

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA
prot. 2005022411

Coordinatore Scientifico	Franco RUSTICHELLI
Ateneo	Università Politecnica delle MARCHE
Titolo della Ricerca	Caratterizzazione fisica di colture per cellule staminali, per l'identificazione di differenti spettri di marker proteici in individui distrofici e sani.
Finanziamento assegnato	Euro 118.000
Durata	24 Mesi

Obiettivo della Ricerca

Scopo del presente progetto è la ricostruzione di tessuto muscolare scheletrico mancante a seguito di traumi o resezioni tumorali o affetto da patologie miopatiche di varia natura in casi in cui risulti ostacolata dalla scarsità di tessuto nativo funzionale. Fino ad oggi, esistevano limitate alternative per il ripristino funzionale di tessuto muscolare danneggiato o mancante. Le perdite massive di tessuto muscolare venivano trattate mediante procedure chirurgiche di trapianto e trasposizione di tessuto nativo. Queste tecniche rappresentano un valido approccio al problema, anche se non costituiscono una soluzione ottimale. Attualmente si stanno sviluppando tecniche di ricostruzione di tessuto artificiale progettato a tavolino (skeletal muscle tissue engineering). Sebbene queste tecniche siano recentemente entrate nella pratica clinica per rigenerare tessuti di varia natura, vedono un'applicazione ancora molto limitata nel distretto muscolo-scheletrico.

L'ingegnerizzazione in vitro di tessuto muscolo-scheletrico sembra costituire una valida alternativa agli approcci più tradizionali. Il successo di questi nuovi approcci al problema dipende dalle proprietà intrinseche di rigenerazione delle cellule satellite ed il loro potenziale di differenziazione e proliferazione. Requisiti fondamentali per l'ingegnerizzazione del tessuto muscolo-scheletrico sono un allineamento parallelo delle miofibrille con i filamenti di miosina ed actina, un accumulo di calcio e la presenza di recettori dell'acetilcolina a livello intracellulare, che sono necessari per creare degli stimoli diretti ed un utilizzo funzionale. Inoltre il tessuto rigenerato deve presentare caratteristiche di biocompatibilità, deve potere essere vascolarizzato ed innervato. Per ottenere quantità considerevoli di tessuto muscolo scheletrico, le colture cellulari mioblastiche devono essere estese su volumi considerevoli di tessuto ingegnerizzato, cioè su scaffold di dimensione considerevole. Comunque, sono ancora molto pochi in letteratura gli studi di differenziazione dei mioblasti all'interno di una matrice 3D e finora non risulta essere stato prodotto alcun tessuto sostitutivo soddisfacente per funzioni muscolo-scheletriche. In particolare, nel presente progetto ci proponiamo di realizzare e caratterizzare terreni di coltura idonei per l'impianto, la crescita e la differenziazione di cellule staminali per il tessuto muscolare. Verranno studiati tali terreni di coltura allo scopo di determinare i meccanismi molecolari nella differenziazione delle cellule staminali di soggetti sani e distrofici. Al fine di giungere a questo obiettivo attraverso la presente ricerca, sono stati pianificati differenti approcci nell'ambito microstrutturale, biofisico e biochimico. Tali studi prevedono l'utilizzo combinato di più tecniche come l'elettroforesi, la spettroscopia di massa, la microscopia a scansione, tecniche moderne di imaging e altre tecniche di indagine microstrutturale. Tali tecniche sono di notevole importanza al fine di comprendere i biomeccanismi dell'interno della cellula.

Innovazione rispetto allo stato dell'arte nel campo

Il fattore che complica la ricerca nell'ambito delle cellule staminali è principalmente la scarsa informazione sull'ambiente in cui le cellule staminali crescono o sono collocate per il loro accrescimento e sull'effetto di tale ambiente sul loro destino. L'ambiente riveste un ruolo determinante nello studio del comportamento cellulare e della loro crescita sia in vitro che in vivo.

Pertanto, una volta acquisite delle conoscenze sulle molecole rilasciate in vitro da cellule staminali normali e distrofiche prima e dopo la loro esposizione in vari ambienti, tali conoscenze saranno di aiuto ai ricercatori per comprendere la differenziazione di tali cellule in vivo e accelerare i progressi nell'ingegneria delle cellule staminali.

In particolare, requisiti fondamentali per l'ingegnerizzazione del tessuto muscolo-scheletrico sono un allineamento parallelo delle miofibrille con i filamenti di miosina ed actina, un accumulo di calcio e la presenza di recettori dell'acetilcolina a livello intracellulare, che sono necessari per creare degli stimoli diretti ed un utilizzo funzionale. Inoltre il tessuto rigenerato deve presentare caratteristiche di biocompatibilità, deve potere essere vascolarizzato ed innervato. Per ottenere quantità considerevoli di tessuto muscolo-scheletrico, le colture cellulari mioblastiche devono essere estese su volumi considerevoli di tessuto ingegnerizzato, cioè su scaffold di dimensione considerevole.

Comunque, sono noti pochi studi sulla differenziazione mioblastiche in una matrice 3D (terreno di coltura) e sono stati sviluppati con poco successo pochi tessuti muscolari sostitutivi.

L'obiettivo del nostro progetto è identificare se in vitro le cellule staminali emopoietiche estratte dal tessuto muscolare di soggetti normali e affetti da distrofia muscolare di Duchenne esprimono variazioni molecolari. L'interpretazione di questi risultati e le loro conseguenze nella comprensione delle malattie neuromuscolari verranno di conseguenza.

Studi recenti hanno dimostrato che le cellule staminali emopoietiche AC133+ possono essere utilizzate per la cura della distrofia muscolare di Duchenne (DMD).

Infatti una delle principali ragioni dello studio di queste cellule staminali è proprio la loro applicabilità nella terapia di patologie neuromuscolari, anche se la loro conoscenza è ancora in via di sviluppo. Infatti è stato dimostrato che le cellule staminali AC133+

non proliferano banalmente e di conseguenza si rende necessario conoscerne la biologia sia a livello genomico che a livello proteomico, per comprendere i meccanismi di differenziazione non soltanto *in vitro* ma anche *in vivo*. E' ampiamente risaputo che il comportamento delle cellule staminali è regolato da due fattori: 1) l'ambiente, come sede di trapianto e 2) la loro storia. Inoltre è noto che i singoli segnali extracellulari possono influire sul destino di queste cellule e comprendere i meccanismi che regolano la cascata del segnale intracellulare permetterà di guidare le cellule nei pathways desiderati.

Al fine di raggiungere questo obiettivo, la nostra ricerca si baserà su diversi approcci microstrutturali, biofisici e biochimici come l'elettroforesi, la spettroscopia di massa, la microscopia a scansione, tecniche moderne di imaging e altre tecniche di indagine microstrutturale. Tali tecniche sono di notevole importanza al fine di comprendere i biomeccanismi dell'interno della cellula. In particolare, la possibilità di usare dei microscopi a forza atomica (AFM) su materiali organici rispetto a materiali inorganici dipende dall'effetto della analisi sul materiale. I materiali organici infatti, come i tessuti, reagiscono e cambiano a seguito delle indagini AFM, questo richiede che la forza utilizzata sia mantenuta molto bassa al fine di evitare ogni variazione del materiale studiato. In aggiunta a questa modalità, l'esame di materiale organico *in vitro*, richiede uno scanning veloce dei cambiamenti intracellulari al fine di registrarne i processi. Per esempio, l'AFM viene sempre più usata per visualizzare la morfologia di superficie, condensati DNA-polimero, nanoparticelle solide lipidiche e variazioni morfologiche del complesso liposoma-DNA. L'AFM è una delle tecniche appartenenti alla famiglia dei microscopi a scansione con una risoluzione dimensionale vicina a 1 Å: fornisce un'opportunità unica e cioè quella di visualizzare le cellule nel loro ambiente naturale anche senza manipolare il campione. Grazie a questa semplicità di utilizzo, l'AFM può essere usata per il controllo dei profili di distribuzione dimensionale. Recentemente, miociti cardiaci sono stati studiati in modo dettagliato con metodi elettrofisiologici. A causa della loro capacità di generare spontaneamente potenziali di azioni *in vitro*, questi sistemi costituiscono un modello ideale per studiare in dettaglio il meccanismo della contrazione muscolare. L'AFM è già stata utilizzata per analizzare il comportamento contrattile di singole cellule attive così come di cellule in un strato confluyente [21]. Utilizzando l'AFM, le singole cellule aderenti possono essere visualizzate e il comportamento pulsante può essere caratterizzato lateralmente.

Verrà utilizzata nel progetto, un'altra tecnica di imaging che recentemente ha permesso molti progressi nell'ambito della ingegneria tissutale: la microtomografia computerizzata di o Raggi X (micro-CT). Tale tecnica è simile alla Risonanza Magnetica o alla Tomografia Convenzionale, nel senso che risulta essere non invasiva. La micro-CT non necessita di agenti di contrasto o coloranti al fine di produrre immagini e può raggiungere una risoluzione spaziale vicina a 1 micron. La MicroCT differisce dalle altre tecniche poiché è in grado di misurare i movimenti random 3D dei tessuti molli.

D'altra parte, al fine di ottenere informazioni sulla microstruttura di un materiale, diverse tecniche fisiche ed ingegneristiche risultano essere largamente diffuse.

In particolare, sono ampiamente usate tecniche di scattering dei raggi-x e dei neutroni, la microscopia ottica ed elettronica (l'ultima includendo anche misure analitiche come l'EDAX) e l'analisi del differenziale termico.

Tra queste tecniche, alcune possono essere utilizzate in laboratorio mentre per altre si richiedono grandi strutture. Relativamente alle ultime, sorgenti di neutroni e di luce di sincrotrone sono sempre più utilizzate in Europa a partire dall'ultimo decennio per ricerche applicate anche a problemi biomedici. Per esempio, grazie al loro basso assorbimento nella materia, i fasci neutronici possono penetrare a fondo nei campioni. Il volume di misura in questi casi è compreso tra il millimetro cubo e alcuni centimetri cubici. Sono inoltre sensibili alle differenze isotopiche dello stesso elemento.

Come il segnale neutronico dipende dal contrasto tra la struttura che scattera e il background, allo stesso modo strutture differenti possono essere messe in evidenza variando il contrasto isotopico.

Criteri di verificabilità

- 1) Entro il primo anno, redazione di un rapporto sui risultati ottenuti per quanto riguarda l'individuazione dei terreni di coltura candidati e la realizzazione delle relative scaffold
- 2) Al termine del progetto, redazione di un rapporto sulle caratteristiche delle scaffold, ottimizzate in base ai prerequisiti iniziali e ai risultati delle caratterizzazioni fisiche e biologiche
- 3) Pubblicazione di lavori scientifici su riviste nazionali ed internazionali
- 4) Presentazione dei risultati parziali e definitivi del progetto in congressi nazionali ed internazionali.

Elenco delle Unità di Ricerca

Sede dell'Unità Università Politecnica delle MARCHE

Responsabile Scientifico Franco RUSTICHELLI

Finanziamento assegnato Euro 35.400

Compito dell'Unità

Il compito della presente Unità di Ricerca (UNITA' 1) è quello di eseguire degli scan di Microtomografia (utilizzando la Radiazione X di Sincrotrone) su almeno 8 differenti terreni di coltura con lo scopo di fornire dati per la selezione di 4 di essi (Unità 4), una volta ottenuti i risultati di Micro-CT (Unità 1) e i risultati delle analisi non-distruttive condotte sugli stessi campioni dalle Unità 2 e 3. I terreni di coltura selezionati dovranno essere adatti per l'impianto di cellule staminali per la crescita del tessuto muscolare. Il contenuto proteico di tali cellule verrà studiato dalla Unità 4 con lo scopo di trovare almeno un fattore di differenziazione tra soggetti sani e soggetti distrofici.

L'approccio che proponiamo offre la possibilità di realizzare un programma sperimentale completo, studiando l'influenza di diversi

parametri come la misura dei pori, la distribuzione spaziale nel terreno di coltura e una informazione strutturale dettagliata a livello atomico che ci potrebbe permettere di determinare quali parametri microstrutturali risultano significativi nel campo dell'ingegneria tissutale riferita a problematiche muscolari.

Come secondo step, i terreni di coltura verranno caricati con cellule staminali del tipo AC133+, a loro volta marcate con nanoparticelle magnetiche di ossido di ferro (ENDOREM) e poi analizzate di nuovo per mezzo della Micro-CT e della radiazione X del sincrotrone.

Le immagini 3D così ottenute costituiranno un notevole passo avanti rispetto alle immagini istologiche 2D usuali, che non forniscono la corretta posizione delle cellule staminali umane. D'altra parte, variando opportunamente il fattore "numero di cellule staminali" si otterrà una ottimizzazione delle condizioni sperimentali al fine di ottenere una informazione scientifica più consistente rispetto al presente problema di carattere biomedico.

Sede dell'Unità	Università Politecnica delle MARCHE
Responsabile Scientifico	Gianni ALBERTINI
Finanziamento assegnato	Euro 15.600

Compito dell'Unità

Il compito dell'unità di ricerca 2 si può suddividere nei seguenti punti:

1. Ricerca bibliografica:

verrà svolta una ricerca bibliografica rivolta soprattutto verso due direzioni:

- ° guide per tessuto muscolare
- ° effetti delle caratteristiche fisiche del supporto sulla crescita di cellule

2. Realizzazione dei terreni di coltura:

La realizzazione delle guide verrà iniziata prima della fine della ricerca bibliografica, quando già si disporrà delle prime indicazioni di massima sulle caratteristiche richieste.

I primi mesi saranno soprattutto dedicati alla scelta dei materiali, mentre gli ultimi soprattutto alla scelta dei trattamenti.

Alla fine dell'ottavo mese si prevede di poter disporre di guide realizzate con materiali diversi ed eventualmente utilizzando tecnologie diverse.

3. Caratterizzazione microstrutturale dei terreni di coltura.

Verranno utilizzate le tecniche di indagine microstrutturale ritenute più idonee, in base alle caratteristiche fisiche richieste. Si presume di utilizzare tecniche di microscopia ottica ed elettronica per studiare sia la superficie sia la parte sotto la superficie, mediante tagli opportuni.

Uno studio particolare sarà rivolto alla porosità, per la quale si utilizzeranno sia tecniche di diffusione a basso angolo di neutroni e raggi x per analizzare la distribuzione dimensionale di piccoli pori, sia tecniche di carattere più macroscopico, come il porosimetro a mercurio, per valutare quanto la rete dei vuoti sia connessa.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di ROMA "La Sapienza"
Responsabile Scientifico	Carlo COLUZZA
Finanziamento assegnato	Euro 32.000

Compito dell'Unità

L'attività di Ricerca dell'Unità 3 prevede l'utilizzo della Microscopia a Forza Atomica (AFM). L'AFM assicura la possibilità di eseguire misure con elevata risoluzione laterale (minore del nanometro) e con altrettanto elevata risoluzione in z che garantisce una vera ricostruzione 3D della morfologia della superficie del terreno di coltura. Inoltre l'utilizzo dello SNOM in versione NanoRAMAN permette di ottenere contemporaneamente informazioni chimiche sui legami organici che si stabiliscono localmente tra le cellule staminali ed il substrato su cui verranno impiantate e fatte crescere.

Il programma di ricerca dell'unità si può suddividere in due fasi

Nella prima fase verrà realizzata una ottimizzazione delle modalità di misura in funzione dei vari parametri caratteristici dei materiali e delle strutture scelte come supporti biocompatibili. La morfologia in superficie dei prototipi di substrati per la successiva crescita di cellule e tessuti opportuni verrà caratterizzata. Lo studio sarà fatto in funzione dei vari trattamenti di attivazione e di tessitura della superficie stessa. In parallelo saranno eseguite misure di spettroscopia di fotomissione (XPS) per valutare la stechiometria di superficie dei substrati. Si effettueranno anche misure di microscopia di fotomissione (PEEM) in modo da correlare gli spettri di fotomissione (integrati spazialmente) con la morfologia locale ottenuta dalla microscopia a forza atomica. In questa fase verranno messe a punto le condizioni più idonee per la rilevazione dei geni prodotti (con tecniche di RTPCR) e di proteine prodotte con tecniche di elettroforesi 2D-PAGE).

Nella seconda fase verrà comparata la morfologia di superficie dei terreni di coltura con e senza deposizione di cellule staminali. Tali misure saranno effettuate in liquido in condizioni termostate in modo da seguire dinamicamente le modificazioni cellulari indotte dalle proprietà del substrato e dalla reciproca interazione. In parallelo si eseguiranno misure di nanoRaman e di

luminescenza mediante la tecnica di microscopia ottica a scansione in campo prossimo (SNOM). In tal modo si ha in contemporanea e localmente l'informazione morfologica e quella di interazione chimica con la risoluzione spaziale propria di tale microscopia (intorno ai 100 nm). Questi risultati verranno quindi controllati mediante prove biologiche di quantificazione dei cDNA prodotti (con tecniche di RT-PCR) e di proteine con tecniche di elettroforesi 2D-PAGE seguite da spettrometria di massa in MALDI-TOFF.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di MILANO
Responsabile Scientifico	Yvan TORRENTE
Finanziamento assegnato	Euro 35.000

Compito dell'Unità

Gli studi preliminari dell'Unità di Ricerca 4 riguarderanno gli effetti di differenti biomateriali sul rilascio di specifiche molecole proteiche a partire da cellule staminali di derivazione emopoietica e muscolare.

Le cellule staminali umane verranno prima isolate, dopo aver ottenuto il consenso informato sotto la direzione dell'ospedale Policlinico di Milano (Italia). I campioni di sangue e le biopsie muscolari di bicipite brachiale (2 cm³) saranno ottenute da pazienti affetti da DMD (n=8, 5-14 anni) e da soggetti sani(NS) (n=8, 8-16 anni).

L'isolamento delle cellule staminali di derivazione muscolare verrà eseguito utilizzando la seguente tecnica: le cellule verranno dissociate enzimaticamente con digestioni successive in un medium contenente lo 0.2% di collagene di tipo XI e lo 0,1% di tripsina per 1 ora a 37°C. Dopo tale selezione, aliquote della frazione cellulare positiva saranno analizzate con il citofluorimetro per verificare la purezza del fenotipo isolato. Una volta che le cellule hanno aderito e raggiunto circa il 50% di confluenza, l'estratto cellulare ed il sovranatante verrà sottoposto ad analisi utilizzando le tecniche di proteomica.

Dopo l'incubazione con anticorpi monoclonali (mAbs) anti-CD34, -CDw90, -CD133, -CD45, -c-kit, le cellule verranno lavate una volta e risospese nel FACS flow (BDIS) per l'acquisizione citofluorimetrica. Circa 10-20x10³ eventi per campione saranno acquisiti ed analizzati usando un "sequential gating" per selezionare la popolazione di interesse.

Per quanto riguarda l'analisi proteomica, l'Unità 4 sarà in collaborazione con il laboratorio di proteomica (Dr. C. Sala) di neurologia dell'istituto CNR del dipartimento di farmacologia dell'Università di Milano. Una prima analisi verrà effettuata separando i campioni proteici con un gel 2D-SDS-PAGE. Gli spot proteici saranno identificati con la spettrometria di massa MALDI-TOFF.

In seguito e marginalmente rispetto alla precedente attività progettuale, verranno eseguiti esperimenti in vivo attraverso una laser microdissezione di cellule umane AC133+ marcate con Endorem e trapiantate in muscoli di topi distrofici.

Topi scid e scidmdx verranno trapiantati con 50000 cellule staminali AC133+ nel tibiale anteriore. Gli animali sopravviveranno 30 giorni dopo il trapianto ed i muscoli saranno caratterizzati per la presenza di cellule Lamina nucleare umana AC positive. La dissezione mediante laser sarà utilizzata per isolare i clusters di cellule lamina nucleare AC positive, seguita da una tecnica di proteomica (1D electrophoresis and LC/MS/MS spectrometry or 2D electrophoresis and Maldi-Tof spectrometry).