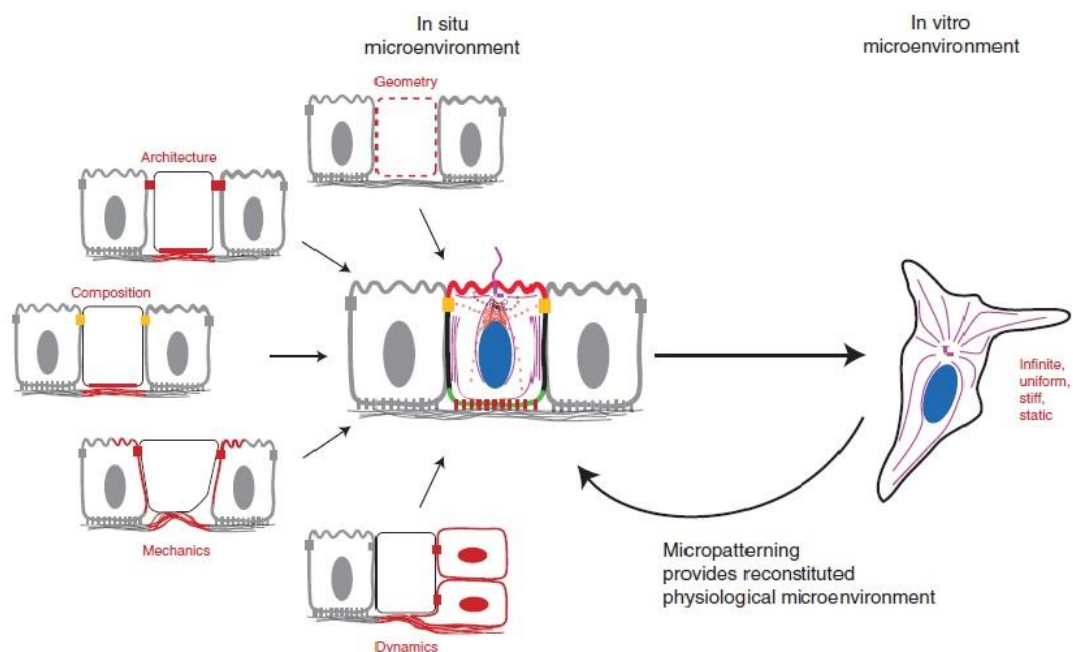


Figura 2. Il microambiente cellulare *in situ* ed *in vitro* (Manuel Théry, 2010).

Tali condizioni sono state utilizzate per decenni per stimolare la crescita delle cellule e mantenere le cellule vive fuori del contesto del loro tessuto nativo, ma, tuttavia, rimangono altamente artefatte. Tecniche di micro-ingegneria forniscono strumenti per modificare le proprietà chimiche dei substrati di coltura cellulare su scala sub-cellulare. Quindi possono essere utilizzate strutture microstrutturate per limitare la posizione e la forma delle regioni di substrato in cui le cellule si possono attaccare (Manuel Théry, 2010). Anche se artificiali, i substrati microstrutturati permettono la ricostituzione di condizioni fisiologiche simili a quelle dei tessuti per colture cellulari *in vitro* e sono stati utilizzati per rivelare fondamentali processi morfogenetici della cellula. La microstrutturazione cellulare comprende la fabbricazione e l'uso di un substrato di coltura con caratteristiche microscopiche che fornisce alla cellula dei "siti di adesione". A titolo esemplificativo in *figura 3* sono riportati alcuni esempi di substrati micro o nanostrutturati. Esistono diverse tecniche per la preparazione di tali substrati ma più comunemente essi sono realizzati per asportazione di materiale a partire da una superficie in modo tale che la lavorazione lasci dei rilievi superficiali che forniscono i cosiddetti siti di adesione. La distanza tra due siti adiacenti fornisce la cosiddetta *feature* che è un parametro fondamentale nello studio dell'influenza della topografia sull'adesione cellulare. Si tratta dunque di un metodo molto efficiente per studiare la sensibilità e la risposta di una cellula a specifici segnali microambientali (Manuel Théry, 2010).

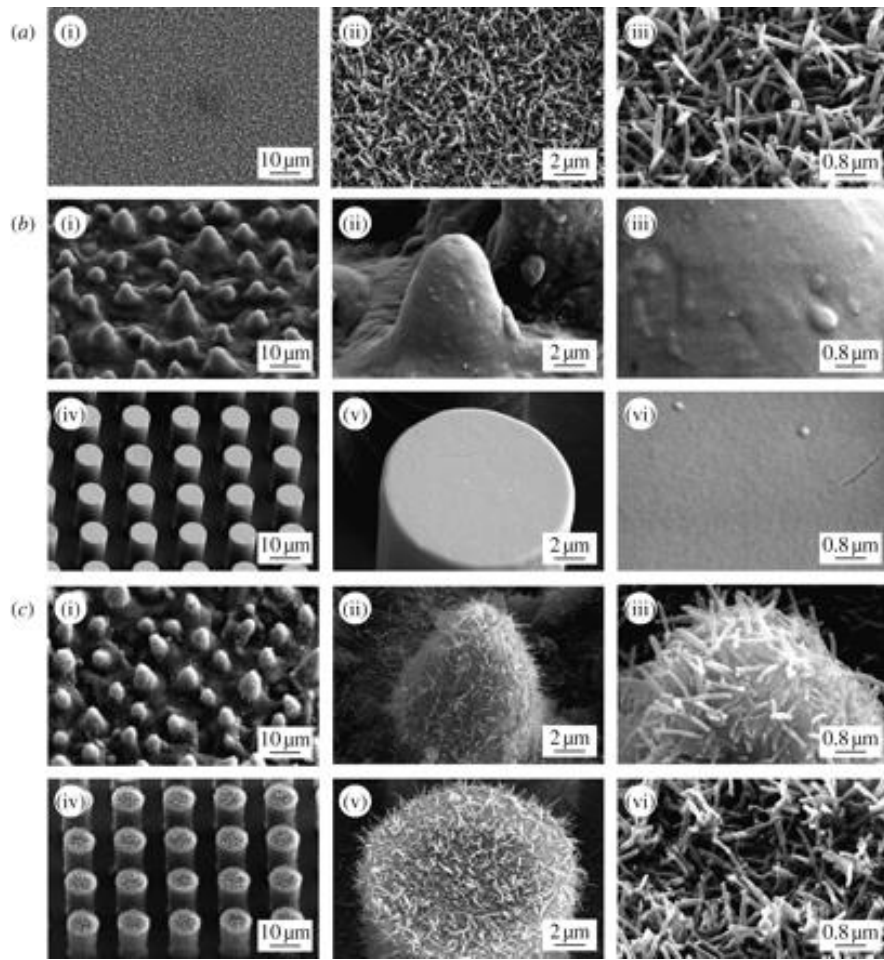


Figura 3. Esempi di substrati micro o nanostrutturati (Koch et al., *Soft Matter*, 2009).

1.2 Adesione cellulare e Meccanotrasduzione

1.2.1 L'importanza delle adesioni cellula-substrato

L'adesione cellulare è un fenomeno di grande importanza nella vita delle cellule. Il meccanismo di adesione cellulare coinvolge complessi proteici multimolecolari, che si formano grazie all'interazione dei recettori di adesione transmembrana con le proteine strutturali del citoscheletro e le molecole di trasduzione del segnale (Kenneth et al., 1997). L'adesione cellula-cellula e cellula-ECM controlla l'orientamento della struttura interna di ciascuna cellula. La creazione e la rottura degli attacchi ed il modellamento della matrice regolano il modo in cui le cellule si muovono all'interno dell'organismo, guidandole durante la crescita, lo sviluppo e la riparazione. Per questo l'apparato delle giunzioni cellulari, dei meccanismi di adesione cellulare e della ECM è cruciale per ogni aspetto dell'organizzazione, della funzione e della dinamica delle strutture pluricellulari

(Alberts et al., Biologia molecolare della cellula, quinta edizione 2009). Altre adesioni importanti sono quelle cellula-substrato.

Le cellule sono in grado di formare strutture forti e stabili grazie a due tipi di adesioni, quelle cellula-cellula e quelle cellula-matrice. Le cellule possono attaccarsi le une alle altre attraverso giunzioni cellule-cellula dirette o possono essere legate tramite il materiale extracellulare che esse secernono, formando una struttura pluricellulare organizzata. Infatti, alcuni tipi cellulari non sono in grado di proliferare in assenza di adesione ad una matrice (Alberts et al., Biologia molecolare della cellula, quinta edizione 2009). Le adesioni cellula-cellula uniscono i citoscheletri di cellule adiacenti e sono distribuite in relazione a diversi tipi di giunzione che possono formare. In ciascun tipo di giunzione, il ruolo centrale è svolto dalle proteine di adesione transmembrana che attraversano la membrana, con una estremità connessa al citoscheletro all'interno della cellula e l'altra estremità connessa ad altre strutture al di fuori di essa. Queste molecole transmembrana rientrano in due superfamiglie: le proteine della superfamiglia delle caderine mediano soprattutto l'attacco tra una cellula e l'altra, mentre nell'adesione cellula-substrato troviamo recettori di integrine che sono composte da due subunità glicoproteiche associate in modo non covalente dette α e β . (Alberts et al., Biologia molecolare della cellula, quinta edizione 2009) (Figura 4).

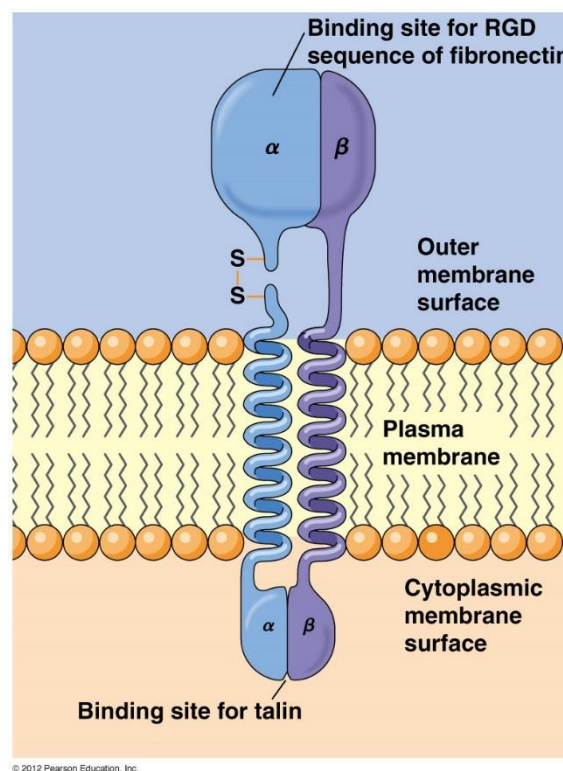


Figura 4. Struttura delle integrine.

1.2.2 Meccanotrasduzione integrina-mediato

La meccanotrasduzione è il processo mediante il quale gli stimoli meccanici sono trasferiti dalle adesioni cellulari al nucleo, con conseguente modulazione genica e proteica che facilita la risposta cellulare adattativa. La mecano-segnalazione biochimica e la meccanotrasduzione diretta 'fisica' (che coinvolge un esercizio di forza dal citoscheletro sul nucleoscheletro) sono entrambi importanti per il trasferimento di segnali meccanici dall'ambiente extracellulare al nucleo (McNamara et al., 2012). Il microambiente cellulare fisiologico è costituito da fibre della matrice extracellulare, cellule adiacenti e fluidi extracellulari. Il macchinario di adesione cellulare, composto da diverse proteine tra cui le integrine, è il primo componente cellulare che vi entra in contatto. In seguito al legame di ligandi extracellulari, viene indotta una segnalazione localizzata con successivo assemblaggio del citoscheletro. Questi eventi localizzati interessano l'intera architettura cellulare, perché lo spazio intracellulare è fisicamente collegato e sostenuto meccanicamente da un equilibrio dinamico tra tutti i componenti (Ingber, 2003; Ingber, 2006).

Le cellule sono sottoposte a forze di due tipi: quelle applicate dall'ambiente e quelle che la cellula stessa genera (Lessey et al., 2012; Plotnikov, et al., 2013). Esternamente le forze applicate includono uno sforzo di taglio generato dal flusso di fluidi sulle cellule, come le forze alle quali le cellule sono sottoposte quando sono compresse, estese o allungate. In risposta a forze esterne o altri stimoli, le cellule possono generare forze interne sia estendendo le membrane sia riordinando il loro citoscheletro di actina, producendo in tal modo forze contrattili endogene (DeMali et al., 2014).

Esternamente le forze applicate vengono rilevate da numerosi recettori di adesione della superficie cellulare (Rakshit et al., 2014; Thomas et al., 2008; Leckband et al., 2014; Stapleton et al., 2014; Ross et al., 2013; Marjoram et al., 2014). Le integrine sono un esempio importante di recettore impegnato a percepire le forze. La risposta delle integrine alla forza prevede tre passaggi meccanochimici (Roca-Cusachs et al., 2009). Le integrine devono prima legarsi alle molecole della matrice extracellulare (o attivarsi). In secondo luogo, queste forze devono essere trasmesse all'interno della cellula dove sono convertite in segnali biochimici (meccanotrasduzione). Infine, integrine si collegano al citoscheletro per trasmettere le forze in tutta la cellula e rafforzare le adesioni per resistere alle forze (Choquet et al., 1997). Per facilitare la loro attivazione e la risposta alla

forza, le integrine reclutano (all'interno della cellula) grandi insiemi molecolari di proteine del citoscheletro e/o di segnalazione per formare un complesso noto come adesione focale (AF). Molti dei componenti citoplasmatici delle adesioni focali, rispondono e sopportano la forza applicata alle integrine (DeMali et al., 2014).

1.2.2.1 Dal substrato alla membrana cellulare

Le integrine sono eterodimeri transmembrana formati da subunità alfa e beta che esistono in una conformazione piegata o dritta a seconda della loro interazione con i ligandi della matrice extracellulare.

Un passo per adottare la conformazione verticale è il legame alla talina, una proteina da 270 kDa che si lega all'actina, sul dominio citoplasmatico della subunità β delle integrine (Calderwood et al., 1999; Tadokoro et al., 2003). Il legame alla talina si verifica nelle prime adesioni cellula-matrice osservate, avviene in modo indipendente dalla tensione e separa le code citoplasmatiche α e β delle integrine (Zhu et al., 2008). Questa separazione innesca cambiamenti conformazionali che aumentano l'affinità delle integrine per i ligandi e che iniziano l'assemblaggio dell'adesione nascente (Tadokoro et al., 2003). La talina poi si lega alla F-actina direttamente e indirettamente attraverso la vinculina, una proteina legante l'actina di 116 kDa (Horwitz et al., 1986). La vinculina stabilizza il legame con la talina, sostenendo in tal modo l'attivazione delle integrine e la trasmissione costante della forza (del Rio et al., 2009; Yao et al., 2014).

1.2.2.2 Dalla membrana al citoscheletro

Come descritto in precedenza, la talina può servire da collegamento tra integrine ed actina citoscheletrica; tuttavia, il suo partner di legame, la vinculina, può giocare un ruolo più importante (Figura 5). La vinculina viene reclutata alle adesioni focali quando viene applicata tensione direttamente alle integrine (Galbraith et al., 2002) o viene generata durante la migrazione delle cellule (Balaban et al., 2001). Il reclutamento della vinculina richiede la talina, ma può essere coinvolta anche un'altra proteina di adesione focale nota come paxillina (Pasapera et al., 2010). Il legame diretto all'actina citoscheletrica permette alla vinculina di sopportare la forza e regolare il reclutamento e il rilascio di diverse proteine, stabilizzando e promuovendo, in tal modo, la formazione delle adesioni focali (Grashoff et al., 2010; Carisey et al., 2013). Di conseguenza, non è sorprendente che le

cellule prive di vinculina non sono in grado di generare forze sulla ECM, sono meno rigide, e non rafforzano le loro adesioni focali in risposta alla forza applicata esternamente (Galbraith et al., 2002; Alenghat et al., 2000; Mierke et al., 2008).

La filamina, un altro componente delle adesioni focali, si lega direttamente al dominio citoplasmatico delle integrine e all'F-actina, rendendola pronta per trasdurre la forza a cui sono sottoposte le integrine sul citoscheletro (Figura 5) (Calderwood et al., 2001; Niederman et al., 1983). Prove del ruolo della filamina nella meccano-trasduzione nascono dall'osservazione che l'applicazione di sollecitazioni di taglio o deformazioni meccaniche aumentano il livello di legame di filamina alle integrine (Ehrlicher et al., 2011). Inoltre, fibroblasti di topo embrionali da topi portatori una delezione delle due isoforme della filamina, mostrano una grave interruzione nella trasmissione della forza (Lynch et al., 2011a; Lynch et al., 2011b).

Molti dei componenti della meccano-trasduzione tra adesioni cellula-matrice subiscono cambiamenti conformazionali che influenzano le loro interazioni con i ligandi (DeMali et al., 2014). Le forze provocano la distensione della talina e della filamina. La talina ha un dominio N-terminale FERM ed un dominio C-terminale a bastoncino che contiene molti siti di legame nascosti per la vinculina. Quando viene applicata la forza, questi siti di legame sono esposti, consentendo in tal modo di interagire con la talina e la vinculina (del Rio et al., 2009; Yao et al., 2014).

Aumentando la forza che viene applicata in modo lineare, Yao et al. hanno mostrato un primo dispiegamento della talina a 5 pN ed un completo svolgimento a 25 pN (Yao et al., 2014). Inoltre, gli autori hanno dimostrato un ripiegamento della talina ad un basso livello di forza, e questo ripiegamento può essere prevenuto con il legame alla vinculina (del Rio et al., 2009).

La filamina, un'altra proteina di adesione focale, ha un dominio di legame all'actina amino-terminale seguito da un dominio a bastoncino composto da 24 domini Ig. Nella sua conformazione spiegata, il filamento A del dominio IgG 20 della filamina si lega al dominio IgG 21, precludendo in tal modo al dominio IgG 21 di legarsi alle integrine. Questa interazione intramolecolare viene rilasciata quando è applicata una forza alla filamina, aumentando così il livello di interazione della filamina con le integrine (Rognoni et al., 2014). Questa autoinibizione può essere accelerata e/o può richiedere meno forza se la filamina viene dapprima fosforilata su un residuo critico di serina nel dominio IgG 20

(Chen et al., 2009). Quindi, la forza modula la composizione delle adesioni cellula-matrice, controllando l'accesso dei partner di legame alle loro controparti nella mecano-risposta. (DeMali et al., 2014). Un tema chiave è che le integrine dipendono dalla vinculina per trasmettere la forza (Figura 5). Non è completamente chiaro come la vinculina stabilizzi le adesioni cellula-matrice, ma esistono diverse possibilità (Figura 6). La vinculina può legarsi ai lati di filamenti esistenti e raggrupparli (Isenberg et al., 1982; Jockusch et al., 1982) e può stimolare la formazione di nuovi fasci di actina (Wen et al., 2009). Inoltre, in siti di nascenti di adesioni cellula-matrice, la vinculina può legarsi al complesso Arp2/3, un fattore di nucleazione dell'actina che si lega ai lati di filamenti di actina e induce la formazione di ramificazioni (DeMali et al., 2002). Filamenti ramificati di actina sono in grado di fornire una forza protrusiva e possono svilupparsi in altre strutture di actina che possono stabilizzare le adesioni cellulari. Infine, la vinculina può stabilizzare adesioni cellulari attraverso il reclutamento di altri modificatori dell'actina. La vinculina lega VASP, una proteina di legame dell'actina che promuove la lunghezza del filamento di actina impedendo la formazione del *cap* nella parte finale (Brindle et al., 1996; Bear et al., 2002). Quindi, la vinculina è importantissima per la trasmissione della forza in virtù della sua capacità di modificare filamenti di actina (DeMali et al., 2014). Infine, ci sono meccanismi per coppia di forze attivati da percorsi di segnalazione alle proteine delle adesioni focali. Ad esempio, i collegamenti tra le integrine e l'actina citoscheletrica sono formati da filamina, e la filamina può indirettamente attivare RhoA e dei suoi effettori a valle (Figura 5). Infatti, la forza attiva incrementi del livello di legame della filamina delle β -integrine e diminuisce il livello di legame alla proteina attivata dalla GTPasi Rac1, FilGAP (Ehrlicher et al., 2011). La FilGAP una volta liberata può quindi reprimere Rac1, e questa inibizione può portare all'attivazione di RhoA attraverso percorsi multipli (Burrige et al., 2004). È importante sottolineare che questo livello di regolamentazione è probabilmente solo una parte dei meccanismi di come alcuni componenti del citoscheletro si legano direttamente altri componenti di segnalazione della via di RhoA (Ueda et al., 2003). L'applicazione di forze sulle integrine innesca così percorsi multipli di attivazione della piccola GTPasi RhoA (Lessey et al., 2012; Marjoram et al., 2014). RhoA esiste sia in uno stato attivo (*GTP-bound*) che inattivo (*GDP-bound*), e l'oscillazione tra questi stati è regolata prevalentemente dall'attività di fattori di scambio del nucleotide guanina (GEFs) e da proteine attivate da GTPasi (GAPs).

Due GEFs, Rho GEF *leukemia-associated* (LARG) ed il fattore di scambio H1 del nucleotide guanina (GEF-H1), sono necessarie per l'attivazione RhoA in risposta a forze sulle integrine (Guilluy et al., 2011). L'inibizione dell'una o dell'altra GEF indebolisce la capacità delle integrine di attivare RhoA in risposta alla forza meccanica, ma è richiesta la deplezione di entrambe le proteine per bloccare completamente l'attivazione di RhoA (Guilluy et al., 2011). Una volta legato GTP, RhoA attiva i membri della famiglia Rho chinasi (ROCK) (Julian et al., 2014). Le isoforme ROCK1 e ROCK2 fosforilano direttamente la catena leggera della miosina (MLC) e regolano indirettamente MLC fosforilando e inibendo la fosfatasi della catena leggera della miosina.

L'attivazione di MLC risulta nell'assemblaggio della miosina II in filamenti e promuove l'interazione della miosina II con i filamenti di actina (Clark et al., 2007). La miosina II accoppia l'idrolisi di ATP a cambiamenti conformazionali che provocano lo scorrimento della miosina II e dei filamenti di actina uno contro l'altro, fornendo in tal modo la forza che riorganizza il citoscheletro di actina. Inoltre, la miosina II forma i fasci di filamenti di actina (Laevsky et al., 2003) e può regolare la polimerizzazione dell'actina (Rex et al., 2010). Questi cambiamenti indotti da miosina permettono alle cellule di riorganizzare e rafforzare il citoscheletro, promuovendo la formazione di adesioni mature in grado di sopportare la forza.

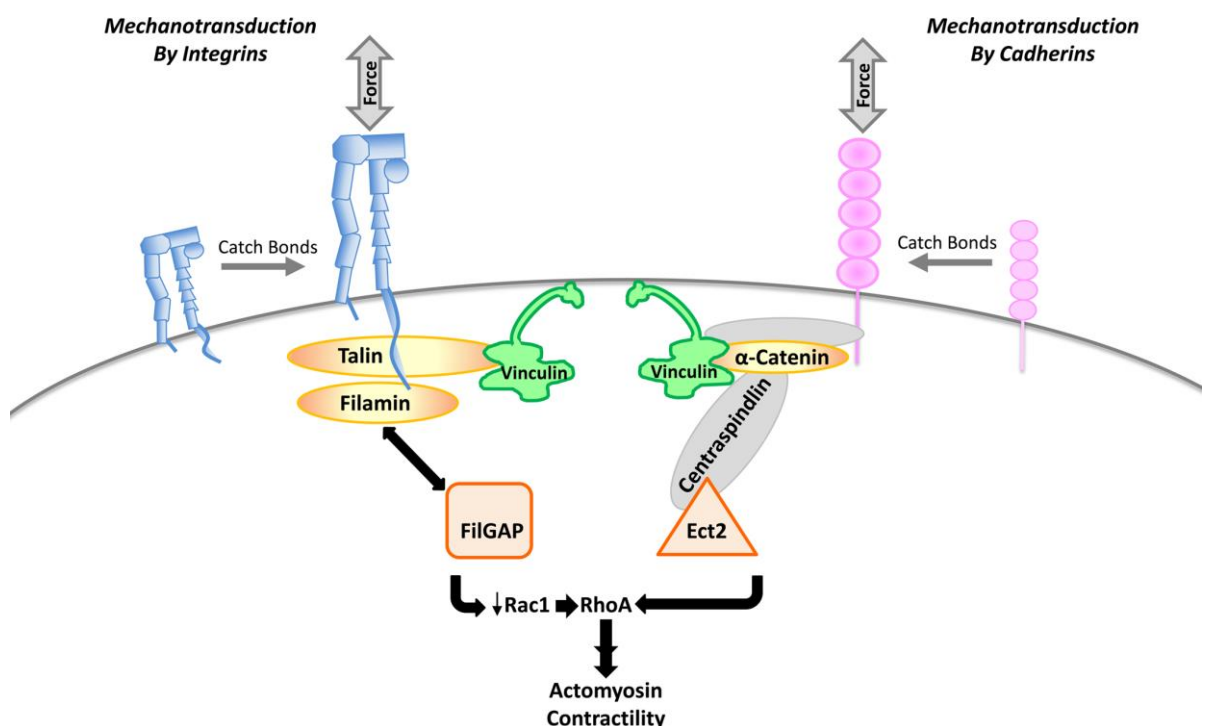
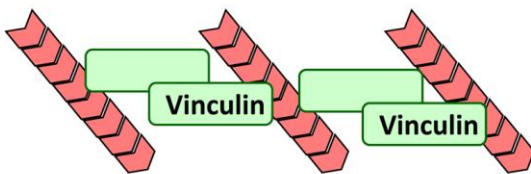


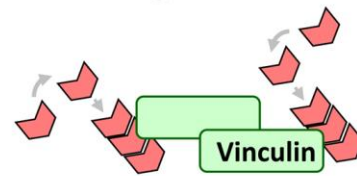
Figura 5. Esempio del modo in cui le integrine rispondono e trasmettono la forza. - In primo luogo, in risposta alla forza, le integrine (blu) formano legami con i loro con i loro ligandi (Curtinet al., 2006). La

frequenza di questi legami aumenta quando la tensione è elevata fino a raggiungere una forza massima. In secondo luogo, un certo numero di proteine (tra cui talina e filamina) sono richieste per i domini citoplasmatici delle integrine e subiscono cambiamenti conformazionali indotti da forze che espongono siti di legame per componenti di adesione aggiuntivi. In terzo luogo, le integrine hanno una dipendenza dalla vinculina, una proteina di legame all'actina reclutata per trasmettere forza al citoscheletro. Infine, le integrine collegano i loro componenti del citoscheletro a vie di segnalazione dipendenti da RhoA avendo come target le attività di attivatori/inibitori a monte (arancio). Le integrine si legano alla filamina in risposta alla forza e rilasciano il FilGAP, una proteina attivata da GTPasi per Rac1. FilGAP diminuisce il livello di Rac1, e ciò può portare ad una attivazione di RhoA.

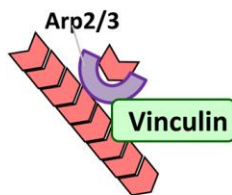
A. Bundling of actin filaments



B. Stimulating new actin bundles



C. Recruiting the Arp2/3 complex



D. Recruiting MENA/VASP

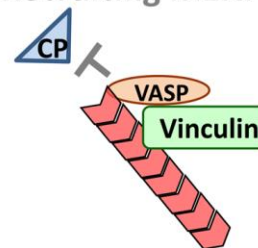


Figura 6. Potenziali meccanismi per la stabilizzazione della adesioni mediata da vinculina. La vinculina può legarsi ai lati di filamenti esistenti e raggrupparli (A) e può stimolare la formazione di nuovi filamenti di actina (B). Inoltre, in siti di nascenti di adesioni cellula-matrice, la vinculina può legarsi al complesso Arp2/3, un fattore di nucleazione dell'actina che induce la ramificazione sui lati dei filamenti di actina (C). Filamenti di actina ramificati sono in grado di fornire una forza protrusiva e possono svilupparsi in altre strutture di actina che possono stabilizzare la adesioni cellulari. Infine, la vinculina può stabilizzare le adesioni cellulari reclutando VASP, una proteina di legame dell'actina che regola la lunghezza dei filamenti di actina, impedendo la formazione del cap nella parte finale (D).

1.2.2.3 Dal citoscheletro al nucleo

I segnali meccanici che vengono trasmessi attraverso i componenti strutturali del citoscheletro alle AF hanno un ruolo chiave negli eventi che regolano la migrazione, la polarità e la proliferazione cellulare. Nel seguito focalizzeremo la nostra attenzione su quest'ultimo aspetto. Abbiamo detto che l'interazione col substrato viene tradotta in

forze endogene che interessano l'intera impalcatura citoscheletrica e questo senza dubbio influenza la proliferazione cellulare.

La famiglia delle Rho GTPasi, ad esempio, è coinvolta nella progressione del ciclo cellulare in diversi punti. L'attivazione dei membri della famiglia di Rho, Rac e Cdc42 può portare all'espressione di cicline D ed E (Assoian e Klein, 2008; Pruitt e Der, 2001). Le Rho GTPasi attivano la segnalazione anche alla fosfoinositide 3-chinasi (PI 3-chinasi), che attiva la proliferazione attraverso la via Akt.

Molto importante per la regolazione meccanica della proliferazione cellulare è l'osservazione che le cellule non possono procedere dalla fase G1 alla fase S in assenza di adesione integrina mediata, che sembra dipendere dalle Rho GTPasi. L'attivazione di Rho è necessaria per rimuovere l'inibizione della progressione del ciclo cellulare che è imposto da p21 e p27 (Zhang et al., 2009). Pertanto, una maggiore segnalazione integrina-mediata, che si verifica quando le cellule sono in matrici rigide, attiva la Rho GTPasi e promuove la progressione attraverso G1 con l'induzione di stimolatori del ciclo cellulare e la perdita di inibitori del ciclo cellulare (Provenzano et al., 2011).

Diversi tipi di cellule coltivate in matrici compatibili mostrano infatti una proliferazione diminuita e una maggiore differenziazione rispetto alle cellule coltivate in ambienti rigidi (Fringer e Grinnell, 2003; Grinnell et al., 2003; Helm et al., 2007; Koyama et al., 1996; Ng et al., 2005; Wang et al., 2000; Wozniak et al., 2003). Le matrici rigide, come detto, portano infatti ad una maggiore attivazione di Rho (Bhadriraju et al., 2007; Provenzano et al., 2009; Wozniak et al., 2003).

1.2.3 La proteina FAK (Focal Adesion Kinase)

Uno dei numerosi meccanismi di segnalazione delle integrine dipende da una tirosina chinasi citoplasmatica chiamata FAK (*Focal Adhesion Kinase*). Negli studi su cellule coltivate su substrati rigidi, le AF sono spesso siti importanti di fosforilazione su tirosina e FAK è una delle proteine principali fosforilate in tirosina, presente nelle AF (Alberts et al., *Biologia molecolare della cellula*, quinta edizione 2009). FAK è strutturalmente divisa in almeno tre domini principali (Figura 7). Il primo dominio si trova all'N-terminale e contiene un dominio di 4,1 proteina-ezrina-radixina-moesina (FERM). Domini FERM si trovano anche nelle proteine strutturali delle AF come la talina. I domini FERM facilitano le interazioni proteina-proteina, in particolare, il dominio FERM lega la proteina Arp2/3.

Arp2/3 è nota per essere una proteina di ramificazione delle fibre di F-actina e interagisce con N-WASP, che può interagire a sua volta con la vinculina (Claudia Tanja Mierke, 2013). Il secondo dominio è un dominio catalitico centrale e contiene il dominio chinasi (KD), che ha tre tirosine disponibili per la fosforilazione. La tirosina più importante è la tirosina alla posizione 397, perché la sua fosforilazione attiva completamente l'attività chinasi di FAK e, quindi, è un sito di autofosforilazione. Questo importante sito di fosforilazione si trova al dominio catalitico N-terminale e si lega alla famiglia delle Src chinasi. Diversi siti di fosforilazione della tirosina sono importanti per i ruoli di regolamentazione di FAK. Alcune analisi hanno mostrato che la delezione del dominio FERM di FAK ne inibisce l'attività enzimatica e reprime la segnalazione (Claudia Tanja Mierke, 2013). Il terzo dominio è il dominio C-terminale che viene ulteriormente suddiviso in due sottodomini: la sequenza target di adesione focale (FAT) (ultimi 140 aminoacidi al C-terminale di FAK) e la regione tra il dominio catalitico e la sequenza FAT. Sono stati trovati diversi siti di adesione focale associati a partner di legame del dominio FAT e a domini ricchi di prolina (a monte del dominio FAT), come paxillina, p130Cas e talina ed il recettore del fattore di crescita legato proteina 2 (Grb2), che agisce come proteina adattatore. In particolare, la sequenza C-terminale tra il dominio catalitico e la sequenza FAT contiene siti di attracco per il dominio SH3. Quindi, questi siti forniscono una matrice strutturale per l'ancoraggio di altre proteine di segnalazione (Claudia Tanja Mierke, 2013).

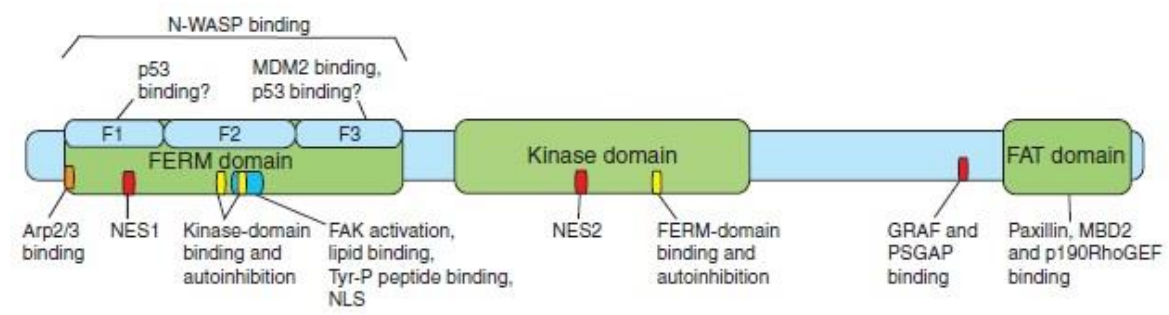


Figura 7. Struttura molecolare della proteina FAK (Michael D. Schaller, 2010).

Quando le integrine si raggruppano in siti di contatto cellula-matrice, FAK è reclutato a livello delle AF da proteine di ancoraggio intracellulari come la talina, che si lega alla subunità β dell'integrina, o la paxillina, che si lega ad un tipo di subunità α dell'integrina. Le molecole raggruppate di FAK si fosforilano a vicenda su una tirosina specifica, creando un sito di attacco fosforilato per la famiglia Src di tirosina chinasi citoplasmatiche. Oltre a

fosforilare altre proteine in corrispondenza dei siti di adesione, queste chinasi fosforilano FAK su altre tirosine, creando siti di attacco per varie proteine di segnalazione intracellulare. In questo modo, il segnale proveniente dall'esterno mediato dalle integrine è trasmesso nella cellula tramite FAK e le chinasi della famiglia Src (Alberts et al., *Biologia molecolare della cellula*, quinta edizione 2009).

Diversi studi dimostrano un ruolo di FAK nella meccano-trasduzione. Ad esempio, è stato dimostrato che il carico meccanico di cellule o tessuti influenza l'espressione o l'attivazione di FAK in un certo numero di tipi cellulari, come i fibroblasti (Moalli et al., 2001; Molina et al., 2001; Wang, J. G. et al., 2001). FAK è necessaria anche per l'osteogenesi indotta meccanicamente (Leucht et al., 2007) ed è implicata nel *mechanosensing* della migrazione dei fibroblasti (Wang, H. B. et al., 2001).

1.3 L'adesione cellulare, il ciclo cellulare e la proliferazione cellulare

L'unico modo per produrre una nuova cellula è per duplicazione di una cellula che già esiste. Una cellula si riproduce svolgendo una sequenza ordinata di eventi in cui duplica i suoi contenuti e si divide in due, questo meccanismo è noto come ciclo cellulare ed è il meccanismo essenziale per cui tutti gli esseri viventi si riproducono (Alberts et al., *Biologia molecolare della cellula*, quinta edizione 2009).

La durata del ciclo cellulare varia col variare della specie, del tipo di cellula e delle condizioni di crescita. È un processo geneticamente controllato, costituito da una serie di eventi coordinati e dipendenti tra loro, dai quali dipende la corretta proliferazione delle cellule. Gli eventi molecolari che controllano il ciclo cellulare sono temporalmente ordinati e direzionali: ogni processo è la diretta conseguenza dell'evento precedente ed è la causa di quello successivo. È caratterizzato da cinque fasi: G1, S, G2, mitosi e citodieresi. Affinché l'informazione genetica venga correttamente trasmessa dalla cellula madre alle cellule figlie, il genoma deve essere prima duplicato durante il periodo di tempo denominato fase S e, in seguito, i cromosomi vengono segregati nelle due cellule figlie durante la fase M.

La fase M è a sua volta composta da due processi, strettamente collegati: la mitosi, durante la quale i cromosomi della cellula sono divisi tra le due cellule figlie e la citodieresi, che comporta la divisione fisica del citoplasma della cellula. Il ciclo cellulare è un processo estremamente importante; errori in questo processo potrebbero

compromettere la vitalità cellulare. Per tale motivo, nel ciclo cellulare, sono presenti dei punti di controllo o checkpoints, localizzati a livello delle transizioni G1/S e G2/M. G1 fra la fine della mitosi e l'inizio della fase S, G2 fra il termine della fase S e l'inizio della fase M. Durante questi periodi di tempo avviene la maggior parte della sintesi proteica con conseguente aumento della massa cellulare e la realizzazione dei controlli che impediscono l'inizio della fase successiva se non è stata completata quella precedente (Alberts et al., Biologia molecolare della cellula, quinta edizione 2009) (Figura 8).

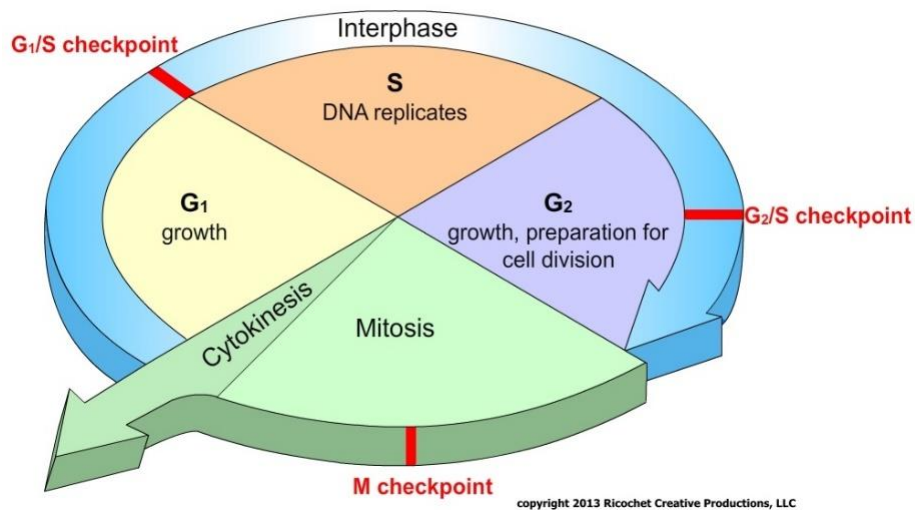


Figura 8. Il ciclo cellulare.

La matrice extracellulare esercita un controllo rigoroso sulla proliferazione delle cellule, suggerendo l'esistenza di una via di segnalazione mitogenica indipendente da recettori di fattori di crescita che è attivata dalle integrine (Maja Oktay et Al., 1999). Oltre ad agire come impalcatura fisica, le AF funzionano anche come snodo in cui assemblare e regolare una rete di segnalazione complessa che influenza la proliferazione cellulare (Mitra et al., 2005; Playford e Schaller, 2004).

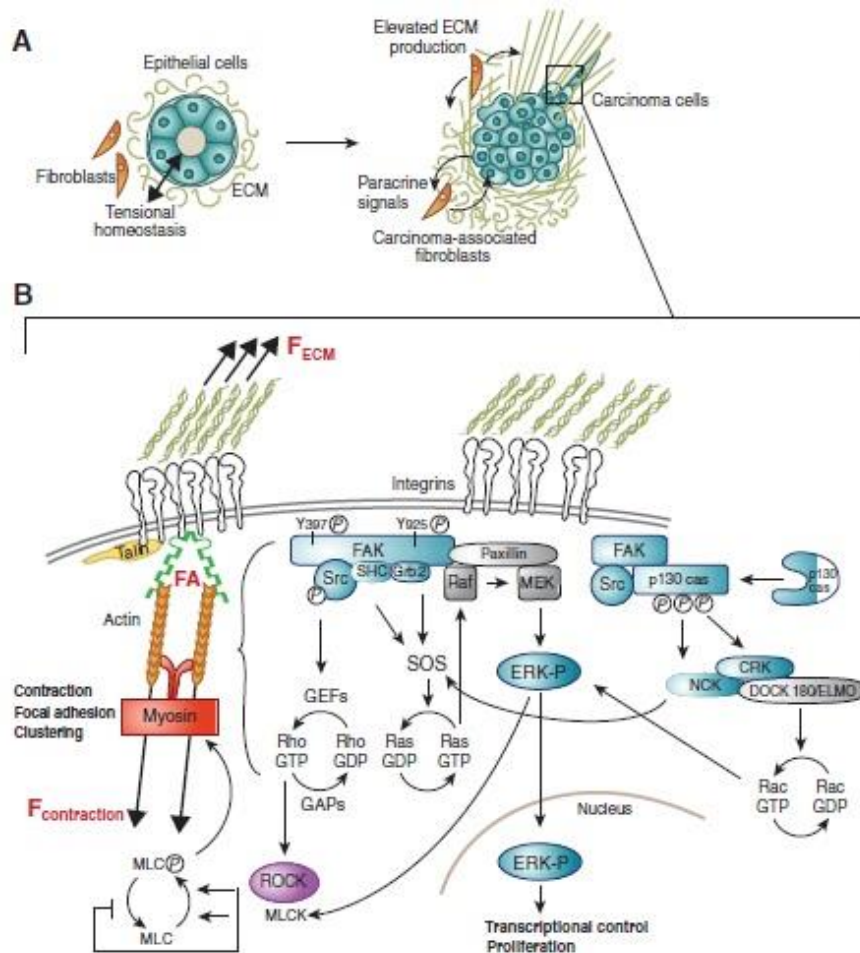


Figura 9. Forza contrattile inside-out come un regolatore di segnalazione cellulare. - La rigidità della matrice extracellulare influenza la forza contrattile della cellula che viene trasmessa attraverso la ECM alle integrine.

Le integrine determinano l'attivazione significativa e prolungata delle chinasi Jun NH₂-terminale (JNK), mentre diversi fattori di crescita causano una più modesta attivazione o non attivazione di questo enzima. La stimolazione mediata da integrine di JNK richiede l'associazione di FAK con una chinasi Src e p130^{Cas}, la fosforilazione di p130^{Cas}, e, successivamente, il reclutamento di Crk. Invece, Ras e PI-3K non sono richiesti (Maja Oktay et Al., 1999). La segnalazione FAK-JNK è necessaria per una corretta progressione attraverso la fase G1 del ciclo cellulare. Quindi FAK ha un ruolo sia nell'attivazione di JNK che nel controllo del ciclo cellulare, e si identifica uno stimolo fisiologico per la segnalazione di JNK che è coerente con il ruolo di Jun sia nella proliferazione che nella trasformazione (Maja Oktay et al., 1999). Dopo l'attivazione, JNK entra nel nucleo e fosforila e attiva i fattori di trascrizione c-Jun e attivazione del fattore di trascrizione 2 (ATF2), regolando così la trascrizione AP-1-dipendente (Karin et al., 1997). Poiché non vi sono prove che c-Jun sia richiesto per la proliferazione cellulare (Riabowol et al, 1992;

Johnson et al, 1993), sono stati esaminati i meccanismi attraverso i quali le integrine attivano JNK ed è stata verificata l'ipotesi che l'attivazione di questo percorso di segnalazione contribuisca al controllo del ciclo cellulare (Maja Oktay et al., 1999). I risultati indicano che le integrine causano l'attivazione significativa e prolungata di JNK, mentre i fattori di crescita sembrano non essere in grado di farlo. Utilizzando varie molecole di segnalazione dominante-negative, è fornita la prova che l'attivazione di JNK dalle integrine è mediata da FAK ed è necessaria per la progressione del ciclo cellulare (Maja Oktay et al., 1999).

Le cellule normali richiedono l'adesione a componenti della matrice extracellulare per proliferare *in vitro*, suggerendo che le integrine attivano vie di segnalazione che sono necessarie per la progressione del ciclo cellulare (Giancotti et al., 1997). In linea di principio, le integrine potrebbero cooperare con i recettori dei fattori di crescita per produrre una stimolazione sinergica di una o più vie di segnalazione mitogenica (Maja Oktay et al., 1999; Ruoslahti and Reed, 1994; Clark and Brugge, 1995; Parsons, 1996; Clark and Hynes, 1997; Schwartz, 1997; Yamada and Geiger, 1997; Howe et al., 1998; Schlaepfer and Hunter, 1998). Tuttavia, tale meccanismo non è in grado di spiegare il requisito di adesione rigorosa per la crescita mostrato dalle cellule normali. Inoltre, o in alternativa, le integrine potrebbero attivare un percorso di segnalazione che non è significativamente attivato da fattori di crescita, ma è necessario per la proliferazione cellulare.

Le diverse integrine attivano vie di segnalazione comuni, nonché vie specifiche dei specifici sottogruppi. Un sottoinsieme di integrine, che comprende $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 6\beta 4$ è accoppiato al percorso di segnalazione di ERK dalla proteina adattatrice Shc (Mainiero et al., 1995; Wary et al., 1996). Shc si lega direttamente all'unico grande dominio citoplasmatico di $\beta 4$ quando questa integrina subisce fosforilazione della tirosina (Mainiero et al., 1995; 1997). Al contrario, il reclutamento di Shc da integrine $\beta 1$ e αv è indiretto e richiede l'interazione della subunità α dell'integrina con l'adattatore di membrana caveolina-1 e associata tirosina chinasi, Fyn (Wary et al., 1998). Prove biochimiche e genetiche suggeriscono che le integrine reclutano Shc indipendentemente da FAK, e che questo evento sia necessario e sufficiente per attivare il percorso di Ras-ERK. Nelle cellule primarie, l'inibizione della segnalazione integrina-mediata Shc comporta l'arresto del ciclo cellulare, nonostante la presenza di fattori di crescita, il che suggerisce

che sia necessaria una stimolazione combinata di Ras da integrine legate a Shc e recettori del fattore di crescita per la progressione attraverso la fase G1 del ciclo cellulare (Wary et al., 1996, 1998). Alcune integrine sembrano associarsi preferenzialmente con specifici recettori del fattore di crescita e contribuire alla loro attivazione (Miyamoto et al., 1996; Schneller et al., 1997; Moro et al., 1998; Soldi et al., 1999). Ad esempio, $\alpha\beta3$ si combina con il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). I fibroblasti mostrano migliore proliferazione in risposta al PDGF quando si attaccano al ligando $\alpha\beta3$ della vitronectina di quanto non facciano con il ligando collagene $\beta1$ dell'integrina (Schneller et al., 1997). L'associazione selettiva delle integrine con i recettori del fattore di crescita rappresenta un secondo potenziale meccanismo di controllo della crescita integrina-specifico. Considerando che i percorsi descritti sopra sono attivati solo da alcuni integrine, la tirosin-chinasi FAK viene attivata dalla maggior parte delle integrine (Parsons, 1996). FAK attivato subisce autofosforilazione sulla Tyr 397 e, quindi, si lega al dominio SH2 della chinasi Src famiglia Src o Fyn (Schaller et al., 1994; Schlaepfer et al., 1994). Le chinasi della famiglia Src poi fosforilano un certo numero di proteine associate a FAK, tra cui p130^{CAS} e paxillina, che contengono più siti di attacco per le proteine adattatrici Crk e Nck (Schaller e Parsons, 1995; Richardson e Parsons, 1996; Vuori et al., 1996; Schlaepfer et al., 1997). Inoltre, Src fosforila FAK su un residuo di tirosina che diventa così in grado di reclutare Grb2 (Schlaepfer et al., 1994). È possibile che FAK contribuisca all'attivazione della cascata Ras-ERK tramite questi e potenzialmente altri meccanismi (Chen et al., 1996; Schlaepfer et al., 1997; King et al., 1997; Lin et al., 1997; Renshaw et al., 1997). Cellule epiteliali mammarie in matrici 3D rigide possono promuovere la fosforilazione di FAK (Paszek et al., 2005; Provenzano et al., 2009; Wozniak et al., 2003) e un aumento della contrazione cellulare Rho-mediata in risposta al microambiente rigido, stimola la localizzazione di FAK attivata nelle adesioni (Provenzano et al., 2009). Un microambiente con ECM rigida aumenta anche la formazione di complessi tra FAK e Src, Shc e la proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK), membro del *pathway* Grb2, andando a stimolare l'attivazione FAK-dipendente di ERK1 e 2 (Provenzano et al., 2009) (Figura 9). FAK viene fosforilata nei residui di tirosina 397 e 925 durante il cambiamento di forma dei fibroblasti, promuovendo la fosforilazione di ERK 1 e 2 (Wang, J. G. et al., 2001) e, successivamente, la proliferazione cellulare (Wang et al., 2005).

La regolazione della proliferazione cellulare mediante la segnalazione delle AF è dunque molto complessa. Oltre all'attivazione diretta del *pathway* Ras-MAPK, componenti delle AF come FAK e Src mostrano anche un notevole *crossstalk* con il recettore tirosina chinasi (RTK) di cui influenzano l'attività (Aplin e Juliano 1999; Barone et al., 1998; Benlimame et al., 2005; Casamassima e Rozengurt, 1998; Sieg et al., 2000).

1.4 Conseguenze della strutturazione del substrato sulla biologia della cellula

I segnali topografici generati dalla ECM hanno effetti diretti sul comportamento delle cellule, come l'adesione, la migrazione, i riarrangiamenti del citoscheletro e la differenziazione (Yang et al., 2011; Diehl et al., 2011). Le cellule sono intrinsecamente sensibili a substrati con topografia su microscala e nanoscala (Bauer et al., 2009). Lo sviluppo di metodi di micro e nanofabbricazione per analizzare la risposta cellulare alla topografia del substrato ha fornito nuove informazioni sulle interazioni delle cellule con il loro microambiente (Lee et al., 2004, Green et al., 2004).

Solchi o sporgenze sono i tipi di *feature* più comuni impiegati nello studio degli effetti delle strutture di superficie sulle cellule e la loro influenza sul comportamento delle cellule è stata ampiamente studiata utilizzando vari tipi di cellule, come fibroblasti, (Loesberg et al., 2007) osteoblasti, ecc. Un gran numero di studi ha rivelato che le cellule tendono ad allinearsi all'asse delle scanalature (Loesberg et al., 2007; Teixeira et al., 2003; Ismail et al., 2007). Ad esempio Kaiser et al. (Kaiser et al., 2006) hanno scoperto che le strutture superficiali influenzano significativamente l'orientamento delle cellule, la direzione di migrazione, nonché la velocità di migrazione nelle direzioni parallele e perpendicolari ai solchi o alle sporgenze in maniera dipendente dalla struttura superficiale. Anche l'influenza di modelli con sporgenze sul comportamento delle cellule è stata ampiamente studiata (W. T. Su, 2011; Ghassemi et al., 2008). In particolare, l'aumento della *feature* delle sporgenze da 1 a 10 μm influenza l'adesione *in vitro* e guida la morfologia dei fibroblasti con l'aumento dell'espressione della laminina (Su et al., 2010). Inoltre, una *feature* tra 5 e 10 μm si è mostrata capace di riorganizzare l'actina citoscheletrica e condizionare la migrazione dei fibroblasti *in vitro* (Ghibaud et al., 2009). Per influenzare i valori di comportamento delle cellule sono stati utilizzati materiali con molti tipi di *feature* micro e nanometriche, come nodi, pori e così via. (Zheng et al., 2012)

Quindi abbiamo visto come la rigidità e la topografia, influenzano, mediante la trasduzione dei segnali meccanici dalla membrana, al citoscheletro, ed infine al nucleo, l'espressione di geni importanti per divisione e ciclo cellulare, polarità, migrazione e differenziamento.

1.4.1 Influenza sull'adesione cellulare

Le cellule, come già discusso, risentono dalla geometria del microambiente, infatti, utilizzando dei substrati microstrutturati è possibile influenzare l'architettura ed il comportamento cellulare. Questo tuttavia sembra anche dipendere dal tipo cellulare. Ad esempio, i fibroblasti adottano una forma bidimensionale su substrati senza un *pattern* mentre risultano sostanzialmente allungati su linee microstrutturate (Levina et al., 2001) (Figura 10).

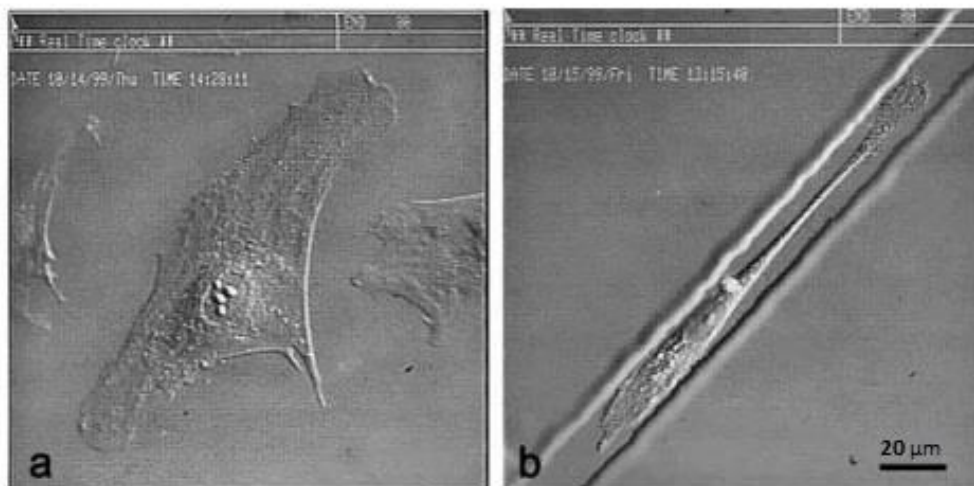


Figura 10. Fibroblasti embrionali di topo sul substrato di controllo (a) o sul substrato con su linee microstrutturate (b). Microscopia DIC. Bar, 20 micron (Levina et al., 2001)

Una microstrutturazione 3D è più appropriata di un microambiente 2D perché il comportamento delle cellule è diverso in matrici 2D e 3D. (Johnson et al., 2007; Fraley et al., 2010). Ad esempio, le cellule tumorali della mammella di mammifero non trasformate coltivate in sistemi di coltura 3D basati su componenti della membrana basale, come *Matrigel*, possono auto assemblarsi per formare strutture simili ad acini, con la crescita arrestata, riproducendo l'architettura dell'epitelio ghiandolare (O'Brien et al., 2002). Quando, però, crescono su matrici 2D formano isole multicellulari piatte e disorganizzate.

Questi diversi comportamenti giustificano l'interesse nel generare microstrutture 3D che si avvicinano maggiormente a scenari *in vivo* (Manuel Théry, 2010).

La capacità di una cellula di formare fibre da stress è più basso in pozzetti 3D rispetto a quelli 2D, sostenendo l'idea che la stimolazione lungo un terzo asse è importante (Ochsner et al., 2010). In questi esperimenti, la differenza nella capacità di una cellula di formare fibre da stress è visibile solo quando i pozzetti sono stampati in polimeri morbidi e non quando vengono utilizzati polimeri rigidi, indicando che la rigidità del microambiente ha un ruolo cruciale nell'organizzazione dell'architettura dell'actina cellulare. Infatti, la differenza principale tra le classiche colture 2D su vetro o su piastre di Petri e le colture 3D in gel di collagene non è solo la terza dimensione aggiunta, ma anche la differenza di rigidità del microambiente cellulare. Quando le cellule sono posizionate sopra una matrice morbida, senza essere immerse in essa, possono formare acini, suggerendo che la rigidità è più importante dell'incapsulamento 3D (Guo et al., 2008; Lee et al., 2007). Inoltre, coprendo la superficie dorsale dei fibroblasti con uno strato superiore, la forma delle cellule e la generazione della forza ne vengono affette solo se questo strato è più rigido del lato inferiore su cui sono piastrati (Beningo et al., 2004). Nel loro insieme, questi dati supportano la conclusione che la rigidità è un regolatore principale della morfogenesi in ECM e nei tessuti. Lo sviluppo di substrati microstrutturati con morbidezza regolabile sarebbe, quindi, un passo importante verso la realizzazione di un microambiente controllato che è altamente simile a condizioni *in situ*.

Molto importante è anche la geometria cellulare, infatti è interessante notare le differenze nella regolazione della contrattilità cellulare in cellule allungate a seconda del tipo di cellula. Nelle cellule mesenchimali, ad esempio, sono stati osservati alti livelli di miosina II su fibre da stress nelle cellule allungate rispetto alle cellule rotonde, suggerendo che le cellule allungate sono più contrattili (Kilian et al., 2010). Al contrario, nelle cellule muscolari lisce vascolari e nelle cellule endoteliali vascolari, l'allungamento delle cellule induce una riduzione del contenuto di F-actina, della rigidità del citoscheletro e della contrattilità. (Roca-Cusachs et al., 2008; Thakar et al., 2009; Thakar et al., 2003). Considerando l'effetto stimolante della contrattilità cellulare sulla crescita cellulare, questi risultati suggeriscono che, a seconda del tipo di cellula, l'allungamento cellulare regola la crescita cellulare in modi diversi (Manuel Théry, 2010). L'assemblaggio orientato del citoscheletro di actina in risposta alla geometria e all'architettura imposte da

condizioni esterne influenza l'organizzazione intracellulare e dirige processi cellulari, come polarità cellulare, migrazione e divisione.

1.4.2 Influenza sulla polarità cellulare

La rete dei microtubuli è polarizzata dalla rete di actina corticale. I microtubuli adottano comportamenti diversi a seconda dell'architettura dell'actina locale. Essi crescono lungo fibre da stress contrattili e smettono di crescere in regioni in cui la polimerizzazione di filamenti di actina induce la formazione di sporgenze della membrana (Théry et al., 2006b). Così la rete di microtubuli non è isotropa ed i microtubuli più estremi si accumulano vicino alle AF ed alle regioni in cui si sviluppano forti forze di trazione. (Manuel Théry, 2010). Nonostante questa organizzazione anisotropica dei microtubuli, il centrosoma, che dà origine ai microtubuli che formano la matrice astrale, tende a stare al centro della cellula (Figura 11). (Théry et al., 2006b) Tale posizionamento centrale è stato mostrato dipendere dai microtubuli (Dupin et al., 2009). Tuttavia la posizione del centrosoma è il risultato di un equilibrio tra diversi fattori, in particolare la sua interazione con il nucleo. Pertanto, anche se il meccanismo di centraggio appare essere lo stesso per la maggior parte delle cellule (Zhu et al., 2010), il centrosoma a volte può essere trovato lontano dal centro della cellula, soprattutto in grandi cellule, (Dupin et al, 2009) se il nucleo è in contatto con i bordi delle cellule. Il nucleo è generalmente decentrato, lontano da adesioni cellula-matrice e, quindi, diretto o verso le regioni prive di ECM (Théry et al, 2006b) o verso giunzioni cellula-cellula (Desai et al., 2009; Dupin et al., 2009). Questo meccanismo non dipende dai microtubuli e potrebbe invece dipendere dalle interazioni tra il nucleo e l'actina (Desai et al., 2009; Dupin et al., 2009; Wang et al., 2009). Di conseguenza, l'asse nucleo-centrosoma-Golgi, che rivela l'orientamento globale della polarità cellulare, è orientato da regioni prive di adesioni della matrice verso regioni dove sono abbondanti (James et al., 2008; Théry et al., 2006a).

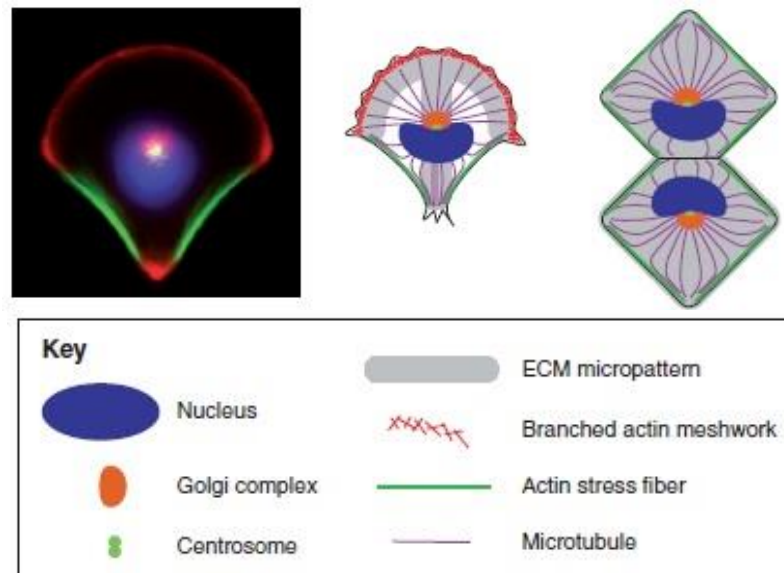


Figura 11. Effetto del pattern di adesione cellulare sulla polarità e sulla migrazione cellulare. (Manuel Théry, 2010).

L'orientamento del citoscheletro di actina e la sua polarità in risposta a stimoli geometrici influenza anche la migrazione cellulare. Su microstrutture a forma di goccia, le cellule formano una rete di actina più rigida nei pressi dell'estremità curva rispetto a quella alla estremità appuntita (Su et al., 2007). La polarità cellulare si orienta da bordi appuntiti verso bordi curvi, e le cellule che vengono rilasciate dalle forme *patterned* fuoriescono dal bordo curvo, indicando che l'orientamento della migrazione cellulare non è intrinsecamente definito ma, piuttosto, dipende da vincoli geometrici esterni (Jiang et al., 2005).

Stimoli corticali interessano anche la divisione di cellule tumorali. Una caratteristica delle cellule tumorali è un centrosoma soprannumerario, che può portare alla formazione di fusi multipolari durante la mitosi. Divisioni multipolari generano cellule altamente aneuploidi che alla fine muoiono. Per evitare questi effetti negativi delle divisioni multipolari, le cellule tumorali possono formare fusi bipolari con più centrosomi per polo, che permetteranno loro la sopravvivenza. La geometria del microambiente influenza la posizione degli stimoli corticali che orientano la distribuzione spaziale delle forze che agiscono sui centrosomi aggiuntivi. Questo, a sua volta, induce coalescenza dei centrosoma (quando il microambiente è bipolare, come ad esempio su microstrutture a forma di H), o separazione dei centrosoma (quando il microambiente è multipolare, ad esempio su microstrutture forma di Y) e, quindi, eventualmente dirige il rapporto di fusi

multipolari e bipolari nelle cellule tumorali (Kwon et al., 2008). Questi risultati dimostrano che il microambiente cellulare può favorire od ostacolare anche la progressione del cancro, a seconda della geometria del microambiente (Manuel Théry, 2010).

1.4.3 Influenza sulla migrazione cellulare

Quando vengono utilizzate microstrutturazioni a forma triangolare, le cellule formano sporgenze di membrana di actina agli apici cellulari e un allineamento dei triangoli guida il movimento cellulare sequenziale da un triangolo all'altro (Mahmud et al., 2009). I meccanismi con cui vincoli geometrici impongono un'architettura definita e dinamica alla rete di actina restano non chiari (Manuel Théry, 2010). Non solo la geometria, ma anche le proprietà meccaniche del microambiente cellulare possono orientare la migrazione cellulare. Ad esempio, substrati microstrutturati in cui il substrato ha maggiore rigidità in una direzione rispetto all'altra che è perpendicolare ad essa, sono in grado di orientare le AF, le fibre da stress e la migrazione delle cellule lungo la direzione più rigida (Saez et al., 2007).

È interessante notare che, anche ambienti simmetrici hanno un effetto sulla migrazione delle cellule. Queste ultime quando sono piastrate su larghe regioni di fibronectina, migrano in un modo simile alle cellule cresciute su piastre Petri, con il loro centrosoma orientato di fronte al nucleo e verso i lamellipodi. Al contrario, in cellule che sono confinate in regioni con *feature* sottili, il centrosoma si trova nella parte posteriore del loro nucleo (Figura 12) (Pouthas et al., 2008).

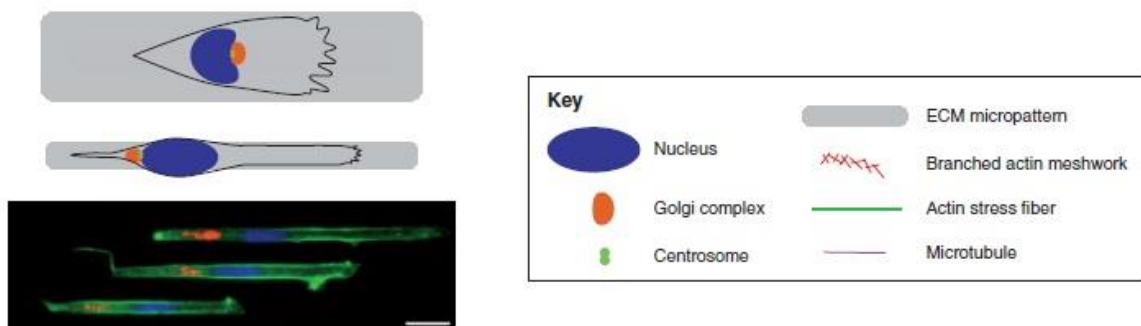


Figura 12. Effetto del pattern di adesione cellulare sulla polarità e la migrazione cellulare. (Manuel Théry, 2010).

Cellule coltivate su un substrato con *feature* sottile migrano più velocemente rispetto a quelle cresciute sulla superficie di un substrato omogeneo e mostrano la maggior parte delle caratteristiche delle cellule che migrano in gel di collagene; cioè uno spostamento coordinato di fronte cellulare e corpo cellulare, e la dipendenza dalla contrattilità dell'acto-miosina e dei microtubuli (Doyle et al., 2009; Pouthas et al., 2008). Questi risultati suggeriscono che la migrazione delle cellule su substrato con *feature* sottile e microstrutturato riassume meglio la situazione *in situ* di migrazione delle cellule rispetto che superfici omogenee, come piastre Petri. Durante la migrazione delle cellule orientate su queste regioni, la via di segnalazione di Src, una delle principali vie che trasmette segnali dalle adesioni cellulari, è attivata in modo omogeneo in ogni parte della cellula, mentre l'attivazione di Rac, che promuove la formazione dei lamellipodia, si osserva solo al bordo d'attacco (Ouyang et al., 2008). Sono stati anche osservati regolari comportamenti oscillatori del moto nucleare in cellule non migranti piastrate su regioni con sottile *feature* lineare i quali sono stati attribuiti allo spostamento della rete di microtubuli all'interno di queste cellule (Szabo et al., 2004).

Metodi di microstrutturazione sono stati utilizzati con successo anche per controllare la forma di gruppi multicellulari e per seguire il loro comportamento. Questo rende possibile l'analisi dei diversi meccanismi di comunicazione intercellulare che si basano su segnali meccanici o chimici. Le cellule interagiscono tra loro meccanicamente. Due cellule endoteliali seminate su una microstruttura tendono a girare l'una intorno all'altra in un modo straordinariamente regolare (Huang et al., 2005), coordinando gli orientamenti dei loro bordi che portano a muoversi insieme in uno spazio ristretto. Anche se tali movimenti di rotazione probabilmente non si verificano *in vivo*, mettono in evidenza come le cellule siano capaci di movimenti coordinati, che è probabile sia rilevante per l'istituzione e il mantenimento dell'equilibrio meccanico in un tessuto. (Poujade et al., 2007).

Sono stati utilizzati metodi di microstrutturazione per definire un confine lineare entro insiemi multicellulari, che possono essere rimossi per permettere alle cellule di muoversi liberamente. In questa configurazione, le cellule non migrano in avanti tutte in una volta; invece, formano escrescenze multicellulari simili a dita che derivano dal movimento di una singola cellula che procede più velocemente rispetto al resto. Cellule direttamente adiacenti a questa cellula leader, e anche tutte le cellule di conseguenza, allineano la loro

migrazione quasi perfettamente con quella della cellula leader (Petitjean et al., 2010). Quest'ultima sembra agire come una guida. L'interazione meccanica tra le cellule non attrae le cellule, ma, influenza la migrazione delle singole cellule; essa influenza non solo le cellule adiacenti, ma anche le cellule che sono a diversi diametri di distanza (Treat et al., 2009).

Interazioni e coordinamenti multicellulari derivano da grandi cambiamenti morfogenetici simili a quelli osservati *in situ*, e che possono anche essere studiati con metodi di microstrutturazione dedicati. Delle guide formate da piccole bacchette 2D per formare delle linee microstrutturate su un substrato piano, hanno dimostrato di essere in grado di guidare la morfogenesi 3D. Per esempio, quando seminate a confluenza su linee microstrutturate con *feature* di 10 μm , cellule endoteliali spontaneamente smettono di dividersi e formano tubi vuoti, imitando i vasi sanguigni effettivi (Dike et al., 1999). Su linee più larghe di 30 μm , le cellule endoteliali formano i vasi vuoti solo quando sono sovrapposti con gel di ECM (Dike et al., 1999; Okochi et al., 2009). La concentrazione di proteine di adesione sulle linee microstrutturate influisce anche l'auto-assemblaggio di cellule endoteliali in strutture tubolari. Strutture simili a vasi si formano anche quando le cellule endoteliali sono coltivate in canali 3D microfabbricati e riempiti con gel di ECM (Raghavan et al., 2010b). Degno di nota, è l'allungamento delle cellule endoteliali su linee microstrutturate, che si è dimostrato sufficiente per promuovere l'espressione di geni immunogeni che sono necessari per ridurre la capacità infiammatoria dei vasi sanguigni, indicando che l'ingegneria della forma cellulare contribuisce alla piena ricapitolazione della funzione delle cellule *in vitro* (Vartanian et al., 2010). Oltre alla secrezione di morfogeni e al contatto con le cellule omotipiche, la morfogenesi e la piena differenziazione cellulare *in situ* dipende anche da interazioni con altri tipi di cellule (Steinberg, 2007). La co-cultura di due tipi di cellule su superfici microstrutturate ha permesso di identificare i parametri nelle interazioni omo- ed eterotipiche che determinano l'acquisizione di funzioni pluricellulari definite (Bhatia et al., 1998; Khetani e Bhatia, 2008).

Il primo studio fondamentale con l'utilizzo di tecniche di microstrutturazione è stato fatto per controllare la forma delle cellule utilizzando isole adesive di varie dimensioni dimostrando che il confinamento geometrico riduce la crescita cellulare e promuove la differenziazione dei cheratinociti epidermici umani (Watt et al., 1988). Successivamente,

è stato dimostrato che, in cellule endoteliali, una diffusione cellulare altamente limitata (utilizzando forme squadrate con una larghezza inferiore a 10 μm) induce anche apoptosi. Sembra che il fattore cruciale che regola il passaggio tra apoptosi, sopravvivenza e crescita non è il grado di adesione cellulare in sé, ma la zona in cui la cellula può diffondere (Chen et al., 1997). Sembra inoltre che il livello di contrazione delle cellule, che aumenta con la diffusione cellulare, sia responsabile dell'attivazione della crescita cellulare in cellule altamente distribuite (Huang et al., 1998; Mammoto et al., 2004).

1.4.4 Influenza sulla divisione cellulare

La polarità del citoscheletro di actina, cioè la posizione relativa delle regioni di protrusione e contrattili della rete, che è stabilita in interfase in risposta a stimoli adesivi, viene mantenuta durante la mitosi e orienta l'asse della divisione cellulare (Théry e Bornens, 2006). Quando le cellule entrano mitosi, si arrotondano e, quando la membrana cellulare si ritrae, forma fibre di retrazione che provengono dai loro contatti adesivi con la matrice extracellulare. Proteine associate all'actina che sono presenti nella parte protrusiva della rete dell'actina si accumulano nella parte prossimale delle fibre di retrazione che sono a contatto con il corpo cellulare rotondo e, quindi, costituiscono segnali corticali (Théry et al., 2005). Modificando la forma di una microstruttura per manipolare l'adesione cellulare e la posizione associata di segnali corticali, è stato dimostrato che questi segnali sono strumentali nel guidare l'orientamento del fuso mitotico (Théry et al., 2005). È stato ipotizzato che i segnali inducono tensioni sui microtubuli, tirando così sui poli del fuso; la quantità di forza prodotta è proporzionale alla densità locale di fibre di retrazione. Modifiche della geometria del microambiente cellulare, al fine di indurre privazione localizzata o accumulo di adesioni cellulari e di cambiare la densità locale di segnali corticali, hanno mostrato di alterare l'equilibrio ai poli del fuso e modificarne la forma da simmetrica ad asimmetrica (Théry et al., 2007). Tuttavia, resta ancora da esplorare se queste condizioni in realtà inducono una vera e propria divisione asimmetrica con segregazione ineguale dei fattori che determinano il destino cellulare (Manuel Théry, 2010).

Gli effetti dei vincoli geometrici e meccanici non sono limitati a cambiamenti cellulari strutturali e hanno dimostrato di interferire anche con la regolazione del destino cellulare, in particolare la crescita cellulare e la differenziazione cellulare. *In situ*, queste

regolazioni dipendono da molti fattori diversi, come presenza di cellule vicine, molecole secrete, o stimolazione meccanica attraverso contatti cellula-cellula. E' difficile delineare il contributo di ciascun fattore. Tecniche di microstrutturazione si sono dimostrate utili per distinguere chiaramente e caratterizzare i diversi fattori in singole cellule isolate. Controllando la geometria dei gruppi pluricellulari, le conclusioni potrebbero essere ulteriormente estese ad indagare strutture tessuto-like (Manuel Théry, 2010).

Due diversi studi di allungamento cellulare e progressione del ciclo cellulare, hanno mostrato opposti ruoli per la contrattilità cellulare ma sono giunti alla stessa conclusione, ovvero che la riduzione della crescita cellulare è sistematicamente correlata al piccolo volume nucleare (Roca-Cusachs et al., 2008; Thakar et al., 2009), suggerendo che la distorsione nucleare in risposta ai cambiamenti di forma cellulare (Khatau et al., 2009) potrebbe essere il parametro fondamentale sottostante.

Esperimenti di microstrutturazione sono stati eseguiti anche con i gruppi multicellulari per studiare gli effetti di confinamento all'interno dei tessuti. La geometria della microstruttura utilizzata definisce la dimensione complessiva della cellula, nonché la lunghezza e la forma dei suoi confini. Nei gruppi pluricellulari, le cellule con caratteristiche specifiche vengono isolate in domini territoriali definiti e la proprietà è regolata da una serie di fattori. Ad esempio, la proliferazione cellulare è favorita alla periferia delle grandi colonie multicellulari (Nelson et al., 2005) e risultano elevate contrazioni nelle regioni periferiche rispetto a quelle centrali (Li et al., 2009; Nelson et al., 2005). La proliferazione cellulare dipende anche da contatti cellula-cellula, perché la down-regolazione di E-caderina annulla le differenze nei tassi di crescita delle cellule all'interno di un gruppo (Kim et al., 2009). Le microstrutture sono state utilizzate anche per controllare il numero e la posizione esatta delle giunzioni cellula-cellula ed è stato dimostrato che la presenza di poche giunzioni cellula-cellula tra cellule endoteliali promuove la crescita cellulare (Nelson e Chen, 2002), mentre la presenza di molte giunzioni tende ad inibirla (Gray et al., 2008).

In conclusione, i metodi di microstrutturazione discussi hanno rivelato importanti intuizioni su come la geometria del microambiente impatti sulla fisiologia cellulare, dall'organizzazione intracellulare alla morfogenesi multicellulare. Il microambiente è, quindi, un parametro che dovrebbe essere affrontato e controllato in studi volti ad indagare queste funzioni cellulari. Come dimostrato sopra, la coltura di cellule su substrati

ingegnerizzati che imitano precisamente la struttura, la composizione e le proprietà meccaniche dei tessuti è già fattibile e, quindi, fornisce un possibile mezzo per superare i limiti della classica coltura cellulare. Questo approccio è particolarmente utile a questo riguardo, perché pone non solo le cellule in condizioni fisiologicamente rilevanti, ma, in aggiunta, rende anche possibile manipolare e perfezionare queste condizioni e, quindi, interferisce con il comportamento delle cellule. Questo livello di controllo è un enorme vantaggio rispetto a studi *in situ* su animali (Manuel Théry, 2010).

In futuro l'utilizzo di queste tecniche può permettere di studiare come le cellule percepiscono cambiamenti nel loro microambiente e, quindi, aiutare a capire il meccanismo di base della morfogenesi durante il normale sviluppo e rinnovamento dei tessuti, così come durante la trasformazione patologica. La guida dell'architettura cellulare, della polarità, della migrazione e della divisione durante la formazione di tessuto *in vitro* sono altre possibilità offerte dalla microstrutturazione e questi strumenti potrebbero rivoluzionare il futuro della medicina rigenerativa (Manuel Théry, 2010).

Nel contesto dei biomateriali, questo ha rilevanza nell'ingegneria tissutale e nelle interazioni cellulari con le superfici dei materiali (compresi topografie ed impianti), dove è richiesta un'appropriata mecano-segnalazione per lo sviluppo dei tessuti, per la sopravvivenza cellulare o per la proliferazione (McNamara et al., 2012). Superfici con particolari pattern topografici offrono un prezioso strumento per la valutazione della risposta cellulare a segnali meccanici. La comprensione della mecano-trasduzione all'interfaccia cellula-materiale rappresenta un elemento essenziale per lo sviluppo di substrati topografici su misura e dispositivi impiantabili di nuova generazione (Jansen et al., 2015).

1.5 Risposta dei tessuti all'impianto di materiali

Quando sono impiantati in tessuti viventi tutti i biomateriali provocano una risposta nei tessuti. Questa reazione provoca la formazione di una capsula di tessuto fibroso con conseguente isolamento del materiale, provocando un fallimento dell'effetto terapeutico previsto dall'impianto (Giannini et al., 2014). La reazione ad un corpo estraneo è attuata soprattutto da macrofagi e cellule giganti ed è l'effetto della risposta infiammatoria e della cicatrizzazione in seguito all'impianto di un dispositivo medico, di una protesi o di un biomateriale. Le caratteristiche chimiche, fisiche e morfologiche dell'impianto e della tua

topografia svolgono un ruolo importante nel modulare gli eventi cellulari. Gli eventi nella reazione da corpo estraneo includono adsorbimento delle proteine, adesione di monociti/macrofagi, la fusione dei macrofagi per formare cellule giganti, cross-talk tra macrofagi/cellule giganti ed infiammazione/guarigione della ferita (James M. Anderson et al., 2008). I macrofagi sono in grado di secernere fattori di crescita ed angiogenici che sono importanti nella regolazione della fibro-proliferazione e dell'angiogenesi. I macrofagi attivati sovra-esprimono alcune proteine della matrice extracellulare (ECM), come la fibronectina, e si ritiene siano coinvolti nel rimodellamento tissutale durante la guarigione della ferita. I macrofagi attivati producono anche fattori pro-fibrogenici che accrescono la fibrogenesi per mezzo dei fibroblasti (James M. Anderson et al., 2008).

Le proprietà della superficie del biomateriale svolgono un ruolo importante nella modulazione della reazione da corpo estraneo nelle prime due-quattro settimane dopo l'impianto di un dispositivo medico. Tuttavia la reazione da corpo estraneo all'interfaccia tessuto/materiale è presente per tutta la durata *in vivo* del dispositivo medico (James M. Anderson et al., 2008).

La comprensione della reazione da corpo estraneo è importante per poter progettare biomateriali più biocompatibili e quindi più sicuri, in quanto le caratteristiche della protesi o del biomateriale impiantato e potrebbero avere un impatto significativo sulle risposte del tessuto a breve ed a lungo termine (James M. Anderson et al., 2008).

Macrofagi umani attivati da polimeri biomedici *in vitro* hanno dimostrato di stimolare l'attività dei fibroblasti. Inoltre, il potenziale di stimolazione dei fibroblasti ha dimostrato di correlare con la risposta fibrotica *in vivo*. Quindi i macrofagi aderenti al biomateriale possono secernere proteine che modulano la fibrosi e, a sua volta, la capsula fibrosa che si sviluppa intorno al materiale dopo l'impianto. Questa capsula fibrosa può interferire con la funzione del biomateriale, a seconda della destinazione d'uso del dispositivo medico, della protesi o del biomateriale (James M. Anderson et al., 2008).

Le nanotecnologie hanno il potenziale di affrontare questo problema, cercando di superare o ritardare l'insorgenza dell'incapsulamento, in virtù della capacità di alcuni nanomateriali di modulare le interazioni con le cellule, inducendo in tal modo risposte biologiche specifiche nei materiali estranei impiantati. Le risposte biologiche delle superfici nanostrutturate sono infatti diverse da quelle della maggior parte dei materiali, perché la nano-strutturazione conferisce una superficie molto più ampia per unità di

massa, aumentando così la reattività chimica (Giannini et al., 2014). In particolare questo studio si rivolge ai fibroblasti, che sono stimolati a proliferare e depositare il tessuto connettivo nel corso di un processo di fibrosi, ed esplora i potenziali meccanismi che potrebbero inibire questo fenomeno.

1.6 Il Bario titanato nanostrutturato

Il presente lavoro di tesi prende le mosse da un lavoro recentemente pubblicato dal nostro gruppo (Giannini et al., 2014), in cui è stata caratterizzata la crescita di fibroblasti NIH-3T3 su film nanostrutturati di Bario Titanato (BaTiO_3), un materiale che è ampiamente utilizzato in applicazioni biomediche.

Il bario titanato (BaTiO_3) appartiene al gruppo delle ceramiche ferroelectriche. Esso è caratterizzato da elevata costante dielettrica ed elevata temperatura di Curie (Nagata et al., 2003). Le sue particolari caratteristiche meccaniche, tra cui la capacità di formare forti legami di interfaccia con i tessuti ed il forte comportamento piezoelettrico, seguente la polarizzazione elettrica, ha permesso l'uso efficace e la sperimentazione di BaTiO_3 sia *in vitro* che *in vivo*, in impianti medici per osteointegrazione. Studi *in vitro* hanno dimostrato che BaTiO_3 polarizzato negativamente e positivamente, può migliorare la formazione di cristalli simili all'osso, come il fosfato di calcio (Hwang et al., 2002; Song et al., 2007). Sebbene il meccanismo sottostante rimanga sconosciuto, è stato suggerito che, a seconda della direzione di polarizzazione, una superficie caricata positivamente o negativamente potrebbe generare, rispettivamente, ioni positivi o negativi che si comportano come nuclei per la formazione di cristalli di crescita simili all'osso. La capacità del BaTiO_3 polarizzato di migliorare la formazione di tali cristalli potrebbe spiegare i risultati di diversi studi *in vivo* con impianti di BaTiO_3 , i quali riportano un miglioramento dell'osteogenesi e della formazione di tessuto osseo intorno all'impianto. (Giannini et al., 2014). Inoltre, superfici cariche potrebbero guidare l'assorbimento preferenziale delle proteine, per attrazione elettrostatica di gruppi di proteine cariche. Questo potrebbe spiegare la bioattività del BaTiO_3 polarizzato e, in particolare, la sua capacità di migliorare la proliferazione cellulare *in vitro*. Altri studi hanno indicato che il BaTiO_3 non polarizzato può anche funzionare come un materiale bioattivo. E' stato dimostrato *in vitro* che il BaTiO_3 non polarizzato migliora il metabolismo cellulare nella stessa misura del materiale polarizzato. Questa osservazione suggerisce che meccanismi, differenti dalla carica

superficiale, come materiale, topografia, chimica e struttura, potrebbero spiegare questi effetti biologici. Nel lavoro citato è stato dimostrato che i film contenenti nanotubi di BaTiO₃ allineati verticalmente (VANT) inibiscono la progressione del ciclo cellulare di fibroblasti, senza comprometterne la vitalità cellulare (Giannini et al., 2014). Alla luce delle considerazioni fatte circa le problematiche relative alla formazione della capsula fibrotica in impianti biomedici permanenti, tale osservazione risulta estremamente interessante e merita pertanto un approfondimento. I risultati ottenuti potrebbero avere rilevanza per applicazioni biomediche allo scopo di prevenire o minimizzare l'involucro fibroso dovuto alla proliferazione incontrollata di cellule fibroblastiche con perdita di interfaccia tra materiale e tessuto, funzione che è alla base degli impianti a lungo termine. Nel lavoro in questione, i VANT sono stati sintetizzati utilizzando come stampo una membrana di allumina (AAO). Nonostante i numerosi rapporti sulla sintesi di nanotubi BaTiO₃, la caratterizzazione del loro comportamento biologico rimane sconosciuta. Nel lavoro di Giannini et al., si evidenzia per la prima volta che, nonostante il materiale del nanotubo non sia né polarizzato, né cristallino, membrane di AAO riempite con VANT di BaTiO₃ inducono chiaramente una risposta biologica specifica. La principale scoperta biologica di questo studio è che i fibroblasti NIH-3T3 coltivati su BaTiO₃ mostrano una diminuzione della proliferazione cellulare (Figura 13).

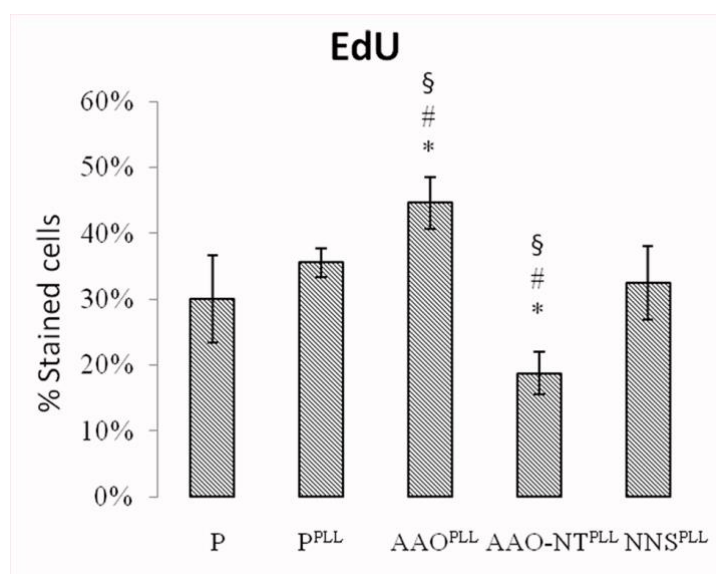


Figura 13. Percentuale di cellule positive all'EdU su P, P^{PLL}, AAO^{PLL}, AAO-NT^{PLL} e NNS^{PLL}. N=6. ANOVA seguita da analisi Bonferroni, $p=2 \cdot 10^{-8}$.

I risultati ottenuti dal saggio di proliferazione cellulare EdU mostrano che la percentuale di cellule positive (cioè il numero di cellule in fase attiva di replicazione) seminate su AAO-NT^{PLL} è circa la metà delle cellule positive coltivate su plastica (P e P^{PLL}). È importante sottolineare che la proliferazione dei fibroblasti ridotta non è legata alla presenza del materiale utilizzato come stampo, come non è stata rilevata alcuna differenza significativa nella proliferazione cellulare tra membrane AAO^{PLL}. Per escludere che la diminuzione di proliferazione cellulare osservata in AAO-NT^{PLL} è legata al materiale stesso, è stato depositato uno strato non nanostrutturato di BaTiO₃ su un vetrino. L'imaging con AFM di NNS conferma che questo campione privo di qualsiasi nano-strutturazione, è organizzato in granuli di dimensioni variabili tra la metà di un micron e pochi micron. La proliferazione cellulare è stata valutata su cellule seminate su NNS BaTiO₃ ma non è stata trovata nessuna differenza statisticamente significativa con i controlli (P e P^{PLL}). Questi dati confermano che la diminuzione osservata della proliferazione cellulare è risultato esclusivamente della presenza dei nanotubi di BaTiO₃.

Facendo delle ipotesi sui meccanismi alla base di questo effetto biologico, la prima considerazione degli autori era di escludere che la diminuzione della proliferazione cellulare fosse un effetto citotossico del materiale nanostrutturato stesso. Questa ipotesi può essere respinta in quanto i VANTs si sono dimostrati essere non citotossici per i fibroblasti NIH-3T3, con nessun cambiamento nella vitalità delle cellule seminate su AAO-NT^{PLL} e poche cellule apoptotiche, al di sotto di 1,5% in tutti i gruppi (Figura 14).

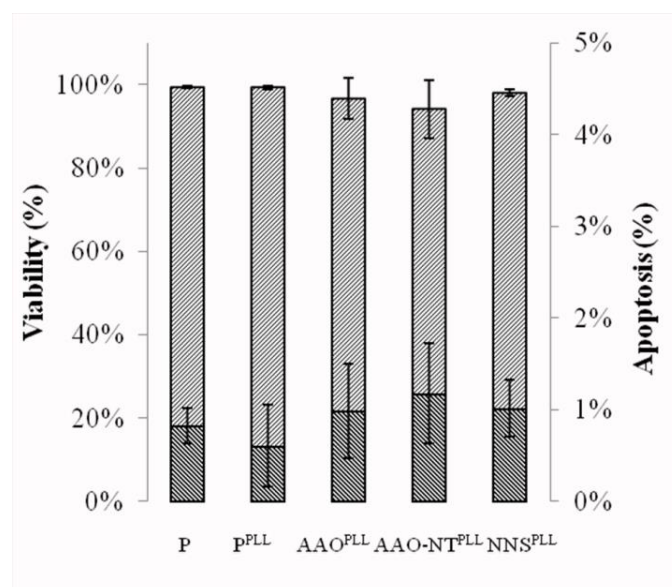


Figura 14. Vitalità e apoptosi delle NIH-3T3 su P, P^{PLL}, AAO^{PLL} and AAO-NT^{PLL} and NNS^{PLL}. Vitalità cellulare ($p = 0.087$). Apoptosi cellulare ($p = 0.309$). $N=6$. Kruskal-Wallis seguita da analisi multicomparata.

Cellule seminate su VANTs mostrano una morfologia nucleare normale, come evidenziato da colorazione nucleare Hoechst. Una volta esclusi effetti di citotossicità, gli autori hanno studiato la possibilità che la nano-topografia del materiale potesse influenzare il ciclo cellulare. Per studiare il comportamento delle cellule seminate sui VANTs, gli autori hanno quantificato la diffusione delle cellule per mezzo della colorazione dell'actina sui diversi substrati. Le immagini ad epifluorescenza ottenute hanno mostrato una rete di actina simile in tutti i gruppi, (con l'eccezione di cellule coltivate su substrati AAO, AAO-NT e vetro non rivestiti) (Figura 15).

Sulla base di calcoli della superficie delle cellule, gli autori hanno scoperto che la diffusione cellulare su AAO-NT^{PLL} non era significativamente differente da diffusione cellulare sul materiale usato come stampo (AAO^{PLL}), confermando che la diminuzione della proliferazione cellulare non era correlata ad una diminuzione della diffusione cellulare. Per analizzare in dettaglio la natura e la portata delle interazioni tra cellule e substrati sottostanti, gli autori hanno usato il SEM che ha confermato una notevole diffusione cellulare sul AAO-NT^{PLL}, indistinguibile da quella sullo stampo AAO^{PLL} o dal controllo P^{PLL}. Nonostante un appiattimento simile, le cellule seminate su VANTs sembravano saldamente ancorate allo strato di nanotubi, suggerendo un diverso adattamento morfologico rispetto ad AAO^{PLL} o P^{PLL}. Immagini al SEM suggeriscono una tendenza delle cellule ad aderire allo strato di nanotubi, con lo sviluppo di giunzioni membrana/substrato non rilevate in cellule coltivate sulle superfici di controllo (Figura 16).

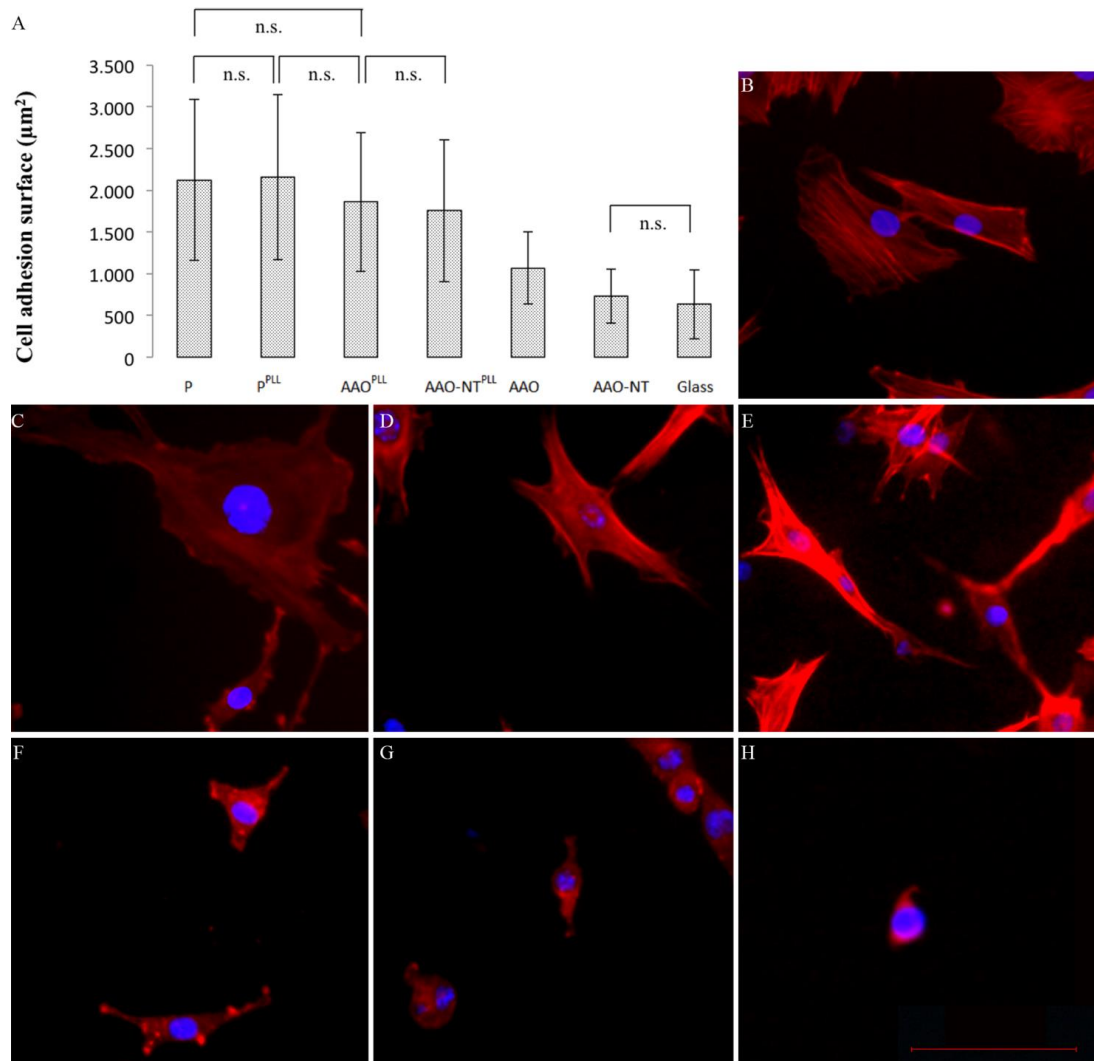


Figura 15. Superficie cellulare. $N=3$. Kruskal-Wallis seguita da analisi multicomparata, $p=0$. L'actina (rossa) e i nuclei (blu) colorati su P, P^{PLL} , AAO^{PLL} , $AAO-NT^{PLL}$, AAO, AAO-NT e vetro, rispettivamente. Scale bar: 100 μm .

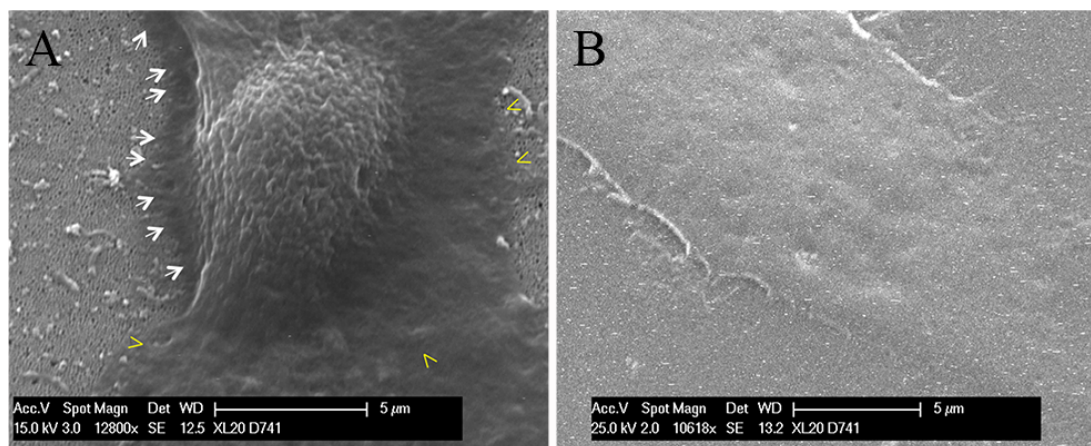


Figura 16. Immagini al SEM delle cellule NIH-3T3 su $AAO-NT^{PLL}$ (A) e P^{PLL} (B). Frecce e punte di frecce mostrano l'interazione cellulare con il substrato.

Gli autori hanno documentato che lo strato di NNS BaTiO₃ non compromette la progressione del ciclo cellulare, suggerendo che la variazione del ciclo cellulare documentata in questo studio dipende dalla nano-topografia dei VANTs piuttosto che dalla loro chimica di superficie. La rugosità di tutti i substrati è stata valutata mediante AFM. Il campione P ha mostrato la superficie piatta con uno scarto quadratico medio di $R_q=8,08\pm 0,84$ ed un'altezza massima tra picchi di $Z_{pp}=59,31\pm 7,25$ (n = 6). Mentre AAO presenta una superficie relativamente piatta con pori vuoti di 200 nm e una distanza da centro a centro di 300 nm (Crawford et al., 1992) ($R_q=15,65\pm 4,70$ nm, $Z_{pp}=143,12\pm 42,55$ nm, N=6), AAO-NT è caratterizzato da nanotubi di BaTiO₃ che protrudono dai pori, con conseguente aumento di rugosità ($R_q=28,02\pm 5,66$ nm, $Z_{pp}=236,00\pm 58,31$ nm, N=6). Vi è una differenza significativa nella loro rugosità superficiale ($p < 0,05$). Lo strato NNS di BaTiO₃ è caratterizzato dalla più alta rugosità ($R_q=229,00\pm 51,60$, $Z_{pp}=1354,14\pm 355,18$, N=6), con un valore di $R_q=44,63\pm 19,00$ e $Z_{pp}=289,17\pm 134,92$ (n = 6) entro il singolo grano (aree digitalizzate $0,5\times 0,5 \mu\text{m}^2$). Tutti insieme, i risultati di questi esperimenti ci portano ad escludere qualsiasi ruolo dello stampo, del materiale stesso e della rugosità, portando a postulare che la nano-strutturazione dei VANTs gioca un ruolo fondamentale. La nanotopografia conferisce alla superficie non solo un aumento della rugosità ma anche una nanostrutturazione ordinata. L'ipotesi postulata dagli autori era che la nanotopografia regolare dei VANTs potesse aumentare la disponibilità di superficie per unità di volume e facilitare il reclutamento e l'adsorbimento di PLL (anche se il materiale non è carico). Con il reclutamento della PLL, il nano-strutturato AAO-NT^{PLL} presenta alle cellule un elevato numero di siti carichi positivamente per unità di volume, che favoriscono fortemente l'adesione cellulare, riproducendo la nanotopografia degli ambienti fisiologici, come la matrice extracellulare. Rispetto a P, AAO^{PLL} o NNS^{PLL}, AAO-NT^{PLL} potrebbe offrire un'impalcatura in 3D in cui il numero di siti disponibili per il legame delle cellule aumenterebbe di diversi ordini di grandezza. Questo meccanismo potrebbe spiegare il forte attaccamento dei fibroblasti alla superficie AAO-NT^{PLL}. Per confermare questa ipotesi, gli autori hanno valutato la forza di adesione delle cellule al substrato. Il distacco meccanico delle cellule mediante ultrasuoni era molto poco efficace su colture cellulari su AAO-NT^{PLL}, poiché le cellule erano fortemente ancorate al substrato rispetto a P, P^{PLL}, AAO^{PLL} o NNS^{PLL} (Figura 17).

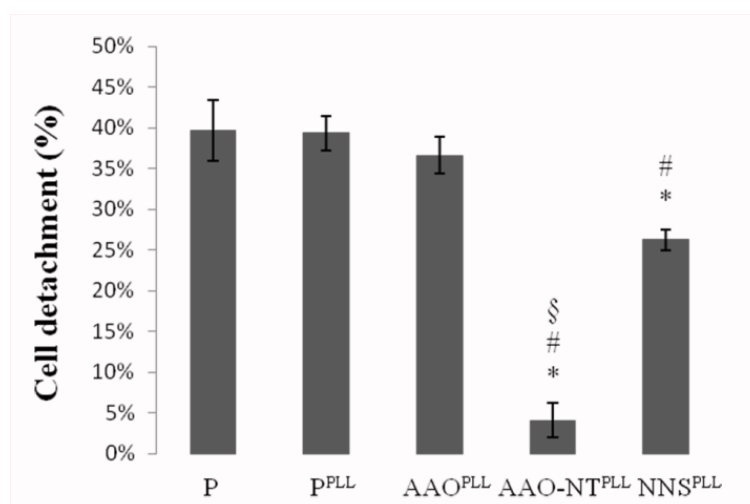


Figura 17. Percentuale di cellule distaccate dopo 50 mM EDTA e trattamento ad ultrasuoni on P, P^{PLL}, AAO^{PLL}, AAO-NT^{PLL} e NNS^{PLL}, N=6. ANOVA seguito da analisi Bonferroni, p=0.

1.7 Scopo della tesi

Nel lavoro appena presentato di Giannini et al., gli autori suggeriscono che l'organizzazione 3D della superficie del materiale agisca aumentando la disponibilità di siti di adesione, promuovendo l'adesione delle cellule e l'inibizione della proliferazione cellulare. Tuttavia, tale conclusione pone la seguente domanda: perché il rafforzamento dell'adesione cellulare promossa dai VANT dovrebbe indurre un'inibizione del ciclo cellulare? I dati disponibili in letteratura sembrerebbero piuttosto suggerire il contrario ovvero che il miglioramento dell'adesione correla con la progressione del ciclo cellulare. Il presente lavoro di tesi prende le mosse da questa questione aperta, allo scopo di chiarirne alcuni aspetti fondamentali.

Lo studio condotto nella presente tesi ha come scopo ultimo quello di chiarire i meccanismi secondo i quali il BaTiO₃ nanostrutturato possa essere in grado di guidare risposte cellulari specifiche. Tale risposta potrebbe essere poi sfruttata per ottenere il controllo sui processi che naturalmente si verificano quando materiali estranei sono impiantati nel corpo umano. In particolare questo studio si rivolge ai fibroblasti, che sono stimolati a proliferare e depositare il tessuto connettivo nel corso di un processo di fibrosi, ed esplora i potenziali meccanismi che potrebbero compromettere questo fenomeno.

Grazie al largo uso del BaTiO₃ in ingegneria tissutale, i risultati ottenuti potrebbero avere rilevanza per applicazioni biomediche progettate per prevenire o minimizzare l'involucro

fibroso dovuto alla proliferazione incontrollata di cellule fibroblastiche con perdita di interfaccia tra materiale e tessuto, funzione che è alla base degli impianti a lungo termine.

2. Materiali e metodi

2.1 Sintesi dei substrati

I substrati con nanotubi di BaTiO_3 sono stati sintetizzati su membrane commerciali di allumina (Whatman, Anodisc™ 47, 0,2 μm , diametro 47 mm). Tali membrane sono membrane di filtrazione disponibili in commercio caratterizzate da uno spessore di 60 μm e dalla presenza di pori passanti del diametro di 200 nm (Figura 18).

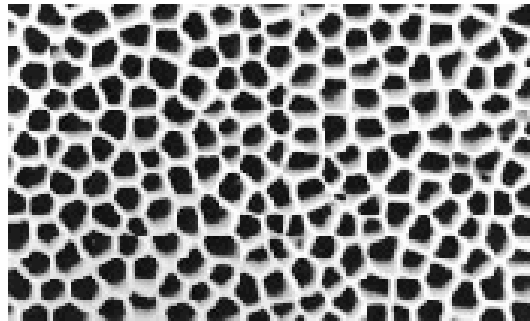


Figura 18. Esempio di un ingrandimento della struttura delle membrane di allumina.

Tale membrana è stata utilizzata come stampo per la generazione di una matrice di nanotubi allineati di bario titanato. In pratica i nanotubi di bario titanato sono stati sintetizzati chimicamente andando a riempire le porosità della membrana.

Per la formazione dei nanotubi sono stati aggiunti ammonio esafluorotitanato $(\text{NH}_4)_2\text{TiF}_6$ 10 mM (Sigma-Aldrich Co) e nitrato di bario $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 10 mM (Sigma-Aldrich Co) in una soluzione acquosa di acido borico 30 mM (Sigma-Aldrich Co) a temperatura ambiente. Il pH è stato aggiustato a 2 tramite HCl 6M.

Successivamente le membrane sono state immerse verticalmente nella soluzione precursore e tenute a 60°C in bagnetto *overnight* (O.N.). Dopo essere state rimosse dalla soluzione sono state sciacquate con acqua deionizzata per qualche secondo per 3 volte. Il processo, descritto in letteratura da Chen e colleghi (Ying-Yu Chen et al., 2008) porta all'accrescimento di nanotubi di BaTiO_3 all'interno dei pori passanti presenti nella membrana.

Come gruppo di controllo, una strato non nanostrutturato di BaTiO₃ è stato depositato su vetrini coprioggetto di forma circolare (13 mm di diametro) utilizzando la stessa metodica appena descritta.

Le membrane nude, le membrane riempite con i nanotubi di BaTiO₃, i vetrini coprioggetto rivestiti con il film di BaTiO₃ e la plastica di controllo saranno, in seguito, etichettati rispettivamente come AAO, AAO-NT, NNS e P.

2.2 Colture cellulari

La linea cellulare murina NIH-3T3 (ATCC) è stata coltivata a 37°C con il 5% di CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenente il 10% di Newborn Calf Serum (NBCS) inattivato con il calore, 2mM di L-glutamina, 100 IU/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina.

La linea cellulare murina MEF deriva da cellule FAK deficienti derivate da embrioni di topo omozigoti per un allele interrotto *fadk* (Ilic et al., 1995) e sono state donate dal Prof. Steven K. Hanks. Le cellule FAK deficienti e *wild-type* mostrano una variabilità morfologica, che vanno da una forma ben diffusa polarizzata tipica dei fibroblasti ad una forma arrotondata distinta che assomiglia più al fenotipo delle cellule FAK deficienti. Un derivato clonale di cellule FAK deficienti (chiamato R1) con una morfologia uniforme è stato ottenuto mediante diluizione seriale ed è servito come linea genitoriale per la costituzione di cellule per l'espressione inducibile FAK (Ilic et al., 1995; Owen et al., 1999). Le cellule sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con piruvato sodio contenente il 10% di Fetal Bovine Serum (FBS) inattivato con il calore, 2mM di L-glutamina, 100 IU/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina, 0.75 µg/ml di amfotericina-B.

Per la costruzione dei plasmidi e la selezione delle cellule Tet-FAK che esprimono FAK inducibile nel lavoro del Prof Steven K. Hanks, un cDNA *full-length wild-type* codificante per la sequenza FAK di topo è stato inserito nel sito XbaI, vettore di repressione della tetraciclina pTRE per produrre un plasmide pTRE-FAK (WT). Il plasmide pTRE-FAK (F397), che esprime siti mutanti della fosforilazione di FAK, è stato costruito sostituendo regioni appropriate da plasmidi PRC/CMV-FAK-F397-HA. Tutti i nuovi costrutti sono stati verificati dal sequenziamento del DNA. I plasmidi sono stati trasfettati utilizzando lipofectamina. Tre plasmidi sono stati trasfettati contemporaneamente, il plasmide di espressione pTRE

(-FAK (WT) oppure -FAK (F397)), il plasmide transattivatore controllato da tetraciclina pTet-tTak (GIBCO/BRL), e il plasmide marcatore selezionabile pBABE-Puro. Le cellule FAK deficienti R1 sono state trasfettate in un rapporto molare 50:50:1 di pTRE-pTet-tTak-pBABE-Puro. Dopo la selezione in 1,4 µg/ml di puromicina e 1 µg/ml di tetraciclina per 4 settimane, colonie isolate sono state raccolte e coltivate a confluenza. Potenziali cloni inducibili FAK, mantenuti in 1 µg/ml di tetraciclina, sono stati ripiastrati in assenza di tetraciclina e coltivati per 48 h per verificare l'espressione inducibile. Parallelamente è stata mantenuta una piastra con tetraciclina come controllo non indotto. Le cellule sono state lisate in tampone per radioimmunoprecipitazione (RIPA) (50 mM Tris-Cl [pH 7,4], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40 [NP-40], 1% di sodio desossicolato, 0,1% sodio dodecil solfato [SDS], 50 mM NaF, 1% aprotinina, e 0,1 mM Na₃VO₄), e l'espressione di FAK è stata determinata mediante analisi immunoblot (Hanks et al., 1992). Con questa procedura di screening, due cloni di cellule (chiamati Tet-FAK) sono stati selezionati per l'espressione inducibile di ogni variante di FAK, *wild-type* FAK [Tet-FAK (WT)-46 e Tet-FAK (WT)-70], F397-FAK [Tet-FAK (F397)-18 e Tet-FAK (F397)-21]. Le cellule di controllo che esprimono pTet-tTak ed il vettore pTRE senza inserto (Tet-tTA-3 e Tet-tTA-13) sono state ottenute e selezionate mediante l'espressione inducibile del transattivatore tTA mediante saggio luciferasi (Gossen et al., 1992). Le cellule Tet-FAK sono state indotte a consentire l'espressione FAK dopo essere ripiastrate in mezzi privi tetraciclina, ed i livelli di espressione sono stati controllati variando la durata del tempo in cui le cellule sono state mantenute in assenza di tetraciclina. Le cellule sono state indotte in genere da 2 a 4 giorni di tempo per raggiungere la massima espressione, ma in alcuni esperimenti le cellule Tet-FAK (F397) sono state indotte solo per 12-14 ore per raggiungere un'espressione di F397-FAK a livelli paragonabili a quelli del WT-FAK. Per le cellule non indotte di controllo, sono state mantenute colture in parallelo in presenza di 1 µg/ml di tetraciclina (Owen et al., 1999).

Per gli esperimenti di questo lavoro di tesi le cellule sono state propagate fino al raggiungimento dell'80% della confluenza e quindi staccate con tripsina e riseminate in rapporto 1:4. Per abbattere l'espressione di FAK, sia nel WT che nel mutato, sono state incubate con 1 µg/ml di tetraciclina per 2-4 giorni. I coating con la poli-L-lisina (PLL) e la fibronectina (FN) sono stati ottenuti incubando le piastre di coltura a 37°C per 1 ora rispettivamente con PLL (Sigma-Aldrich Co) 10 µg/ml in PBS e con FN (Sigma-Aldrich Co)

10 µg/ml in PBS. Analogamente, quando sono stati utilizzati i differenti substrati (AAO, AAO-NT, NNS), prima della semina delle cellule, i suddetti substrati sono stati posti sul fondo delle piastre di coltura impiegate e si è proceduto con il coating, come precedentemente spiegato. I substrati ricoperti con PLL e FN saranno identificati nel seguito tramite l'uso di apici (P^{PLL} , AAO^{PLL} , $AAO-NT^{PLL}$, NNS^{PLL} e P^{FN} , AAO^{FN} , $AAO-NT^{FN}$, NNS^{FN}).

2.3 Marcatura tramite EdU

I fibroblasti NIH-3T3 sono stati seminati su piastre multi pozzetto (24 pozzetti) secondo lo schema in figura 19 ed in concentrazione di $2 \cdot 10^4$ cellule nei gruppi P e di $6 \cdot 10^4$ cellule nei gruppi AAO, AAO-NT e NNS. 4 ore dopo la semina le membrane AAO, AAO-NT e NNS sono state cambiate di pozzetto allo scopo di rimuovere dall'analisi le cellule aderenti sul fondo della piastra di coltura (circa il 60% delle cellule seminate inizialmente).

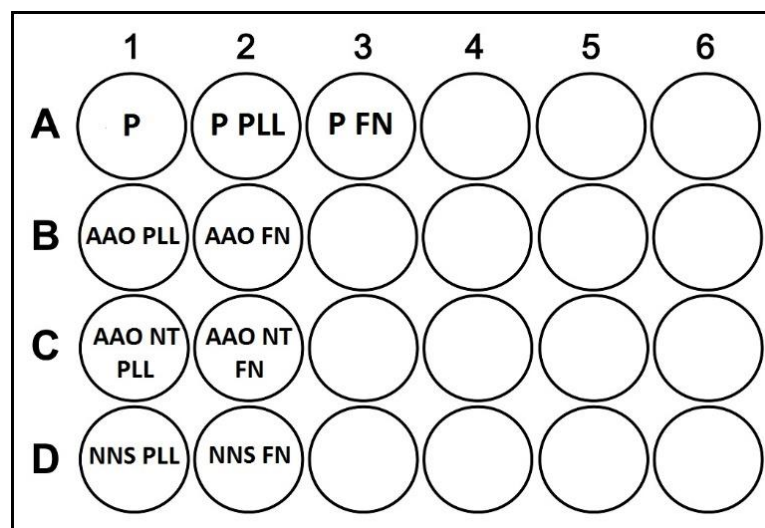


Figura 19. Schematizzazione della piastra multipozzetto utilizzata nell'esperimento.

La proliferazione è stata studiata utilizzando il kit Click-iT EdU 488 (Life Technologies, C10337), che marca le cellule che sintetizzano il DNA.

Dopo 24 ore di incubazione, le cellule arrivano ad una confluenza del 60%, dopo di che si inizia a seguire il protocollo EdU:

- sostituire la metà del mezzo con 250 µl di 2X working solution EdU (Component A)
- incubare per 8 ore a 37°C

- fissare le cellule rimuovendo il mezzo ed aggiungendo 500 µl di formaldeide al 3,7% in PBS
- incubare 10 minuti a temperatura ambiente
- rimuovere il fissativo e sciacquare due volte con 1 ml di BSA al 3% in PBS
- rimuovere la soluzione e aggiungere 500 µl di Triton-X 100 allo 0,5% in PBS
- incubare 20 minuti a temperatura ambiente
- rimuovere la soluzione e aggiungere 20 µl di Click-iT cocktail di reazione per ogni pozzetto aiutandosi con un pezzetto di parafilm in modo che la soluzione bagni tutto il pozzetto
- incubare 30 minuti a temperatura ambiente proteggendo le piastre dalla luce
- rimuovere il cocktail di reazione e lavare con 1 ml di PBS
- rimuovere la soluzione
- aggiungere Hoechst in concentrazione 1:100 in 500 µl di PBS per pozzetto
- incubare 30 minuti a temperatura ambiente proteggendo le piastre dalla luce
- sciacquare due volte con 1 ml di PBS e rimuovere

L'imaging è stato fatto con analisi al microscopio a fluorescenza. L'esperimento è stato fatto in 6 replicati e per ogni pozzetto sono state contate circa 3000 cellule.

2.4 Studi di proliferazione cellulare: marcatura EdU per lo studio della fase G1

Lo stesso tipo di protocollo è stato utilizzato per andare a studiare la percentuale di cellule positive alla marcatura EdU a diversi time point: 30 minuti, 2 ore, 4 ore, 8 ore, 12 ore, 24 ore, 36 ore, 48 ore.

I fibroblasti NIH-3T3 sono stati seminati su piastre multi pozzetto (24 pozzetti) secondo lo schema in figura 20 ed in concentrazione di $3 \cdot 10^4$ cellule nel gruppo AAO e di $6 \cdot 10^4$ cellule nel gruppo AAO-NT. 4 ore dopo la semina le membrane sono state cambiate di pozzetto allo scopo di rimuovere dall'analisi le cellule aderenti sul fondo della piastra di coltura (circa il 60% delle cellule seminate inizialmente).

Dopo 24 ore di incubazione è stato eseguito il protocollo EdU.

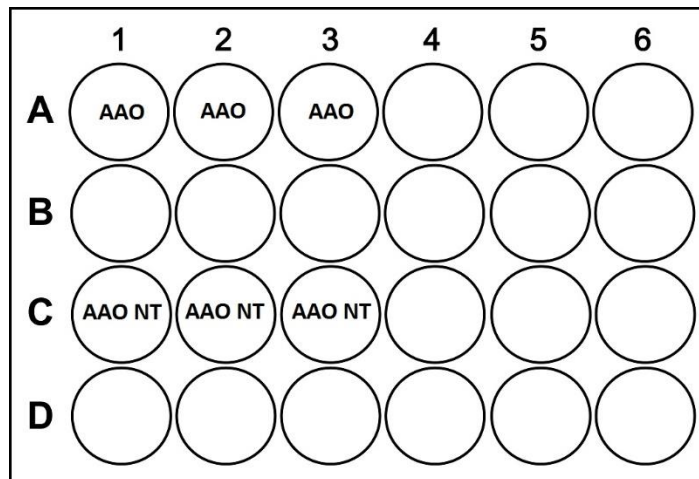


Figura 20. Schematizzazione della piastra multipozzetto utilizzata nell'esperimento

L' imaging è stata fatta con analisi al microscopio a fluorescenza.

L'esperimento è stato fatto in 6 replicati e per ogni pozzetto sono state contate circa 1000 cellule.

2.5 Marcatura tramite EdU delle cellule in fase S, doppia marcatura EdU-fosfo-istone H3

In questo caso il kit Click-iT EdU è stato utilizzato in combinazione con l'anticorpo anti fosfo-istone H3 (rabbit). I fibroblasti NIH-3T3 sono stati seminati su piastre multi pozzetto (24 pozzetti) secondo lo schema in figura 20 ed in concentrazione di $3 \cdot 10^4$ cellule nel gruppo AAO e di $6 \cdot 10^4$ cellule nel gruppo AAO-NT. 4 ore dopo la semina le membrane sono state cambiate di pozzetto allo scopo di rimuovere dall'analisi le cellule aderenti sul fondo della piastra di coltura (circa il 60% delle cellule seminate inizialmente).

E' stato utilizzato il protocollo Click-iT EdU 488 (Life Technologies, C10337) dopo 24 ore di incubazione come per gli studi precedenti ma in questo caso si è marcato anche il fosfo-istone H3:

- blocking 1 ora con BSA 1%
- incubare 3 ore con anticorpo primario anti fosfo-istone H3, rabbit, policlonale (Merck Millipore) 1:400 a temperatura ambiente
- incubare 3 ore con anticorpo secondario Rhodamine goat-anti rabbit (Life Technologies) 1:500 a temperatura ambiente

Poi si è proceduto analogamente al protocollo sopra spiegato.

2.6 Marcatura EdU su linee cellulari MEF Tet-FAK WT e Tet-FAK F397

I fibroblasti MEF sono stati seminati su piastre multi pozzetto (24 pozzetti) secondo lo schema in figura 20 ed in concentrazione di $3 \cdot 10^4$ cellule nel gruppo AAO e di $6 \cdot 10^4$ cellule nel gruppo AAO-NT. I gruppi analizzati sono stati:

- cellule Tet-FAK WT trattate con tetraciclina
- cellule Tet-FAK WT non trattate con tetraciclina
- cellule Tet-FAK F397 trattate con tetraciclina
- cellule Tet-FAK F397 non trattate con tetraciclina

4 ore dopo la semina le cellule seminate su AAO e AAO-NT sono state trasferite in un nuovo pozzetto allo scopo di rimuovere dall'analisi le cellule aderenti sul fondo della piastra di coltura (circa il 60% delle cellule seminate inizialmente). Dopo 24 ore di incubazione è stato eseguito il protocollo EdU. L'imaging è stato fatto con analisi al microscopio a fluorescenza.

L'esperimento è stato fatto in 3 replicati per ogni gruppo e per ogni pozzetto sono state contate circa 1000 cellule.

2.7 Citofluorimetria

I gruppi testati sono stati: P senza marcatura, P con marcatura EDU, P^{FN} con marcatura EDU, P^{PLL} con marcatura EDU, AAO^{FN} con marcatura EDU, AAO^{PLL} con marcatura EDU, AAO-NT^{FN} con marcatura EDU, AAO-NT^{PLL} con marcatura EDU.

I fibroblasti NIH-3T3 sono seminati su piastre Petri da 60 mm con concentrazione di $0,5 \cdot 10^6$ cellule (2 piastre per ogni campione analizzato al citofluorimetro). Il giorno seguente il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco con o senza EDU (10 mM), e le piastre sono state incubate a 37 °C, 5% CO₂, al buio per 18 ore.

Trascorse le 18, le cellule sono state tripsinizzate e le cellule provenienti dalle coppie di piastre relative allo stesso gruppo sono state trasferite in tubi falcon da 15 ml. Per la fissazione le cellule sono state: a) centrifugate a 1200 g per 5 minuti ed il sovrnatante aspirato; b) risospese in 3 ml di BSA all'1% in PBS, centrifugate a 1200 g per 5 minuti ed il sovrnatante aspirato; c) risospese in 100 µl di preparato fresco di paraformaldeide al 4%, incubate a temperatura ambiente per 15 minuti e risospese in 3 ml di 1% BSA in PBS. Per la permeabilizzazione le cellule sono state: a) centrifugate a 1200 g per 5 minuti e il sovrnatante aspirato, b) risospese in 100 µl di preparato fresco di saponina allo 0,05% in

PBS, c) incubate a temperatura ambiente per 15 minuti e d) sospese in 3 ml di BSA all'1% in PBS.

Per l'analisi al citofluorimetro le cellule sono state: a) centrifugate a 1200 g per 5 minuti e il supernatante aspirato; risospese in 200 µl di fluoroforo (in accordo al protocollo fornito dal produttore), c) incubate a temperatura ambiente al buio per 15 minuti, d) sospese in 3 ml di saponina allo 0,05% in PBS e d) trasferite in tubi per FACS da 5 ml e mantenuti in ghiaccio fino lettura nel citometro a flusso.

I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule marcate rispetto al numero totale di cellule. Sono state condotte un totale di 20.000 acquisizioni per campione. Le misure sono state condotte tramite lo strumento BD FACScan flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA). I dati sono stati acquisiti e analizzati col software CellQuest. Il bianco (cellule senza marcatura) è stato utilizzato come riferimento per la calibrazione dello strumento. Sono stati adoperati i seguenti parametri di calibrazione:

FSC	E1	6.26	Lin
SSC	320	1.25	Lin
FL1	250	1.0	Log

2.8 Vitalità cellulare

Lo ioduro di propidio (Sigma-Aldrich Co) è stato adoperato per valutare la vitalità cellulare (le cellule necrotiche sono permeanti alla molecola mentre quelle non necrotiche non lo sono), mentre, l'Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Co) è stato utilizzato per distinguere i nuclei apoptotici condensati (picnotici).

I fibroblasti NIH-3T3 sono stati seminati su piastre multipozzetto a 24 pozzetti secondo lo schema ed in figura 20, in concentrazione di $2 \cdot 10^4$ cellule nel gruppo P e di $6 \cdot 10^4$ cellule nei gruppi AAO, AAO-NT e NNS, dopo aver fatto un coating con la polilisina, ed incubati per 72 ore. 4 ore dopo la semina le membrane AAO, AAO-NT e NNS sono state cambiate di pozzetto allo scopo di rimuovere dall'analisi le cellule aderenti sul fondo della piastra di coltura (circa il 60% delle cellule seminate inizialmente). La differenza di concentrazione è stata valutata sperimentalmente come quella ottimale per assicurare un'analogia densità cellulare tra i gruppi, in quanto essendo i substrati AAO, AAO-NT e NNS parzialmente

flottanti, gran parte delle cellule seminate vanno a ricoprire la plastica sottostante del pozzetto. L'Hoechst 33342 è stato aggiunto ad una concentrazione finale di 5 µg/ml ed incubato per 20 minuti a 37°C. Il PI è stato aggiunto alla concentrazione di 5 µg/ml ed incubato per 5 minuti a 37°C.

Per ogni esperimento sono stati fatti 3 replicati e contate circa 1000 cellule per pozzetto. Inoltre con lo stesso protocollo è stato ripetuto lo stesso test sul gruppo AAO-NT ma le cellule sono state analizzate dopo 7 giorni dalla semina.

2.9 Marcatura tramite fosfo-istone H3 delle cellule in fase M

I fibroblasti NIH-3T3 sono stati seminati su piastre multi pozzetto (24 pozzetti) in concentrazione di $2 \cdot 10^4$ sui seguenti substrati: P, P^{PLL}, AAO^{PLL}, AAO-NT^{PLL} e NNS^{PLL}. La proliferazione cellulare è stata analizzata in epifluorescenza utilizzando l'anticorpo policlonale (rabbit) anti fosfo-istone H3 (Upstate Biotechnology). Dopo 24 ore di incubazione è stato eseguito il protocollo di immunocitochimica.

E' stato rimosso il terreno di coltura, le cellule sono state lavate delicatamente con PBS e, quindi, fissate con formaldeide al 4% per 15 min. Dopo il lavaggio, le cellule sono state permeabilizzate con 0.1% Triton X-100 in PBS e bloccate con 1% di albumina di siero bovino in PBS per 1 h. Successivamente le cellule sono state incubate con l'anticorpo policlonale (rabbit) anti-fosfo-istone H3 per 3 ore a temperatura ambiente, lavate in PBS, incubate con anticorpo secondario (goat) Rodamina anti-rabbit (Life Technologies) per 1 ora a temperatura ambiente, e colorato per Hoechst 33342 (5 mg/ml) per 10 min e sciacquate con PBS.

Il conteggio cellulare è stato condotto mediante analisi al microscopio a fluorescenza. Sono state eseguite sei repliche sperimentali e per ogni esperimento sono state contate una media di 1600 cellule.

2.10 Cell detachment assay

Al fine di valutare la forza di adesione cellulare ai substrati (P, P^{PLL}, AAO^{PLL}, AAO-NT^{PLL} e NNS^{PLL}), le cellule sono state colorate con Hoechst 33342 (5 mg/ml) per 10 minuti, trattate con EDTA 50 mM e successivamente le piastre Petri sono state collocate a galleggiare in bagnetto ad ultrasuoni per 10 minuti (230 V, 80 W, 37 kHz, Elma). A questo punto, le cellule sono state lavate due volte con PBS.

Le immagini dei nuclei colorati con Hoechst, sono state registrate a posizione fissa, prima e dopo l'esperimento EDTA/ultrasuoni. Sono state effettuate sei repliche sperimentali e per ogni esperimento è stato valutato il decremento delle cellule, partendo da un numero iniziale di 3000 cellule.

I valori sono riportati come media \pm errore standard della media. Sono state studiate le distribuzioni dei dati con test di Kolmogorov-Smirnov. La significatività statistica è stata valutata mediante analisi della varianza ad una via. In particolare, per le distribuzioni di dati non-normali, è stata utilizzata analisi di Kruskal-Wallis, seguita da analisi multi-confronto (95% di affidabilità), mentre per le distribuzioni di dati normali, è stato utilizzato il test ANOVA seguito dalla correzione di Bonferroni. La significatività è stata fissata a $p \leq 0,05$. "*" è la significatività rispetto al gruppo P, "#" è la significatività rispetto al gruppo P rivestito, "\$" è la significatività rispetto al gruppo AAO, "±" è la significatività rispetto al gruppo NNS, "ns" indica non significatività. Le analisi statistiche sono state eseguite in Matlab R14 lavoro (funzioni "kstest", "anova1", "Bonferroni", "multicompare") e Microsoft Office Excel utilizzando lo strumento di analisi dei dati.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti contando 2000 cellule per ciascun esperimento.

3. RISULTATI

3.1 Sintesi dei substrati

Il film nanostrutturato di BaTiO₃ (AAO-NT) è stato sintetizzato a partire da membrane porose (con pori passanti) di allumina (AOO), le cui porosità sono state riempite con nanotubi di BaTiO₃. La morfologia e la composizione chimica dei nanotubi di BaTiO₃ sintetizzato su stampi AAO sono stati caratterizzati da Giannini et al. utilizzando diversi approcci. Microscopia a scansione elettronica (SEM) di sezioni trasversali di AAO-NT mostra la presenza di nanostrutture tubolari allineate verticalmente (Figura 21). Lo spettro EDX ha confermato che il campione AAO-NT contiene Ba e Ti (da nanotubi) e Al proveniente dalle membrane stampo (Figura 22).

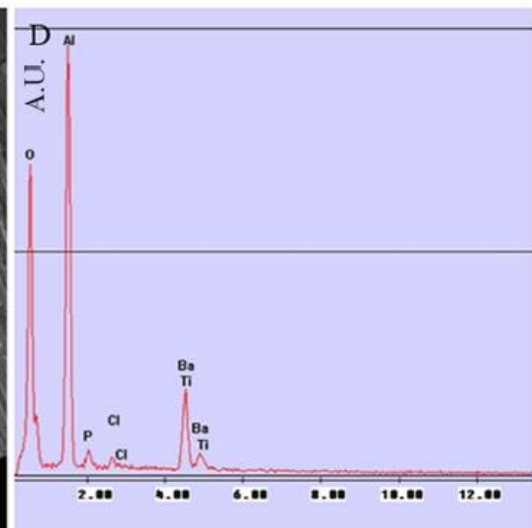
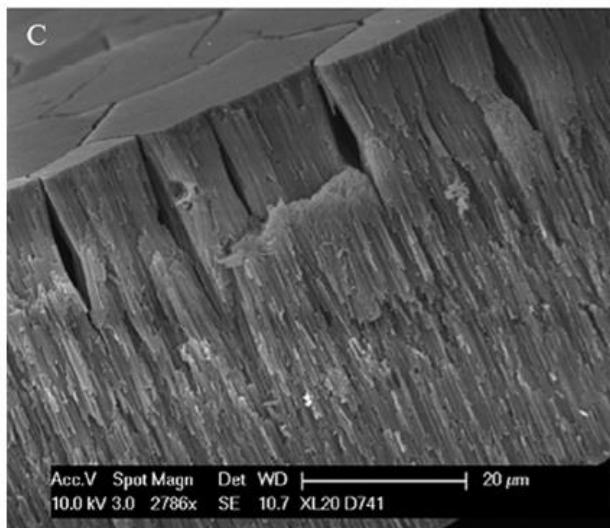


Figura 21. Sezioni trasversali di AAO-NT. - Figura 22. Spettro EDX. (Giannini et al., 2014)
Microscopia con SEM.

Al contrario, in membrane di controllo AAO (Figura 23) è stato rilevato Al, ma non Ba e Ti (Figura 24).

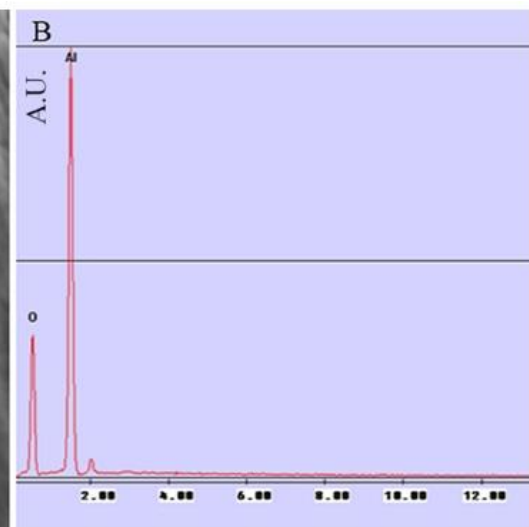
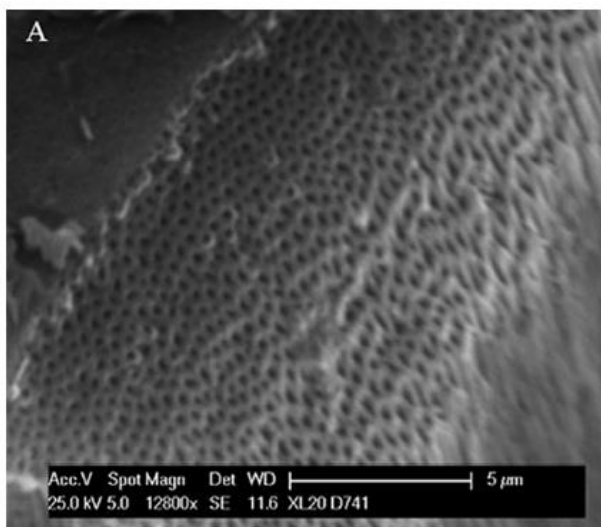


Figura 23. Sezione di AAO. - Microscopia con SEM Figura 24. Spettro EDX. (Giannini et al., 2014)

Ricostruzioni AFM 2D e 3D della morfologia di superficie degli AAO-NT (Figura 25, A-B) confermano che i fori circolari della membrana sono pieni di nanotubi che sporgono dalla superficie.

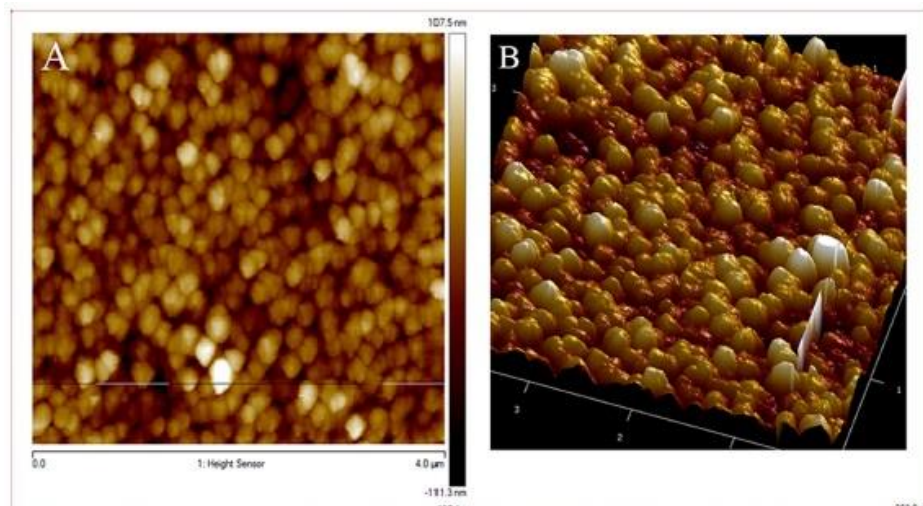


Figura 25. Ricostruzioni AFM 2D e 3D della morfologia di superficie degli AAO-NT. (Giannini et al., 2014)

3.2 Studi di proliferazione cellulare: marcatura EdU

La proliferazione cellulare è stata studiata mediante l'utilizzo del kit Click-iT EdU (Figura 27) e la colorazione con Hoechst 33342 (Figura 26). Sono stati condotti studi di proliferazione cellulare su NIH-3T3 piastrate su diversi coating. Come coating sono stati utilizzati polilisina e fibronectina.

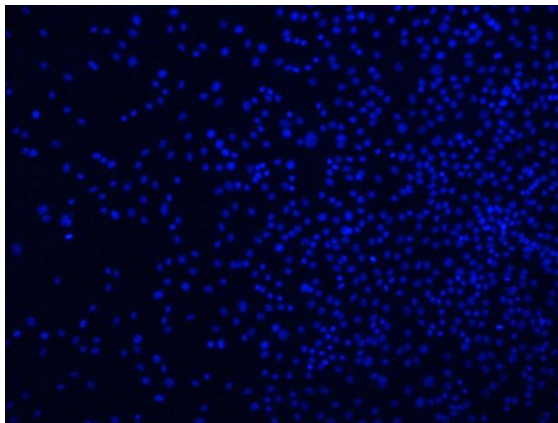


Figura 26. Esempio di cellule NIH-3T3 su AAO-NT colorate con Hoechst. Microscopia in fluorescenza.

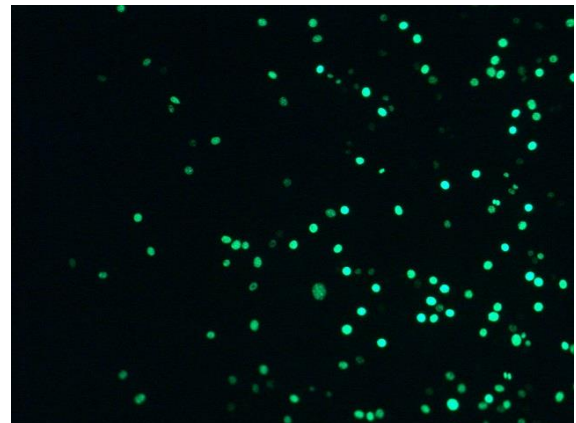


Figura 27. Esempio di cellule NIH-3T3 su AAO-NT colorate con Alexa fluor. Microscopia in fluorescenza.

Il test effettuato (Figura 28) conferma i dati di Giannini et al., ovvero solo il substrato AAO-NT porta ad un rallentamento del ciclo cellulare e tale rallentamento non dipende né dall'utilizzo delle membrane né dal BaTiO_3 di per sé, ma unicamente dalla nanostrutturazione. Da tale esperimento è emerso inoltre che il rallentamento osservato

non dipende dal coating effettuato. Possiamo notare infatti che non c'è significatività tra i gruppi nanostrutturati AAO-NT^{PLL} ed AAO-NT^{FN}. Inoltre confrontando i campioni con nanotubi (AAO-NT^{PLL} ed AAO-NT^{FN}) con i propri controlli (AAO-NT^{PLL}, AAO^{PLL} e NNS^{PLL} oppure AAO-NT^{FN}, AAO^{FN} e NNS^{FN}, rispettivamente) possiamo notare come in questo caso ci sia una grande differenza statisticamente significativa ad ulteriore prova che l'effetto dipende esclusivamente dalla nanostrutturazione, indipendentemente dai materiali e dal coating coinvolti.

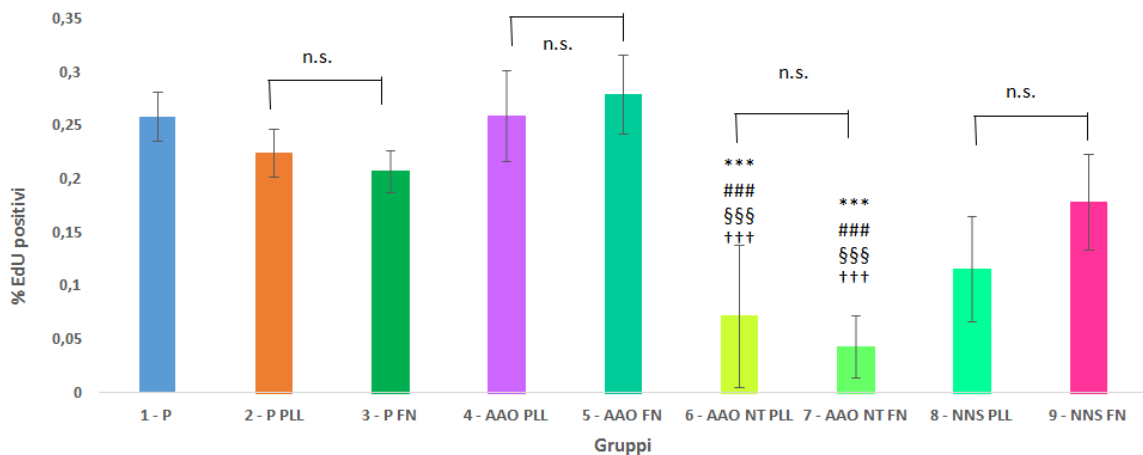


Figura 28. Test EdU su cellule NIH-3T3, incubazione 8 ore. n=6. "*" è la significatività rispetto al gruppo P, "#" è la significatività rispetto al gruppo P rivestito, "\$" è la significatività rispetto al gruppo AAO, "±" è la significatività rispetto al gruppo NNS, "ns" indica non significatività. "****", "###", "\$\$\$", "±±±" sono p <0.001

3.3 Citofluorimetria

I risultati ottenuti tramite analisi immunoistochimica (IHC) sono stati ripetuti mediante citofluorimetria, ad ulteriore riprova della correttezza del dato. L'analisi al citofluorimento (Figura 29) è stata effettuata dopo 18 ore di incubazione con EdU, confermando i risultati precedentemente ottenuti con la marcatura EdU.

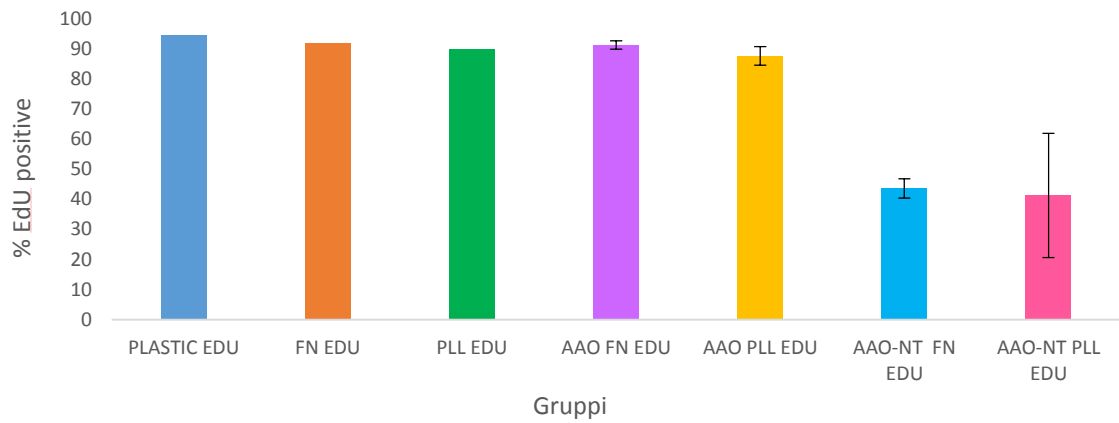


Figura 29. Risultati ottenuti tramite citofluorimetria.

3.4 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata testata utilizzando ioduro di propidio (PI) (Figura 31) ed Hoechst 33342 (Figura 30) per verificare se il rallentamento della proliferazione cellulare osservato negli esperimenti con EdU fosse dovuto o meno ad un effetto citotossico. Durante le fasi tardive dell'apoptosi si ha la compromissione dell'integrità della membrana plasmatica, quindi, utilizzando un colorante nucleare come il PI capace di penetrare solo in cellule con membrana plasmatica compromessa è possibile discriminare questa popolazione di cellule.

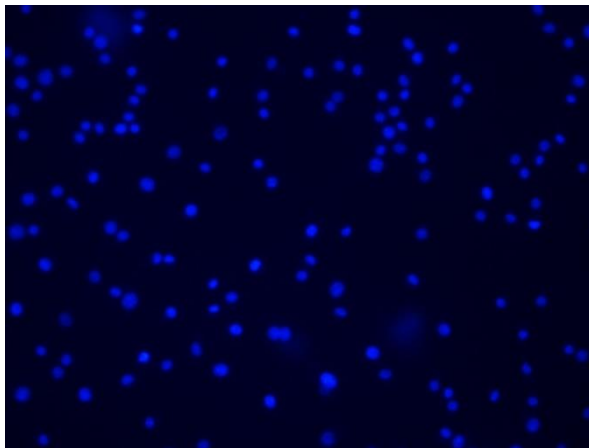


Figura 30. Esempio di cellule NIH-3T3 su AAO-NT colorate con Hoechst - Microscopia in fluorescenza.



Figura 31. Esempio di cellule NIH-3T3 su AAO-NT colorate con Propidio Ioduro - Microscopia in fluorescenza.

L'analisi in microscopia in fluorescenza ha dimostrato che l'effetto osservato non è un effetto citotossico. Infatti, come si può osservare nei grafici in figura 32 in tutti i gruppi possiamo osservare una tossicità inferiore al 5%.

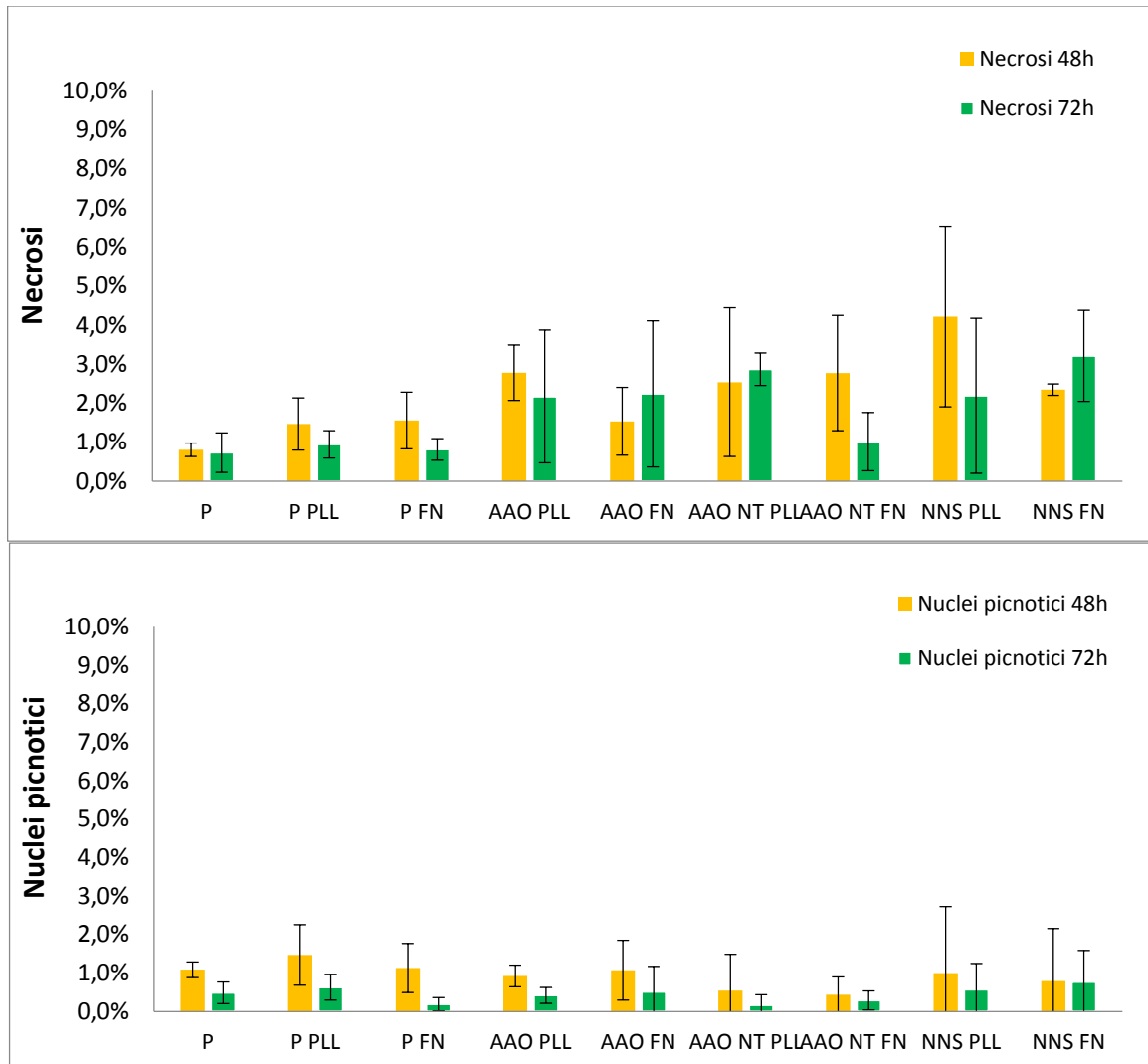


Figura 32. Test di vitalità cellulare con Propidio di Ioduro ed Hoechst su cellule NIH-3T3, incubazione 48 e 72 ore. N=3.

Lo stesso tipo di test è stato effettuato su cellule tenute in coltura per 7 giorni su AAO-NT allo scopo di chiarire se, nel lungo termine, cellule con ciclo cellulare più lento vadano incontro a morte. L'esperimento ha mostrato chiaramente che, nonostante le cellule proliferino più lentamente, esse rimangono vitali giacché la percentuale di cellule necrotiche dopo una settimana di incubazione è $7,1 \pm 0,8\%$, $n=3$ e la percentuale di nuclei picnotici è di $1,8 \pm 0,9\%$, $n=3$.

3.5 Studi di proliferazione cellulare: marcatura EdU per lo studio della fase G1

Il protocollo Click-iT EdU è stato utilizzato per condurre studi a diversi *time point*. Da tale tipo di studio è possibile estrapolare informazioni su quale sia la fase del ciclo cellulare interessata dal rallentamento. Nel grafico in figura 33 possiamo notare per entrambi i gruppi (AAO e AAO-NT) una fase di crescita lineare, seguita dal raggiungimento di un plateau. I due gruppi sono caratterizzati da una fase di crescita lineare con la stessa pendenza con la differenza che le cellule coltivate sulle membrane senza nanotubi (AAO^{PLL}) arrivano a plateau e quindi entrano nella fase S del ciclo cellulare dopo circa 18 ore (dato estrapolato dallo studio di citofluorimetria, dove dopo 18 ore di incubazione con EdU la popolazione marcata è il 95%); nel caso delle cellule seminate sulle membrane con i nanotubi (AAO-NT^{PLL}) si nota come il plateau sia raggiunto dopo 36 ore. Il grafico mostra come tutte le cellule (il 95%) entrino nella fase S del ciclo cellulare in entrambi i gruppi ma nel caso dei nanotubi i tempi sono ritardati. Da questo esperimento possiamo dedurre che il tempo di permanenza delle cellule AAO-NT in fase G1 è doppio rispetto a quello delle cellule AAO.

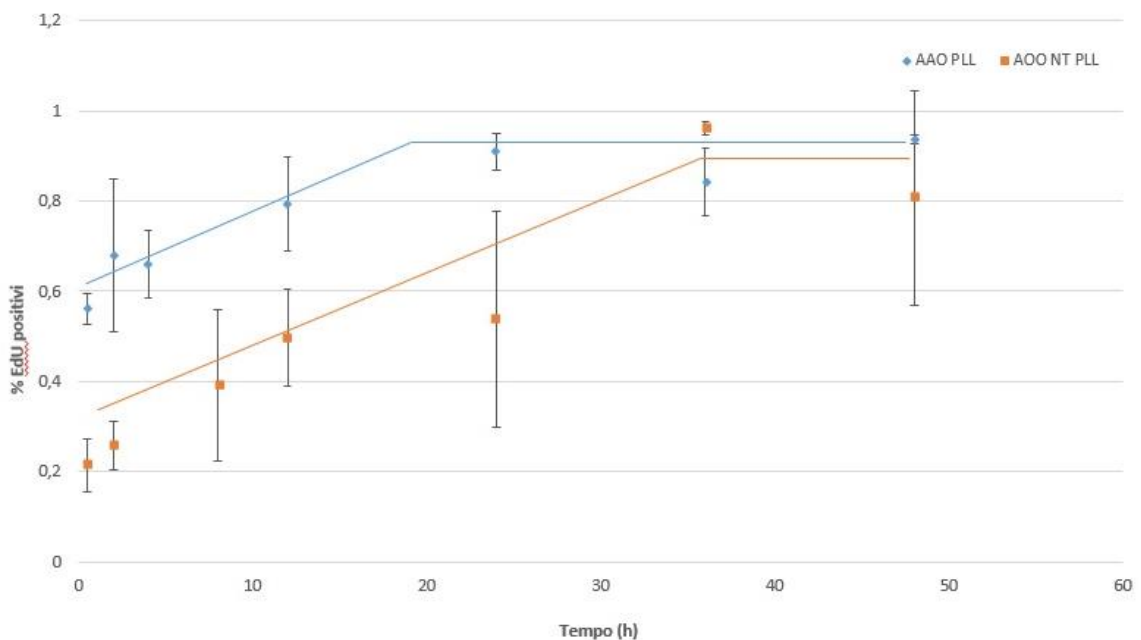


Figura 33. Test EdU su cellule NIH-3T3 per marcare la fase G1 del ciclo cellulare, incubazione a diversi *time point*.

3.6 Fosfo-istone H3

Allo scopo di escludere che si sia un ritardo nella fase M, è stato effettuato un test di proliferazione cellulare con immunocistochimica contando il numero di cellule positive alla immunocolorazione fosfo-istone H3, poiché l'istone H3 è specificatamente fosforilato sia durante la mitosi e meiosi, quando i cromosomi in metafase sono molto fosforilati. Dai dati ottenuti in figura 34 possiamo notare che nell'esperimento durato 72 ore la percentuale di cellule positive è di circa il 12% nella cellule seminate su substrati AAO su cui le cellule ciclano in 18 ore, mentre nel caso dei substrati AAO-NT su cui le cellule ciclano ogni 36 la percentuale di cellule positive è circa il 6%. Da questi dati, considerando che in 72 ore su AAO le cellule ciclano 4 volte e su AAO-NT 2 volte, possiamo notare come il rapporto 2:1 con la percentuale di cellule positive sia mantenuto e quindi possiamo concludere che non si rilevano differenze nella fase M tra i gruppi AAO ed AAO-NT.

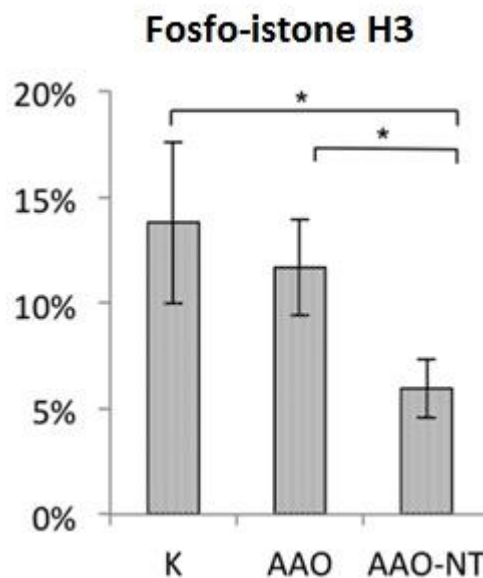


Figura 34. Test di proliferazione cellulare con immunocistochimica su fosfo-istone H3, per marcare la fase M del ciclo cellulare.

3.7 Marcatura tramite EdU delle cellule in fase G2, doppia marcatura EdU-fosfo-istone H3

Per valutare la presenza di un ritardo durante la fase G2 del ciclo cellulare, è stata effettuata una doppia marcatura EdU e fosfo-istone H3. Le cellule seminate su AAO già a 4 ore sono in fase M, come è possibile notare nel grafico in figura 35, in cui al time point

di 4 ore il plateau della percentuale delle cellule fosfo-istone H3 positive rispetto al totale delle cellule EdU positive è stato già raggiunto. Le cellule seminate sui nanotubi, invece, raggiungono il plateau dopo 4-6 ore. Quindi possiamo concludere che le cellule seminate su substrati AAO hanno una fase G2 lunga meno di 4 ore, mentre le cellule seminate su substrati AAO-NT hanno una fase G2 di una lunghezza compresa tra 4 e 6 ore. Il dato ottenuto è in buon accordo con quello riportato in letteratura che riferisce per le NIH-3T3 una durata della fase G2 di circa 3 ore (Hahn et al., 2009).

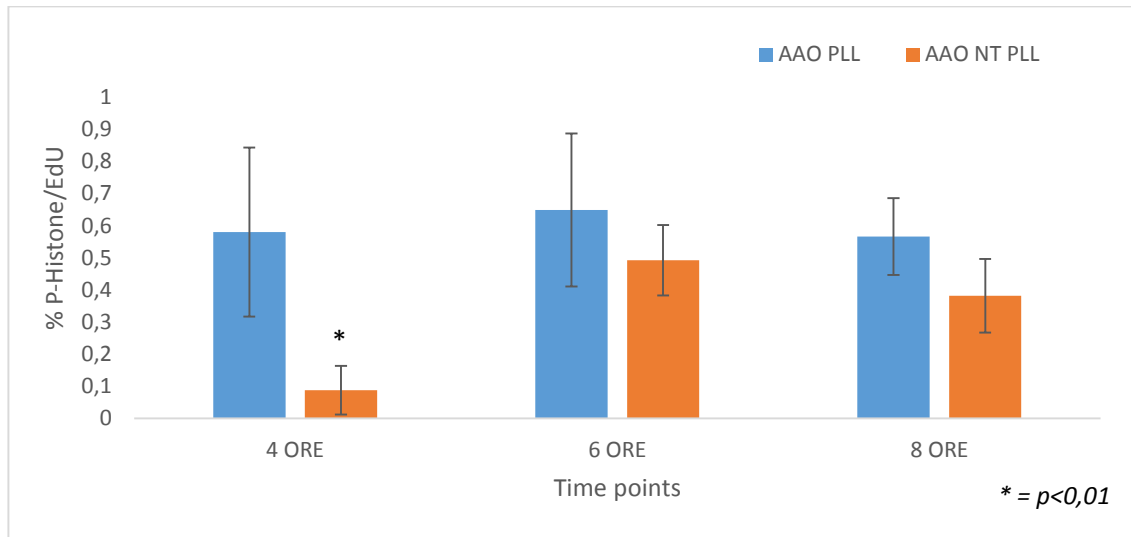


Figura 35. Test doppia marcatura EdU-fosfo-istone H3 su cellule NIH-3T3 per marcare la fase G2 del ciclo cellulare, incubazione a 4, 6 e 8 ore.

3.8 Marcatura EdU sui cloni MEF Tet-FAK WT, Tet-FAK F397

Per studiare un possibile coinvolgimento della proteina FAK nelle osservazioni precedenti è stato eseguito un esperimento di marcatura EdU su cellule MEF Tet-FAK WT, Tet-FAK F397 con lo scopo di andare. È stato utilizzato questo sistema di repressione tetraciclina dipendente per ottenere l'espressione inducibile di FAK *wild-type* o di FAK mutante nel sito di fosforilazione in fibroblasti derivati da embrioni di topo FAK deficienti.

Dai risultati ottenuti (Figura 36) possiamo concludere che la differenza tra cellule seminate su membrane AAO e cellule seminate su membrane AAO-NT si mantiene in tutti i gruppi. In altre parole, sia le cellule esprimenti FAK WT, sia le cellule esprimenti FAK mutato (F397), sia quelle non esprimenti FAK mostrano lo stesso andamento, ovvero la percentuale di cellule positive alla colorazione EdU è circa la metà nel gruppo AAO-NT rispetto al suo controllo (AAO). Tuttavia un'anomalia registrata nel gruppo di cellule non esprimenti FAK (F397) ci suggerisce di ripetere l'esperimento per confermare il dato.

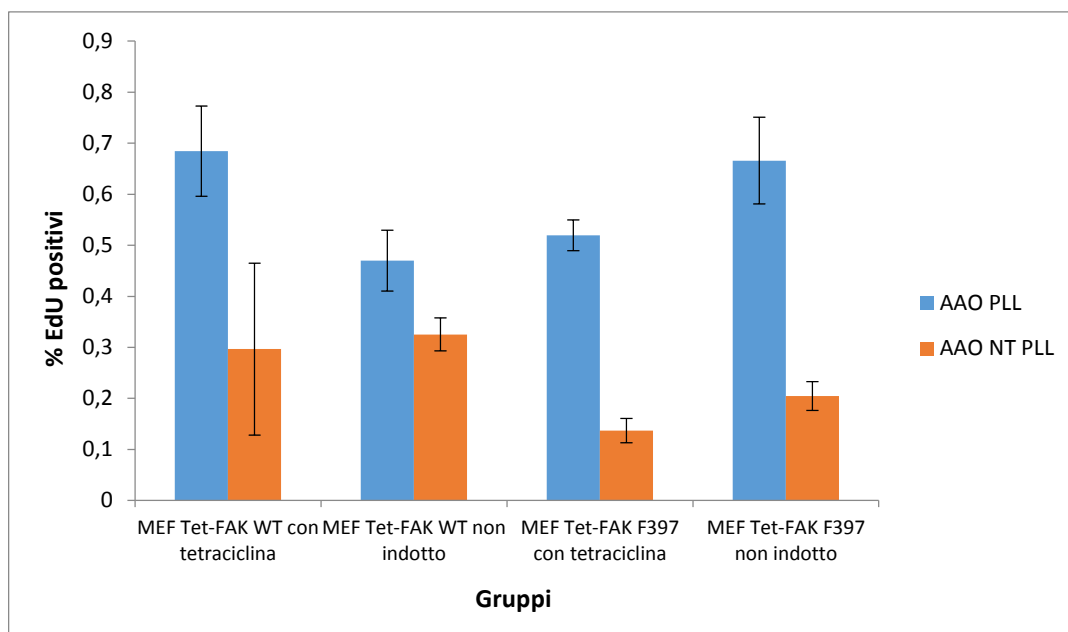


Figura 36. Test EdU su cellule MEF. n=3.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I biomateriali quando vengono impiantati in tessuti viventi producono una risposta da parte di questi ultimi; dal momento che tale risposta causa la formazione di una capsula fibrosa che porta all'isolamento del materiale impiantato e perdita dell'interfaccia tessuto/materiale, il presente lavoro di tesi si inserisce all'interno di un progetto il cui scopo è quello di trovare materiali impiantabili che non vengano incapsulati dai fibroblasti. Studi precedenti al presente lavoro di tesi hanno evidenziato come substrati nano-strutturati di bario titanato presentino interessanti proprietà in tal senso (Giannini, PlosOne, 2014). Mentre studi in letteratura riportano generalmente che la nano-strutturazione promuove l'adesione cellulare, il rafforzamento delle adesioni focali e la progressione del ciclo cellulare, (Manuel Théry, 2010; Jansen et al., 2015; McNamara et al., 2011; DeMali et al., 2014) nel lavoro di Giannini et al., è stato osservato come la nano-strutturazione rallenti la progressione del ciclo cellulare senza però influire in alcun modo sulla vitalità cellulare. Tale meccanismo potrebbe essere efficacemente sfruttato *in vivo* per inibire la formazione della capsula fibrotica intorno all'impianto.

Lo scopo della presente tesi è stato quello di ipotizzare meccanismi molecolari che giustificano tali osservazioni sperimentali, andando a studiare l'effetto della nanostrutturazione su fibroblasti murini.

Il meccanismo fondamentale da considerare è la meccanotrasduzione, ovvero il processo mediante il quale uno stimolo meccanico è trasferito tramite l'adesione cellulare al nucleo, con conseguente modulazione dell'espressione genica e proteica, facilitando la risposta cellulare adattativa. La meccanotrasduzione è fondamentale per i processi cellulari tra cui la sopravvivenza delle cellule, la crescita e la differenziazione. Superfici modellate topograficamente (generalmente micro o nano-strutturate) offrono un prezioso strumento non invasivo nella valutazione della risposta cellulare a tali stimoli e una maggiore comprensione delle interazioni all'interfaccia cellula/materiale ha importanti risvolti nell'ingegnerizzazione di una nuova generazione di dispositivi impiantabili. Un importante gruppo di recettori transmembrana che collegano meccanicamente la cellula al substrato (o matrice extracellulare) sono le integrine. Uno dei numerosi meccanismi di segnalazione delle integrine dipende da FAK, una tirosina chinasi citoplasmatica mecano-sensibile. FAK è nota per essere coinvolta nella fosforilazione durante la segnalazione integrina-mediata (Gilmore et al., 1996). Tuttavia, il suo ruolo esatto nell'adesione cellulare e nella migrazione non è chiaro. In uno studio di Wang et al., 2001, è stato osservato che FAK non è richiesta per il montaggio o il mantenimento delle adesioni focali, come indicato dalla formazione di adesioni focali apparentemente normali in cellule FAK deficienti (Ilic et al., 1995). Anche l'attivazione mediata dalle integrine di FAK è stata considerata indipendente dalla formazione di adesioni focali (Lyman et al., 1997).

Nel lavoro svolto precedentemente da Giannini et al., è stata documentata una ridotta progressione del ciclo cellulare delle cellule NIH-3T3 quando coltivate su VANTs di BaTiO₃. Questo effetto non può essere attribuito ad un effetto citotossico o ad un'alterazione della diffusione cellulare, invece, sembra dipendere dal forte miglioramento dell'adesione meccanica delle cellule al substrato, promossa esclusivamente dai VANTs.

Nel lavoro di tesi, per prima cosa si sono andati a studiare i meccanismi a livello di interazione substrato/membrana per accertare se il rallentamento della proliferazione cellulare potesse essere dovuto al coating di polilisina utilizzato. Sono stati utilizzati due diversi tipi di coating, polilisina e fibronectina, per andare a studiare due tipi di interazione a livello substrato membrana; infatti nel primo caso c'è un'interazione non mediata da integrine invece nel secondo caso abbiamo un'interazione mediata da integrine. Osservando i risultati ottenuti non è emersa nessuna differenza tra i due diversi

tipi di coating in tutti i substrati utilizzati, compresi i nanostrutturati ed i non nanostrutturati contenenti BaTiO₃. E' emersa invece una differenza tra i gruppi con substrati nanostrutturati e gruppi di controllo, a conferma dell'ipotesi che il rallentamento osservato non dipende dal coating effettuato, né dall'utilizzo delle membrane oppure dal BaTiO₃, ma unicamente dalla nanostrutturazione. L'esperimento è stato condotto tramite analisi immunocitochimica. Ad ulteriore conferma dei risultati ottenuti è stato eseguito un esperimento di citofluorimetria con cellule sottoposte a 18 ore di incubazione con EdU, ed è stato confermato il risultato del precedente test.

Allo scopo di scongiurare qualunque effetto connesso a potenziale tossicità indotta dai materiali testati, è stato effettuato un test di vitalità cellulare utilizzando lo ioduro di propidio (PI), per la sua proprietà di penetrare nelle cellule necrotiche e l'Hoechst 33342 per evidenziare i nuclei apoptotici condensati (picnotici). Dall'analisi con microscopia a fluorescenza è stato osservato che la mortalità era in tutti i gruppi inferiore al 5%, confermando che la diminuzione della proliferazione osservata non è influenzata da un effetto citotossico dovuto ai substrati utilizzati, come del resto già riportato nel lavoro di Giannini et al. Lo stesso tipo di test è stato effettuato su cellule tenute in coltura su AAO-NT per 7 giorni per andare a studiare cosa succede alle cellule dopo un tempo maggiore di incubazione ed è stato osservato che le cellule anche se proliferano più lentamente sono vitali e la percentuale di cellule necrotiche dopo una settimana di incubazione è $7,1 \pm 0,8\%$, $n=3$ e la percentuale di nuclei apoptotici è di $1,8 \pm 0,9\%$, $n=3$.

Allo scopo di formulare ipotesi su possibili meccanismi molecolari coinvolti, ci si è chiesto quale fase del ciclo cellulare fosse rallentata dalla presenza della nanostrutturazione.

I dati raccolti ci consentono di concludere che le cellule coltivate su AAO-NT stazionano in fase G1 più a lungo (precisamente il doppio) rispetto al controllo AAO. Si è riscontrato anche un leggero ritardo nella fase G2 (4 ore e 4-6 ore nei gruppi AAO e AAO-NT, rispettivamente) ma nessuna variazione nella fase M.

Sulla base dei risultati raccolti, dunque, il target molecolare potenzialmente coinvolto andrebbe ricercato in un *pathway* in qualche modo correlabile con transizione G1/S e G2. L'esperimento di *cell detachment* condotto nel lavoro di Giannini et al. ha evidenziato come solo le cellule coltivate su AAO-NT siano fortemente ancorate al loro substrato e difficilmente staccabili, anche in condizioni sperimentali "estreme". Questi indizi hanno portato la nostra attenzione sulla proteina FAK che è stata studiata per evidenziarne un

possibile coinvolgimento. L'esperimento è stato condotto su un sistema FAK inducibile TET ON rappresentato da cellule MEF e precisamente un clone esprime FAK WT a un clone esprime FAK mutato (F397). Tale esperimento sembra escludere un coinvolgimento di FAK giacché il dimezzamento delle cellule EdU positive su AAO-NT rispetto al gruppo di controllo AAO è stato osservato sia in presenza di FAK mutato nel residuo 397 (assenza di fosforilazione) sia in cellule FAK nulle. L'ipotesi dunque formulata alla luce di queste osservazioni è che il blocco dovuto alla nanostrutturazione possa avvenire a livello della meccano-trasduzione substrato/membrana/citoscheletro/nucleo. La situazione da noi prospettata è quella rappresentata nella figura 37. Le evidenze sperimentali ci inducono a pensare che l'interazione che si viene a creare tra la cellula ed il film nanostrutturato sia unica nel suo genere. Le analisi di microscopia elettronica e microscopia a forza atomica dimostrano che i nanotubi di bario titanato si presentano come una "foresta" all'interno della quale la cellula entra e si compenetra. Il contatto è così intimo (figura SEM nell'intro) e la superficie di interazione così vasta che il legame risultante tra il substrato e la cellula è difficilmente revertibile. Allo stesso tempo però i nanotubi grazie al loro *aspect ratio* offrono una matrice estremamente poco rigida e assai deformabile. Questa situazione è abbastanza anomala perché solitamente le matrici alle quali le cellule aderiscono stabilmente e fortemente sono matrici rigide. In senso figurato, è come se la cellula si trovasse immersa all'interno di sabbie mobili che l'avvolgono ma non forniscono punti di appiglio. Esprimendosi in termini fisici, i nanotubi di bario titanato non offrono un buon contesto per applicare la terza legge della fisica, il principio di azione e reazione. Le cellule solitamente "reagiscono" alla rigidità del substrato contraendosi e generando forze endogene che stimolano la progressione del ciclo cellulare. Le cose cambiano nella matrice offerta dai nanotubi di bario titanato che a causa della loro flessibilità non forniscono gli "appigli" necessari per la generazione delle forze endogene. Il risultato potrebbe essere una impossibilità della cellula di attivare i meccanismi di contrattilità acto-miosinica che portano alla riorganizzazione del citoscheletro in risposta ai segnali meccanici esterni. Il risultato di questo potrebbe essere che non essendoci risposta nella contrattilità acto-miosinica, non sono attivate le Rho chinasi necessarie per eliminare il blocco imposto da p27 e p21 nella progressione nella fase G1/S. Questa ipotesi sarà validata nel proseguo del presente lavoro di tesi.

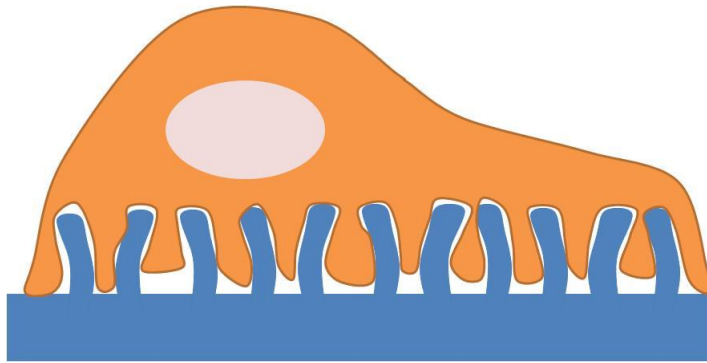


Figura 37. Esempio di interazione che si viene a creare tra la cellula ed il film nanostrutturato.

5. Bibliografia

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Biologia molecolare della cellula*. Quinta edizione (2009)

Anderson J. M., Rodriguez A., Chang D. T. *Foreign body reaction to biomaterials*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004 (2007).

Chen Y., Yu B., Wang J., Cochran R. E., Shyue J. *Template-Based Fabrication of SrTiO₃ and BaTiO₃ Nanotubes*. *Inorganic Chemistry*, Vol. 48, No. 2, (2009).

Roca-Cusachs P., Iskratsch T., Sheetz M. P. *Finding the weakest link – exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways*. *Journal of Cell Science* 125, 3025–3038 (2012).

DeMali K. A., Xiaowen Sun X., Bui G. A. *Force Transmission at Cell–Cell and Cell–Matrix Adhesions*. *Biochemistry*, 53, 7706–7717 (2014).

Frisch S. M., Vuori K., Ruoslahti E., Po-Ying Chan-Hui. *Control of Adhesion-dependent Cell Survival by Focal Adhesion Kinase*. *The Journal of Cell Biology*, Volume 134, Number 3, 793-799 (1996).

Giancotti F. G. *Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression*. *Current Opinion in Cell Biology*, 9:691-700 (1997).

Giannini M., Giannaccini M., Sibillano T., Giannini C., Liu D., Wang Z., Bau' A., Dente L., Cuschieri A., Raffa V. *Sheets of Vertically Aligned BaTiO₃ Nanotubes Reduce Cell Proliferation but Not Viability of NIH-3T3 Cells*. *PLoS ONE* 9(12): e115183. doi:10.1371/journal.pone.0115183 (2014).

Hahn A. T., Jones J. T., Meyer T. *Quantitative analysis of cell cycle phase durations and PC12 differentiation using fluorescent biosensors*. *Cell Cycle*. 8(7): 1044–1052 (2009).

Hasirci V., Kenar H. *Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior.* Nanomedicine 1(1), 73-90, (2006).

Ingber D. E., *Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again.* The FASEB Journal Vol. 20 (2006).

Jansen K. A., Donato D. M., Balcioglu H. E., Schmidt T., Danen E. H. J., Gijsje H., Koenderink G. H. *A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet.* Biochim. Biophys. Acta (2015).

Koch K., Bhushan B., Jung Y. C., Barthlott W. *Fabrication of artificial Lotus leaves and significance of hierarchical structure for superhydrophobicity and low adhesion.* Soft Matter, 5, 1386–1393 (2009).

Levina E. M., Kharitonova M. A., Rovinsky Y. A., Vasiliev J. M. *Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate.* Journal of Cell Science 114, 4335-4341 (2001).

McNamara L. E., Burchmore R., Riehle M. O., Herzyk P., Biggs M. J. P., Wilkinson C. D. W., Curtis A. S. G., Dalby M. J. *The role of microtopography in cellular mechanotransduction.* Biomaterials 33 2835e2847 (2012).

Mierke C. T., *The role of focal adhesion kinase in the regulation of cellular mechanical properties.* Phys Biol. 10(6):065005 (2013).

Oktay M., Wary K. K., Dans M., Birge R. B., Giancotti F.G. *Integrin-mediated Activation of Focal Adhesion Kinase Is Required for Signaling to Jun NH₂-terminal Kinase and Progression through the G1 Phase of the Cell Cycle.* The Journal of Cell Biology, Volume 145, Number 7, 1461–1469 (1999).

Owen J. D., Ruest P. J., Fry D. W., Hanks S. K. *Induced Focal Adhesion Kinase (FAK) Expression in FAK-Null Cells Enhances Cell Spreading and Migration Requiring Both Auto-*

and Activation Loop Phosphorylation Sites and Inhibits Adhesion-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Pyk2. Molecular and cellular biology, p. 4806–4818, Vol. 19, No. 7 (1999).

Provenzano P. P., Keely P. J. *Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling.* Journal of Cell Science 124, 1195-1205 (2011).

Schaller M. D. *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions.* Journal of Cell Science 123, 1007-1013 (2010).

Théry M. *Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions,* Journal of Cell Science 123, 4201-4213 (2010).

Wang H., Dembo M., Steven K. Hanks S. K., Wang Y. *Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration.* PNAS, vol. 98 no. 20 11295–11300 (2001).

Wang H., Dembo M., Wang Y. *Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells.* Am J Physiol Cell Physiol 279: C1345–C1350, (2000).

Yamada K. M., Geiger B. *Molecular interactions in cell adhesion complexes.* Current Opinion in Cell Biology, 9:76-85 (1997).

Yao M., Goult B. T., Chen H., Cong P., Sheetz M. P., Jie Yan J. *Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation.* Scientific Reports, 4:4610 (2014).

Zhao J., Reiske H., Guan J. *Regulation of the Cell Cycle by Focal Adhesion Kinase.* The Journal of Cell Biology, Volume 143, Number 7, 1997-2008 (1998).

Zheng W., Zhang W., Jiang X. *Precise Control of Cell Adhesion by Combination of Surface Chemistry and Soft Lithography.* *Adv. Healthcare Mater*, DOI: 10.1002/adhm.201200104 (2012).

Zhu J., Luo B., Xiao T., Zhang C., Nishida N., Springer T. A. *Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces.* *Molecular Cell* 32, 849–861 (2008).