



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

---

Dottorato di Ricerca in Scienza e Tecnologia dei Materiali  
XXVIII Ciclo

Anna Alba

**Eventi precoci nel processo di interazione tra Cellule  
Staminali Mesenchimali e Biomateriali polimerici  
(PSS e PEI Multilayers)**

---

Tesi di Dottorato

---

Cordinatore :  
Chiar.ma Prof.ssa Maria Grazia  
Grimaldi

Tutor :  
Chiar.mo Prof. Giovanni Marletta

Co-Tutor :  
Chiar.ma Prof.ssa Fulvia Sinatra

---

ANNI 2012 – 2015

## INDICE

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>OBIETTIVO.....</b>	<b>7</b>
<b>ADESIONE E SPREADING CELLULARE.....</b>	<b>11</b>
<b>CELLULE E MATRICE EXTRACELLULARE.....</b>	<b>12</b>
<b>INTEGRINE.....</b>	<b>14</b>
<b>CITOSCHELETRO.....</b>	<b>15</b>
<b>ADESIONI FOCALI.....</b>	<b>17</b>
<b>Chinasi delle Adesioni Focali (FAK).....</b>	<b>29</b>
<b>Paxillina.....</b>	<b>20</b>
<b>ADESIONE E CICLO CELLULARE.....</b>	<b>21</b>
<b>BIOMATERIALI.....</b>	<b>22</b>
<b>Polimeri Naturali e Sintetici.....</b>	<b>24</b>
<b>Polietilenimine (PEI).....</b>	<b>25</b>
<b>Multilayers di Polielettroliti (PEMs).....</b>	<b>26</b>
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>29</b>
<b>Morfologia Cellulare.....</b>	<b>29</b>
<b>Vitalità Cellulare.....</b>	<b>31</b>
<b>Attività Metabolica.....</b>	<b>32</b>
<b>Citoscheletro.....</b>	<b>38</b>
<b>Molecole di Adesione.....</b>	<b>41</b>
<b><i>Integrine</i>.....</b>	<b>42</b>

<i>FAK pY397 e Pax pY31</i> .....	46
Interazione Cellule-Superficie in QCM-D.....	53
<b>CONCLUSIONI</b> .....	57
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	59
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	68

## INTRODUZIONE

La perdita o il danneggiamento di organi e tessuti rappresenta ancora oggi una delle grandi problematiche della medicina, finora affrontata attraverso un approccio basato sul trapianto d'organo o di tessuto. Il primo trapianto di organi umani fu eseguito nel dicembre del 1954 dal chirurgo statunitense Joseph E. Murray, che effettuò un trapianto di rene tra due gemelli omozigoti, la cui compatibilità genetica garantì il successo dell'intervento. Diversi anni dopo Murray effettuò un nuovo trapianto di rene tra individui non identici geneticamente, ottenendo anche in questo caso degli ottimi risultati. La possibilità di poter trasferire organi o tessuti tra individui con caratteristiche genetiche differenti segnò una nuova era nel campo della medicina, aprendo le porte all'uso del trapianto come mezzo di terapia per la sostituzione di organi e tessuti compromessi o danneggiati.

Questo tipo di approccio clinico comprende tuttavia una serie di limitazioni relative alla disponibilità di donatori di organi, al monitoraggio dei pazienti trapiantati soggetti a totale rigetto dell'organo, ad una estesa risposta immunitaria ed a lunghissime terapie immunosoppressive a cui i pazienti vengono sottoposti.

La ricostruzione chirurgica, la terapia farmacologica, l'uso di protesi sintetiche e di vari dispositivi medici sono terapie alternative per il trattamento di patologie relative alla perdita di funzioni d'organo o di tessuto; tuttavia anch'esse sono soggette a limitazioni dovute al fatto che, a differenza degli organi veri e propri, i dispositivi medici o le protesi sintetiche non sono comunque in grado di ricostruire o sostituire tutte le funzioni perse da un organo o da un tessuto danneggiato.

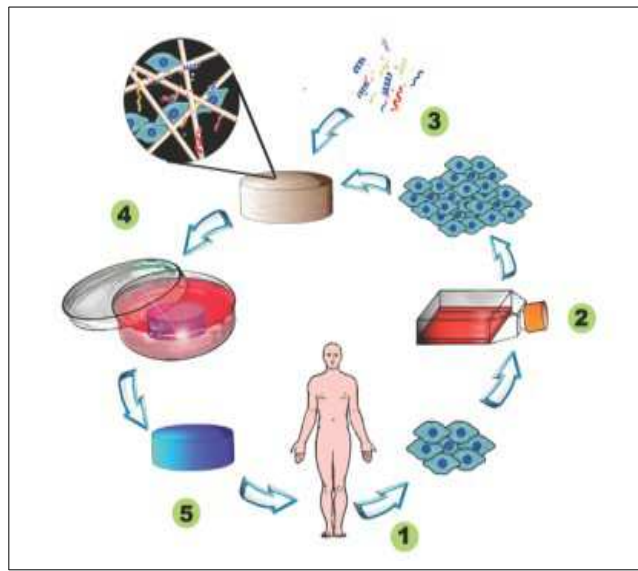
Tali problematiche hanno portato medici e scienziati a cercare approcci innovativi per il trattamento di organi o tessuti danneggiati, attraverso lo sviluppo di nuovi biomateriali e terapie basate su presupposti diversi rispetto alla classica sostituzione di organi o tessuti.

L'ingegneria tissutale (Tissue Engineering, T.E.), così come definita da Langer e Vacanti, è “un campo multidisciplinare di ricerca che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita verso lo sviluppo di sostituti biologici che rigenerano, mantengono o migliorano la funzione tissutale” (Langer R. Vacanti JP. 1993), emerso al fine di superare le limitazioni delle terapie convenzionali.

Il principio della T.E. è quello di combinare in maniera strategica cellule, scaffold e fattori bioattivi per dirigere la formazione di un nuovo tessuto o di un organo *in vitro*. Man mano che gli scienziati sono giunti alla comprensione della complessità dei processi biologici su scala cellulare e molecolare, i campi dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa hanno

puntato verso l'applicazione di queste conoscenze per controllare le interazioni tra le cellule e loro microambiente ( Bean AC and Tuan RS. 2013).

La realizzazione di sostituti biologici *in vitro* presuppone l'utilizzo di una componente cellulare avente una capacità proliferativa e differenziativa tale da ricostituire interamente il tessuto danneggiato, e di un "supporto" impiantabile avente caratteristiche tali da consentire l'attecchimento, la proliferazione, la sopravvivenza ed il differenziamento cellulare.



Bean and Tuan. 2013. *Micro and Nanotechnologies in Engineering Stem Cells and Tissues*

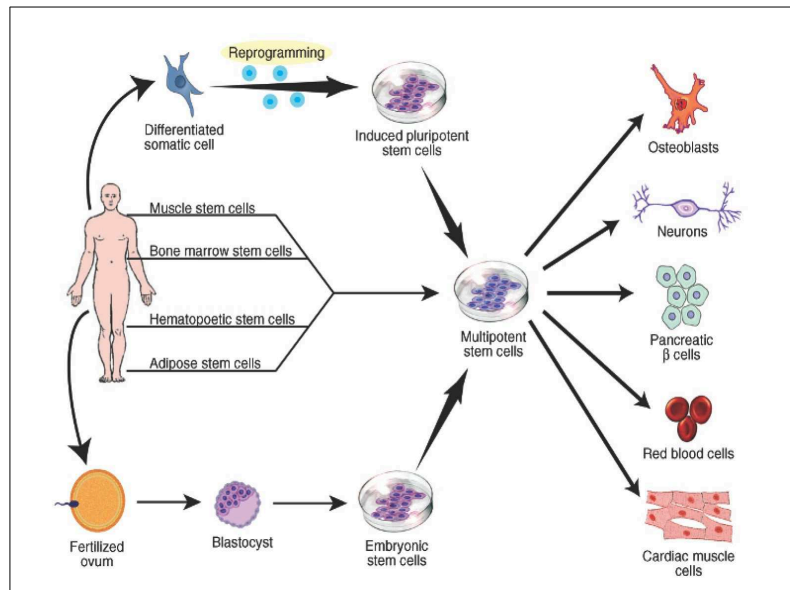
Per evitare l'insorgenza di una risposta immunitaria, dovuta all'impianto di sistemi non autologhi, l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa si sono focalizzati sull'uso di cellule autologhe, derivate dal tessuto del donatore, o di cellule non immunogene.

Le cellule differenziate hanno una limitata capacità proliferativa ed è quindi difficile ottenerne un numero sufficiente per la rigenerazione di un tessuto; tale limitazione ha aperto una nuova frontiera scientifica caratterizzata dallo studio delle cellule staminali, il cui utilizzo è diventato ormai ubiquitario nei campi della T.E. e della medicina rigenerativa.

Le caratteristiche che definiscono le cellule "Staminali" sono la proprietà di auto rinnovamento (self-renewal), la proliferazione a lungo termine e la loro capacità di differenziare in diversi tipi cellulari se sottoposte a specifici stimoli (Dawson E *et al.* 2008).

Le cellule staminali sono tipicamente classificate in due grandi gruppi: embrionali ed adulte, e suddivise in base alla loro plasticità (capacità di differenziarsi in uno o più tipi cellulari) in

totipendenti (zigote), pluripendenti (staminali embrionali), multipendenti e unipendenti (staminali adulte).



*Bean and Tuan. 2013. Micro and Nanotechnologies in Engineering Stem Cells and Tissues*

Le cellule staminali embrionali (ESCs) derivano da una massa cellulare interna della blastocisti che si forma dopo la fecondazione della cellula uovo, prima del suo impianto nell'utero. Esse sono pluripendenti in quanto in grado di differenziarsi in cellule di tutti e tre i foglietti embrionali e possono essere mantenute in coltura per un periodo di tempo indefinito (Thomson JA *et al.* 1998).

Nonostante queste caratteristiche rendano le ESCs le migliori candidate alla rigenerazione dei tessuti, esse hanno delle limitazioni sia di natura etica (isolamento da embrioni) che biologica (potenziale formazione di tumori).

A differenza delle ESCs, le cellule staminali adulte sono isolate da tessuti post-natali e possono differenziare anch'esse in molteplici linee cellulari ma sono più limitate nella loro plasticità differenziativa in quanto già geneticamente “committed” verso specifici tipi cellulari.

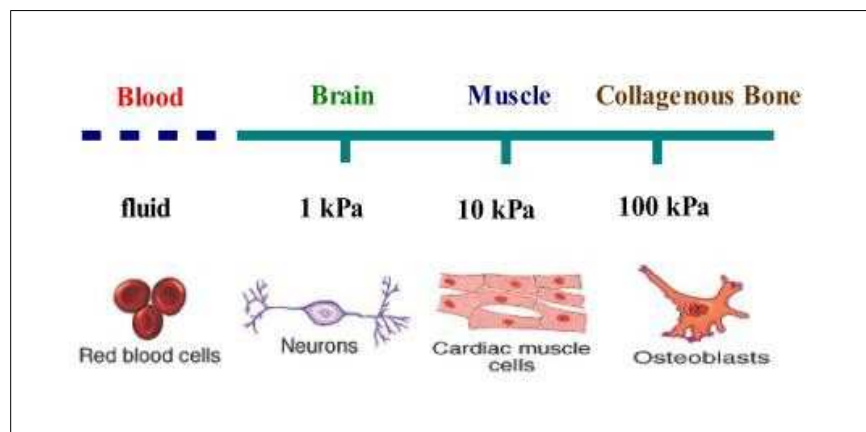
Le cellule staminali adulte sono state isolate da diversi tessuti, midollo osseo, tessuto adiposo, cordone ombelicale etc, ma quelle più ampiamente utilizzate in T.E. sono le cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (hMSCs).

Le hMSCs hanno la capacità di differenziare in cellule del tessuto osseo, cartilagineo ed adiposo che le rendono particolarmente indicate per la rigenerazione dei tessuti muscoloscheletrici e connettivi.

Ciò che caratterizza questo tipo di tessuti è la presenza di Matrice Extracellulare (ECM), una complessa e intricata rete di proteine, che conferisce stabilità strutturale e funzionale al tessuto, con cui le cellule interagiscono attivamente (Bowers S *et al.* 2010).

Engler AJ *et al.* (2006) hanno dimostrato l'importanza delle proprietà meccaniche di un substrato sul differenziamento di cellule staminali usando come modello le MSCs.

I tessuti presentano un diverso range di rigidità, che influisce notevolmente sul differenziamento delle MSCs, così come evidenziato dalle differenti morfologie cellulari tessuto-specifiche nello schema sottostante.



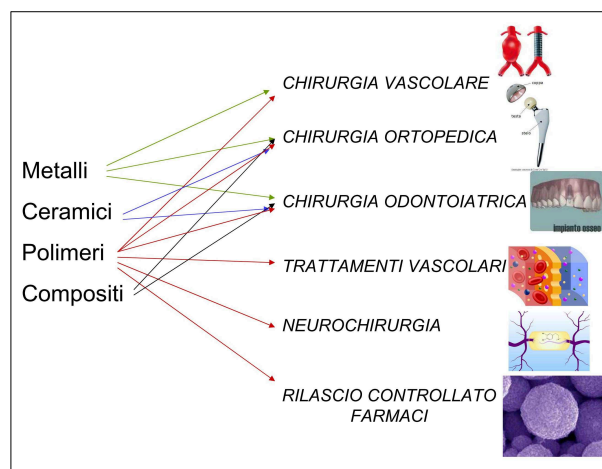
La ECM fornisce importanti segnali meccanici, topografici e biochimici che influenzano l'adesione, la sopravvivenza, la morfologia, la proliferazione, la migrazione e il differenziamento cellulare (Stabenfeldt SE *et al.* 2010), per cui nella progettazione di un costrutto impiantabile è fondamentale la scelta di un biomateriale che abbia delle caratteristiche chimico-fisiche che mimino il più possibile la ECM specifica del tessuto da rigenerare. Oltre al mimetismo tissutale, ossia la capacità di riprodurre il più fedelmente possibile le caratteristiche chimiche, fisiche e meccaniche di un tessuto, i materiali utilizzati per la realizzazione di scaffold in ingegneria tissutale devono rispondere ad altri criteri progettuali, quali:

- Affinità cellulare, la superficie del materiale deve favorire l'adesione delle cellule, promuovendone la crescita e il differenziamento verso una determinata linea cellulare

tessuto-specifica;

- Biocompatibilità, capacità di non provocare una risposta infiammatoria e non avere nessun effetto citotossico *in vivo*;
- Biodegradabilità, una volta impiantato il materiale deve essere riassorbito simultaneamente alla crescita cellulare, e quindi rimpiazzato gradualmente dalla nuova matrice extracellulare del tessuto in formazione.

Si conoscono diverse tipologie di biomateriali raggruppati principalmente in quattro grandi categorie: metalli, ceramiche, polimeri, compositi, che trovano differenti campi di applicazione in ambito biomedico.



A. Magnani. Università degli Studi di Siena

I biomateriali polimerici, distinti a loro volta in naturali e sintetici, trovano un più ampio campo di applicazioni rispetto alle altre categorie di biomateriali in quanto, durante la fabbricazione, è possibile modificarne facilmente le proprietà chimiche e meccaniche adattandole alle caratteristiche che il materiale dovrà possedere per svolgere al meglio le funzioni per le quali è stato progettato.

L'interazione cellula-biomateriale è il primo evento biochimico da valutare *in vitro* per proseguire nella corretta realizzazione di un costrutto biofunzionale.

Gli stimoli meccanici provenienti dal microambiente locale attivano una serie di recettori e molecole di adesione focale presenti sulla superficie cellulare che innescano delle cascate di segnalazione intracellulare culminanti nell'attivazione di specifici geni coinvolti nella secrezione di matrice extracellulare e numerose altre funzioni cellulari.

L'adesione iniziale di una cellula alla superficie di un biomateriale è un punto critico per il funzionamento e la longevità del materiale stesso ed è un buon indicatore di biocompatibilità

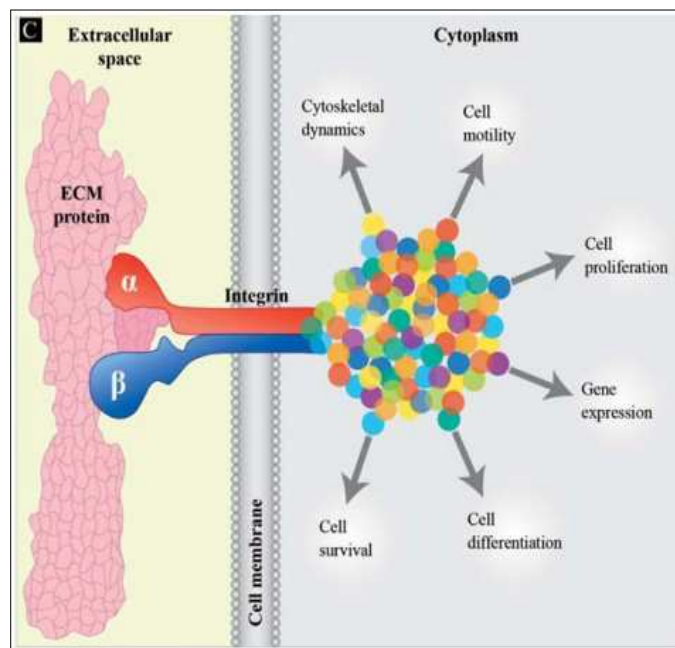


che in alcuni casi viene utilizzato come test di screening nello studio di nuovi biomateriali.

La superficie di un biomateriale in ambiente biologico viene rapidamente ricoperta da proteine solubili che mediano l'interazione tra cellule e biomateriale (Wilson CJ *et al.*, 2005), e numerosi studi hanno dimostrato che le proprietà superficiali del materiale influenzano il tipo, la quantità e la conformazione delle proteine adsorbite, condizionando la successiva interazione cellulare (Webb K *et al.*, 2000).

Il differente adsorbimento proteico biomateriale-dipendente ha effetto sui recettori di membrana deputati al riconoscimento delle proteine extracellulari (integrine) e sul corretto assemblaggio dei complessi proteici coinvolti nell'adesione cellulare (Focal Adhesion complexes).

Lo studio delle molecole coinvolte nel riconoscimento cellula-materiale e le conseguenti modificazioni strutturali cui la cellula va incontro durante le prime fasi di adesione, sono di cruciale importanza in quanto essenziali per la corretta regolazione di quasi tutte le funzioni cellulari (Docheva D. *et al.*, 2007).



Docheva D. *et al.* *J. Cell. Mol. Med.* Vol 11, No 1, 2007 pp. 21-38

## OBIETTIVO

Lo scopo del seguente progetto di dottorato è stato quello di studiare le prime fasi di interazione cellula-materiale utilizzando due differenti scaffold di natura polimerica, per comprendere come e quanto le caratteristiche chimico fisiche della superficie influenzassero l'adesione, la morfologia e la proliferazione cellulare.

Lo studio è stato condotto utilizzando cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo umano e film sottili realizzati con polielettroliti Polistirensolfonato (PSS) e Polietilenimina (PEI) assemblati con la tecnica Layer by Layer per lo sviluppo di nuovi materiali biocompatibili applicabili in tissue engineering.

In un primo momento è stata valutata la citotossicità dei polielettroliti attraverso un test di vitalità cellulare e successivamente sono state analizzate le variazioni morfologiche dovute al riarrangiamento del citoscheletro actinico e tubulinico.

L'indagine, è proseguita con l'analisi di quelle componenti proteiche precocemente reclutate nei siti di interazione cellula-superficie per la formazione dei complessi focali di adesione.

Tali complessi sono costituiti da una serie di proteine organizzate in modo da connettere fisicamente la cellula alla superficie e trasmettere segnali meccanici, provenienti dall'ambiente extracellulare, all'interno della cellula al fine di regolarne numerose funzioni biologiche.

I complessi multiproteici assemblati a livello dei contatti focali di adesione consistono in recettori di membrana quali le integrine, e in una serie di proteine funzionali e strutturali reclutate secondo uno specifico ordine temporale e attivate dalla modificazione conformazionale che le integrine subiscono associandosi ai ligandi extracellulari.

L'influenza della chimica di superficie è stata analizzata inizialmente seguendo l'andamento delle integrine  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 1\beta 1$ , coinvolte nel riconoscimento di due principali proteine extracellulari, la fibronectina ed il collagene, e successivamente studiando la distribuzione di alcune proteine reclutate a livello dei punti di contatto focali cellula-materiale.

Il reclutamento, l'attivazione e la localizzazione delle proteine coinvolte nella formazione dei complessi focali di adesione sono regolati da processi di fosforilazione che consentono di convertire un segnale di tipo meccanico, proveniente dall'ambiente extracellulare, in un segnale di tipo biochimico intracellulare, che regola l'organizzazione delle componenti citoscheletriche e numerose funzioni biologiche ad esso associate.

Sono state analizzate due proteine precocemente reclutate nei siti di adesione, la Chinasi delle Adesioni Focali (FAK), una tirosin-chinasi attivata dalle integrine, e la Paxillina, una proteina

strutturale strettamente associata al citoscheletro actinico.

Nello specifico il dominio citoplasmatico della catena  $\beta$  delle integrine facilita l'attivazione di FAK stimolandone l'autofosforilazione al residuo di tirosina Y397 sul dominio N-terminale, con conseguente incremento dell'affinità per un'altra chinasi Src. Il complesso FAK-Src attiva la fosforilazione della proteina adattatrice Paxillina promuovendo la fosforilazione del residuo di tirosina Y31.

Le due proteine sono state quindi identificate in uno specifico stato di fosforilazione indice di attivazione, FAK pY397 e Pax pY31, e attraverso tecniche di immunofluorescenza indiretta è stata osservata una loro differente distribuzione sulle cellule adese alle due superfici polimeriche studiate.

Sono stati successivamente condotti degli studi per analizzare l'attività metabolica cellulare, utilizzando quali parametri i livelli di ATP intracellulare e l'attività mitocondriale.

L'importanza dell' Adenosintrifosfato (ATP) è stata ampiamente riconosciuta nella regolazione metabolica dei pathway anabolici e catabolici, così come fonte di energia per le attività chimiche e biologiche della cellula.

L'attività mitocondriale è stata analizzata attraverso l'uso di una sonda fluorescente (JC-1) sensibile alla variazione del potenziale di membrana mitocondriale. Tale sonda è in grado di interagire selettivamente con la membrana polarizzata dei mitocondri e virare il suo colore dal verde all'arancione conseguentemente alla formazione di aggregati che causano lo shift di emissione da 530 nm a 590 nm.

Sono state infine condotte delle indagini relative alla progressione del ciclo cellulare attraverso l'analisi dell'espressione di alcuni geni coinvolti nella regolazione di quest'ultimo.

Il ciclo cellulare consiste in una serie di fasi che si susseguono cronologicamente: una fase iniziale di quiescenza detta G0 in cui la cellula non cresce e non prolifera, una fase G1 in cui la cellula inizia a trascrivere tutti quei fattori necessari per la replicazione del DNA, una fase S di sintesi e duplicazione del DNA, una fase G2 di preparazione alla divisione e una fase M di mitosi in cui si assiste alla separazione del patrimonio genetico in due cellule figlie. Il passaggio da una fase all'altra è finemente regolato da una serie di proteine chiamate cicline.

In particolare è stata analizzata l'espressione genica in real time PCR di due cicline coinvolte nella regolazione delle prime fasi del ciclo cellulare, la ciclina D2 essenziale per il passaggio in fase G1, la ciclina E2 regolante il passaggio dalla fase G1 alla fase S, e dell'oncogene p53.

L'interazione cellula-superficie è stata inoltre analizzata attraverso la tecnica QCM-D in fase liquida, che consente di caratterizzare i sistemi biomolecolari nel loro ambiente acquoso naturale, e permette di studiare processi come l'adsorbimento di multistrati di polielettroliti,

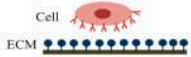
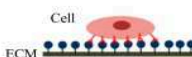
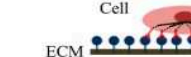


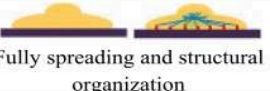
l'adsorbimento di proteine su una superficie *in situ* e l'interazione fra la cellula e il materiale.

## ADESIONE E SPREADING CELLULARE

L'adesione è un fenomeno centrale nella comunicazione e nella regolazione cellulare ed è di fondamentale importanza nello sviluppo e nel mantenimento di un tessuto in quanto responsabile della trasmissione dei segnali che regolano il differenziamento, il ciclo, la migrazione e la sopravvivenza cellulare.

Difetti nei meccanismi di adesione cellulare sono direttamente responsabili di un ampio range di patologie comprendenti l'artrite, il cancro, l'osteoporosi e l'aterosclerosi.

Il processo di adesione cellulare *in vitro* è caratterizzato da tre step: contatto del corpo cellulare al substrato, appiattimento ed espansione del corpo cellulare, e organizzazione del citoscheletro actinico con formazione di adesioni focali tra cellula e substrato (Khalili AA *et al.* 2015).

Cell Adhesion Phases	Phase I	Phase II	Phase III
Schematic diagram of cell adhesion			
Schematic diagram of the transformation of cell shape	 Initial attachment	 Flattening	 Fully spreading and structural organization
Cell adhesion intervention	Electrostatic interaction	Integrin bonding	Focal adhesion
Adhesion stages	Sedimentation	Cell attachment	Cell spreading and stable adhesion

*Khalili AA et al. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16*

È noto che le cellule ancoraggio-dipendenti non si dividono prima di aver subito una estensione (spreading) sul substrato di crescita, per cui la misura dell'area di spreading correla positivamente con l'attività proliferativa. Lo spreading cellulare stimola la proliferazione attraverso un pathway biochimico e uno meccanico. Entrambi i meccanismi iniziano con l'adsorbimento di molecole mediatrici dell'adesione dai fluidi biologici alla superficie del materiale e il legame di queste ultime con siti attivi presenti sui recettori cellulari. Il legame di questi recettori con i rispettivi ligandi ne induce il clustering in specifici domini chiamati “placche di adesione” o “siti di adesione”, dove i recettori comunicano con numerose proteine strutturali e regolatrici attraverso le quali sono associati al citoscheletro actinico.

Il meccanismo biochimico consiste nell'attivazione di proteine regolatrici a livello delle

placche di adesione, quali la chinasi delle adesioni focali (FAK) e altre tirosin kinasi (Src, PYK2, Csk, Abl), così come di altri pathway di segnalazione intracellulare, comunemente attivati anche dai fattori di crescita, quali le MAP chinasi, ERK 1 e 2, che dirigono il passaggio dalla fase G0 alla fase G1 e dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare inducendone la proliferazione.

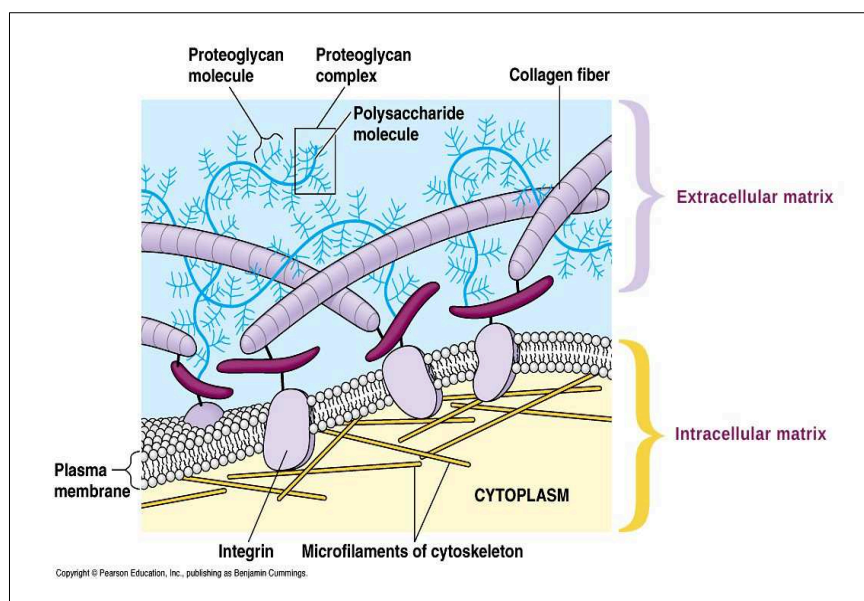
Il controllo della crescita di tipo meccanico è basato sul cambiamento della tensione del citoscheletro actinico. Le fibre di actina sono ancorate alle componenti strutturali dei siti di adesione (talina, paxillina, vinculina, alfa-actina, tensina) e allo stesso tempo associate alla membrana nucleare e a numerosi organuli cellulari. L'incremento della tensione del citoscheletro durante lo spreading stimola la proliferazione cellulare attraverso l'espansione del nucleo, con l'allargamento dei pori nucleari e l'aumento del trasporto nucleare, così come l'incremento della sintesi e del trasporto di vari fattori extranucleari che regolano il ciclo cellulare. Inoltre l'aumento del volume nucleare induce la decondensazione della cromatina incrementando l'accessibilità del macchinario replicativo al DNA.

La dipendenza tra spreading e proliferazione non è però lineare. L'incremento dello spreading, la formazione delle placche di adesione e l'assemblaggio del citoscheletro actinico stimolano la proliferazione cellulare solo a certi stadi di adesione. La capacità di proliferazione e la velocità di migrazione di alcune linee cellulari quali cellule muscolari, endoteliali, fibroblasti e cellule staminali mesenchimali, cresciute su differenti substrati, è maggiore se la forza di adesione non è eccessivamente alta, mentre un elevato grado di adesione è associato piuttosto a cellule quiescenti o in maturazione.

L'adesione e lo spreading sono fortemente influenzate dalle proprietà fisico-chimiche della superficie del materiale, in termini di composizione chimica, energia superficiale, polarità, bagnabilità, rugosità, topografia e proprietà meccaniche.

## CELLULE E MATRICE EXTRACELLULARE

Una parte sostanziale del volume dei tessuti è costituita dallo spazio extracellulare, in larga parte riempito da una intricata rete di macromolecole che costituiscono la matrice extracellulare (ECM). Essa comprende una varietà di proteine e polisaccaridi quali Fibronectina, Collagene, Laminina, Elastina, Glicosamminoglicani, secreti localmente e aggregati in un reticolo organizzato in maniera compatta e connesso alla superficie della cellula che l'ha prodotto.



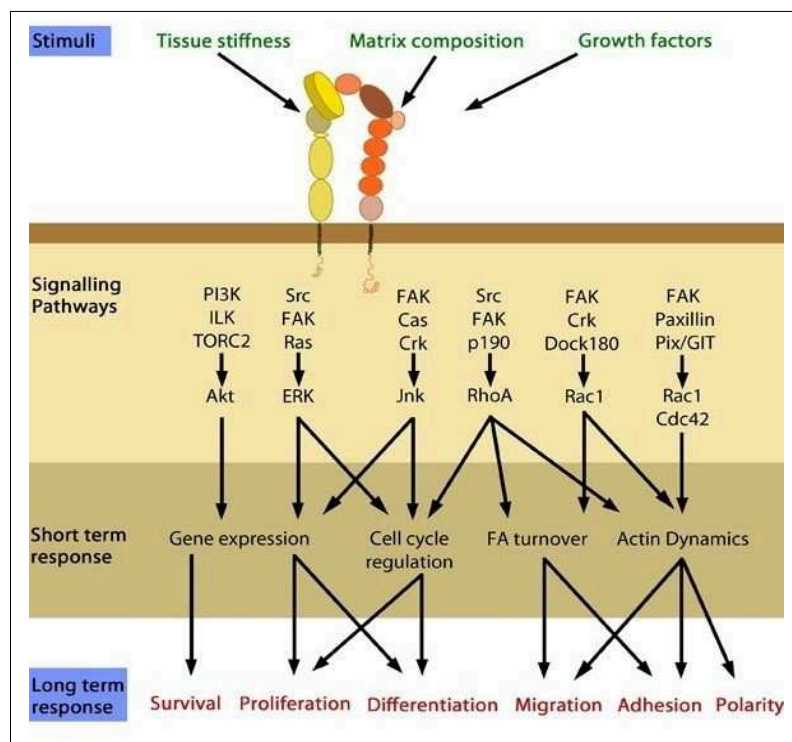
Le variazioni della quantità relativa dei vari tipi di macromolecole delle ECM ed il modo in cui esse si organizzano, originano una sorprendente varietà di forme, ciascuna adatta ai requisiti funzionali di un diverso tessuto. La matrice può infatti calcificare formando strutture solide come la roccia, tipiche delle ossa e dei denti; oppure può costituire la matrice trasparente della cornea, o ancora può adottare quella organizzazione che conferisce ai tendini la loro enorme resistenza alla trazione (Adams e Watt, 1993).

Le cellule ricevono delle informazioni strutturali e funzionali dalla ECM e sono in grado di trasdurre tali segnali in specifiche risposte cellulari attraverso un sistema di riconoscimento specifico (ligando-recettore) tra componenti della ECM (ligando) e proteine localizzate sulla membrana cellulare (recettore).

Una volta che il segnale è rilevato dal recettore di superficie, viene trasmesso all'interno della cellula di solito attraverso cambiamenti conformazionali del recettore o variazioni nel suo

stato di fosforilazione sul lato citosolico, per innescare una cascata di eventi di segnalazione a valle, che molto spesso culmina nel nucleo, provocando variazioni nel profilo di espressione genica delle cellule, inducendole a rispondere allo stimolo.

La morfologia cellulare è controllata in larga misura dalla organizzazione coordinata di matrice extracellulare, membrana plasmatica e citoscheletro. I complessi proteici che si realizzano a livello delle giunzioni ECM-membrana-citoscheletro (chiamati Adesioni Focali e Adesioni Fibrillari) stabiliscono una connessione fisica tra i compartimenti intracellulari ed extracellulari e dirigono l'organizzazione del citoscheletro actinico, la modulazione della morfologia cellulare e altri fondamentali processi cellulari (Tu Y *et al.* 2003).



*Mechanobiology Institute, Singapore 2013 [www.mechanobio.info]*

Le prime molecole coinvolte nell'interazione cellula-ECM sono le integrine, recettori specifici di membrana che modulano e dirigono la trasduzione del segnale meccanico attraverso l'attivazione ed il reclutamento di secondi messaggeri citoplasmatici, collegati a loro volta al citoscheletro cellulare sulla cui organizzazione è diretto il segnale.



## INTEGRINE

Le integrine sono glicoproteine eterodimeriche di membrana costituite dall'associazione non covalente di una subunità  $\alpha$  e una  $\beta$ , entrambe composte da una porzione globulare extracellulare (che consente il legame con i ligandi della ECM), un segmento transmembrana e una breve coda intra-citoplasmatica (connessa al citoscheletro actinico).

Nell'uomo esistono 18 tipi di subunità  $\alpha$  e 8 tipi di subunità  $\beta$  che eterodimerizzando formano 24 differenti recettori integrinici distinti per specificità e affinità di legame ( Prowse ABJ *et al.* 2011).

Subunits	Ligands
$\beta 1$	$\alpha 1$ Collagens, laminins †
	$\alpha 2$ Collagens, laminins
	$\alpha 3$ Collagens, laminins, fibronectin, entactin
	$\alpha 4$ Fibronectin, VCAM-1 †
	$\alpha 5$ Fibronectin
	$\alpha 6$ Laminins
	$\alpha 7$ Laminins †
	$\alpha 8$ Vitronectin, fibronectin, tenascin
	$\alpha 9$ Vitronectin, fibronectin, tenascin
	$\alpha 10$ Collagens †
	$\alpha 11$ Collagens †
	$\alpha V$ Fibronectin, vitronectin
$\beta 2$	$\alpha L$ ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	$\alpha M$ iC3b, fibrinogen, ICAM-1, coagulation factor X
	$\alpha X$ Fibrinogen, iC3b
	$\alpha D$ ICAM-3
$\beta 3$	$\alpha II\beta$ Fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, vitronectin, thrombospondin, tenascin
	$\alpha V$ Fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, vitronectin, thrombospondin, osteopontin, collagens
$\beta 4$	$\alpha 6$ Laminins
$\beta 5$	$\alpha V$ Vitronectin, fibronectin
$\beta 6$	$\alpha V$ Fibronectin, tenascin
$\beta 7$	$\alpha 4$ Fibronectin, VCAM-1, MAdCAM-1 †
	$\alpha E$ E-cadherin
$\beta 8$	$\alpha V$ Vitronectin

*J. Cell. Mol. Med. Vol 11, No 1, 2007*

Le due subunità associandosi, costituiscono una tasca in corrispondenza della quale avviene il riconoscimento e il legame delle molecole specifiche per ciascuna integrina, attraverso un

sito di riconoscimento costituito da tre aminoacidi (arginina-glicina-acido aspartico o RGD) (Van der Flier A. and Sonnenberg. 2001).

Le integrine sono normalmente espresse sulla superficie cellulare in uno stato inattivo, il legame con i rispettivi ligandi extracellulari ne induce il passaggio ad uno stato attivo attraverso una variazione conformazionale, seguita dal clustering e dall'assemblaggio di complessi proteici localizzati nei punti di adesione (placche di adesione).

Attraverso questo passaggio di segnali inside e outside, le integrine controllano tutta una serie di funzioni cellulari quali motilità, sopravvivenza, proliferazione, differenziamento, rimodellamento della ECM e sviluppo embrionale. L'assenza o il malfunzionamento delle integrine è associato allo sviluppo aberrante dei tessuti e delle loro funzioni, e di conseguenza all'insorgenza di molte malattie quali le patologie trombotiche, la formazione e progressione di metastasi tumorali, l'angiogenesi tumorale, i danni vascolari della aterosclerosi, l'osteoporosi e diverse patologie infiammatorie e autoimmuni (Docheva D. *et al.* 2007).

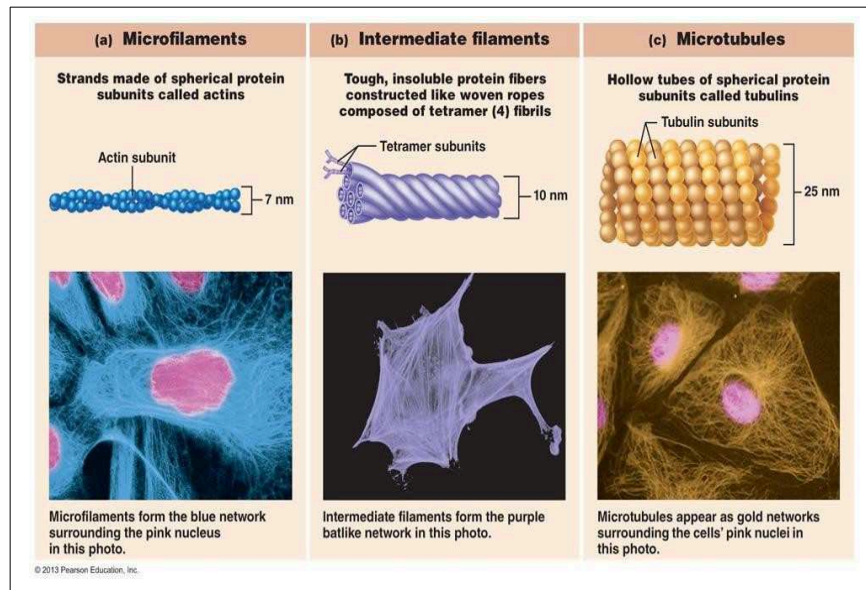
## **CITOSCHELETRO**

Il citoscheletro è un complesso reticolo tridimensionale, costituito da tre grandi classi di biopolimeri filamentosi : microfilamenti, microtubuli e filamenti intermedi, connessi tra di loro a formare un network strutturale che fornisce supporto meccanico alla cellula e le alle sue componenti citoplasmatiche.

I microfilamenti sono polimeri di actina larghi circa 7 nm, che generano nella cellula forze contrattili e di protrusione, regolandone la motilità; essi agiscono come un importante trasduttore di segnale dall'ambiente esterno verso l'interno della cellula.

I microtubuli sono gli elementi più grandi del citoscheletro, pari a circa 20-25 nm di larghezza, costituiti dall'associazione di 12-17 protofilamenti e svolgono un ruolo importante nella comunicazione cellulare e nella citocinesi, ossia nel processo di divisione cellulare. Tra le più importanti funzioni dei microtubuli c'è quella di garantire l'eguale distribuzione cromosomica tra due cellule in divisione.

I filamenti intermedi sono il terzo tipo di filamenti citoscheletri e rappresentano il gruppo più eterogeneo in termini di composizione e funzione. Sono stati descritti cinque tipi di filamenti intermedi, ciascuno costituito da diverse proteine monomeriche, assemblati con lo stesso meccanismo a formare filamenti di circa 10 nm in larghezza.



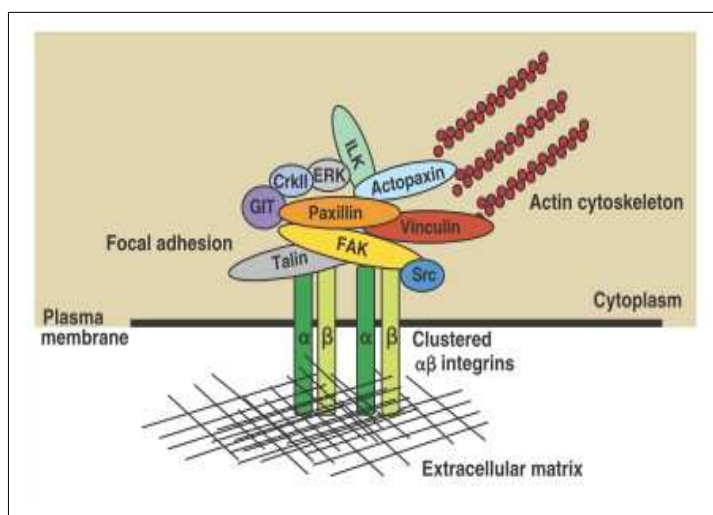
Il citoscheletro non si limita però al solo sostegno meccanico ma, grazie alla sua dinamicità, regola anche numerose funzioni cellulari quali il trasporto vescicolare, la divisione cellulare, il movimento, la contrazione muscolare e l'interazione diretta con l'ambiente extracellulare. Dato il ruolo diretto del citoscheletro sulle funzioni cellulari, aberrazioni a carico di proteine citoscheletriche sono associate a numerosi fenotipi patologici tra cui invasione tumorale, cirrosi epatica, fibrosi polmonare, sindromi cardiovascolari e malattie della pelle (Ramaekers F.C. *et al.* 2004).

## ADESIONI FOCALI

Le adesioni focali sono complessi macromolecolari che si assemblano nei punti di ancoraggio cellula-ECM e connettono fisicamente le integrine al citoscheletro actinico (Chen C.S. *et al.* 2003).

Il dominio citoplasmatico delle integrine non possiede attività enzimatica è quindi necessario un sistema di segnalazione biochimico che trasduca lo stimolo meccanico al citoscheletro (Deakin e Turner, 2008).

Alcune delle molteplici proteine che vengono reclutate nei siti di adesione per la formazione delle adesioni focali possiedono attività enzimatica (tirosina chinasi), altre invece hanno proprietà strutturali (proteine associate al citoscheletro), e tutte si assemblano in modo coordinato e finemente regolato.






*Science* 121 (15) 2435–2444. 2008

Sono stati identificati più di 150 componenti associati ai complessi di adesione che includono proteine integrali di membrana (integrine), proteine di connessione al citoscheletro (talina, vinculina,  $\alpha$ -actinina, zixina) e proteine adattatrici e segnalatrici (paxillina, Src tirosina chinasi e chinasi delle adesioni focali FAK). Le adesioni focali contengono anche proteine che vi si associano transientemente per modulare la regolazione della motilità cellulare (assemblaggio e disassemblaggio) (Bacakova L. *et al.* 2011).

La formazione delle placche di adesione consiste nei seguenti tre stadi di maturazione: i “complessi focali” rappresentano il primo stadio che guida lo spreading e la migrazione,

successivamente le “adesioni focali” che mediano una robusta adesione alla matrice extracellulare, ed infine lo stadio più maturo è quello delle “adesioni fibrillari” coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare.

Types and characteristics of cell-matrix adhesion structures.				
Parameter /adhesion type	Phosphorylation (Pax)	FAK content	Turnover	Localization and relation to actin and myosin fibres
<b>Focal complex</b> •	↑	↑	↑	Periphery 
<b>Focal adhesion</b> —	↑	↑	↑	Towards central part 
<b>Fibrillar adhesion</b> —	↓	↓	↓	Central part 

*Biotechnol Adv. 29(6):739-67. 2011*

Questi tipi di adesione differiscono nella loro morfologia, composizione chimica, localizzazione sulla membrana cellulare, turnover e associazione con specifiche molecole della ECM e del citoscheletro.

I **complessi focali** hanno una forma puntiforme (dot-like) localizzati alla periferia di cellule che iniziano ad estendersi (spread) e migrare sul loro substrato di adesione. Essi contengono alti livelli di FAK e altre tirosin chinasi come Src, e paxillina fosforilata. Intracellularmente i complessi focali sono in connessione con piccole fibre di actina e miosina di nuova formazione localizzate alla periferia della cellula. Il turnover dei complessi focali è molto veloce, la durata di queste strutture è meno di un minuto.

Le **adesioni focali** sono localizzate non solo alla periferia cellulare, ma si muovono anche verso la parte centrale della cellula. Esse sono più grandi dei complessi focali e hanno una morfologia bastoncellare. Lo stato di fosforilazione della paxillina e il reclutamento di FAK in queste strutture è ancora alto ma più basso rispetto ai complessi focali.

Le adesioni focali sono associate con lunghe fibre di actina e miosina localizzate non solo perifericamente ma anche vicino alla regione perinucleare della cellula.

Le **adesioni fibrillari** hanno la morfologia di fibre lunghe e sottili e sono localizzate nella regione centrale della cellula. La paxillina in questi siti non è fosforilata e il contenuto di FAK è molto basso. In confronto ai complessi focali e alle adesioni focali, il contenuto di paxillina, talina e vinculina in questi siti è relativamente basso, e i siti contengono principalmente

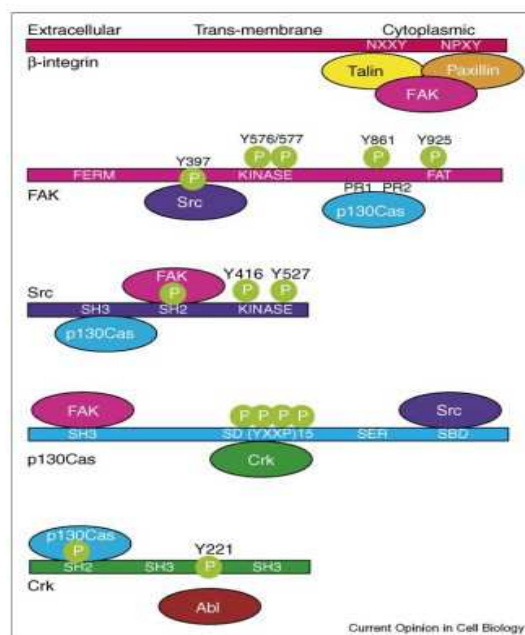
tensina. Cellule con adesioni fibrillari contengono spesse fibre di actina e miosina distribuite nell'intero volume cellulare. Le proprietà di questo tipo di adesioni sono tipiche delle condizioni fisiologiche *in vivo*, invece i complessi focali e le adesioni focali sono tipiche strutture in sistemi di coltura bidimensionali.

### Chinasi delle Adesioni Focali (FAK)

La chinasi delle adesioni focali (FAK) è una proteina tirosin kinasica di 125 KDa, reclutata precocemente nei punti di contatto tra cellula e superficie integrino-mediati, la cui struttura consiste in tre grandi domini: un dominio centrale chinamico, un dominio N-terminale FERM, contenente il maggiore sito di autofosforilazione alla tirosina 397 (Y397), e un dominio C-terminale FAT di collegamento alle integrine (Castillo A. *et al.* 2012).

FAK è attivata nel sito di clustering delle integrine attraverso l'interazione tra il suo dominio C-terminale e alcune proteine di ancoraggio al citoscheletro quali la vinculina e la paxillina (Mitra S.K. *et al.* 2006).

Il dominio citoplasmatico della catena  $\beta$  delle integrine facilita l'attivazione di FAK stimolandone l'autofosforilazione al residuo di tirosina Y397 sul dominio N-terminale FERM, con conseguente incremento dell'affinità per la chinasi Src. Il complesso FAK-Src attiva la fosforilazione della proteina adattatrice Paxillina e di p130Cas, che promuove il legame di un'altra proteina adattatrice Crk, e la cascata di segnalazione prosegue andando ad attivare altre proteine citoplasmatiche, regolatori della trascrizione genica etc.



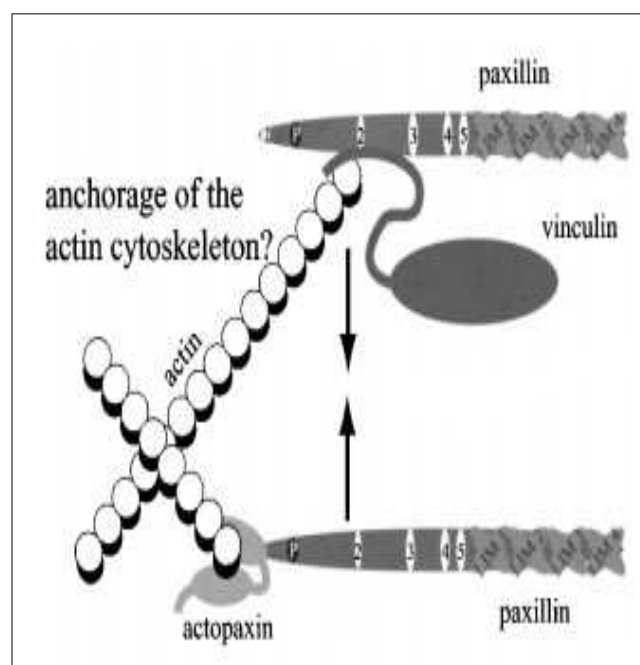
*Curr Opin Cell Biol.*18(5). 516-23. 2006

## Paxillina

La paxillina è un'altra importante proteina di connessione al citoscheletro reclutata precocemente durante la formazione delle adesioni focali, e coinvolta in numerosi pathway di segnalazione (Shaller M.D *et al.* 2001). La sua struttura del peso molecolare di 68-70 KDa è organizzata in numerosi domini, molti dei quali regolati da fosforilazione, che mediano l'interazione con numerose proteine strutturali e non. Attraverso l'interazione multipla con numerose proteine la paxillina funge da piattaforma per il reclutamento e l'assemblaggio di numerose proteine strutturali e regolatorie che insieme controllano il cambiamento dinamico durante l'adesione cellulare, l'organizzazione del citoscheletro e l'espressione genica, funzioni necessarie per la migrazione e la sopravvivenza cellulare (Deakin e Turner *et al.* 2008).

L'attivazione della paxillina a livello dei complessi di adesione focale è regolata dalla fosforilazione del residuo di tirosina 31, ad opera del complesso chinasi FAK-Src.

La funzione biologica della paxillina è quella di regolare la motilità cellulare attraverso l'organizzazione del citoscheletro actinico, in particolare essa gioca un ruolo fondamentale nel coordinare l'azione spaziale e temporale della famiglia *Rho* GTPase che regolano il citoscheletro actinico e la formazione delle stress fibers.

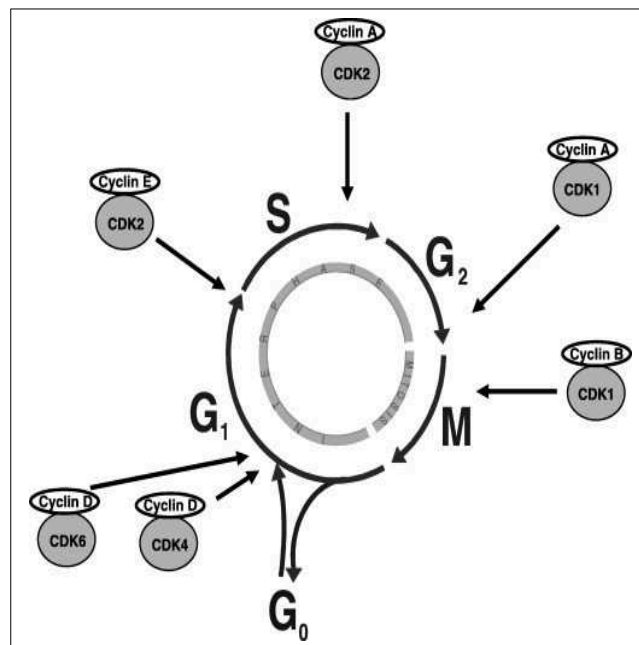


*Oncogene* 20, 6459 – 6472. 2001.

## ADESIONE E CICLO CELLULARE

L'adesione cellulare ad un substrato e la corretta organizzazione citoscheletrica sono requisiti fondamentali per la progressione del ciclo cellulare in fibroblasti umani.

Il ciclo cellulare consiste in una serie di fasi che si susseguono cronologicamente, una fase iniziale di quiescenza detta G<sub>0</sub> in cui la cellula non cresce e non prolifera, una fase G<sub>1</sub> in cui la cellula inizia a trascrivere tutti quei fattori necessari per la replicazione del DNA, una fase S di sintesi e duplicazione del DNA, una fase G<sub>2</sub> di preparazione alla divisione e una fase M di mitosi in cui si assiste alla separazione del patrimonio genetico in due cellule figlie. Il passaggio da una fase all'altra è finemente regolato da una serie di proteine chiamate cicline (Vermeulen K. *et al.* 2003).



*Cell Prolif. 36(3):131-49.2003*

La progressione del ciclo cellulare è regolata da una serie di fattori di crescita mitogeni e da segnali provenienti dalla matrice extracellulare. L'organizzazione citoscheletrica di una cellula in adesione può influire direttamente sul ciclo cellulare, come dimostrato dal decremento dell'espressione della ciclina D1 in fibroblasti aventi un citoscheletro non ben strutturato (Böhmer R.M *et al.* 1996).



## BIOMATERIALI

I biomateriali possono essere raggruppati in 3 grandi categorie di materiali: metalli, ceramiche (inclusi biovetri), e polimeri (naturali e sintetici), spesso due differenti classi di materiali vengono combinati insieme a dare i compositi, considerati una quarta classe di materiali.

La grande diversità e complessità dei materiali correntemente usati in medicina e biotecnologia è la testimonianza del significativo progresso scientifico e tecnologico che è avvenuto negli ultimi 50 anni. Dalla seconda guerra mondiale ai primi anni 60, un piccolo gruppo di chirurghi pionieri, iniziò a utilizzare polimeri e metalli disponibili in commercio per costruire impianti e componenti di dispositivi medici, e applicarli clinicamente. L'applicazione di questi primissimi impianti fu caratterizzata da notevoli successi e da altrettanti fallimenti, il che portò i chirurghi a ricorrere all'aiuto di studiosi di fisica, biologia, scienza dei materiali e ingegneria, per una fondamentale collaborazione interdisciplinare.

Questo gruppo eterogeneo di studiosi, non solo riconobbe la necessità di controllare la composizione, la purezza e le proprietà fisiche dei materiali che venivano usati, ma riconobbe anche la necessità di trovare materiali originali, stimolandone lo sviluppo a partire dagli anni 70.

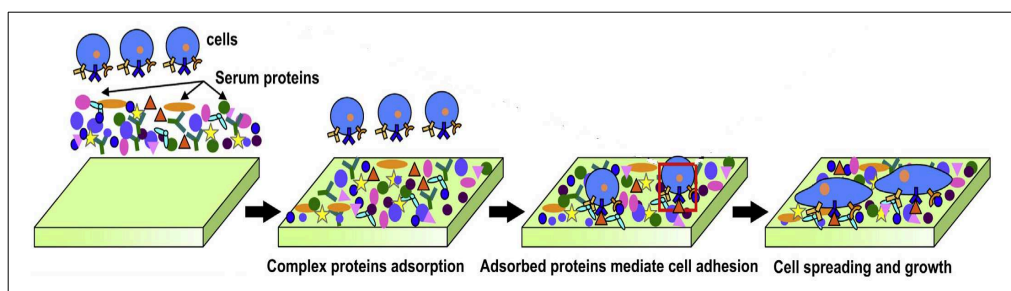
Nuovi materiali vennero quindi progettati *de novo* specificatamente per uso medico, quali polimeri biodegradabili e ceramiche bioattive. Molti erano derivati da materiali esistenti fabbricati con nuove tecnologie, come le fibre di poliestere lavorate o intrecciate a forma di tubi per innesti vascolari, altri materiali vennero modificati per fornire speciali proprietà biologiche come l'immobilizzazione di eparina per superfici anticoagulanti (Ratner BD. *et al.* 2004).

Negli ultimi decenni la ricerca scientifica ha focalizzato l'attenzione sull'applicazione di nanomateriali in campo biomedico poiché essi forniscono un'adeguata nano-interfaccia biologica che assicura un diretto controllo del comportamento cellulare *in vitro* (Ilie I. *et al.* 2012), grazie alla possibilità di controllare a livello nanoscopico la struttura dei materiali per sfruttarne al massimo le peculiari proprietà.

I nanomateriali possono essere composti da metalli, ceramiche, polimeri e compositi, che abbiano almeno una dimensione inferiore ai 100 nm, essi hanno dimostrato promettenti capacità nella stimolazione di alcune funzioni cellulari e nel miglioramento della loro applicabilità in ingegneria tissutale, grazie alle loro caratteristiche biomimetiche e alle loro particolari proprietà fisico-chimiche, meccaniche e biologiche.

La morfologia della superficie di un biomateriale su scala nanometrica influenza

profondamente l'adesione, la diffusione, la crescita e il differenziamento cellulare, poiché regola l'efficienza di adsorbimento delle proteine presenti in ambiente biologico e la successiva loro interazione con i recettori cellulari. Pertanto, la caratterizzazione quantitativa delle caratteristiche superficiali in nanoscala, è necessaria per comprendere la quantità e la distribuzione delle proteine adsorbite e di conseguenza per capire i meccanismi di interazione tra cellule e materiali nanostrutturati.



*Biomaterials 34 (2013) 5747-5758*

Lo sviluppo di nano-biomateriali per applicazioni in ingegneria tissutale è stato recentemente finalizzato alla realizzazione di materiali biomimetici in grado di reagire con i tessuti circostanti attraverso un riconoscimento biomolecolare (Shin H *et al.* 2003).

Il biomimetismo indica un tentativo di riprodurre l'organizzazione propria della matrice naturale. In particolare uno dei principali obiettivi è quello di riprodurre le complesse strutture cellulari e il microambiente a varie unità di scala: dalle strutture della membrana cellulare e il rivestimento pericellulare, alla matrice extracellulare.

La sfida dell'ingegneria biomedica è quella di selezionare un biomateriale con proprietà che si avvicinino il più possibile a quelle richieste per una particolare applicazione clinica e, per la loro versatilità, i polimeri sono la classe di biomateriali più indicati per questo tipo di obiettivo.

Numerosi tipi di polimeri sono ampiamente utilizzati nella realizzazione di dispositivi biomedici che includono impianti ortopedici, dentali, tessuti molli e impianti cardiovascolari.

I polimeri rappresentano la più ampia classe di biomateriali, e possono derivare da fonti naturali o da processi di sintesi organica.

## Polimeri naturali e Sintetici

La grande varietà di polimeri naturali rilevanti nel campo dei biomateriali include materiali vegetali come cellulosa, sodio alginato e gomma naturale, e materiali animali come collagene, glicosamminoglicani (GAGs), eparina e acido ialuronico, e altri polimeri biologici come DNA e polipeptidi.

Il più grande vantaggio dei polimeri di origine naturale è la loro eccellente attività fisiologica nella selettività cellulare (es. collagene, fibronectina), nelle proprietà meccaniche e nella biodegradabilità, tuttavia il loro svantaggio consiste nel limitare la progettazione di scaffold con specifiche proprietà quali porosità, rigidità, bagnabilità etc., a causa della loro intrinseca complessità strutturale.

I polimeri sintetici invece possono essere fabbricati in larga scala e progettati in modo che alcuni parametri quali la macrostruttura, le proprietà meccaniche e il tempo di degradazione possono essere facilmente controllati e manipolati. Il limite dei polimeri sintetici è però quello della mancata specificità di segnali di riconoscimento cellulare.

Per superare questo limite, numerosi polimeri di origine naturale sono stati incorporati sulla superficie di biomateriali sintetici per incrementarne il bio-riconoscimento e la funzionalità.

Tali materiali “ibridi” hanno quindi la peculiarità di possedere la versatilità progettuale dei materiali sintetici e la specificità biologica dei polimeri naturali (Shin H *et al.* 2003).

Sono stati condotti numerosi studi per rendere i materiali biomimetici attraverso la modificazione della superficie con molecole bioattive, quali proteine della ECM, che promuovono l'adesione e la proliferazione cellulare.

Numerosi tentativi sono quindi attualmente dedicati alla funzionalizzazione della superficie di biomateriali comunemente utilizzati in applicazioni biomediche (tipicamente metalli, polimeri e ceramiche) allo scopo di renderli più biomimetici e di conferirgli maggiori proprietà biologiche e funzionali (Rosso F *et al.* 2005).

Il range di polimeri sintetici va da gli idrofobici come le gomme di silicone (SR), polietilene (PE), polipropilene (PP), polietilene tereftalato (PET) e polimetilmetacrilato (PMMA), a quelli più polari come il polivinilcloruro (PVC), acido polilattico-co-glicolico (PLGA) e nylon, a materiali che assorbono acqua come il poliidrossietilmetilacrilato (PHEMA), e materiali solubili in acqua come il polietilenglicole (PEG o PEO). Alcuni sono idroliticamente instabili e si degradano nel corpo, mentre altri rimangono essenzialmente invariati per tutta la vita del paziente (Ratner D *et al.* 2004).

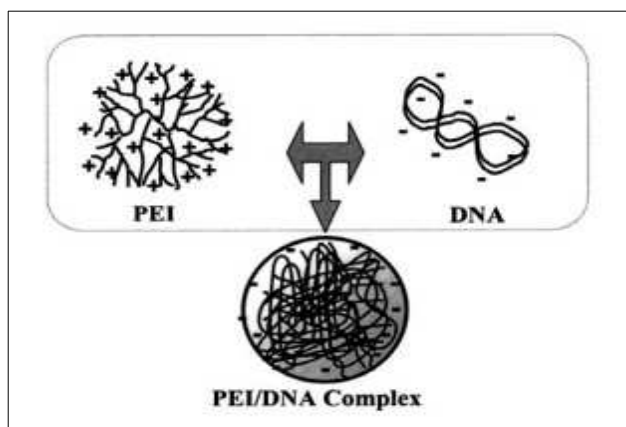
Le proprietà del materiale come la bagnabilità, la carica superficiale, la topografia e la

viscoelasticità, hanno un forte impatto sull'adesione cellulare. A questo proposito, sono stati progettati varie tecniche di modificazione superficiale per controllare l'adesione cellulare su biomateriali nella maniera desiderata.

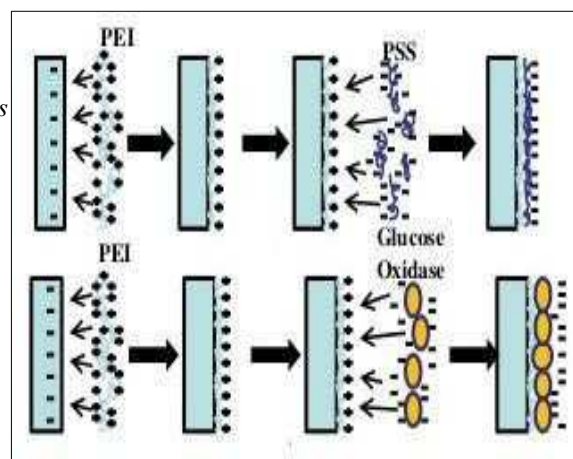
## Polietilenimine PEI

Le Polietilenimine sono polimeri cationici commercialmente disponibili in un ampio range di peso molecolare (200–800 000 Da) e con differenti gradi di ramificazioni di catena. A causa dell'elevato numero di gruppi amminici le PEI hanno una forte carica positiva superficiale che li rende adatti a legare molecole cariche negativamente come il DNA o altri polimeri (Bieber T. *et al.* 2002).

L'applicazione della Polietilenimina come efficiente vettore di trasfezione sfrutta la capacità della molecola di realizzare dei pori nella membrana plasmatica o nella membrana degli endosomi consentendo l'ingresso dei complessi PEI/DNA all'interno della cellula (Klemm A.R. *et al.* 1998). Numerosi reports hanno descritto la Polietilenimina come un polielettrolita comunemente utilizzato in esperimenti *in vitro* e come precursore base per la realizzazione di PEM in applicazioni biologiche (Brunot C. *et al.* 2007).



*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*  
60 (2005) 247-66

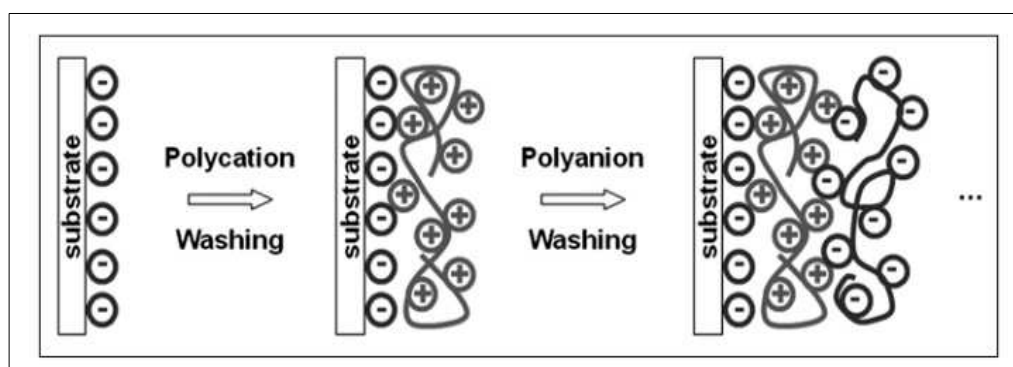


*Sensors and Actuators B* 166-67 (2012) 637-41

## Multilayers di Polielettroliti (PEMs)

Sono state sviluppate molte tecniche per realizzare film sottili a livello molecolare inclusi Langmuir–Blodgett (LB), self-assembled monolayers (SAMs) e layer-by-layer (LbL).

Tra le tecniche di modificazione superficiale, il metodo self-assembly è indicato per realizzare superfici rivestire da mono o multi-layer. L'applicazione dei polielettroliti per preparare rivestimenti di multilayer sui materiali fu introdotta da Decher *et al.* (1992) e denominata tecnica Layer-by-Layer. Il principio si basa sulla realizzazione di multistrati di polielettroliti su superfici cariche attraverso l'adsorbimento alternato di polielettroliti con carica opposta in soluzioni acquose.



*Int J Artif Or34 (2)185-19. 2011*

La regolazione e il controllo di parametri quali il pH e la stringenza ionica della soluzione durante l'assemblaggio può avere un forte impatto sulla conformazione del polielettrolita e di conseguenza sulle proprietà del PEM (Polyelectrolyte Multilayer), quali lo spessore, la carica di superficie, la bagnabilità, la topografia e la viscoelasticità. Per questa ragione è interessante capire come il metodo L-b-L può essere utilizzato per controllare l'adesione e la proliferazione cellulare sulla superficie di biomateriali (Boudou T. *et al.* 2010).

La composizione chimica e la concentrazione dei singoli polielettroliti guida il processo di autoassemblaggio. Dato che sono le interazioni elettrostatiche a consentire il legame tra i polielettroliti, le proprietà del multilayer possono essere modulate attraverso alcuni aggiustamenti delle condizioni di deposizione, che includono la variazione di parametri quali il pH della soluzione del polielettrolita, la stringenza ionica, il numero di strati, l'ordine in cui essi vengono depositati e le modificazioni post-assemblaggio.

TABLE 1. EXAMPLES OF PARAMETERS VARIED IN POLYELECTROLYTE MULTILAYER ASSEMBLY FOR CELL CULTURE APPLICATIONS

<i>Cationic PE/anionic PE</i>	<i>PEM parameter varied</i>	<i>PEM property affected</i>	<i>Cell types cultured</i>
PAH/PAA, PLL/PLGA, PAH/PMA	Assembly pH	Thickness or swelling	NR6WT fibroblasts, HCS-2/8 human chondrosarcoma cells
PAH/PAA, PAH/SPS	Assembly pH	Stiffness	MVEC
PAH/PAA-modified RGD	Assembly pH	Surface composition	NR6WT fibroblasts, osteoblasts
PAH/PAA	Assembly pH	Surface topography	Human corneal epithelial cells
PLL/PLGA, PLL/alginate	Number of layers	Thickness	Human fibroblasts, fetal liver/stem progenitor cells
(PEI or PLL or PAH)/(SPS or PLGA), PLL/PLGA, PLL/HA, PLL/(PLGA or PAH or SPS)	Order in which the PEs were assembled	Terminating PE Layer	Periodontal ligament cells, HCS-2/8 human chondrosarcoma cells, primary human monocytes
PLL/HA	Chemical crosslinker (EDC)	Stiffness	Chondrocytes, C2C12 myoblasts, SMCs
PEI/PAA + MWNT, PAH/SPS, HA/chitosan	Chemical crosslinker (GA)	Stiffness	BALB/c 3T3 fibroblasts
PLL/vinylbenzyl grafted-HA, PAH/PAA	Other modes of crosslinking (Heat, UV)	Stiffness	C2C12 myoblasts, A7r5 SMCs

*Tissue Engineering Part B:17(2): 101-113. 2011*

Può essere utilizzata una varietà di combinazioni di polianioni e policationi per l'assemblaggio di PEMs con appropriate proprietà adattabili ad un ampio range di applicazioni, quali microelettronica, nanofluidica, rivestimenti virucidi, rilascio di farmaci e ingegneria tissutale. I PEMs possono essere assemblati con polimeri sintetici o naturali, e utilizzati in campo biologico per rivestire superfici in grado di inibire o promuovere l'adesione cellulare, e soprattutto per dirigere o mantenere il fenotipo cellulare ( Detzel C *et al.*2011).

TABLE 2. EXAMPLES OF POLYELECTROLYTE MULTILAYERS USED IN TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

<i>Research objective</i>	<i>Cationic/anionic PE</i>	<i>Cell type</i>	<i>Significant finding</i>
Cell interaction	PLL/HA CHI/HA PLL/PGA	Chondrocytes, chondrosarcoma	Crosslinking increased Young's modulus and cell adhesion, and spreading decreased enzymatic degradation
	PEI/PAA SPS/PAH CHI/HA Amine Mod	Fibroblasts	Adhesion, proliferation, and cell morphology
	HA/HA SPS/PAH CHI/HA PAA/PAH	Endothelial cells	Adhesion, spreading, and viability
Delivery of bioactive molecules	PLL/RNA PLL/PLGA CHI/HA PLL/HA PLL/PGA	Osteoblasts, COS-1; HeLa; HEK-293	DNA or RNA incorporation to inhibit gene expression or as transfection vehicle
	PLL/HA PLL/HA PAH/PAA	Cancer cell lines (CHO, melanoma, HT29); macrophages; fibroblasts	Embedded drugs, growth factors, or signaling molecules for cellular response modulation

*Tissue Engineering Part B:17(2): 101-113. 2011*

È noto che differenti parametri come l'idrofobicità e l'idrofilicità, la carica superficiale, la rugosità, l'energia libera, hanno effetto sull'adsorbimento delle proteine e di conseguenza sull'adesione cellulare. Non è molto semplice definire delle regole generali, e il comportamento cellulare osservato probabilmente dipende non solo da un singolo parametro ma da una complessa combinazione di differenti fattori ( Richert L. *et al.* 2002).

Adattando la topografia della superficie, la composizione chimica, le proprietà meccaniche e la degradazione del PEMs, per riproporre l'ambiente *in vivo*, è possibile modulare l'adsorbimento di proteine, promuovere l'adesione cellulare e regolare la risposta infiammatoria.

Polielettroliti sintetici come il Polistirene solforato (PSS), l'acido poliacrilico (PAA) o il polialilammino idroclorido (PAH) sono stati ampiamente utilizzati in studi di interazione cellule/films. La carica superficiale può avere effetto sull'adsorbimento delle proteine (a seconda del punto isoelettrico della proteina) e sull'adesione cellulare. I tipici gruppi funzionali dei polielettroliti sono: acidi carbossilici, solfati, solforati come gruppi carichi negativamente, e ammine come gruppi carichi positivamente. È stato osservato che films terminanti con PAH mostrano un alto grado di adsorbimento di proteine dal siero, invece in films terminanti con PSS, alcune proteine del siero come l'albumina, adsorbono debolmente, con conseguenti implicazioni nella risposta cellulare. Tuttavia l'adsorbimento delle proteine da solo non può spiegare le significative differenze nell'adesione cellulare. A seconda del tipo di cellule è possibile avere differenti performance di adesione su layers terminanti con cariche positive o negative. Epatociti cresciuti su films realizzati con polimeri sintetici polidimetildiallilammonio clorido (PDDA) come policatione e PSS come polianione, aderiscono solo sui films terminanti con PSS e non con PDDA. Altre linee cellulari come i fibroblasti sono invece meno sensibili e aderiscono su entrambi i films terminanti con PSS e PDDA (Ladam G. *et al.* 2000).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

La costruzione di multilayer di polielettroliti (PEM) è un concetto ormai ben consolidato e permette la modificazione superficiale per il rivestimento di biomateriali in applicazioni cliniche quali impianti di biodispositivi, protesi e organi artificiali.

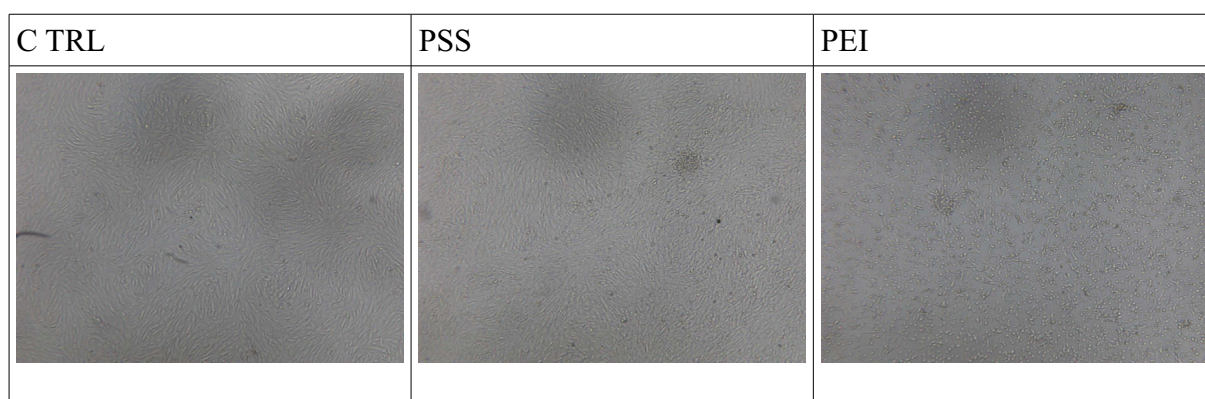
Numerosi polielettroliti biodegradabili sono utilizzati in ambito biologico e lo studio delle loro interazioni con sistemi cellulari risulta di cruciale importanza per la realizzazione di un costruito impiantabile con caratteristiche ottimali.

In questo lavoro è stato condotto lo studio delle interazioni tra films sottili PEI-ended e PSS-ended e cellule staminali mesenchimali umane, durante le fasi precoci di adesione in modo da valutare l'effetto diretto delle superfici sulle componenti cellulari primariamente attivate dal contatto cellula-superficie.

### Morfologia

Da una primissima valutazione di tipo morfologico, attraverso osservazione al microscopio ottico, si evince una differente morfologia cellulare a seconda del tipo di substrato utilizzato per la crescita cellulare.

Le cellule adese sulle superfici controllo e i campioni PSS-coated mostrano una morfologia cellulare normale caratterizzata da un'ampia area di contatto tra cellula e superficie, indice di corretto spreading cellulare, mentre l'adesione a superfici PEI-coated porta ad una notevole riduzione delle dimensioni cellulari e alla formazione di numerosi prolungamenti citoplasmatici a raggiera (**Fig. 1**).



**Figura 1:** cellule staminali mesenchimali in adesione per 24 ore. M.O. x 25

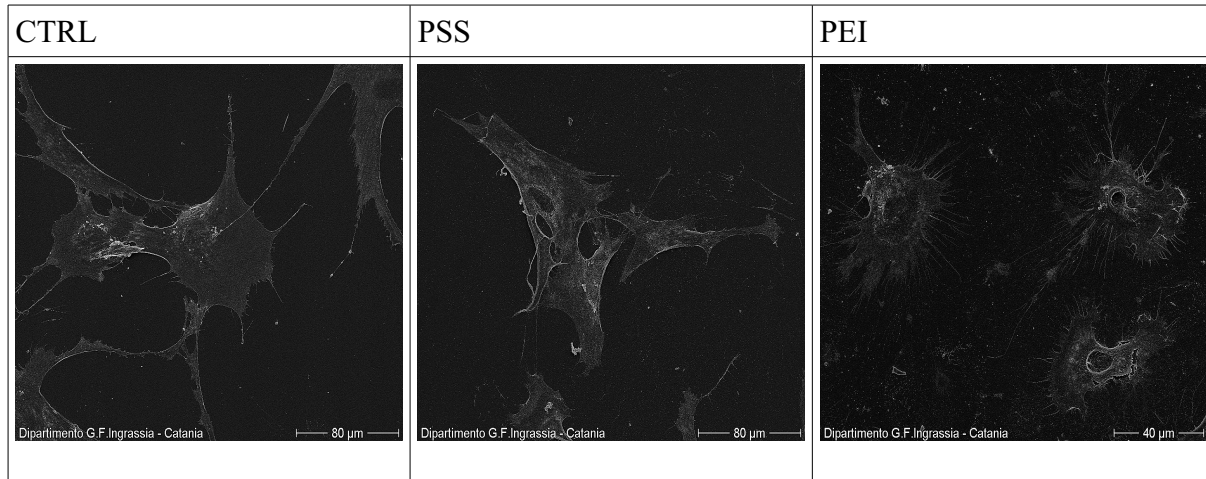


Da questa prima valutazione morfologica si è osservato anche un differente comportamento cellulare in termini di adesione. Le cellule in sospensione a contatto con la superficie PEI-coated mostrano una forte tendenza ad aderire in modo più rapido e più forte rispetto al controllo e al PSS, un fenomeno metaforicamente assimilabile ad un effetto calamita. Questo forte legame ne impedisce probabilmente lo spreading andando ad intaccare numerose funzioni ad esso correlate.

La forma è direttamente connessa alle funzioni cellulari, per cui un differente aspetto morfologico è indice di alterazione dei corretti meccanismi di adesione, spreading e signalling intracellulare.

L'alterazione morfologica riscontrata nei campioni PEI-coated risulta anche da una più approfondita osservazione ultrastrutturale attraverso microscopia elettronica a scansione.

Infatti le micrografie mostrano una superficie cellulare ampia ed uniforme nelle cellule controllo e in quelle cresciute sui campioni PSS-coated, mentre nei PEI-coated si osserva una superficie meno omogenea e con numerosi prolungamenti di membrana, indice di un buon grado di adesione ma di una alterata morfologia (**Fig. 2**).



**Figura 2:** cellule staminali mesenchimali in adesione per 24 h. Microscopia Elettronica a Scansione

## Vitalità cellulare

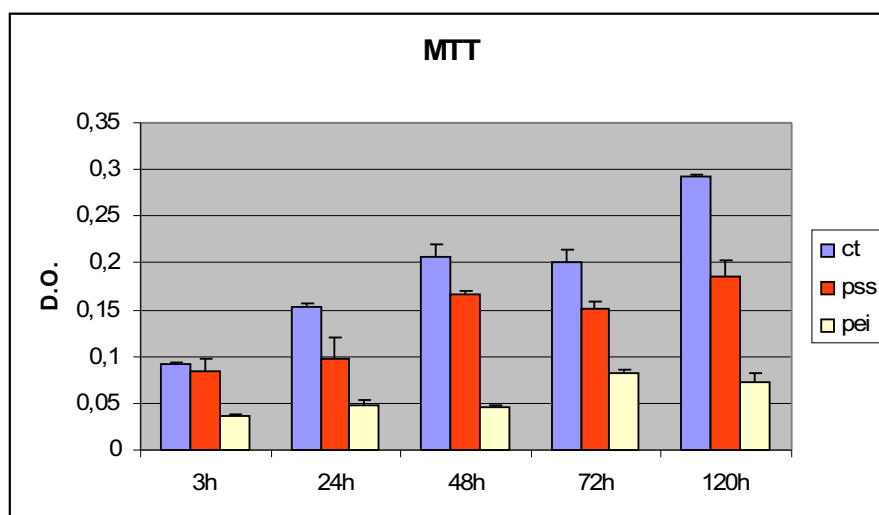
Uno degli aspetti da valutare nello studio della biocompatibilità dei polielettroliti è il loro effetto sulla vitalità e proliferazione cellulare.

Il PEI è noto avere un effetto citotossico strettamente correlato al peso molecolare, alla concentrazione utilizzata e alla ramificazione o meno della catena polimerica (Brunot C *et al.* 2007). La potenzialità citotossica del polielettrolita cationico è espletata se utilizzato a concentrazioni superiori a 5 mg/ml e non dovrebbe essere in grado di perturbare l'adesione e la proliferazione a basse concentrazioni fino a 2 mg/ml.

Il PSS viene invece ampiamente utilizzato in applicazioni biologiche in un range di concentrazioni che va da 1 a 5 mg/ml senza mostrare nessun effetto citotossico (Tryoen-Tóth P *et al.* 2002).

La biocompatibilità dei polielettroliti può essere misurata attraverso l'analisi della maggiore o minore attività delle deidrogenasi mitocondriali, enzimi in grado di ridurre un substrato tiazolico in sali di formazano, la cui quantificazione spettrofotometrica, dopo opportuna solubilizzazione, da una stima dell'attività mitocondriale e della proliferazione cellulare.

Nonostante la concentrazione dei polielettroliti utilizzata (1 mg/ml) rientri nel range di biotolleranza, i risultati emersi della lettura spettrofotometrica indicano una evidente riduzione della vitalità cellulare nei campioni PEI-coated già durante le prime fasi di adesione (3h), che si mantiene bassa in tutti i successivi time points (6h-24h-48h-72h-120h) (**Graf. 1**).



**Grafico 1.** MTT assay. Le cellule presentano diversa vitalità ed attività proliferative dipendenti dalla superficie di crescita. I valori derivano dalla media di tre esperimenti

Brunot *et al* (2007) hanno dimostrato che la citotossicità del PEI implica un'alta inibizione della proliferazione cellulare, ma l'adesione cellulare al substrato non appare essere modificata.

È interessante capire con quale meccanismo di azione la Polietilenimina riduce drammaticamente la proliferazione delle cellule e ne altera notevolmente la morfologia, mantenendo tuttavia una buona performance di adesione cellulare.

Una delle caratteristiche chimiche della Polietilenimina è quella di possedere un'elevata densità di gruppi amminici protonabili che consentono di legare efficientemente molecole cariche negativamente come il DNA e di aumentare la permeabilità della membrana plasmatica attraverso un meccanismo non ancora del tutto noto (Klemm A.R. *et al.* 1998).

Le cariche superficiali della membrana plasmatica interagiscono elettrostaticamente con molecole cationiche, e nel caso della Polietilenimina tale interazione elettrostatica ha un effetto negativo sull'integrità della membrana con conseguente squilibrio della permeabilità selettiva a ioni e piccole molecole solubili, ad essa correlata.

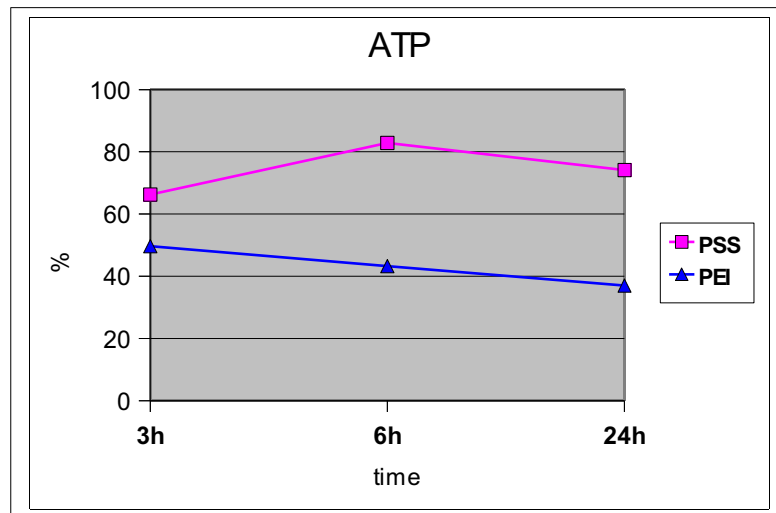
### **Attività metabolica**

Una variazione del grado di permeabilizzazione della membrana plasmatica genera uno sbilanciamento nel normale “traffico” di membrana, portando all'idrolisi di molecole fondamentali per la sopravvivenza cellulare e per numerose funzioni biologiche, come l'ATP.

L'importanza dell' Adenosintrifosfato (ATP) è stata ampiamente riconosciuta nella regolazione metabolica dei pathway anabolici e catabolici così come fonte di energia per le attività chimiche e biologiche della cellula.

La produzione di ATP intracellulare è affidata ai mitocondri, organuli citoplasmatici circondati da una doppia membrana e sede del trasporto elettronico che genera il gradiente di ioni idrogeno necessario per la sintesi di ATP (Harris e Thompson *et al.* 2000).

Dal saggio di quantificazione di ATP in luminescenza è emerso un evidente decremento della quantità di ATP intracellulare nei campioni PEI-coated rispetto ai campioni PSS-coated (**Graf. 2**).

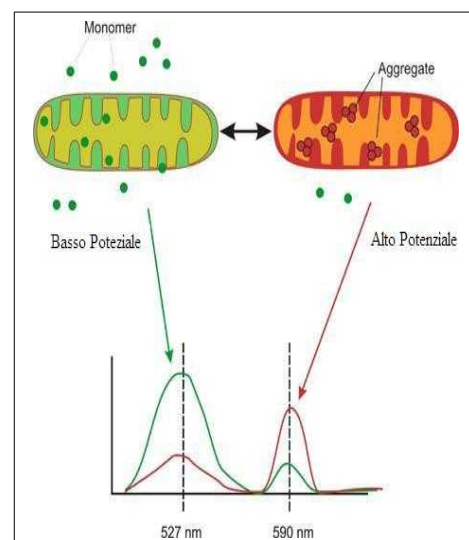


**Grafico 2:** Dosaggio di ATP. La superficie di crescita influenza il contenuto di ATP delle cellule mesenchimali. I risultati sono espressi come valori percentuali rispetto al controllo

Dopo 3h di adesione si assiste ad un abbassamento repentino del 50 % di ATP intracellulare indotto dal PEI, che si mantiene costante nei successivi time points, a differenza del PSS in cui è evidente una ripresa dell'attività metabolica cellulare.

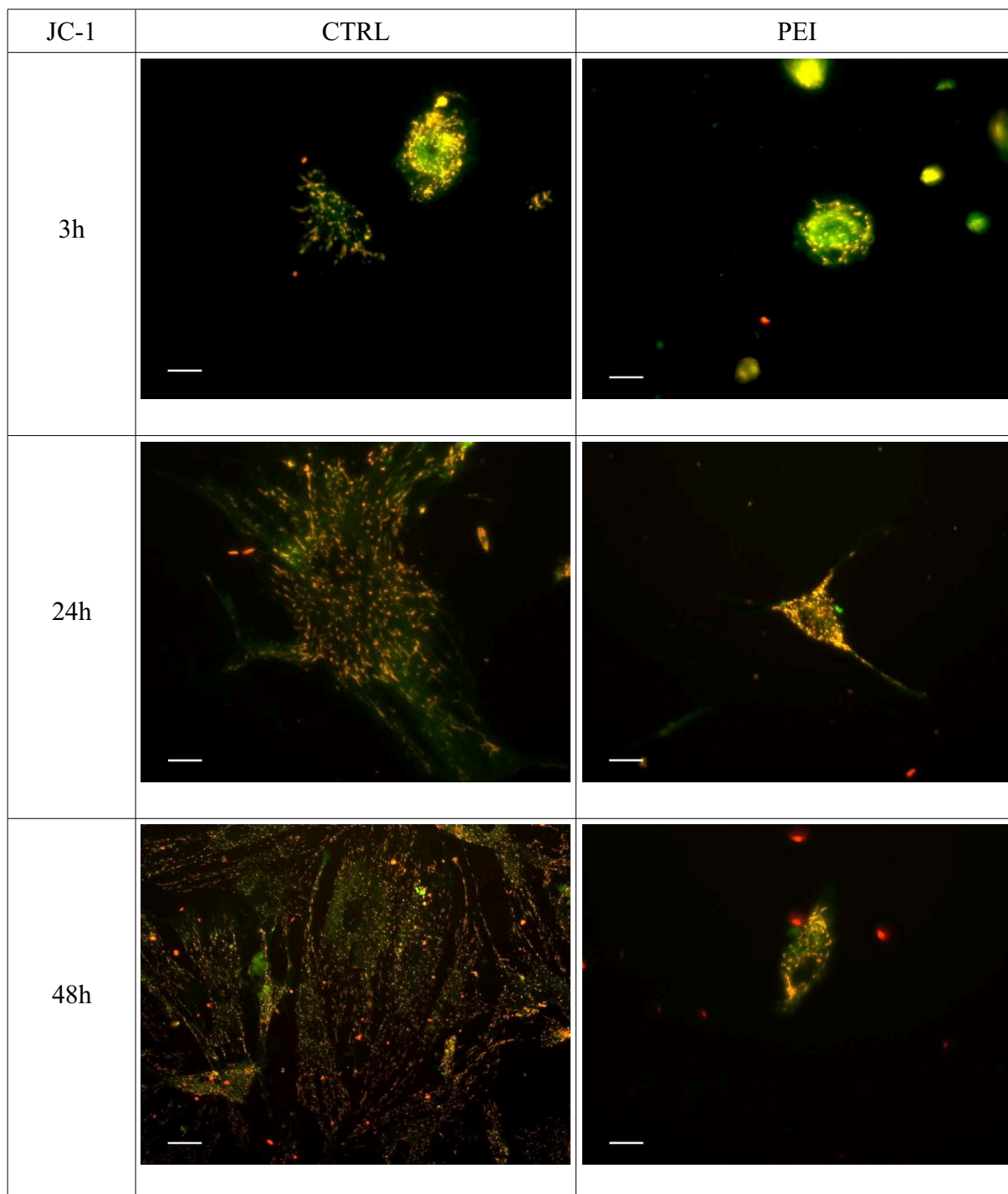
Il decremento della concentrazione di ATP nelle cellule cresciute su Polietilenimina potrebbe provocare delle disfunzioni sulle numerose funzioni cellulari ATP-dipendenti e sull'intero assetto metabolico cellulare.

L'attività mitocondriale delle cellule cresciute sul multilayer PEI-ended è stata analizzata attraverso l'uso della sonda fluorescente JC-1, specifica per i mitocondri, e in grado di valutare la variazione del potenziale transmembrana mitocondriale ( $\Delta\psi$ ). Quest'ultimo è generato dal flusso di protoni nello spazio intermembrana durante la respirazione cellulare. Il JC-1 è in grado di evidenziare un minore o maggiore potenziale transmembrana variando la sua lunghezza d'onda di emissione da 530 nm (fluorescenza verde) a 590 nm (fluorescenza arancio).



Meccanismo d'azione del JC-1

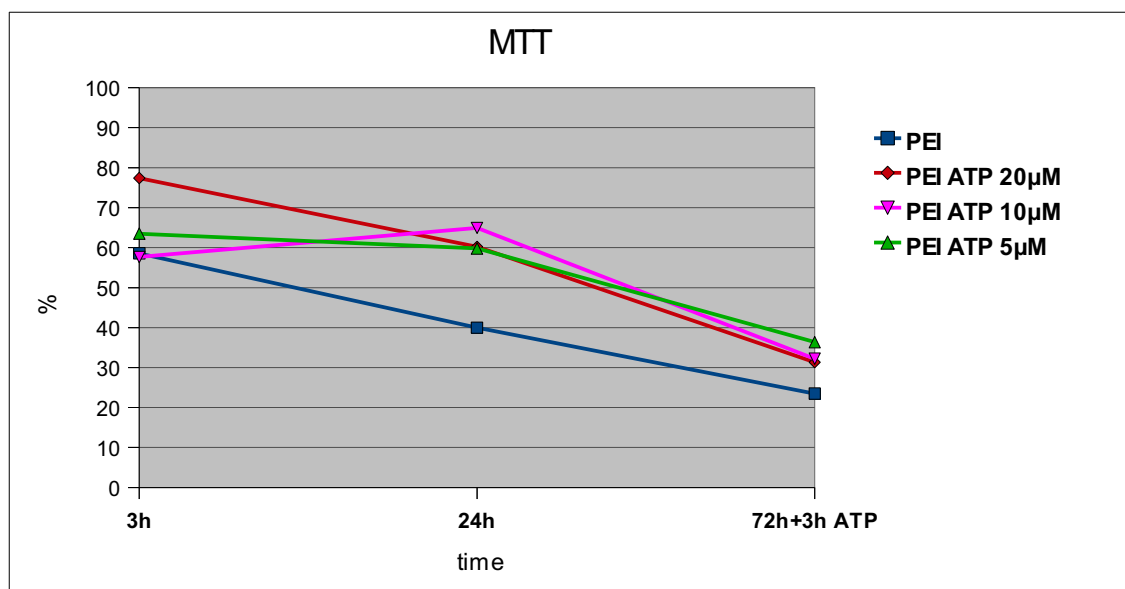
Dall'osservazione al microscopio a fluorescenza, si nota una limitata attività mitocondriale nei campioni PEI-coated in tutti i tempi sperimentali analizzati (3h,24h e 48h) ed una maggiore concentrazione dei mitocondri a livello del corpo citoplasmatico (**Fig. 3**).



**Figura 3:**La fluorescenza del JC1 evidenzia, nel tempo, una diversa attività e localizzazione dei mitocondri. La mancata distensione delle cellule sulla superficie PEI coated mantiene i mitocondri addossati nella parte centrale della cellula. Il potenziale transmembrana, evidenziato dalla sonda sembra mantenersi più basso rispetto al controllo. Microscopio a Fluorescenza. Bar = 5  $\mu$ m

Dato che un abbassamento dell'attività mitocondriale non consente il ripristino della concentrazione di ATP intracellulare necessaria per riattivare un corretto assetto metabolico, la somministrare ATP nel mezzo di coltura potrebbe portare ad un miglioramento della performance cellulare.

ATP a tre diverse concentrazioni, 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  è stato aggiunto alla sospensione cellulare e questa posta a crescere sulle superfici PEI-coated. Dopo 3 e 24 ore si è analizzata la vitalità cellulare (MTT assay). Una ulteriore aggiunta di ATP è stata effettuata dopo 72 ore per 3 ore. In generale osserviamo un abbassamento della vitalità cellulare in tutti i campioni PEI-coated analizzati ma risulta più marcata nei campioni cui non è stato somministrato ATP (**Graf. 3**).



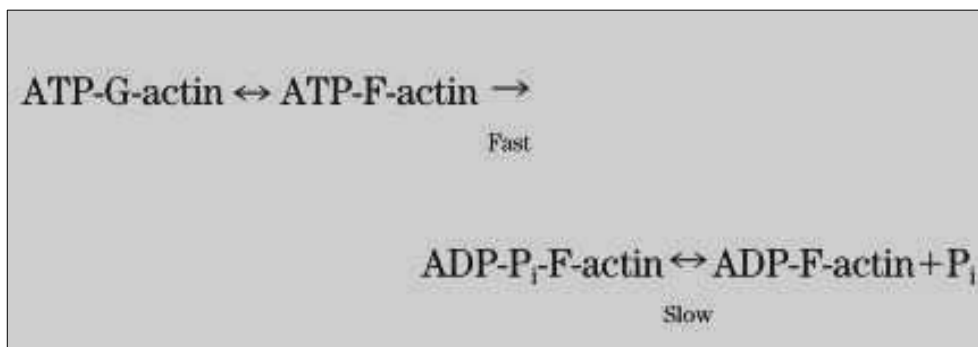
**Grafico 3** : L'aggiunta di ATP (20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ ) nel mezzo di coltura migliora la vitalità delle cellule sulle superfici PEI-coated soprattutto alla maggiore concentrazione utilizzata. La risomministrazione di ATP dopo 72 ore non apporta alcun miglioramento.

La presenza di ATP esogeno porta sicuramente ad un miglioramento iniziale delle condizioni cellulari, supportando l'ipotesi che la deplezione di ATP dovuta ad una alterazione della membrana plasmatica indotta dal PEI, impedisce che le cellule svolgano i loro normali processi di adesione e proliferazione.

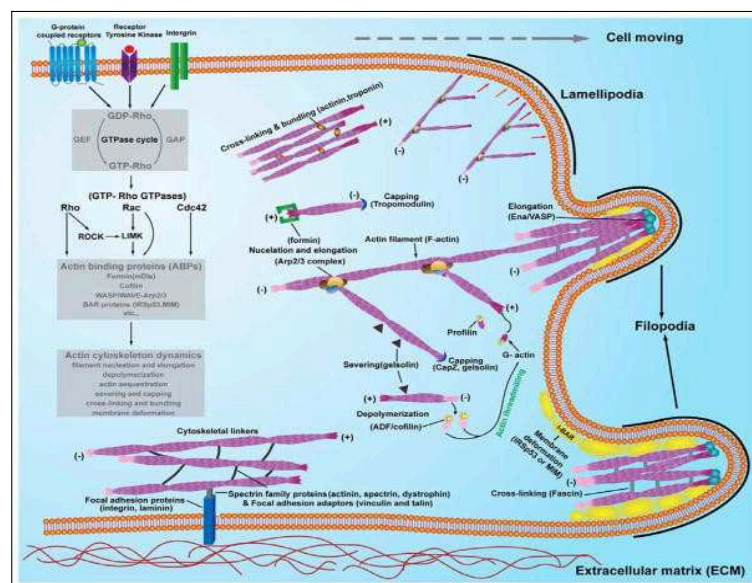
Uno dei principali effetti dovuti alla deplezione di ATP durante le prime fasi di interazione cellula-superficie riguarda l'organizzazione del citoscheletro cellulare, principalmente dei microfilamenti.

Precedenti lavori hanno dimostrato che l'integrità e il riarrangiamento dell'organizzazione dei microfilamenti sono strettamente correlati ai livelli di ATP in cellule metabolicamente alterate, con una diminuzione del contenuto di ATP di circa il 15-20 % rispetto alle condizioni normali (Hinshaw DB *et al.* 1988).

L'ATP svolge un ruolo fondamentale nella polimerizzazione delle molecole di actina regolandone il passaggio dalla loro forma monomerica (G-actina) a quella polimerica (F-actina) attraverso due reazioni qui sotto evidenziate (Dos Remedios CG *et al.* 2003).



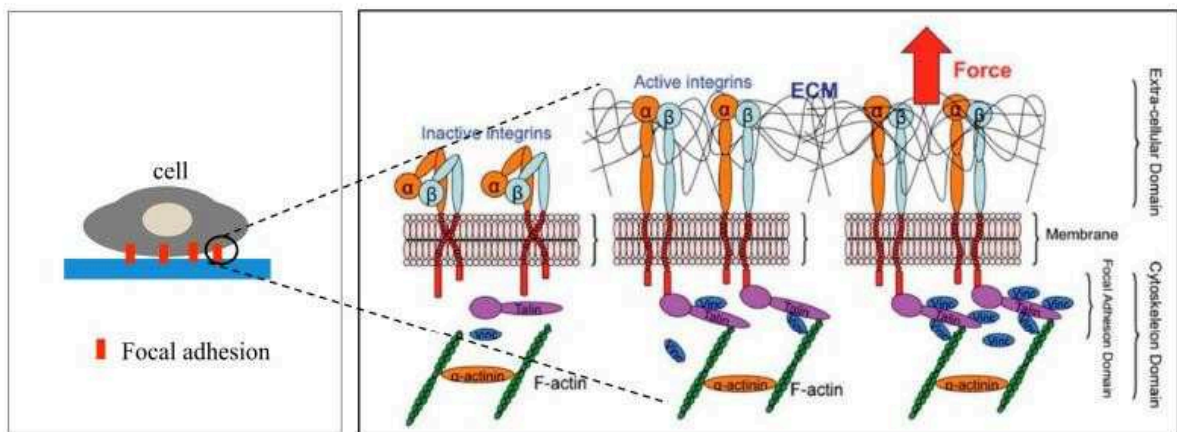
Il rimodellamento dinamico del citoscheletro dovuto alla transizione dalla forma globulare dell'actina (G) a quella filamentosa (F) è responsabile dell'adesione e del movimento cellulare attraverso la formazione di strutture quali lamellipodi, filopodi, fibre da stress e adesioni focali (Lee S.H. *et al.* 2010).



*Mol. Cells.* 2010 Apr;29(4):311-25

La perturbazione dell'integrità della membrana e la concomitante perdita di ATP risulta in un rapido incremento della rigidità del citoscheletro e l'aggiunta di ATP immediatamente inverte questo effetto, suggerendo che la rigidità del citoscheletro dipende da trasformazioni molecolari ATP-dipendenti, come lo scivolamento dei filamenti di actomiosina (il rigor mortis), o modificazioni chimiche delle proteine del citoscheletro (fosforilazione) (Wang e Ingbert. 1994).

L'organizzazione del citoscheletro è strettamente connessa alla membrana plasmatica poiché i siti di adesione si vengono a formare proprio in alcune regioni in cui le integrine, proteine transmembrana, la ancorano esternamente alla matrice extracellulare o alla superficie di un biomateriale, e internamente ai filamenti di actina, attraverso l'ausilio di un cluster di molecole altamente organizzato, i complessi di adesione focale (FA).



*Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 18149-18184*

L'effetto delle caratteristiche chimiche della superficie di un biomateriale influenza quindi alcuni dei più importanti processi da analizzare per la realizzazione di un costrutto impiantabile: l'adesione cellulare e il conseguente assetto citoscheletrico.

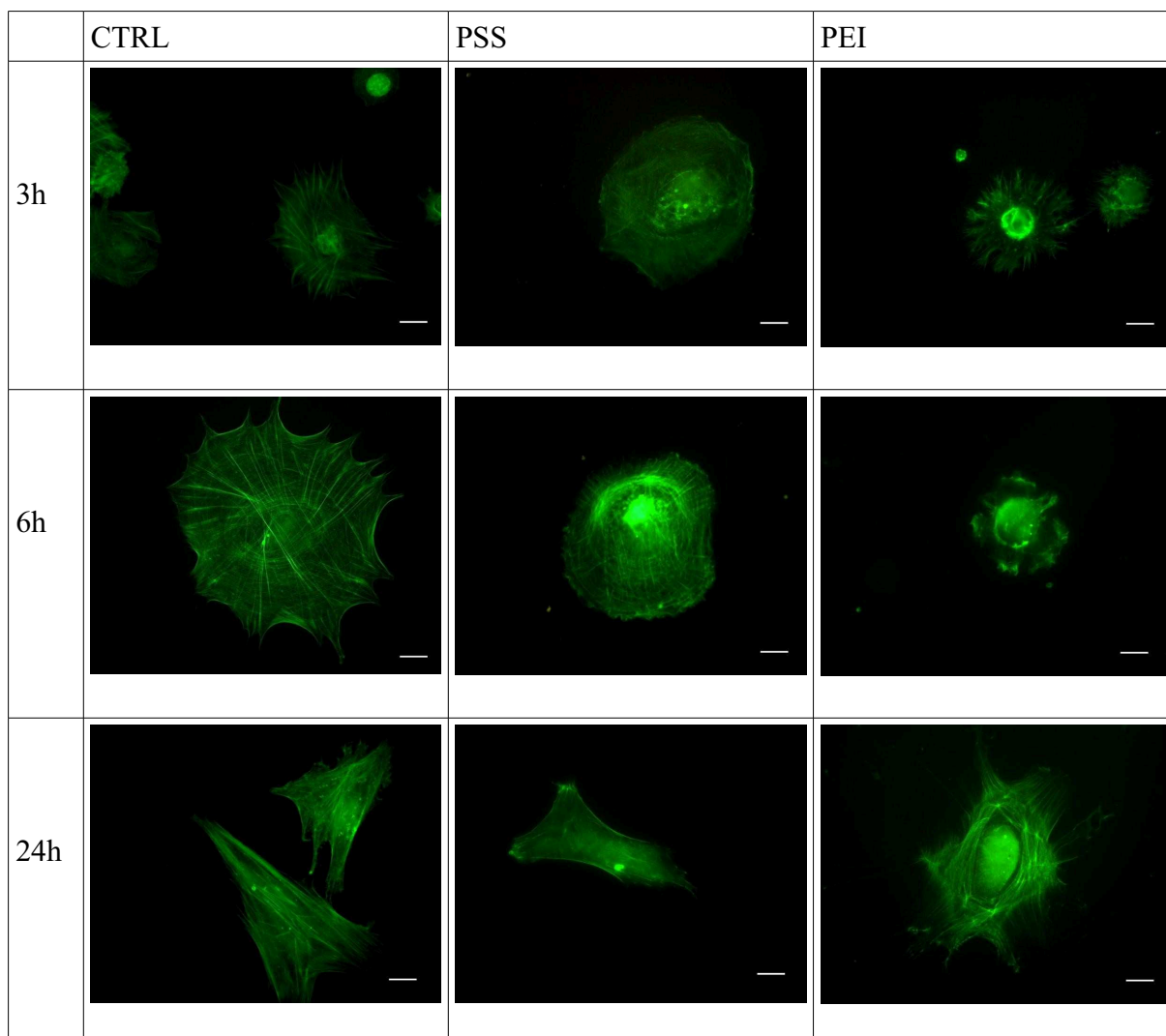
Sono stati condotti studi in immunofluorescenza per analizzare il citoscheletro (nelle sue componenti actiniche e tubuliniche) e la localizzazione spazio-temporale di alcune proteine coinvolte nei primissimi processi di adesione attivati dall'interazione cellulare con i multilayers PSS e PEI-ended.



## Citoscheletro

La reazione di immunofluorescenza diretta condotta utilizzando la FITC-Falloidina, ha evidenziato il normale rimodellamento del citoscheletro actinico durante l'adesione delle cellule al PSS-ended film e al controllo: ampia area cellulare occupata da fasci di actina ben organizzati inizialmente in sottili filamenti e successivamente in fibre da stress.

Una alterata organizzazione dei microfilamenti si riscontra nel citoscheletro delle cellule adese alle superfici PEI-coated, in cui l'actina è evidenziabile nella zona corticale da cui si dipartono numerosi prolungamenti a raggiera (Fig. 4).



**Figura 4:** Evidenziazione dei microfilamenti tramite FITC-Falloidina. L'influenza delle superfici CTRL, PSS e PEI coated si riflette sulla diversa organizzazione dei microfilamenti durante il processo di adesione e spreading cellulare. Barr = 5  $\mu$ m

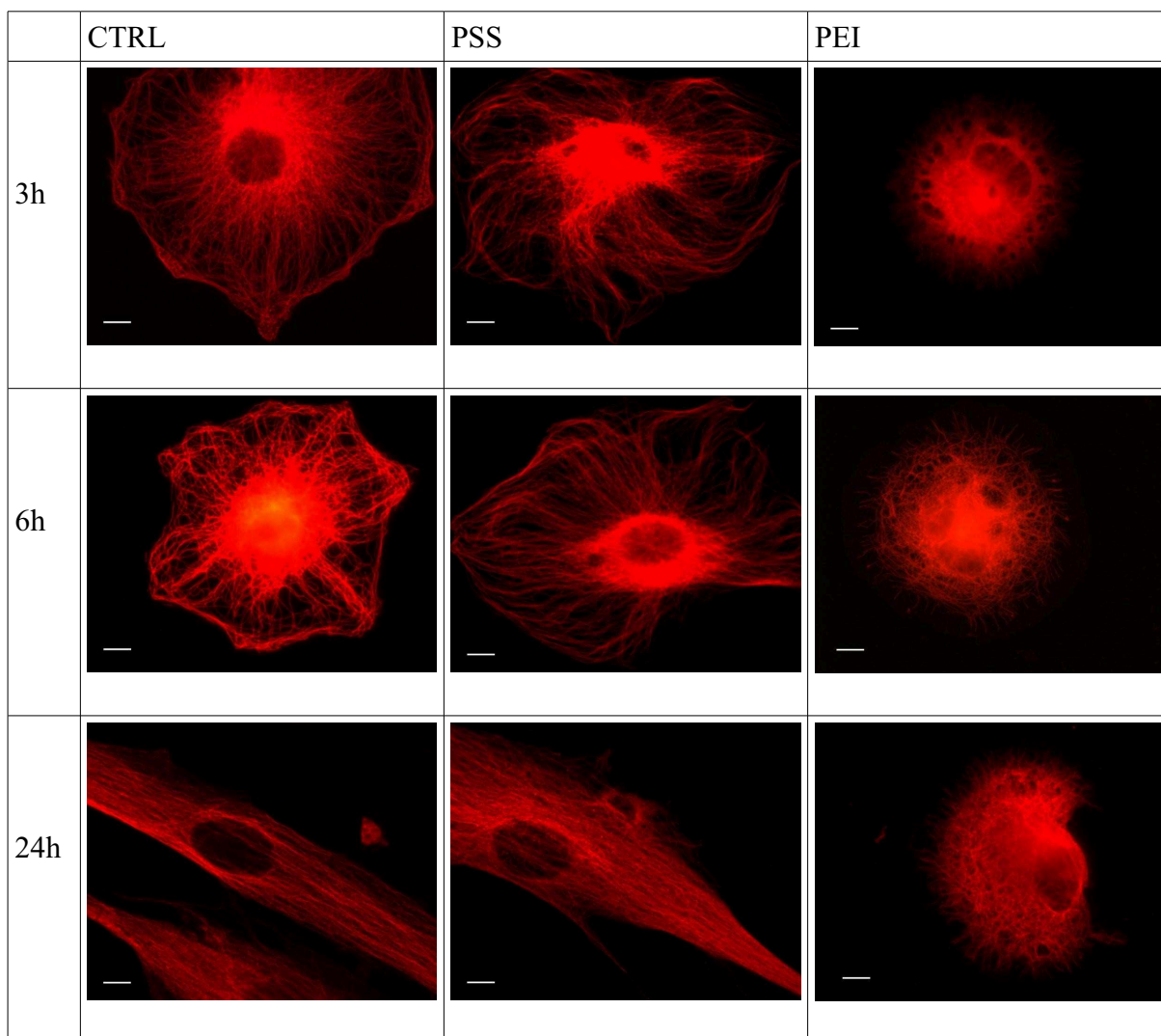
Le numerose evaginazioni citoplasmatiche indotte dal PEI sono indice di un buon grado di adesione ma limitano la cellula nel suo corretto processo di spreading mantenendone una morfologia tondeggianti piuttosto che fibroblastoide.

È ben documentato che un citoscheletro actinico intatto è un requisito necessario per l'assemblaggio dei complessi di adesione focale integrino-dipendenti e per la trasduzione dei segnali extracellulari. La formazione delle adesioni focali (FA) e delle stress fiber è accompagnata dalla fosforilazione di molte proteine specifiche, tra cui la chinasi delle adesioni focali (FAK) e la paxillina, la cui inibizione interferisce nell'assemblaggio delle FA.

Le variazioni precoci nello stato di fosforilazione di queste proteine e il loro corretto assemblaggio sono condizioni necessarie per stimolare la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare in seguito all'adesione, attraverso l'attivazione della cascata Ras/MAP chinasi (proteine chinasi attivate da mitogeni) e conseguente iperfosforilazione della proteina retinoblastoma (Rb) e induzione della ciclica D1 (Bershadsky A. *et al.* 1996).

Il citoscheletro actinico è direttamente responsabile della trasmissione dei segnali extracellulari all'interno della cellula attraverso le integrine, ma è anche strettamente connesso ad un'altra tipologia di filamenti citoscheletrici, i microtubuli con i quali coopera nella regolazione di numerose funzioni cellulari come la contrazione, il trasporto di organelli e il coordinamento del ciclo cellulare (Fletcher DA *et al.* 2010). Durante la divisione cellulare si assiste alla separazione di una cellula madre in due cellule figlie aventi identico patrimonio genetico. La cellula si trova inizialmente in una fase di quiescenza detta G1 e procede sotto opportuni stimoli al passaggio in fase di sintesi del DNA, detta fase S, in cui duplica il corredo cromosomico per la successiva ripartizione alle due cellule figlie. Durante la mitosi, o fase M, si assiste alla segregazione dei cromosomi in due identici set, che avviene ad opera di una specifica struttura chiamata Fuso Mitotico, costituita da un preciso e ordinato arrangiamento dei microtubuli.

L'assetto del citoscheletro nella sua componente tubulinica, è stato analizzato in cellule adese per 3, 6 e 24 ore sulle superfici PSS e PEI-ended per valutarne l'organizzazione e la struttura. Come già osservato per i microfilamenti, anche il network dei microtubuli non risulta conforme al normale status cellulare nelle cellule a contatto con le superfici PEI-coated, dove si assiste ad una disorganizzazione della componente tubulinica con numerosi piccoli irraggiamenti marginali (**Fig. 5**).



**Figura 5.** Evidenziazione dei microtubuli tramite anticorpo antitubulina (Rodamina). I microtubuli formano una sottile e ben risolvibile rete nelle cellule in adesione su superfici CTRL e PSS-coated, mentre più fitta e compatta appare quella delle cellule che interagiscono con il multilayer PEI-ended. Barr = 2  $\mu$ m.

Questi risultati dimostrano come le caratteristiche chimico-fisiche di un substrato di crescita influiscano in modo diretto sul corretto assemblaggio delle strutture del citoscheletro cellulare, oltre che sull'attività metabolica, e le conseguenti funzioni ad esso correlate.

La connessione diretta tra la superficie di adesione ed il citoscheletro si instaura a livello della membrana plasmatica ad opera delle integrine, che insieme ai complessi di adesione focale (FA) traslocano lo stimolo dalla superficie all'interno della cellula.

Sono state analizzate l'espressione e la localizzazione di alcune molecole di adesione coinvolte in questo meccanismo di traslocazione e primariamente reclutate durante le fasi precoci di adesione cellulare ai multilayers polimerici.

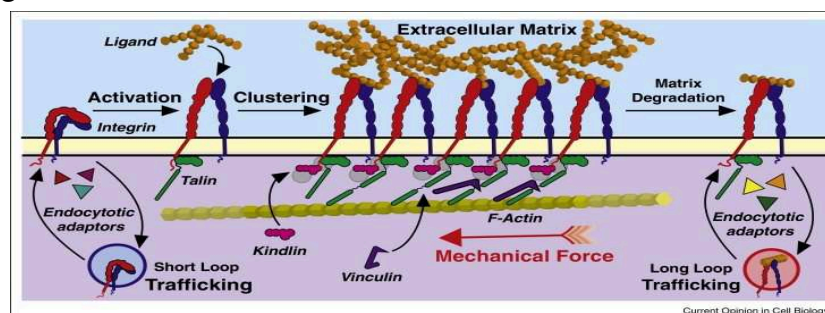
## Molecole di adesione

L'adesione alla matrice extracellulare, o alla superficie di un biomateriale, gioca un ruolo cruciale nella regolazione di numerose funzioni cellulari che vanno dalla migrazione e proliferazione all'apoptosi (morte cellulare programmata). Le strutture subcellulari che primariamente mediano tali effetti sul comportamento cellulare sono le adesioni focali (FAs). Questi complessi macromolecolari mediano l'ancoraggio cellulare al substrato connettendo fisicamente le integrine al citoscheletro actinico contrattile, essi inoltre orientano e concentrano numerose proteine segnale ai siti di legame e clustering delle integrine.

Poichè la funzione delle adesioni focali non è solo di connessione meccanica tra citoscheletro e matrice extracellulare, ma anche centro di segnalazione biochimica per molti pathway regolatori, la regolazione del loro assemblaggio e disassemblaggio è critico per il controllo delle funzioni cellulari.

La specificità di legame cellula-superficie è determinata dai domini extracellulari delle integrine che riconoscono diverse proteine di matrice quali fibronectina, collagene e laminina. In generale le integrine legano specifici motivi delle proteine di matrice, ad esempio nove differenti integrine possono legarsi tutte alla fibronectina attraverso il riconoscimento di un dominio centrale costituito da tre amminoacidi (Arg-Gly-Asp, [RGD] motif), per cui le cellule che aderiscono alla fibronectina hanno un'adesione matrice-indotta mediata da diverse integrine aventi un effetto differenziale sull'adesione e sulla motilità cellulare; l'adesione mediata dall'integrina  $\alpha5\beta1$  è più dinamica rispetto a quella mediata dall'integrina  $\alpha v\beta3$  che è più associata ad un fenotipo migratorio (Huttenlocher A. *et al.* 2011).

Il riconoscimento ligando-recettore che si instaura tra il dominio extracellulare delle integrine e le molecole della ECM genera una variazione conformazionale che induce il passaggio delle integrine da una forma inattiva ad una attiva, con conseguente aumento dell'affinità al ligando e del clustering recettoriale.



*Curr Opin Cell Biol*; 36:41-7. 2015

La superfamiglia delle integrine nei mammiferi può essere sommariamente raggruppata in integrine che legano la laminina ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$ , e  $\alpha 6\beta 4$ ), integrine che legano il collagene ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 1$ ), integrine leucocitarie ( $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha X\beta 2$ ,  $\alpha D\beta 2$ ) e integrine che riconoscono il dominio RGD ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ), esse sono quindi espresse nei diversi tipi cellulari a seconda della matrice cellulare tessuto-specifica con cui sono a contatto (Takada Y. *et al.* 2007).

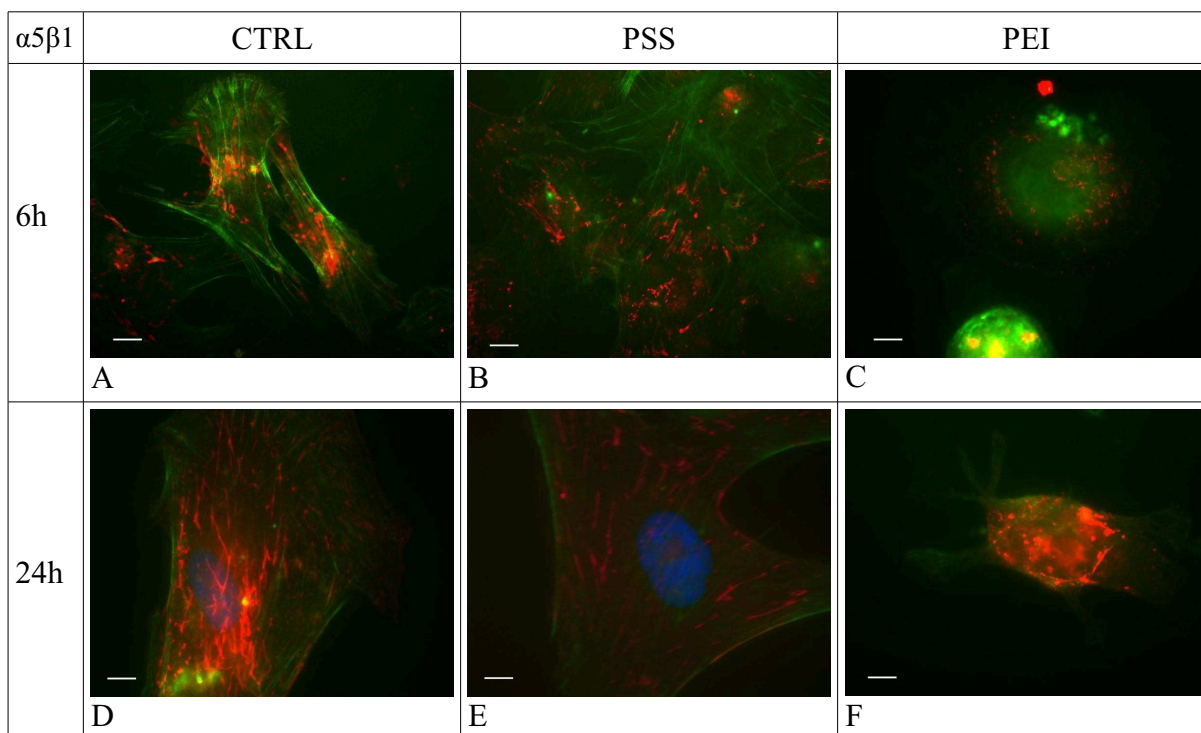
### ***Integrine***

La fibronectina ed il collagene sono le due proteine maggiormente espresse in tessuti di origine mesenchimale, per cui nello studio delle interazioni tra cellule staminali mesenchimali e multilayers sono state analizzate le integrine  $\alpha 5\beta 1$  (recettore per la fibronectina) e  $\alpha 1\beta 1$  (recettore per il collagene).

Per meglio evidenziare la relazione esistente tra i microfilamenti e la localizzazione e distribuzione delle integrine, è stata condotta una doppia marcatura con anticorpi primari specifici per le subunità citoplasmatiche  $\alpha 5$  e  $\alpha 1$  e FITC-falloidina.

Dalle osservazioni si evince una normale espressione delle integrine nei tre campioni analizzati ma una anomala distribuzione di esse nel campione PEI-coated. Il contatto cellula superficie induce un clustering delle integrine che traslocano verso la periferia cellulare, e, passando da una organizzazione puntiforme ad una bastoncellare, “trascinano” i sottostanti filamenti di actina neoassemblati.

Dopo 6 ore di adesione ai substrati, nel controllo e nel PSS-ended si assiste alla clusterizzazione e traslocazione dell'integrina  $\alpha 5\beta 1$  (**Fig. 6**) alla periferia cellulare, nel PEI-ended invece tale traslocazione non si osserva e l'integrina rimane puntiforme e dispersa nella zona centrale della cellula. A seguito di 24 ore di adesione sul PEI-ended è evidenziabile una clusterizzazione disordinata confinata al centro della cellula senza nessuna traslocazione alla periferia, e di conseguenza senza una regolare organizzazione del citoscheletro actinico, così come precedentemente osservato .

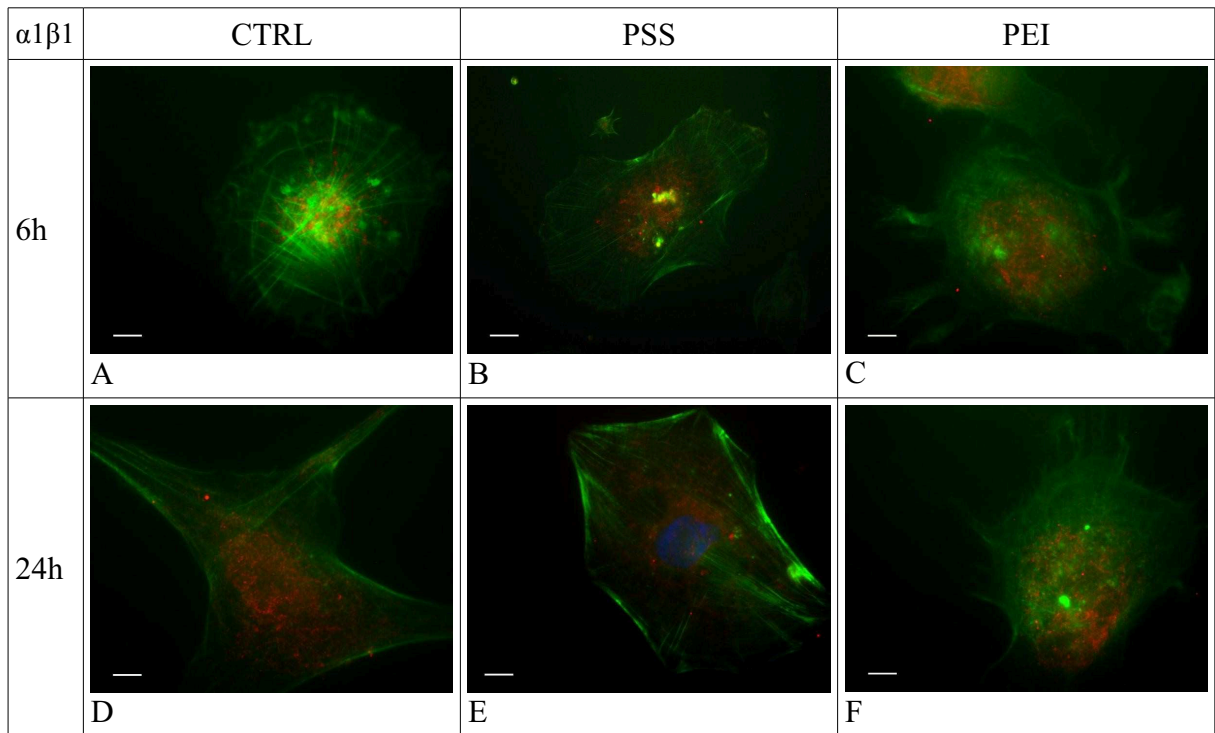


**Figura 6.** Microfilamenti e Integrina  $\alpha 5\beta 1$ . La doppia marcatura dei microfilamenti e dell' integrina  $\alpha 5$  evidenzia la traslocazione di questa in seguito al corretto assemblaggio dei microfilamenti nel CTRL e nel PSS-coated: da un iniziale aspetto puntiforme e centrale ad una clusterizzazione e traslocazione alla periferia cellulare con aspetto bastoncellare. L'interazione tra cellule e superficie PEI-coated porta ad una clusterizzazione disordinata, confinata all'area centrale della cellula non seguita da una traslocazione verso la periferia. Microscopio a Fluorescenza. Microfilamenti: FITC-Falloidina, verde; Int. $\alpha 5$  : Alexa Fluor 594. A e B barr = 5  $\mu\text{m}$ ; C,D,E ed F barr = 2  $\mu\text{m}$ .

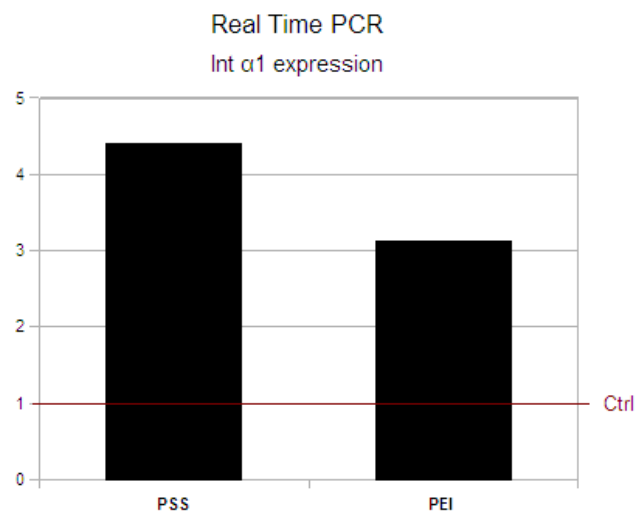
Il forte ancoraggio alla superficie PEI-coated potrebbe impedire fisicamente la traslocazione delle integrine o che la mancata polimerizzazione dei filamenti di actina causata dal deficit di ATP non generi quella forza di trazione per lo spostamento dei complessi integrinici.

L'integrina  $\alpha 1\beta 1$  è più uniformemente diffusa nel corpo cellulare e non bastoncellare come l' $\alpha 5\beta 1$ , e non si riscontrano rilevanti differenti fra i campioni analizzati in termini di espressione, se non nell'apparente maggiore concentrazione nei campioni PEI-coated dovuta alla ridotta dimensione cellulare (**Fig. 7**).

Oltre alla localizzazione cellulare, l'integrina  $\alpha 1\beta 1$  è stata anche analizzata a livello genico, quantificandone l'espressione in Real Time PCR (**Graf. 4**). Dopo 24 ore di adesione l'espressione della  $\alpha 1\beta 1$  risulta maggiore nei due campioni analizzati rispetto al controllo, in particolar modo nel PSS.



**Figura 7.** Microfilamenti e Integrina  $\alpha 1\beta 1$ . Microscopio a Fluorescenza. Microfilamenti: FITC-Falloidina, verde; Integrina.  $\alpha 1$ : Alexa Fluor 594. B barr = 5  $\mu\text{m}$ ; A,C,D,E ed F barr = 2  $\mu\text{m}$ .



**Grafico 4.**

Espressione dell'integrina  $\alpha 1$  in hMSC cresciute su superfici PSS e PEI-coated per 24 h. Quantità relativa ottenuta mediante la formula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . La linea rossa indica il livello di espressione del controllo. L'integrina risulta overespressa in entrambi i campioni.

Oltre ad ancorare fisicamente la cellula al substrato, le integrine sono principalmente responsabili della trasduzione del segnale meccanico e della conseguente risposta cellulare. Uno dei principali eventi biologici coinvolti nei fenomeni di trasduzione è la fosforilazione di alcuni residui amminoacidici presenti nei siti catalitici di proteine funzionali e strutturali. Poiché le integrine non possiedono una intrinseca attività catalitica, lo stimolo indotto dall'interazione con il substrato è trasdotto attraverso l'attivazione di complessi proteici delle Adesioni Focali, che si assemblano a livello dei punti di contatto integrine-substrato secondo un definito ordine strutturale e temporale.

Come precedentemente detto, l'assemblaggio o il disassemblaggio dei complessi di adesione focale è cruciale per la regolazione di numerose funzioni biologiche. Le adesioni focali agiscono come un centro integrato di meccanosensori e trasduttori di forze per il signalling cellulare, esse orchestrano la maturazione dei siti di adesione attraverso i loro complessi multiproteici (FAK, talina, vinculina, paxillina) che trasducono la risposta meccanica in un rimodellamento dinamico del citoscheletro actinico e nella regolazione dell'espressione genica.

La chinasi delle adesioni focali, FAK è una delle prime proteine reclutate nei siti di clustering delle integrine attraverso l'interazione tra il suo dominio C-terminale e alcune proteine associate alle integrine come la talina e la paxillina. La coda citoplasmatica della subunità  $\beta$  delle integrine facilita l'attivazione di FAK promuovendone l'autofosforilazione al residuo tirosinico Y397 e il legame meccanico al citoscheletro actinico.

La fosforilazione della tirosina Y397 di FAK genera un' alta affinità dei siti di legame per la proteina Src, che vi si associa a formare il complesso FAK-Src. Andando avanti con l'assemblaggio del macchinario di adesione e trasduzione, tale complesso promuove la fosforilazione di altre due importanti proteine adattatrici, la Paxillina e p130 Cas, la cui fosforilazione genera dei siti di legame per altre proteine e così a cascata fino a regolare proteine coinvolte nella gestione di numerose funzioni cellulari (Mitra SK *et al.* 2006).

La Paxillina possiede numerosi siti di fosforilazione, ma i principali siti coinvolti nella regolazione delle adesioni focali riguardano le tirosine Y31 e Y118, il cui stato di fosforilazione è stato descritto essere critico per il corretto assemblaggio/disassemblaggio delle adesioni focali (Dawson M. *et al.* 2001).

Gli eventi precoci di organizzazione delle adesioni focali su cellule in adesione risultano quindi cruciali per il corretto meccanismo di regolazione a catena che parte dal contatto



cellula-superficie iniziato dalle integrine, e, attraverso il complesso proteico delle adesioni focali, arriva fino al nucleo, per regolare l'espressione genica e attivare la risposta cellulare più idonea al tipo di superficie.

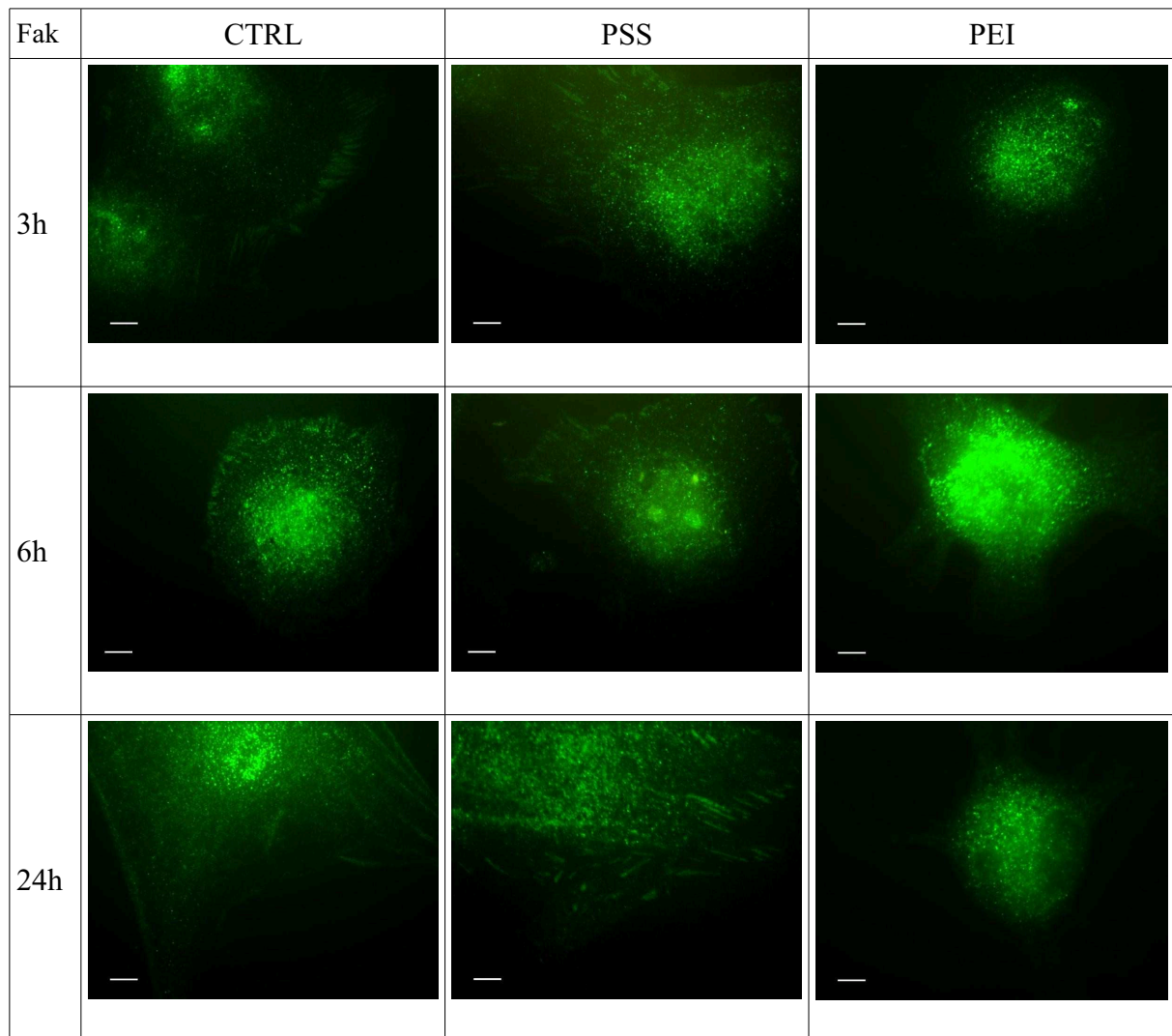
Nelle cellule in adesione sui films sottili oggetto del mio studio, sono state analizzate la localizzazione, la distribuzione e l'organizzazione di due proteine precocemente reclutate nei siti di adesione, la Chinasi delle Adesioni Focali (FAK) e la Paxillina, in uno specifico stato di fosforilazione FAK pY397 e Pax pY31.

Attraverso tecniche di immunofluorescenza indiretta è stata osservata una loro differente distribuzione e organizzazione durante le prime fasi di interazione cellula-superficie (3h, 6h, 24).

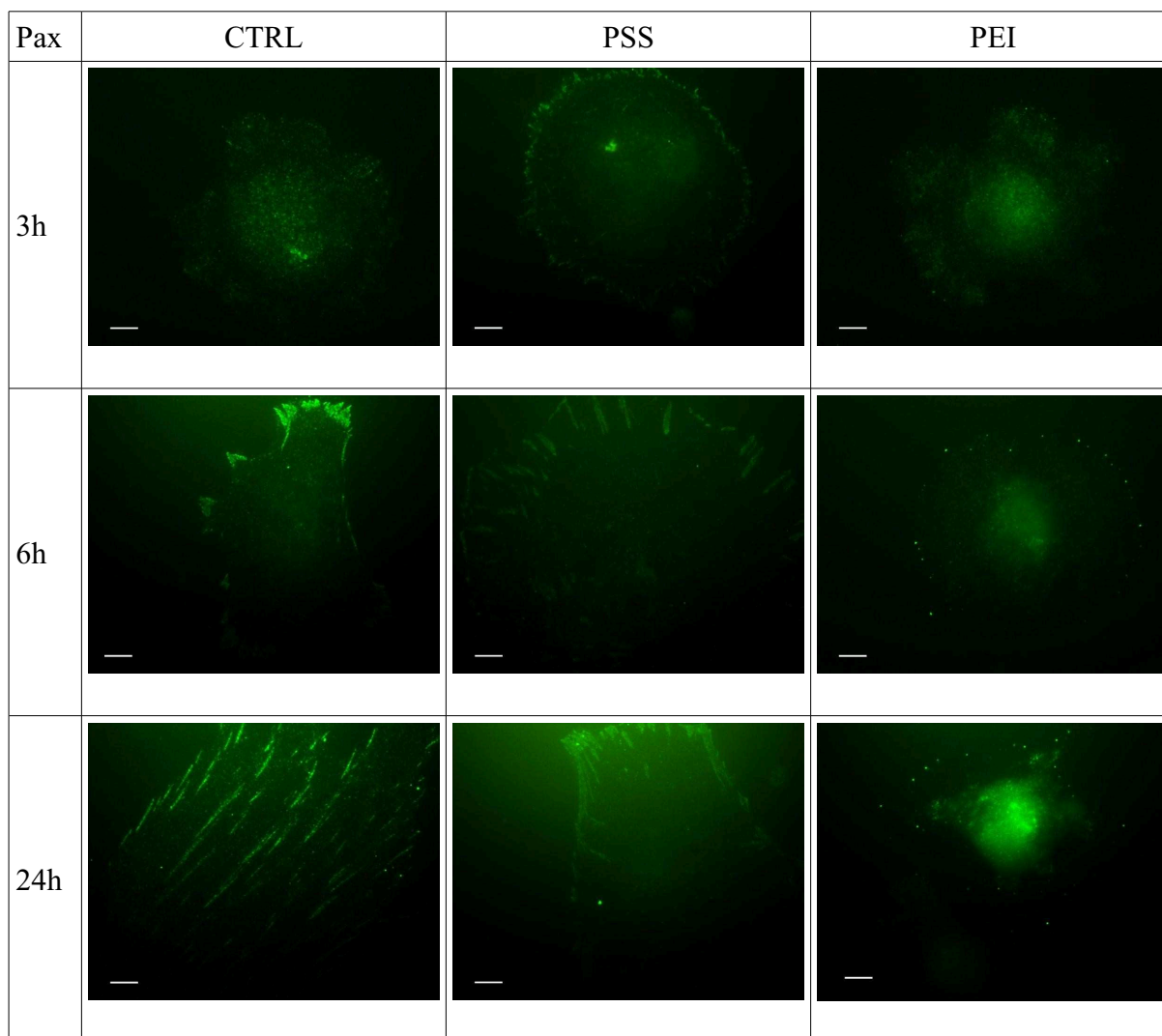
### ***FAK pY397 e Pax pY31***

La localizzazione di FAK e Paxillina fosforilate e la loro organizzazione puntiforme o bastoncellare in cellule in adesione, sono indice del grado di maturazione delle adesioni focali. Durante le prime ore di adesione nel Controllo e nei campioni PSS-ended si osserva già una maturazione dei complessi focali in adesioni focali, con una organizzazione di FAK e paxillina bastoncellare e periferica, indice di un corretto assemblaggio del macchinario di adesione. Nei campioni PEI-ended invece le proteine attivate appaiono puntiformi e uniformemente distribuite nella zona centrale del corpo cellulare ma non in periferia, in cui solo una piccola quota sembra traslocare come evidenziato soprattutto per la Paxillina a 24h (**Fig. 8 e 9**). Questa alterazione nella maturazione delle placche di adesione che si ferma allo stadio dot-like corrisponde ai quadri precedentemente osservati per le integrine .

La corretta architettura e collocazione di alcune proteine chiave dei complessi di adesione focale è di primaria importanza per la sopravvivenza cellulare. Il segnale proveniente da un buon substrato di adesione induce la cellula a proliferare, viceversa un substrato che non consente la corretta organizzazione del sistema di adesione, induce la cellula ad un blocco proliferativo. Potremmo quindi dire, dai risultati ottenuti finora sulla architettura delle adesioni focali che le superfici rivestite con la Polietilenimmina provocano una inibizione della traslocazione del macchinario di adesione e una successiva inibizione della proliferazione.



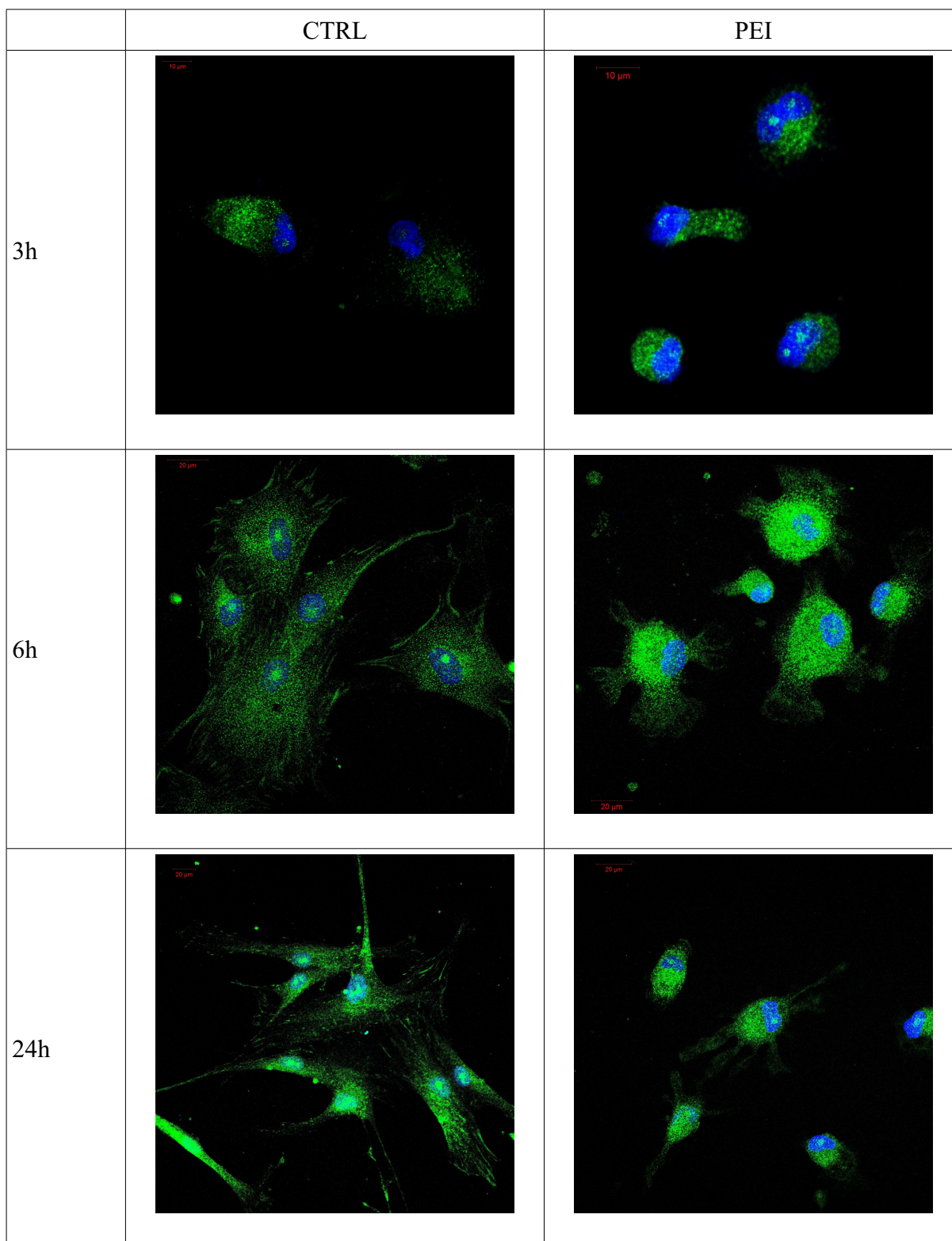
**Figura 8** Evidenziazione della fosforilazione di FAK pY397. Corretta maturazione dei contatti focali in adesioni focali nelle immagini dei campioni CTRL e PSS-ended: organizzazione bastoncellare e periferica. Tale tipo di organizzazione non è presente nei campioni PEI-ended: FAK mantiene un aspetto puntiforme e localizzato al centro della cellula. Microscopia a fluorescenza; bar= 2  $\mu$ m



**Figura 9** Evidenziazione di Paxillina fosforilata pY31. Corretta maturazione dei contatti focali in adesioni focali nelle immagini dei campioni CTRL e PSS-ended: organizzazione bastoncellare e periferica. Tale tipo di organizzazione non è presente nei campioni PEI-ended: la Paxillina fosforilata mantiene un aspetto puntiforme e localizzato al centro della cellula, solo una piccola quantità con aspetto bastoncellare fluoresce in periferia. Microscopia a fluorescenza; bar= 2  $\mu$ m.

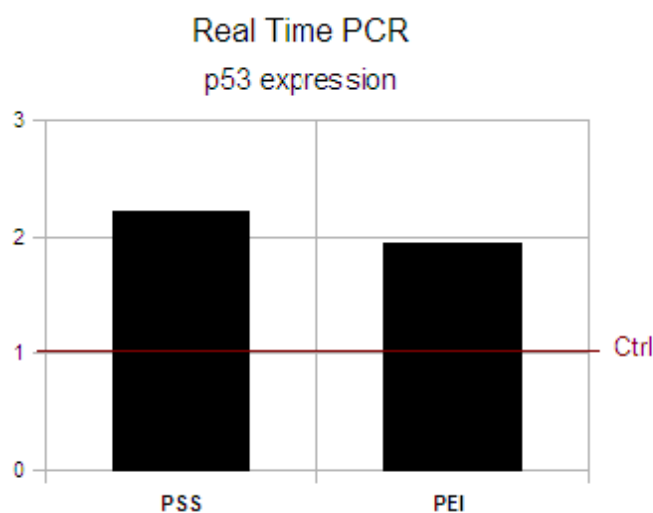
La connessione diretta tra le molecole di adesione e la regolazione delle funzioni cellulari è confermata dal fatto che una delle proteine primariamente reclutate nei siti di adesione, FAK, è in grado di traslocare direttamente nel nucleo regolando la proliferazione cellulare.

In condizioni di crescita normale, FAK è principalmente localizzato nelle adesioni focali e nel citoplasma cellulare, solo una piccola parte è in grado di traslocare nel nucleo. Nel caso del PEI si assiste ad una traslocazione di Fak nel nucleo (**Fig. 10**) apparentemente più abbondante rispetto al controllo.



**Figura 10** Traslocazione nucleare di FAK Y397. L'esame al Microscopio Confocale delle cellule cresciute su superfici CTRL e rivestite da PEI evidenzia una diversa traslocazione di FAK: diffusa quasi omogeneamente su tutta l'area cellulare in adesione sulla superficie non trattata ed estremamente concentrata attorno e dentro l'area nucleare nelle cellule sulla superficie trattata.

L'azione svolta da FAK a livello del nucleo consiste nell'attivare dei segnali di tipo mitogeno che inducono la cellula a proliferare, indicando un meccanismo di regolazione diretto tra i segnali extracellulari della superficie di adesione e la corretta progressione del ciclo cellulare. Segnali di stress di tipo chimico e ossidativo promuovono la mobilitazione di FAK dai siti di adesione integrinici al nucleo, in cui attraverso il dominio FERM interagisce con la proteina p53 e ne promuove la degradazione per stimolare la proliferazione cellulare (Lim ST. 2013). Attraverso quantificazione in Real-Time PCR del livello di espressione genica di p53 (**Graf. 5**) in cellule cresciute sui polielettroliti per 24 ore è emersa una maggiore espressione del gene in entrambi i campioni, probabilmente dovuta al rapido turnover della proteina, associata ad un incremento della sua trascrizione.



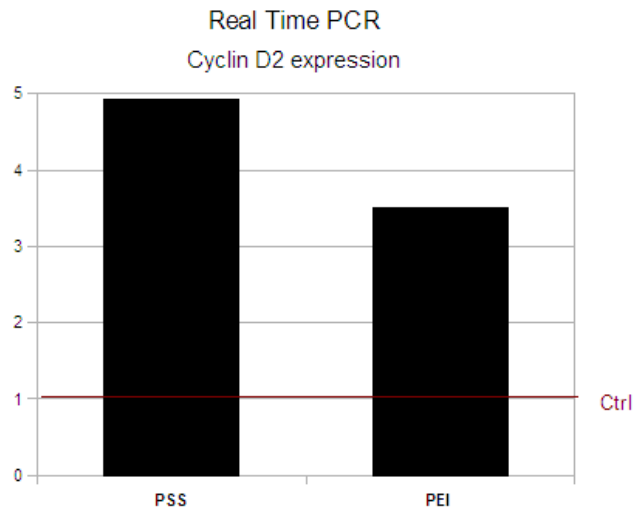
**Grafico 5**

Espressione dell'oncogene p53 in hMSC cresciute su superfici PSS e PEI-coated per 24 h. Quantità relativa ottenuta mediante la formula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . La linea rossa indica il livello di espressione del controllo. L'oncogene p53 risulta sovraespresso in entrambe le superfici.

Oltre ad abbassare i livelli proteici di p53, FAK regola l'espressione di alcune cicline (proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare) direttamente a livello trascrizionale, andando ad attivarne i promotori trascrizionali per promuoverne l'up-regolazione (Vermeulen K *et al.* 2003).

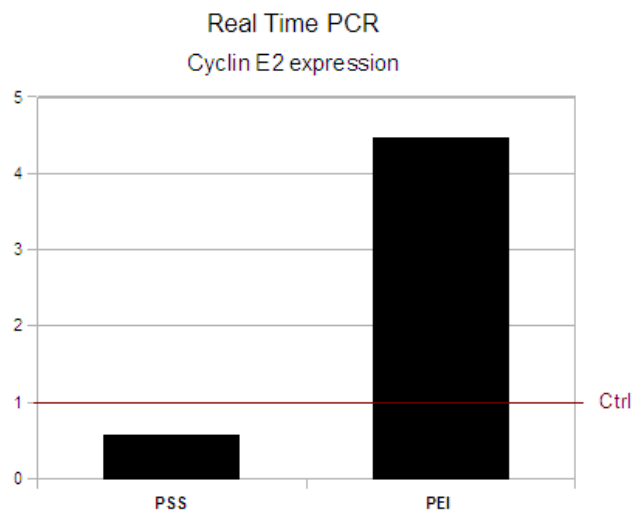
Sono state analizzate due cicline coinvolte nella regolazione della fase G1 del ciclo cellulare dopo 24 ore di adesione sui polielettroliti e, dalla quantificazione in Real Time PCR, è emerso

un effetto positivo della superficie PEI-coated sull'espressione genica della ciclina D2 (**Graf. 6**) e della ciclina E2 (**Graf. 7**).



**Grafico 6**

Espressione della ciclina D2 in hMSC cresciute su superfici PSS e PEI-coated per 24 h. Quantità relativa ottenuta mediante la formula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . La linea rossa indica il livello di espressione del controllo. La ciclina D2 risulta sovrappresa in entrambe le superfici.



**Grafico 7**

Espressione della ciclina E2 in hMSC cresciute su superfici PSS e PEI-coated per 24 h. Quantità relativa ottenuta mediante la formula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . La linea rossa indica il livello di espressione del controllo. La ciclina E2 risulta sovraespressa nei campioni PEI-coated e sottoespressa nei campioni PSS-coated.

La regolazione del ciclo cellulare è promossa sia da fattori di crescita mitogeni che da segnali meccanici provenienti direttamente dalla matrice extracellulare, per cui, il corretto assemblaggio dei complessi di adesione focale e la conseguente organizzazione citoscheletrica, sono direttamente coinvolti nella progressione del ciclo cellulare.

L'attivazione ed il clustering delle integrine durante le prime fasi di adesione stimolano gli eventi mitogeni precoci associati alla transizione dalla fase G0 alla fase G1 del ciclo cellulare, quali l'espressione immediata di alcuni geni in risposta ai segnali di crescita.

Tuttavia questi stimoli precoci, che compaiono da qualche minuto a poche ore dopo la stimolazione delle integrine, non sono sufficienti a promuovere l'ulteriore progressione del ciclo cellulare alla fase S e la conseguente proliferazione. Affinchè ciò sia possibile, sono necessari degli ulteriori segnali aggiuntivi che compaiono al termine della fase G1 e che richiedono la corretta integrità del citoscheletro e dello spreading cellulare. Studi condotti utilizzando fibroblasti come modello cellulare ancoraggio-dipendente, hanno dimostrato che l'adesione regola direttamente la transizione attraverso il punto di restrizione G1/S; i fibroblasti a cui si impedisce l'adesione rimangono bloccati in fase G1, mentre una volta posti ad aderire su un substrato che ne promuove l'attaccamento e lo spreading, superano il punto di restrizione entrando in fase S. Altre prove dell'importanza dell'integrità del citoscheletro per il passaggio dei checkpoint del ciclo cellulare sono state ottenute da studi condotti in cellule cui la distruzione del network actinico comportava un arresto del ciclo cellulare (Huang S *et al.* 1998).

## Interazione cellula-superficie in QCM-D

L'interazione cellula-superficie è stata analizzata attraverso la tecnica QCM-D in fase liquida, che consente di caratterizzare i sistemi biomolecolari nel loro ambiente acquoso naturale, e permette di studiare processi come l'adsorbimento di multistrato di polielettroliti, l'adsorbimento di proteine su una superficie *in situ* e l'interazione fra la cellula e il materiale.

La Microbilancia a Cristallo di Quarzo con monitoraggio della Dissipazione (QCM-D) permette di misurare simultaneamente la frequenza del sensore risonante e il fattore di dissipazione. Le informazioni ottenute dalle misure di dissipazione possono, quindi, insieme alle variazioni di frequenza (massa) essere usate per distinguere differenti conformazioni di molecole adsorbite.

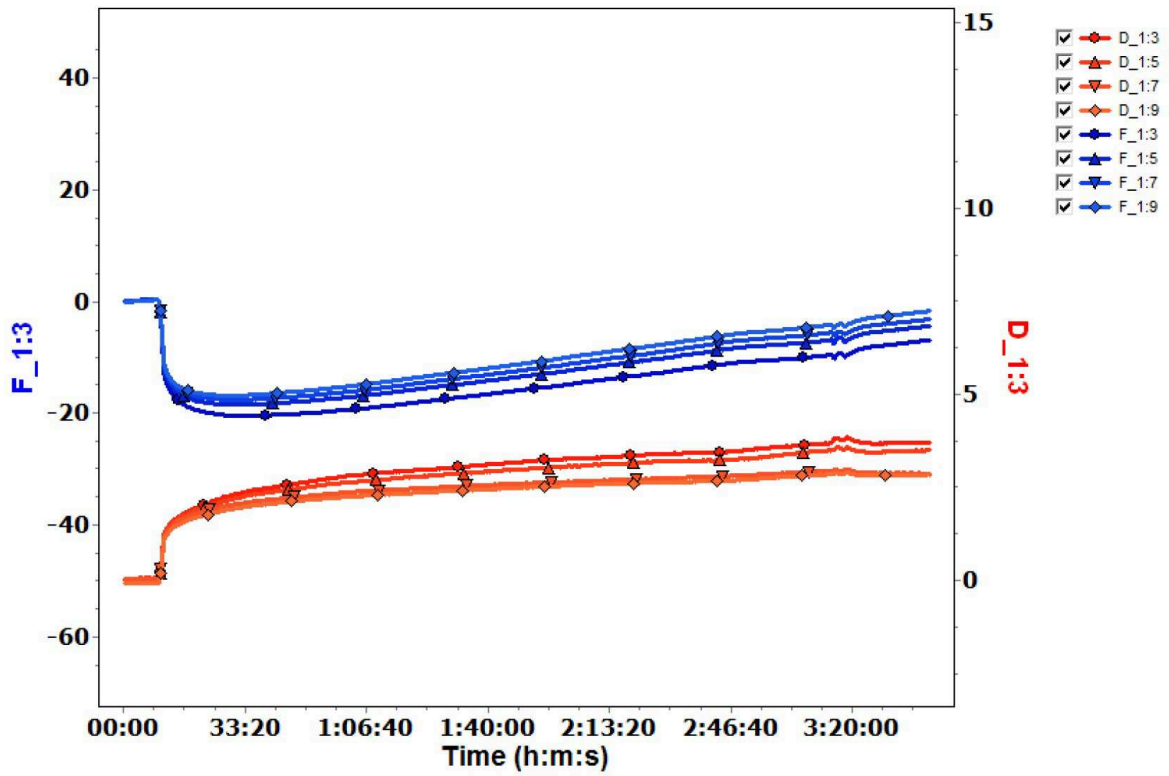
Un cambiamento nella frequenza di oscillazione ( $\Delta f$ ) del sensore risonante viene considerato un buon indicatore per l'interazione biomolecolare sul materiale in esame, nel caso dell'interazione cellulare il  $\Delta f$  è proporzionale all'area di contatto della cellula sulla superficie, mentre la dissipazione ( $\Delta D$ ) può essere monitorata per rilevare i cambiamenti citoscheletrici.

Lo studio è stato condotto monitorando l'interazione cellula-superficie in terreno di coltura per 3 ore a 37 °C. Nel caso dell'interazione cellule-SiO<sub>2</sub> (controllo) si ha una iniziale diminuzione della frequenza ( $f$ ) dovuta alla semplice deposizione cellulare, seguita da un distacco di queste ultime (**Graf. 8**).

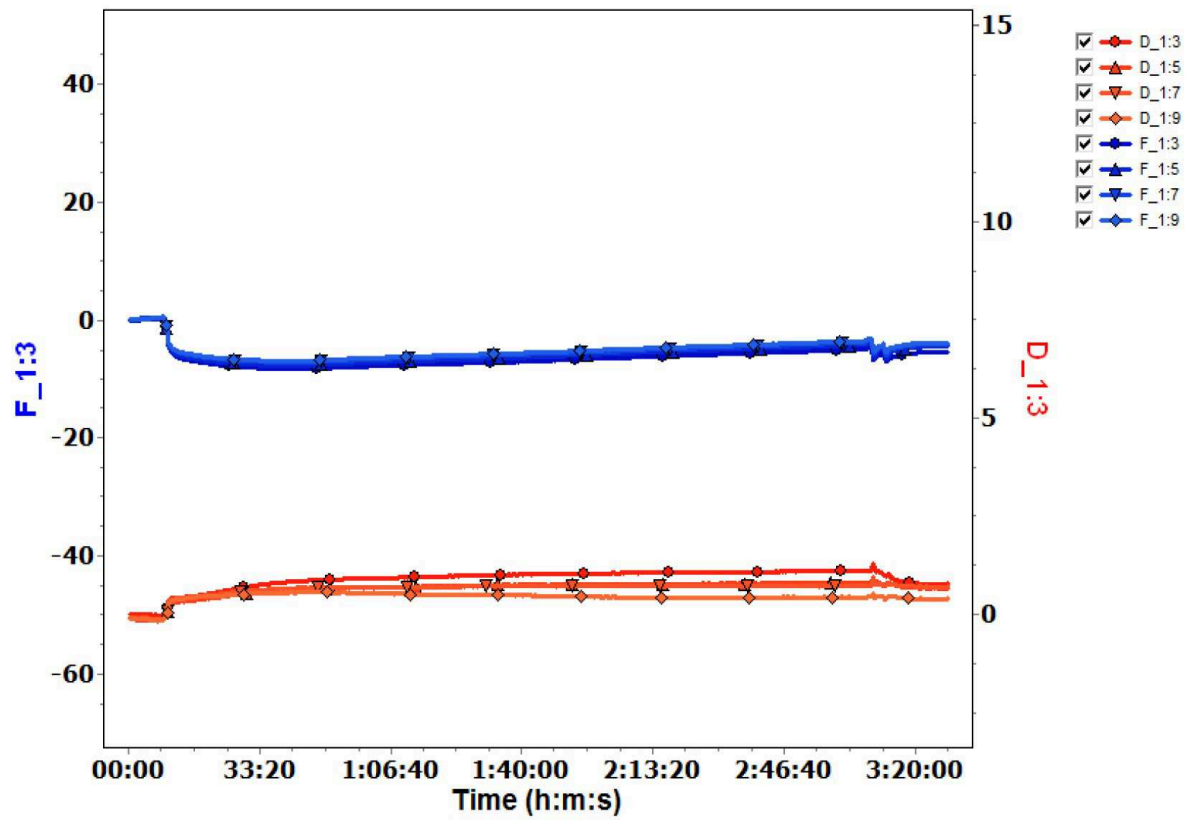
Sul PSS la diminuzione della frequenza non è altissima indice della bassa interazione fra le cellule e la superficie, con un valore di dissipazione quasi costante (**Graf. 9**).

La risposta migliore in termini di adesione si riscontra sulle superfici PEI-coated in cui osserviamo una diminuzione più marcata della frequenza che si mantiene bassa, e un aumento della dissipazione, indice dell'adesione di sistemi viscoelastici (membrana cellulare) alla superficie (**Graf. 10**).

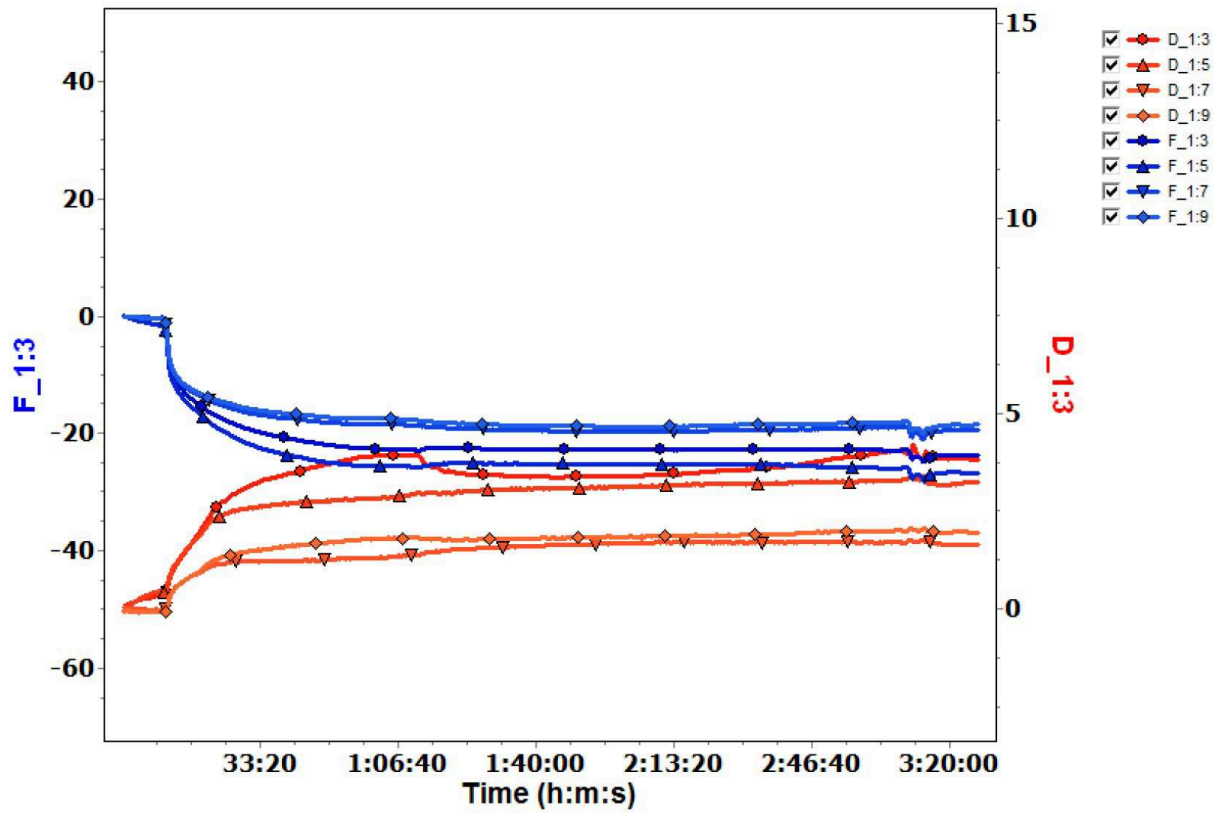




**Grafico 8** Andamento della variazione della frequenza (F) e della dissipazione (D) durante l'interazione cellule-SiO<sub>2</sub> (CTRL) per 3h a 37 °C.



**Grafico 9.** Andamento della variazione della frequenza (F) e della dissipazione (D) durante l'interazione cellule-PSS per 3h a 37 °C.



**Grafico 10** Andamento della variazione della frequenza (F) e della dissipazione (D) durante l'interazione cellule-PEI per 3h a 37 °C.

## CONCLUSIONI

Il mantenimento del fenotipo cellulare è di fondamentale importanza in qualsiasi applicazione di ingegneria tissutale. La possibilità di valutare *in vitro* le risposte cellulari a condizioni che mimano l'ambiente *in vivo*, può fornire una più completa conoscenza del comportamento dei biomateriali impiantati.

La realizzazione di multistrati di polielettroliti (PEMs) su materiali impiantabili è un'ottima strategia per realizzare condizioni che possano promuovere o prevenire l'adesione cellulare, o ancora più importante dirigerne e mantenerne il fenotipo.

Oltre a facilitare il mantenimento del fenotipo, è importante che i PEMs stimolino anche la proliferazione cellulare, e a questo scopo è possibile incorporare dei fattori di crescita per promuoverne il rilascio controllato.

La versatilità dei PEMs fornisce la straordinaria possibilità di mimare il complesso ambiente extracellulare *in vitro*; variando le caratteristiche chimiche, meccaniche e topografiche è possibile promuovere l'adesione, la proliferazione, il differenziamento, la migrazione e l'espressione genica di praticamente tutti i tipi di cellule.

La grande varietà dei tessuti biologici e i fenotipi cellulari ad essi associati, impone che la scelta delle caratteristiche dei PEMs sia la più idonea possibile al tipo cellulare utilizzato per la rigenerazione di uno specifico tessuto.

Lo strato terminale di un multilayer di polielettroliti è un fattore determinante nella biocompatibilità di un materiale e deve essere attentamente considerato sulla base delle interazioni cellulari desiderate per una particolare applicazione.

Dallo studio delle interazioni tra cellule staminali mesenchimali umane e PEMs terminanti rispettivamente con Polistirensolfonato (PSS) e Polietilenimina (PEI) sono emersi interessanti risultati.

Il comportamento delle cellule mesenchimali sul Multilayer terminante con il Polistirensolfonato non è molto dissimile dalla quello che si ottiene dall'interazione cellula-superficie non trattata. I processi di adesione cellulare, sia dal punto di vista molecolare che fisico (QCM-D), avvengono tramite meccanismi riconducibili a quelli normalmente riscontrabili *in vitro*. Il substrato attiva il corretto clustering delle molecole di adesione e organizza in modo corretto il citoscheletro cellulare senza indurre evidenti modificazioni fenotipiche. Anche gli eventi conseguenti all'appropriato riarrangiamento actinico e

microtubulinico sembrano progredire correttamente. Studi iniziali sul ciclo cellulare, condotti in citofluorimetria, mostrano che la progressione nel ciclo cellulare avviene con valori percentuali che poco si discostano da quelli di cellule utilizzate come controllo (dati non mostrati), confermando i risultati già esposti.

I PEMs PSS-ended sembrano avere le caratteristiche migliori per dirigere l'adesione ed il mantenimento del fenotipo delle hMSCs, mostrando una buona biocompatibilità.

Al contrario, le cellule sulle superfici rivestite da Polietilenimina sembrano aderire più rapidamente e con maggior forza, ma a questo ancoraggio non corrisponde un corretto pathway di adesione, in quanto le cellule non sono in grado di distendersi sul substrato (spreading) e di maturare correttamente i contatti focali. Sia la componente actinica che microtubulinica del citoscheletro presentano una disorganizzazione evidente rispetto alle cellule controllo, con conseguente impossibilità nella traslocazione delle integrine e delle molecole di adesione ed esse correlate. Pur non sembrando che questo infici la vitalità cellulare, sicuramente blocca o rallenta la proliferazione, come mostrato dai risultati dell' MTT e dai primi risultati ottenuti dall'esame citofluorimetrico del ciclo cellulare (dati non mostrati).

Il PEMs PEI-ended induce significative modificazioni morfologiche ed un abbassamento dell'attività metabolica cellulare; tuttavia la forza di adesione cellulare a questa superficie è superiore rispetto a quella che si riscontra negli altri campioni. Il forte ancoraggio della cellula indotto dal Polielettrolita, confermato dalle misure QCM-D, limita la possibilità di spreading sequestrando tutte le molecole di adesione nell'iniziale area di contatto cellula-substrato.

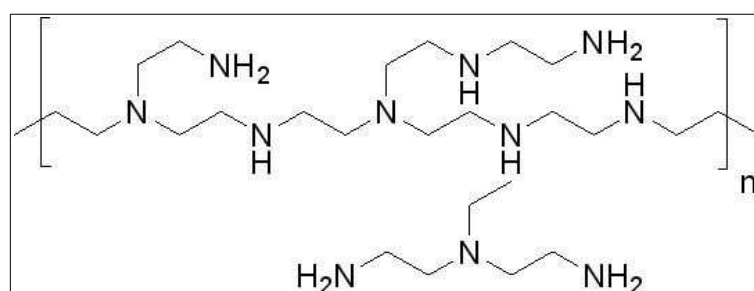
Nello sviluppo di nuovi biomateriali per applicazioni in ingegneria tissutale, il PSS si comporta come un buon substrato di crescita per le cellule mesenchimali, a differenza del PEI che ne compromette alcune funzioni biologiche; tuttavia potrebbe essere interessante modulare alcuni parametri nella struttura del PEMs PEI-ended o funzionalizzarlo con opportuni fattori che ne riducano l'effetto negativo sulle hMSCs, al fine di poter sfruttare il forte ancoraggio cellulare indotto da questa superficie.

L'adesione di una cellula alla superficie di un biomateriale è un punto critico per il funzionamento e la longevità del materiale stesso ed è un buon indicatore di biocompatibilità che, in alcuni casi, viene utilizzato come test di screening nello studio di nuovi biomateriali.

## MATERIALI E METODI

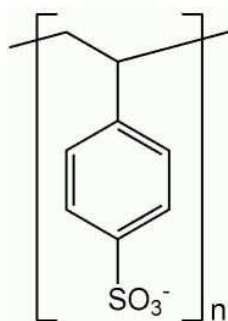
### MULTISTRATI POLIMERICI *Layer-by-Layer*

I polielettroliti sono polimeri che possiedono gruppi ionizzabili. In solventi polari, come per esempio l'acqua, questi gruppi possono dissociarsi, mantenendo le cariche sulle catene polimeriche e rilasciando i controioni in soluzione. I polielettroliti utilizzati in questo lavoro sono stati: PEI e PSS. La polietilenimmina (PEI), ha un peso molecolare pari a 60.000 Da e la seguente formula di struttura:



Il PEI è un comune polielettrolita cationico usato come strato ancorante nella formazione di film multistrato, poiché in seguito alla sua chimica e alla sua struttura facilita la crescita di film *layer-by-layer*.

Il poli(4-stirene-solfonato) (PSS) ha peso molecolare pari a 70.000 Da e formula di struttura:



I polielettroliti sono stati solubilizzati in una soluzione di NaCl 0.15M ad una concentrazione di 1 mg/ml. Le piastre e i vetrini utilizzati per le colture cellulari sono stati trattati per 30 minuti con UV-O<sub>3</sub>, al fine di conferire uno Z-potential leggermente negativo alla superficie e di eliminare le specie carboniose presenti sulla superficie, rendendole quindi parzialmente idrofiliche.

Al termine dei 30 minuti, sono stati effettuati 6 minuti di exhaust per permettere l'allontanamento dei “vapori” e dei radicali liberi formati per via del trattamento di cui sopra. I campioni così preparati sono stati lavati abbondantemente con acqua Millipore e asciugati sotto flusso di Azoto.

Una volta terminato tale trattamento, si procede con la deposizione degli strati polimerici PSS (-) e PEI (+) sui pozzetti e sui vetrini da utilizzare per il nostro studio mediante la tecnica Layer-by-Layer (LbL).

In particolare vengono depositati tre strati per la superficie carica positivamente e due strati per la superficie carica negativamente. Poiché il trattamento UV-O<sub>3</sub> conferisce alle superfici una carica elettrica negativa, viene depositato in primo luogo il polimero con carica elettrica opposta: i campioni vengono incubati con la soluzione di PEI per 15 minuti, tempo necessario per consentire l'adsorbimento del polielettrolita e quindi lavati con una soluzione di NaCl 0.15 M. Una volta depositato il primo polimero con carica elettrica positiva (PEI) sulle superfici trattate, si procede con l'adsorbimento del secondo polimero (PSS), avente carica elettrica opposta al primo, seguendo la metodica sopra illustrata.

Sono state così ottenute le superfici contenenti i due diversi substrati polimerici:

- PSS multilayer con 2 strati (PEI/PSS) carico negativamente in seguito alla presenza in superficie del gruppo funzionale del polistirensolfonato.
- PEI multilayer con 3 strati (PEI/PSS/PEI) carico positivamente in seguito alla presenza del gruppo funzionale della polietilenimina.

Dopo completa asciugatura delle superfici trattate, queste vengono incubate per 2 ore con Fungizone, vengono eseguiti successivamente 2 lavaggi in PBS e, ad ogni campione, viene aggiunta la sospensione cellulare.

## **COLTURE CELLULARI**

Tutti i protocolli sperimentali sono stati eseguiti utilizzando cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo umano (hMSCs). Il midollo osseo è stato prelevato da pazienti sani, mediante aspirazione con siringhe eparinizzate, e posto direttamente in fiasche da 75 cm<sup>3</sup> con medium  $\alpha$ -MEM (with L-Glutamina, nucleosidi e sali di Earle), Fungizone (Pennicillina 10.000 U/mL, Streptomicina 1000  $\mu$ g/mL), Siero Fetale Bovino (FBS-Invitrogen) al 20 %, e Acido Ascorbico (100  $\mu$ m).

Le fiasche sono state incubate a 37° C in atmosfera umidificata, 95% aria e 5% CO<sub>2</sub>. Sono

stati eseguiti due o più cambi di terreno a distanza di 24 ore per allontanare le cellule in sospensione e quindi isolare le sole cellule staminali mesenchimali. In seguito sono stati effettuati dei cambi di terreno periodici (ogni 3-4 giorni), fino al raggiungimento della confluenza. Una volta raggiunta la confluenza, le hMSCs sono state staccate dalla fiasca di coltura mediante Tripsina/EDTA (0,05% / 0,2%), risospese in terreno  $\alpha$ -MEM senza siero, e contate al microscopio ottico tramite camera emocitometrica di Bürker.

### **MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)**

Le cellule sono state poste in coltura su vetrini rivestiti dai multilayer PSS ending film e PEI ending film e processati per l'osservazione ultrastrutturale al microscopio elettronico a scansione. Il processamento dei campioni prevede il trattamento del monostrato cellulare con gluteraldeide 2% in tampone Sodio Cacodilato 0.1M pH 7.4, per 1 ora a 4°C per, seguita da una seconda fissazione in tetrossido di Osmio all'1% in tampone Sodio Cacodilato 0.1M pH 7.4.

Successivamente i campioni sono stati sottoposti a disidratazione con serie crescente di etanolo (35°-50°-90°-70°-100°), e poi completata con CO<sub>2</sub> con Critical Point Drying eseguito con Emscope CPD750. I campioni sono stati resi conduttivi tramite metallizzazione con oro dello spessore di 100 nm (Sputter Coater, Polar SC7640), ed osservati e fotografati per mezzo di un FESEM Hitachi S4000.

### **TEST DI VITALITA' CELLULARE ( MTT )**

Per testare la vitalità e la proliferazione cellulare, è stato utilizzato un saggio colorimetrico basato sulla determinazione dell'attività metabolica cellulare.

Il saggio prevede l'utilizzo di un colorante tiazolico solubile non citotossico, il 3-(4,5-dimetiltiazolo-2)-2,5-difeniltetrazolo bromuro, che a contatto con le deidrogenasi mitocondriali di cellule metabolicamente attive, viene ridotto a sali di formazano, i quali si accumulano all'interno della cellula sotto forma di cristalli di colore blu.

La successiva solubilizzazione dei sali di formazano con isopropanolo, determina la colorazione del mezzo, la cui intensità è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. La quantità di sali di formazano formati può essere misurata attraverso una lettura spettrofotometrica a due diverse lunghezze d'onda (570 nm e 650 nm), ed i valori ottenuti



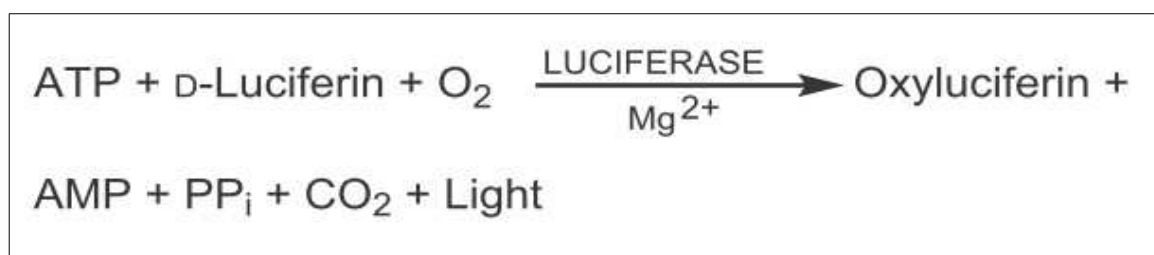
vengono espressi come Densità Ottica corretta ( $\Delta DO: \lambda_{570} - \lambda_{650}$ ).

La soluzione MTT (M5655 Sigma) è stata preparata ad una concentrazione di 5 mg/ml in PBS e incubata per 2 ore e 25 minuti a 37° C in atmosfera umidificata, 95% aria e 5% CO<sub>2</sub>.

Sono state utilizzate 10.000 cellule per ciascun campione e l'attività mitocondriale è stata analizzata dopo 3h, 24h, 48h, 72h e 120h di coltura per saggiare la biocompatibilità dei polielettroliti, e dopo 3h, 24h e 72h per il test di vitalità dopo somministrazione di ATP.

## QUANTIFICAZIONE ATP

L'ATP è un marker di vitalità cellulare, è presente in tutte le cellule metabolicamente attive e la sua concentrazione declina molto rapidamente in cellule la cui membrana plasmatica viene danneggiata. La concentrazione di ATP intracellulare nei campioni presi in esame è stata valutata attraverso l'ausilio del kit ATPlite 1step (PerkinElmer), un sistema basato sull'emissione di fotoni generata dalla reazione tra l'enzima Luciferasi e il substrato Luciferina in presenza di ATP, secondo il seguente schema:



L'emissione luminosa è direttamente proporzionale alla concentrazione di ATP e viene espressa in colpi per secondo (CPS). I campioni sono stati lisati e quantificati dopo 3h, 6h e 24 ore di coltura.

## ATTIVITA' MITOCONDRIALE (JC-1).

L'analisi dell'attività mitocondriale è stata condotta attraverso il trattamento di cellule ancora vitali cresciute sui vetrini PEI-coated per 3h, 24h e 48h con la sonda fluorescente JC-1 sensibile al potenziale transmembrana mitocondriale ( $\Delta \psi$ ).

La sonda JC-1 è stata diluita nel mezzo di coltura cellulare privato del siero, posta in bagnetto termico a 37°C per favorirne la dissoluzione, vortexata e incubata con le cellule a 37°C per 10 minuti. Al termine dell'incubazione i vetrini sono stati lavati e osservati immediatamente al microscopio a fluorescenza.

## **IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA (FITC-Falloidina)**

L'immunofluorescenza diretta è una tecnica che consiste nell'uso di un anticorpo o di una sostanza specifica per una molecola di interesse, coniugato ad un fluoroforo (o un altro elemento di segnalazione) che ne consenta la visualizzazione diretta.

L'analisi della componente citoscheletrica actinica è stata eseguita attraverso una tecnica di immunofluorescenza diretta che prevede la marcatura dei microfilamenti con la Falloidina, una sostanza altamente specifica per l'actina F, coniugata al fluoroforo verde FITC fluoresceinaiotiocianato. Il monostrato cellulare cresciuto sui vetrini coated è stato lavato con PBS e fissato con formaldeide al 3% in PBS e saccarosio al 2%, per 5 minuti a temperatura ambiente. Una volta terminata la fissazione i campioni sono stati nuovamente lavati e trattati con tampone di permeabilizzazione per 4 minuti a 4°C. Trascorsi i 4 minuti si procede con ulteriori lavaggi con PBS, al termine dei quali ad ogni campione viene aggiunta la soluzione FITC-Falloidina (Sigma), 20 µg per mL di PBS, e vengono posti poi in incubatore per 30 minuti. Dopo il trattamento, i vetrini vengono trasferiti e montati con opportuno liquido di montaggio, per poi essere osservati al microscopio a fluorescenza Olympus BX50 corredato da una camera digitale Leica DC 500.

## **IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA**

L'immunofluorescenza indiretta prevede l'uso di due anticorpi, uno primario non coniugato specifico per la molecola di interesse, e uno secondario coniugato con un fluoroforo (o altri elementi di identificazione) diretto verso l'anticorpo primario.

Le cellule sono state fatte aderire sui vetrini PSS e Pei coated per 3h, 6h e 24h, e fissate per 15 minuti con Paraformaldeide 4% in PBS. Dopo opportuni lavaggi post fissazione, le cellule sono state permeabilizzate con Triton X-100 0,2% in PBS 5 minuti per consentire l'ingresso degli anticorpi primari (anti-tubulina, anti-integrina  $\alpha 1$ , anti-integrina  $\alpha 5$ , anti-FAK-pY397 e anti-Pax pY31). Prima dell'incubazione con gli anticorpi primari, i campioni sono stati incubati per 30 minuti con Albumina Sierica Bovina (BSA) al 5% il PBS per bloccare i siti aspecifici.

Gli anticorpi primari sono stati diluiti in BSA 1% in PBS e incubati per 1h a temperatura ambiente. Trascorso il tempo di incubazione dell'anticorpo primario specifico, sono stati condotti tre lavaggi in PBS e diluiti gli anticorpi secondari coniugati ai fluorofori Alexa Fluor 594 e Alexa Fluor 488, aventi rispettivamente emissione di fluorescenza rossa e verde.

Gli anticorpi secondari sono stati incubati per 1h a temperatura ambiente al buio per evitare decadimento della fluorescenza. Alla fine della doppia incubazione con anticorpi e degli opportuni lavaggi, i vetrini trattati sono stati asciugati e montati per l'osservazione al microscopio a fluorescenza Olympus BX50 corredato da una camera digitale Leica DC 500 e al Microscopio Confocale a scansione laser.

## **ESTRAZIONE DI RNA**

Le cellule in adesione sulle superfici sono state lisate con Trizol Reagent (Ambion 15596-026) dopo 24 ore per procedere all'estrazione dell'RNA. Al lisato è stato aggiunto cloroformio (0,2 ml per 1 ml di Trizol) e centrifugato a 12.000 g per 15 minuti a 4 °C. Dopo centrifugazione del campione si procede al recupero della fase contenente l'RNA, vi si aggiunge isopropanolo 100 % (0,5 ml per 1 ml di Trizol usato per la lisi) e si lascia incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.

Trascorso il tempo di incubazione si centrifugano nuovamente i campioni a 12.000 g per 10 minuti a 4 °C per consentire la precipitazione dell'RNA. Dopo un lavaggio con etanolo 75 % (1 ml per 1 ml di Trizol) si effettua un'ultima centrifuga a 7.500 g per 5 minuti a 4 °C.

Una volta scaricato il surnatante, il pellet di RNA viene fatto asciugare e risospeso in 20-30 µL di acqua e incubato in bagnetto riscaldato a 55-60 °C per 10-15 minuti in modo da facilitarne la risospensione.

I campioni vengono quindi quantificati attraverso il fluorimetro Qubit® (life technologies™, Invitrogen). Da ogni campione è stato prelevato 1 µL di soluzione ed aggiunto a 199 µL di Qubit® Working Solution negli appositi Qubit® assay tubes.

La concentrazione di RNA presente nel campione viene espressa in µg/ µL e si procede con il calcolo delle opportune diluizioni. per allestire l'esperimento di Real Time PCR utilizzando per tutti i campioni la stessa quantità di RNA.

## **REAL TIME PCR**

L'RNA estratto deve essere convertito in cDNA, DNA complementare a singolo filamento, per poter fungere da stampo nelle successive reazioni di amplificazione qualitativa e quantitativa.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una metodica che permette l'amplificazione esponenziale in vitro di una determinata sequenza di cDNA, precedentemente preparato con reazione di retrotrascrizione, attraverso l'uso di piccole sequenze specifiche (primer) per i geni

da amplificare. Il prodotto della reazione sarà una molecola di dsDNA con estremità corrispondenti a quelle dei primer utilizzati. L'amplificazione viene effettuata tramite diversi cicli, ciascuno dei quali risulta composto di tre fasi fondamentali:

- denaturazione: la molecola di DNA viene portata ad alte temperature (94-95°C) al fine di separare le due catene di DNA, rendendo possibile l'accesso dei primers al filamento complementare;
- appaiamento: la temperatura viene abbassata per consentire l'appaiamento dei primer alla sequenza complementare;
- estensione: l'enzima Taq polimerasi sintetizza il filamento complementare al DNA stampo a partire dai due primers. La temperatura di efficienza dell'enzima è 72°C.

A differenza della tecnica di PCR precedentemente descritta, la PCR Real Time, o quantitativa, permette la caratterizzazione quantitativa del trascritto, monitorando la quantità di DNA prima della fase di plateau, durante la fase esponenziale di crescita, per risalire alla quantità di stampo di partenza.

La PCR quantitativa Real-Time è stata realizzata utilizzando la metodica SYBR Green (Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit, Applied Biosystems). Questo saggio di quantificazione è basato sull'incremento di fluorescenza provocato dal legame della molecola SYBR Green al solco minore del DNA. Dopo i primi cicli di amplificazione che servono a settare la reazione in quanto non significativamente misurabili, si possono registrare curve di fluorescenza che si innalzano tanto più velocemente quanto più elevata è l'espressione della quantità di template presente in origine.

Siccome sono necessari parecchi cicli affinché il prodotto sia abbastanza rilevabile, il diagramma della fluorescenza rispetto al numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide. Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, è chiamato il ciclo soglia (valore di Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. Ogni amplificazione consta di 40 cicli ripetuti.

La fluorescenza viene direttamente registrata dal software Applied Biosystems SDS Plate Utility 2.2, e i risultati sono stati analizzati seguendo il metodo Ct comparativo Applied Biosystems R.Q. Manager.

## ANALISI DELL'INTERAZIONE CELLULE-SUBSTRATO MEDIANTE QCM-D

Il principio di funzionamento della microbilancia a cristallo di quarzo con monitoraggio di dissipazione (QCM-D) si basa sull'effetto piezoelettrico inverso.

L'effetto piezoelettrico fu scoperto nel 1880 da Jacques e Pierre Curie, i quali osservarono che uno stress meccanico applicato sulla superficie di alcuni cristalli, tra cui il quarzo, causava l'insorgere di un potenziale elettrico sul cristallo la cui entità è proporzionale allo stress applicato.

La frequenza di risonanza dipende dalla natura del materiale, dalla sua geometria e dimensioni. Una variazione della frequenza ( $\Delta f$ ) del sensore risonante (ad es. per deposizione, adsorbimento o desorbimento di un film sottile sulla superficie) corrisponderà ad una variazione della massa adsorbita ( $\Delta m$ ).

L'alta precisione con la quale la frequenza viene misurata rende possibile misurare variazioni che corrispondono a masse veramente piccole  $< 1 \text{ ng/cm}^2$ . L'uso della tecnica QCM in fase liquida consente di caratterizzare i sistemi biomolecolari nel loro ambiente acquoso naturale, e permette di studiare processi come l'adsorbimento di multistrato di polielettroliti o l'adsorbimento di proteine su una superficie *in situ* o l'interazione fra la cellula e il materiale. La Microbilancia a Cristallo di Quarzo con monitoraggio della Dissipazione (QCM-D) permette di misurare simultaneamente la frequenza e il fattore di dissipazione. Le informazioni ottenute dalle misure di dissipazione possono, quindi, insieme alle variazioni di frequenza (massa) essere usate per distinguere differenti conformazioni di molecole adsorbite. In particolare, variazioni misurate nella dissipazione D diventano molto preziose quando sono combinate con un modello per la possibile struttura del film adsorbito e delle sue proprietà viscoelastiche.

Il cristallo sensore è un disco circolare, costituito da quarzo alfa, una forma cristallina specifica di  $\text{SiO}_2$ , ha uno spessore di 0.3 mm e un diametro di 2.5 cm. Su ciascun lato del disco sono depositati elettrodi metallici molto spesso in oro. Quando il cristallo è inserito nella camera di misura, un lato viene in contatto con il campione durante la misura ed in tale lato, solo l'area attiva fa da sensore, cioè saranno sentiti solo in quest'area ( $0.2 \text{ cm}^2$ ) i cambiamenti nelle proprietà di superficie.

La camera inoltre contiene un modulo termoelettrico che permette di controllare la temperatura durante la misura.

Dopo essere state staccate dalle fiasche di coltura, le cellule sono state raccolte, centrifugate e risospese sia in una soluzione di PBS sia in terreno senza siero. Gli studi QCM-D di

interazione fra le cellule e le superfici SiO<sub>2</sub>, PEI e PSS sono state fatte in situ.

Il tempo impiegato per l'analisi dell'interazione cellule-substrato è stato di 3 ore a  $37.0 \pm 0.1$  °C.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams JC and Watt FM. “*Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix*”. Development 117, 1183-1198.1993.
- Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. “*Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants*”. Biotechnol Adv. 29(6):739-67. 2011
- Bean AC and Tuan RS. “*Stem cells and nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine*” Micro and Nanotechnologies in Engineering Stem Cells and Tissues, First Edition. 2013.
- Bershadsky A, Chausovsky A, Becker E, Lyubimova A, Geiger B. “*Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction*”. Curr Biol. 6(10):1279-89.1996.
- Bieber T, Meissner W, Kostin S, Niemann A, Elsasser HP. “*Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes*”. J Control Release. 21;82(2-3):441-54. 2002.
- Böhmer RM, Scharf E, Assoian RK. “*Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1*”. Mol Biol Cell. 7(1):101-111. 1996.
- Boudou T, Crouzier T, Ren K, Blin G, Picart C. “*Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications*”. Adv Mater. Jan 26;22(4):441-67. 2010.
- Bowers S, Banerjee I, Baudino T. “*The extracellular matrix: at the center of it all*”. J Mol Cell Biol 48:474–482. 2010.
- Brunot C, Ponsonnet L, Lagneau C, Farge P, Picart C, Grosogoeat B. “*Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films*”. Biomaterials;28(4):632-40. 2007.
- Castillo AB, Blundo JT, Chen JC, Lee KL, Yereddi NR, Jang E, Kumar S, Tang WJ, Zarrin S, Kim JB, Jacobs CR. “*Focal adhesion kinase plays a role in osteoblast mechanotransduction in vitro but does not affect load-induced bone formation in vivo*”. PLoS One;7(9):e43291. 2012
- Chen CS, Alonso JL, Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE. “*Cell shape provides global control of focal adhesion assembly*” Biochemical and Biophysical Research Communications 307(2):355-61. 2003.

- Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. “***Biomaterials for stem cell differentiation***” *Advanced Drug Delivery Reviews* 60. 215–228. 2008.
- Deakin NO and Turner CE. “***Paxillin comes of age***”. *Journal of Cell Science* 121 (15) 2435–2444. 2008.
- Detzel CJ, Larkin AL and Rajagopalan P. “***Polyelectrolyte Multilayers in Tissue Engineering***”. *Tissue Engineering Part B*:17(2): 101-113. 2011.
- Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. “***Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system***”. *J Cell Mol Med*.11(1):21-38. 2007.
- Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. “***Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments***”. *Physiol Rev.*;83(2):433-73. 2003.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. “***Matrix elasticity directs stem cell lineage specification***” *Cell*, 126, pp. 677–689. 2006.
- Fletcher DA, Mullins RD. “***Cell mechanics and the cytoskeleton***”. *Nature*;463(7280):485-92.2010.
- Harris MH, Thompson CB. “***The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability***”. *Cell Death Differ* ;7(12):1182-91.2000.
- Hinshaw DB, Armstrong BC, Burger JM, Beals TF, Hyslop PA. “***ATP and microfilaments in cellular oxidant injury***”. *Am J Pathol.*;132(3):479-88. 1988.
- Huang S, Chen CS, Ingber DE. “***Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension***”. *Mol Biol Cell*. 9(11):3179-93. 1998.
- Huttenlocher A, Horwitz AR. “***Integrins in Cell Migration***”. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(9). 2011.
- Ilie I, Ilie R, Mocan T, Bartos D, Mocan L. “***Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: designing an appropriate nanobiointerface***”. *Int J Nanomedicine*;7:2211-25. 2012.
- Khalili AA, Ahmad MR. “***A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications***”. *J Mol Sci*. 16(8):18149-84. 2015.
- Klemm AR, Young D, Lloyd JB. “***Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability***”. *Biochem Pharmacol*. 56(1):41-6. 1998.
- Ladam G, Gergely C, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P and Cuisinier FJG. “***Protein Interactions with Polyelectrolyte Multilayers: Interactions between Human***



- Serum Albumin and Polystyrene Sulfonate/Polyallylamine Multilayers*". *Biomacromolecules* 1, 674-687. 2000.
- Langer R, Vacanti JP. "*Tissue engineering*". *Science* 260:920–926. 1993.
- Lee SH, Dominguez R. "*Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells*". *Mol Cells*;29(4):311-25. 2010.
- Lim ST. "*Nuclear FAK: a new mode of gene regulation from cellular adhesions*". *Mol Cells*. 36(1):1-6. 2013.
- Mitra SK, Schlaepfer DD. "*Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells*". *Curr Opin Cell Biol*.18(5). 516-23. 2006.
- Prowse ABJ, Chong F, Gray PP, Munro TP. "*Stem cell integrins: Implications for ex-vivo culture and cellular therapies*". *Stem Cell Research* 6, 1–12. 2011.
- Ramaekers FC, Bosman FT. "*The cytoskeleton and disease*". *J Pathol*. Nov;204(4):351-4. 2004.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* 2<sup>nd</sup> Edition. 2004.
- Richert L, Lavalle Ph, Vautier D, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, and Picart C. "*Cell Interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films*". *Biomacromolecules* 3, 1170-1178. 2002.
- Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. "*Smart materials as scaffolds for tissue engineering*". *J Cell Physiol*. Jun;203(3):465-70. 2005.
- Schaller MD. "*Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein*". *Oncogene* 20, 6459 – 6472. 2001.
- Shin H, Jo S, Mikos AG. "*Biomimetic materials for tissue engineering*". *Biomaterials*. Nov;24(24):4353-64. 2003.
- Stabenfeldt S.E. Brown A.C. Barker T.H. "*Engineering ECM complexity into biomaterials for directing cell fate*". *Biomaterials as Stem Cell Niche*. pp. 1–18. 2010.
- Takada Y, Ye X, Simon S. "*The integrins*". *Genome Biol*.;8(5):215. 2007.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. "*Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*". *Science*; 282(5391):1145-7. 1998.
- Tryoen-Tóth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Chluba J, Ogier J. "*Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films*". *J Biomed Mater Res*. 15;60(4):657-67. 2002.

- Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K and Wu C. “*Migfilin and Mig-2 Link Focal Adhesions to Filamin and the Actin Cytoskeleton and Function in Cell Shape Modulation*” Cell, Vol. 113, 37–47, April 4, 2003.
- Van der Flier A. and Sonnenberg, “*Function and interactions of integrins*” Cell and Tissue Research. 305, 3, 285-298. 2001.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. “*The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*”. Cell Prolif. 36(3):131-49.2003.
- Wang N and Ingber DE. “*Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape and mechanical tension*” Biophysical Journal. Volume 66. 2181-2189. 1994.
- Webb K, Hlady V, Tresco PA. “*Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces*”. J Biomed Mater Res. 49(3):362-8. 2000.
- Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ “*Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review*”. Tissue Engineering. 11: 1–18. 2005.
- Zhao J, Bian ZC, Yee K, Chen BP, Chien S, Guan JL. “*Identification of transcription factor KLF8 as a downstream target of focal adhesion kinase in its regulation of cyclin D1 and cell cycle progression*”. Mol Cell.;11(6):1503-15. 2003.