

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

*Ruolo della fisica della matrice extracellulare
come determinante della progressione della
malattia neoplastica*

Elaborato in
Biochimica

Relatore
Prof. Emanuele Giordano

Presentata da
Roberta Ramilli

Sessione Terza

Anno Accademico 2012/2013

Indice

Capitolo 1 - La matrice extracellulare: un intricato network di macromolecole

1.1 Composizione molecolare dell'ECM	4
1.1.1 Proteine fibrose	4
1.1.2 Glicosamminoglicani	6
1.1.3 I principali recettori delle macromolecole dell'ECM: le integrine	9
1.2 Meccanismi di funzionamento della ECM	11
1.3 Dinamiche ECM deregolate come segno distintivo del cancro	14

Capitolo 2 - ECM: nicchia dinamica nella progressione del cancro

2.1 Introduzione	17
2.2 Viaggio di forza della cellula tumorale	18
2.2.1 Morfologia e omeostasi dei tessuti	18
2.2.2 Il distacco e l'invasione	20
2.2.3 Forze interstiziali e forze di taglio	22
2.2.4 Diapedesi e metastasi distali	23
2.3 Caratterizzare il fenotipo meccanico	29
2.3.1 Tipi di forze sperimentate da una cellula	29
2.3.2 Misura della reologia in colture cellulari in due dimensioni	30
2.3.3 Misura della meccanica cellulare in tre dimensioni	34

Capitolo 3 - Approfondimento: analisi della rigidità della matrice

3.1	Calcolo della pre-tensione nella ECM	37
3.2	Cambiamento della rigidità in campioni di ECM reali	40
	Bibliografia	45

Capitolo 1

La matrice extracellulare: un intricato network di macromolecole

La matrice extracellulare o ECM (Extracellular matrix), come più comunemente viene definita nell'ambito scientifico internazionale, rappresenta la più complessa unità di organizzazione strutturale dei tessuti degli organismi viventi. I tessuti, infatti, non sono costituiti solo da cellule: una parte rilevante del loro volume è formata dallo spazio extracellulare, occupato da un'intricata rete di macromolecole, la cui organizzazione tridimensionale rappresenta appunto l'ECM. L'analisi biochimica dell'ECM rivela che essa è composta da una pleora di proteine e polisaccaridi, che si aggregano in un reticolo organizzato in maniera compatta e connesso alla superficie delle cellule che l'hanno prodotto e di quelle circostanti.

Se fino a qualche tempo fa si pensava che l'ECM servisse principalmente da impalcatura relativamente inerte in grado di stabilizzare la struttura fisica dei tessuti, è ormai ampiamente dimostrato che l'ECM rappresenta il substrato su cui tutte le cellule dei tessuti possono aderire, migrare, proliferare e differenziare, e che ne influenza inoltre la sopravvivenza, la forma e la funzione. Infatti, le macromolecole dell'ECM sequestrano fattori di crescita, molecole come l'acqua o i minerali, e controllano fenomeni fisiologici, quali la morfogenesi, fisiopatologici, quali la guarigione delle ferite, e patologici, quali l'invasione e la metastatizzazione tumorale.

Il comportamento cellulare (metabolismo, proliferazione, differenziamento o staminalità, migrazione, apoptosi) non dipende solo da caratteristiche intrinseche delle cellule, ma è strettamente condizionato dall'interazione tra cellule, matrice e microambiente cellulare.

A loro volta le cellule condizionano la composizione e la dinamica della matrice. Ogni cellula del corpo interagisce costantemente con la ECM, sia sotto l'aspetto meccanico che chimico ed energetico, con effetti "drammatici" sull'architettura statica e dinamica dei tessuti.

1.1 Composizione molecolare dell'ECM

Le due classi principali di macromolecole extracellulari che compongono la matrice sono:

- **GLICOSAMMINOGLICANI: (GAG)** Catene di polisaccaridi che solitamente si trovano legati covalentemente alle proteine per formare i **PROTEOGLICANI (PG)**. Questi possono essere ricchi di gruppi solfato (il condroitinsolfato, il dermatansolfato, l'eparansolfato e il cheratansolfato) o privi (l'acido ialuronico).
- **PROTEINE FIBROSE:** appartenenti a due gruppi, uno con funzione principalmente strutturale (i collagene e l'elastina) ed uno con funzioni principalmente adesive (la fibronectina, le laminine, le entactine o nidogeni e la vitronectina).

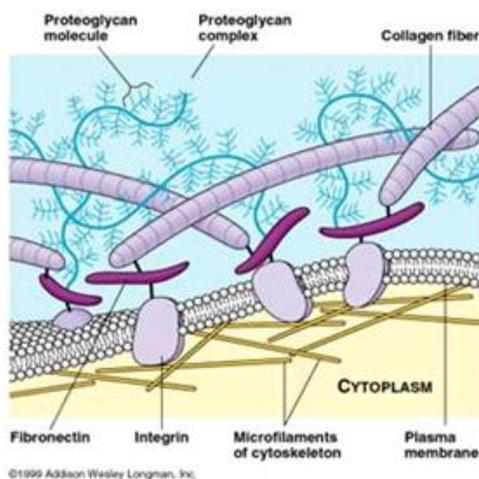


Figura 1 - Schematizzazione della composizione della matrice extracellulare.

1.1.1 Proteine fibrose

Fibre collagene

Le fibre dei collagene rinforzano l'ECM, la organizzano, la rendono flessibile e ne assicurano la resistenza alla trazione. Esse appaiono al microscopio come strutture ondulate di larghezza e lunghezza variabile, appaiono cioè come matasse costituite da sub-unità più sottili. Queste sub-unità sono le fibrille di collagene. All'interno di ogni

fibra di collagene le fibrille hanno un diametro uniforme. Durante lo sviluppo di un tessuto non maturo le fibrille presentano dimensioni differenti e il loro diametro può variare dai 15 ai 300 nm. Nei tessuti connettivi densi o in altri tessuti sottoposti a carichi notevoli il diametro delle fibrille può arrivare a misurare 300 nm. Quando le fibrille di collagene vengono esaminate al microscopio a trasmissione elettronica esse presentano una sequenza di striature trasversali che si ripete all'incirca ogni 68 nm per tutta la loro lunghezza.

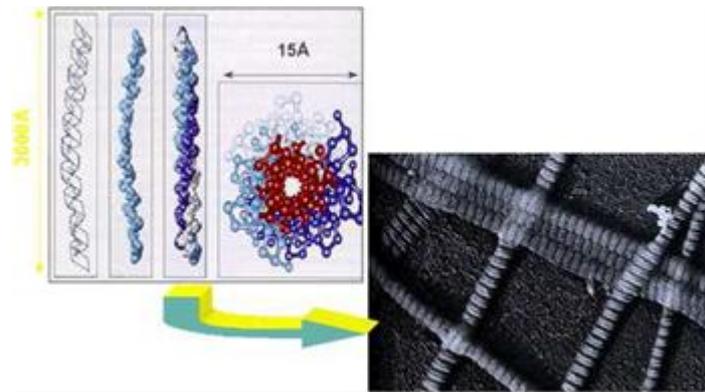


Figura 2 - Collagene al TEM: le striature sono dovute alla struttura microscopica del collagene. Infatti ciascuna fibrilla è composta di molecole di collagene sfasate tra di loro.

Fibre reticolari

Le fibre reticolari forniscono un supporto per le componenti cellulari dei vari organi e tessuti. Le fibre reticolari e le fibre di collagene sono entrambe forme di fibrille di collagene. A differenza delle fibre di collagene precedentemente descritte, le fibre reticolari sono formate da collagene di tipo III. Le fibrille individuali, che formano le fibre reticolari, esibiscono una striatura di 0,68 nm. Le fibrille hanno un diametro più piccolo (20 nm). Le fibre reticolari hanno quindi un'organizzazione in un reticolo o una rete.

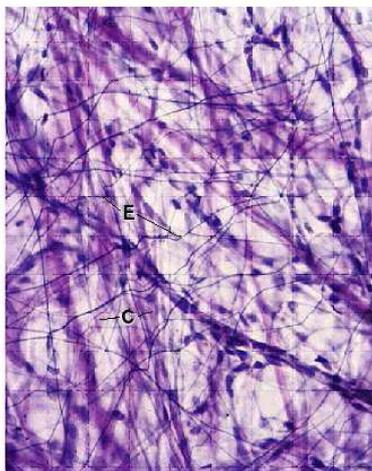


Figura 3 - Mesenterio Collagene (C) e fibre elastiche (E); le fibre elastiche sono sottili tipo filo ramificato, le fibre di collagene sono più spesse e non ramificate.

Fibre elastiche

Le fibre elastiche determinano l'elasticità della ECM, consentendo ai tessuti di rispondere allo stiramento e alla distensione. Esse sono tipicamente più sottili delle fibre di collagene e sono organizzate in strutture ramificate che formano reticoli tridimensionali. Le fibre elastiche sono intrecciate con quelle di collagene per limitare la "distensibilità" del tessuto e per prevenire strappi causati dall'eccessivo stiramento.

Le fibre elastiche sono prodotte per la maggior parte dalle stesse cellule che producono il collagene e le fibre reticolari, in particolare fibroblasti e cellule muscolari lisce. A differenza del collagene le fibre elastiche sono composte da due componenti strutturali: un cuore centrale di elastina e una parte circostante di microfibrille di fibrillina.

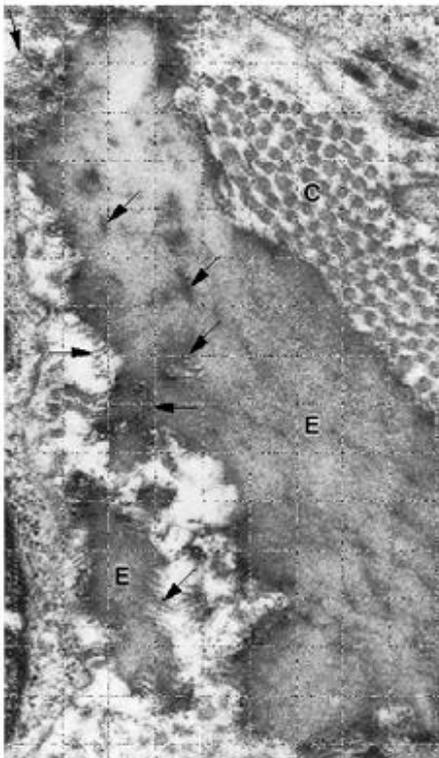


Figura 4 - Microscopia elettronica di una fibra elastica. L'elastina (E) della fibra ha un aspetto amorfo. Le microfibrille di fibrillina (vedi frecce dell'immagine corrispondente) sono presenti alla periferia e dentro la sostanza delle fibre. Sono anche presenti alcune fibre di collagene (C).

1.1.2 Glicosamminoglicani

Glicosaminoglicani

Glicosaminoglicani e proteoglicani costituiscono la rete tridimensionale a maglia fine tra le cellule dell'organo e i capillari e i vasi linfatici. I Glicosamminoglicani sono catene di polisaccaridi non ramificate composte da unità di disaccari di ripetute. Uno dei

due residui di zucchero nel disaccaride ripetuto è sempre un amminozucchero (N-acetilglucosammina o N-acetil galattosammina) che nella maggior parte dei casi è solfatato. Il secondo zucchero è, di solito, un acido uronico (glicoronico, iduronico). La presenza di gruppi solforici o carbossilici, conferisce ai glicosamminoglicani un'elevata carica negativa. Le catene di polisaccaridi sono troppo rigide per formare strutture compatte o globulari. I glicosamminoglicani tendono ad assumere nello spazio conformazioni distese che occupano un volume enorme rispetto al loro peso e formano gel anche a concentrazioni molto basse. L'elevata densità delle loro cariche negative attrae una nube di cationi come Na^+ , accompagnato da un afflusso di grandi quantità d'acqua nella matrice. La risultante tendenza al rigonfiamento rende la matrice capace di resistere alle forze di compressione, (diversamente dalle fibrille del collagene che tendono ad essere più resistenti alle forze di trazione). Per tale meccanismo la matrice della cartilagine dell'articolazione del ginocchio può resistere a pressioni di centinaia di atmosfere.

I glicosamminoglicani del tessuto connettivo sono meno del 10% in peso rispetto a quelle delle proteine fibrose. Tuttavia poiché le catene dei glicosamminoglicani, come detto occupano molto spazio e formano gel porosi e idratati, occupano gran parte dello spazio extracellulare formando un supporto meccanico ai tessuti e consentendo la diffusione di molecole idrosolubili.

Acido Ialuronico

L'Acido Ialuronico è la più semplice molecola di glicosamminoglicano. Esso gioca un ruolo importante nella resistenza dei tessuti ed articolazioni alle forze di compressione. Svolge anche una funzione importante durante lo sviluppo embrionale, dove è coinvolto nei complessi cambiamenti morfologici dei tessuti. E' inoltre prodotto in grande quantità durante i processi di riparazione delle ferite ed è un componente chiave del fluido delle articolazioni dove funge da lubrificante. La molecola di acido ialuronico come gli altri GAG presenta elevata polarità, e di conseguenza è in grado di formare idrogel contenti un elevato numero di molecole d'acqua. Questa caratteristica permette alla ECM di mantenere l'appropriato grado di idratazione, turgidità, plasticità e viscosità. L'acido ialuronico è anche in grado di agire come sostanza cementante e come molecola anti-urto, nonché come efficiente lubrificante, prevenendo il danneggiamento delle cellule del tessuto da stress fisici.

Un'ulteriore funzione è quella di *filtro* contro la diffusione libera nel tessuto di particolari sostanze, quali batteri e agenti infettanti. Nonostante questi siano ruoli fisiologici comuni dell'ialuronato negli organismi adulti, esso funziona inoltre come un segnale microambientale che co-regola il comportamento cellulare durante lo sviluppo embrionale, i processi di guarigione delle ferite, l'infiammazione e lo sviluppo dei tumori.

Proteoglicani

Fatta eccezione per l'acido ialuronico, tutti i glicosaminoglicani sono legati covalentemente a proteine per formare proteoglicani presenti nella maggior parte delle cellule animali. I proteoglicani per definizione hanno come catene glucidiche laterali, i glicosaminoglicani. La proteina centrale di un proteoglicano è in genere una glicoproteina (le glicoproteine contengono dall'1% al 60% in peso i carboidrati) sotto forma di catene disaccaridi ramificate relativamente corte. L'Aggregano, che è il maggior componente delle cartilagini, ha una massa di circa $3 \cdot 10^6$ Dalton e possiede più di cento catene di glicosaminoglicani, circa uno ogni venti residui aminoacidi.

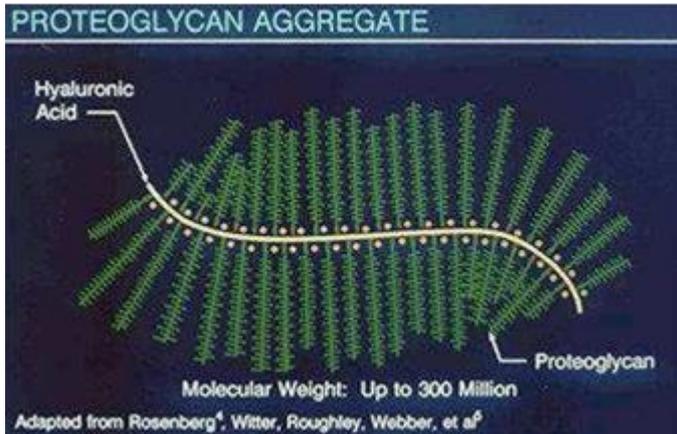


Figura 5 - Struttura dell'interazione tra proteoglicani e la molecola di acido ialuronico.

Distinguiamo due tipi di ECM:

- La *matrice interstiziale* dei tessuti connettivi: le molecole dell'ECM circondano le cellule riempiendo gli spazi interstiziali intercellulari e tendono a formare un lattice tridimensionale;
- La *membrana basale*: una struttura laminare specializzata della matrice extracellulare di spessore compreso tra 70 e 300 nm. Essa si organizza in un

piano, e le molecole sono deposte solo sulla superficie basale su cui si adagiano le cellule. Questa differente organizzazione è dovuta principalmente a differenze nel "assembling" delle molecole di collagene. Questa membrana di solito fa da interfaccia tra un tessuto connettivale e un tessuto non connettivale, tipicamente epiteli.

1.1.3 I principali recettori delle macromolecole dell'ECM: le integrine

Gran parte delle macromolecole dell'ECM può stabilire interazioni altamente funzionali con le cellule di un tessuto grazie ai recettori che queste esprimono. Tra questi, i più importanti sono le integrine, che hanno le fondamentali funzioni di (1) adesione della cellula alla ECM e (2) trasduzione del segnale dalla ECM alla cellula.

Le integrine sono proteine eterodimeriche transmembrinarie costituite da due subunità associate, indicate con le lettere greche α e β ; ogni subunità ha un grande dominio extracellulare in cui sono presenti i siti di legame per la ECM catione-dipendenti, un frammento transmembrana corto e un piccolo dominio intracellulare privo di attività catalitica. Prima del contatto con la ECM gli eterodimeri di integrina sono in una configurazione inattiva con il loro dominio extracellulare in una conformazione ripiegata ed i due domini citoplasmatici legati tra loro, con α che inibisce l'interazione di β con il citoscheletro di actina. Il legame del ligando al dominio globulare extracellulare di α e β induce dei cambiamenti conformazionali con la conseguente separazione dei domini citoplasmatici. Il legame delle integrine all'ECM provoca a livello citoplasmatico il reclutamento di proteine responsabili della formazione di piccole strutture adesive che prendono il nome di complessi di adesione cellula matrice (MACs). Questi complessi sono ulteriormente differenziati in *complessi focali* (MACs nascenti), *adesioni focali* e *fibrillari* (MACs maturi) e *podosomi*, specifici delle cellule ematopoietiche. I complessi focali sono strutture di adesione piccole e transitorie nella periferia della cellula e sono regolate dalle proteine Rac o Cdc42. In questi complessi le integrine non sono riunite in cluster e non si formano fibre da stress. In seguito all'attivazione della proteina RhoA ed alle forze di tensione il complesso focale si trasforma in adesione focale, una struttura più stabile e più grande. Affinchè i complessi focali maturino in adesioni focali è necessaria quindi l'attivazione della piccola GTPasi

della famiglia Rho. L'attivazione di Rho porta al reclutamento di ulteriori filamenti di actina ed di integrine verso il sito di contatto. Una cellula deve essere capace di rimodellare continuamente adesioni focali in contatti focali e viceversa per potere migrare. Il disassemblaggio delle adesioni focali viene promosso dalle proteine matricellulari (trombospondina, tenascina, SPARC).

Le integrine, quando legano i componenti dell'ECM, sono in grado inoltre di trasmettere segnali biochimici all'interno della cellula che le esprime. Recentemente è stato identificato un gran numero di mediatori dell'attivazione cellulare indotta dalle integrine: chinasi della famiglia Src (oncogene trasformante del virus del sarcoma di Rous) e della famiglia delle adesioni focali, il cui prototipo è FAK (chinasi delle adesioni focali); serino-treonino-chinasi, come la PKC (proteina-chinasi di tipo C) e le MAPK (proteine-chinasi attivate dai mitogeni); molecole adattatrici; proteine che legano il GTP (guanosina trisfosfato), tra cui quelle appartenenti alla famiglia Ras (oncogene trasformante associato al sarcoma di Ratto); la PLC γ (fosfolipasi C γ) e la PI3-K (fosfatidilinositolo-3-chinasi); fattori trascrizionali; le cicline A, D ed E e le loro chinasi Cdk (chinasi dipendenti dalle cicline); molecole anti- e proapoptotiche. La loro attivazione regola funzioni cellulari differenti, quali l'adesione, la migrazione, la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e l'espressione genica. Le integrine rappresentano pertanto i più importanti adattatori molecolari attraverso i quali l'ECM può modulare le funzioni cellulari.

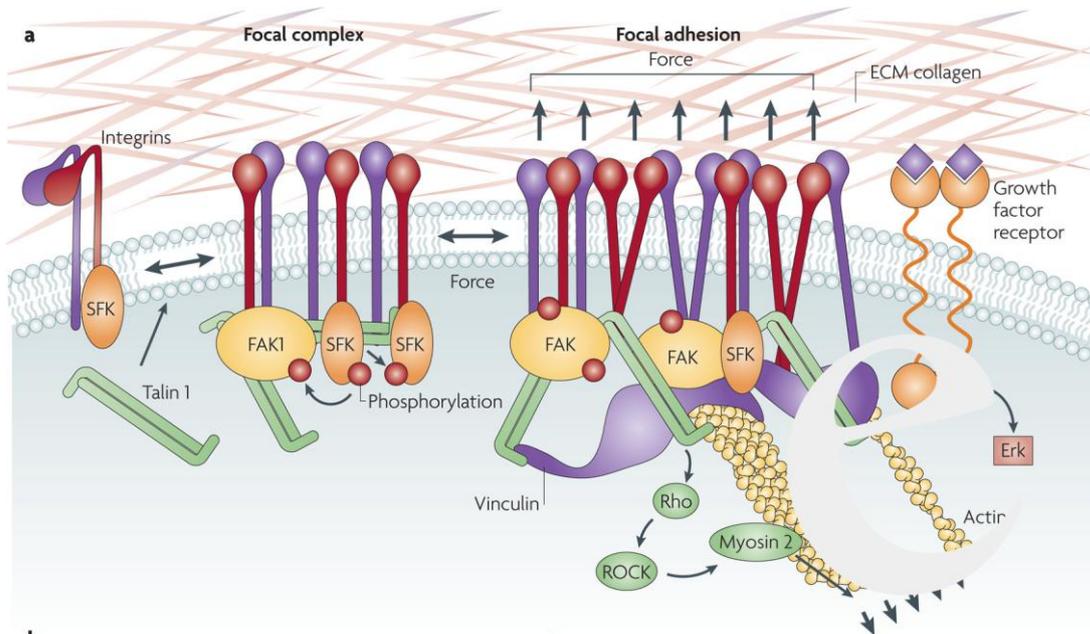


Figura 6 - Schematizzazione del “signalling” mediato dalle integrine e dei componenti coinvolti nelle adesioni focali.

1.2 Meccanismi di funzionamento della ECM

I componenti della ECM, con la loro notevole diversità strutturale e biochimica e la versatilità funzionale, conferiscono alle matrici uniche proprietà fisiche, biochimiche e biomeccaniche che sono essenziali per regolare il comportamento cellulare.

Ad esempio, le *proprietà fisiche* della ECM attribuiscono ad essa rigidità, porosità, insolubilità, disposizione spaziale e orientamento (o topografia), e altre caratteristiche fisiche che insieme concorrono a determinare il suo ruolo di impalcatura per sostenere l'architettura e l'integrità dei tessuti. La ECM può funzionare come sito di ancoraggio alla membrana basale (Figura 7, fase 1), essenziale per vari processi biologici, tra cui la divisione cellulare asimmetrica nella biologia delle cellule staminali e il mantenimento della polarità del tessuto, e dipendentemente dal contesto, può servire per bloccare o facilitare la migrazione cellulare (Figura 7, fasi 2- 3).

Al contrario, le *proprietà biochimiche* della ECM riguardano le sue capacità dirette ed indirette di segnalazione che permettono alle cellule di percepire e interagire con l'ambiente extracellulare utilizzando cascate di trasduzione del segnale che determinano

un cambiamento nel loro profilo di espressione genica e di conseguenza nel loro comportamento.

Sequestrando le molecole segnale, come per esempio i fattori di crescita, la ECM previene la loro diffusione altrimenti libera e agisce come un dissipatore di questi segnali, contribuendo così a definirne un gradiente di concentrazione (Figura 7, fase 4). Alcuni componenti della ECM, tra cui i proteoglicani eparan-solfato e i recettori CD44 dell'acido ialuronico, possono legarsi selettivamente a diversi fattori di crescita e funzionare come co-recettore (Figura 7, fase 5) o un presentatore di segnale (Figura 7, fase 6) e contribuire a determinare la direzione della comunicazione cellula-cellula.

Inoltre, l'ECM può anche avviare direttamente la segnalazione di eventi, in particolare funzionando come un precursore di frammenti biologicamente attivi di segnalazione, frammenti funzionali precedentemente processati da proteasi come le MMP (Figura 7, fase 7). Le Metalloproteinasi di Matrice (Matrix Metalloproteinases, MMP), conosciute anche come matrixine, infatti, sono una famiglia di enzimi proteolitici capaci di degradare vari componenti strutturali della matrice. Esse svolgono pertanto un ruolo fondamentale in diversi processi fisiologici e patologici, come l'embriogenesi, la cicatrizzazione, l'infiammazione, l'artrite e il cancro.

Un'area di interesse nella biologia della ECM è quella che studia come le sue *proprietà biomeccaniche*, tra cui l'elasticità della ECM (che varia da morbida, predisposta a modifiche a inflessibile e rigida), contribuiscono allo sviluppo fisiologico e alla progressione della malattia. Come si è visto, l'elasticità della ECM aiuta a determinare come una cellula sente e percepisce le forze esterne e, quindi, fornisce un importante segnale di input ambientale che determina la risposta della cellula. Infatti, il complesso di adesione focale, che consiste di integrine e di un multicomplesso di adattatori e proteine di segnalazione, può essere visto come un meccano-sensore che collega il citoscheletro di actomiosina con la ECM. Molti dei componenti di adesione focale, subiscono cambiamenti conformazionali che determinano conseguenze funzionali nella risposta alla forza applicata. Insieme a citoscheletro e matrici nucleari, involucro nucleare, e cromatina, costituiscono un sofisticato macchinario meccanosensore che determina come le cellule reagiscono alle forze trasmesse dalla ECM. È interessante notare, tuttavia, che variazioni di forza meccanica possono essere convertite in differenze nelle attività di segnalazione del TGF- β nel tendine del topo, suggerendo che vie di segnalazione convenzionali possono essere utilizzate per interpretare le proprietà

biomeccaniche della ECM. Ne consegue che proprietà biomeccaniche della ECM regolano vari comportamenti cellulari essenziali, compresa la determinazione del destino cellulare, il differenziamento e la funzione del tessuto (Figura 7, fase 8).

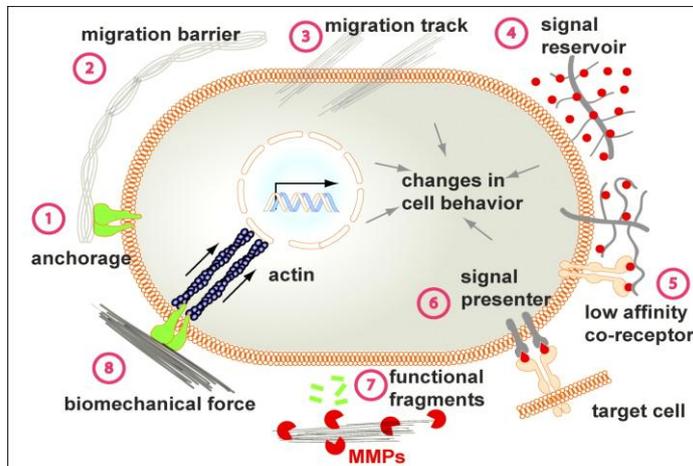


Figure 7 - Schematizzazione delle funzioni della ECM.

Le diverse proprietà della ECM non sono indipendenti tra loro, ma si influenzano. Pertanto, quando l'ECM aumenta di rigidità, come, per esempio, in condizioni patologiche, le sue proprietà biomeccaniche cambiano, e le cellule rispondono esercitando marcatamente differenti tipi di forza. Inoltre, l'irrigidimento della matrice determina un cambiamento anche delle altre proprietà fisiche della ECM e, di conseguenza, modifica direttamente la capacità cellulare di migrare: ad esempio, fasci linearizzati di collagene reticolato, che sono piuttosto rigidi, potenziano la migrazione cellulare, mentre una fitta rete di fibre a matrice reticolata rigida, impedisce la migrazione, a meno che metalloproteinasi della matrice vengano attivate contemporaneamente.

In secondo luogo, l'ECM è altamente dinamica, costantemente in fase di ristrutturazione in diversi tessuti in varie fasi embrionali e postnatali. Dinamiche ECM possono derivare da variazioni dell'importo assoluto o composizione della ECM, per esempio come risultato di sintesi alterata o degradazione di uno o più componenti della ECM. In alternativa, le dinamiche ECM possono non mostrare variazioni nella composizione dei suoi componenti, ma invece coinvolgere solo la trasformazione dei suoi componenti, in strutture organizzate nello spazio, grazie a legami covalenti e non covalenti.

Infine, una delle caratteristiche più importanti di interazioni cellula-ECM è la reciprocità. Da un lato, le cellule costantemente creano, rompono, o altrimenti riorganizzano e riallineano componenti dell'ECM per modificarne una o più proprietà; d'altra parte, poiché la ECM regola il comportamento delle cellule, qualsiasi suo cambiamento, come risultato di attività cellulari, influenzerà a loro volta le cellule adiacenti e modificherà i loro comportamenti. Questo meccanismo di regolazione feedback tra le cellule e la ECM permette alle cellule e ai tessuti di adattarsi rapidamente all'ambiente.

1.3 Dinamiche ECM deregolate come segno distintivo del cancro

Dopo decenni di studi, concentrati quasi interamente sull'identificare il ruolo del tessuto epiteliale nello sviluppo e nella tumorigenesi, negli ultimi anni l'interesse scientifico è tornato a considerare lo stroma come un attore chiave di questi processi. Probabilmente, uno dei motivi di questo ritardo è dovuto alla complessa e altamente strutturata costituzione dello stroma. Dinamiche ECM anormali sono ben documentate in studi clinici di molte malattie e sono un segno distintivo del cancro. Per esempio, una produzione eccessiva di ECM o un suo ridotto movimento sono stati evidenziati nella fibrosi dei tessuti di molti organi. Un aumento della deposizione di vari tipi di collagene, tra cui il collagene di tipo I, II, III, V e IX, è stato riscontrato durante la formazione del tumore. Con l'avanzare dell'età, invece, si riduce la deposizione di collagene e si evidenzia un concomitante aumento dell'attività delle MMP. Inoltre, molti altri componenti dell'ECM e loro recettori, come eparan-solfato, proteoglicani e CD44, sono spesso sovrapprodotti nel cancro. Cambiamenti anormali nella quantità e nella composizione della ECM possono notevolmente alterare le proprietà biochimiche della ECM, potenziare gli effetti oncogeni di varie vie di segnalazione di fattori di crescita, e deregolare comportamenti cellulari durante la trasformazione maligna.

L'ECM associata al tessuto neoplastico mostra, oltre a cambiamenti nelle proprietà biochimiche, anche modifiche all'architettura e ad altre proprietà fisiche e biomeccaniche, fondamentalmente diverse da quelle dello stroma del tessuto normale. Ad esempio, lo stroma tumorale è tipicamente più rigido dello stroma normale; nel caso

di cancro al seno, il tessuto malato può essere 10 volte più rigido del seno normale, caratteristica che facilita l'individuazione di una massa neoplastica alla palpazione.

E' stato messo in luce un legame fra la rigidità dei tessuti e la formazione dei tumori, evidenziando come le forze meccaniche possano regolare il comportamento cellulare, influenzando i segnali molecolari che governano la diffusione delle cellule cancerose. Ricercatori hanno esaminato cellule cancerose in sviluppo all'interno di un sistema tridimensionale a base di gel, nel quale la rigidità poteva essere controllata accuratamente. In questo studio è stato riportato che, anche un leggero aumento di durezza della matrice extracellulare circostante, perturbava l'architettura dei tessuti e ne favoriva la crescita, promuovendo l'adesione focale e l'attivazione dei fattori di crescita. Mentre, un calo di attività Rho o ERK (enzimi costituenti fattori oncogeni, in quanto frequentemente coinvolti nel processo di metastatizzazione) nelle cellule cancerose, è stato associato a un susseguente declino di adesione focale e all'inversione delle modifiche morfologiche.



Figura 8 – Schema che descrive come la tumorigenesi e la progressione stromale mesenchimale siano due processi che si influenzano reciprocamente. Le immagini rappresentano una ricostruzione confocale 3D della ECM derivante da fibroblasti (in marrone) e dei nuclei cellulari (in verde): l'architettura è disorganizzata nel tessuto sano a sinistra e organizzata in pattern nel tessuto tumorale a destra, che risulta anche più rigido.

Capitolo 2

ECM: nicchia dinamica nella progressione del cancro

2.1 Introduzione

La progressione del cancro è spesso collettivamente concepita e raffigurata come un "viaggio" in cui una cellula si trasforma nel tempo da un fenotipo benigno in un'entità invasiva o metastatica, passando per stadi intermedi.

Negli ultimi due decenni si è cominciato a capire che una parte importante di questo percorso comporta cambiamenti del fenotipo meccanico della cellula e del tessuto, che si traducono sia in variazioni intrinseche della struttura e della meccanica delle cellule e dei tessuti, sia in cambiamenti nelle proprietà biofisiche del microambiente in cui le cellule sono immerse, come la meccanica, la geometria e la topologia della matrice extracellulare (ECM). L'interazione tra le proprietà biofisiche della cellula e dell'ECM stabilisce una dinamica e una meccanica reciprocità, nel quale l'abilità della cellula di esercitare sollecitazioni contrattili contro l'ambiente extracellulare bilancia la resistenza elastica della ECM a tale deformazione (cioè la sua rigidità o elasticità). È ormai chiaro che questo equilibrio di forze è in grado di regolare sorprendentemente una vasta gamma di proprietà cellulari, fondamentali nel processo di tumorigenesi, come la struttura, la motilità, la proliferazione e la differenziazione. La risposta delle cellule agli stimoli biofisici provenienti dalla ECM, quali quelli meccanici, dipende dalla gerarchia dei sistemi mecanochimici interconnessi, che includono recettori di adesione (ad esempio, le integrine), adesioni focali intracellulari, reti citoscheletro e motori molecolari.

La meccanica e la dinamica integrata di questi sistemi permettono alle cellule di controllare la loro forma, generare forza, e rimodellare la ECM. Queste reti strutturali

interagiscono anche in modi molto specifici con vie di trasduzione del segnale canoniche nel determinare il comportamento delle cellule. Ad esempio, le cellule epiteliali mammarie (MECS) formano strutture acinose normali, quando coltivate in ECM con rigidità fisiologica del tessuto sano, ma mostrano le caratteristiche strutturali e trascrizionali di un tumore in via di sviluppo, quando coltivate in ECM di una rigidità che più si avvicina ad uno stroma tumorale. L'elaborazione di questi segnali richiede il raggruppamento (clustering) dell'integrina, l'attivazione dell'ERK, il rimodellamento del citoscheletro e la contrattilità Rho GTPasi -dipendente, al fine di illustrare le connessioni funzionali tra segnalazione del fattore di crescita, segnalazione mecano-transduttive, ed il citoscheletro della cellula, aderenza, e macchinario contrattile. In altre parole, i segnali di micromeccanica di controllo strutturale provenienti dalla ECM e dalla cellula sono intimamente connessi e si interfacciano con le reti di trasduzione del segnale nella determinazione dei comportamenti rilevanti per la trasformazione neoplastica, l'invasione e la formazione di metastasi.

2.2 Viaggio di forza della cellula tumorale

2.2.1 Morfologia e omeostasi dei tessuti

Persino in tessuti che sono apparentemente statici, le cellule costantemente incontrano una varietà di forze meccaniche e allo stesso tempo esercitano attivamente una forza meccanica sul loro ambiente circostante. Queste forze possono provenire da cellule vicine o dalla ECM e vengono canalizzate attraverso specifici recettori di adesione, nonché attraverso carichi meccanici applicati non specificamente a tutto il tessuto, come le forze interstiziali e i flussi di taglio. Infatti, le cellule interrogano continuamente il loro microambiente meccanico ed integrano questi segnali di forza esercitando una reciproca forza contrattile compensativa derivante dalla azione coordinata di ristrutturazione del citoscheletro e di attività di proteine motore. A livello tissutale queste forze contrattili, derivati dalle cellule, sono essenziali per scolpire l'organismo durante l'embriogenesi e lo sviluppo degli organi. Alterazioni nelle interazioni meccaniche tra le cellule e il loro ambiente contribuiscono alla displasia di tessuti associata con l'iniziazione del tumore. Ad esempio, le cellule epiteliali trasformate

esprimono differenti profili di filamenti intermedi ed ampie architetture del citoscheletro rispetto alle loro controparti normali. In presenza di substrati morbidi che sopprimono la diffusione e la proliferazione delle cellule normali, le cellule trasformate proliferano ampiamente ed esercitano anomale ed elevate forze trazionali, che a loro volta possono disturbare l'integrità delle giunzioni cellula-cellula, compromettere la polarità del tessuto, promuovere la sopravvivenza ancoraggio-indipendente e migliorare l'invasione. Questa maggiore contrattilità riflette l'aumentata espressione e l'iperattività di Rho GTPasi e dei suoi effettori, nonché gli elevati livelli di fattore di crescita indotti dall'attività della ERK. La manipolazione della rigidità della ECM e della contrattilità della cellula che dipende dalla rigidità, è sufficiente per indurre trasformazione in cellule in coltura. Ad esempio, come discusso in precedenza, la coltivazione di cellule MEC in gel rappresentativi di una ECM ad alta rigidità, altera l'espressione dell'integrina, aumenta l'adesione focale, interrompe l'architettura acinosa, e promuove l'invasione conseguente ad un aumento della ontrattilità dipendente da Rho e da ERK (Figura 9).

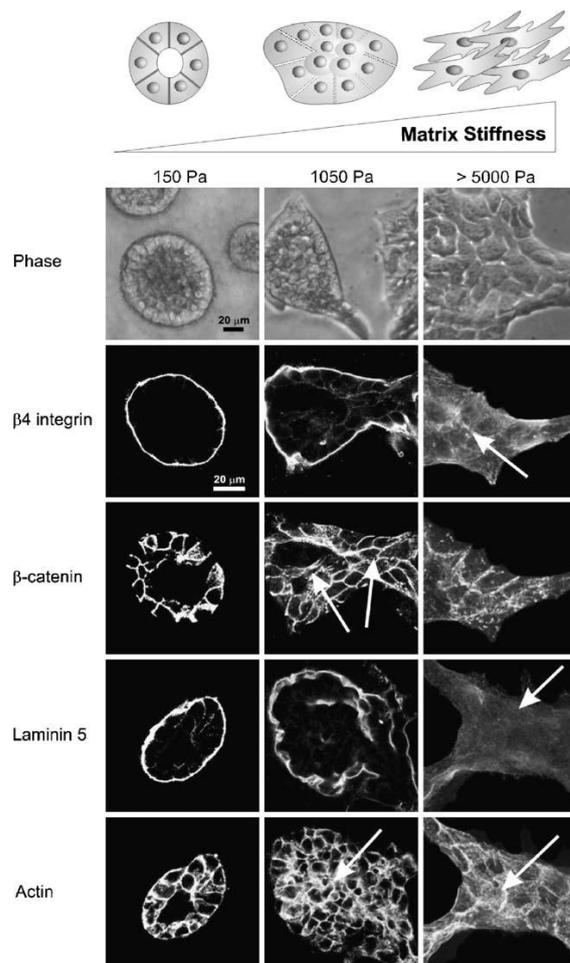


Figura 9 – Effetto della rigidità dell'ECM sulla morfogenesi epiteliale mammaria. Immagini in contrasto di fase o in immunofluorescenza di cellule epiteliali mammarie (MEC) coltivate su substrati ECM caratterizzati da diversa rigidità (Modulo di Young di 150 Pa (colonna di sinistra), 1050 Pa (colonna centrale) e >5000 Pa (colonna di destra)).

2.2.2 Il distacco e l'invasione

Come una singola cella si libera da un tumore e comincia a invadere il parenchima circostante, meccanismi di generazione di forza supplementari cominciano a regolarne il comportamento. Questo fenomeno è meglio illustrato dai recenti lavori sul ruolo dei processi di protrusione conosciuti come "invadopodi" nel facilitare la digestione iniziale e l'invasione della ECM. Gli invadopodi sono sporgenze nella membrana cellulare di una cellula tumorale invasiva che si estendono nella matrice extracellulare. La formazione di invadopodi ha origine con l'assemblaggio di strutture di base di actina, seguito dall'accumulo di metalloproteinasi della matrice per la degradazione della ECM. Gli invadopodi si distinguono dalla migrazione bidimensionale per la loro capacità di concentrare spazialmente la secrezione proteolitica, facilitando il rimodellamento della matrice esistente, la secrezione di nuova matrice e, infine, la creazione di "tracce" che supportano la successiva invasione.

Questo processo è stato recentemente catturato in tempo reale attraverso l'elegante imaging dinamico multimodale condotto da Wolf, Friedl, e colleghi. Questi autori hanno potuto osservare come le cellule proteoliticamente degradano e riorganizzare fibrille locali di ECM mentre migrano attraverso gel di collagene tridimensionale. È importante sottolineare che l'inibizione dell'attività delle MMP ad ampio spettro farmacologico, costringe le cellule a "spremersi" attraverso le fibre di collagene esistenti (analogo al moto ameboide), con un risultante comportamento migratorio accompagnato da drammatiche deformazioni cellulari e nucleari.

Per definizione, tutti questi processi di estensione - invadopodi, formazione di matrice pista e deformazione cellulare e nucleare - richiedono significativi e dinamici cambiamenti locali dell'organizzazione del citoscheletro e della meccanica cellulare. La quantificazione di questi cambiamenti e la delucidazione dei meccanismi molecolari alla loro base rappresentano una sfida costante in questo settore di studio emergente, ma permettono anche di chiarire i meccanismi di invasione e metastatizzazione e di identificare nuovi bersagli terapeutici.

Le alterazioni nella struttura delle cellule tumorali e la meccanica durante il distacco e l'invasione sono accompagnati da cambiamenti reciproci nella topologia della ECM (organizzazione) e nelle proprietà dei materiali (meccanica). Come descritto in precedenza, la contrattilità cellulare può promuovere direttamente rimodellamento

microscala della ECM, che può creare fasci di matrice o tracce di motilità che potrebbero facilitare la migrazione tridimensionale delle cellule. Inoltre, la formazione di tumori in vivo è accompagnato da un irrigidimento progressivo del tessuto e ECM: questi aumenti di rigidità della ECM a loro volta permettono alle cellule di generare maggiori forze trazionali sul loro ambiente, che migliora così la loro crescita, sopravvivenza, e invasione promuovendo la maturazione dell'adesione focale e segnalando la contrattilità attraverso l'actomiosina.

Per testare l'influenza della rigidità della ECM sulla formazione di invadopodi sono state coltivate cellule tumorali su substrati di gel di poliacrilammide (PA) caratterizzati da diversa rigidità: le cellule coltivate su gel PA più rigidi producevano un quantitativo maggiore di invadopodia e degradavano maggiormente la ECM, rispetto alle cellule coltivate in gel PA meno rigido. Questa evidenza sperimentale suggerisce che la rigidità della ECM promuova la formazione di invadopodi.

Come descritto in precedenza, l'elevata contrattilità delle cellule tumorali e i fibroblasti stromali a loro associati inducono anche il rimodellamento tensione-dipendente della matrice che promuove il riorientamento lineare di fibrille di collagene che circondano la parte anteriore invasiva del tumore.

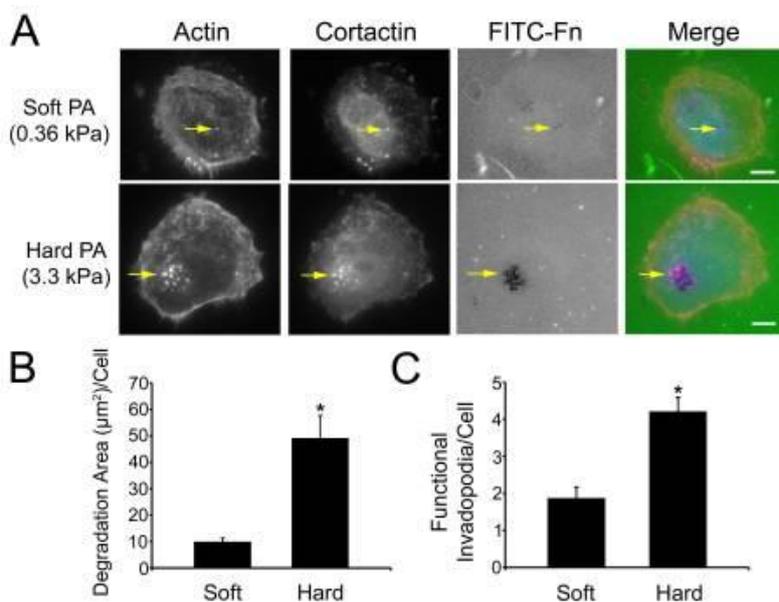


Figura 10 - **A.** Immagini dicellule coltivate in gel di poliacrilamide (PA) a diversa rigidità (kPa). Le frecce indicano gli invadopodi. **B** - **C.** Quantificazione degli invadopodi e della loro degradazione.

2.2.3 Forze interstiziali e forze di taglio

Oltre ai problemi microscala molecolarmente specifici descritti in precedenza, una componente importante della resistenza di una cellula tumorale comporta la sua capacità di resistere alle sollecitazioni meccaniche non specifiche che derivano dalla crescita del tumore stesso, dall'omeostasi tissutale, e dal trasporto nel sistema linfatico e nel circolo ematico. Anche prima dell'inizio dei processi di invasione e metastatizzazione, l'espansione del tumore comprime la ECM circostante, che a sua volta comprime il flusso del sistema vascolare, del sistema linfatico e dello spazio interstiziale. Quando queste tensioni di compressione si manifestano nel tessuto simile al basale, come pancreas e cervello, si osserva che l'organizzazione della membrana basale viene compromessa e la combinazione con la forza di compressione sporgente verso l'esterno, facilita l'invasione delle cellule tumorali nel parenchima. Queste forze compressive chiaramente anche contribuiscono direttamente alla presentazione clinica iniziale dei tumori, quali i sintomi di ipertensione endocranica che presentano i pazienti con glioblastoma multiforme, o le ostruzioni biliari che sono spesso il segno iniziale del cancro pancreatico. A livello istopatologico, queste sollecitazioni possono facilitare l'angiogenesi tumorale, aumentando l'espressione di VEGF, sia attraverso una sovra-regolazione diretta della secrezione di VEGF o indirettamente attraverso l'induzione di ipossia. Le forze di compressione possono anche ridurre lo spazio interstiziale che circonda le strutture duttali, che possono a loro volta concentrare fattori di crescita e citochine, facilitando quindi, la segnalazione autocrina e paracrina e promuovendo la crescita del tumore. I cambiamenti associati al tumore della pressione interstiziale e la sollecitazione di compressione possono rappresentare un ostacolo per i farmaci antitumorali al raggiungimento dei tumori solidi. Queste pressioni possono essere composte da un irrigidimento stromale indotto dal tumore, che costringe il tumore ad esercitare una tensione più alta di quella che sarebbe necessaria in tessuto normale per poter espandersi.

Ironia della sorte, mentre l'espansione del tumore è comunemente associata a una massiccia secrezione di MMP e digestione della matrice, l'ECM adiacente al tumore è spesso piuttosto densa e mostra maggiore deposizione, reticolazione e impacchettamento.

Se una cellula tumorale oltrepassa con successo i confini della sua sede primaria e arriva al sistema vascolare o sistema linfatico in rotta verso una metastasi, deve affrontare una nuova serie di forze meccaniche, in particolare quelle associate al flusso di fluido e le forze di taglio. Anche se il tumore primario viene asportato con successo, manipolazioni chirurgiche come irrigazione e aspirazione possono sottoporre le cellule tumorali a forze di taglio sostanziali o modelli alterati di flusso. Nelle cellule tumorali, l'esposizione alle forze di taglio può attivare vie di segnalazione specifiche che possono a loro volta indurre drammatica riorganizzazione del citoscheletro e delle molecole di adesione e in definitiva facilitare il rinforzo della struttura cellulare e il fissaggio alla parete vascolare. Recentemente, Basson et al. hanno dimostrato che le forze di taglio possono paradossalmente aumentare l'adesione *in vitro* a substrati di ECM a base di collagene attraverso un processo che implica l'attivazione di *Src* e il successivo assemblaggio del citoscheletro di actina e la formazione di adesioni focali. Allo stesso modo, Haier et al. hanno dimostrato che le forze di taglio possono migliorare la fosforilazione di FAK nelle cellule di carcinoma del colon, rafforzando in tal modo l'adesione all'ECM a base di collagene. In parallelo studi *in vivo* illustrano che la sovraespressione di FAK difettiva (?) diminuisce significativamente la capacità delle cellule tumorali di aderire alla vascolarizzazione del microcircolo epatico.

2.2.4 Diapedesi e metastasi distali

Una volta che una cellula tumorale circolante è sopravvissuta nel torrente circolatorio e ha aderito all'endotelio di un tessuto bersaglio, essa deve attraversare la barriera endoteliale per colonizzare quel tessuto. Come accade ai leucociti durante una risposta infiammatoria, anche le cellule tumorali aderenti vanno incontro a diapedesi, un processo mediante il quale estendono pseudopodia che penetrano fra le giunzioni cellula-cellula nell'endotelio. Questa attività richiede cambiamenti locali e dinamici nella meccanica della cellula neoplastica guidati dal rimodellamento del citoscheletro, e si accompagna a riarrangiamenti nel citoscheletro di actina delle cellule endoteliali, che dunque modificano il loro proprio fenotipo meccanico, sebbene i dettagli molecolari di questo processo complesso siano ancora poco chiari. Mentre la cellula tumorale si fa strada verso la membrana basale sottoendoteliale, questi cambiamenti reologici cellulari sono accompagnati da cambiamenti nell'espressione di molecole di adesione, che

determinano una transizione fenotipica dall'adesività cellula-cellula all'adesività cellula-ECM. I meccanismi alla base di questa opzione possono includere l'attivazione conformazionale delle integrine esistenti e l'espressione di combinazioni di subunità di integrine totalmente nuove. Recentemente, Mierke et al. hanno valutato la capacità di linee cellulari neoplastiche di transmigrare in un sistema di co-cultura endoteliale e hanno mostrato che la propensione a invadere di una linea cellulare è positivamente correlata all'espressione del recettore della chemochina CXCR2. In sintesi, le cellule tumorali resistono alla forza ed esercitano forza meccanica sul loro ambiente nel loro cammino di trasformazione. Questi processi richiedono cambiamenti profondi e altamente dinamici nelle proprietà meccaniche cellulari.

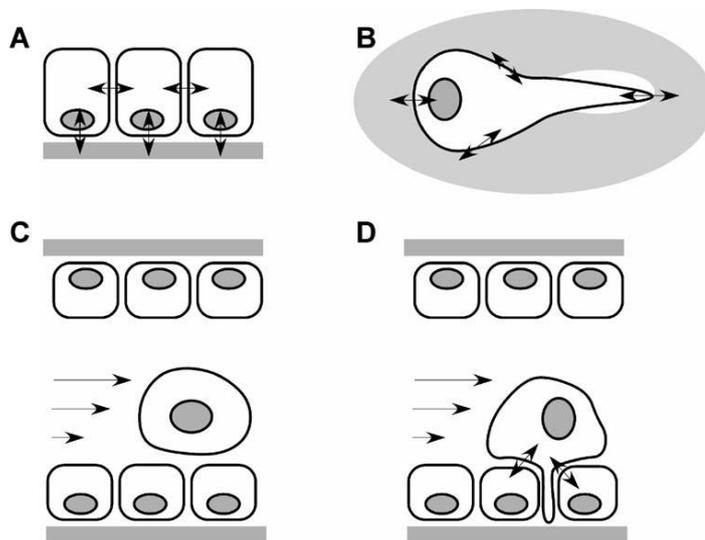


Figura 11 - Il viaggio di forza di una cellula tumorale. a) Nei tessuti normali, quali l'epitelio, le cellule sono soggette a forze meccaniche indotte dalle vicine e dall'ECM, identificate dalle interazioni recettore-ligando. Possono agire anche forze non specifiche applicate all'intero tessuto come la pressione interstiziale. b) Quando una cellula tumorale si stacca dalla massa tumorale primaria e invade il parenchima circostante, continua a scambiare forza meccanica con l'ambiente, comprese le forze trazionali associate alla locomozione e forze protrusione del bordo anteriore della cellula. c) Se una cellula tumorale sfugge dal suo tessuto primario e raggiunge il sistema vascolare, deve resistere a forze di taglio associate al flusso sanguigno. d) Affinché una cellula tumorale sfugga al sistema vascolare e metastatizzi in un tessuto distale, deve subire diapedesi attraverso la parete endoteliale, che introduce ulteriori interazioni meccaniche tra cellule tumorali e cellule endoteliali e precede una transizione da adesione cellula- cellula ad adesione cellula-ECM.

Recentemente, mediante un approccio *in situ* che ha utilizzato la microscopia a forza atomica (AFM) per indentazione, è stata misurata con precisione micrometrica la rigidità dei tessuti mammari durante la trasformazione neoplastica in un modello di topo transgenico. Per identificare le origini dell'irrigidimento del tessuto durante la tumorigenesi mammaria. Questo metodo è stato combinato con l'*imaging* a immunofluorescenza dal vivo. Il risultato ha dimostrato chiaramente come l'epitelio, il sistema vascolare, e la matrice extracellulare associati al tumore contribuiscano di concerto ai passaggi meccanici dell'evoluzione del tumore, coerentemente con l'idea che le cellule "sintonizzano" le loro proprietà meccaniche in risposta al loro microambiente meccanico. Lo studio *in situ* ha infatti permesso che le interazioni cellulari eterotipiche e omotipiche e le associazioni con la ECM fossero scrupolosamente mantenute. Queste condizioni conferiscono vincoli biochimici e biomeccanici critici sul comportamento cellulare.

L'esperimento di indentazione AFM ha infatti dimostrato che sebbene isolate cellule tumorali epiteliali mammarie siano più rigide delle cellule epiteliali mammarie normali, esse sono sostanzialmente più morbide quando misurate *ex vivo* rispetto a *in situ*.

È importante sottolineare che, mentre c'è stato un aumento complessivo consistente della rigidità delle cellule tumorali, sia anche stata notata una notevole eterogeneità biomeccanica all'interno dell'epitelio di ogni tumore, sollevando la possibilità che questa proprietà del tessuto canceroso potrebbe contribuire al comportamento eterogeneo di alcuni tipi di cancro. Le proprietà meccaniche eterogenee delle cellule tumorali all'interno di ogni massa tumorale potrebbero riflettere lo stato non uniforme del microambiente cellulare locale e extracellulare, includendo se le cellule tumorali siano adiacenti a una regione necrotica o prossimali a un vaso sanguigno o a una fibrilla collagene. In alternativa, questa eterogeneità potrebbe essere dovuta a proprietà intrinseche delle cellule, o a un'eterogeneità genetica inerente che migliora la contrattilità cellulare, o a proprietà meccaniche differenziali di cellule di origini distinte. Si è tentati di ipotizzare che l'eterogeneità biomeccanica cellulare del tumore potrebbe riflettere il comportamento di una sottopopolazione di cellule staminali tumorali o progenitrici, soprattutto data la recente evidenza che le cellule staminali sono più morbide e mostrano comportamenti biomeccanici differenziali rispetto alla loro progenie differenziata.

Con questo approccio è stato confermato anche che la ECM si irrigidisce progressivamente durante la progressione tumorale: l'irrigidimento costante durante la progressione tumorale suggerisce che le fibre di collagene orientate e ispessite lungo le quali le cellule tumorali della ghiandola mammaria sono state viste migrare siano infatti una fonte di irrigidimento dell'ECM.

Mentre l'epitelio mammario progredisce da una condizione normale a stato precanceroso, fino a uno stato di tumore maligno invasivo, si nota un progressivo aumento del modulo elastico di Young, in particolare all'interno della ECM adiacente e circostante ogni epitelio del tumore invasivo. Il modulo elastico di Young della ECM circostante dell'epitelio duttale è aumentato da una media di 1,1 kPa nel condotto normale, a 1,3 kPa nei tumori pre-maligni e 1,7 kPa nei tumori maligni.

Il collagene è la proteina più abbondante presente nell'ECM e contribuisce significativamente all'integrità biomeccanica dei tessuti. Durante la trasformazione neoplastica della ghiandola mammaria vi è un aumento significativo nella deposizione di collagene fibrillare. Tuttavia, sebbene il collagene fibrillare si irrigidisca con l'evoluzione della ghiandola dallo stato pre-maligno a quello invasivo, in questo passaggio non si quantifica un ulteriore aumento della deposizione di collagene. Questi risultati suggeriscono che altri fattori quali il *cross-linking*, la linearizzazione, la deposizione e l'aumentata espressione di altre proteine della ECM debbano contribuire ulteriormente all'irrigidimento della matrice nella transizione del tessuto verso la franca malignità.

È interessante notare che la degradazione proteica mediata da metalloproteinasie della matrice (MMP) sia stata implicata nella progressione del tumore e nella metastasi e una schiacciante quantità di prove sostiene la tesi che MMP siano assolutamente fondamentali per favorire la transizione di epitelii oncogenicamente trasformati in un fenotipo invasivo. Le MMP quindi potrebbero svolgere un ruolo nella progressione del tumore "rimodellando" e creando di fibrille di collagene rigide che favoriscono la migrazione delle cellule tumorali e l'invasione nella matrice interstiziale.

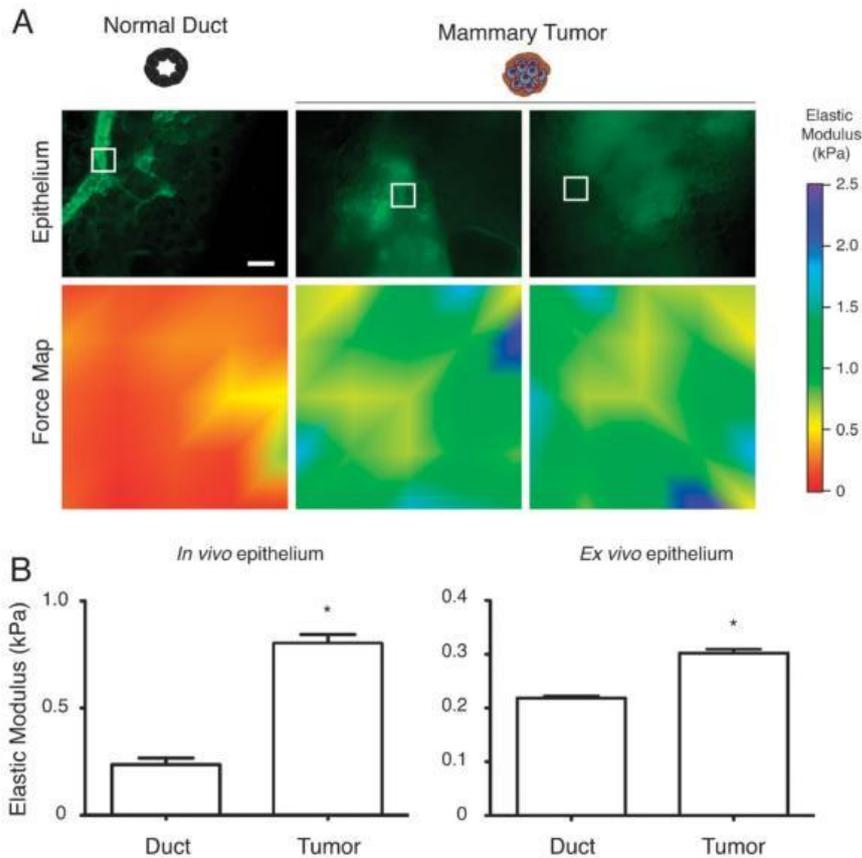


Figura 12 - La caratterizzazione biomeccanica *in situ* rivela irrigidimento meccanico ed eterogeneità dell'epitelio tumorale. (A) Immagini in microscopia a fluorescenza che mostrano l'epitelio della ghiandola mammaria (verde) marcata nel topo transgenico ACTB-ECFP. Le indentazioni AFM sono state eseguite in aree $90 \times 90 \mu\text{m}$ (quadrati bianchi) e le misure di forza ottenute all'interno di questa area sono rappresentate come una mappa di calore. Scala = $100 \mu\text{m}$. (B) Istogramma che rappresenta il modulo elastico di Young ottenuto da indentazioni AFM dell'epitelio *in situ* (sinistra) e *ex vivo* (destra). I grafici rappresentano la media delle misure ottenute da almeno 8 topi. Ogni mappa di forza è costruita da 36 indentazioni.

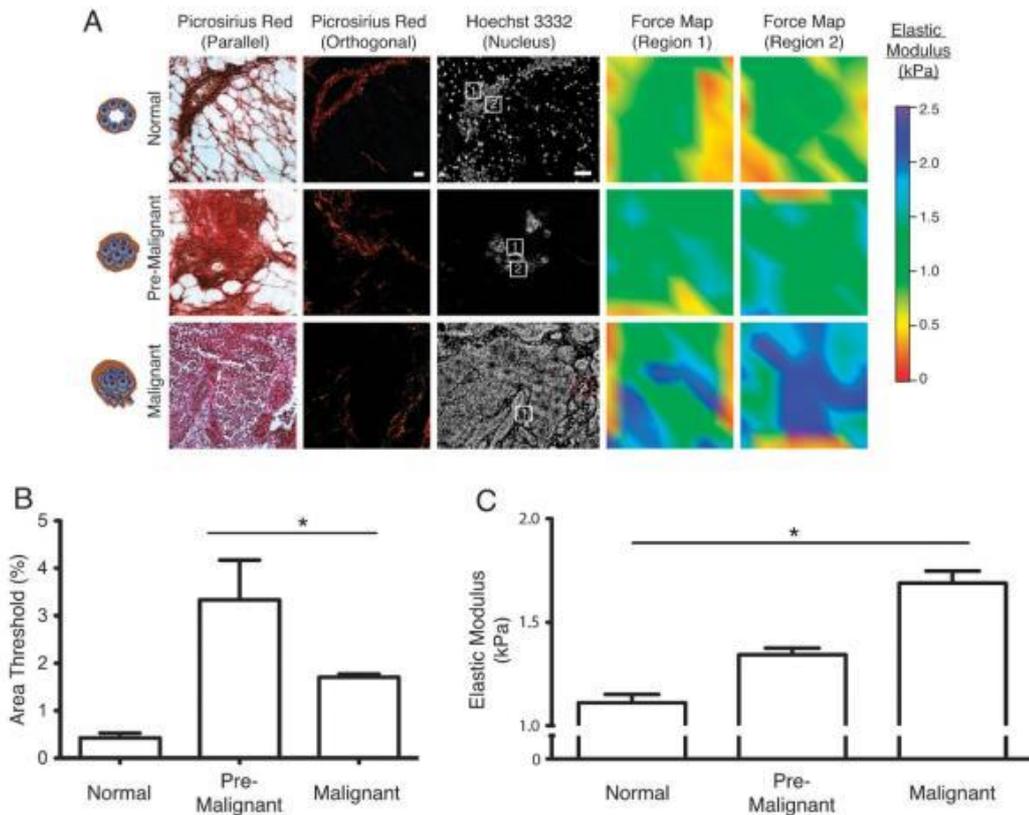


Figura 13 – La caratterizzazione biomeccanica *in situ* rivela il progressivo irrigidimento ECM durante la progressione tumorale. (A) Microscopia con picrosirius red vista sotto filtri polarizzatori paralleli o ortogonali presi da sezioni crioconservate della ghiandola mammaria rivelano il collagene fibrillare. I nuclei delle cellule sono stati identificati dalla colorazione con Hoechst 3332. Indentazioni AFM sono state effettuate in aree $90 \times 90 \mu\text{m}$ (quadrati bianchi) corrispondenti a ECM adiacente all'epitelio e le misure di forza ottenute in quest'area sono rappresentate come una mappa di calore. Scala = $100 \mu\text{m}$. (B) Istogramma che rappresenta la quantificazione della deposizione di collagene fibrillare nei tessuti che circondano l'epitelio mammario come % di area. (C) Istogramma che rappresenta il modulo elastico di Young del collagene fibrillare adiacente all'epitelio. I grafici rappresentano la media delle misure ottenute da almeno 7 topi. Ogni mappa di forza è costruita da 100 indentazioni.

2.3 Caratterizzare il fenotipo meccanico

2.3.1 Tipi di forze sperimentate da una cellula

Per misurare le proprietà meccaniche cellulari è necessario prima definire alcuni termini. I normali processi fisiologici normali espongono le cellule a una varietà di stimoli meccanici compresi pressione idrostatica, forze di taglio, forze di compressione e trazione. Le immagini nella figura raffigurano il bilancio delle forze una volta raggiunto l'equilibrio in seguito all'applicazione di forze meccanica. La terza legge di Newton afferma che per ogni azione corrisponde una reazione uguale e contraria e, seguendo questa legge, le cellule *in vivo* rispondono ad alterazioni nelle proprietà meccaniche della loro matrice circostante adattando la propria tensione intracellulare attraverso la rete del citoscheletro. Per contro, le variazioni di tensione nella cellula provocheranno alterazioni nell'organizzazione della matrice extracellulare (ECM), modificando le sue proprietà meccaniche.

La tensione meccanica (*stress*) è la forza applicata per unità di superficie di un oggetto (p. es. una cellula) ed è espressa in unità di forza/superficie (p. es. N/m^2 o Pascal (Pa)); lo *strain* è la deformazione dell'oggetto normalizzata sulla sua dimensione iniziale ed è una quantità adimensionale. Il modulo di Young (noto anche come il modulo elastico o elasticità (E), è una misura della deformabilità del materiale ed è rappresentato dallo *stress* diviso per lo *strain*: maggiore è il modulo di Young, più rigido è il materiale. L'elasticità descrive le proprietà meccaniche associate alla capacità di un materiale di immagazzinare energia meccanica internamente ed è quindi indipendente dalla velocità di deformazione.

Essendo lo strain adimensionale, il modulo di Young ha le stesse unità dello stress p. es. N/m^2 o Pascal (Pa)). Il modulo di Young offre un modo per quantificare le differenze meccaniche tra i tessuti, e in effetti le elasticità di massa misurate nei tessuti umani abbraccia un arco di circa cinque ordini di grandezza, p. es. grasso (17 Pa) , ghiandola mammaria (160 Pa) , cervello (260-490 Pa) , fegato (640 Pa) , rene (2,5 kPa) , muscolo scheletrico (50 kPa) , cartilagine (950 kPa).

Molti materiali biologici, comprese le cellule viventi, sono in grado di immagazzinare e dissipare energia meccanica applicata attraverso interazioni di attrito interne, e lo fanno in modo che dipende fortemente dalla velocità di deformazione. Per questo motivo,

quando si misurano le proprietà meccaniche di questi materiali, è fondamentale catturare sia le proprietà elastiche o di "immagazzinamento" sia le proprietà viscosi o di "perdita". I tessuti biologici molli possono essere descritti come materiali viscoelastici: un fluido viscoso resiste al flusso di taglio e alla deformazione linearmente con il tempo sotto stress. Un solido elastico subisce una deformazione sotto sforzo e rapidamente ritorna al suo stato originale.

La risposta globale viscosa ed elastica di un materiale alla deformazione meccanica è collettivamente riferita come la sua "reologia".

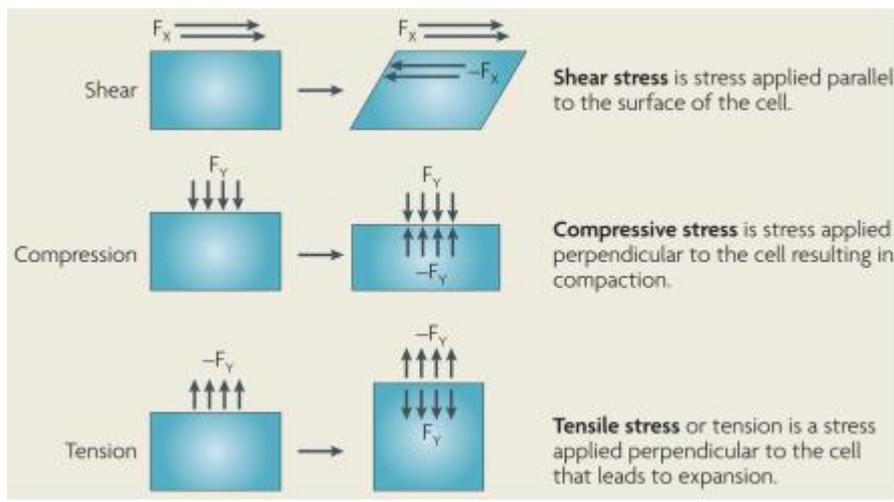


Figura 14 – Tipologie di forze applicate alla superficie delle cellule (sforzo di taglio, di compressione e di trazione).

2.3.2 Misura della reologia in culture cellulari in due dimensioni

Negli ultimi dieci anni, una sofisticata suite di tecnologie è stata sviluppata con l'obiettivo primario di quantificare le proprietà viscoelastiche delle cellule in coltura.

Microscopia a forza atomica

In microscopia a forza atomica (AFM), si misura la forza di interazione tra una superficie del campione, p. es. una cellula vivente, e una sonda microscala ("punta") associata a un cantilever assomigliante a una molla. L'incontro tra la punta e il campione

crea una forza che devia il cantilever, che a sua volta può essere otticamente tracciato riconvertendo lo spostamento in un valore della forza di interazione, se la costante elastica del cantilever è nota. Poiché il contrasto AFM proviene interamente dalla forza di interazione tra punta e campione, si richiede tipicamente nessuna fissazione o colorazione delle colture cellulari. In questi termini, il metodo è perfettamente adatto per catturare processi dinamici in sistemi viventi. Si possono acquisire due tipi di informazioni dalla interazione punta-campione con l'AFM: immagini topografiche e misure di forza. Nella prima misurazione la superficie di un campione viene analizzata a forza costante, e i movimenti di compensazione della fase necessaria per mantenere la forza costante come i cambiamenti nella topografia del campione possono essere utilizzati per ricostruire un'immagine. Nel secondo approccio, il campione è verticalmente indentato dalla punta a una posizione fissa, e la resistenza del campione a quella deformazione può essere analizzata per estrarre le proprietà viscoelastiche del materiale. La capacità di misurazione della forza di AFM è stata utilizzata con successo per misurare quantitativamente le proprietà relative alla meccanica cellulare sia di cellule intere, sia di singole molecole. Nel settore della meccanica di singole molecole, l'AFM è stata utilizzata per misurare sia lo svolgimento forza-dipendente delle proteine della ECM sia quello delle proteine di adesione cellula-ECM, nel tentativo di capire come questi sistemi realizzino le conversioni mecano-chimiche. L'AFM ha anche dimostrato un enorme valore per quantificare la reologia di indentazione delle cellule viventi, comprese l'elasticità cellulare, mappe spaziali di elasticità attraverso la superficie delle cellule, e la trasduzione di forze di compressione locali in segnali biochimici. Una delle applicazioni più recenti innovative di dell'AFM alla meccanica cellulare è la misurazione delle forze protrusive generate dalla crescita di reti di actina, come quelli trovati in invadopodia e pseudopodia. Sorprendentemente, questi studi dimostrano che la velocità di crescita dipende dalla storia di carico della rete e non solo dal carico istantaneo. Questi dati suggeriscono quindi che queste reti di citoscheletro probabilmente si rimodellano per adattarsi ai carichi applicati (p. es. con l'assunzione di filamenti di actina aggiuntivi), e che questi eventi di rimodellamento vengono progressivamente registrati nell'evoluzione strutturale della rete. Un approccio simile è stato utilizzato per misurare le proprietà viscoelastiche oscillatorie di queste reti in crescita.

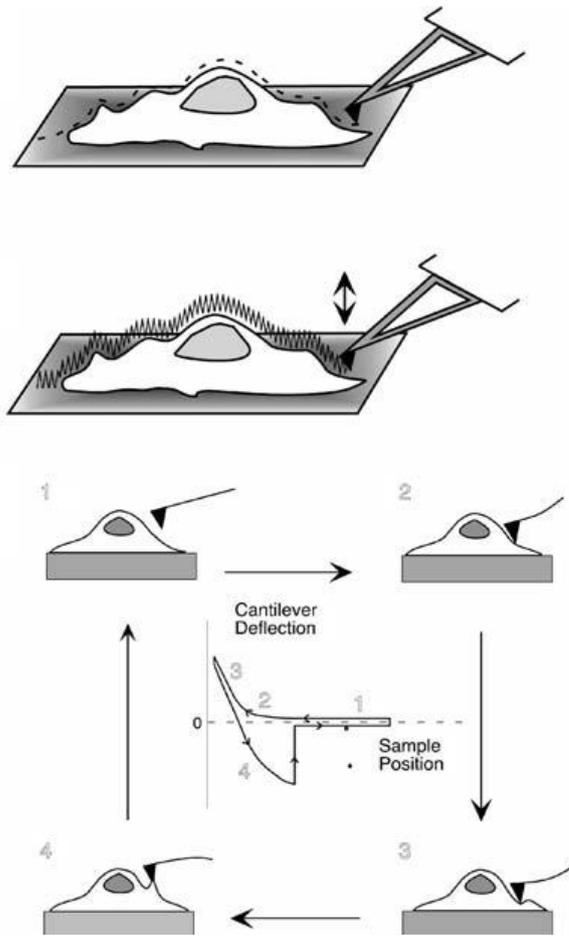


Figura 15 – Rappresentazione schematica del funzionamento della tecnica AFM finalizzata alla rilevazione di immagini topografiche di cellule viventi.

Ablazione laser subcellulare

Anche se l'AFM ha dato molto panoramica alle cellulari proprietà reologiche rilevanti per l'invasione delle cellule tumorali e metastasi, soffre di due limiti importanti. In primo luogo, può sondare solo la superficie esterna di una cellula vivente, offrendo così accesso limitato alle proprietà meccaniche delle strutture interne. In secondo luogo, le misurazioni AFM rappresentano il contributo collettivo di molti filamenti del citoscheletro e proteine motrici e non consentono la dissezione del contributo di singoli elementi strutturali nelle regioni microscala localizzate all'interno della cellula. Come descritto in precedenza, la delucidazione di specifiche strutture del citoscheletro in

luoghi e tempi specifici nella cellula (ad esempio, fibre di stress, fasci di actina filopodiali) sono suscettibili di essere critici, come i viaggi verso cellulari invasione e metastasi. L'Ablazione laser subcellulare (SLA) è emerso come un metodo complementare che è capace di superare entrambi i limiti. SLA utilizza un fascio laser strettamente focalizzato per irradiare e vaporizzare nano - strutture microscala nelle cellule viventi. Su irradiazione, il materiale al fuoco del laser subisce l'assorbimento multifotonico non lineare, con conseguente rottura ottica e distruzione materiale. È importante sottolineare che, se l'energia di impulso, ampiezza di impulso, frequenza di ripetizione sono scelti correttamente, strutture in cellule viventi possono essere selettivamente incisi con precisione sub -micrometrica senza compromettere la membrana plasmatica o uccidere la cellula. Nel contesto della comprensione della segnalazione biofisica tra cellule endoteliali dei capillari e la ECM nell'angiogenesi tumorale, SLA è stato impiegato per sondare le proprietà micromeccaniche di fasci di fibre di actomiosina sotto sollecitazioni (stress fibers), che sono le strutture contrattili che ancorano e consentono alle cellule endoteliali di esercitare forze trazionali contro la ECM. Queste forze trazionali svolgono un ruolo centrale nella forma, polarità e motilità delle cellule epiteliali e endoteliali sia in vitro che in vivo. Questi studi mostrano che fibre stress recise ritraggono in parallelo con l'asse della fibra, fornendo elementi di prova che queste strutture portano carichi di trazione e che la cinetica di retrazione quantitativa è coerente con quella di un cavo viscoelastico. Forse il risultato più sorprendente emergente da questo studio è che l'accoppiamento tra una fibra e l'architettura del citoscheletro e la forma del resto della cellula dipendono fortemente dalla rigidità della ECM su cui le cellule sono coltivate. Per cellule coltivate su substrati rigidi con un'elasticità dell'ordine di 1 MPa - 1 GPa (es. vetro), tagliando una singola fibra stress, o anche più fibre parallele, non modifica sensibilmente la forma delle cellule. Viceversa, tagliando una fibra di stress in cellule coltivate su substrati relativamente morbidi (~ 4 kPa) a base di poliacrilammide produce un allungamento del 4-5 % della cellula lungo l'asse della fibra stress, nonché un assottigliamento e un'estensione delle strutture citoscheletriche di decine di micron dal sito di incisione. Studi paralleli con TFM rivelano che una singola fibra stress contribuisce alla deformazione della ECM attraverso quasi l'intera interfaccia cellula - ECM e deforma la ECM maggiormente vicino ai punti in cui l'elemento citoscheletrico inserisce nella adesione focale. Così, questi studi mostrano come SLA può essere usato per mostrare

collegamenti diretti tra strutture contrattili cellulare individuali micron scala e forze trazionali esercitate dalle cellule che sono distribuiti su centinaia di micron quadrati.

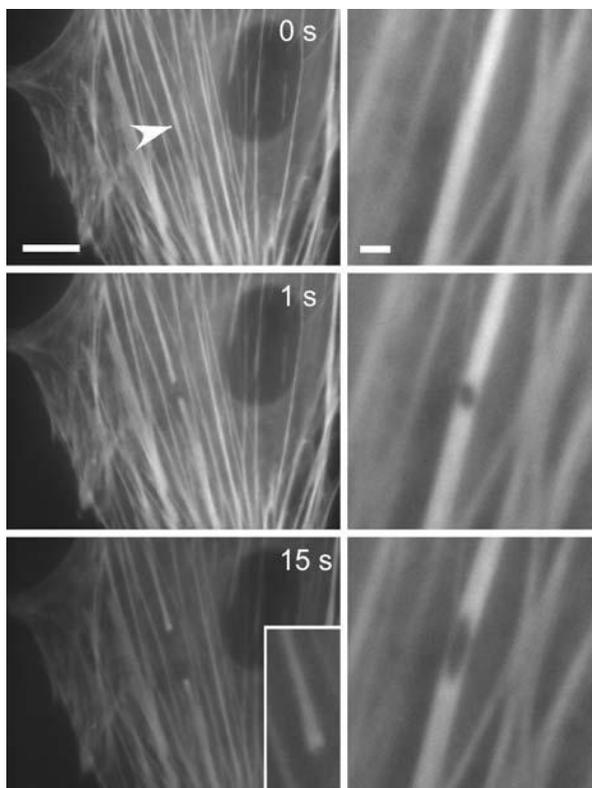


Figura 16 – Cellule epiteliali sottoposte a SLA. Una fibra di actomiosina indicata dalla freccia è stata recisa al fine di misurare le proprietà meccaniche di fibre stressate e il loro contributo alla forma cellulare.

2.3.3 Misura della meccanica cellulare in tre dimensioni

L'applicazione di AFM e SLA alla misurazione della meccanica cellulari è stata ampiamente limitata alle cellule in formati di coltura bidimensionali. Recentemente, tuttavia, entrambi i metodi sono stati estesi a sistemi più pertinenti fisiologicamente. Modelli di coltura cellulare tridimensionale offrono un netto vantaggio rispetto ai sistemi convenzionali bidimensionali perché ricapitolano sia l'architettura sia il comportamento fenotipico dei tessuti differenziati con fedeltà ragionevole. Sistemi modello tridimensionale usano cellule primarie o immortalate e idrogel naturali o sintetici (per esempio, collagene I, membrana basale ricostituita, peptidi sintetici e poliacrilammide). Molti di questi sistemi 3D sono concentrati sull'uso di collagene I [13], che costituisce uno dei principali componenti che sono alterati e sovra-espressi durante la tumorigenesi nel compartimento stromale mesenchimale. Con vari mezzi,

proteine e gel polisaccaridi possono essere manipolati per modificarne le proprietà meccaniche. Un aumento nella concentrazione di proteine totali di proteine gel, come collagene o fibrina, si traduce in un aumento della rigidità della rete polimerizzata. In questo caso, il modulo elastico è stato approssimato essere proporzionale al quadrato della concentrazione della proteina. Gel liberamente fluttuanti o rilassati presentano un ambiente tridimensionale più conforme alle cellule di gel ancorati o stressati e sono più sensibili alla generazione cellulare di forza. La glicazione mediante aggiunta di zuccheri riducenti quali glucosio o ribosio si traduce in una reticolazione non enzimatica delle fibre collagene che può irrigidire ulteriormente i gel collagene tridimensionali. Alterare la concentrazione di proteine per cambiare la rigidità del gel può introdurre ulteriori variabili nel sistema modello. L'uso di gel di poliacrilammide permette un controllo preciso della rigidità del gel mentre mantenendo la densità del ligando e il contenuto chimico e cambiando o il bis- acrilammide (un agente di reticolazione di poliacrilammide) o i componenti del gel di acrilammide può alterare la meccanica del gel. Pelham e Wang furono i pionieri del gel di poliacrilammide per la coltura di cellule meno di 10 anni fa, e numerosi ricercatori hanno usato questo sistema modello con molti tipi di cellule diverse per affrontare la questione della risposta cellulare alla forza della ECM. Questa tecnica si è dimostrata particolarmente adattabile, in modo tale che gel di diversa rigidità possono essere combinati per assomigliare alle proprietà meccaniche di, per esempio, membrana basale alveolare e stroma mammario.

Capitolo 3

Approfondimento: analisi della rigidità della matrice

Per esplorare gli effetti della rigidità della matrice extracellulare sul comportamento cellulare possono essere utilizzati varie metodologie. Sperimentalmente la rigidità dell'ECM può essere modulata con diversi approcci, attraverso la variazione della concentrazione o del valore di pH del collagene, oppure cambiando le condizioni al contorno, attraverso l'utilizzo di floating gel o gel meccanicamente vincolati, o le condizioni di polimerizzazione della ECM.

In questo capitolo è presentato un nuovo modello di modulazione della rigidità locale della ECM, che incorpora sfere magnetiche bio-coniugate con le fibre dell'ECM: l'applicazione di un campo magnetico esterno, che attrae le biglie, altera la resistenza alla deformazione delle fibre. Gli autori propongono un modello agli elementi finiti (FEM) per determinare la deformazione viscoelastica di questi campioni di ECM coniugati con le biglie magnetiche [Du Y, Herath SCB, Wang Q, Asada H, Chen]

3.1 Calcolo della pre-tensione nella ECM

Sfere magnetiche ricoperte di streptavidina sono incorporate in una soluzione di collagene, grazie ai legami che esse formano con le fibrille del collagene, prima della sua gelificazione. Per non impattare significativamente sulle proprietà fisiche della matrice, sono state scelte sfere di piccole dimensioni, circa 1 μm di raggio, e alla concentrazione media inferiore a 0.5mg/ml. Quando sottoposte ad un campo magnetico, le sfere generano nella ECM una pre-tensione che interagisce direttamente con le forze esterne esercitate sulla ECM, alterando così le sue caratteristiche di deformazione.

La ricostruzione di un modello agli elementi finiti che aggiunga una biglia alla volta nella matrice risulta troppo difficile, vista la grande quantità di sfere che occorrerebbe introdurre, si è scelto quindi di assumere che la distribuzione di sfere sia uniforme all'interno della matrice, in modo che la posizione delle sfere e il numero degli elementi contenenti le sfere siano noti. Date le dimensioni estremamente piccole degli elementi (circa 0.002 mm x 0.01 mm x 0.01 mm) si può assumere anche che un elemento contenga al massimo una sola sfera. La viscoelasticità della ECM è allora rappresentata dal Modello Solido Lineare Standard (SLSM) presentato in figura 17. Esso consiste di una molla in parallelo alla serie di un'altra molla e un dissipatore viscoelastico, cioè un dispositivo meccanico che ha il compito di smorzare il moto ad esso impresso trasformandolo in attrito viscoso, usato per costruire modelli di materiali che presentano comportamento viscoelastico.

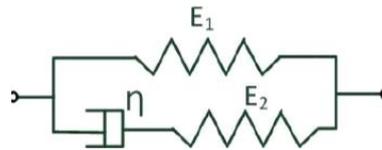


Figura 17 – Modello solido lineare standard.

Lo spostamento di ogni nodo dell'elemento solido finito al passo temporale t (u^t) viene determinato ricorsivamente dal suo spostamento al passo temporale precedente ($t - 1$) seguendo la formula:

$$u^t = (\Delta t / K_{viscous}^{-1}) * [(K_{elastic} * u^{t-1}) + ((K_{viscous} / \Delta t) * u^{t-1}) - F_{ext}^t]$$

dove $K_{elastic}$ e $K_{viscous}$ rappresentano le matrici contenenti la stiffness di ogni singolo elemento e F_{ext} tiene in considerazione le forze di trazione tra cellule, le forze del contorno e i carichi imposti dal campo magnetico.

La precedente equazione permette di ricavare la deformazione in una direzione: la deformazione nelle altre due direzioni derivano da questa in accordo con l'effetto Poisson.

La pre-tensione è stata simulata sia costruendo un modello FEM, sia utilizzando COMSOL Multiphysics, un software per la simulazione di problemi di meccanica strutturale, di fluidodinamica, di elettromagnetismo. Sono stati simulati due scenari tipici: uno che considera una ECM con soltanto una sfera incorporata e un secondo che

prevede la disposizione di due colonne allineate di sfere sottoposte a forze magnetiche opposte. La forza esercitata sulle sfere dovuta al campo magnetico esterno e il suo valore in Newton è stato precedentemente fissato. In figura 18 sono riportati i grafici che mostrano le pre-tensioni generate nella ECM: la linea rossa continua rappresenta il risultato del modello FEM, quella blu tratteggiata il risultato della simulazione con COMSOL. La figura 18 a) mostra che c'è una forte pre-tensione (deformazione massima della ECM) nell'area prossima alla sfera nella direzione della forza esercitata dalla sfera; la figura 18 b) mostra la pre-tensione nella direzione perpendicolare alla direzione della forza esercitata dalle sfere. I due modelli FEM e COMSOL producono risultati comparabili.

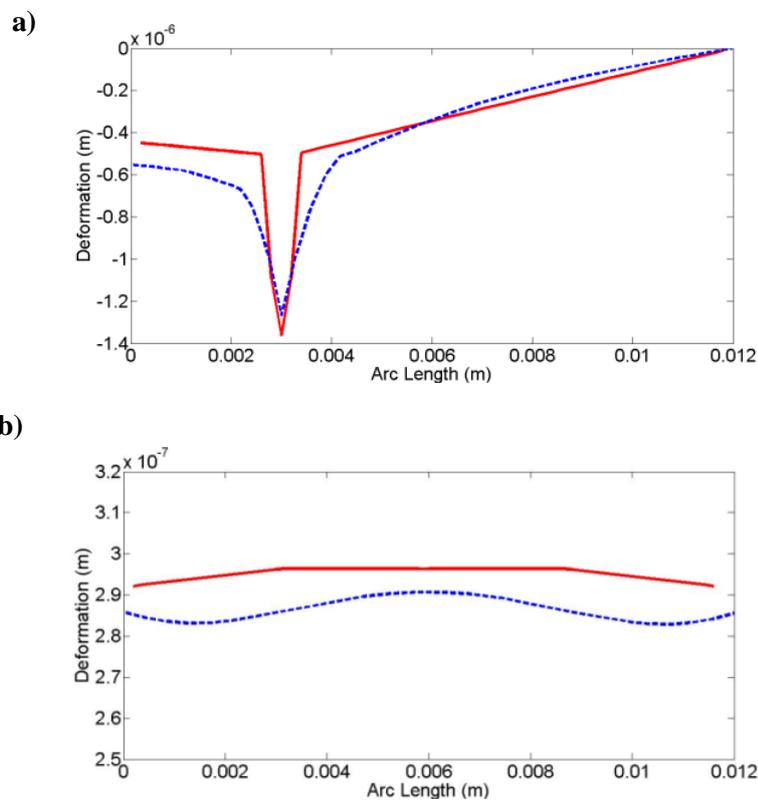


Figura 18 - Pre-tensione indotta nella ECM dai punti di carico.

Il ruolo di ogni singola sfera viene considerato come esercitante un punto di carico sulla ECM. Il carico di punto è pari alla forza magnetica indotta sulla sfera dal campo magnetico esterno e aumenta con la dimensione della sfera. Sulla base delle informazioni in merito alla deformazione viscoelastica e alla forza esterna, la rigidità

della ECM può essere calcolata per i casi in cui il campo magnetico è presente, ma anche nel caso in cui sia assente.

3.2 Cambiamento della rigidità in campioni di ECM reali

E' possibile applicare il modello appena descritto per predire il cambiamento della rigidità misurata di un campione di ECM dovuto alla pre-tensione generata dalla forza della sfera, e per comparare questa predizione analitica con i risultati sperimentali ottenuti da test di elasticità effettuati su campioni reali di ECM.

Il test di elasticità prevede che una striscia di ECM con incorporate le sfere bioconiugate con le fibre di collagene sia posta tra due magneti permanenti e sia esposta nel senso della larghezza ad un campo magnetico (Figura 19). Fissando il bordo inferiore della striscia e applicando una forza di trazione sul bordo, le sfere nella porzione centrale della striscia risentono di una forza che può essere scomposta in due componenti, una orizzontale direzionata verso i magneti ed una verticale direzionata verso il basso.

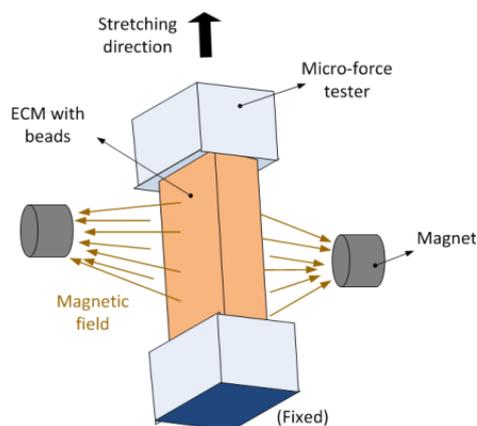


Figura 19 – Set-up sperimentale del test di elasticità.

E' stato quindi utilizzato COMSOL per modellare la rigidità risultante della ECM.

I risultati ottenuti mostrano l'effetto che la concentrazione e la dimensione delle sfere hanno sulla pre-tensione generata dalle sfere stesse e perciò la forza di trazione che è richiesta per deformare la ECM. La pre-tensione generata dalla biglie, che agisce contro la forza di trazione, aumenta esponenzialmente fino al raggiungimento di un

valore stabile dovuto alla viscoelasticità del gel ECM, e la velocità di crescita massima si ottiene nella condizione con maggior concentrazione di (Figura 20 a). La figura 20 b) invece mostra le forze di tensione necessarie per deformare il gel ECM per una data velocità e in assenza o in presenza di campo magnetico esterno. I risultati indicano che è necessaria una forza maggiore per deformare la ECM in presenza di campo magnetico e che questa aumenta con l'aumentare della concentrazione delle biglie. Le biglie infatti generano un incremento della pre-tensione che agisce contro la forza di trazione.

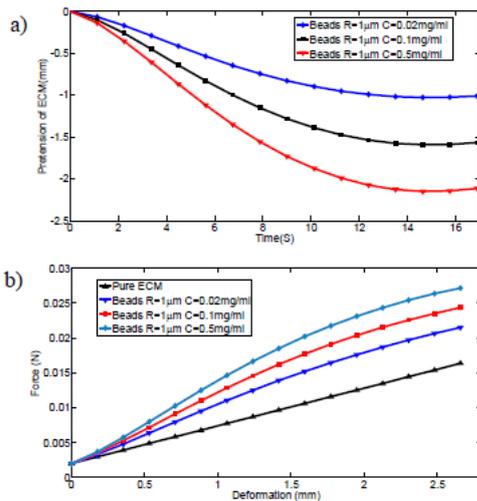


Figura 20 – Effetto della concentrazione delle biglie sulla pre-tensione nella ECM generata dalla biglie stesse e dalla forza di trazione.

Sono stati valutati anche gli effetti che la dimensione delle biglie hanno sulla formazione della pre-tensione e sulla forza di trazione necessaria per deformare la ECM ad una data velocità. Biglie di più grandi dimensioni generano una pre-tensione maggiore perché su biglie più grandi può essere generata una forza magnetica maggiore (Figura 21 a). Analogamente anche una forza di tensione maggiore è necessaria per deformare una ECM con biglie più grandi (Figura 21 b).

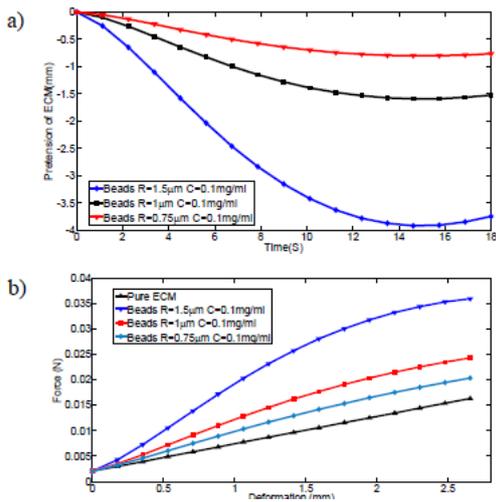


Figura 21 – Effetto della dimensione delle biglie sulla pre-tensione nella ECM generata dalla biglie stesse e dalla forza di trazione.

Linearizzando le curve delle figure 20 b) e 21 b) e misurando la pendenza delle rette risultanti si può stimare la stiffness all'istante di tempo in cui la pre-tensione avesse raggiunto un valore stabile ($t=16s$). In figura 22 sono graficati i valori di stiffness così ottenuti, dove il gruppo 1 è relativo ai dati riportati in figura 20 b) e il gruppo 2 a quelli riportati in figura 21 b). Il gruppo 1 mostra che la rigidità della matrice cresce con l'aumentare della concentrazione delle sfere; il gruppo 2 indica che sfere più grandi determinano una ECM più rigida per la creazione di forza di pre-tensione maggiori. Inoltre, la variazione della rigidità è più sensibile alla variazione del formato della sfera rispetto alla variazione della concentrazione.

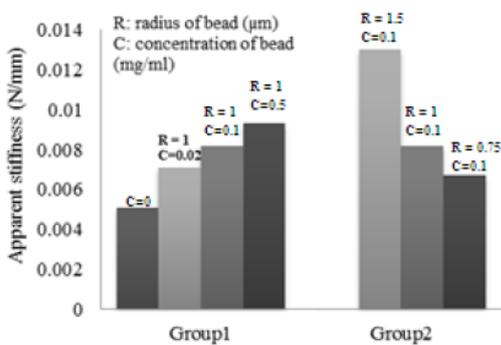


Figura 22 – Stiffness dell'ECM calcolata nel modello contenente biglie di dimensione costante ma concentrazione variabile (gruppo 1) o biglie di dimensione variabile ma concentrazione costante (gruppo 2).

Questi risultati forniscono una base analitica per sviluppare sofisticate tecniche per il controllo della rigidità di gel di ECM. Rispetto ad altri metodi di manipolazione della sua rigidità che modificano la composizione chimica del gel di collagene, il metodo qui descritto è più versatile perché consente il controllo della rigidità locale, modulando la concentrazione delle sfere magnetiche e l'attivazione del campo magnetico esterno. Tale controllo potrà essere applicato allo studio del comportamento delle cellule in un microambiente con rigidità variabile.

Bibliografia

Fabrizio Maniero, Cellula. Matrice extracellulare, Enciclopedia della Scienza e della Tecnica (2007)

Darci T. Butcher, Tamara Alliston & Valerie M. Weaver, A tense situation: forcing tumour progression, Nature Reviews Cancer 9, 108-122 (February 2009)

Edna Cukierman, Daniel E. Bassi, "Physico-mechanical aspects of extracellular matrix influences on tumorigenic behaviors", Seminars in Cancer Biology Volume 20, Issue 3, June 2010, Pages 139–145

Erin L. Baker, Roger T. Bonnecaze and Muhammad H. Zaman, "Extracellular Matrix Stiffness and Architecture Govern Intracellular Rheology in Cancer", Biophysical Journal, Volume 97, Issue 4, 1013-1021, 19 August 2009

Jose I. Lopez, Inkyung Kang, Weon-Kyoo You, Donald M. McDonald and Valerie M. Weaver, "In situ force mapping of mammary gland transformation" Integr. Biol., 2011,3, 910-921

Yue Du, Sahan C. B. Herath, Qing-Guo Wang, Harry Asada, and Peter C. Y. Chen, Analysis of Stiffness in Extracellular Matrix Embedded with Bio-Conjugated Magnetic Beads in a Magnetic Field, International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, Vol. 2, No. 5, September 2012

Nelson R. Alexander,^{#1,§} Kevin M. Branch,^{#1} Aron Parekh,¹ Emily S. Clark,¹ Izuchukwu C. Iwueke,¹ Scott A. Guelcher,² and Alissa M. Weaver Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity, Current Biology, Volume 18, Issue 17, 1295-1299, 9 September 2008

Pengfei Lu, Valerie M. Weaver and Zena Werb, The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression, J Cell Biol. Feb 20, 2012; 196(4): 395–406

Sanjay Kumar & Valerie M. Weaver, Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell, *Cancer Metastasis Rev* (2009) 28:113–127