

Il corso- 2015 **Meccanobiologia**,  
2013 Ing Tessutale e Bioreattori , in 2016 sarà  
Tecnologie per la Medicina Regenerativa

The course book: **Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la  
medicina rigenerativa**. Author/s Mantero S, Remuzzi A, M.T.  
Raimondi, Ahluwalia A ISBN Code 978-88-55-3039-2 Publisher  
:Patron: Number of pages 212

# Come si svolge l'esame

Orale

Presentazione in gruppi con questi temi

1. Ipsc-Luzzi, Edwige, Giusi, Alessia, xxx, Oct 26
2. Organ printing –Noemi, Anna, Miriam, Stefania, Valentina, Aleandro, Francesca. First week Nov. 2 Nov
3. Artificial skin for cosmetic testing-Alice, Silvia, Lorenzo, Chiara, Alessia, Simona, Lorenzo 2<sup>nd</sup> week Nov. 9 Nov
4. organ decellularization –Chiara, Giulia, Alessandro, Isadora, Elisa, Valentino 16
5. engineered meat-Francesca, Matteo, Enrico , 23
6. Organ on a chip- Michele, Leonardo, Virginia, Mauro, Francesca, Andrea. 7 Dec
7. Engineering the trachea- 14 Dec.

# INFO

- <http://www.centropiaggio.unipi.it/~ahluwalia>

(c'è un link al corso)

Portale biomedica

- [www.biomedica.ing.unipi.it](http://www.biomedica.ing.unipi.it)

# What is the course about?

- Tissue engineering
- Regenerative Medicine
- Biomimicking tissues, organs and systems, ie. In-vitro models
- (why is it called Meccanobiology?)

# **Faremmo un approccio bottom up**

Recettori e comunicazione: binding e secrezione

Controllo geometrico, stiffness e tensegrity

Sviluppo e morfogenesi : modelli Steinberg, Wolpert, adesione differenziale

Crescita e differenziazione.(cellule staminali, iPSC, EMT)

Progettazione usando allometria e apporto nutrienti

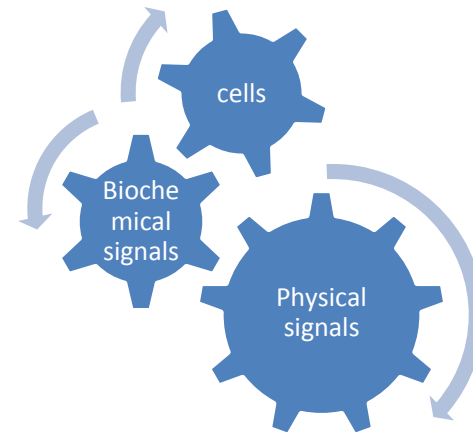
Le tecnologie: i biomateriali e gli scaffold

Bioreattori, sensori ambientali, controllo ambientale

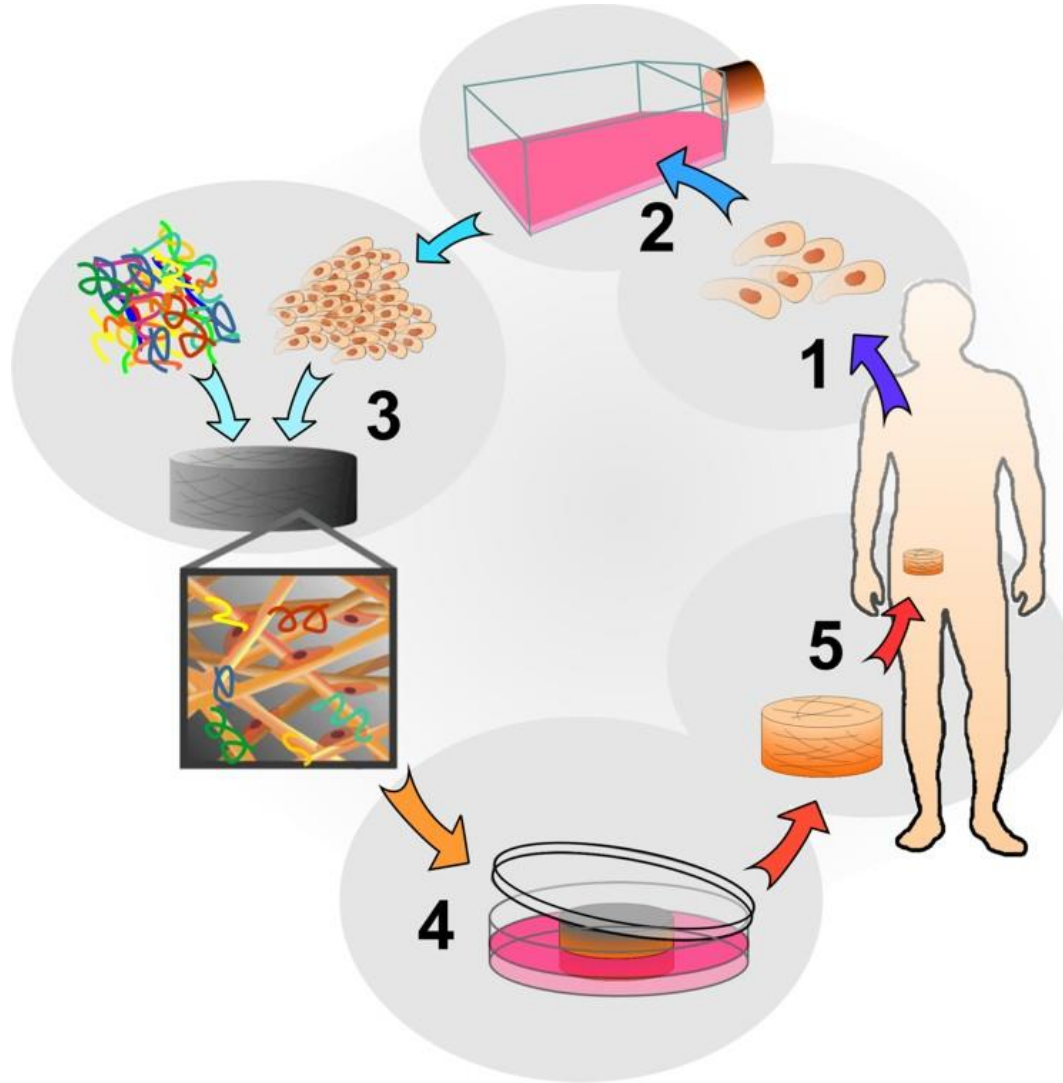
Alcuni approci, pancreas, fegato, osso ecc Controllo biochimico, adesione e forza di adesione

# Why?

- ATMP is the bioengineering of the future.
- Biological engineering
- Design downscaled biomimetic in-vitro systems, understand how the big picture comes together.
- 3Rs



# What is Tissue engineering?



The old  
cells on a  
scaffold  
approach

# 21 century tissue engineering (regenerative medicine)

Allopathy: a system of medical practice that aims to combat disease by use of remedies (as drugs or surgery) producing effects different from or incompatible with those produced by the disease being treated

New Regenerative medicine uses ATMP (advanced therapy medicinal products)

An ATMP is a medicinal product which is either:

- a gene therapy medicinal product
- a somatic cell therapy medicinal product (allogenic, autologous, or xenogenic)
- a tissue engineered product

**They **all** involve a degree of manipulation in-vitro**



# Why do we need it?

(Lack of donor organs used to be the reason)

Allopathy cannot “cure” 21<sup>o</sup> century diseases

like :

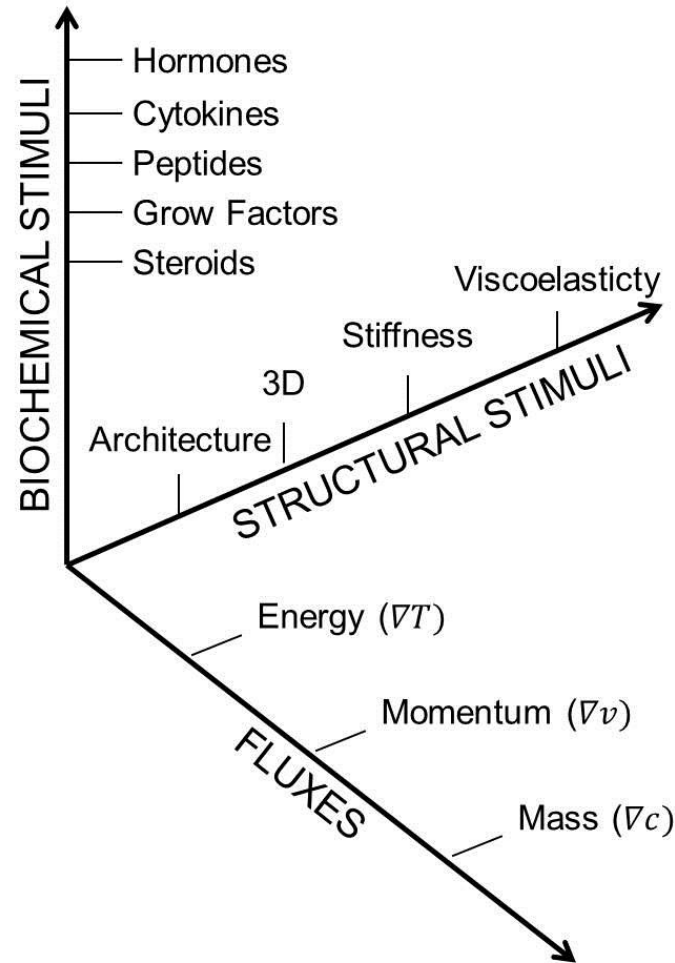
- Ageing & degeneration
- Auto immune diseases
- Cancer
- Obesity
- Or genetic disorders

(what do they have in common?, what diseases can be cured with allopathy?)

# The main ingredient we manipulate in-vitro is the cell

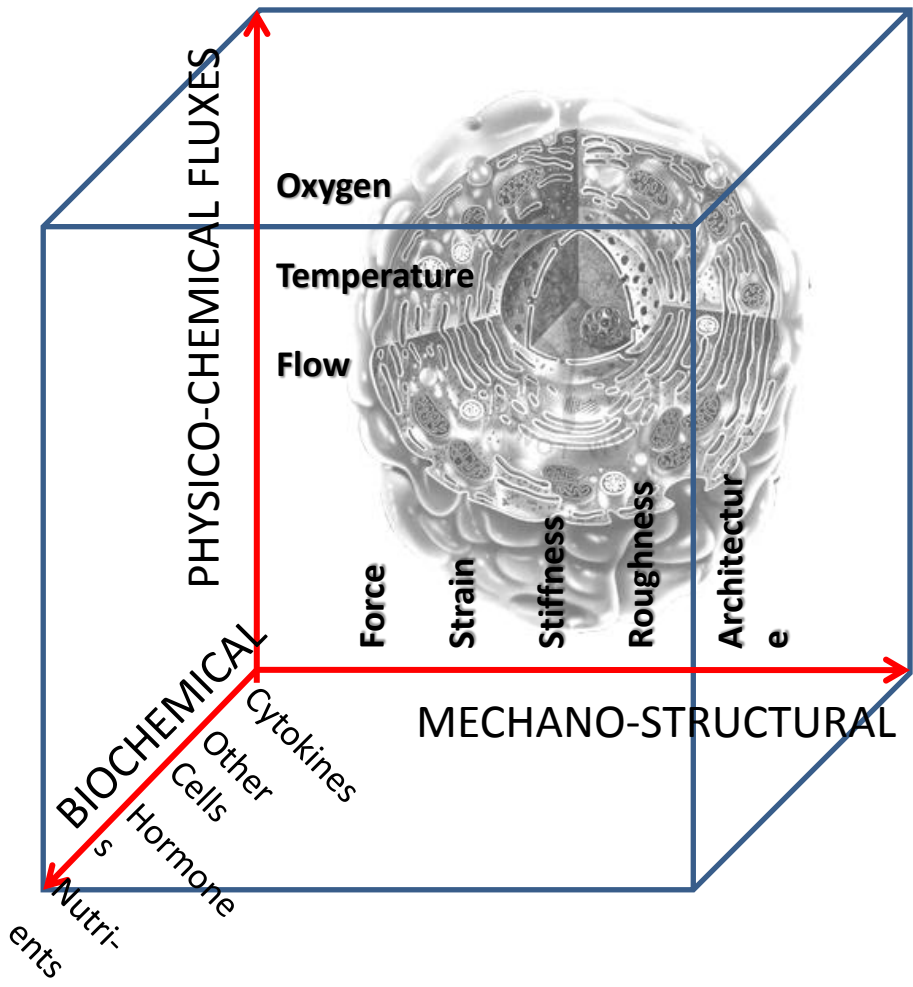
## Stimuli

- Biochemical
- Physico-chemical
- Mechano-structural

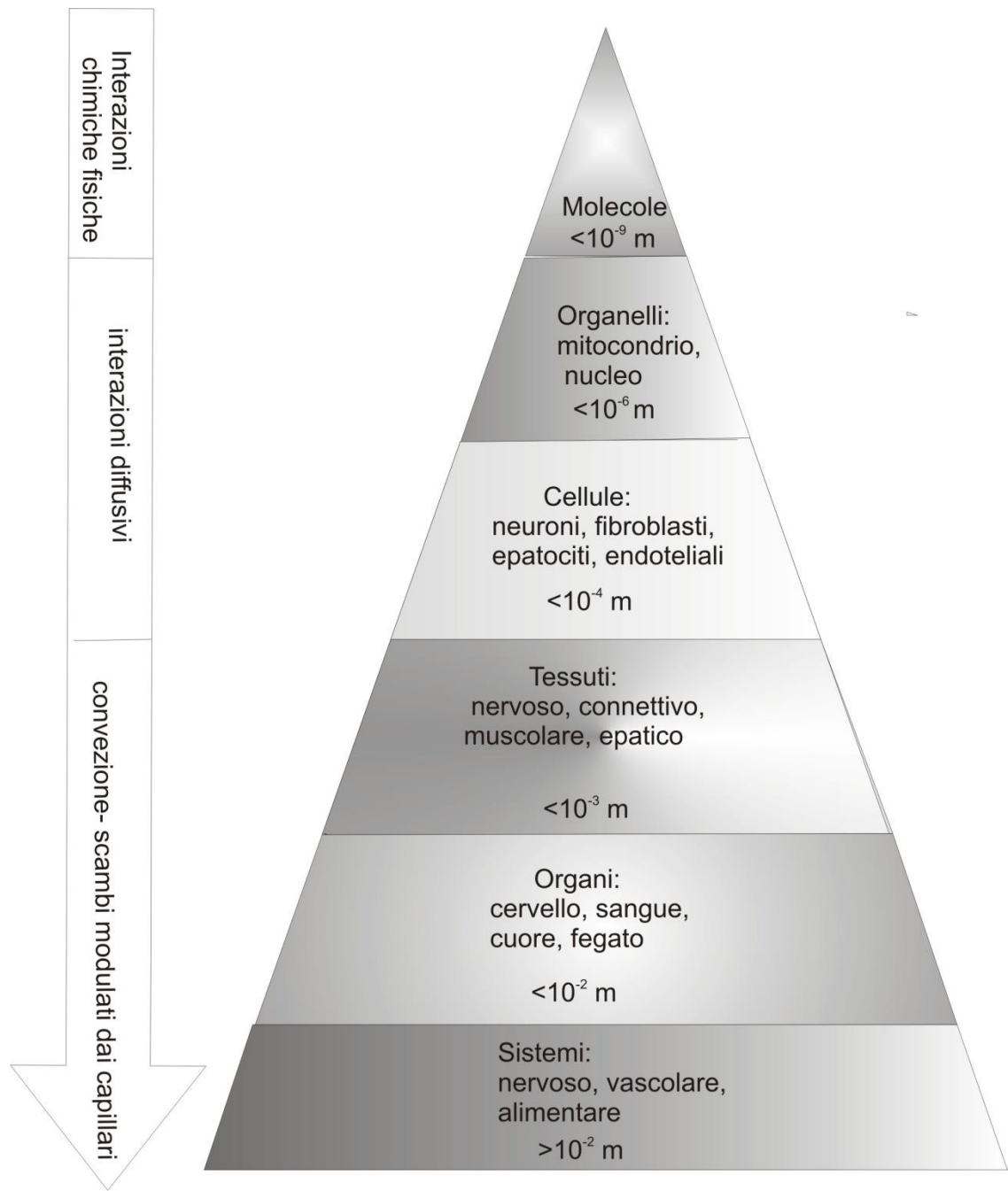


Note even time has a role- thus a *dynamic* environment, is fundamental in all biological processes.

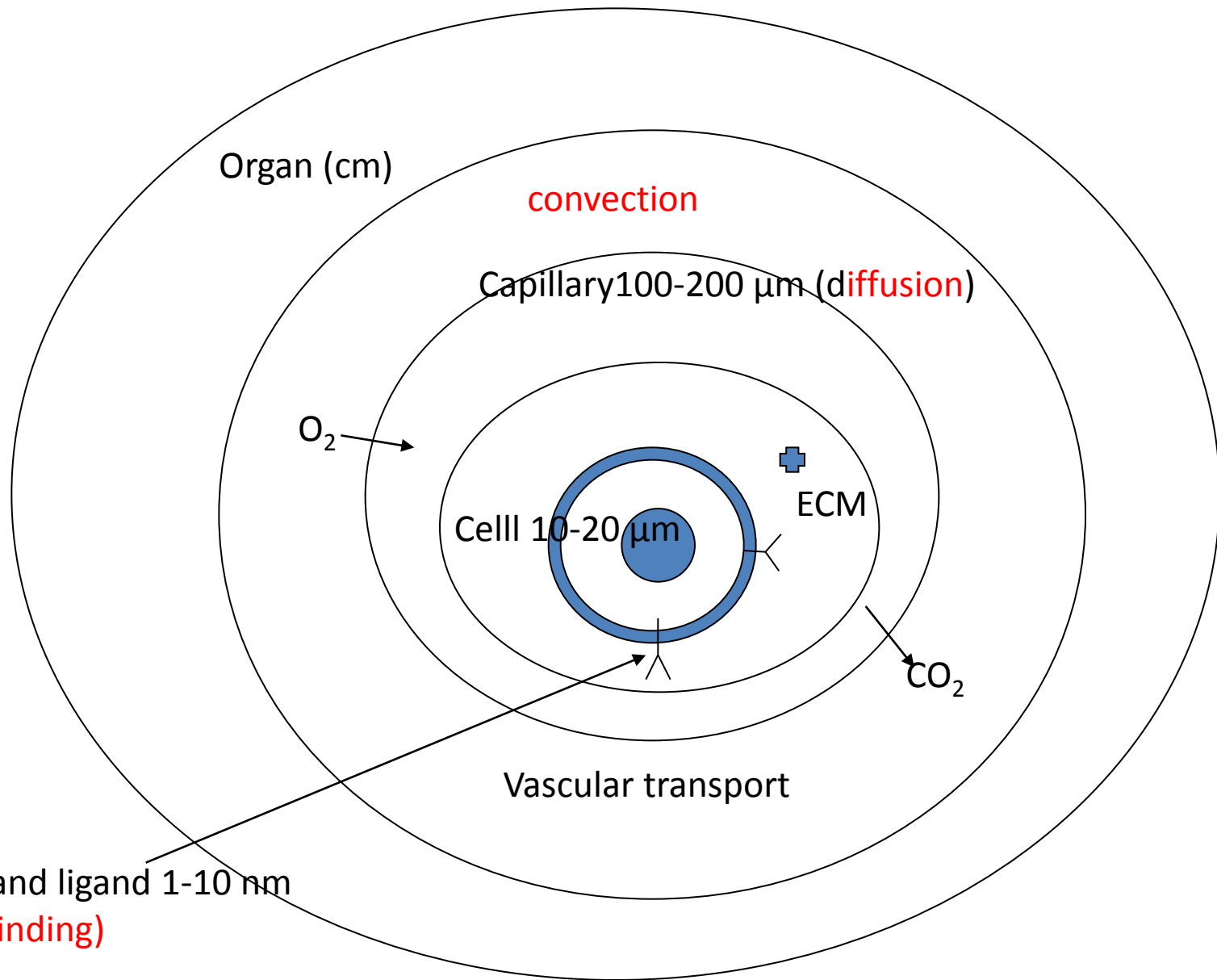
# monitoring/sensing/control is essential



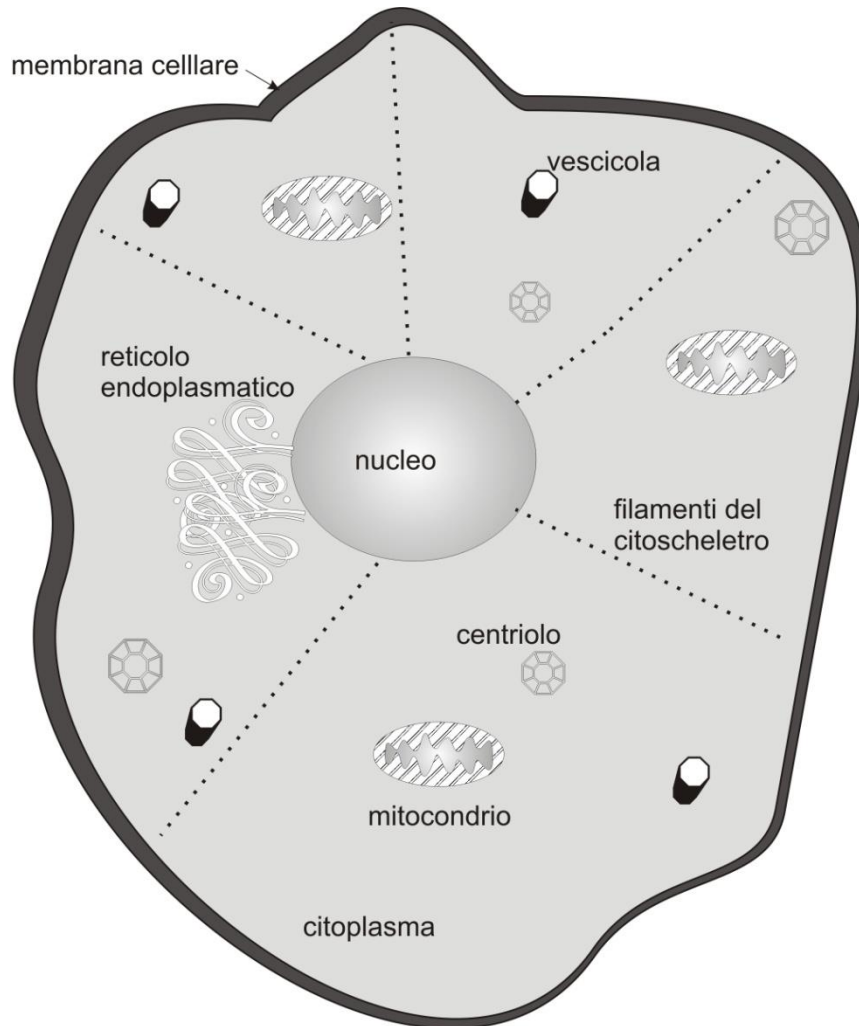
# Hierarchical organisation



# Characteristic distance 100-200 $\mu\text{m}$



# La cellula

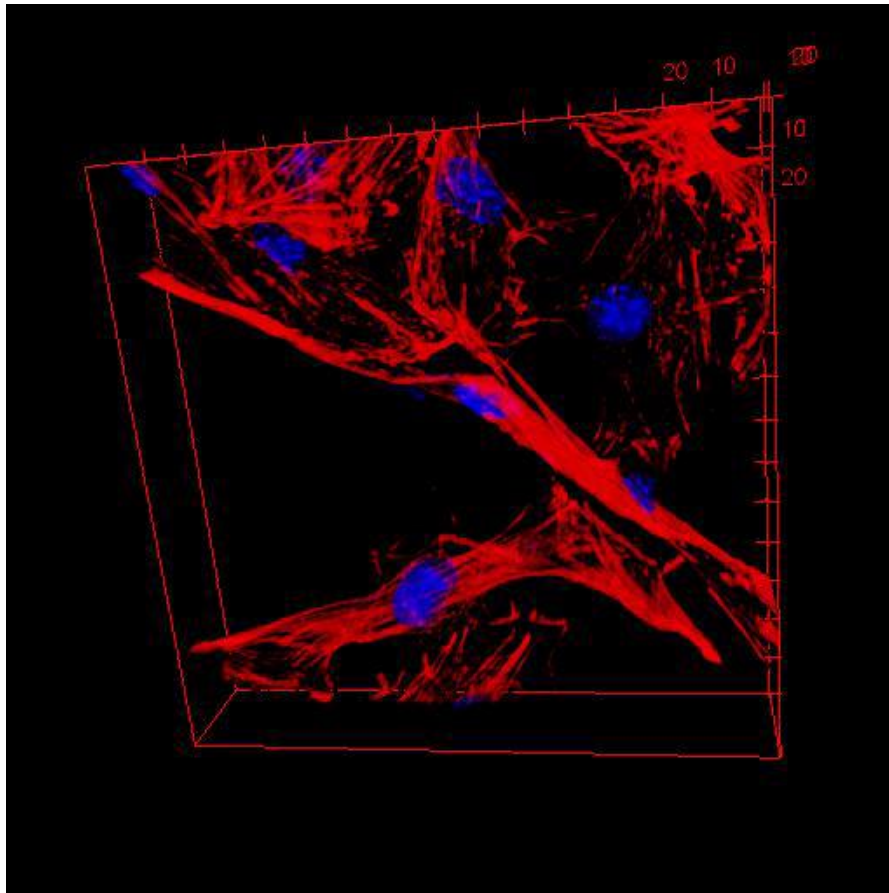


Dovete sapere le funzioni  
dei componenti  
citoplasmici

Cellule matrice dipendenti  
e cellule "libere"

# Numbers

- The typical cell– diameter 10-20  $\mu\text{m}$



How many?  
How many in an organ?  
How many are therapeutic?

## Quali sono i processi cellulari fondamentali?

Genes hold the gun  
Environment pulls the trigger

OMICS  
Genome  
Phenome  
Epigenome  
Connectome  
secretome

Quali invece sono specifici a cellule specifiche?

Fenotipo – caratteristiche fisiche e biochimiche del organismo

Genotipo- caratteristiche del DNA nucleare

Epigenotipo- alterazione dell'espressione genica da fattori ambientali



Le funzioni cellulari sono diverse da cellula a cellula e da tessuto a tessuto, e definiscono il **fenotipo** cellulare. Però alcuni processi sono comuni a tutte le cellule. I processi cellulari più noti sono:

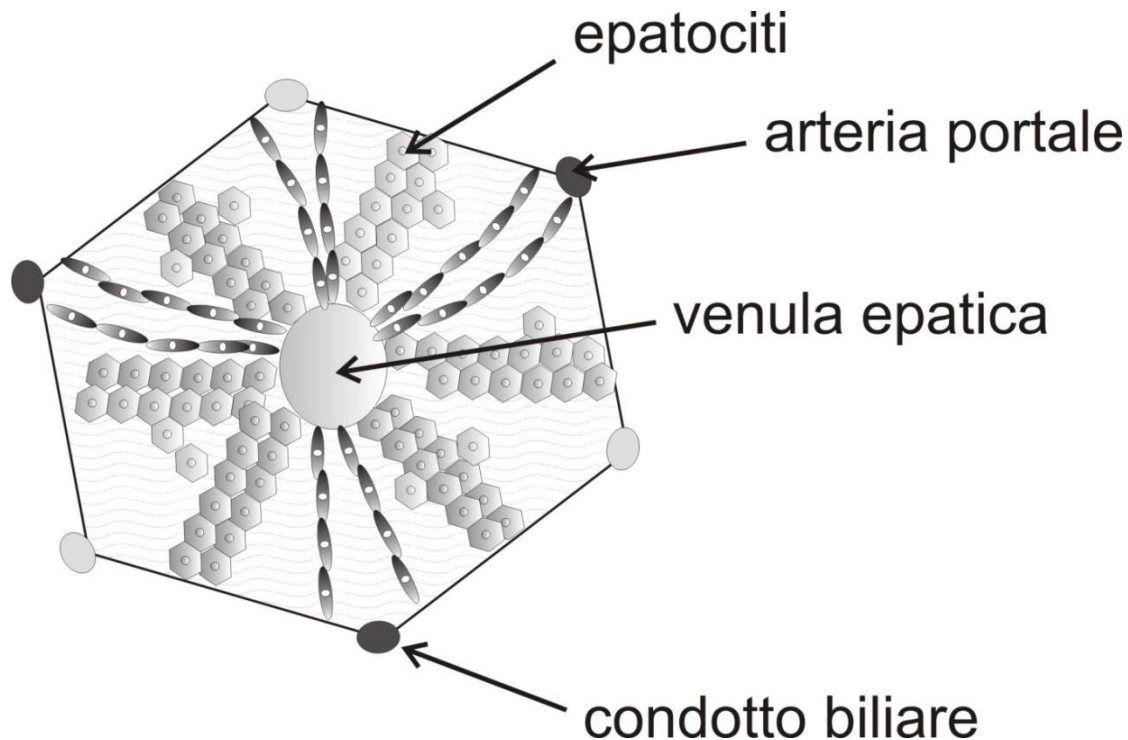
- Proliferazione o crescita
- Migrazione
- Differenziazione
- Morte (apoptosi, necrosi)
- Metabolismo, respirazione
- Adesione
- Espressione proteica

Define: phenotype, genotype, epigenotype

# Definitions

- **Epigenetics** is the study, in the field of genetics, of cellular and physiological phenotypic trait variations that are caused by external or environmental factors that switch genes on and off and affect how cells read genes instead of being caused by changes in the DNA sequence.

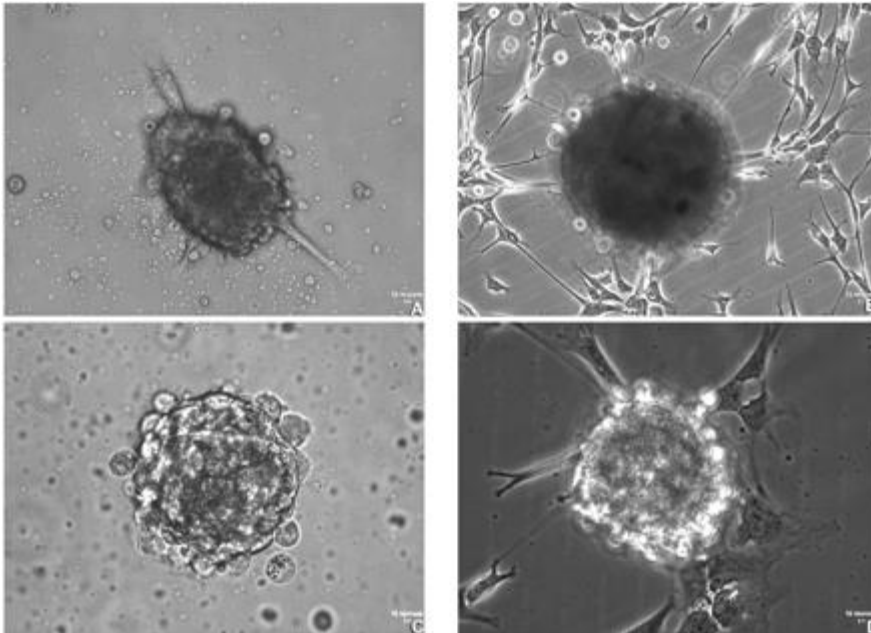
**Functional unit:** collection of functional (parenchymal) and support (stromal or non-parenchymal) cells which do not require a capillary network. It is  $\approx$  equivalent to a cube of 100 micron sides. In vitro these units are usually referred to as **ORGANOIDS**



How many cells in a Functional unit?

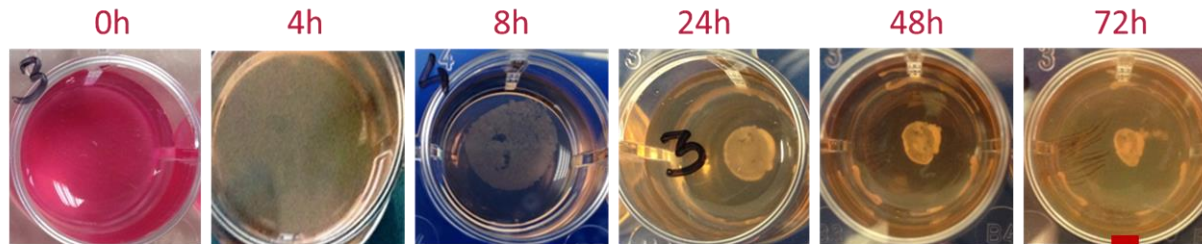
# Functional unit

- Each organ is a network of the parallel functional units, composed of groups of functional cells or parenchymal supported by stromal cells, each unit has dimensions of a few hundreds of microns, and responds with characteristic times in the order of minutes. The micro-functional domains are repeated both in morphology and function.



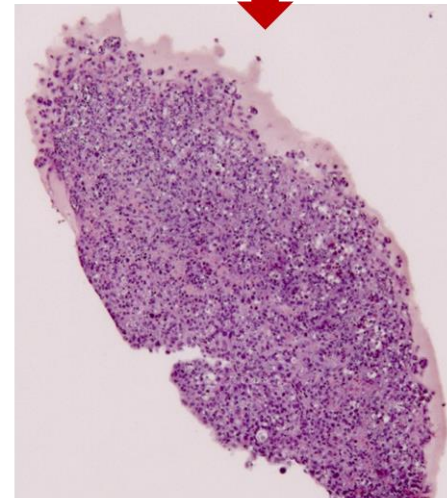
Cardiospheres are a good example

# Hepatic organoids



Combination of:  
differentiated, human upcyte® hepatocytes  
+ upcyte® LSECs  
+ upcyte® MSCs

HE-stain of a  
„first try“ liver  
bud (72h)



# Cell growth: Hayflick limit and population doublings

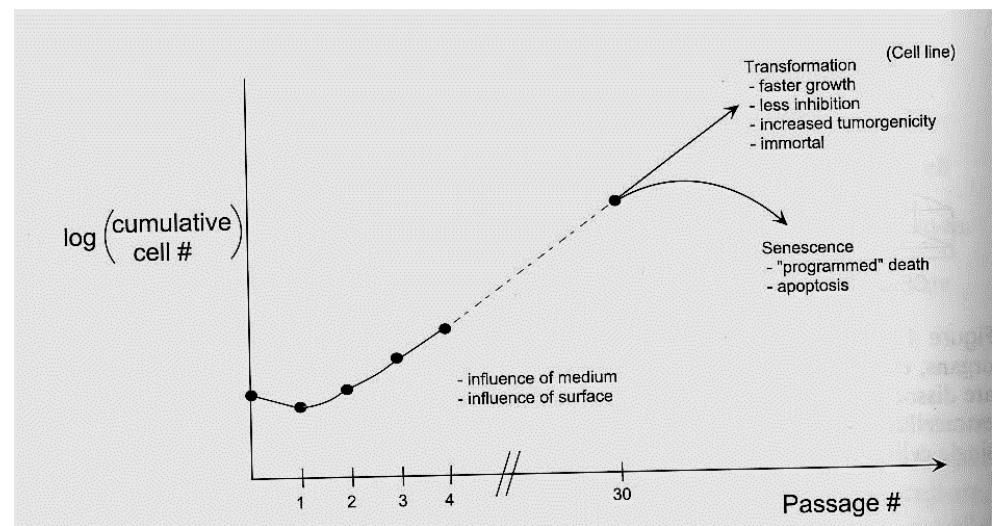
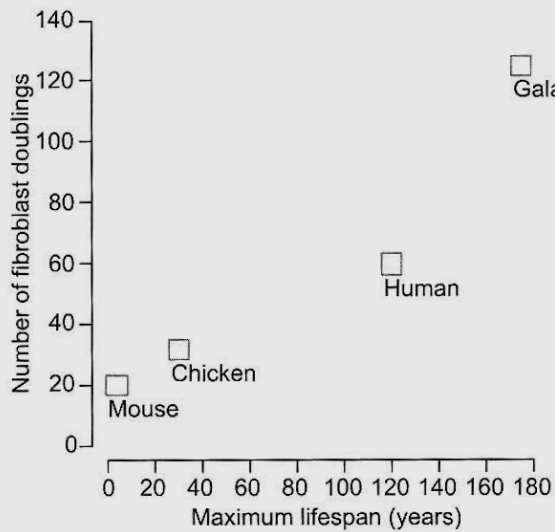
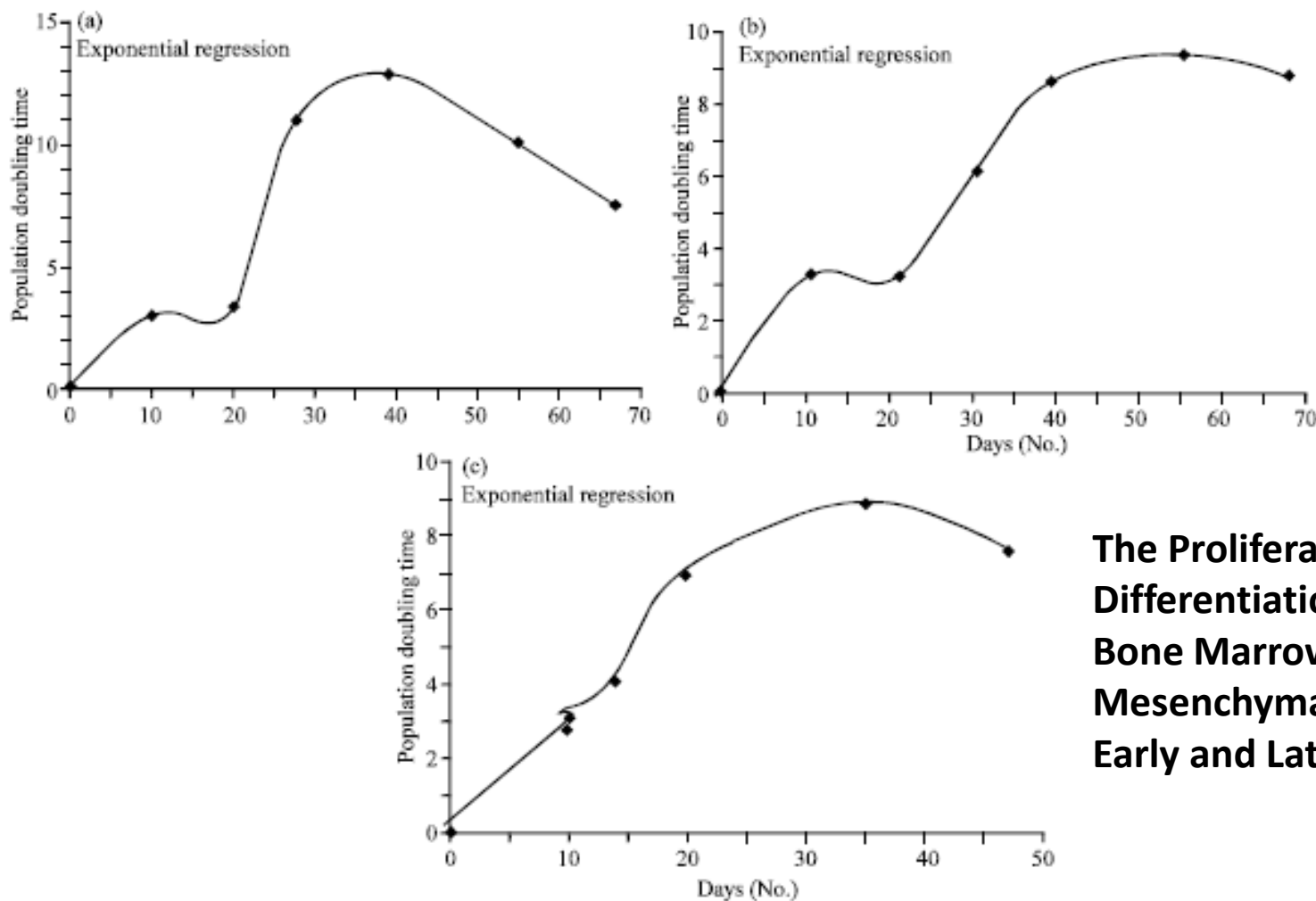


Fig. 1(a-c): *In vitro* population doubling time (PDT) of human bone marrow derived MSCs cultures in three sets. (a) Set 1 (b) Set 2 and (c) Set 3

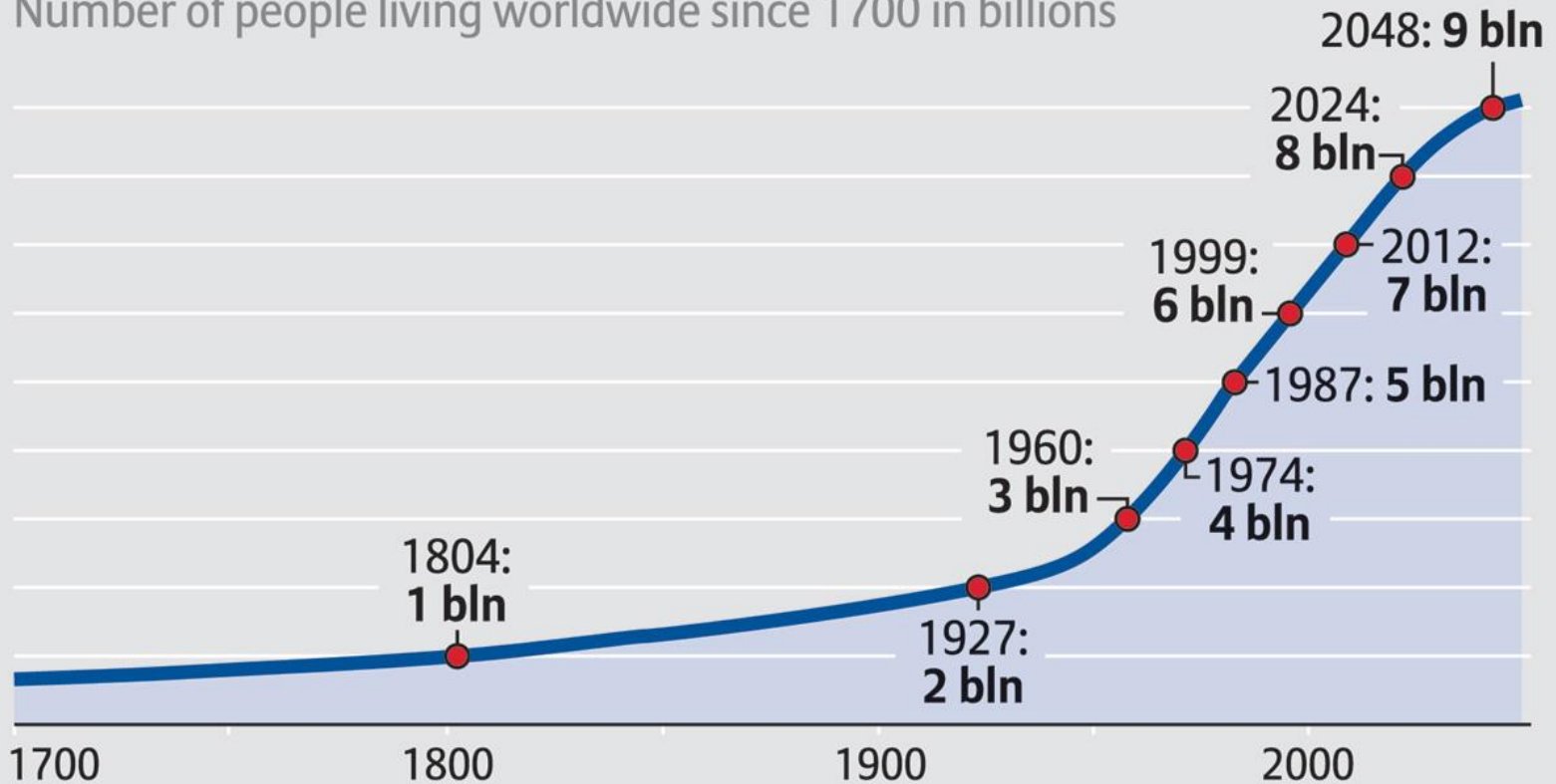


**The Proliferation and Differentiation Capacity of Bone Marrow Derived- Human Mesenchymal Stem Cells in Early and Late Doubling**

# POPULATION OF THE EARTH



Number of people living worldwide since 1700 in billions



Source: United Nations World Population Prospects, Deutsche Stiftung Weltbevölkerung

For further information please visit: [www.knowledge.allianz.com](http://www.knowledge.allianz.com)



Rate of cell proliferation is proportional to cell number

$$\frac{dN}{dt} \propto N$$

$$\frac{dN}{N} = k dt$$

$$N = N_0 e^{kt}$$

$$2N_0 = N_0 e^{kt_d}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{k}$$

N = cell population

$N_0$  = initial population @t=0

$t_d$  = population doubling time

Sample questions

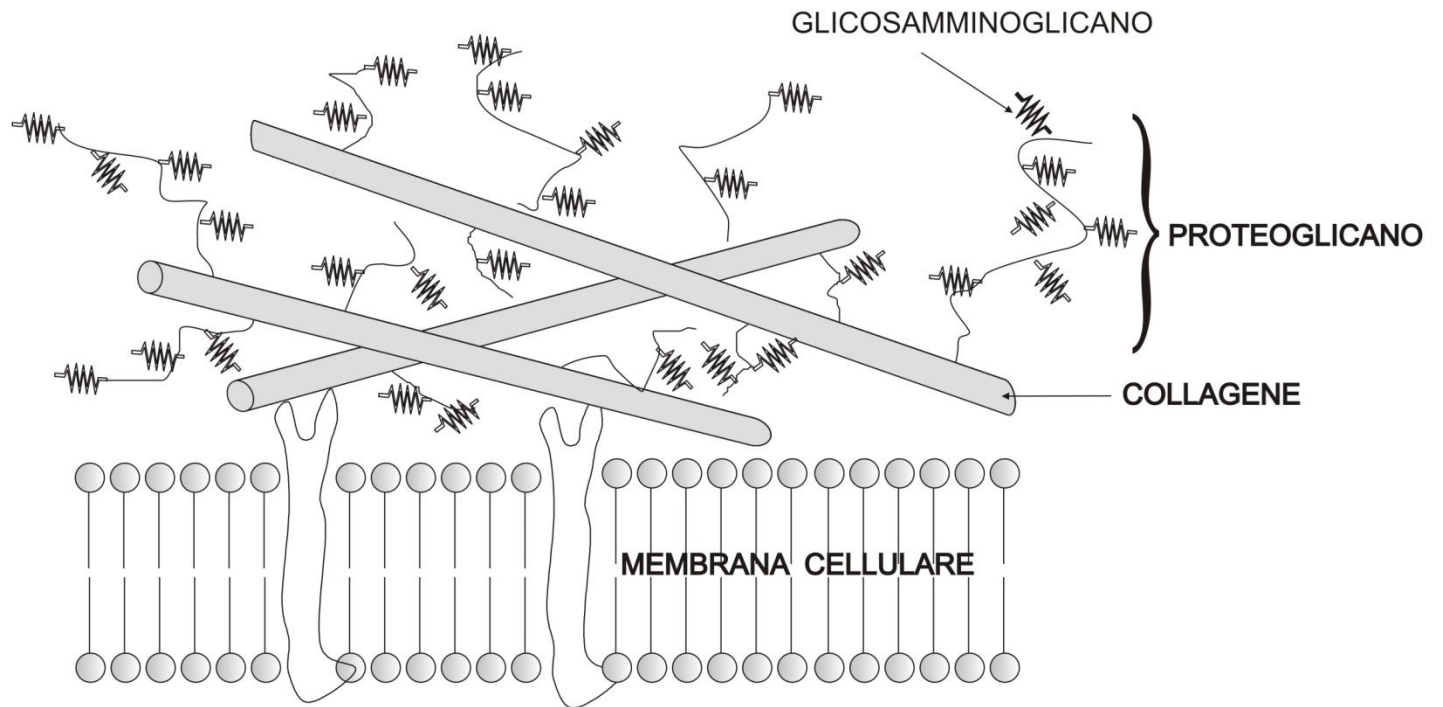
# Ripassare ECM

- Le molecole dell'ECM: GAG, HA, elastina, collagene, fibronettina, laminina ecc. Calcio, sodio, acqua, fattori di crescita ecc.
- Le macromolecole hanno elevato peso molecolare e diffondono poco, si possono considerare "fisse". La classe più importante di CSR per la ECM sono le INTEGRINE. Sono note come CAM- cell adhesion molecule.

# La Matrice Extra Cellulare

(vedere anche la roba di biomeccanica sul ECM)

Matrice Extra Cellulare	
Componente	Funzione
Acqua	E' il mezzo di trasporto, ed è la componente più importante degli organismi viventi. Rende inoltre incomprimibile L'ECM,.
Sali Minerali	Mantengono un sistema tamponato
Elastina	Proteina strutturale
Fibronettina, laminina ..	Proteine adesive specializzate, spesso glicosilate
Glicosamminoglicani	Disaccaridi (ad esempio:acido ialuronico, eparina, eparan solfato) che formano un complesso con le proteine per formare i proteoglicani
Proteoglicani	Complessi zuccheri-proteine che formano un reticolo macromolecolare o gel idratato, figura 4
Collagene	Proteina strutturale e ligando adesivo



Genes load the gun  
Environment pulls the trigger



OMICS  
Genome  
Phenome  
Epigenome  
Connectome  
Secretome  
Organome  
Inflammatome

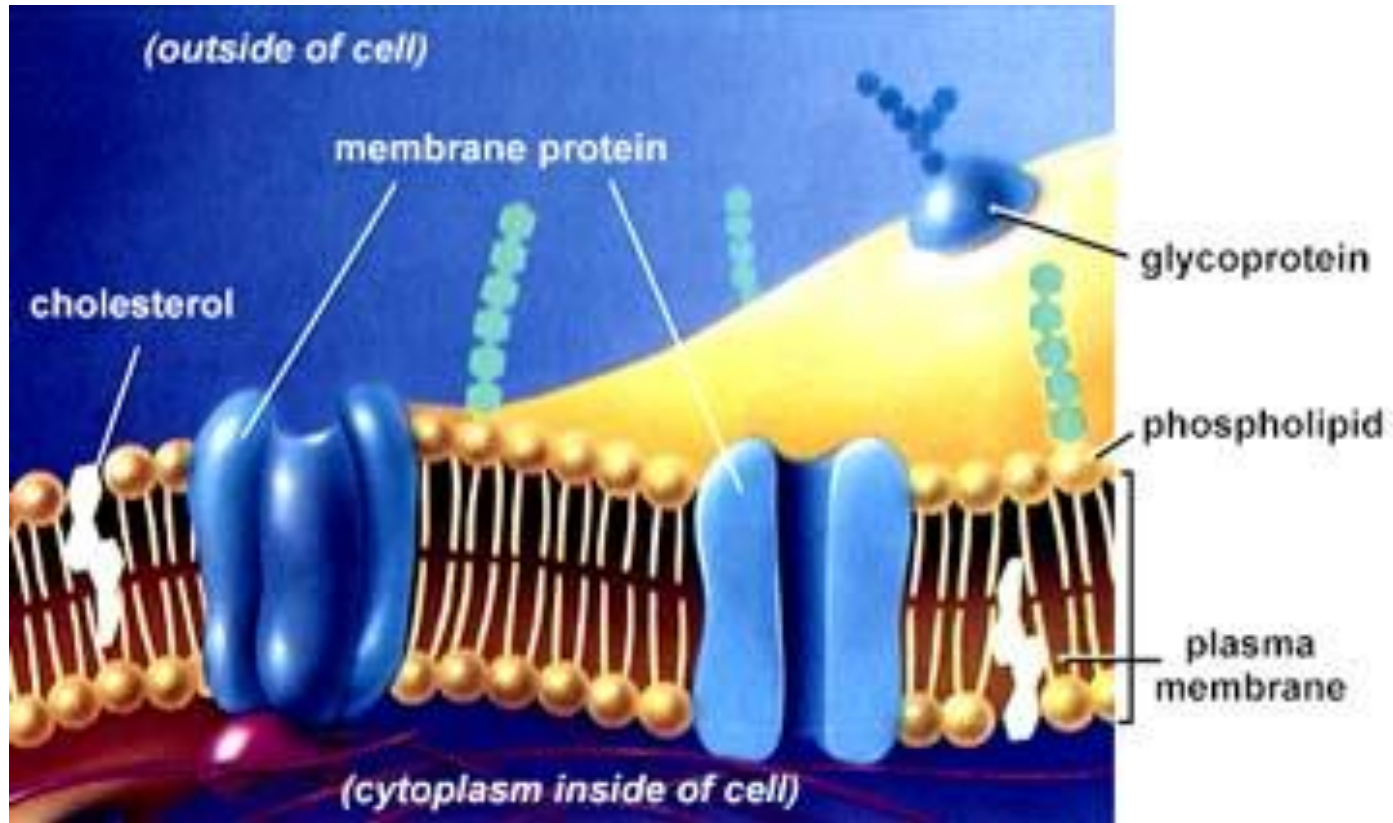
Fenotipo – caratteristiche fisiche e biochimiche del organismo

Genotipo- caratteristiche del DNA nucleare

Epigenotipo- alterazione del espressione genica da fattori ambientali

# LIGAND BINDING/RECEPTORS/ CELL ADHESION

Libro di Lauffenburger e Linderman

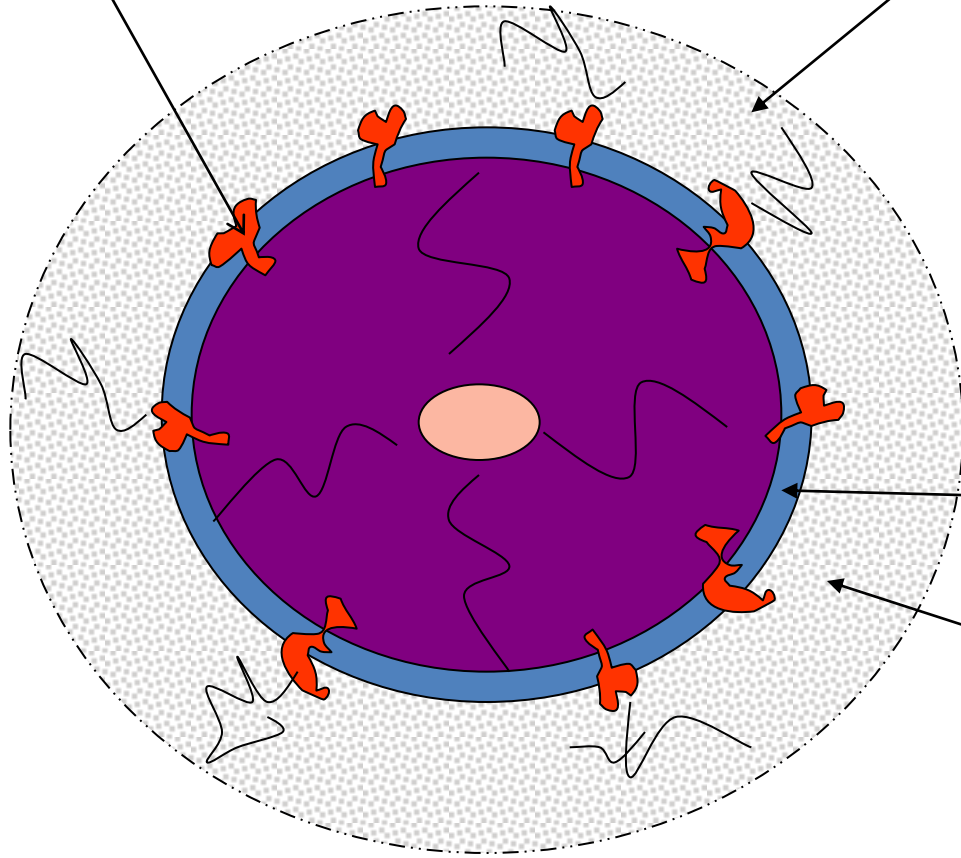


# Binding

CELL RECEPTOR

Glycocalyx: carbohydrates adsorbed on transmembrane proteins. It is negative, why?

Membrane is 40% protein, 45% lipid and 5% carbohydrate

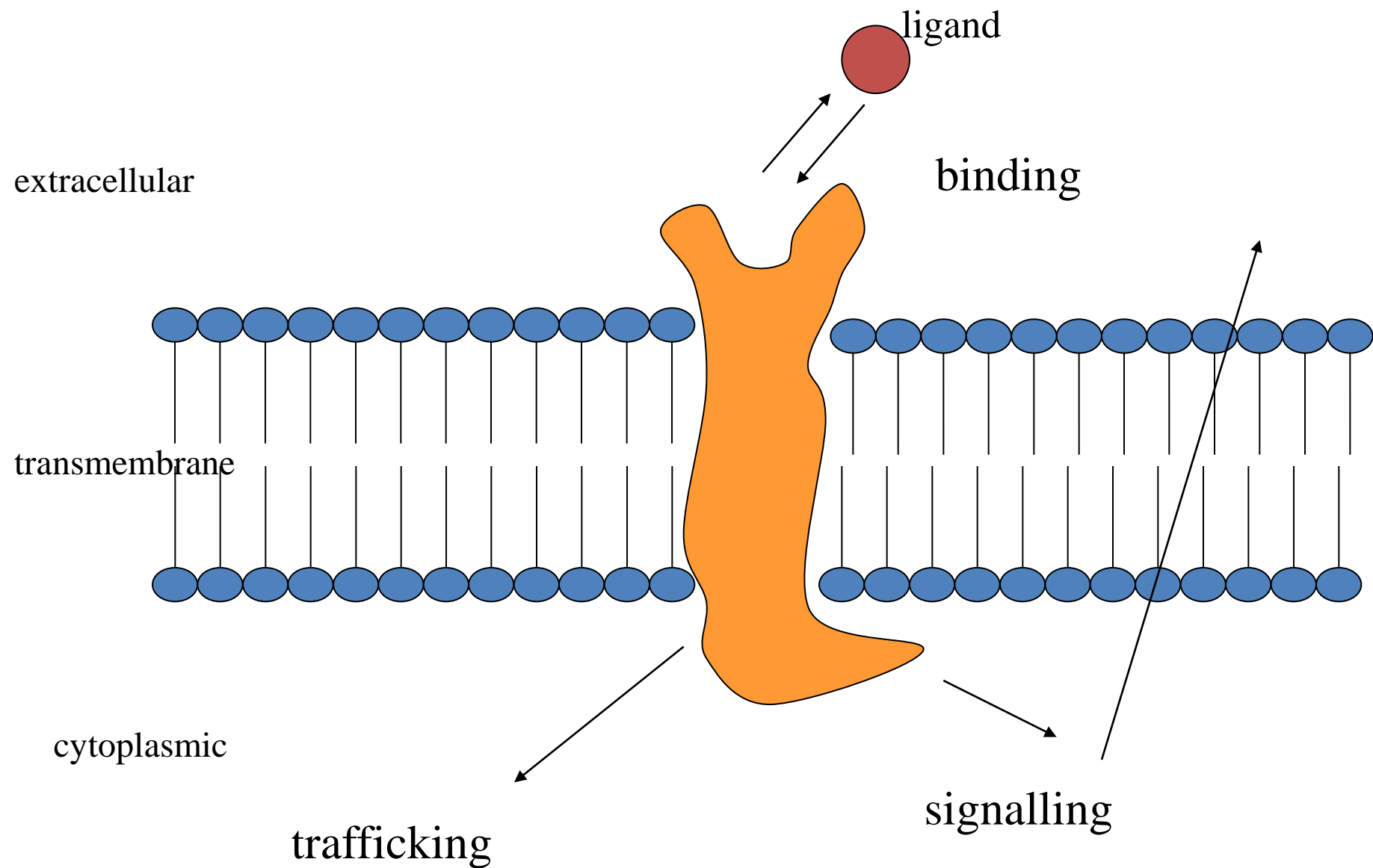


40  
A

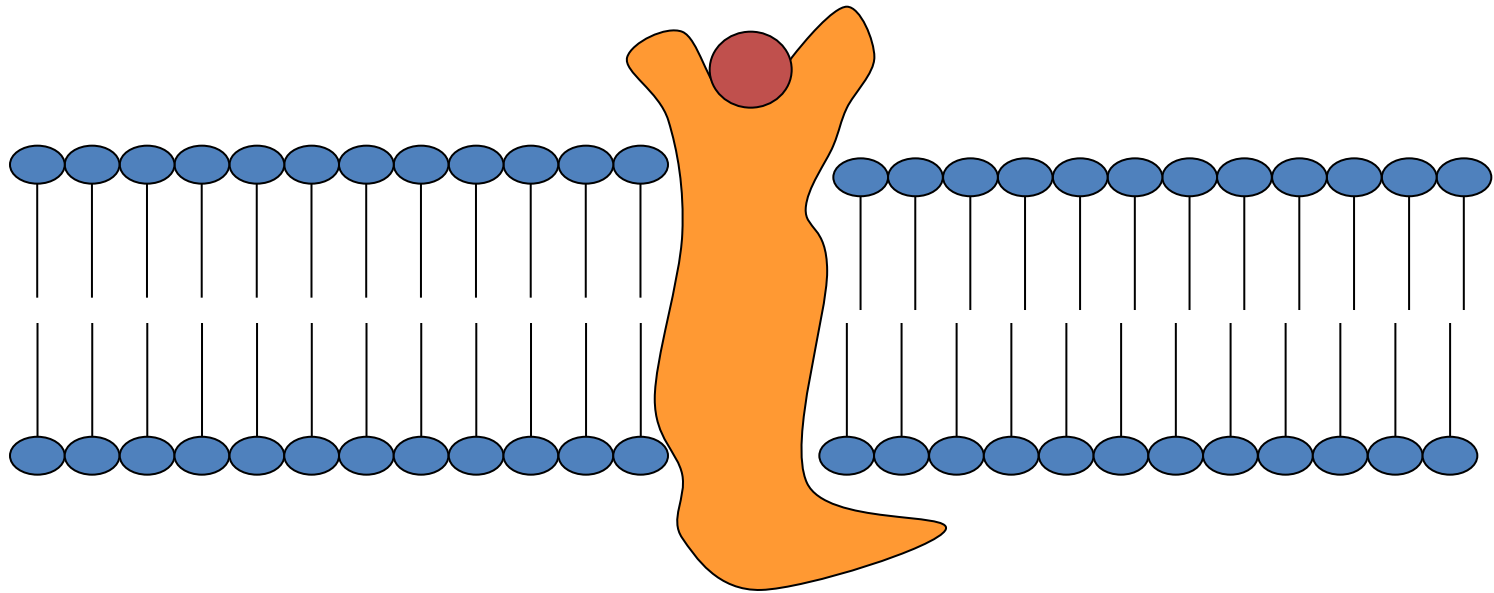
100-200  
A



Eukaryotic Cell responses are regulated and controlled by receptor interaction with the environment. So parameters such as growth, death, differentiation, are studied by analysing receptor-ligand binding and the associated trafficking and signalling events.



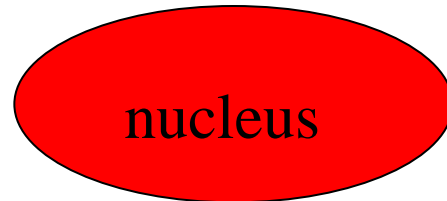
INSIDE OUT- OUTSIDE IN



Signal cascade

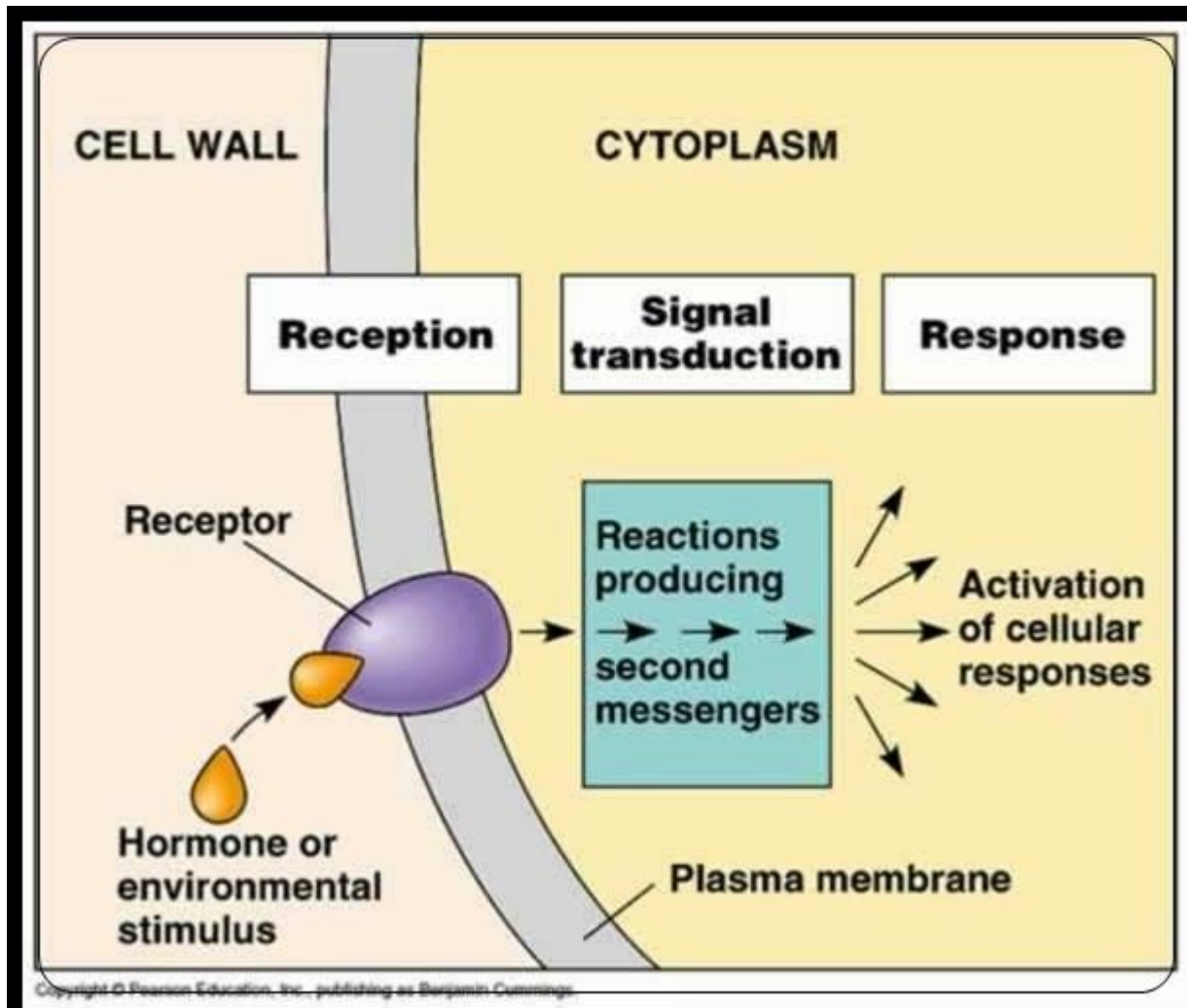


Short term response

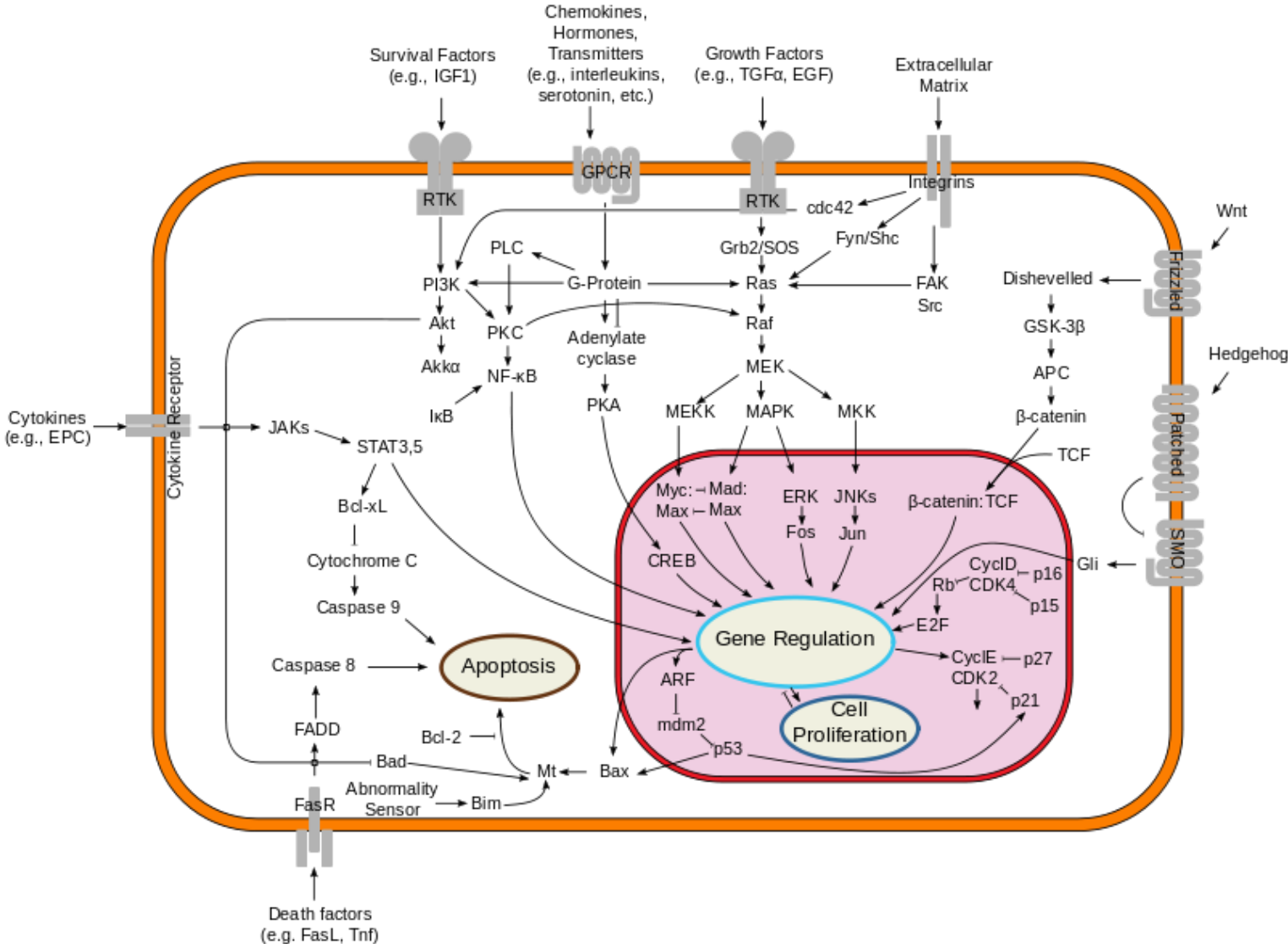


long term response

**Signal transduction** occurs when an extracellular signaling molecule activates a specific receptor located on the cell surface or inside the cell. In turn, this receptor triggers a biochemical chain of events inside the cell, creating a response. Depending on the cell, the response alters the cell's [metabolism](#), shape, [gene expression](#), or ability to divide. The signal can be amplified at any step. Thus, one signaling molecule can cause many responses.



# An example of signal CASCADE and TRANSDUCTION pathways



Receptors: Cell surface receptors (CSR). They interact with the extra cellular environment giving rise to four types of signals:

- Nerve transmission
- Hormone release
- Muscle contraction
- Growth stimulation

There are four types of messenger molecules.

- steroids
- small organic or inorganic molecules
- peptides
- Proteins

The messengers may be

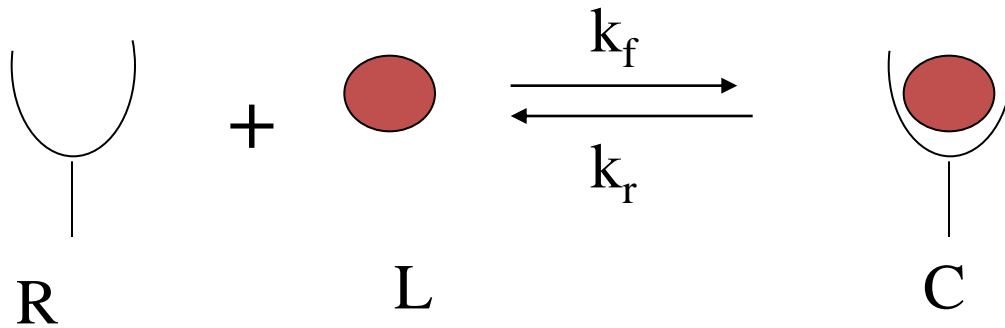
- Endocrine: usually hormones
- autocrine
- paracrine : usually cytokines
- juxtacrine

There are 4 classes of ligand bound receptor signal transduction models

- ion channel receptor (fast ms, low affinity)
- G protein linked receptor (second messenger involved)(medium, mins, med affinity) (GPCR)
- Enzyme (usually Tyrosine kinase i.e. enzyme which adds a phosphate group to proteins at tyrosine residues...ie phosphorylation) linked receptors -Slow and high affinity

# Cell surface receptors

Recettore	Ligando	$R_T$ (numero/cellula)	$k_f$ ( $nM^{-1} min^{-1}$ )	$k_r$ ( $min^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
Trasferrina	Trasferrina (trasportatore ferro negli epatociti)	50000	0.003	0.1	33
EGF	EGF (fattore di crescita epidermale)	25000	0.18	0.12	0.67
Fibronectina (integrina)	Fibronectina	50000	0.0007	0.6	860
Insulina	Insulina	10000	0.0096	0.2	21
TNF	TNF (citochina)	6600	0.93	0.14	0.15
Interleuchina 2	Interleuchina 2 (citochina)	200	1.89	0.014	0.0074



We consider a model of receptor-ligand binding in which binding is monovalent and interfering effects are absent.  $k_f$  and  $k_r$  are the kinetic association and dissociation constants.

$R$ =number of receptors per cell

$C$ =number of complexes per cell

$L$ =conc of ligand in the ECM (moles/liter)

$k_r=t^{-1}$

$k_f=M^{-1}t^{-1}$

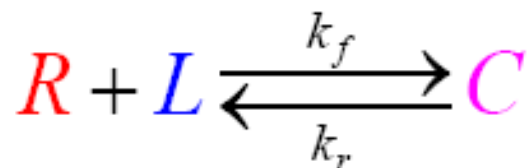
$N$ =number of cells per unit volume

ok



# Monovalent Binding

- For the receptor-ligand reaction:



- We can write a simple **Master Equation** that states that the rate of accumulation of bound complex  $C$  is equal to the rate at which molecules associate to form  $C$  less the rate at which  $C$  dissociates into its components:

$$\frac{dC}{dt} = k_f RL - k_r C$$

- Here
  - $C$  is the concentration of product,
  - $R$  is the concentration of receptor
  - $L$  the concentration of ligand.
- The units for all of these is mol/L or M.  $k_f$  is the forward reaction rate ( $M^{-1}s^{-1}$ ) and  $k_r$  is the reverse reaction rate [ $s^{-1}$ ]

## Monovalent Binding Master Equation

- One can go further by applying “conservation laws”:

$$R_T = R + C \quad \text{and} \quad L_o = L + C$$

- where  $R_T$  = total number of receptors and  $L_o$  = initial ligand concentration. We thus obtain:

$$\frac{dC}{dt} = k_f (R_T - C)(L_o - C) - k_r C$$

- To simplify this, suppose that  $L_o$  is very much larger than  $C$  and thus ligand isn't depleted much by the reaction from its initial value,  $L_o$ . We then get:

$$\frac{dC}{dt} = k_f (R_T - C)L_o - k_r C$$

- As one may check that with the initial condition  $C(t=0) = C_o$ , the solution to this equation is:

$$C(t) = C_o \exp\left[-(k_f L_o + k_r)t\right] + \left(\frac{k_f L_o R_T}{k_f L_o + k_r}\right) \left\{1 - \exp\left[-(k_f L_o + k_r)t\right]\right\}$$

- As  $t \rightarrow \infty$ , (i.e. at equilibrium):

$$C_{eq} = \left(\frac{k_f L_o R_T}{k_f L_o + k_r}\right)$$

Dividing by  $k_f$  we get

$$C_{eq} = \frac{L_o R_T}{L_o + \frac{k_r}{k_f}} = \frac{L_o R_T}{L_o + k_D}$$

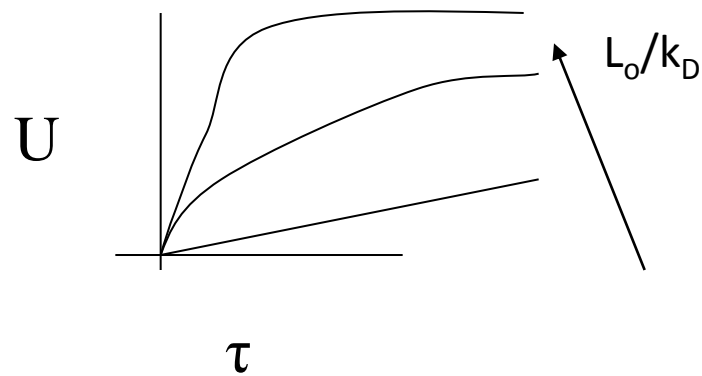
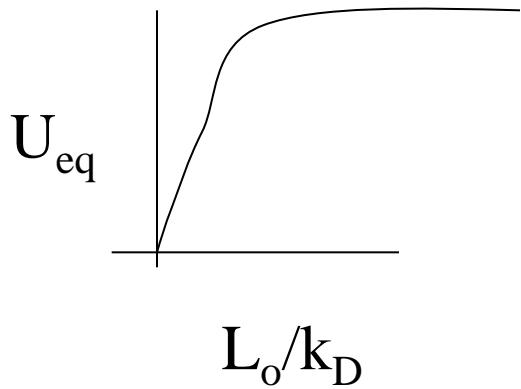
Where we define  $\frac{k_r}{k_f} = k_D$  as the equilibrium dissociation constant.

The equations are more simply expressed in terms of adimensional parameters,  $U$  (ratio of complexes to total number of sites) and  $\tau$  (a characteristic reaction time).

$$U(\tau) = U_o \exp\left(-\left\{1 + \frac{L_o}{k_D}\right\} \tau\right) + \frac{\frac{L_o}{k_D}}{1 + \frac{L_o}{k_D}} \left(1 - \exp\left(-\left\{1 + \frac{L_o}{k_D}\right\} \tau\right)\right)$$

$$U_{eq} = \frac{\frac{L_o}{k_D}}{1 + \frac{L_o}{k_D}}$$

$$U_{eq} = \frac{L_o/k_D}{1 + L_o/k_D}$$



A variety of messengers can bind to various tissues.

Various cellular responses may occur, depending on the tissue.

Either positive or negative responses may occur, even in the same tissue, depending on the type of receptor.

The response of a cell to a messenger depends on the number of receptors occupied.

A typical cell may have about 1000-3000 receptors.

Only a small fraction (10%) of the receptors need to be occupied to get a large (50%) response.

Receptors may have a dissociation constant of about  $10^{-11}$ ; this is the concentration of messenger at which they are 50% saturated. Thus very low concentrations of messengers may give a large response.

Receptor	Ligand	Cell	$R_T$ (#/cell)	$K_f$ ( $M^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$K_r$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_d$ (M)	$T_{95\%}$ (min)
Fc	Fab	macrophage	7.1e5	3e6	0.023	7.7e-10	650
EGF	EGF	Rat lung	2.5e4	1.8e8	0.12	6.7e-10	12.5
Fibronectin	Fibronectin	fibroblasts	5e5	7e5	0.6	8.6e-7	2.5
Transferrin	Transferrin	hepatocytes	5e4	3e6	0.1	3.3e-8	15

# Cell adhesion, cell cohesion

CAM :Cell Adhesion molecule, classified as CSR : cell surface receptors. Common names VCAM, PECAM.

Cells can adhere to each other (cohesion)

Or to the ECM (adhesion)

CAMs are responsible for structural integrity of adherent cells

# Cell adhesion, cell cohesion: why?

- Scaffold colonization
- Motility
- Metastasis
- Wound healing
- Morphogenesis

There are 3 types of junctions between cells and cells or cells and ECM

Tight junctions- especially in epithelial cells, they prevent diffusion of molecules

Communicating junctions – gap junctions, they regulate transport. For example in the liver and kidney

Anchoring junctions- they provide mechanical links- through integrins and cadherins



Linked to the cytoplasm  
through cytoskeleton

~~Three types of anchoring junctions:~~

- ~~•adherens -actina~~
- ~~•Desmosomes-filamenti intermedi~~
- ~~•Hemidesmosome- solo ECM fuori e filamenti intermedi dentro~~

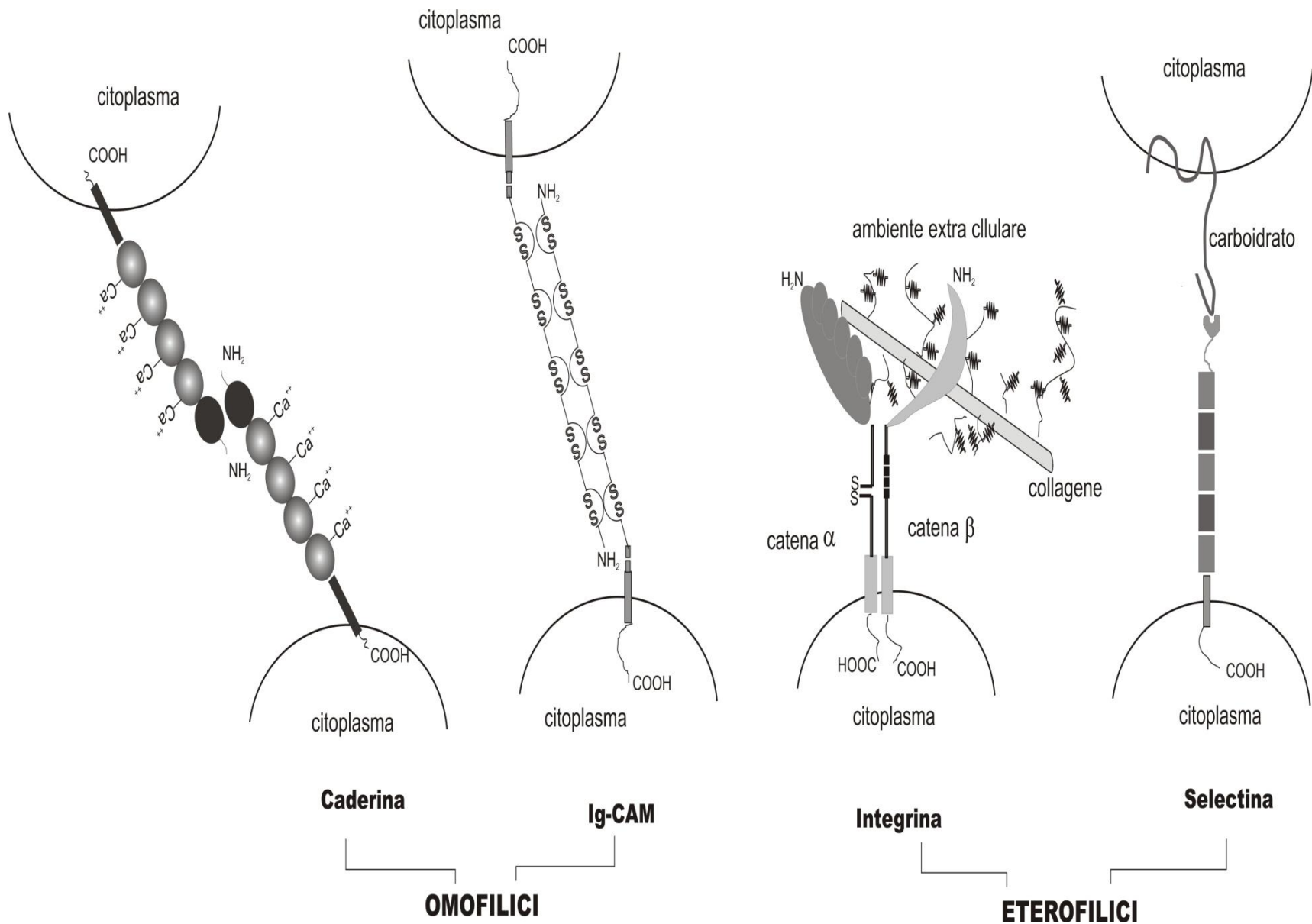


# CAMs

Il meccanismo di riconoscimento attraverso i CAM è uno dei principali modi in cui la cellula interagisce con suo ambiente.

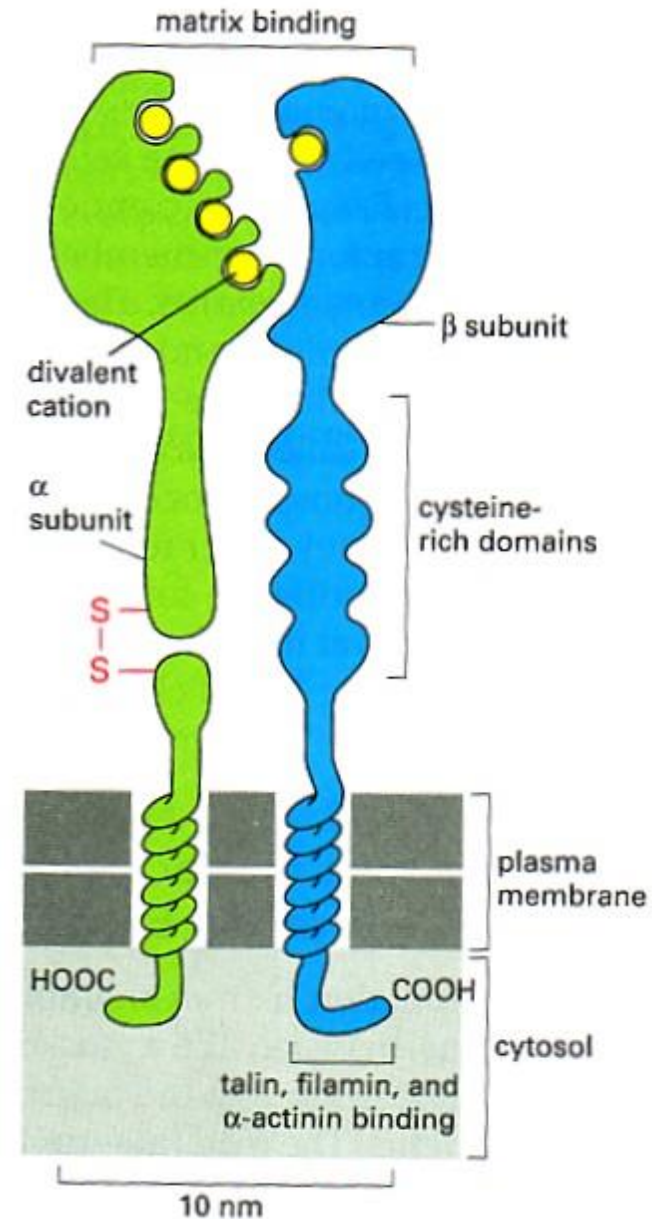
CAM	Caratteristiche
Integrine	-legano ai ligandi adesivi della matrice extra cellulare, sono detti legami eterofilici
Caderine	- legano a cellule vicine, generalmente omotipici (caderina-caderina) e sono calcio dipendenti. Le caderine sono <b>fondamentali per la morfogenesi.</b>
Ig CAM	- legano a altre cellule, generalmente formando legami omotipici, sono meno forti di legami caderine-caderine e sono le uniche CAM che non dipendono dalla presenza di calcio.
Selectine	- legano a mucine (la parte glicosata delle proteine), quindi formano legami eterofilici.

Why are integrins not so important during early morphogenesis?



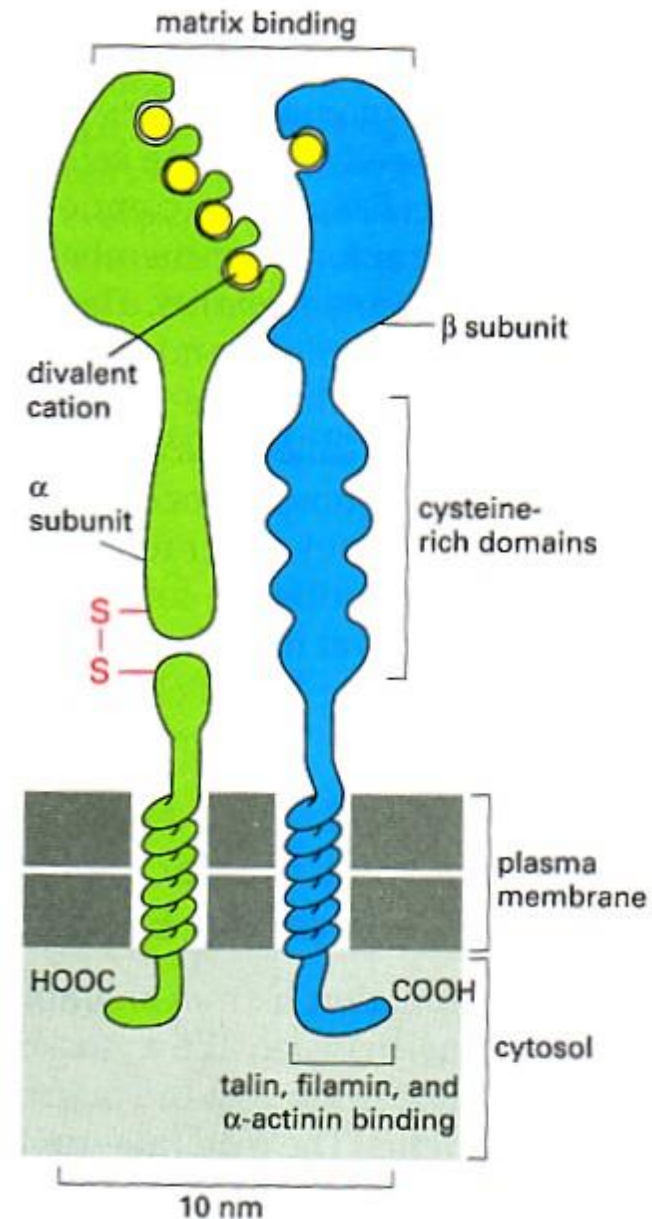
## Le integrine

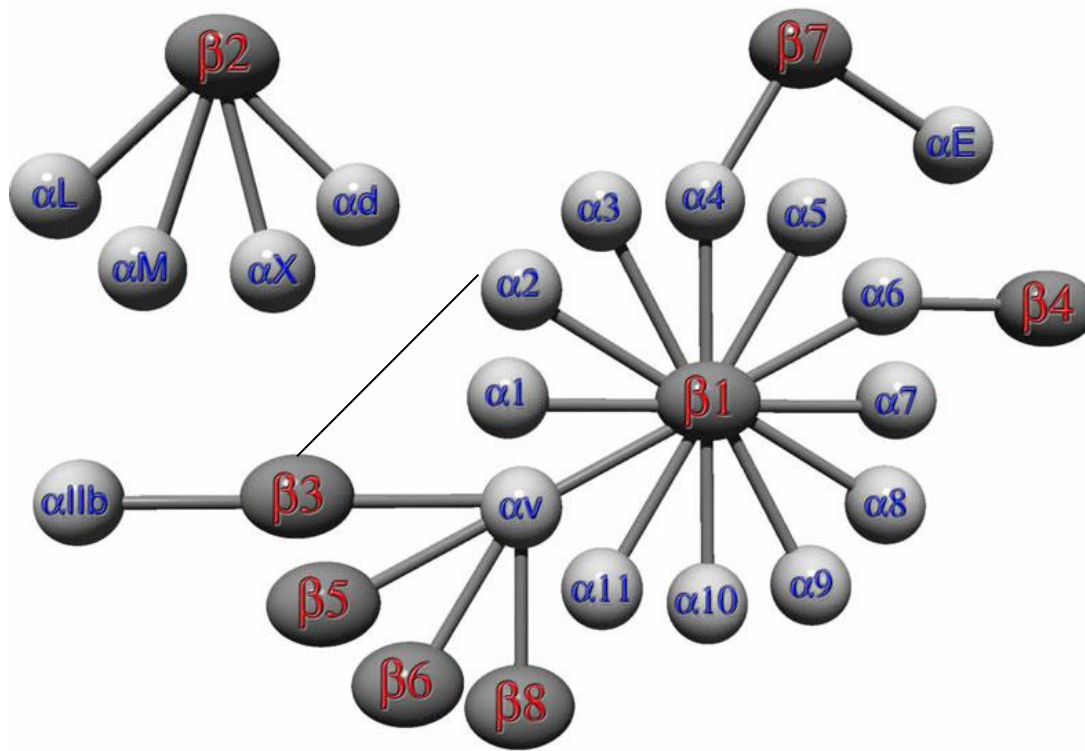
Sono delle proteine recettori che stanno sulla membrana cellulare, e modulano le interazioni tra cellula e la MEC. Tra queste interazioni, differenziazione, apoptosi, adesione, guarigione (“wound healing”). Insieme con le caderine, formano la famiglia di proteine recettori che sono coinvolte nelle interazioni cell-cell e cell-ECM.



Sono proteine transmembrane con 2 subunita glicoproteiche , alpha e beta non legate cov. tra di loro. Si dice proteine eterodimeriche in cui le varie  $\alpha$  e  $\beta$  sono omologhe fino al 40% . Per ora sono state identificate 9 subunità  $\alpha$  e circa 16  $\beta$ , e 24 integrine. Di queste 8 riconoscono Fn e 5 laminina. La catena  $\alpha$  è piu specifico nel riconoscimento.

Che differenza c'è tra la struttura delle integrine e quella dei anticorpi?





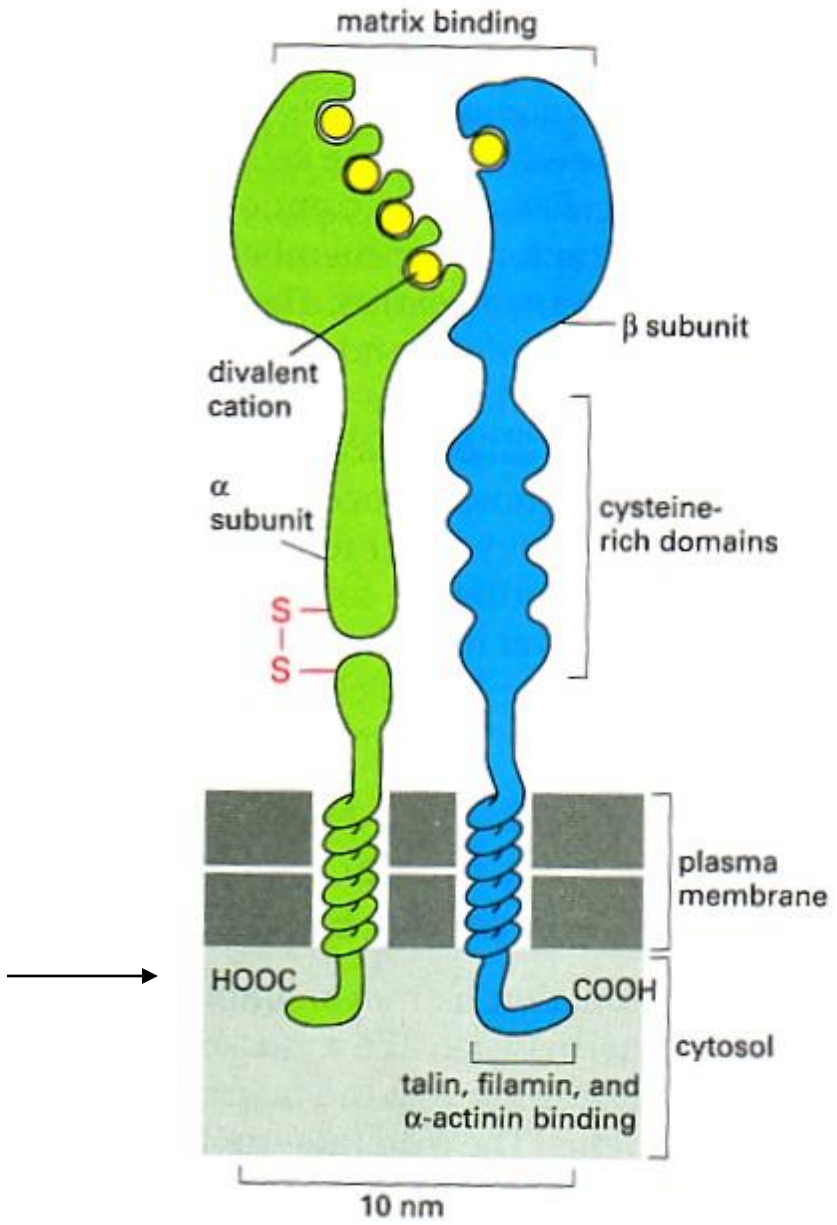
integrins.hypemart.net

INTEGRIN	LIGAND*	DISTRIBUTION
$\alpha_5\beta_1$	fibronectin	ubiquitous
$\alpha_6\beta_1$	laminin	ubiquitous
$\alpha_7\beta_1$	laminin	muscle
$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, see p. 1411)	Ig superfamily counterreceptors	white blood cells
$\alpha_2\beta_3$	fibrinogen	platelets
$\alpha_6\beta_4$	laminin	epithelial hemidesmosomes

\*Not all ligands are listed.

Integrin binding is calcium dependent. ECM proteins have specific amino acid sequences which bind to integrins. The most well known sequence is the RGD tripeptide (arginine, glycine, aspartic acid). Found in fibronectin, collagen, laminin. The alpha subunit is mainly responsible for recognition.

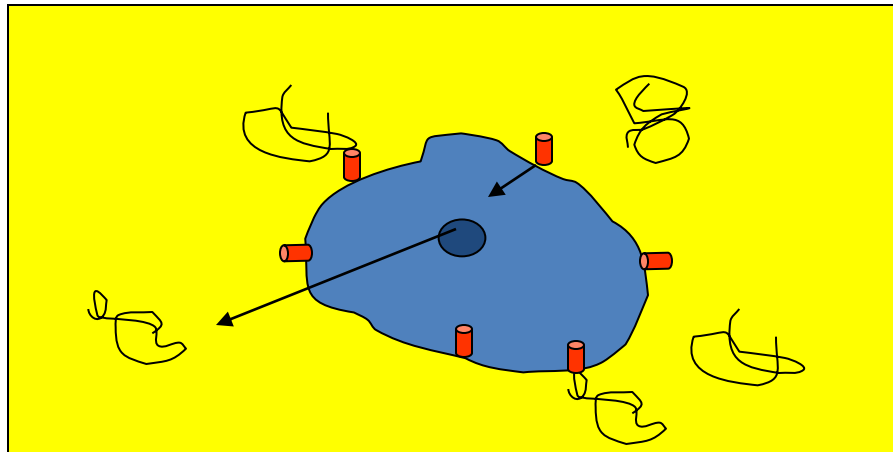
50 AA residues



## Le integrine

L'importanza dell'interazione tra cellule e la ECM. Livello macromolecolare. L' ECM non è solo una struttura di supporto ma gioca un ruolo attivo e importante in tante funzioni cellulari. Migrazione, proliferazione, differenziazione, apoptosis. Inoltre modula l'espressione delle citochine e i fattori di crescita e attiva la trasduzione e segnalazione intracellulare. Il rapporto cellule ECM funziona per reciprocità dinamica. La ECM è l'ambiente che regola la dinamica dell'espressione genetica e differenziazione.

Le molecole del ECM interagiscono con i recettori (CSR-cell surface receptors, in particolare i CAM) che trasmettono segnali attraverso la membrana a molecole dentro i citoplasma. Questi segnali iniziano una cascata di eventi attraverso il CSK al nucleo (cytoskeleton) che risultano nell'espressione di geni. Questi vanno trascritti in proteine che hanno un effetto sull' ECM.



The cytoskeleton: microfilaments, intermediate filaments and filaments.

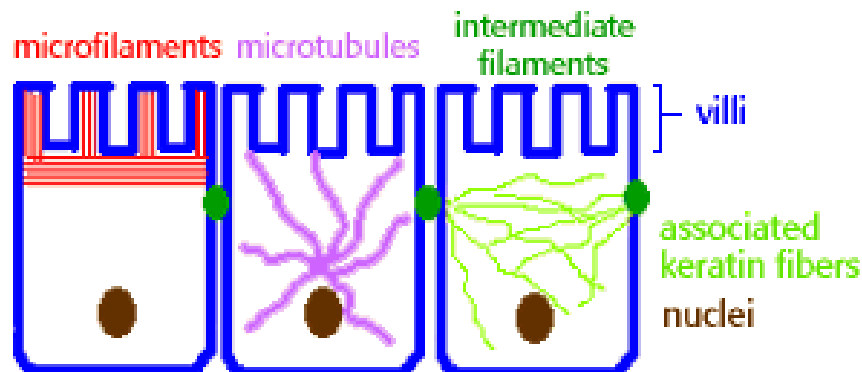
Function: cell shape, motility, division, **mechanical strength (incompressible, resistant to tension)**.

**Micro filaments: Actin** – contractile 3-6 nm

**Intermediate filaments** (fibrous proteins eg desmin, vimentin)- 10 nm. - tensile, rope like structures, much longer than actin. Form the structural framework in the cell.

**Microtubules** 25 nm. Cell shape and motility.  
Tracks for vesicle movement

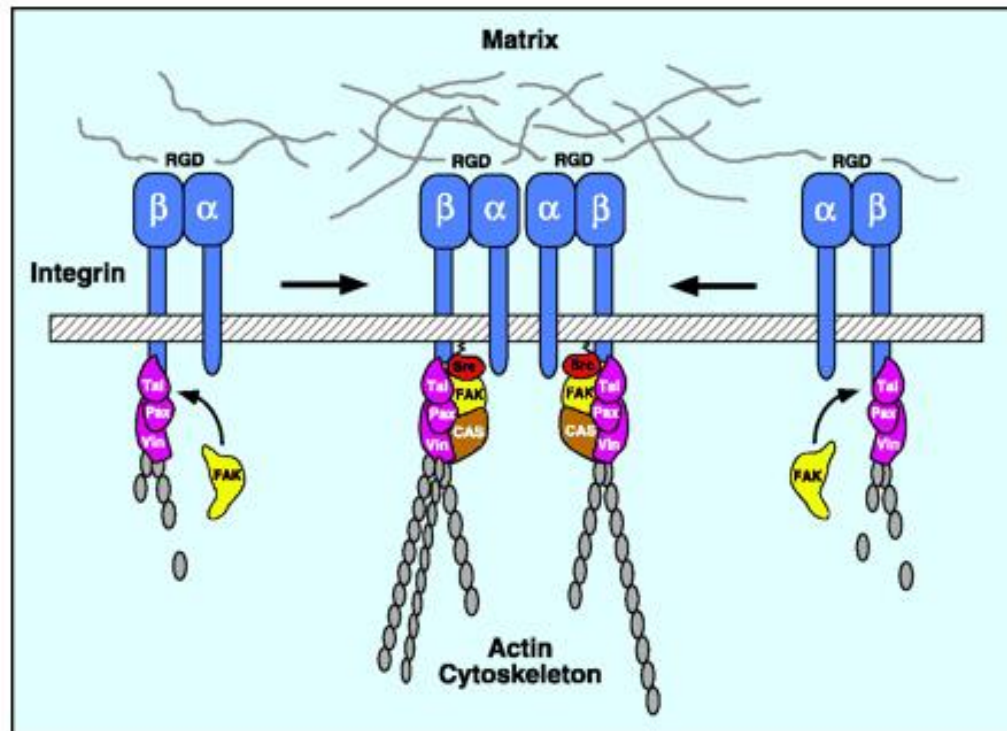
**Cytoskeletal components of intestinal epithelial cells**





- Gran parte dell'integrina sta fuori nello spazio extra cellulare.
- La parte extra c. del dominio  $\alpha$  ha 4 siti per legare a ioni  $++$  e sono coinvolti nel legame calmodulina che è sempre presente nelle interazioni.
- Il legame con la ECM induce dei segnali intra cellulari. La parte interna interagisce con il CSK. *In generale, segnale dal ECM attraverso le integrine vengono trasdotte via il CSK e induce cambiamenti di forma che portano a movimento, proliferazione, differenziazione ecc.*
- Alcuni recettori sono specifici altri riconoscono più epitopi
- Possono anche diversificarsi (plasticità e ridondanza)
- Affinità  $10^6$ - $10^9$  litri/mole. Da confrontare con l'affinità anticorpo-antigene.
- Sono presenti in concentrazioni da 10 o più di 1000 per cellula. La loro azione dipende dalla concentrazione locale di ligandi, e possono solo agire quando presente in densità locali grandi (zone di adesioni focali o emidesmosomi). Quando sono diffusi in maniera omogenea sulla CM, non c'è adesione. Dopo alcuni stimoli, si raggruppano in contatti focali, e la somma delle loro affinità per unità di area aumenta. Le integrine possono spostarsi per espolarare l'ambiente. Se l'affinità fosse alta, non sarebbe facile interrompere il legame e non ci sarebbe motilità cellulare.
- Multiple weak adhesions-----few strong adhesions [440 nm e 160 nm ]

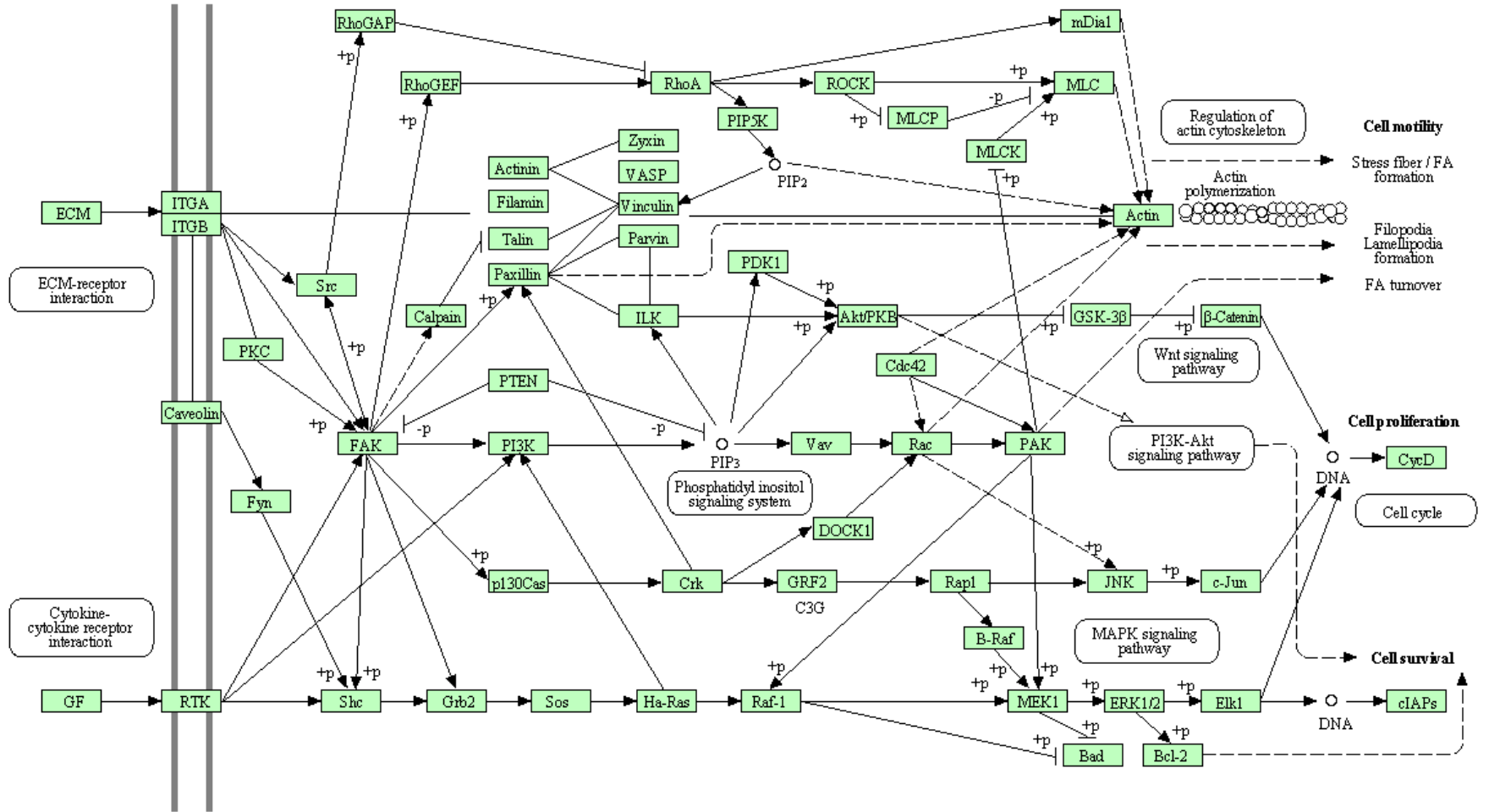
- Le Integrine si raggruppano e inizia una cascata di segnali
- *Focal adhesion kinase (FAK)*, un enzima tyrosina kinase è coinvolta
- FAK arriva agli contatti focali e viene fosforilato, iniziando una cascata di reazioni (quasi sempre di fosforilazione) che finiscono in una concentrazione di proteine nella zona focale.
- Il segnale viene trasmesso all'interno della cellula attivando l'organizzazione dello citoscheletro

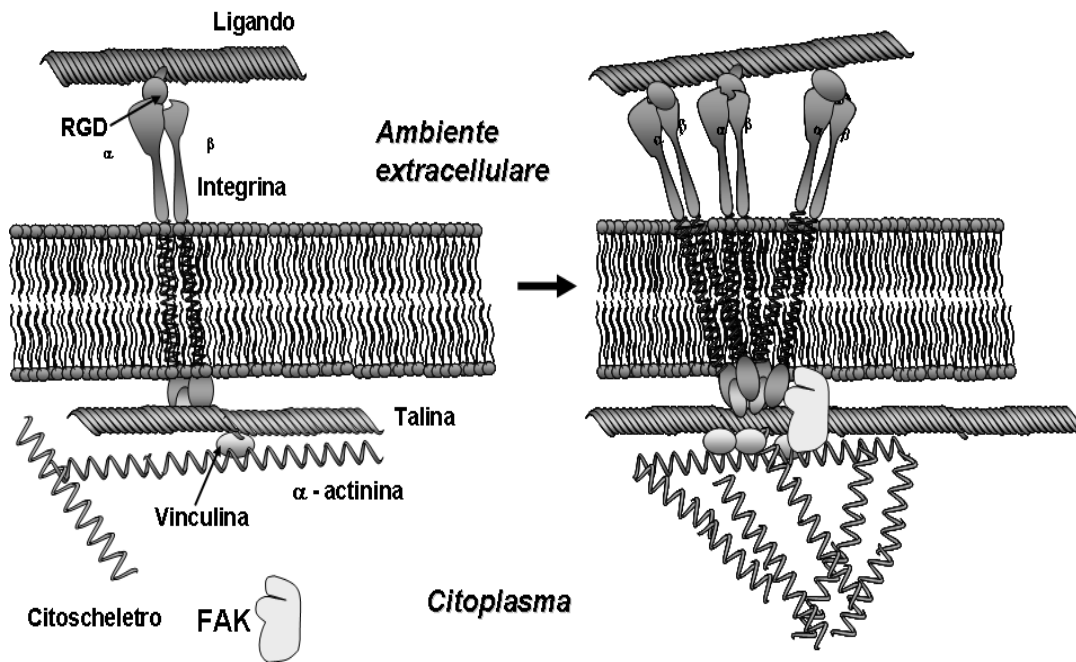


# What is protein phosphorylation?

- Addition of a  $\text{PO}_4^{3-}$  group to a protein. Makes the protein hydrophilic and polar, changes conformation. Thus activates other proteins (enzymes)
- Phosphorylation forms the basis of many enzymatic biochemical reactions.
- Amino Acids which phosphorylate are serine, threonine, tyrosine
- It is different to oxidative phosphorylation, why?

**FOCAL ADHESION**

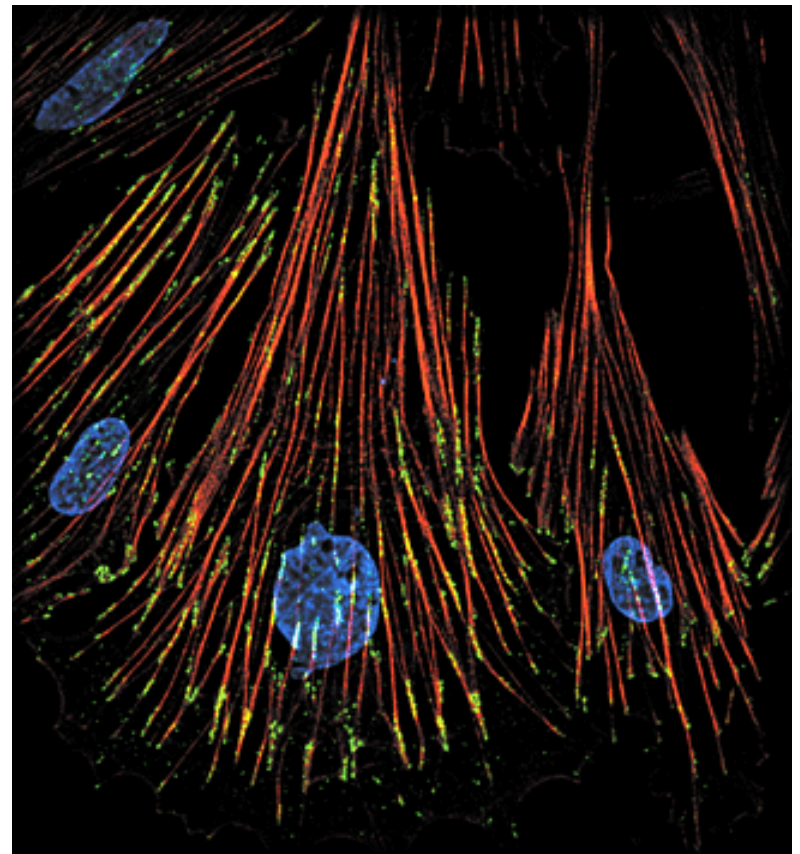
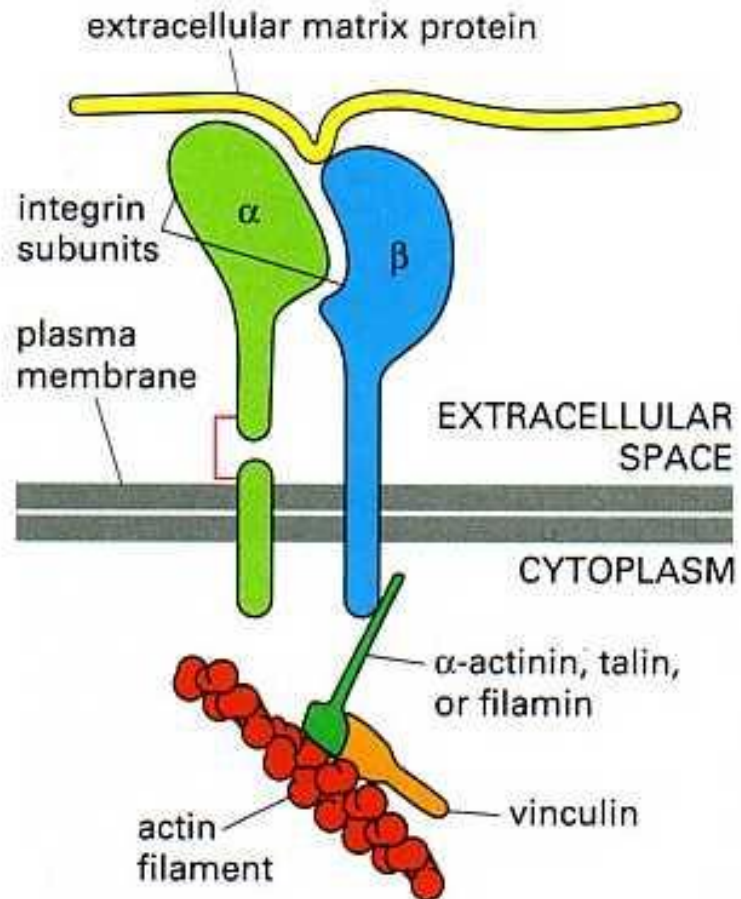


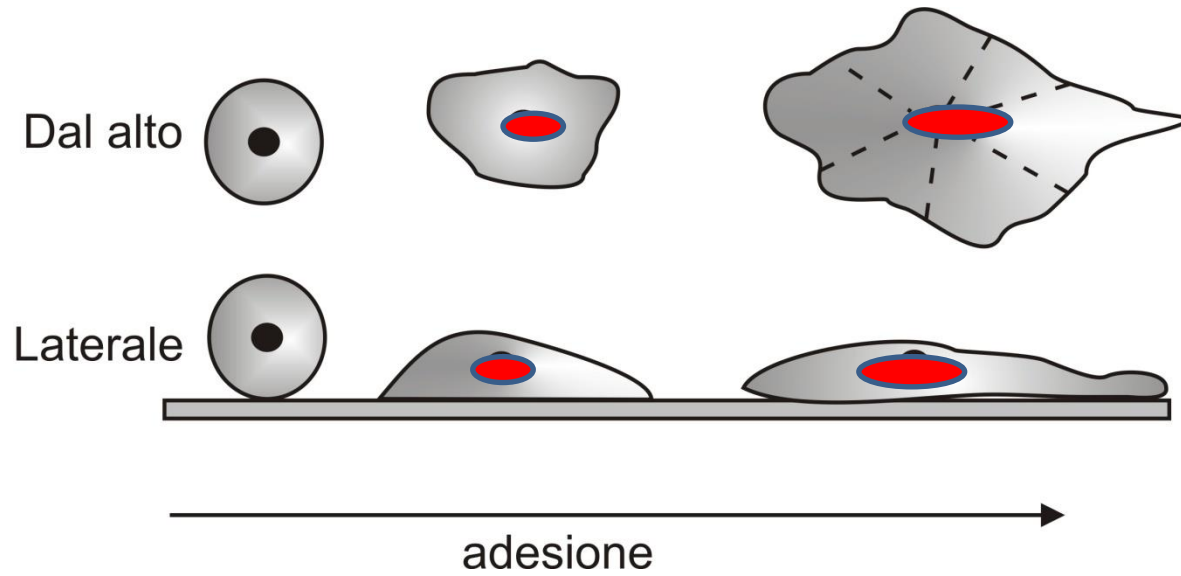


Quando l'ambiente extra cellulare è ricco di ligandi adesivi, le integrine migrano verso un punto comune della membrana per formare contatti focali. La zona citoplasmica delle integrine è associata con alcune proteine (talina, vinculina e  $\alpha$ -actinina) e nelle zone focali si forma un complesso proteico grazie all'attività dell'enzima FAK (focal adhesion kinase). Questo complesso proteico (FAC focal adhesion complex) è capace di attivare una cascata di segnali che inizia con la fosforilazione della FAK e con il conseguente accoppiamento di quest'ultimi con i microfilamenti del citoscheletro. Grazie a queste interazioni, il citoscheletro viene riorganizzato, riorientato e contratto; formando così le cosiddette fibre di stress-cioè fibre di actina polimerizzate (F-actin), e la cellula viene ancorata alla ECM. Un ancoraggio organizzato e meccanicamente consolidato si chiama adesione focale. **L'ancoraggio è accompagnato da un cambiamento di forma e proprietà meccaniche.**

## **Il processo di adesione**

- 1. L'integrina lega al RGD (pochi secondi)**
2. La prima proteina (già presente) è talina, quasi sempre associata a vinculina. Talina ha siti per legarsi a integrine, actina e vinculina. Questa è la prima proteina che cambia conformazione
3. La proteina alfa actinina lega fibrille di actina ai CAM. Questa proteina reticola **le fibrille di actina che polimerizzandosi diventano filamenti contrattili, formando le microfibrille**. Altre proteine importanti sono la filamina e la paxillina
4. In **presenza di più integrine** arriva il FAK *Focal adhesion kinase*, un enzima tyrosina kinase, che legandosi al complesso proteico si fosforilizza (a un residuo tyrosina) e così diventa altamente reattivo iniziando la cascata di reazioni e la **formazione di un complesso proteico sotto l'integrina (il FOCAL ADHESION COMPLEX)**.
5. **Di seguito c'è una riorganizzazione del citoscheletro, e la cellula diventa rigida, contrattile e più spansa Di solito c'è anche l'espressione proteica. T= poche ore.**
  - 6. Il segnale viene così trasmesso all'esterno della cellula. L'ancoraggio è accompagnato da un cambiamento di forma e proprietà meccaniche.**



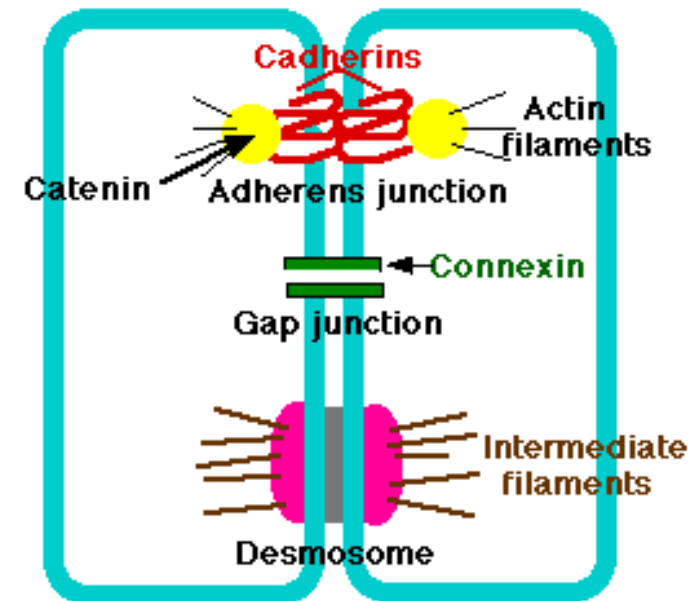


***Cellula non adesa, poco adesa e molto adesa, su un substrato.***

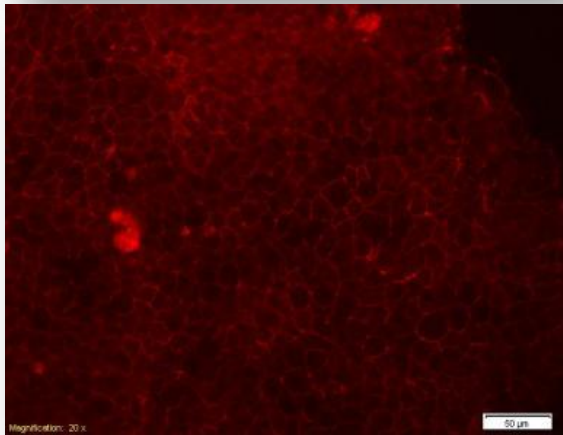
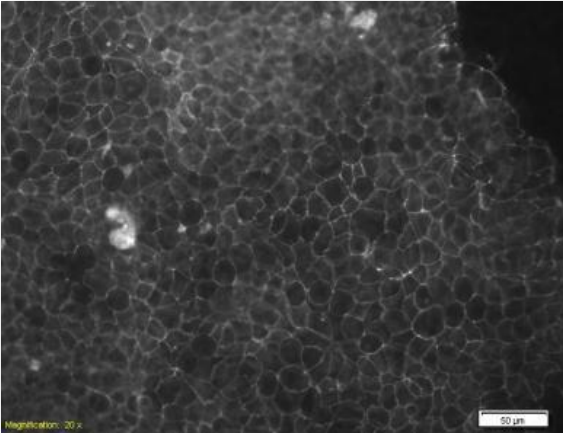


## Le Caderine

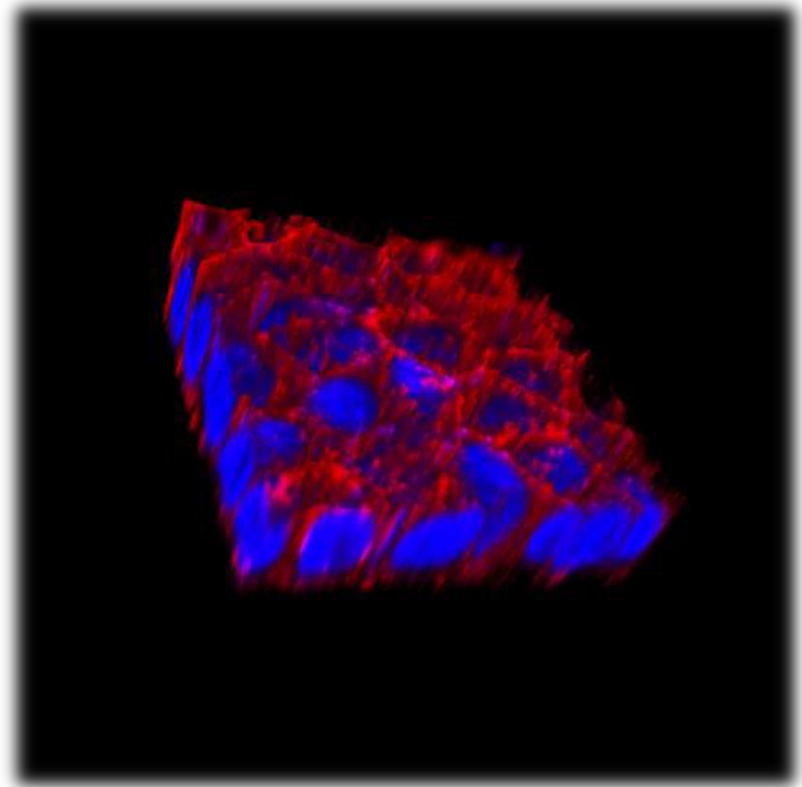
Sono molecole presenti nei tessuti dei vertebrati e la loro azione dipende dalla presenza di calcio. Inizialmente sono state nominate in base al tessuto di appartenenza: caderina-E (epitelio), caderina-N (nervi) e caderina-P (placenta). Ogni tipo di cellula esprime un determinato set di caderine, che può cambiare se le funzioni della cellula cambiano. La porzione extracellulare è molto estesa e composta da cinque domini, di circa 100 amminoacidi ciascuno. Quattro di questi domini sono omologhi e contengono siti di legame per il calcio, ione indispensabile per la loro funzione. Solitamente le caderine sono impegnate in legami omofilici, di conseguenza, le caderine presenti sulla superficie di una cellula si legano alle caderine presenti sulle superfici cellulari adiacenti. La loro affinità è piuttosto bassa, e il principio di funzionamento è simile a quella delle integrine.



# Intestinal epithelia



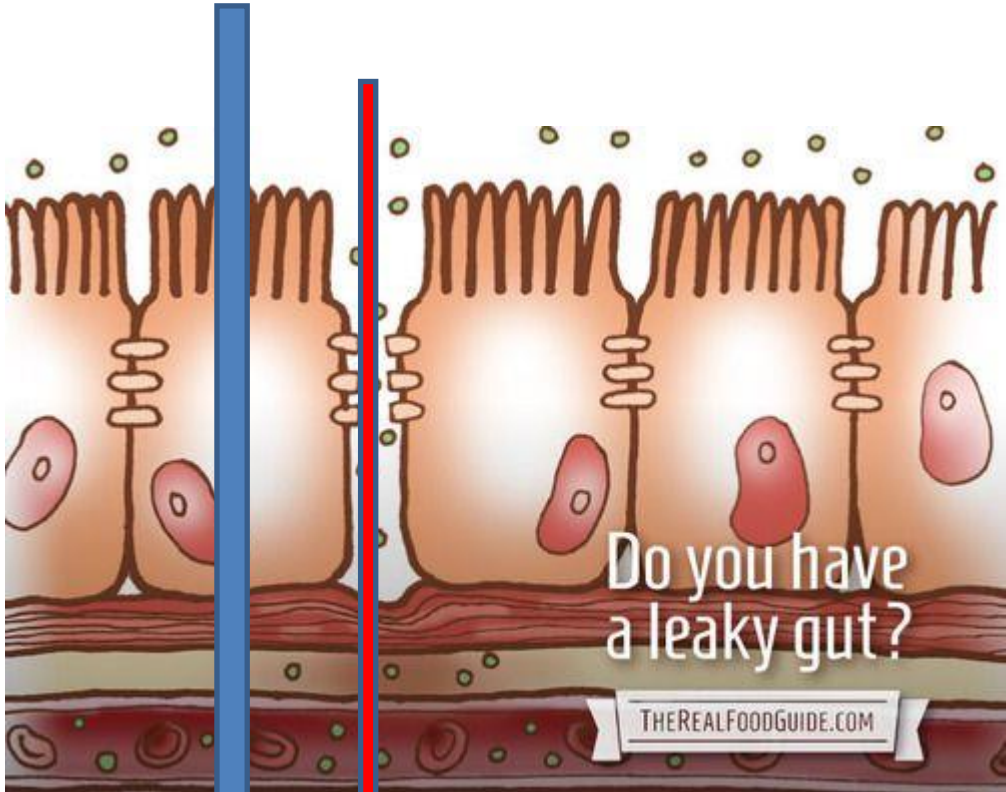
20X



Tight junctions :red. Nuclei:blue

transcellular

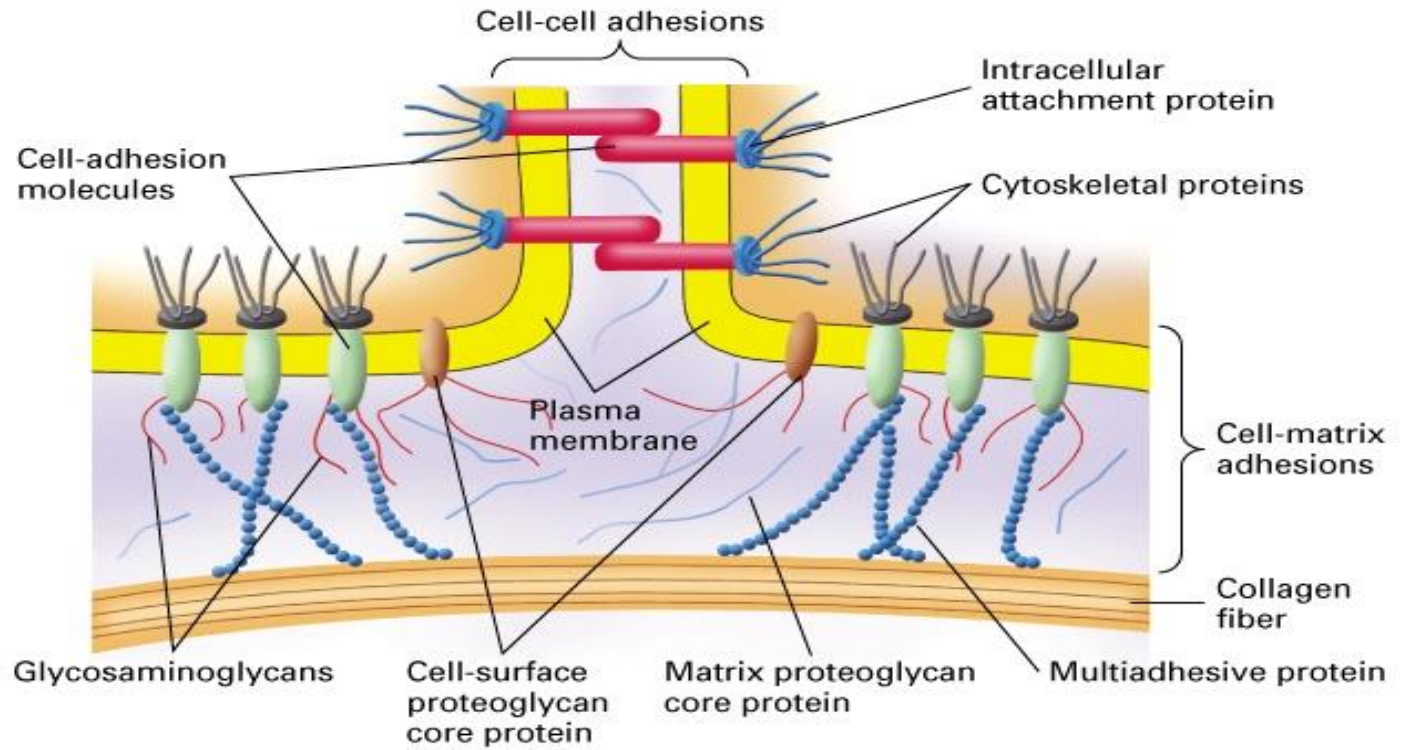
TEER-  
trans-  
epithelial-  
electrical  
resistance



Tight junctions

Integrins  
Basal lamina

paracellular



## **Le Ig-CAM**

Questi recettori assomigliano agli anticorpi e sono importanti nella regolazione fine della coesione, soprattutto nell'embrione. (Ca<sup>+</sup> independent)

## **Le Selectine**

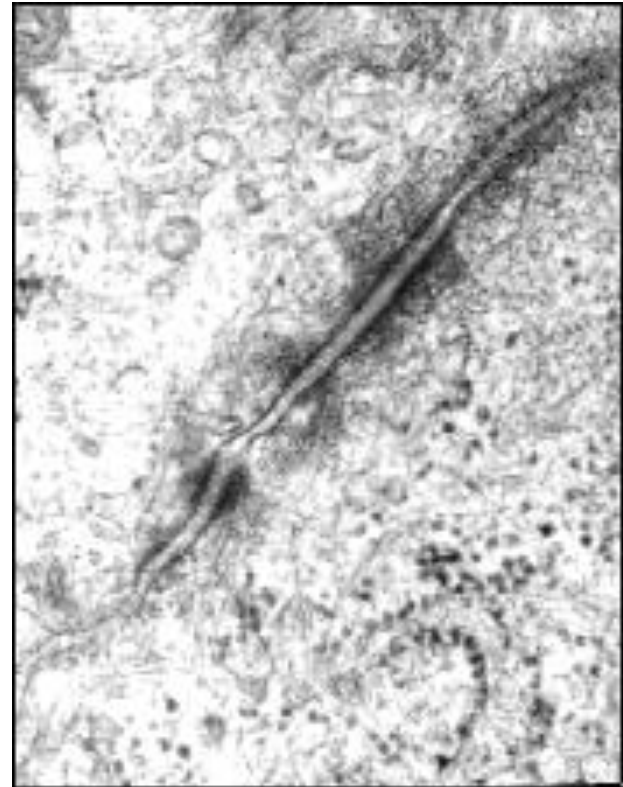
Le selectine possiedono un dominio capace di legarsi ai carboidrati e giocano un ruolo nella risposta infiammatoria perchè in genere si legano agli zuccheri presenti sulla superficie dei neutrofili.

Le caderine sono importanti per lo sviluppo, aggregazione e disaggregazione cellulare (up and down regulation).

Anticorpi contro cadherina rompono i legami e distruggono l'epitelio

Sono Ca dipendenti

E cad (epiteliale), N cad, ecc



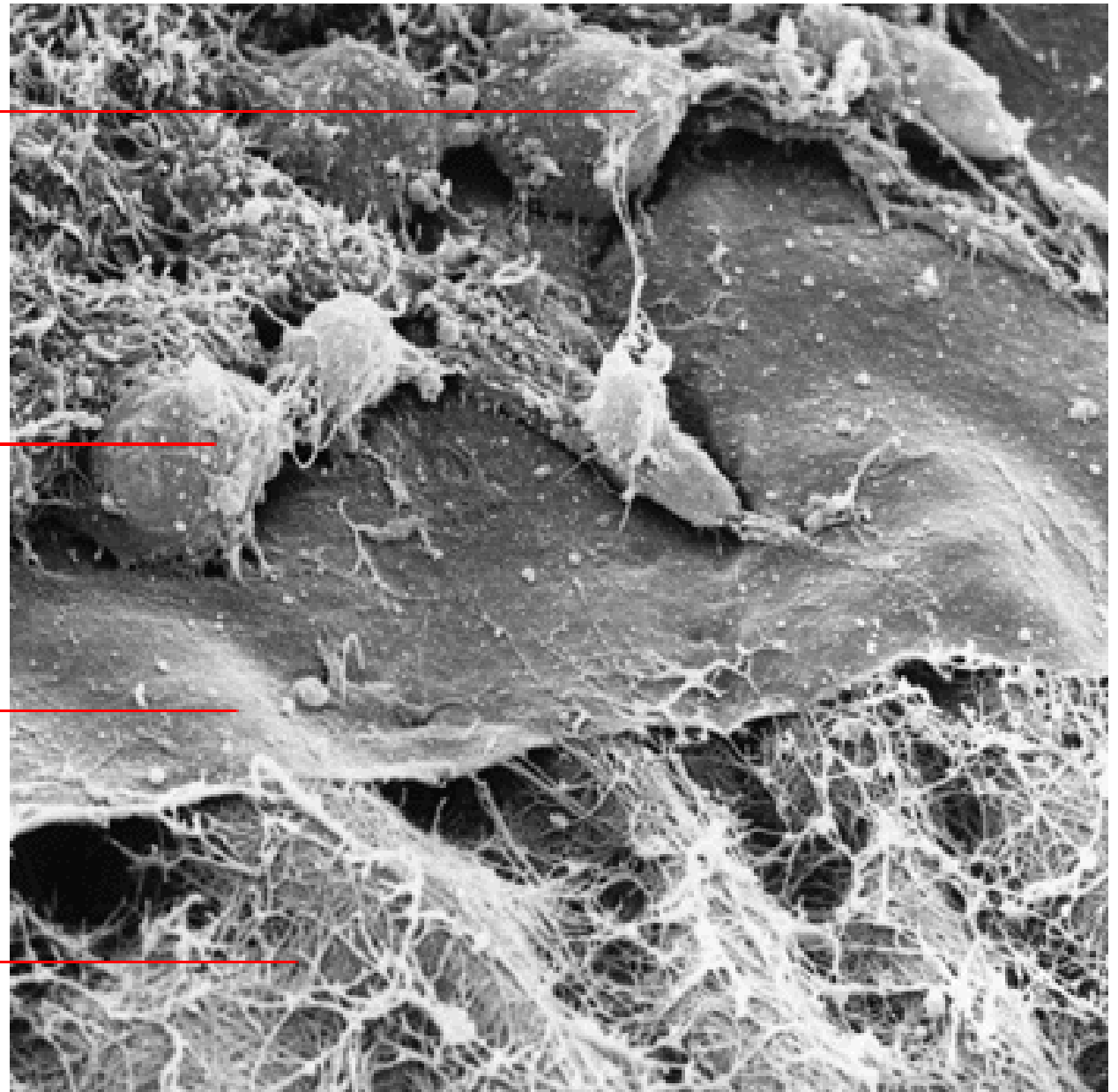
I IgCAM (LCAM e NCAM) invece non sono  $Ca^{++}$  dipendenti, meno forti delle caderine, e possono cambiare la forza del legame riducendo la lunghezza della catena extra citoplasmica

**Epithelial cells**

**Epithelial cells**

**Basal lamina**

**Collagen fibrils**



10  $\mu\text{m}$

**Scanning electron micrograph of a basal lamina in the cornea of a chick embryo**

Stimare il numero di integrine che una cellula endoteliale deve possedere per superare le forze di taglio imposte dal flusso sanguigno in un'arteria.

Diametro cellula= 20  $\mu\text{m}$ , altezza trascurabile

Velocità media del sangue nell'arteria di diametro 1.5 cm= 40 cm/s

Viscosità del sangue=0.004 Pas

Usare i dati per il problema sotto.

Uno dei problemi associato all'utilizzo di scaffold sintetici per l'ingegnerizzazione dei vasi è la mancanza di un'adeguata adesione di cellule endoteliali sulla parete luminale, che causa la formazione di trombi e altre complicazioni. Uno degli approcci considerati è l'immobilizzazione di ligandi di adesione, tipicamente in forma di sequenze amminoacidi contenenti RGD. Dato che un'integrina si lega a un RGD, calcolare la densità superficiale ( $\#/\mu\text{m}^2$ ) di RGD necessario per assicurare un'adeguata adesione e quindi la distanza tra un ligando e l'altro. Discutere alcuni dei problemi che si possa incontrare con l'utilizzo di questo approccio. I dati sono da confrontare con le densità superficiali di 600-700 ligandi/ $\mu\text{m}^2$  necessarie per formare adesioni focali riportate in Cavalcanti-Adam et al (Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands, Biophysical Journal, Volume 92, 2007 p. 2964–2974).



Considerare una coltura di condrociti seminati su scaffold porosi in microwells da 1.5 ml, con  $1 \cdot 10^6$  cellule/scaffold. I condrociti esprimono circa  $10^5$  recettori per TGF- $\beta$ , un fattore di crescita. A che concentrazione di TGF- $\beta$  si ha il fenomeno di ligand depletion?  $K_D$  per il legame TGF- $\beta$ - recettore per TGF- $\beta$  e'  $10^{-10}$  Molare.

La molecola di dexametasone (DEX) aumenta la produzione di collagene in osteoblasti, grazie all'interazione di DEX con un recettore. Per controllare la produzione di collagene in vivo e in vitro, si può utilizzare un farmaco che inibisce l'azione del DEX in maniera competitiva. La massima velocità di produzione di collagene è 100 molecole/cellula/s. In un tipico esperimento si aggiunge una concentrazione di  $1 \cdot 10^{-8}$  M di DEX che dà luogo a una produzione del 75%.

a) Calcolare il  $K_D$  (costante di equilibrio) del DEX.,

b) si aggiunge poi il farmaco che inibisce la produzione di collagene. A  $5 \cdot 10^{-7}$  M di farmaco, la produzione diminuisce al 65%. Calcolare il  $K_D$  per il farmaco inibitore..

c) Che concentrazione di DEX ci vuole per resituare la produzione di collagene in presenza di  $5 \cdot 10^{-7}$  M del farmaco ?

d) quali assunzioni si fanno per ottenere le soluzioni a a, b, e c?.