



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

CORSO DI STUDIO IN BIOINGEGNERIA

Tesi di Laurea per il conseguimento del titolo di  
Dottore Magistrale in Bioingegneria

**Progetto e sviluppo di esperimenti cellulari in vitro e  
corrispondente applicativo software per la valutazione  
di alterazioni meccaniche cellulari responsabili di  
patologie diverse nella muscolatura liscia umana**

Benedetta de Michele

Marzo 2022

*Relatore:* Prof. Ing. Francesco Beltrame Quattrocchi

*Correlatore:* Dott. Ing. Federica Viti, Dott. Raffaella Magrassi



# Indice

|                                                    |           |
|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>Sommario.....</b>                               | <b>5</b>  |
| <b>Capitolo 1 Introduzione .....</b>               | <b>7</b>  |
| <b>Capitolo 2 Stato dell'arte .....</b>            | <b>9</b>  |
| 2.1. Miopatia viscerale.....                       | 9         |
| 2.2. Diagnosi .....                                | 10        |
| 2.2.1. Actina.....                                 | 11        |
| 2.2.2. Adesioni focali.....                        | 11        |
| 2.2.3. Movimento cellulare .....                   | 13        |
| 2.3. Terapia .....                                 | 14        |
| 2.4. Traction Force Microscopy .....               | 14        |
| 2.5. DNA e RNA.....                                | 15        |
| 2.5.1. Replicazione DNA .....                      | 17        |
| 2.5.2. Ribosomi.....                               | 18        |
| 2.6. Oligonucleotidi antisenso.....                | 19        |
| 2.6.1. Locked Nucleic Acids (LNA).....             | 20        |
| 2.6.2. Meccanismo d'azione .....                   | 22        |
| 2.6.3. Somministrazione.....                       | 24        |
| <b>Capitolo 3 Materiali e metodi .....</b>         | <b>26</b> |
| 3.1. Colture cellulari.....                        | 26        |
| 3.2. Linee cellulari .....                         | 29        |
| 3.3. Protocollo di traction force microscopy ..... | 29        |
| 3.3.1. Substrati .....                             | 31        |
| 3.3.2. Protocollo di esecuzione.....               | 31        |
| 3.3.3. Clomipramina (CLM) .....                    | 32        |

|                                             |                                                                       |           |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.                                        | Protocollo ASO e CLM.....                                             | 33        |
| 3.5.                                        | Microscopia confocale per l'acquisizione delle immagini .....         | 33        |
| 3.6.                                        | Sortware ImageJ per elaborazione delle immagini .....                 | 36        |
| 3.7.                                        | Software Cellogram per calcolo traction force .....                   | 36        |
| 3.6.1.                                      | Detection .....                                                       | 37        |
| 3.6.2.                                      | Meshing.....                                                          | 39        |
| 3.6.3.                                      | Analisi agli elementi finiti e risultati.....                         | 42        |
| 3.6.4.                                      | Protocollo di analisi .....                                           | 45        |
| 3.8.                                        | Analisi statistica dei dati.....                                      | 45        |
| 3.8.1.                                      | Protocollo e software utilizzati.....                                 | 46        |
| <b>Capitolo 4 Esperimenti condotti.....</b> |                                                                       | <b>48</b> |
| 4.1.                                        | Linee cellulari .....                                                 | 48        |
| 4.2.                                        | Criticità riscontrate.....                                            | 48        |
| <b>Capitolo 5 Risultati ottenuti.....</b>   |                                                                       | <b>50</b> |
| 5.1.                                        | Confronto tra casi miogenici e sani.....                              | 51        |
| 5.2.                                        | Confronto tra casi neurogeni e sani.....                              | 52        |
| 5.3.                                        | Confronto tra casi non miogenici e miogenici .....                    | 53        |
| 5.4.                                        | Confronto tra considerando i casi miogenici severi .....              | 54        |
| 5.5.                                        | Confronto tra campioni trattati con CLM e campioni non trattati ..... | 55        |
| 5.6.                                        | Confronto tra campioni trattati con ASO e campioni non trattati ..... | 57        |
| <b>Capitolo 6 Conclusione.....</b>          |                                                                       | <b>59</b> |
| <b>Bibliografia.....</b>                    |                                                                       | <b>61</b> |

# Sommario

La miopatia viscerale è una condizione rara, ereditabile ed eterogenea, che interessa il tratto intestinale e le vie urinarie. Comprende un gruppo di disturbi dovuti alla compromissione della funzione delle cellule muscolari lisce.

Il coinvolgimento del tratto intestinale può variare da malrotazione, manifestazioni neonatali di microcolon, sindrome di ipoperistalsi intestinale e pseudoostruzione intestinale cronica (CIPO).

La pseudo-occlusione intestinale cronica (CIPO) è un disturbo della motilità intestinale raro, grave e invalidante caratterizzato da sintomi e segni ricorrenti o cronici di ostruzione intestinale, con conseguenze molto significative sulla qualità della vita del paziente che ne è affetto. Nella maggior parte dei casi si manifesta in età pediatrica, nei primi mesi di vita, o in età adulta, tra i 20 e 40 anni di età. Alla base di questa disfunzione motoria ci possono essere anomalie del sistema nervoso enterico e/o estrinseco (neuropatia viscerale), oppure della muscolatura liscia (miopatia viscerale).

Circa il 44% dei casi di miopatia viscerale presenta mutazioni a livello del gene ACTG2, un gene responsabile della sintesi della proteina Actina Gamma 2, essenziale per la corretta contrazione muscolare.

Questa patologia presenta conseguenze molto significative sulla qualità della vita di chi ne è colpito, infatti i soggetti affetti sono costretti a frequenti ricoveri in ospedale, interventi chirurgici, mostrano seri problemi nutrizionali, poiché diventano dipendenti da nutrizione tramite sondino. Inoltre, frequentemente i pazienti muoiono in età infantile. La gestione domestica della patologia è gravosa e stressante sia per il paziente sia per l'intera famiglia. Per quanto riguarda l'eziologia della patologia si conosce ancora molto poco, infatti tutt'ora vengono scoperte nuove mutazioni a livello dell'ACTG2 che causano il disturbo.

Un trattamento risolutivo per le diverse forme di miopatie, in particolare le forme degenerative a esordio precoce, a tutt'oggi non esiste. Tuttavia, con terapie specifiche in molti casi si possono controllare efficacemente i disturbi (sintomi).

L'obiettivo è quello di conoscere e valutare le alterazioni meccaniche nelle cellule, più precisamente, la forza di trazione che quest'ultime esercitano sull'ambiente extracellulare, per capire se questa proprietà meccanica può essere utilizzata per discriminare i soggetti

colpiti da CIPO da quelli che non presentano tale sintomatologia. Inoltre, è stata valutata l'efficacia di alcuni farmaci nel riportare l'espressione delle cellule affette più vicina a quella del fenotipo naturale. La tecnica utilizzata è quella della Traction Force Microscopy.

# Capitolo 1

## Introduzione

La causa principale, nella maggior parte dei casi di miopatia viscerale, risulta essere una mutazione a livello del gene ACTG2, responsabile della codifica e dell'espressione dell'actina, proteina fondamentale per la corretta contrazione muscolare. La rarità della malattia e la sovrapposizione tra i diversi fenotipi hanno reso difficile determinare accuratamente l'incidenza e la prevalenza di tale patologia.

Anche se il gene ACTG2 è emerso come il primo gene responsabile della disturbo, sono stati scoperti altri geni che svolgono un ruolo nella patogenesi, per questo motivo una diagnosi precisa a livello genotipico ancora non è possibile [1].

Ad oggi ancora non esiste un trattamento risolutivo per le diverse forme di miopatie, in particolare le forme degenerative a esordio precoce. Tuttavia, con terapie specifiche in molti casi si possono controllare efficacemente i disturbi (sintomi).

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di mettere a punto una serie di esperimenti al fine di valutare le alterazioni meccaniche su un substrato di crescita delle cellule, dovute ad mutamenti presenti su cellule della muscolatura liscia. Tali alterazioni sono rilevate a livello di microscopia ottica misurando le modificazioni del substrato nelle due situazioni, quella sana e quella patologica.

Fa parte dell'obiettivo, su base di tale metodologia la valutazione dell'efficacia di alcuni principi attivi testati sulle cellule, al fine di recuperare l'effetto di azione meccanica alterato in quelle malate. Dato che i fibroblasti sono considerati un modello internazionale valido, questo studio è stato condotto in vitro, utilizzando delle colture primarie di cellule umane ottenute da biopsie su pazienti di età pediatrica.

Per valutare al meglio la proprietà meccanica della trazione nello studio, sono stati considerati anche i casi neurogeni dovuti a problemi di innervazione, come nella malattia di Hirschsprung, in cui si ha un'assenza di cellule gangliari a livello dell'intestino, determinando così problemi inerenti alla peristalsi.

La tecnica utilizzata per valutare la forza di trazione è quella della Traction Force Microscopy (TFM), un nuovo metodo che, tramite un'acquisizione in tempo reale, consente di determinare questa proprietà meccanica cellulare.

Fa parte di questo procedimento l'utilizzo di un microscopio confocale a scansione laser, opportunamente collegato a un PC, che permette di ottenere delle immagini in fluorescenza al fine di valutare la forza di trazione che le cellule esercitano su un substrato composto da nanoparticelle fluorescenti.

Infine, dopo aver raccolto i dati ottenuti dall'elaborazione di immagini digitali, è stato possibile valutare la variazione della forza di trazione tra i soggetti sani e quelli affetti dalla patologia. Conseguentemente è stato sperimentato l'effetto di due farmaci, la Clomipramina e gli oligonucleotidi antisenso (ASO), per verificare che il fenotipo delle cellule affette si avvicini a quello delle cellule sane.



# Capitolo 2

## Stato dell'arte

### 2.1 Miopatia viscerale

Le funzioni essenziali dell'intestino comprendono i processi digestivi e l'assorbimento dei nutrienti, che però non sono possibili senza il movimento intestinale peristaltico che spinge in avanti il contenuto intestinale [2].

La miopatia viscerale è una condizione rara, ereditabile ed eterogenea, che interessa il tratto intestinale e le vie urinarie. È caratterizzata da un'alterazione delle funzioni delle cellule muscolari lisce enteriche, con conseguente motilità intestinale anormale, forti dolori addominali, malnutrizione e persino morte [2]. Comprende un gruppo di disturbi dovuti alla compromissione della funzione delle cellule muscolari lisce.

Con il termine di pseudo-ostruzione intestinale cronica (CIPO) s'intende un gruppo eterogeneo di condizioni che interessano la struttura e/o la funzione del sistema neuromuscolare enterico, ed è caratterizzata dalla compromissione della motilità gastrointestinale e dall'ostruzione in assenza di un blocco organico. La CIPO primaria o secondaria viene diagnosticata in base a come si manifesta, in modo isolato o come conseguenza di un'altra malattia.

La pseudo-occlusione intestinale cronica (CIPO) è un disturbo della motilità intestinale raro, grave e invalidante caratterizzato da sintomi e segni ricorrenti o cronici di ostruzione intestinale, con conseguenze molto significative sulla qualità della vita del paziente che ne è affetto.

Nella maggior parte dei casi si manifesta in età pediatrica, nei primi mesi di vita, o in età adulta, tra i 20 e 40 anni di età. La causa più comune della miopatia viscerale è una mutazione del gene ACTG2, responsabile della sintesi della proteina Actina Gamma 2 (che fa parte del citoscheletro cellulare), presente nella muscolatura liscia. Questa patologia è associata a una disfunzione di tipo meccanico che macroscopicamente si traduce in anomalie che coinvolgono la peristalsi del tratto gastrointestinale.

Alla base di questa disfunzione motoria e del transito intestinale ci possono essere anomalie del sistema nervoso enterico e/o estrinseco (neuropatia viscerale), oppure della muscolatura liscia (miopatia viscerale). Nel mio lavoro di tesi ho deciso di focalizzare l'attenzione principalmente sulla miopatia viscerale.

## 2.2 Diagnosi

La causa genetica della miopatia viscerale è stata incerta fino a quando si è avuto un primo riscontro di una variante patogena autosomica dominante nel gene dell'Actina gamma 2 del muscolo liscio enterico (ACTG2) in un caso di miopatia viscerale con esordio in età adulta [3]. Circa il 44% dei casi di miopatia viscerale presenta mutazioni a livello del gene ACTG2, localizzato nel braccio corto del cromosoma 2 e codifica l'actina enterica gamma 2, che si trova nelle cellule muscolari lisce del tratto urinario e intestinale. È cruciale per la contrazione della muscolatura liscia intestinale. Le varianti di questo gene sono associate alla miopatia viscerale e alla sindrome da ipoperistalsi megacistismicrocolon-intestinale (MMIHS) [4].

La miopatia viscerale è una patologia autosomica dominante. L'ereditarietà di tipo autosomico dominante è una forma di trasmissione di un carattere da un individuo a un altro. Si dice dominante per la prevalenza del fenotipo su altri analoghi.

Una malattia autosomica dominante è una malattia genetica causata dalla forma allelica dominante di un gene difettoso, che giace su un autosoma. Per questo tipo di malattia, basta una singola copia dell'allele difettoso per far sì che essa si esprima. I casi in cui accade ciò sono i seguenti:

- un individuo malato ha almeno un genitore affetto;
- vengono colpiti entrambi i sessi;
- il figlio di un individuo affetto ha la probabilità di 1/2 di ereditare la malattia, se l'altro genitore è sano.

Talvolta però, sono state osservate delle mutazioni che si verificano ex novo, per cui questo tipo di mutazione viene diagnosticata nell'individuo, ma non risulta essere presente nel

corredo genetico dei suoi genitori. Significa che non è stata ereditata, ma è frutto di un evento “nuovo”, verificatosi per la prima volta in quel soggetto

## 2.2.1 Actina

Il citoscheletro è la struttura portante delle cellule, ne determina la forma e le posizioni degli organelli. Oltre al ruolo strutturale il citoscheletro è responsabile del movimento delle cellule e del trasporto degli organuli e di altre strutture (come i cromosomi mitotici) attraverso il citoplasma. Principalmente è composto da tre tipi di proteine: filamenti di actina, microtubuli e filamenti intermedi.

L'actina è la proteina più abbondante a livello di citoscheletro, polimerizza sottoforma di filamenti, fibre sottili e flessibili di circa 7 nm di diametro approssimativamente e alcuni  $\mu\text{m}$  di lunghezza. All'interno della cellula i filamenti di actina (detti **microfilamenti**) sono organizzati in strutture altamente ordinate, formando dei fasci o network 3D con proprietà di gel semisolidi. L'assemblaggio e il disassemblaggio dei filamenti di actina, il loro cross-linking in fasci o network, e la loro associazione con altre strutture cellulari (come, ad esempio, il plasma di membrana) sono regolate da una varietà di proteine leganti l'actina. I filamenti di actina sono particolarmente abbondanti al di sotto della membrana plasmatica, dove formano un network che fornisce supporto meccanico, determina la forma alla cellula e permette il movimento della stessa, di conseguenza permette al corpuscolo di muoversi, inglobare particelle e dividersi.

Originariamente l'actina è stata isolata dalle cellule muscolari in cui costituisce circa il 20% di tutte le proteine cellulari. Anche se inizialmente si pensava che l'actina fosse coinvolta esclusivamente nella contrazione muscolare, successivamente si è scoperto essere una proteina estremamente abbondante (tipicamente 5-10% delle proteine totali) in tutti i tipi di cellule eucariote.

## 2.2.2 Adesioni focali

Tutte le cellule del nostro organismo, ad esclusione dei globuli rossi, hanno necessità di aderire alla matrice extracellulare per poter compiere il proprio ciclo vitale. Di conseguenza, molte cellule hanno delle regioni specializzate della membrana plasmatica,

che formano dei punti di contatto con le cellule adiacenti o la matrice extracellulare. Queste regioni possono servire come siti di ancoraggio per i fasci dei filamenti di actina che congiungono il citoscheletro alle aeree adibite al contatto cellulare. Questi punti di attacco dei filamenti di actina sono particolarmente evidenti nei fibroblasti mantenuti in coltura. Tali fibroblasti secernono proteine della matrice extracellulare che aderiscono alla superficie dei dischi di coltura. I fibroblasti si attaccano poi a questa matrice extracellulare sul disco di coltura attraverso il legame di proteine transmembrana (dette **integrine**).

Le integrine sono i principali recettori della matrice cellulare e sono responsabili dell'attacco delle cellule alla matrice extracellulare. Inoltre, per legare le cellule alla matrice extracellulare, le integrine servono come punti di ancoraggio per il citoscheletro. Il legame che si stabilisce tra citoscheletro e matrice extracellulare è responsabile della stabilità delle giunzioni cellula-matrice.

Tra le diverse interazioni tra integrine e citoscheletro vi sono due tipi di giunzioni cellula-matrice: le adesioni focali e gli emodesmosomi. Le adesioni focali (regioni riscontrate esclusivamente in vitro) mediano il legame di diverse cellule con la matrice, inclusi i fibroblasti, gli emidesmosomi invece riguardano solo le cellule epiteliali. Nelle adesioni focali i domini citoplasmatici delle integrine ancorano l'actina del citoscheletro, legandosi con i fasci di filamenti di actina. Inoltre, alcuni studi hanno mostrato che le integrine giocano un ruolo importante come strutture di segnalazione nelle cellule, trasmettendo segnali dall'esterno delle cellule per controllare diversi aspetti di movimento cellulare, proliferazione e sopravvivenza. I siti di attacco sono delle regioni discrete (**adesioni focali**) che servono come punti di ancoraggio per i fasci dei filamenti di actina, chiamati **stress fibers**.

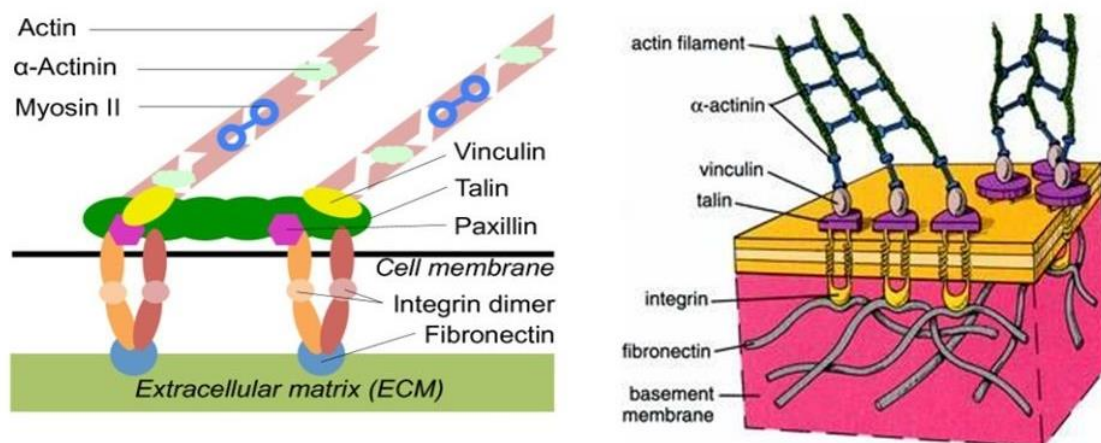


Figura 1. Adesioni focali

Gli stress fibers sono fasci di filamenti di actina, cross-linkati da  $\alpha$ -actinina (proteina di legame) e stabilizzati con tropomiosina, che premettono l'attacco della cellula ed esercitano una tensione sul substrato. Questi sono ancorati alla membrana plasmatica in corrispondenza delle adesioni focali, attraverso l'interazione con le integrine.

L'actina del citoscheletro è legata allo stesso modo alle regioni di contatto tra cellule adiacenti, chiamate **adherens junctions**.

Le proteine di adesione sono la terza classe di costituenti della matrice extracellulare e sono responsabili sia dell'associazione dei componenti della matrice tra loro, che del collegamento alle superfici delle cellule.

## 2.2.3 Movimento cellulare

I meccanismi di ancoraggio descritti permettono alla cellula, attraverso il legame con la matrice extracellulare, di espletare tutte le funzioni vitali. Infatti, ad esclusione di quelle del sangue, tutte le cellule devono aderire alla matrice extracellulare o alle unità biologiche adiacenti. Se questo segnale di adesione viene a mancare la cellula va incontro a morte cellulare. Attraverso questi meccanismi la cellula può muoversi ed esercita una forza sulla matrice extracellulare oppure, nel caso di colture cellulari, sul substrato di crescita.

Molte protusioni superficiali sono strutture transitorie che si formano in risposta a stimoli ambientali e sono coinvolte nel movimento corpuscolare. Il moto delle cellule su una superficie rappresenta la base della locomozione cellulare adottata da una grande varietà di cellule differenti. Tutti i movimenti cellulari sono basati su estensioni locali della

membrana citoplasmatica che si estendono dal bordo anteriore della cellula in movimento. Queste estensioni principalmente si basano su filamenti di actina e devono attaccarsi al substrato attraverso cui la cellula deve muoversi.

## **2.3 Terapia**

Non esiste una cura specifica per la pseudo-ostruzione intestinale cronica causata dalla miopatia viscerale. Il trattamento richiede un approccio multidisciplinare da parte di più specialisti (pediatri, gastroenterologi con esperienza in motilità gastrointestinale, chirurghi digestivi, urologi, specialisti in malattie metaboliche e genetiche, nutrizionisti e psicologi). Tra le misure generali vanno annoverate le modificazioni della dieta (supporto nutrizionale mediante alimentazione orale, parenterale o enterale per prevenire la malnutrizione), in alcuni casi, l'uso di farmaci procinetici, i trattamenti delle complicanze, come il dolore acuto, nonché specifici interventi chirurgici. Per le insufficienze intestinali gravi, la chirurgia può avere un ruolo cruciale nella gestione dei pazienti. Le stomie digestive (per esempio gastrostomia), oltre a fornire un accesso diretto al tratto gastrointestinale interessato, possono essere utilizzate per la nutrizione enterale o la somministrazione di farmaci e rappresentano altresì una via di decompressione dell'apparato gastro-intestinale. Per i pazienti affetti da forme particolarmente gravi e refrattarie della malattia, per i quali non è efficace neppure l'alimentazione parenterale totale, può essere proposto il trapianto di intestino. Si tratta comunque di un'opzione terapeutica molto complessa e a sua volta rischiosa. Inoltre, la gestione domestica della patologia è gravosa e stressante sia per il paziente sia per l'intera famiglia.

## **2.4 Traction Force Microscopy**

Le cellule esercitano forze sul loro ambiente extracellulare, principalmente ma non esclusivamente attraverso il meccanismo contrattile dell'acto-miosina. Queste forze vengono trasmesse all'ambiente extracellulare attraverso adesioni basate sulle integrine (aderenze focali), che consentono cambiamenti di forma e migrazione direzionale. La connessione meccanica tra le celle e l'ambiente circostante è fondamentale per la

regolazione di processi biologici complessi durante i meccanismi di sviluppo, riparazione o patologia dei tessuti.

La Traction Force Microscopy (TFM) consente la determinazione di queste forze di trazione. È un nuovo metodo che consente un'acquisizione in tempo reale di campi di trazione continui dentro e fuori dal piano focale con un'elevata sensibilità. Il metodo si basa sulla nanostampa elettroidrodinamica di nanodischi fluorescenti in array monocristallini confocali, che rendono identificabili queste sorgenti luminose puntiformi individualmente su substrati conformi. Prevede un'analisi delle modificazioni indotte dalla forza di trazione che le cellule applicano su un substrato. Questo substrato è formato da particelle fluorescenti con foto decadimento molto lento, che presentano un picco di emissione intorno ai 543 nm.

Questa tecnica di analisi fornisce un potente strumento per accedere sperimentalmente alle forze cellulari. Negli ultimi due decenni sono stati sviluppati più protocolli per la misurazione delle trazioni generate dalle cellule, basati sul rilevamento ottico delle deformazioni dipendenti dalla forza applicata su substrati cedevoli.

I metodi TFM sfruttano substrati elastici contenenti perline fluorescenti disperse seguendo una matrice regolare. Questi approcci producono mappe di forza all'interno e fuori dal piano ad alta risoluzione.

## **2.5 DNA e RNA**

L'acido desossiribonucleico o deossiribonucleico (in sigla DNA) è un acido nucleico che contiene le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di RNA e proteine, molecole indispensabili per lo sviluppo ed il corretto funzionamento della maggior parte degli organismi viventi.

Dal punto di vista chimico il DNA è un polimero a doppia elica i cui monomeri sono costituiti da nucleotidi. I nucleotidi presentano tre unità fondamentali: un gruppo fosfato, uno zucchero pentoso (il desossiribosio, detto anche deossiribosio) e una base azotata.

L'ordine nella disposizione sequenziale dei nucleotidi costituisce l'informazione genetica, la quale è tradotta tramite il codice genetico negli amminoacidi corrispondenti. La sequenza amminoacidica prodotta, detta polipeptide, forma le proteine. Il processo di traduzione genetica (comunemente chiamata sintesi proteica) è possibile solo in presenza di una molecola intermedia di RNA, che è generata per complementarità con le quattro basi

dei nucleotidi del DNA in un processo noto come trascrizione. Tale procedimento non genera solo filamenti di RNA destinati alla traduzione, ma anche frammenti già in grado di svolgere svariate funzioni biologiche (ad esempio all'interno dei ribosomi, dove l'RNA ha una funzione strutturale).

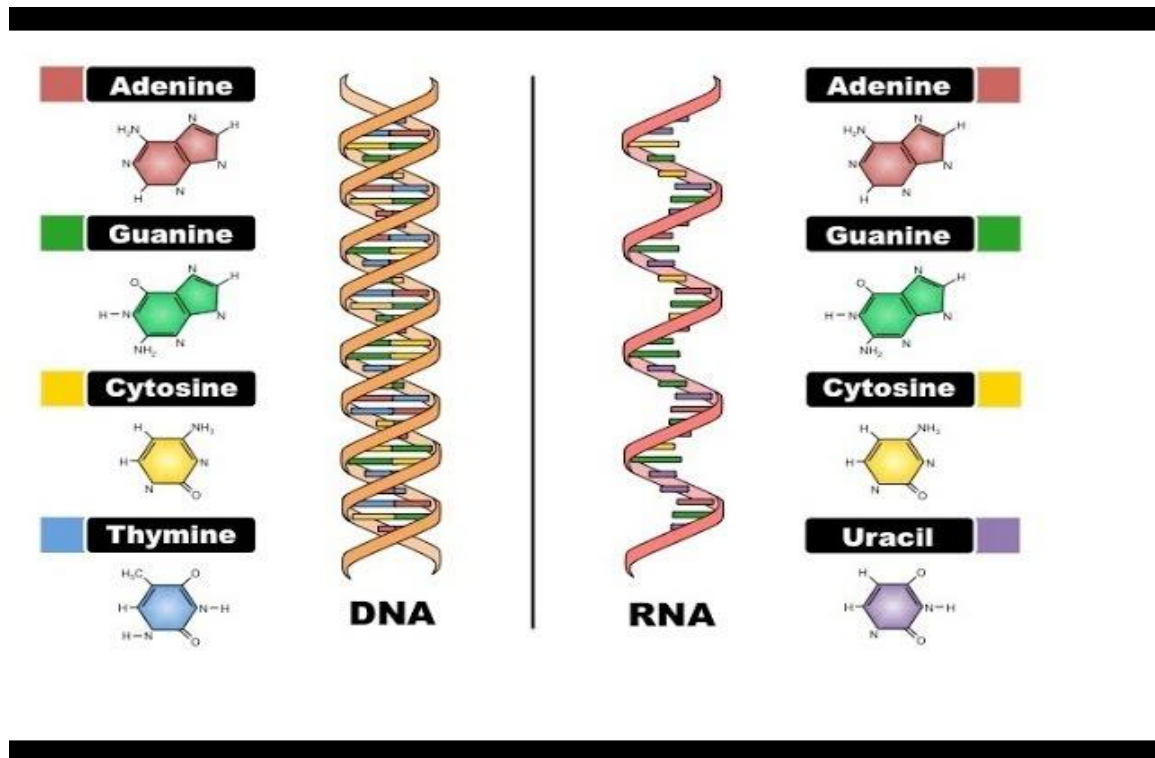


Figura 2. DNA e RNA

L'acido ribonucleico (in sigla RNA) in chimica, è una molecola polimerica implicata in vari ruoli biologici di codifica, decodifica, regolazione ed espressione dei geni. L'RNA e il DNA sono acidi nucleici che, insieme a proteine, carboidrati e lipidi, costituiscono le quattro principali macromolecole essenziali per tutte le forme di vita conosciute.

Come il DNA, l'RNA è assemblato come una catena di nucleotidi, ma a differenza del DNA è più frequente in natura come un singolo filamento ripiegato su sé stesso, piuttosto che un doppio filamento accoppiato. Gli organismi cellulari utilizzano l'RNA messaggero (mRNA) per trasmettere le informazioni genetiche (mediante le basi azotate guanina, uracile, adenina e citosina, indicate con le lettere G, U, A e C) che dirigono la sintesi di proteine specifiche.

Alcune molecole di RNA svolgono un ruolo attivo all'interno delle cellule al fine di catalizzare le reazioni biologiche, di controllo dell'espressione genica o per percepire e comunicare le risposte a segnali cellulari. Uno di questi processi attivi è la sintesi proteica,



una funzione universale per cui molecole di mRNA dirigono l'assemblaggio delle proteine nei ribosomi.

Esistono diversi tipi di RNA:

- RNA messaggero (mRNA): prende l'informazione contenuta nel DNA e la utilizza per la sintesi delle proteine;
- rRNA: i ribosomi sono strutture a base di DNA e proteine che prendono l'informazione contenuta in mRNA e la trasformano in proteina;
- microRNA: serve per regolare l'espressione genica, "quanta" proteina deve essere sintetizzata e in quale momento;
- tRNA: collabora insieme a mRNA e ribosomi per la sintesi delle proteine.

Il dogma fondamentale della biologia è che il DNA può duplicarsi, mantiene l'informazione genetica, e l'informazione che è codificata nel DNA viene trasferita all'RNA. La cellula è in grado di esprimere i geni con un'efficienza diversa, a seconda dell'esigenza di proteine in quel particolare momento, di conseguenza l'unità biologica deve regolare questo processo.

## **2.5.1 Replicazione DNA**

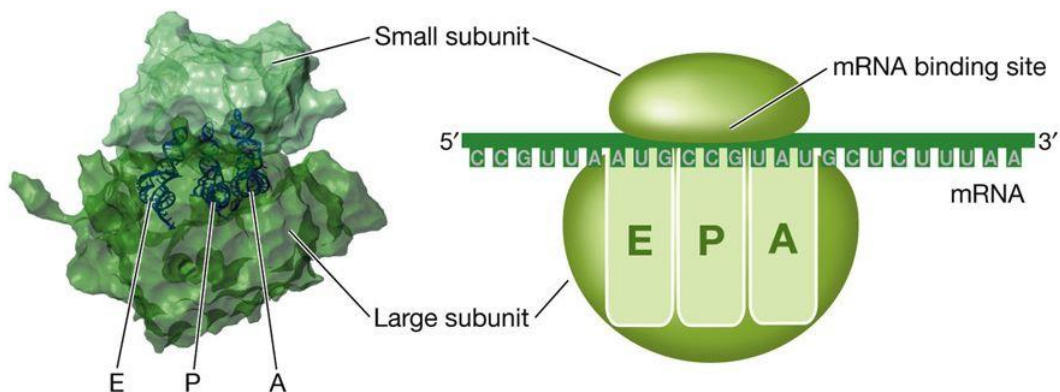
Il DNA replica sé stesso quando la cellula si divide, ed esprime l'informazione codificata durante l'espressione proteica. Per replicazione del DNA s'intende che da una doppia elica si ottengono due doppie eliche. Il modello di replicazione è definito semiconservativo, vale a dire che le due doppie eliche che si formano, saranno composte ognuna da un filamento vecchio e uno di nuova sintesi. Questa è la base dell'ereditarietà dei caratteri della specie.

## 2.5.2 Ribosomi

La sintesi proteica avviene a livello dei ribosomi, in cui abbiamo un complesso composto da ribosomi, mRNA e la catena polipeptidica in crescita. I ribosomi leggono il messaggio portato dall'mRNA e prendono i tRNA per formare la catena polipeptidica.

Sono dei grandi complessi molecolari costituiti da rRNA e da diversi tipi di proteine, principalmente sono composti da due subunità una maggiore e una minore, che nel momento in cui la proteina deve essere elaborata, si assemblano e danno origine al processo di

**Struttura del ribosoma**



scrittura. Inoltre, presentano dei siti in cui viene inserito il tRNA che porta il suo carico di amminoacidi e dove vengono assemblati i vari amminoacidi in entrata, dove si forma il legame peptidico.

## 2.6 Oligonucleotidi antisenso (ASO)

La produzione o il metabolismo irregolare delle proteine è associato a numerose malattie o disturbi. Una produzione anomala di proteine può essere regolata dal targeting dell'RNA messaggero (mRNA), poiché le proteine sono prodotte decodificando le informazioni immagazzinate nell'mRNA.

Gli oligonucleotidi antisenso (ASO) sono brevi composti sintetici di oligonucleotidi a singolo filamento, di solito lunghi da 8 a 25 nucleotidi, che accoppiandosi all'mRNA bersaglio con sequenze di basi complementari di Watson-Crick, possono alterare l'RNA e ridurre, ripristinare o modificare l'espressione della proteina attraverso diversi meccanismi[8].

Negli ultimi decenni gli oligonucleotidi antisenso vengono considerati come nuovi inibitori o modulatori dell'espressione genica, grazie alla loro elevata sensibilità. In effetti, negli ultimi anni, il loro utilizzo nel trattamento di malattie derivanti da anomalie genetiche sta diventando una possibilità reale [6].

Le potenzialità di questi principi attivi nel silenziamento genico sono state scoperte più di 40 anni fa, il che ha portato ad un crescente interesse nella loro chimica, meccanismo d'azione e vie metaboliche.

Il crescente interesse per le terapie antisenso è stato avviato da Zamecnik e Stephenson, che hanno scoperto che tramite l'introduzione di un frammento esogeno di acido nucleico complementare all'mRNA del virus del sarcoma Rous, si poteva ottenere un efficace inibitore del processo di traduzione.

Dato che questi oligonucleotidi sono rapidamente smaltiti da enzimi intracellulari come le endo o le esonucleasi, la struttura ASO deve essere modificata chimicamente.

Lo studio della trasformazione degli ASO è particolarmente importante perché alcuni dei loro prodotti metabolici possono essere tossici. Per questa ragione, risulta essenziale la valutazione della tossicità non clinica utilizzando modelli animali, per capire gli effetti indesiderati di questi potenziali farmaci antisenso. Lo svantaggio principale di tale approccio è la conoscenza limitata degli effetti potenzialmente dannosi esclusivamente negli animali, che quindi possono essere differenti nel caso dei pazienti. Tuttavia, al fine di migliorare la conoscenza, possono essere condotti degli studi sul metabolismo in vitro con l'uso di tessuti o enzimi umani.

## 2.6.1 Locked Nucleic Acids (LNAs)

Per far sì che queste terapie basate sugli ASO abbiano successo in ambito clinico, è fondamentale superare eventuali effetti collaterali off-target e l'insufficiente attività biologica. A tal proposito, sono state valutate diverse modifiche chimiche e diverse strategie di somministrazione.

Sono state introdotte delle modifiche nelle molecole di zucchero, nelle basi o nei legami fosfodiesterici, con lo scopo di aumentare la loro stabilità, migliorarne la distribuzione a livello tissutale e l'affinità di legame con le sequenze bersaglio.

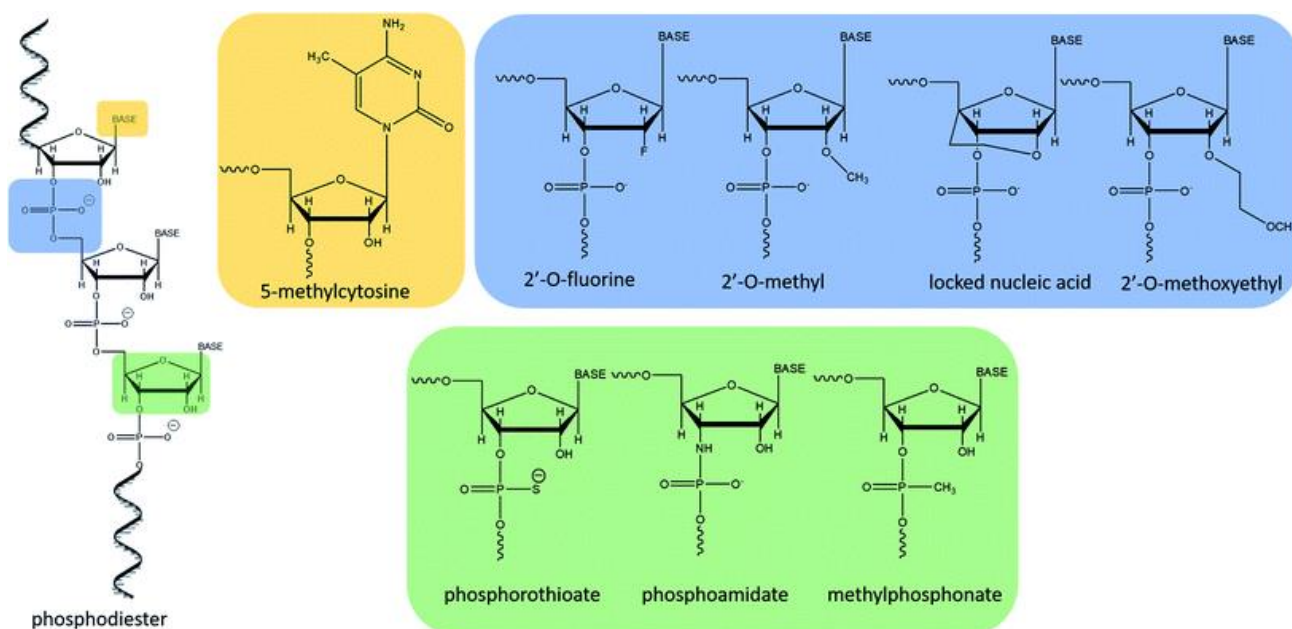


Figura 3. Modifiche strutturali più comuni degli oligonucleotidi.

Gli oligonucleotidi con legami fosfodiesterici modificati appartengono alla prima generazione di ASO. Tale modifica comporta la sostituzione di uno degli atomi di ossigeno con un altro atomo o gruppo chimico, come ad esempio il metile. Quelli maggiormente studiati sono gli oligonucleotidi fosforotioati (PS), in cui l'ossigeno è sostituito da un atomo di zolfo.

La seconda generazione di questi composti include la modifica all'interno della molecola di zucchero. In questo caso, il gruppo idrossile in posizione 2' del ribosio viene sostituito con un atomo di fluoro o gruppi metile e metossietilico (ME e MOE), che riducono significativamente la polarità.

Gli ASO di terza generazione di solito contengono diverse modifiche nei gruppi fosfato, nella molecola di zucchero, oppure nelle basi azotate. Tra questi troviamo, acidi nucleici peptidici (PNA), così come i locked nucleic acids (LNA).

I locked nucleic acids presentano un ponte metilenico vincolato tra l'ossigeno in posizione 2' e il carbonio in posizione 4' dell'anello di ribosio e mostrano una forte affinità di legame alle sequenze di DNA o RNA bersaglio grazie alla loro struttura preorganizzata.

Gli LNA esprimono la loro capacità antisense attraverso un meccanismo di ingombro sterico. Sono stati valutate diverse strutture di LNA (gapmer, mixmer, e altre modifiche) per la loro attività antisense, poi sono state confrontate con gli ASO non modificati. Con il termine gapmer s'intende delle strutture basate su LNA-DNA-LNA che contengono nucleotidi di DNA intervallati tra due nucleotidi LNA posti nelle regioni terminali. È stato ben evidenziato che la struttura gapmer stimola il meccanismo di scissione basato su RNasi H1[9].

## 2.6.2 Meccanismo di azione

Circa un decennio fa, Zamecnik e Stephenson hanno riportato per la prima volta che 13 nucleotidi sintetici a singolo filamento ASO potevano causare l'arresto del processo di trascrizione prendendo di mira l'mRNA del virus del sarcoma Rous. Dopo diversi studi, è stato stabilito che gli ASO attivi sono generalmente singoli filamenti lunghi 15-20 nucleotidi e possono agire sull'RNA complementare tramite l'accoppiamento di basi Watson-Crick senza causare alcuna tossicità significativa al di fuori del bersaglio. Inoltre, ulteriori studi hanno stabilito che il meccanismo di azione degli ASO può essere di due tipi: (1) scissione dell'RNA e (2) blocco dell'RNA

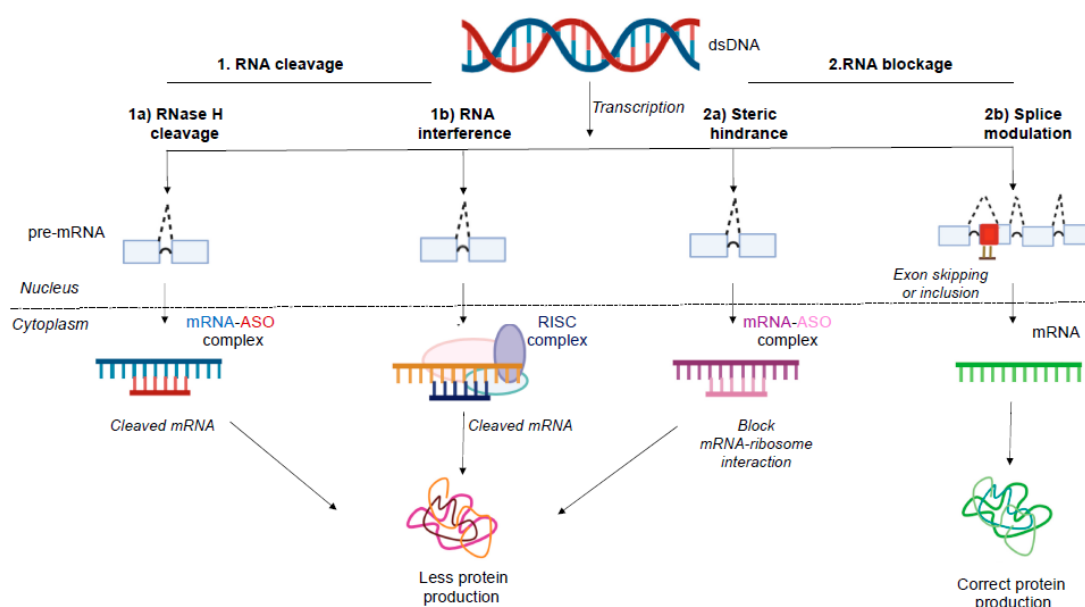


Figura 4. Meccanismi di azione degli ASO

Come è possibile osservare dalla figura, gli ASO agiscono causando: la scissione dell'RNA oppure il blocco dell'RNA.

Tra i vari tipi di meccanismo vi sono:

- La scissione mediata dalla RNasi H1: gli ASO mirano all'RNA, formando dei complessi ASO-RNA, che agiscono come substrati per gli enzimi RNasi presenti nel citoplasma. Le RNasi degradano l'RNA nel complesso. Tra questi abbiamo la struttura del gapmer, che contiene una regione centrale di nucleotidi non modificati

che aiuta l'attività della RNasi H1, affiancata da nucleotidi modificati che aumentano la sua affinità di legame e le proprietà di resistenza enzimatica;

- l'interferenza dell'RNA (RNAi): piccoli frammenti di RNA esogeni (siRNA) costituiti da sequenze di RNA a doppio filamento di 22 nucleotidi, con l'aggiunta di due nucleotidi all'estremità 3' di entrambi i filamenti. Questa sequenza si associa con l'enzima argonante 2 (Ago 2) per formare il complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC) dove il filamento di passaggio viene degradato. Il restante filamento guida dirige il RISC alla regione complementare dell'mRNA, dove l'enzima Ago 2 taglia l'mRNA ed esercita il suo effetto di silenziamento genico. L'RNAi funziona con un meccanismo simile a quello RNasi H dipendente;
- l'ingombro sterico: queste classi di ASO si legano alla sequenza targetRNA (tRNA) e causano l'arresto della traslazione, inibendo la loro interazione con la subunità ribosomiale o impedendo il loro assemblaggio sulle stesse. Gli ASO di questo tipo non attivano la scissione mediata dalla RNasi H1; pertanto, la struttura del pre-mRNA viene mantenuta. L'ingombro sterico è direttamente correlato all'affinità di legame degli ASO. Inoltre, sono stati progettati degli oligonucleotidi sintetici a singolo filamento di 20-25 nucleotidi di lunghezza, per legare i miRNA e impedire la loro interazione con l'mRNA con un meccanismo basato sull'ingombro sterico, controllando ulteriormente l'espressione genica;
- la modulazione dello splice: Gli ASO possono esercitare la loro azione anche attraverso lo splicing alternativo. La modulazione dello splicing può essere di due tipi: (1) salto di esoni e (2) inclusioni di esoni. Queste mutazioni alterano i modelli di splicing del pre-mRNA che determina una produzione anomala o un arresto della traduzione delle proteine. Nel primo caso, gli ASO si legano ai pre-mRNA trascritti, correggono la struttura che sta passando nel momento in cui è avvenuta l'interruzione e producono una proteina breve ma funzionale. Nel secondo caso invece si legano al sito del pre-mRNA e impediscono allo spliceosoma (grosso complesso enzimatico formato da proteine e piccole molecole di RNA) e ai fattori di splicing di accedere ai siti di trascrizione[9].

## 2.6.3 Somministrazione

Affinché un oligonucleotide antisense possa regolare l'espressione genica, deve raggiungere le cellule bersaglio. L'assorbimento avviene attraverso il trasporto attivo, che a sua volta dipende dalla temperatura, dalla struttura, dalla concentrazione dell'oligonucleotide e dalla linea cellulare. Attualmente, si ritiene che l'endocitosi adsorbitiva e la pinocitosi in fase fluida siano i principali meccanismi di internalizzazione dell'oligonucleotide, le cui proporzioni di materiale internalizzato dipendono dalla concentrazione dell'oligonucleotide stesso.

A una concentrazione relativamente bassa, è probabile che l'assorbimento avvenga tramite l'interazione con un recettore di membrana. A una concentrazione relativamente alta, questi recettori sono saturi e il processo pinocitotico assume un'importanza maggiore.

Numerosi rapporti hanno dimostrato che gli oligonucleotidi nudi, che siano caricati negativamente o meno, sono inglobati male dalle cellule. Più specificamente, gli oligonucleotidi nudi tendono a localizzarsi a livello degli endosomi (corpi vescicolari presenti nella cellula) o lisosomi (organelli presenti nel citoplasma e contenenti enzimi idrolitici capaci di digerire materiale ingerito al loro interno) e di conseguenza non riescono ad assolvere il proprio scopo.

Per migliorare l'assorbimento cellulare e la loro attività, sono state sviluppate una serie di tecniche e vettori.

In questo caso parliamo della tecnica della trasfezione. La trasfezione è un processo di introduzione di materiale biologico esogeno in cellule eucariotiche. È più frequente l'inserimento di materiale genetico (DNA e siRNA), come nel nostro caso. Principalmente in questo lavoro di tesi si fa riferimento ad una trasfezione di tipo chimico che sfrutta l'azione dei liposomi (piccole vesciche lipidiche che inglobano DNA e sono indotte ad entrare con esso nella cellula simulando processi di endocitosi cellulare).

L'utilizzo di questi vettori aumenta la stabilità degli oligonucleotidi contro la digestione da parte delle nucleasi e permette l'utilizzo di concentrazioni molto minori. La prima generazione di vettori sviluppati sono stati i liposomi, (vescicole colloidali generalmente composte da un doppio strato di fosfolipidi e colesterolo). I liposomi possono essere neutri



o cationici, a seconda della natura dei fosfolipidi. L'acido nucleico può essere facilmente incapsulato nell'interno del liposoma, che contiene un compartimento acquoso, o essere legato alla superficie dello stesso da interazioni elettrostatiche. Questi vettori, a causa della loro carica positiva, hanno un'alta affinità per le membrane cellulari, che sono negativamente caricate in condizioni fisiologiche. Poiché questi vettori utilizzano gli endosomi per trasportare gli oligonucleotidi nelle cellule, sono state aggiunte nei liposomi alcune molecole definite "helper", per permettere agli oligonucleotidi di fuoriuscire dagli endosomi. Tra i principali vettori commerciali quella maggiormente utilizzata è la Lipofectamina.

Tutti questi sistemi di rilascio cationico internalizzano gli oligonucleotidi attraverso il meccanismo di endocitosi. Per evitare i problemi di compartimentazione, è stata presa in considerazione la possibilità di modulare la permeabilità della membrana plasmatica[10].

Recentemente, è emerso che gli ASO carichi positivamente possono entrare liberamente in alcune linee cellulari senza la necessità di utilizzare vettori per il loro trasporto. Il protocollo di trasfezione è così semplificato e viene evitato qualsiasi effetto off-target dovuto all'esposizione delle cellule al lipide. Il metodo può essere utilizzato anche con linee cellulari che non sono compatibili con la trasfezione mediata da lipidi. Tuttavia, sono necessarie delle concentrazioni più alte di ASO rispetto a quelle utilizzate nelle trasfezioni mediate da lipidi[14].

Le terapie con gli ASO offrono una promettente prospettiva per le malattie ereditarie del metabolismo. Quando si valuta se la terapia potrebbe essere un'opzione per un tipo di patologia, la parte più importante da prendere in considerazione è il tessuto bersaglio[12].

Forse il vantaggio più significativo di questo tipo di trattamento rispetto ad altri approcci con piccole molecole è che la conoscenza della sequenza bersaglio che fornisce una conoscenza immediata di potenziali terapie oligonucleotidiche complementari[13].

Studi recenti riguardo le modificazioni chimiche degli ASO hanno permesso lo sviluppo di farmaci ASO per il silenziamento dell'espressione genica a fini terapeutici.

Attualmente, più di 35 di questi farmaci sono utilizzati in studi clinici o sono stati approvati dalla FDA per l'uso contro una varietà di malattie[15].

## Capitolo 3

# Materiali e metodi

### 3.1 Colture cellulari in vitro

Con il termine colture cellulari s'intende isolare le cellule dal loro ambiente e metterle in laboratorio, in condizioni tali che possano continuare a vivere e svolgere il proprio metabolismo in modo corretto. Praticamente le cellule vengono estratte dal tessuto e messe in un ambiente opportuno, che va a mimare in modo abbastanza fedele gli elementi essenziali, affinché le cellule possano continuare a vivere e ad esplicare le principali funzioni. Le colture cellulare presentano diversi vantaggi e svantaggi.

I vantaggi sono i seguenti:

- Sono sistemi semplificati ed altamente riproducibili;
- Consentono l'analisi dei meccanismi cellulari e molecolari del fenomeno in esame;
- Controllo dell'ambiente di crescita
- Economicità e rapidità di risposta
- Disponibilità di vari tipi cellulari

Gli svantaggi invece, sono i seguenti:

- Essendo sistemi semplificati rispetto ad un organismo integrato, anche la risposta sarà semplificata, di conseguenza talvolta deve essere completata con esperimenti in vivo;
- Condizioni di esposizione alle sostanze diverse da quelle in vivo, che talvolta possono diventare tossiche in vivo;
- Sostanze inoculate possono reagire con il terreno di coltura

Sulla base della loro origine le cellule in coltura possono crescere adese o in sospensione (cellule del sangue).

Principalmente si fa una distinzione tra coltura primaria e coltura secondaria, o subcoltura. La coltura primaria è una coltura di cellule che provengono direttamente dal tessuto di un

donatore. Una volta messe in coltura, queste cellule prolifereranno, inizieranno a svolgere il proprio ciclo vitale e si moltiplicheranno fino ad arrivare a confluenza ed esaurire lo spazio disponibile sul supporto di coltura. A questo punto bisognerà prenderle e suddividerle in più contenitori, queste saranno le colture secondarie.

La coltura primaria viene preparata da un tessuto. Si preleva da un donatore, ad esempio, tramite biopsia, costituito da cellule e matrice extracellulare. Innanzitutto, devono essere recuperate le cellule, quindi il tessuto viene sminuzzato meccanicamente il tessuto, dopodiché si devono staccare gli organuli dalla matrice extracellulare. Una volta che le cellule sono state staccate, si possono mettere in un opportuno contenitore con il terreno di coltura, contenente i nutrienti per quel fenotipo cellulare.

Le tappe principali per ottenere una coltura primaria sono le seguenti:

1. Prelievo di cellule da campione;
2. Recupero del tessuto di interesse. Le cellule sono collegate alla matrice extracellulare con legami specifici mediati tra proteina e proteina. Per tagliare questi legami si utilizzano degli enzimi proteolitici (es. tripsina). A seconda della composizione della matrice, ogni tessuto avrà una specifica ricetta ed enzimi specifici che vengono utilizzati per tagliare i legami della cellula con l'ambiente esterno;
3. Il tutto viene messo in una falcon per centrifuga di modo che le cellule più pesanti vanno sul fondo e tutto il resto rimane in sospensione. Al termine di questo passaggio viene aspirato il sovrantante.
4. Le cellule vengono sospese nel terreno di coltura;
5. Infine, vengono messe nel contenitore per coltura, che solitamente è una fiaschetta.

Il terreno di coltura è essenziale per una coltura cellulare, ha il compito di mantenere le cellule in un ambiente che, dal punto di vista biochimico, sia il più possibile simile a quello naturale. Le cellule hanno bisogno di nutrimento, di conseguenza questo mezzo deve contenere i nutrienti essenziali per la crescita, la proliferazione e il loro differenziamento. Ogni fenotipo cellulare ha la necessità di avere un terreno con una composizione diversa. All'interno del mezzo di coltura solitamente vi sono: amminoacidi, vitamine, sali, glucosio, indicatore di pH (rosso fenolo), inoltre, vengono addizionati antibiotici per la sterilità, glutammina e siero.

Il **rosso fenolo** è un indicatore di pH, e indica quando qualcosa non va bene nella coltura. Al valore fisiologico (7.3) la molecola è di colore rosso-arancio, se il pH scende tra 6.8 e 7 il rosso fenolo cambia colore verso il giallo. Con il proliferare delle cellule il terreno di coltura diventa più acido, perché il metabolismo cellulare produce CO<sub>2</sub> e quindi il terreno va cambiato. Se il pH sale sopra 7.5 il rosso fenolo vira verso il viola, questo indica che le cellule non sono metabolicamente attive.

Il **siero fetale bovino** (FBS), addizionato in 20%, è una frazione di plasma ottenuto dopo la coagulazione del sangue di provenienza bovina. Sono presenti albumina, vitamine, colesterolo, acidi grassi, fattori di crescita e di adesione, sostanze indispensabili per il metabolismo cellulare. Ha diverse funzioni: protegge la membrana, introduce fattori di crescita, favorisce l'interazione cellula-substrato perché contiene fattori adesivi e contiene inibitori della tripsina, l'enzima proteolitico utilizzato per staccare le cellule.

La coltura cellulare deve essere mantenuta in un ambiente che riproduca le condizioni in vivo, quindi viene utilizzata una strumentazione che vada a riprodurre queste condizioni. Per manipolare le cellule e fare qualsiasi altra operazione viene utilizzata una cappa a flusso laminare, che deve garantire la sterilità durante tutte le fasi. Per la conservazione vengono poste in un incubatore, una camera termostata al cui interno vi è una temperatura di 37 °C, che deve essere mantenuta ed è regolata mediante elementi riscaldanti nella parete dell'incubatore e opportuni sistemi di regolazione. L'incubatore è collegato ad un flusso di CO<sub>2</sub>, la cui concentrazione è mantenuta al 5%, che corrisponde alla pressione parziale cellulare all'interno dei tessuti. La presenza della CO<sub>2</sub> contribuisce anche al mantenimento e al controllo del pH.

## 3.2 Linee cellulari

Le linee cellulari considerate in questo lavoro di tesi sono fibroblasti che provengono da diversi pazienti, tutti di età pediatrica. Tra queste abbiamo considerato casi “sani”, casi neurogeni e casi miogenici.

Fanno parte dei casi sani le cellule che appartengono a pazienti con patologie che non presentano alcuna correlazione con la miopatia viscerale, quindi sono fibroblasti che non hanno nessuna disfunzione meccanica.

I casi neurogeni sono linee cellulari che appartengono a pazienti affetti da neuropatia viscerale (affetti dalla patologia di Hirschprung), che presenta gli stessi sintomi della miopatia viscerale, ma la causa è una mancata innervazione dell'intestino.

I casi miogenici sono relativi a pazienti affetti da miopatia viscerale, che presentano come sintomo la pseudo-obstruzione cronica intestinale (CIPO).

Questo lavoro di tesi si è inserito all'interno di uno studio on going in cui sono state analizzate quattordici linee cellulari di fibroblasti umani epiteliali di cui:

- sei sono relativi ai casi “sani”, utilizzati come controllo;
- quattro sono relativi ai casi miogenici;
- quattro sono relativi ai casi neurogeni;

Inoltre, due di queste linee cellulari sono state utilizzate per valutare l'effetto degli ASO e della Clomipramina. In questo caso sono state scelte le due linee cellulari che presentano la stessa mutazione.

## 3.3 Protocollo di Traction Force Microscopy

La configurazione TFM è costituita da un tipico coverslip in vetro di 170  $\mu\text{m}$  rivestito con uno strato di 30 mm di spessore di silicone CY52-276 altamente deformabile. Questo silicone è un elastomero bicomponente che produce diversi moduli elastici che vanno da 1 a 20 kPa per rapporti di miscelazione vicini a 1:1.

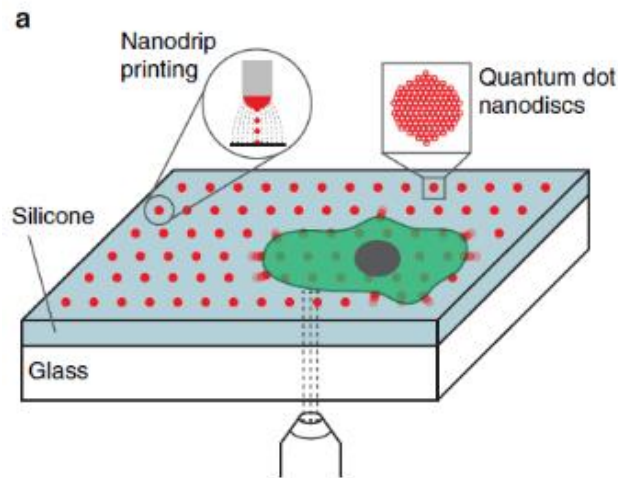


Figura 6. Schema del set-up cTFM e delle tecniche coinvolte.

Un'unità di 0,05% di poli(dimetilsilossano-b-ossido di etilene) viene aggiunta durante la fabbricazione del silicone per aumentare l'idrofilicità, che aiuta la precisione della stampa a nanogoccia.

La superficie in silicone presenta una matrice monocristallina di nanodischi fluorescenti, in modo che le linee che collegano quelli più vicini formino una griglia di triangoli equilateri. Ogni nanodisco fluorescente stampato contiene un certo numero di quantum dots(QD).

Questi array di nanodischi monocristallini, fatti di dispersioni di QDs, vengono stampati su substrati idrofili con spaziatura tra i dischi che vanno da 0,75 a 3  $\mu\text{m}$ . Ciò ha comportato una precisione di posizionamento di 30-45 nm.

La prima fase dell'analisi di traction force microscopy prevede la semina cellulare su delle petri su cui sono stampati i quantum dots. In seguito entro le 24 ore successive la semina cellulare, vengono fatte le acquisizioni delle immagini digitali utilizzando un microscopio confocale a scansione laser.

Nel protocollo seguito sono state impiegate le linee cellulari menzionate nel capitolo precedente, utilizzando come mezzo di coltura RPMI(mezzo di coltura) con un 10% di siero (FBS), 2% di glutammina e 1% di antibiotico penicillina/streptomina.

### 3.3.1 Subtrasti

I due componenti del silicone e lo 0,05% di poli(dimetilsilossano-b-etilene ossido) vengono miscelati accuratamente al rapporto desiderato per 5 minuti, degassati per 2 minuti e rivestiti per rotazione su coverslip spessi 170  $\mu\text{m}$  per 1 minuto a 1.500 giri/min. Il silicone viene poi polimerizzato a 70°C per 30 min. Successivamente i substrati vengono mantenuti in tutte le fasi in un ambiente pulito, privo di polvere e asciutto per evitare incrostazioni. Alla fine vengono sintetizzati i QD seguendo una ricetta pubblicata.

I QD sono stati depositati sul substrato mediante un processo di stampa elettroidrodinamico, per ottenere la massima precisione. In breve, il substrato viene posto su una piastra conduttiva con messa a terra. Un capillare di vetro rivestito d'oro con un diametro di apertura di 1-1,5  $\mu\text{m}$  viene riempito con la dispersione QD e portato a 5 mm dal substrato utilizzando uno stadio piezoelettrico con precisione nanometrica. In questo modo viene creato prima un film sul vetrino, dopodiché vengono depositati i quantum dots. infine, i substrati vengono incubati in un forno sottovuoto a 90 ° C per 1 ora, lavati per 1 minuto in metanolo e incubati per altre 2 ore nel forno a vuoto, per rimuovere i ligandi e fissare QD al silicone. I substrati sono stati poi incollati in piastre Petri da 35 mm.



### 3.3.2 Protocollo di esecuzione

Una volta aperti le petri contenenti la dispersione di quantum dots, viene seguito il seguente protocollo:

- 1) vengono subito sterilizzati con Etanolo al 75%;
- 2) vengono lavati con PBS per 3 volte;

- 3) si prepara una falcon con PBS e Fibronectina (serve per far aderire i substrati);
- 4) una volta messa la Fibronectina vengono lasciati in incubatore per 30 minuti, in modo che la fibronectina agisca;
- 5) dopo 30 minuti, viene effettuato un lavaggio con PBS per tre volte;
- 6) si procede con la semina delle cellule sulle petri
- 7) una volta terminato il tutto, le petri vengono messe in incubatore.
- 8) Il giorno successivo la semina, si procede con l'analisi delle petri con il Microscopio confocale, tramite cui vengono acquisite le immagini che successivamente vengono trattate con il software Cellogram.

### 3.3.3 Clomipramina (CLM)

La Clomipramina è un farmaco antiepilettico. Questo principio attivo provoca un aumento della produzione delle shock protein (HsP) che determina un aumento dell'autofagia cellulare. È stato deciso di testare questo farmaco poiché sono stati riscontrati degli effetti positivi su patologie autosomiche dominanti ad insorgenza pediatrica.

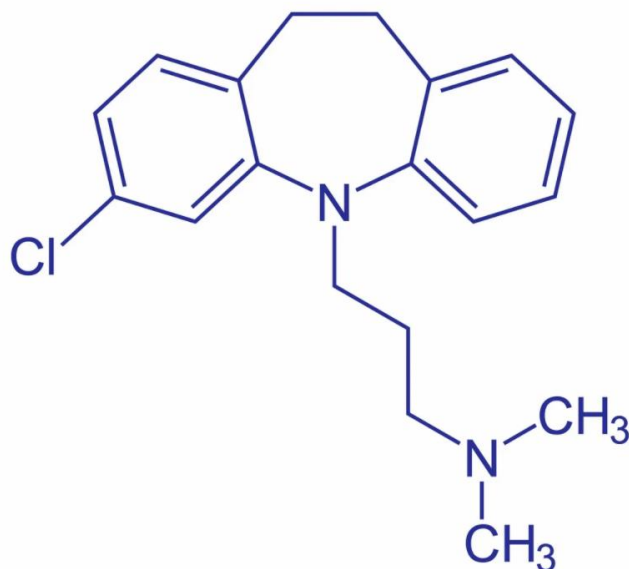


Figura 7. Formula Clomipramina



## **3.4 Protocollo ASO e CLM**

Per questo lavoro di tesi si è scelto di testare gli ASO e più precisamente sono stati utilizzati i Locked Nucleic Acids (LNAs), spiegati ampiamente nel precedente capitolo, inizialmente sintetizzati e testati dall'ospedale Gaslini di Genova. In merito alle considerazioni fatte precedentemente per la somministrazione della molecola nelle cellule bersaglio, si è scelto di inserire gli ASO direttamente, senza utilizzare vettori o altri sistemi di rilascio.

Di conseguenza l'ASO viene fornito direttamente alle cellule seminate sulle petri su cui sono stati stampati i QDs, in una concentrazione di 100 nM. Per quanto riguarda il protocollo relativo la forza di trazione è lo stesso utilizzato negli altri esperimenti.

La stessa cosa vale per il CLM è stato somministrato direttamente alla linea cellulare in una concentrazione di 5  $\mu$ M.

## **3.5 Microscopia confocale per l'acquisizione delle immagini**

Il microscopio utilizzato è il Leica TCS SP2, ed è confocale a scansione laser.

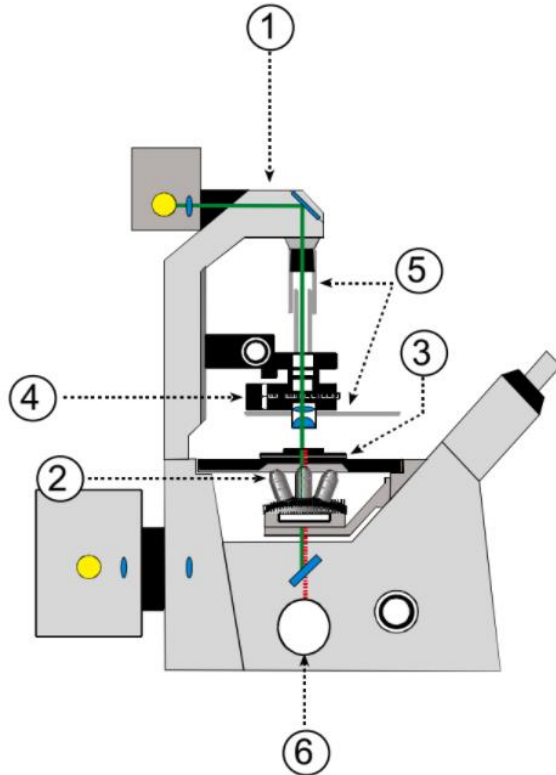
Si tratta di un microscopio invertito in cui la sorgente luminosa (un laser pulsato) ed il condensatore sono posti in alto, al di sopra del tavolino portaoggetti, mentre gli obiettivi e la torretta si trovano al di sotto.

L'analisi microscopica di un sistema biologico, può avvenire sfruttando l'interazione delle biostrutture con una radiazione luminosa, oppure a seguito di una marcatura specifica delle strutture con sostanze in grado di interagire con la luce.

Il principio su cui basa la microscopia confocale consiste nell'illuminare il campione punto per punto, registrando la risposta, tipicamente in riflessione o fluorescenza, della sola luce proveniente dal punto illuminato.

Nella microscopia confocale le strutture vengono riconosciute in quanto la luce emessa o riflessa da un campione, da un unico piano focale, viene concentrata e quella proveniente dal di fuori di questo piano viene soppressa.

In uno scanner confocale a punti, le lenti del microscopio focalizzano la luce laser su un singolo punto del piano, detto punto focale. Dopodiché il laser scandisce punto per punto creando l'immagine da acquisire. La luce in fluorescenza e quella riflessa del campione vengono direzionate attraverso l'obiettivo.



L'assetto confocale presenta un elemento di fondamentale importanza, il pinhole. Un diaframma di piccole dimensioni che non permette ai contributi luminosi provenienti dai piani fuori fuoco di raggiungere il rivelatore. I vantaggi legati a questo elemento sono le sue dimensioni ridotte. Quando l'oggetto in osservazione si trova nel piano di fuoco la luce riemessa viene focalizzata sul pinhole e viene rivelato gran parte del segnale d'interesse. Quando invece un oggetto si trova fuori dal piano di fuoco, si forma un'immagine sfocata sul pinhole, la cui intensità misurata risulta molto minore.

Il pinhole, e la scansione punto per punto, sono gli aspetti principali che caratterizzano la confocalità.

I dati acquisiti da un microscopio confocale sono sostanzialmente dei valori di intensità per ogni voxel attraverso il volume 3D del campione e vengono visualizzati sotto forma di immagine digitalizzata.

Il principio che regola l'acquisizione è il campionamento. In questo approccio l'immagine viene visualizzata grazie ad un numero di misure singole che riflettono le proprietà

all'interno di specifiche regioni del campione, la misura coinvolge le proprietà ottiche (conteggio dei fotoni).

Un microscopio viene considerato come un sistema lineare a spazio invariante, la cui funzione di risposta all'impulso (Point Spread Function, PSF) caratterizza la trasformazione di un ingresso (oggetto) in uscita (immagine).

La funzione di risposta all'impulso è fondamentale nella caratterizzazione del processo di formazione dell'immagine del microscopio confocale a scansione laser. Con la sola assunzione che il sistema sia lineare e spazio-invariante, applicando la sovrapposizione degli effetti, la risposta all'impulso consente di determinare l'immagine che il sistema fornisce, avendo in ingresso un oggetto noto. La PSF di un sistema formatore di immagine può essere usata in uno schema di problema inverso per la ricostruzione dell'oggetto generatore dell'immagine osservata.

I componenti principali dell'assetto strutturale sono i seguenti:

- 1) Modulo di eccitazione : costituito da diversi laser che coprono diverse lunghezze d'onda. Nel nostro caso è stato utilizzato un laser alla lunghezza d'onda di 543 nm, considerando di eccitare nel verde;
- 2) Alimentazione e modulo di controllo laser : serve per alimentare e controllare l'uscita del laser;
- 3) Microscopio invertito : al cui interno sono presenti due filtri. Un filtro di eccitazione che consente di tagliare le lunghezze d'onda di eccitazione, e un secondo filtro che permette di variare ulteriormente l'intensità di eccitazione. Inoltre, sono presenti due specchi dicroici, di cui uno serve per separare il cammino ottico dell'eccitazione da quello dell'emissione.

Il microscopio presenta vari obiettivi in base al tipo di ingrandimento che si vuole avere, in questo lavoro si è optato per un 40X in olio.

- 4) Computer
- 5) Software per l'acquisizione

Il microscopio è stato utilizzato per acquisire esclusivamente l'immagine in fluorescenza che rappresenta la matrice di quantum dots, al fine di ottenere il valore di forza di trazione esercitata dalla cellula sul substrato.

## **3.6 Software ImageJ per elaborazione delle immagini**

Preliminarmente si è proceduto con un'elaborazione delle immagini, e a tal fine è stato utilizzato il software ImageJ.

ImageJ è un programma informatico di elaborazione digitale delle immagini, rilasciato nel pubblico dominio, basato su Sun-Java; sviluppato dal National Institutes of Health degli Stati Uniti. ImageJ è un programma informatico di elaborazione digitale delle immagini, consente di analizzare, processare, modificare e visualizzare immagini.

Considerando che nelle immagini acquisite vi è la presenza di più cellule l'utilizzo di questo software ha permesso, ove possibile, di isolare una singola cellula per calcolarne il valore di forza di trazione ed inoltre ha permesso di ricavare l'immagine utilizzata come riferimento nel calcolo della forza di trazione.

## **3.7 Software Cellogram per elaborazione immagini e calcolo della forza di trazione**

Il pacchetto Cellogram contiene un software sviluppato su misura per l'analisi di immagini riguardo la forza di trazione. Il software comprende il rilevamento dei marker (costituiti dai quantum dot nel nostro caso), la stima della posizione di riferimento e l'analisi degli elementi finiti per calcolare i campi di trazione superficiale.

Questo software prevede quattro step principali:

- 1) Detection;
- 2) Meshing;
- 3) Analisi;
- 4) Risultati.

## 3.7.1 Detection

Come input viene caricata l'immagine acquisita in fluorescenza, in scala di grigio. Questa contiene i quantum dots, considerati come marcatori. Come primo step viene analizzata l'immagine per estrarre la posizione 2D di ogni marker, rappresentato da un singolo nanodisco.

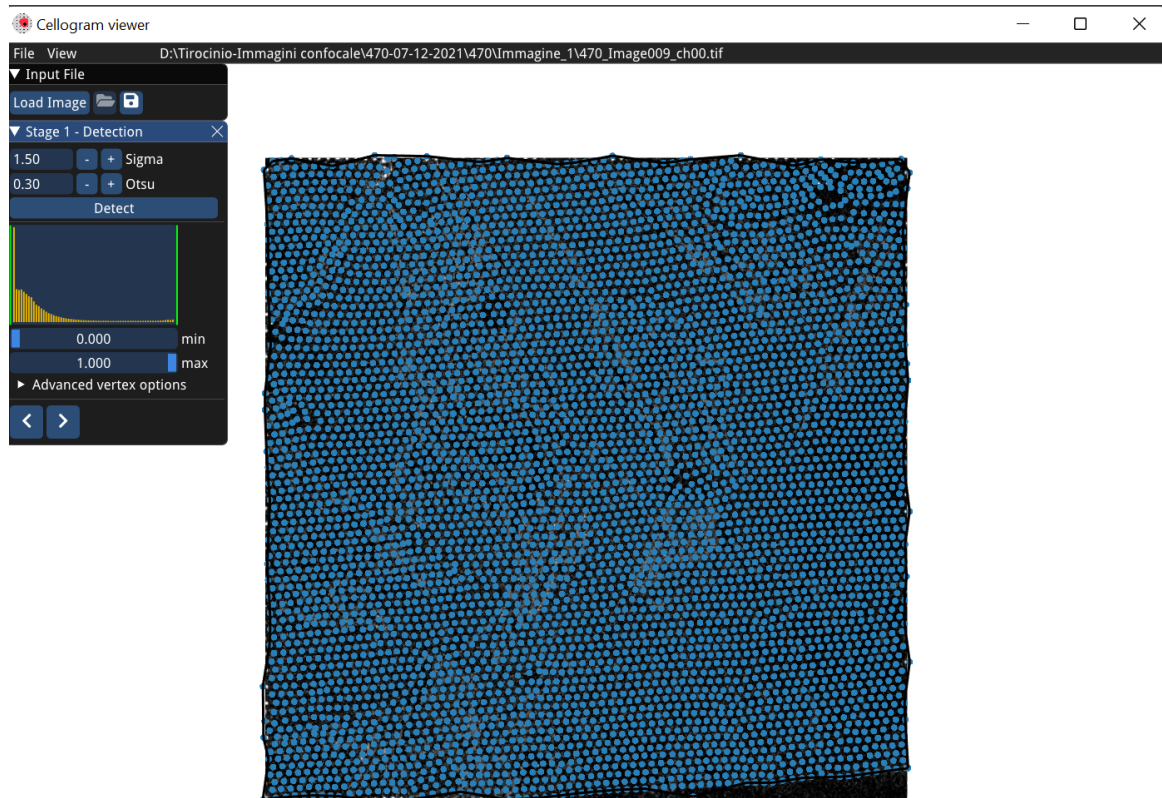


Figura 8. Detection

Inizialmente, viene applicato all'immagine un filtro gaussiano con una sigma definita dall'utente per ridurre il rumore, ovvero l'immagine viene filtrata con una gaussiana 2D. Questa immagine viene quindi binarizzata ad un livello di intensità determinato algoritmicamente, in modo che venga generata una maschera con delle regioni in cui potrebbero essere localizzati i marcatori. Parallelamente figura originale viene applicato un filtro Laplaciano di Gauss (LoG). L'immagine LoG viene poi sottratta da quella gaussiana per generare un nuovo fotogramma con picchi più netti nella posizione dei marcatori. In questa immagine risultante vengono determinati i massimi locali. Un pixel è considerato un massimo locale se mostra il valore di intensità più alto tra i suoi otto pixel vicini. Se un

pixel è un massimo locale e si trova nella regione candidata della maschera, allora la posizione del pixel viene utilizzata per fare un adattamento ai minimi quadrati di una gaussiana 2D nel suo intorno, considerando l'immagine originale non filtrata. Il risultato è un'immagine con valori bassi nelle posizioni dove originariamente non c'era gradiente di intensità, cioè il centro dei marker, e valori alti dove i gradienti di intensità erano più forti. I rilevamenti doppi che possono derivare da due massimi vicini, per i quali le gaussiane si fondono, vengono eliminati dopo l'adattamento.

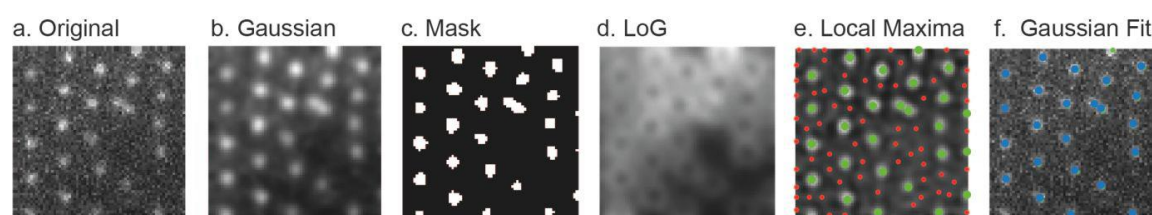


Figura 9. Figura 8. Fasi Detection: (a) Immagine originale, (b) Filtro gaussiano (c) Maschera generata dall'immagine sogliata in (b) usando Otsu-Threshold, (d) Laplaciana di Gaussiana (LoG), (e) Rilevamento massimi locali nell'immagine risultante dalla LoG sottratta dall'immagine gaussiana. I massimi rilevati nella maschera e fuori dalla maschera sono in verde e rosso, rispettivamente. (f) Adattamento ai minimi quadrati delle gaussiane ai massimi locali rilevati

## 3.7.2 Meshing

Lo step precedente genera un insieme di posizioni 2D dei marcatori: a questo punto si deve ricostruire un reticolo di connettività regolare. La sfida sta nel fatto che la griglia è deformata dalle forze di trazione (che sono sconosciute). L'unica conoscenza che si ha è che, prima dello spostamento indotto dalle cellule, i marcatori erano posizionati secondo un reticolo triangolare regolare ma di dimensioni e orientamento ignoti.

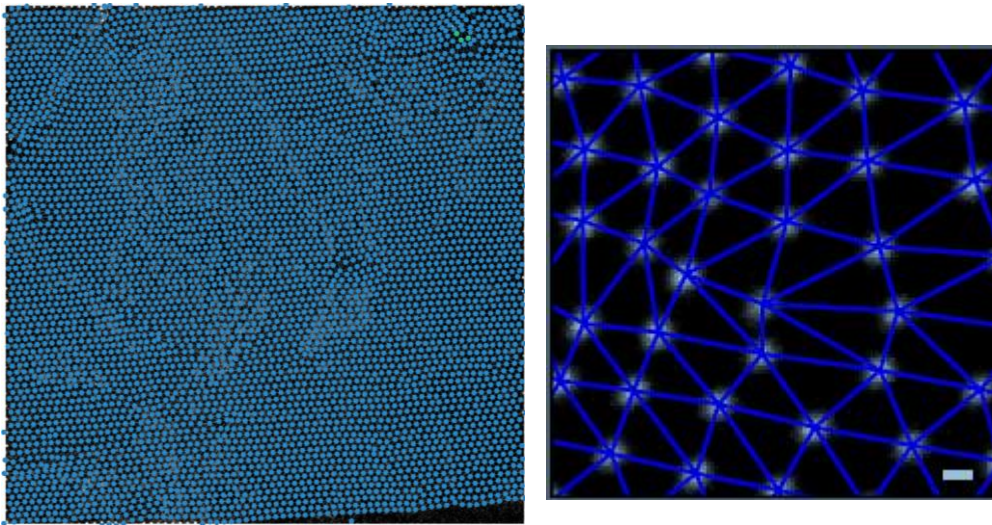


Figura 10. Meshing

Differentemente dai metodi applicati precedentemente, questa ricostruzione deve essere capace di risolvere eventuali errori nel rilevamento dei marcatori, correggendo i falsi negativi (marcatori non rilevati durante la procedura di rilevamento) così come i falsi positivi (marcatori indentificati erroneamente dalla procedura di rilevamento). Per esempio, i falsi negativi e positivi possono essere indotti dal rumore presente nell'immagine, o derivare dall'errata interpretazione di due marcatori adiacenti come uno solo.

L'input di questo step è un insieme di punti  $D$  rilevati in 2D, in cui ogni punto è rappresentato da una coppia di coordinate. L'output è un insieme  $P \subset D$  di falsi positivi, un insieme  $N$  di falsi negativi (nuovi punti 2D che sono stati individuati anche se non sono mai stati osservati direttamente), e una permutazione  $\alpha$  di punti 2D ( $D / P \cup N$ ) nella posizione di una griglia triangolare regolare. Una volta che la permutazione è nota, le posizioni nella condizione di riposo, possono essere dedotte dallo smoothing della griglia e gli spostamenti sono quindi definiti dalla differenza.



Tra tutte le potenziali scelte di  $N$ ,  $P$ , (per una data osservazione  $D$ ), quella che minimizza la sua unlikelihood è definita come:

$$k1|N| + k2|P| + E(\alpha(D / P \cup N))$$

dove  $|X|$  denota la cardinalità dell'insieme  $X$ ,  $k1$  e  $k2$  sono parametri scalari fissi che determinano quanto i falsi positivi e negativi impattano la probabilità di una soluzione, e  $E(X)$  è un'approssimazione dell'energia elastica potenziale che sarebbe necessaria per deformare un modello regolare, dato  $X$  (sulla base del fatto che la configurazione meno energetica è la più plausibile).

Per definire  $E$ , il substrato elastico è approssimato come una rete di molle che seguono la legge di Hooke che collegano ogni coppia di punti vicini sul reticolo:

$$E(X) = \sum_{i=0}^{|X|} \sum_{x_j \in N_j} (|x_i - x_j| - L)^2$$

L'algorithmo implementato dal software utilizza due rappresentazioni complementari per  $\alpha$ , cioè una soluzione intermedia per una raffigurazione basata su Mesh e una basata su rappresentazione tramite Lattice (letteralmente "reticolo").

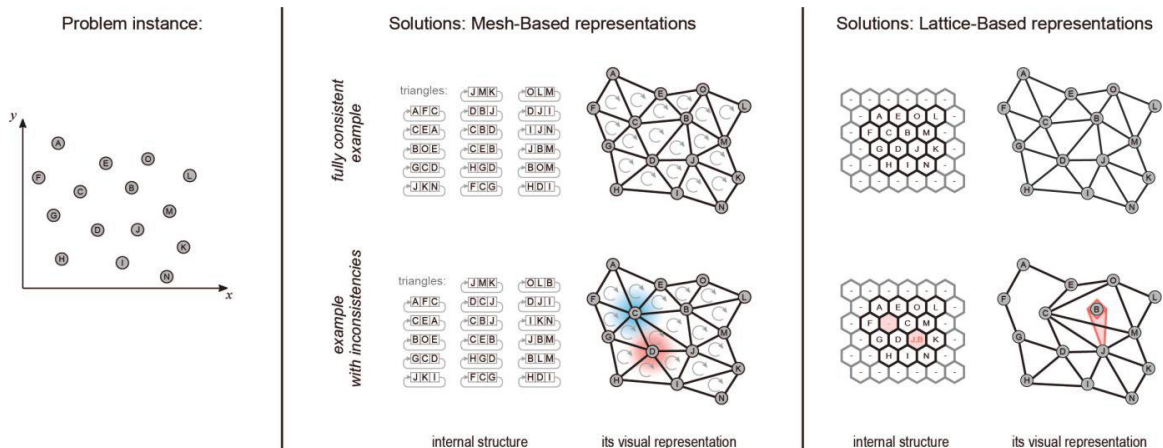


Figura 11. Rappresentazioni basate su Mesh e Lattice.

Le due rappresentazioni sono ugualmente capaci di esprimere qualsiasi cambiamento coerente con una connettività regolare, ma la cosa più importante, è che ciascuna può anche raffigurare alcune incoerenze di natura diversa. Passare da una all'altra permette di ridurre queste incoerenze in modo molto efficiente.

La permutazione tramite mesh è definita come una rete triangolare su due livelli, i cui vertici sono rappresentati dai punti  $D$ . In altre parole, una mesh consiste in tutti i punti  $D$  collegati da un insieme di triangoli; i lati dei triangoli sono chiamati bordi. Una maglia si dice regolare quando ogni vertice di confine ha valenza minore di 6, e ogni altro vertice ha valenza 6. Una maglia regolare può essere interpretata come una permutazione  $\alpha$  dei suoi



vertici D in un reticolo, purché codifichi un reticolo regolare. Una maglia non regolare, al contrario, non corrisponde a nessuna permutazione di questo tipo. Di conseguenza, le incongruenze di una rappresentazione di questo tipo sono dei vertici che infrangono il requisito di valenza sopra citato (detti vertici "irregolari").

Il reticolo, o matrice (Lattice), è una griglia regolare 2D di celle esagonali (struttura a nido d'ape). Ogni elemento di D si trova all'interno di una cella. Una cella può essere vuota o contenere uno o più elementi. Nel reticolo, le celle non vuote formano sempre un sottoinsieme contiguo della griglia, e tutte le celle sul confine della griglia sono vuote.

Idealmente, ogni cella non vuota ospita solo un singolo elemento di D. Inoltre, le celle vuote si trovano tutte in un insieme continuo intorno al reticolo (cioè non è presente un insieme di celle vuote completamente circondato da celle riempite). Un reticolo con queste proprietà può essere banalmente convertito in una permutazione valida. In questo caso le incongruenze di questa rappresentazione sono celle che ospitano più di un elemento di D (questi elementi sono chiamati "collidenti"), o celle vuote che non sono collegate al confine della griglia da una sequenza di celle vuote (queste celle sono chiamate "buchi").

L'algoritmo viene inizializzato calcolando la triangolazione 2D Delaunay dell'insieme di vertici D. Nelle aree non deformate, questa maglia riproduce la connettività e la forma di una griglia regolare ed è quindi una soluzione corretta. Tuttavia, nelle regioni distorte, vengono introdotti dei vertici irregolari.

In questa fase l'algoritmo passa da una rappresentazione all'altra, eliminando tutte le incongruenze che si verificano anche ricorrendo ad operazioni locali. Infine, si ferma quando un'intera iterazione (2 conversioni e 2 serie di operazioni locali) non cambiano la rappresentazione del reticolo. Solitamente, questo non richiede mai più di quattro iterazioni[17].

### 3.7.3 Analisi agli elementi finiti e risultati

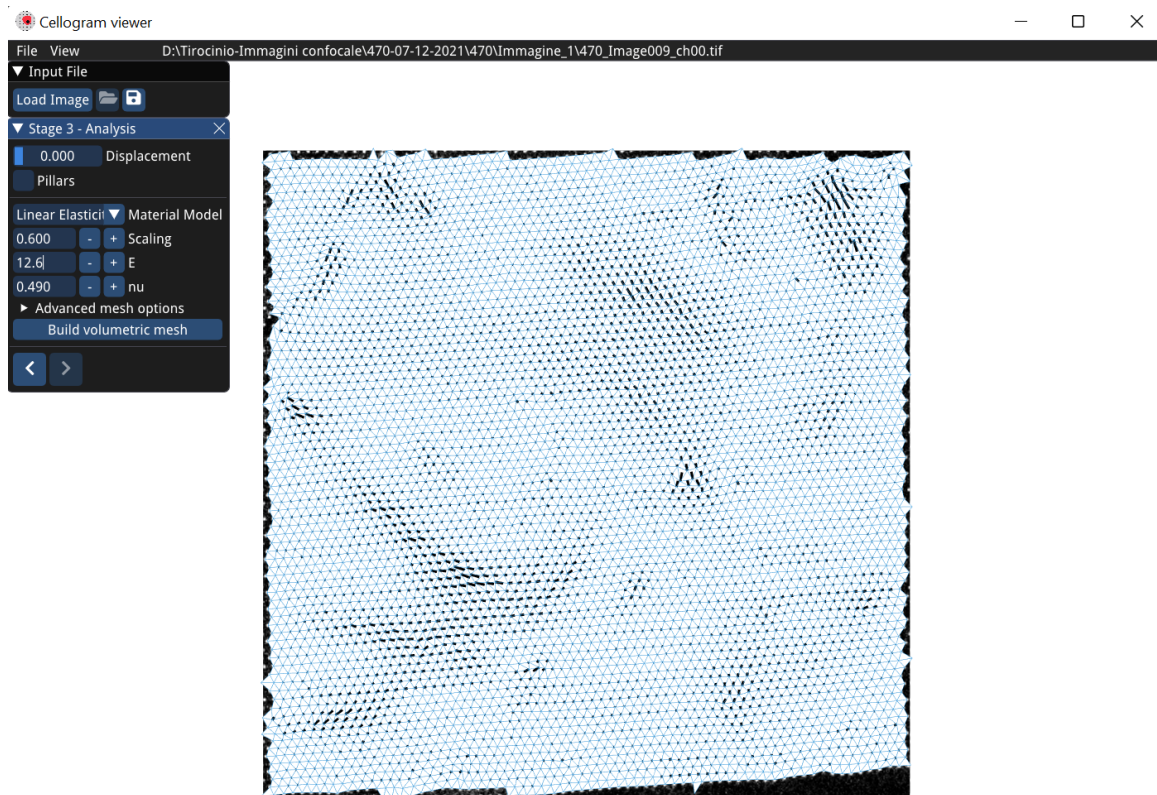


Figura 12. Analisi agli elementi finiti

A questo punto, sono stati rilevati i marcatori nell'immagine di input, ed è stata calcolata la connettività tra loro. Il passo successivo è quello di ricostruire gli spostamenti dei marcatori dalla configurazione a riposo rispetto a quella dell'immagine di input. Questo si ottiene con un processo di rilassamento che deforma i marcatori presenti nella figura in una griglia regolare: gli spostamenti sono poi calcolati prendendo la differenza tra la posizione iniziale e quella rilassata. Questo processo viene modellato utilizzando il Laplaciano:

$$L_{ij} = \begin{cases} -\sum_j L_{ij} \\ 1 \\ 0 \end{cases}$$

In cui, per una maglia perfettamente regolare, è soddisfatta la relazione:

$$L_x = 0$$

dove  $x$  sono le coordinate dei vertici della maglia. I vertici sono di due tipi: interni, che devono essere rilassati nella loro posizione originale, e di bordo che sono fissi.

Risolvendo l'equazione si ottiene la posizione a riposo dei vertici interni. Con i vertici di bordo invece, dato che sono fissi, questo ha l'effetto di spostare simultaneamente tutti i vertici verso il baricentro del loro intorno, creando così una griglia esagonale regolare.

Nella fase precedente sono stati calcolati gli spostamenti dei marcatori identificati, che risultano essere già una buona approssimazione per le forze di trazione. La conversione di questi spostamenti in forze di trazione dipende dal tipo di immagine. Per i quantum dots, dato che vi è un'applicazione continua delle forze sul substrato, la loro ricostruzione richiede un approccio di analisi agli elementi finiti. In questo caso bisogna risolvere un problema di deformazione volumetrica, che dati gli spostamenti dei vertici sulla superficie, determina le forze di trazione che inducono tali movimenti.

Come prima cosa si procede con una discretizzazione del substrato, che viene scomposto in una maglia formata da tetraedri. Questa maglia è di tipo adattivo, con una densità maggiore nelle regioni corrispondenti al maggiore spostamento.

In questa fase abbiamo un ulteriore processo di Mesh che prevede quattro step principali:

- 1) Step 1: viene creata una mesh 2D di sfondo come triangolazione Delaunay dei marcatori spostati, più alcuni punti aggiuntivi su un box esteso, la cui dimensione è controllata dall'utente. Principalmente si fa una distinzione tra zona interna (il substrato) e zona esterna (substrato + riempimento).
- 2) Step 2 : viene calcolato un campo di dimensionamento in 2D per indicare la lunghezza target del bordo della mesh da utilizzare nella simulazione.  
In primo luogo, la "fonte" di questo campo viene determinata come i triangoli della mesh i cui vertici hanno uno spostamento maggiore di una soglia data (impostata come percentuale dello spostamento massimo tra tutti i punti, in questo caso abbiamo il 18% come valore di default). La dimensione per la regione di origine è quindi impostata come una percentuale della distanza mediana tra quantum dots adiacenti, che in questo caso è il 30%. Se nessun marcatore rientra in questa soglia, l'intera box interna è impostata come "sorgente", e la dimensione target è impostata sulla distanza mediana tra i punti adiacenti. Il campo di dimensionamento viene poi propagato dalla regione di origine al resto della mesh di sfondo in modo che il rapporto tra i vertici adiacenti segua un rapporto dato dall'utente.
- 3) Step 3 : viene definita una maglia tetraedrica densa della scatola esterna in 3D.

- 4) Step 4 : La mesh tetraedrica densa viene rimescolata per seguire il campo di dimensionamento 3D.

Infine, si procede con l'analisi agli elementi finiti. Per ottenere una ricostruzione accurata viene utilizzato un modello di materiale elastico lineare. In questo caso sono stati utilizzati i parametri del polimero con cui è stato realizzato il substrato di quantum dots (coefficiente di Poisson=0.49, modulo elastico  $E= 12.6$  kPa).

Si risolve in base allo spostamento:

$$\text{div}(\sigma(u)) = 0 \quad \text{e} \quad u = g \quad \text{sul bordo}$$

dove  $\sigma(u)$  è il tensore dello stress e  $g$  sono le condizioni al contorno.

Di conseguenza si ottiene il seguente risultato:

$$\sigma(u) = 2 \mu \epsilon(u) + \lambda \text{Tr}(\epsilon(u))I, \quad \text{con} \quad \epsilon(u) = \frac{1}{2}(\nabla u^T + \nabla u)$$

Per ottenere le forze di trazione dalla soluzione dell'equazione differenziale parziale, si calcola il prodotto tra lo stress e la normale alla superficie.

Infine, nello step finale è possibile vedere il risultato relativo la traction force e salvare i risultati in un file.

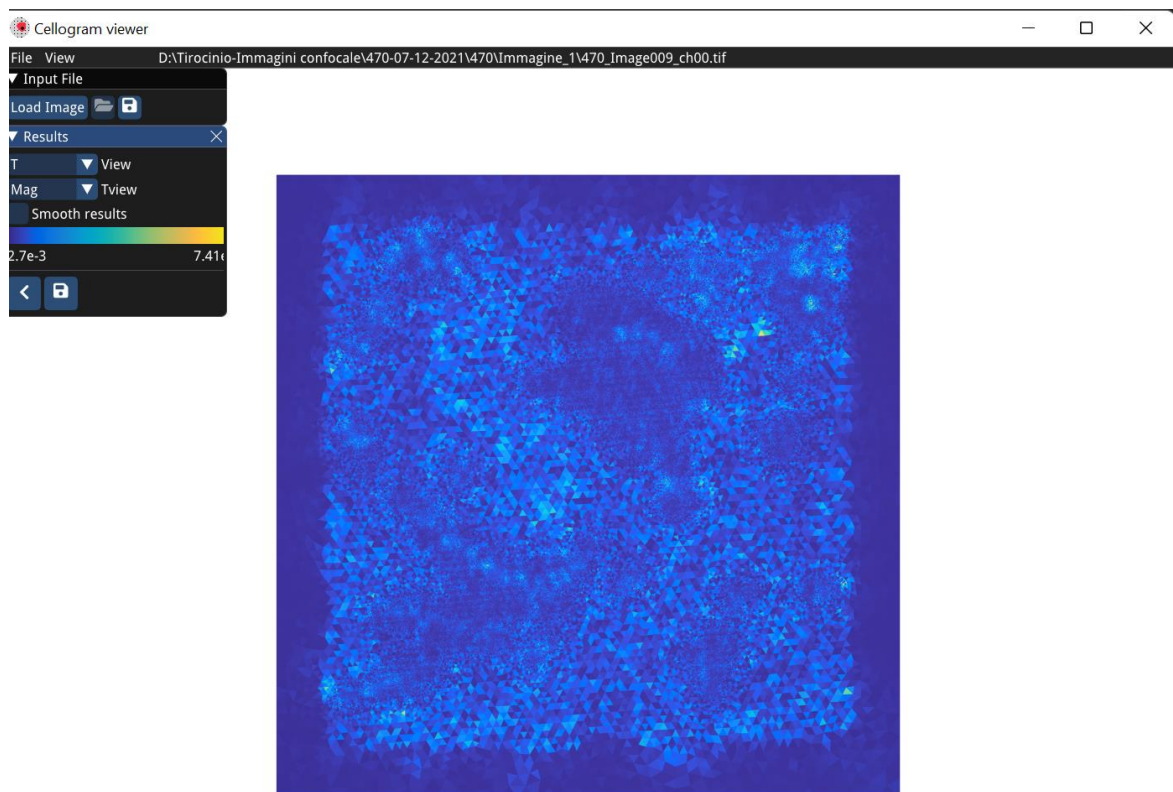


Figura 13. Risultati

### 3.7.4 Protocollo di analisi

Dopo aver elaborato le immagini utilizzando ImageJ, queste vengono analizzate utilizzando il software Cellogram. L'analisi viene ripetuta due volte, una considerando la parte in cui vi sono le cellule e la seconda considerando una parte della stessa immagine ma senza la cellula, che viene utilizzata come riferimento.

Una volta terminati tutti gli step del software, viene creato un file contenente al suo interno tutti i valori di traction. A questo punto utilizzando uno script Matlab vengono passati i file relativi le due immagini analizzate, ottenendo così il valore di forza di trazione della cellula contenuta nell'immagine.

## 3.8 Analisi statistica

La statistica è una disciplina che ha il fine di sintetizzare un insieme più o meno vasto di dati o, più in generale, di informazioni attraverso l'uso di grafici, valori tabellati o parametri specifici. Con l'analisi statistica dei dati otterremo quindi, in modo abbastanza veloce e semplice, le informazioni più importanti di un "campione" che, al fine di garantire risultati corretti, deve essere statisticamente rappresentativo della "popolazione". L'obiettivo della statistica è quello di valutare i valori di **probabilità**, con cui determinati eventi si verifichino.

In questo caso si è optato per il test delle ipotesi. In statistica il test d'ipotesi si utilizza per valutare la bontà di un'ipotesi. Per ipotesi s'intende un'affermazione che ha come oggetto accadimenti nel mondo reale, che si presta ad essere confermata o smentita da dati osservati sperimentalmente. Il metodo con cui si valuta l'attendibilità di un'ipotesi è il metodo sperimentale. In questo caso si valuta se effettivamente esiste una differenza tra i fenomeni osservati in due gruppi distinti. Quando si effettua un test d'ipotesi si fissa un'ipotesi nulla e un valore soglia che indica il livello di significatività del test, espresso tramite il parametro definito con il termine p-value. Il p-value in statistica inferenziale, indica il grado di significatività del campione.

Nel test delle ipotesi il valore p o p-value determina se rispetto ad una popolazione di valori l'insieme campionato sia adeguatamente congruo o significativamente rappresentativo. In

sintesi, il p-value sottolinea se i valori dell'insieme campionato siano più o meno aderenti all'ipotesi formulata per descrivere una popolazione di valori attendibili.

Normalmente in statistica inferenziale un valore di p-value maggiore di 0,05 indica che l'ipotesi campionata è nulla. Viceversa, un valore di p-value minore di 0,05 lascia pensare che l'ipotesi dei dati osservati siano statisticamente significativi.

Per effettuare la generalizzazione della popolazione dal campione, vengono utilizzati i test statistici. Un test statistico è una tecnica formale che si basa sulla distribuzione di probabilità, per raggiungere la conclusione relativa alla ragionevolezza dell'ipotesi. Questi test ipotetici relativi alle differenze sono classificati come test parametrici e non parametrici. Il test parametrico è un test statistico che si può applicare in presenza di una distribuzione libera dei dati, o comunque nell'ambito della statistica parametrica. Ciò avviene effettuando un controllo delle ipotesi sul valore di un parametro, quale la media, la proporzione, la deviazione standard, l'uguaglianza tra due medie, etc.

Al contrario un test non parametrico non presuppone nessun tipo di distribuzione. Pur essendo applicabile solo in presenza di distribuzioni di tipo normale, i test parametrici risultano più attendibili rispetto a quelli non parametrici in quanto associati ad una maggiore probabilità di riuscire a rifiutare un'ipotesi statistica errata.

### **3.8.1 Protocollo di analisi e software utilizzato**

Dalle analisi effettuate sono state ottenute diverse distribuzioni dei valori di trazione che fanno riferimento alle linee cellulari analizzate, ovvero sani, neurogeni, miogenici e quelle e quelle trattate con ASO e CLM. Innanzitutto, si è proceduto con il plot dei dati tramite Excel, per valutarne la distribuzione ed eliminare possibili outliers.

Dopodiché si è deciso di valutare la normalità delle distribuzioni utilizzando il test di Shapiro-Wilk, in modo da utilizzare il test più opportuno per il calcolo del p-value. Lo Shapiro test è considerato in letteratura uno dei più potenti per la verifica della normalità. In base al p-value ottenuto, l'ipotesi nulla secondo cui i dati abbiano una distribuzione normale, viene accettata o rifiutata.

Nel caso in cui il p-value abbia un valore maggiore di 0.05 l'ipotesi nulla viene rigettata. Una volta verificato che le distribuzioni non sono normali, si è deciso di utilizzare un test non parametrico, il Wilcoxon test.

Per eseguire l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software R. R è un linguaggio di programmazione e un ambiente di sviluppo specifico per l'analisi statistica dei dati. Venne scritto inizialmente dal matematico e statistico canadese Robert Gentleman, e dallo statistico neozelandese Ross Ihaka.

# Capitolo 4

## Esperimenti condotti

### 4.1 Linee cellulari

Per questo lavoro di tesi sono state analizzate sei linee cellulari, di cui:

- 2 appartengono a soggetti sani (ovvero soggetti con patologie che non coinvolgono il tratto intestinale e non hanno nulla a che fare con la miopatia viscerale);
- 1 linea cellulare proveniente da pazienti affetti dalla malattia di Hirschprung, in cui la miopatia viscerale è dovuta a problemi relativi a all'innervazione del tratto intestinale, ovvero i casi neurogeni;
- 3 sono linee cellulari provenienti da pazienti affetti da CIPO.

Il protocollo descritto precedentemente è stato eseguito allo stesso modo per tutte linee cellulari, ed è stato utilizzato in due contesti distinti:

1. orientato alla diagnosi;
2. orientato all'identificazione di un saggio funzionale per valutare l'efficacia di alcuni farmaci testati (ASO e CLM).

Di conseguenza, sono stati raggruppati i dati in base alla condizione patologica, al fine di valutare come forza di trazione varia tra soggetti "sani" e soggetti affetti. Successivamente, sono state ripetute le analisi su due linee cellulari affette, aventi lo stesso tipo di mutazione, in cui sono stati somministrati gli ASO e il CLM.



## 4.2 Criticità

Conducendo le varie attività, ho riscontrato diverse criticità.

1. Lavorare su linee cellulari primarie non costituisce una base robusta, poiché sono linee che evolvono nel tempo e non possono essere monitorate. Quindi possono essere considerate come una base da cui partire però, negli step successivi, gli esperimenti devono essere integrati in maniera più corposa;
2. Talvolta può capitare che ci siano problemi durante il processi di stampa dei substrati, di conseguenza si potrebbero avere dei substrati non conformi. Questo problema risulta evidente durante le acquisizioni al microscopio, infatti si possono verificare le seguenti situazioni:
  - a) La matrice di quantum dots potrebbe trovarsi su due piani focali differenti, pertanto le due parti devono essere acquisite separatamente;
  - b) Ci possono essere delle zone in cui non ci sono quantum dot, oppure zone disomogenee in cui ci sono queste particelle che presentano una forma non regolare. In questo caso, durante l'elaborazione dell'immagine, si cerca di non considerare la zona danneggiata.

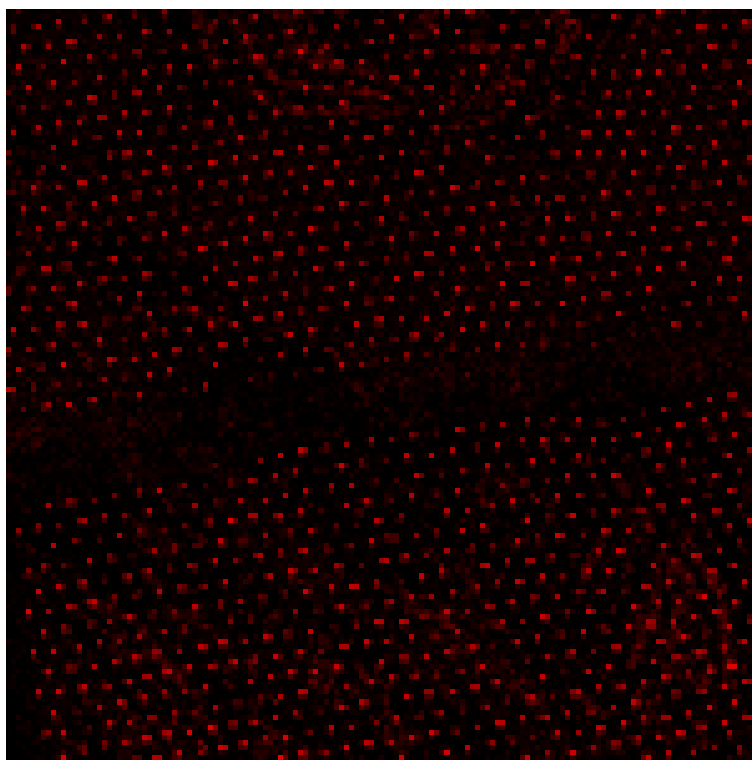


Figura 14. Esempio errore di stampa del substrato.

## Capitolo 5

# Risultati ottenuti

I dati ottenuti sono stati raggruppati considerando separatamente l'insieme delle linee riguardanti i casi sani e quelle relative ai casi miogenici, valutando le relative distribuzioni con l'utilizzo di Excel.

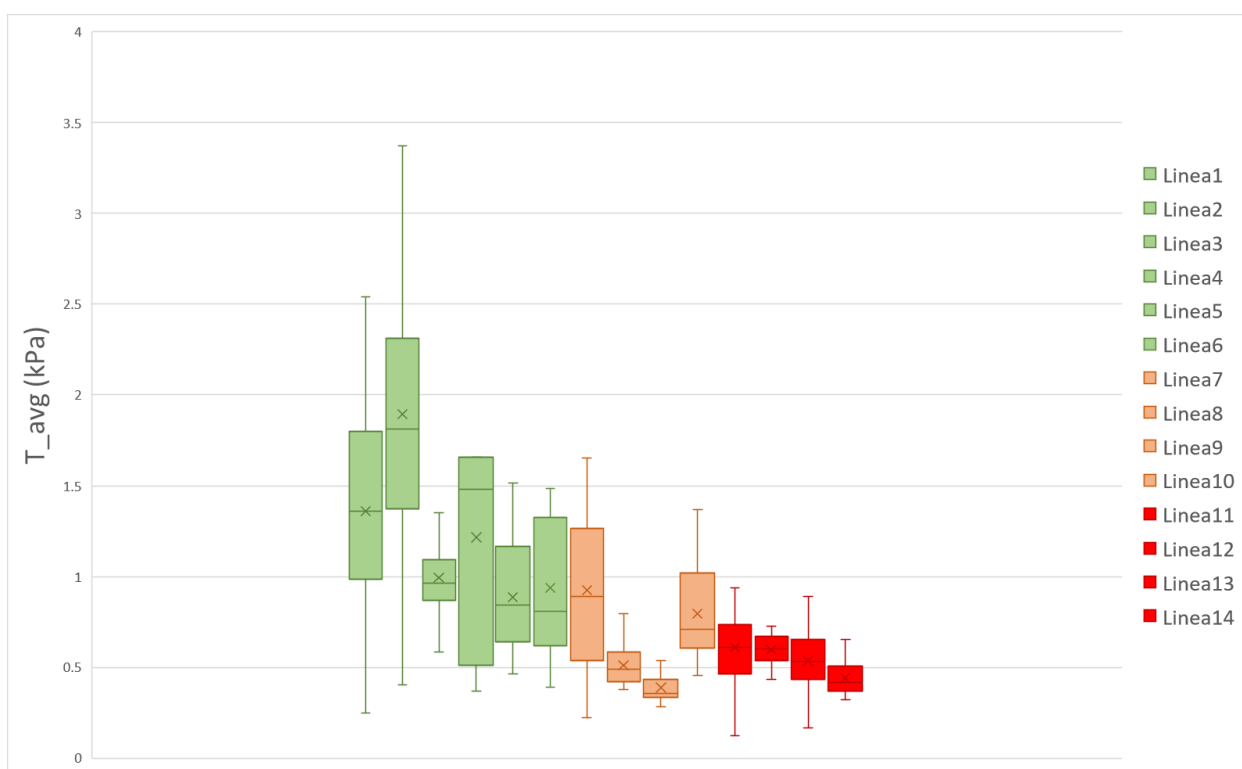


Figura 15. Linee cellulari

In questo grafico sono rappresentate tutte le linee ed è possibile notare come la forza di trazione varia tra di esse.

In seguito, considerando l'obiettivo di questa tesi, i dati sono stati raggruppati in base alla condizione patologica, al fine di valutare se il metodo utilizzato potesse discriminare in modo significativo in base alla sintomatologia.

## 5.1 Confronto tra casi miogenici e sani

I dati ottenuti sono stati raggruppati considerando insieme tutte le linee sane e quelle relative i casi miogenici, valutando le relative distribuzioni, per fare ciò ho utilizzato Excel.

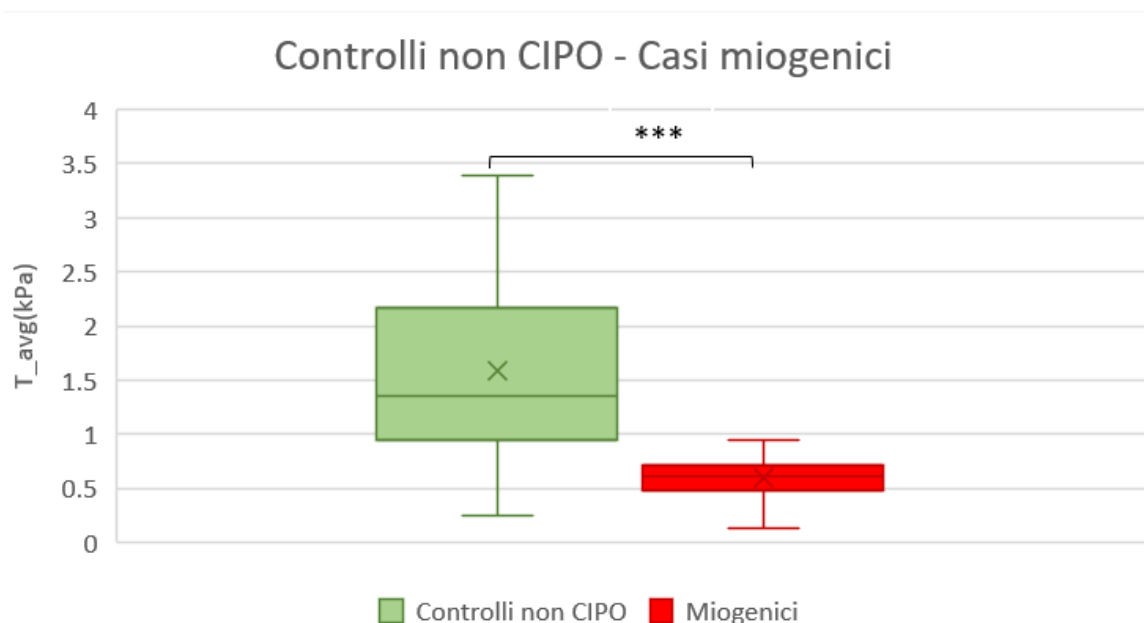


Figura 16. Confronto casi miogenici-casi sani

Dal grafico emerge una sostanziale disuguaglianza tra le due distribuzioni, per cui al fine di valutare se la differenza sia significativa o meno, si procede con l'analisi statistica.

|         |         |
|---------|---------|
| p-value | << 0.01 |
|---------|---------|

In questo caso, come livello di significatività, è stato scelto un valore pari allo 0.05 (5%), solitamente molto utilizzato, in quanto si ritiene abbastanza piccolo per dimostrare che la differenza osservata non è dovuta al caso.

Utilizzando il software R, attraverso il test di Shapiro, è emerso che le due categorie di dati non presentano una distribuzione normale, per cui applicando il Wilcoxon-test, per valutare la significatività, si è ottenuto un p-value molto minore di 0,01. Questo indica che, utilizzando il metodo descritto in questo lavoro di tesi, emerge una differenza significativa tra i casi non CIPO e quelli miogenici.

## 5.2 Confronto tra casi neurogeni e sani

Successivamente è stato fatto un confronto tra i dati inerenti i casi sani e quelli riguardanti i casi neurogeni, valutando le relative distribuzioni.

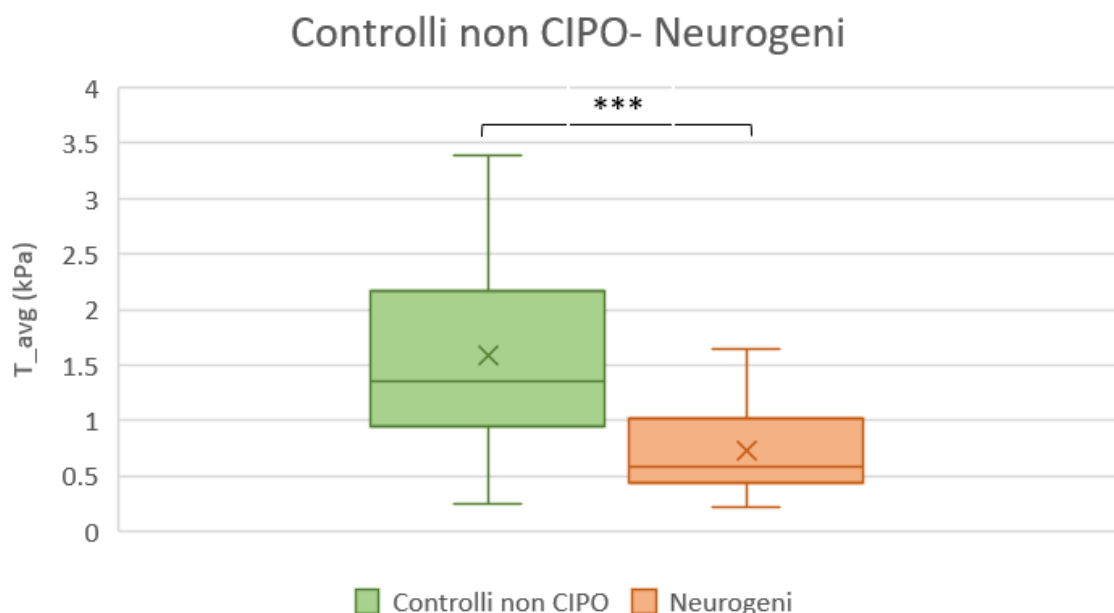


Figura 17. Confronto casi sani-casi neurogeni

Dal grafico emerge una sostanziale differenza tra le due distribuzioni, e al fine di valutare se la differenza sia significativa o meno, si procede con l'analisi statistica.

|         |            |
|---------|------------|
| p-value | $\ll 0.01$ |
|---------|------------|

Utilizzando il software R, attraverso il test di Shapiro è emerso che le due categorie di dati non presentano una distribuzione normale, di conseguenza applicando il Wilcoxon-test, per valutare la significatività, si è ottenuto un p-value molto minore di 0,01. Questo indica che utilizzando il metodo descritto in questo lavoro di tesi, emerge una differenza importante tra i casi sani e quelli neurogeni.

## 5.3 Confronto tra casi non miogenici e miogenici

Considerando l'obiettivo di questo lavoro di tesi, sono stati confrontati anche i dati relativi ai due casi che presentano la sintomatologia CIPO. In questo modo, si è cercato di capire se il metodo potesse discriminare in modo efficiente le due classi che presentano la medesima sintomatologia, ma attribuita a due cause differenti.

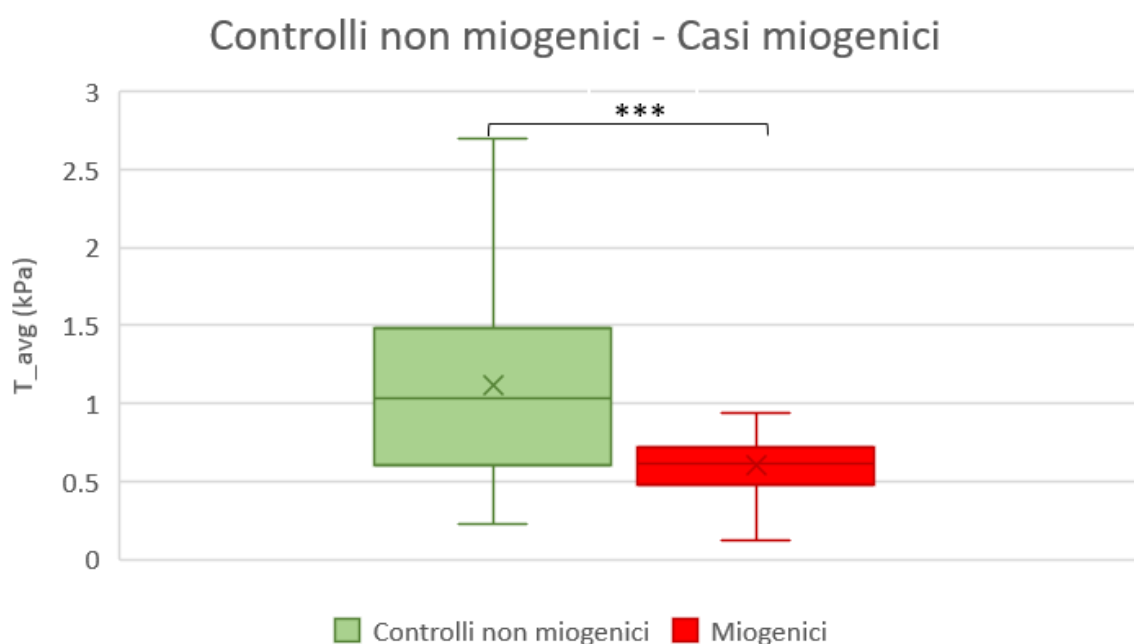


Figura 18. Confronto casi non miogenici-casi miogenici

Dal grafico emerge una sostanziale differenza tra le due distribuzioni, per cui al fine di valutare la significatività dei dati, si procede con l'analisi statistica.

|         |            |
|---------|------------|
| p-value | $\ll 0.01$ |
|---------|------------|

Utilizzando il software R, attraverso il test di Shapiro è emerso che le due categorie di dati non presentano una distribuzione normale, di conseguenza applicando il Wilcoxon-test, per valutare la significatività, si è ottenuto un p-value minore di 0.05. Questo indica che l'ipotesi nulla non viene accettata, pertanto le due popolazioni presentano una differenza significativa quindi di potrebbe dire che non appartengono alla stessa categoria di dati.

## 5.4 Confronto considerando i casi miogenici severi

Considerando l'obiettivo di questo lavoro di tesi, sono stati considerati i dati relativi a CIPO di tipo miogenica severa, ovvero aventi tutti lo stesso tipo di mutazione (R257C). In questo modo, si è cercato di capire se il metodo potesse discriminare in modo efficiente le due classi di CIPO che presentano la medesima sintomatologia, ma attribuita a due cause differenti.

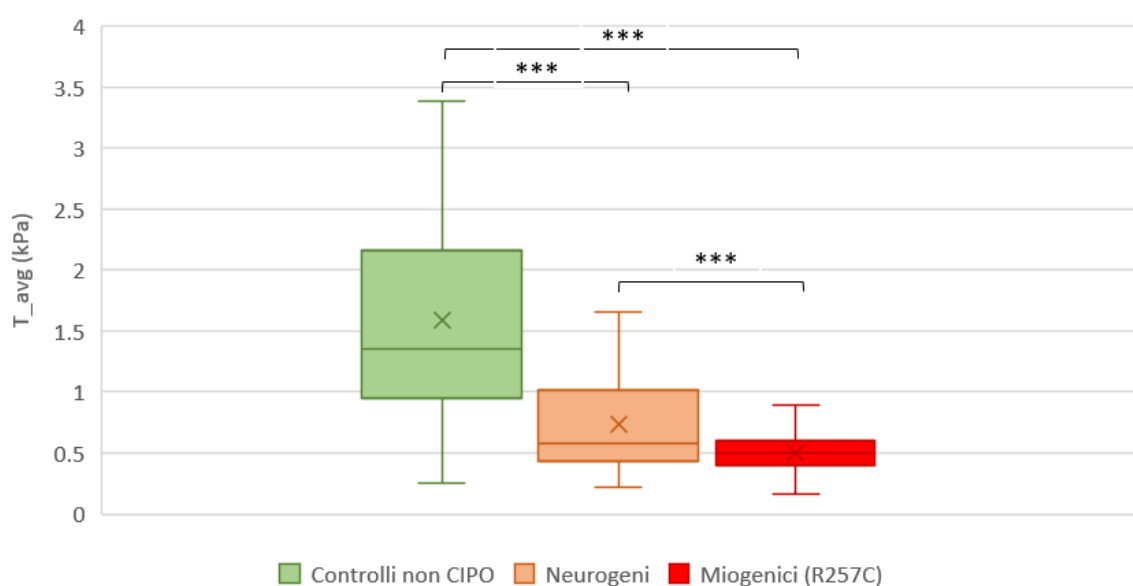


Figura 19. Confronto considerando CIPO miogenica severa

Dal grafico emerge una sostanziale differenza tra le distribuzioni, per cui al fine di valutare la significatività dei dati, si procede con l'analisi statistica.

|         |         |
|---------|---------|
| p-value | << 0.01 |
|---------|---------|

Utilizzando il software R, attraverso il test di Shapiro è emerso che le due categorie di dati non presentano una distribuzione normale, di conseguenza applicando il Wilcoxon-test, per valutare la significatività, si è ottenuto un p-value minore di 0.05. Questo indica che l'ipotesi nulla non viene accettata, pertanto le tre popolazioni presentano una differenza significativa quindi di potrebbe dire che non appartengono alla stessa categoria di dati.

## 5.5 Confronto tra campioni trattati con CLM e campioni non trattati

Dopo aver mappato i dati in base alla condizione patologica, è stato valutato l'effetto di alcuni farmaci, ovvero gli ASO e il CLM. Entrambi sono stati testati su linee cellulari aventi lo stesso tipo di mutazione. Nel caso specifico sono state utilizzate la linea 12 e la linea 13 con mutazione in ACTG2 p.R257C. Di seguito sono riportati i risultati relativi alla linea 12.

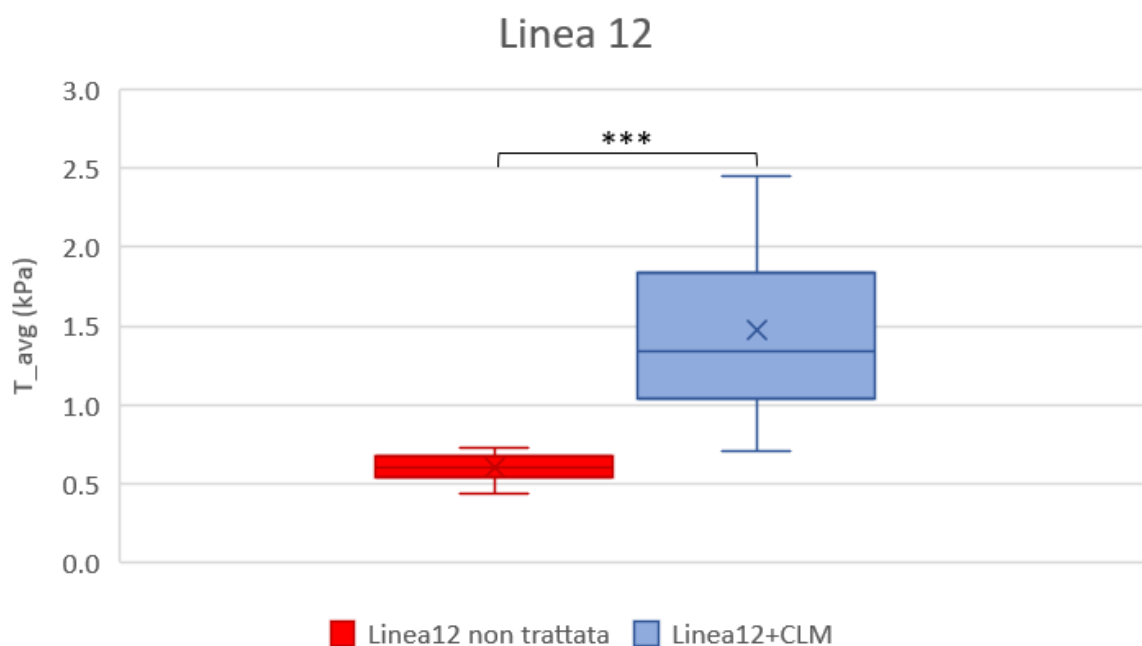


Figura 20. Confronto campioni trattati e campioni non trattati

Dal grafico emerge una sostanziale differenza tra le due distribuzioni, dunque si procede con l'analisi statistica, al fine di valutare se la differenza sia significativa o meno.

|         |            |
|---------|------------|
| p-value | $\ll 0.01$ |
|---------|------------|

Utilizzando il software R, attraverso il test di Shapiro è emerso che le due categorie di dati non presentano una distribuzione normale, di conseguenza applicando il Wilcoxon-test, per valutare la significatività, si è ottenuto un p-value molto minore di 0,05. Questo indica che

utilizzando il metodo descritto in questo lavoro di tesi, emerge una differenza significativa tra i casi trattati e quelli non trattati con il farmaco.

Di seguito vengono riportati i dati relativi alla linea 13:

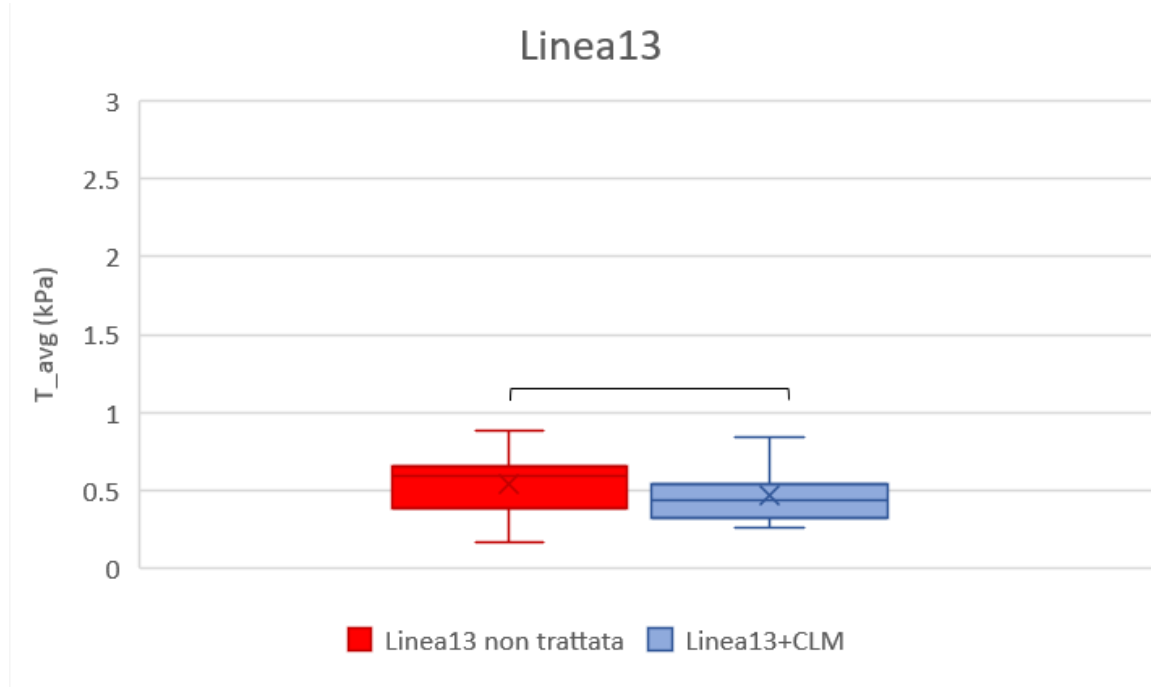


Figura 21. Confronto campioni trattati e non trattati

Dal grafico non emerge una sostanziale differenza tra le due distribuzioni, dunque si procede con l'analisi statistica, al fine di valutare se la differenza sia significativa o meno.

|         |       |
|---------|-------|
| p-value | >0.05 |
|---------|-------|

Utilizzando il software R, attraverso il test di Shapiro è emerso che le due categorie di dati non presentano una distribuzione normale, di conseguenza applicando il Wilcoxon-test, per valutare la significatività, si è ottenuto un p-value maggiore di 0,05. Questo indica che utilizzando il metodo descritto in questo lavoro di tesi, non emerge una differenza significativa tra i casi trattati e quelli non trattati con il farmaco. Nel caso della linea 13 si nota che il farmaco non apporta alcuna miglioria, al contrario i valori di traction dei campioni trattati appartengono alla stessa popolazione.



## 5.6 Confronto tra campioni trattati con ASO e campioni non trattati

Infine, è stato valutato l'effetto degli ASO sempre in riferimento alla linea 13. Considerando che gli ASO hanno una conformazione specifica, che ha come bersaglio l'mRNA, in questo caso la loro struttura è stata sintetizzata per agire sulla mutazione specifica di questa linea.

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti:

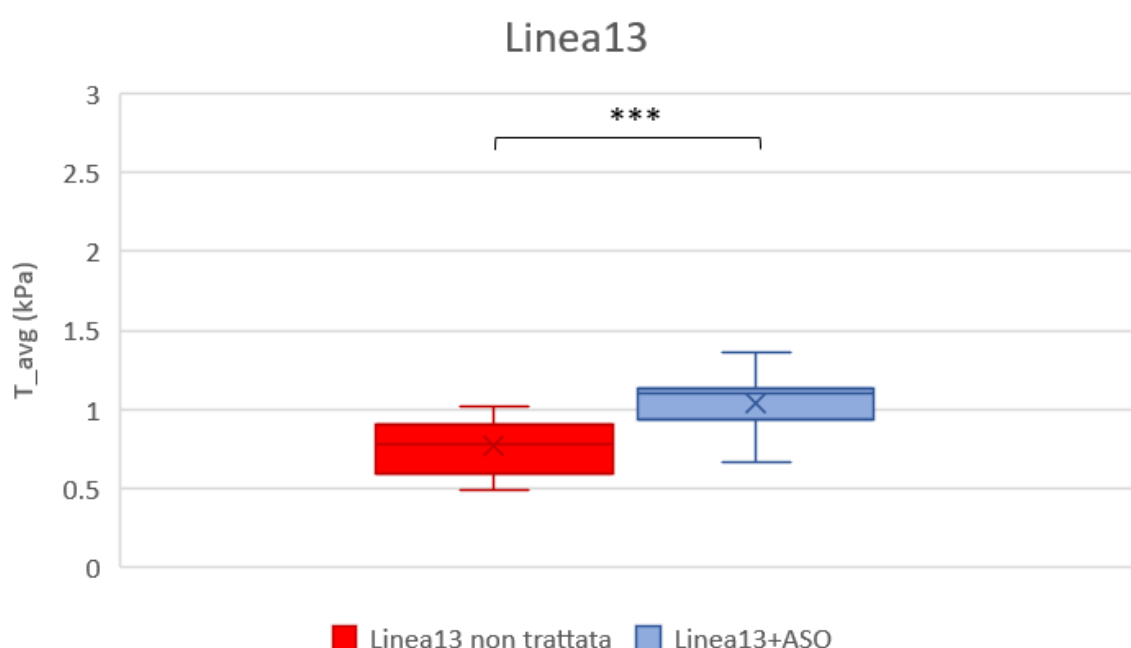


Figura 22. Confronto campioni trattati e campioni non trattati

Dal grafico emerge una sostanziale differenza tra le due distribuzioni, dunque si procede con l'analisi statistica, al fine di valutare se la differenza sia significativa o meno.

|         |         |
|---------|---------|
| p-value | << 0.01 |
|---------|---------|

Utilizzando il software R, attraverso il test di Shapiro è emerso che le due categorie di dati non presentano una distribuzione normale, di conseguenza applicando il Wilcoxon-test, per valutare la significatività, si è ottenuto un p-value molto minore di 0,01. Questo indica che

utilizzando il metodo descritto in questo lavoro di tesi, emerge una differenza significativa tra i casi trattati e quelli non trattati con ASO, pertanto si potrebbe ipotizzare che questo tipo di farmaco potrebbe essere una buona strada sulla ricerca di una possibile cura della miopatia viscerale.

## Capitolo 6

# Conclusioni

Come spiegato nei capitoli precedenti la pseudo ostruzione cronica intestinale è una condizione determinata da una ridotta motilità intestinale, che causa problemi a livello della peristalsi.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di utilizzare la tecnica della Traction force microscopy per capire se la forza di trazione a livello cellulare potesse essere correlata con la ridotta motilità delle cellule intestinali e quindi determinare un nuovo metodo per discriminare i soggetti sani da quelli affetti da un punto di vista fenotipico. La Traction force microscopy si basa sulla valutazione delle modificazioni indotte dalla forza di trazione che le cellule applicano su un substrato deformabile su cui sono stampati dei nanodischi fluorescenti.

Al fine di ottenere dei risultati validi, ho integrato questo metodo con altre discipline, quali l'analisi di immagini digitali, e l'analisi statistica. Questo tipo di approccio è stato basato unicamente sul parametro relativo la forza di trazione, acquisito elaborando le immagini digitali. Il primo risultato ottenuto è che utilizzando questo set-up sperimentale si riesce a raggiungere una discriminazione tra i campioni sani e quelli affetti dalla patologia, quindi potrebbe essere considerato un approccio mirato alla diagnosi.

Inoltre, in seguito alla somministrazione dei farmaci citati si è potuto vedere che nel caso della Clomipramina si ottengono dei miglioramenti esclusivamente per una delle due linee testate, anche se entrambe presentano lo stesso tipo di mutazione. Quindi non ci si può sbilanciare su un possibile effetto del farmaco. Invece nel caso degli oligonucleotidi antisense (testati solo sulla linea 13) sono evidenti dei miglioramenti alquanto significativi anche confrontando i risultati ottenuti con la Clomipramina.

Infine, in considerazione di prospettive future gli ASO potrebbero rappresentare una valida alternativa per una possibile terapia riguardo la miopatia viscerale, ovviamente sarebbe

auspicabile effettuare ulteriori test su altre linee cellulari in modo da confermare il risultato ottenuto sino ad ora, con la speranza che questa possibilità possa diventare una certezza.

# Bibliografia

[1] Recurrent Arginine Substitutions in the ACTG2 Gene are the Primary Driver of Disease Burden and Severity in Visceral Myopathy. Nurit Assia Batzir<sup>1,2</sup>, Pranjali K. Bhagwat<sup>1,3</sup>, Austin Larson<sup>4</sup>,..... Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics Jennifer E. Posey<sup>1</sup>, James R. Lupski Arthur L. Beaudet, Michael F. Wangler<sup>1</sup>. Hum Mutat. 2020 March.

[2] Segregation of a Missense Variant in Enteric Smooth Muscle Actin  $\alpha$ -2 With Autosomal Dominant Familial Visceral Myopathy. HELI J. LEHTONEN, TAINA SIPPONEN, SARI TOJKANDER, RIITTA KARIKOSKI, HEIKKI JÄRVINEN, NIGEL G. LAING, PEKKA LAPPALAINEN, LAURI A. AALTONEN, and SARI TUUPANEN\*, 2012.

[3] Variants in the Enteric Smooth Muscle Actin  $\alpha$ -2 Cause Pediatric Intestinal Pseudo-obstruction in

Chinese Patients. Zhiliang Wei, Lina Lu, Youjie Zheng, Weihui Yan, Yijing Tao, Yongtao Xiao, Wei Cai, and Ying Wang, 2020.

[4] ACTG2 Variants in Pediatric Chronic Intestinal

Pseudo-obstruction With Megacystis. Jong Woo Hahn, Soo Young Moon, Min Soo Kim, Min Hyung Woo, Min Ji Sohn, Hyun-Young Kim, Moon-Woo Seong, Sung Sup Park, Sung-Hye Park, Jin Soo Moon, and Jae Sung Ko<sup>1</sup>\*, Gennaio 2022.

[5] the cell a molecular approach. Geoffrey M. Cooper.

[6] the delivery of antisense therapeutics. Jong Woo Hahn, Soo Young Moon, Min Soo Kim, Min Hyung Woo, Min Ji Sohn, Hyun-Young Kim, Moon-Woo Seong, Sung Sup Park, Sung-Hye Park, Jin Soo Moon, and Jae Sung Ko<sup>1</sup>, 2000.

[7] In vivo and in vitro studies of antisense oligonucleotides. Anna Kilanowska and Sylwia Studzińska, Settembre 2020

[8] Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. Carlo Rinaldi and Matthew J.A. Wood.

[9] Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in

Drug Discovery and Development. Karishma Dhuri, Clara Bechtold, Elias Quijano, Ha Pham, Anisha Gupta, Ajit Vikram Sand Raman Bahal, Giugno 2020.

[10] Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. Nathalie Dias and C. A. Stein, Marzo, 2002.

[11] Efficient Delivery of Antisense Oligonucleotides Using Bioreducible Lipid

Nanoparticles In Vitro and In Vivo. Liu Yang, Feihe Ma, Fang Liu, Jinjin Chen, Xuewei Zhao, and Qiaobing Xu, Marzo 2020.

[12] Opportunities and challenges for antisense oligonucleotide therapies. Elsa C. Kuijper Atze J. Bergsma, W.W.M. Pim Pijnappel, Annemieke Aartsma-Rus, Maggio 2020.

[13] Antisense oligonucleotides. Daniel R. Scoles, PhD, Eric V. Minikel, MS, and Stefan M. Pulst, MD, Dr med, 2019.

[14] Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic, Jonathan K. Watts and David R. Corey, Gennaio 2012.

[15] Antisense Oligonucleotides: Treatment Strategies and Cellular Internalization. Colton M. Miller and Edward N. Harris, 2016.

[16] Confocal reference free traction force microscopy. Martin Bergert<sup>1</sup>, Tobias Lendenmann, Manuel Zuñdel, Alexander E. Ehret, Daniele Panozzo, Patrizia Richner, David K. Kim, Stephan J.P. Kress, David J. Norris, Olga Sorkine-Hornung, Edoardo Mazza, Dimos Poulidakos & Aldo Ferrari, Settembre 2016

[17] Cellogram: On the Fly Traction Force Microscopy. Tobias Lendenmann, Teseo Schneider, Jérémie Dumas, Marco Tarini, Costanza Giampietro, Apratim Bajpai, Weiqiang Chen, Julia Gerber, Dimos Poulidakos, Aldo Ferrari, Daniele Panozzo.

[18] Cellogram: Documentation. Tobias Lendenmann, Teseo Schneider, Jeremie Dumas, Marco Tarini, Apratim Bajpai, Weiqiang Chen, Dimos Poulidakos<sup>1</sup>, Aldo Ferrari, Daniele Panozzo.

[19] Introduzione all'analisi degli errori, lo studio delle incertezze nelle misure fisiche. di John R. Taylor (Autore)

[20] Diagnosis of Chronic Intestinal Pseudo-obstruction and Megacystis by Sequencing the ACTG2 Gene, yAubrey Milunsky, Clinton Baldwin, Xiaoying Zhang, Daniel Primack, z§Adrian Curnow, and !yJeff Milunsky, Ottobre 2017.

[21] The management of adult patients with severe

chronic small intestinal dysmotility. Jeremy M D Nightingale ,<sup>1</sup> Peter Paine,<sup>2</sup> John McLaughlin,<sup>3</sup> Anton Emmanuel, Joanne E Martin ,<sup>5</sup> Simon Lal,<sup>6</sup> on behalf of the Small Bowel and Nutrition Committee and the Neurogastroenterology and Motility Committee of the British Society of Gastroenterology, Agosto 2020.