



Corso Luigi Einaudi, 55 - Torino

Appunti universitari

Tesi di laurea

Cartoleria e cancelleria

Stampa file e fotocopie

Print on demand

Rilegature

NUMERO: 712

DATA: 07/10/2013

A P P U N T I

STUDENTE: Bessone

MATERIA: Bioingegneria Cellulare e Tessutale

Prof. Massai

Il presente lavoro nasce dall'impegno dell'autore ed è distribuito in accordo con il Centro Appunti.

Tutti i diritti sono riservati. È vietata qualsiasi riproduzione, copia totale o parziale, dei contenuti inseriti nel presente volume, ivi inclusa la memorizzazione, rielaborazione, diffusione o distribuzione dei contenuti stessi mediante qualunque supporto magnetico o cartaceo, piattaforma tecnologica o rete telematica, senza previa autorizzazione scritta dell'autore.

ATTENZIONE: QUESTI APPUNTI SONO FATTI DA STUDENTIE NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE.
IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.

BIOTECNOLOGIA CELLULARE E TESSUTALE

Prof. Massai



NECESSITÀ CLINICA DI STRATEGIE DI MEDICINA RIGENERATIVA

Nello sviluppo della **medicina moderna** sono stati fondamentali:

- la scoperta di nuove **tecniche di anestesia**
- l'uso di farmaci in grado di **combattere efficacemente le infezioni**

Di conseguenza, le tecniche chirurgiche, inizialmente adottate per rimuovere semplicemente parti di organi o tessuti danneggiati, si sono trasformate in **tecniche di ricostruzione**.

Oggi vengono realizzati sofisticati interventi in grado di ripristinare funzionalità di organi o tessuti mediante l'impiego di **materiale proveniente dallo stesso paziente** (es. trapianto di pelle, bypass aorto-coronarico, ricostruzione legamento crociato anteriore con tendine rotuleo, ...).

Non sempre però il **trapianto autologo** (da tessuti del paziente stesso) è praticabile causa limitazioni quali: disponibilità del tessuto, sua adeguatezza in termini di proprietà funzionali e strutturali, sua durata nel tempo.



NECESSITÀ CLINICA DI STRATEGIE DI MEDICINA RIGENERATIVA

Alcune di queste limitazioni sono state superate con il **trapianto** di organi o tessuti provenienti **da altri individui** (viventi o cadaveri). L'utilizzo di queste tecniche a partire dagli anni '60 è stato possibile grazie allo sviluppo di:

- nuove **tecniche chirurgiche**
- nuovi **farmaci anti-rigetto** (da assumere a vita)

I continui progressi compiuti dalla medicina dei trapianti hanno consentito di aumentare considerevolmente la percentuale di sopravvivenza dei pazienti. Esistono comunque delle **limitazioni** a questa strategia terapeutica:

- **scarsa disponibilità** di organi
- **possibilità di rigetto cronico**, con un progressivo danneggiamento dell'organo
- **effetti collaterali delle terapie anti-rigetto** (es. insorgenza di neoplasie), più rischiose per pazienti giovani



NECESSITÀ CLINICA DI STRATEGIE DI MEDICINA RIGENERATIVA

In questo scenario, la possibilità di **favorire o innescare**, tramite tecniche di **medicina rigenerativa**, una reazione di **rigenerazione endogena** (all'interno dell'organismo) nel **tessuto irrimediabilmente danneggiato** rappresenta una strategia con enorme potenziale.

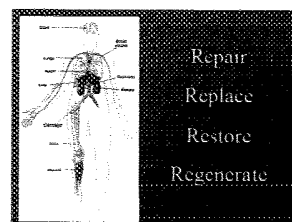
Queste tecniche richiedono, per un loro corretto sviluppo e utilizzo, che i **medici si avvalgano della collaborazione** di altre figure professionali quali biologi, chimici e ingegneri.

Si tratta non solo di **osservare come avvengono** alcuni fenomeni fisiologici e patologici e agire di conseguenza, ma di **progettare e costruire sistemi innovativi** per generare una nuova classe di **dispositivi composti da materiali artificiali e componenti biologiche**.



REGENERATIVE MEDICINE

Regenerative Medicine (RM) aims to **repair and regenerate damaged biological tissues** by developing substitutes that mimic the native environment to **guide the growth of new functional tissue in vitro or in vivo** to restore, maintain or improve tissue function.



RM has traditionally used **materials at hand** and the **technology of the day** to restore or improve function of organs and tissues afflicted with birth defects or the damages of injury, disease, and age.

The driving force for RM has been **clinical need**: clinicians, particularly surgeons, have recruited **practitioners from multiple disciplines** to address **complex biological problems** that are well beyond a single scientific or engineering discipline.



Origine della vita.....Tutto inizia dalle stelle...

1/28

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

NO

sono composte da atomi leggeri (H, He, etc.)
 sintetizzano gli elementi più pesanti durante gli ultimi stadi
 li disseminano nello spazio con le esplosioni delle Supernove

il tempo necessario perché si formino le specie atomiche necessarie per la vita basata sul carbonio (C, N, P, etc.) è quindi il tempo del ciclo vitale di base delle stelle (diversi miliardi di anni)



9-9.5: eruzioni vulcaniche e bombardamenti di comete ed asteroidi = inospitale e inadatta alla vita
 9.5-10: apparizione e lo sviluppo della vita sulla terra

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

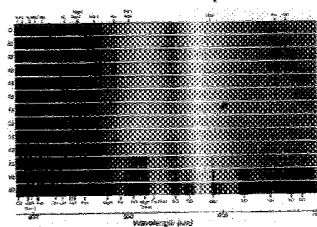
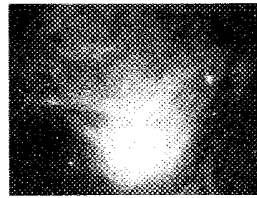


Origine della vita.....Tutto inizia dalle stelle...

2/28

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

NO



Gli spettri di emissione dei corpi celesti rivelano che lo spazio è costellato da nuvole (polvere interstellare) dense di particelle microscopiche (complessi contenenti C, H, O, N e talvolta anche zolfo e silicio)

questi si trovano sotto forma di radicali liberi estremamente reattivi e di piccole molecole

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

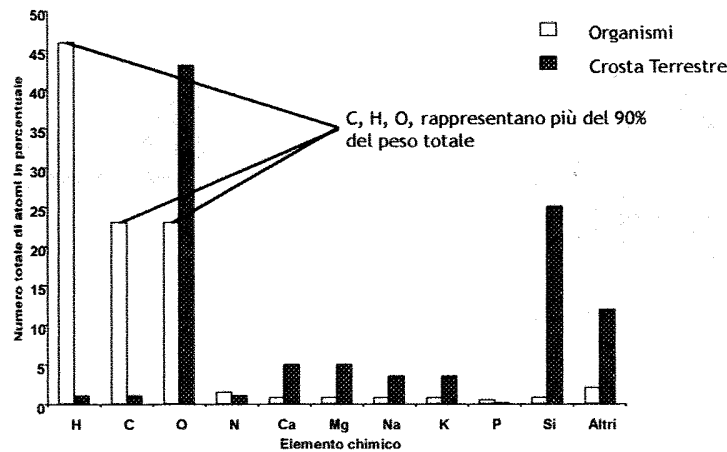


Specie chimiche

3/28

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

NO



Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Costituenti progenitori

5/28

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

PROTEINE

sono i composti con proprietà strutturali e funzionali. Le proteine strutturali vengono usate per costruire tutti i componenti molecolari all'interno e fuori l'ambiente cellulare; supportano le migliaia di reazioni chimiche che avvengono all'interno di una qualsiasi cellula, tra cui la sintesi di tutti i costituenti biologici (anche il DNA e l'RNA). non possono autoreplicarsi; nel senso che pur facilitando la formazione di legami tra i composti aminoacidici, non possono farlo senza l'informazione contenuta all'interno degli acidi nucleici



DNA

svolge la funzione di conservare l'informazione genetica, contenendo nel proprio codice le istruzioni per la codifica delle proteine, ossia l'esatto ordine in cui gli aminoacidi devono essere legati per formare una data proteina. non partecipa direttamente alla sintesi delle proteine (al fine di completare questa funzione primaria interviene poi un'altra molecola), non può autoreplicarsi.

RNA

Esistono diversi tipi di RNA alcuni infatti partecipano alla sintesi delle proteine in altre forme come ad esempio l'RNA ribosomiale che costituisce la vera e propria macchina cellulare per la "polimerizzazione" degli aminoacidi fungendo da catalizzatore tra aminoacidi e nascente catena peptidica. Altro tipo di RNA, RNA-transfer, svolge la funzione di portare gli aminoacidi in vicinanza del ribosoma.



Biogenetica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



L'RNA-world

9/28

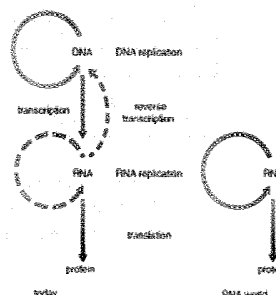
diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

➤ Queste tre classi -proteine, DNA e RNA- sono dipendenti dalla altre due sia per la loro sintesi che per la loro funzionalità.

➤ Una possibile soluzione è che esista una di queste classi che inizialmente svolse tutte funzioni. Le ipotesi si concentrarono subito sull'RNA e trovarono ampio appoggio quando si osservò che alcune molecole di RNA possono svolgere anche una funzione catalitica.

➤ L'RNA è, una molecola molto antica, molto versatile, e impegnata in tutti i processi relativi alla continuazione della vita nella cellula.

➤ Alla fine degli anni '70, un gruppo di ricercatori dell'università del Colorado ha scoperto che le molecole di RNA potevano agire da catalizzatori nelle reazioni implicate nella loro stessa formazione. E' teoricamente possibile, che una molecola di RNA possa essere esistita, e che questa molecola contenesse le informazioni per autoriprodursi e sintetizzare altre molecole di RNA.



Biogenetica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Le fasi del RNA-world

10/28

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

➤ sviluppo di un insieme di reazioni chimiche con lo scopo di convertire i composti primari (i tioesteri) nelle sequenze fondamentali dei nucleotidi

➤ i nucleotidi si legarono insieme per produrre le molecole di RNA

➤ sviluppo del processo di replicazione dell'RNA e con essa la sua evoluzione nel senso darwiniano del termine. A causa degli inevitabili errori di scrittura si formarono poi un numero elevato di varianti del modello iniziale, di queste alcune si replicarono più velocemente oppure si distinsero dalle altre per la maggiore stabilità tutto questo a svantaggio delle altre varianti. Questo fenomeno, a livello molecolare, non è altro che il meccanismo postulato da Darwin per l'evoluzione degli organismi: mutazioni fortuite, competizione, selezione e progresso dei sistemi predominanti

➤ sintesi delle proteine per mezzo dello stesso RNA

➤ ...

Biogenetica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

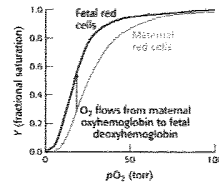


evoluzione 2

16/28

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

- ... le cellule contengono informazioni per costruire diversi tipi di emoglobina:
- emoglobina fetale
- emoglobina adulta



circa 200 milioni di anni fa la duplicazione genetica ha fatto in modo che l'emoglobina "fetale" venisse perfettamente separata da quella adulta.

Il processo evolutivo non coinvolge mai una singola cellula, ma una popolazione di cellule che costituiscono insieme una entità biologicamente rilevante.

All'interno di una data popolazione esistono ampi spazi di sperimentazione, milioni di modifiche possono essere tentate anche se la maggior parte di queste si rivelano inefficaci o inadeguate con cause irreparabili per la singola cellula.

La popolazione continua comunque a sopravvivere e gli individui che hanno prodotto dei rari miglioramenti si svilupperanno sempre più dominando le successive generazioni.

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



evoluzione 3

17/28

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Esempio: Il virus dell'HIV mostra i vantaggi dei cambiamenti evolutivisti in modo così accelerato che ne possiamo osservare gli effetti in mesi anziché in millenni.



La trascrittasi inversa del virus HIV (l'enzima che duplica l'informazione genetica del virus) è particolarmente incline ad errori di codifica, ciò comporta che la popolazione di virus all'interno di un organismo infetto contiene virus con migliaia di varianti del ceppo originario. Il più efficiente di queste dominerà sulle altre che saranno comunque presenti e continueranno a duplicarsi e riprodursi.

Quando un individuo viene trattato con una terapia antiretrovirale, la popolazione dei virus ha un ampio range di diverse mutazioni all'interno delle quali scegliere la forma che resiste alla terapia farmacologica.

Il virus viene reso più efficiente per mezzo del suo inefficiente meccanismo di riproduzione.

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



evoluzione 4

18/28

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

L'evoluzione porta comunque con se un importante inconveniente: il problema del patrimonio genetico.

Ogni qual volta che un meccanismo chiave di una macchina viene migliorato, risulta molto difficoltoso sostituirlo o realizzare ulteriori miglioramenti senza portare alla distruzione della cellula.

Ciò è particolarmente vero per i processi molecolari più importanti, come la sintesi proteica, i sistemi per la produzione di energia, la riproduzione, etc. tutti processi che richiedono l'azione concertata di diverse "macchine molecolari".

Questo porta alla notevole uniformità per tutti i sistemi viventi quando vengono osservati a livello molecolare: sono costruiti con i medesimi componenti di base.

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



evoluzione 8

22/28

diana.massai@polito.it, marco.dentu@polito.it

Il processo evolutivo pone però alcuni limiti alla costruzione delle proteine:

- ✓ sono solo circa una ventina i costituenti fondamentali (AA) la cui successione è codificata all'interno del genoma
- ✓ vi sono limiti alle dimensioni delle proteine
- ✓ esse devono essere principalmente confinate in ambienti acquosi
- ✓ è necessario che siano in grado di organizzarsi spontaneamente per poter disporsi all'interno dell'ambiente cellulare (folding e clustering)

La dimensione di un sistema proteico è limitato dalla percentuale di errore che caratterizza il processo di sintesi proteica, il quale in teoria è in grado di produrre proteine di qualsivoglia lunghezza.

Esistono due tipi di errori:

1. Errori che fraintendono l'informazione genetica sostituendo un aminoacido sbagliato lungo la crescente catena aminoacidica (1/2000 sostituzioni). Per proteine composte da 500 aminoacidi la probabilità di avere un errore è del 25%, mentre quasi tutte le proteine costituite da 2000 aminoacidi saranno affette almeno da un errore.
2. Errori di processo che sono causa dell'interruzione prematura del processo di sintesi prima che la proteina sia completata (1/3000 sostituzioni). Solo raramente lunghe proteine costruite da sequenze di migliaia di aminoacidi sono costruite in toto.



evoluzione 9

23/28

diana.massai@polito.it, marco.dentu@polito.it

➤ La lunghezza media delle proteine proprio per questi motivi oscilla tra i 300 e i 1000 aminoacidi come compromesso adottato proprio dalla cellula per limitare la possibilità d'errore (la costruzione di catene proteiche più grandi nascono dalla coniugazione di più unità).

➤ Importanza del solvente:

➤ L'acqua è un substrato assolutamente necessario per l'organizzazione spaziale delle catene proteiche e per l'espletazione delle loro funzioni. Parti di una proteina ricche di atomi di carbonio interagiscono molto debolmente con l'acqua e sono responsabili della natura idrofobica di questi siti. Quando infatti questi siti sono immersi all'interno di una soluzione acquosa si uniscono insieme formando un complesso globulare minimizzando in questo modo la superficie di contatto con le molecole d'acqua consentendo a quest'ultime di spostarsi andando ad interagire con zone più affini.

➤ Questo effetto idrofobico è uno dei più importanti ed efficaci strumenti con i quali le proteine si organizzano tridimensionalmente.



evoluzione 10

24/28

diana.massai@polito.it, marco.dentu@polito.it

Poiché il nostro patrimonio proteico è in stretta relazione con l'ambiente acquoso e con l'interazione idrofobica che ne scaturisce,

➔ noi non potremmo in nessun modo vivere nel vuoto oppure in altri tipi di solventi quali i solventi organici, perché le proteine semplicemente non si organizzerebbero spazialmente.

➔ Per una proteina, la forma spaziale e le funzionalità biochimiche sono le due facce della stessa medaglia, come a scale superiori le strutture dei tessuti determinano le loro capacità funzionali (concetto di anatomofunzionalità).



Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Sono composti organici formati da carbonio, idrogeno e ossigeno. Sono caratterizzati da idrofobicità e scarsa solubilità in acqua. Sotto forma di aggregati, svolgono le funzioni di:

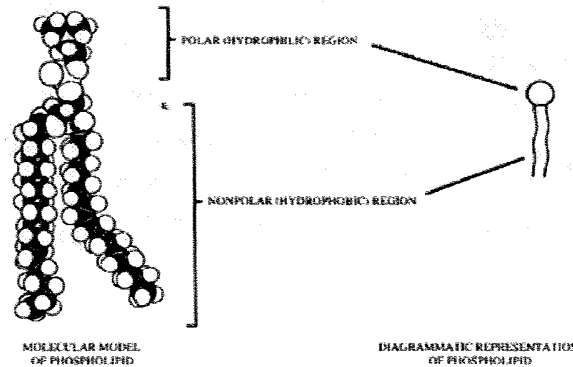
- Costituire la membrana cellulare assieme alle proteine
- Essere riserve di energia se costituiti da catene di idrocarburi
- Trasmettere messaggi intra- ed extracellulari



Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

I LIPIDI sono presenti soprattutto sotto forma di fosfolipidi caratterizzati da due code che contengono dai 14 ai 24 atomi di carbonio (IDROFOBICHE) e una testa polare (IDROFILICA).

Glicerolo3fosfati (fosfolipidi), costituiscono la membrana cellulare

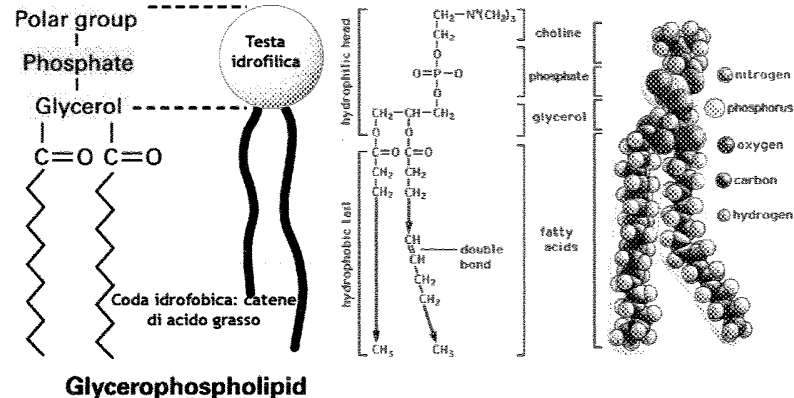


Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

I fosfolipidi contengono:

un gruppo polare carico (spesso un fosfato) attaccato a un back bone costituito da 3 C di un glicerolo

2 catene di acido grasso uscenti da 2 C del glicerolo



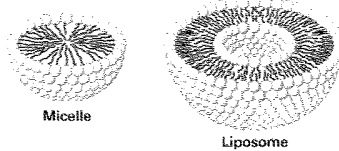


Nelle soluzioni acquose, le molecole anfifiliche formano micelle, ossia aggregati globulari in cui le catene idrocarburiche sono fuori dal contatto con l'acqua.

Le micelle sono aggregati globulari in cui le catene idrocarburiche (catena singola) sono fuori dal contatto con l'acqua.

I liposomi sono vescicole chiuse e contenenti solvente circondate da un unico e doppio strato lipidico. Sono assorbiti nelle cellule per diffusione nella membrana plasmatica. Il diametro di un liposoma è di diverse centinaia di angstrom.

Entrambe queste organizzazioni molecolari eliminano interazioni non favorevoli tra l'acqua e le catene idrocarburiche e consentono la solvatazione delle teste polari.

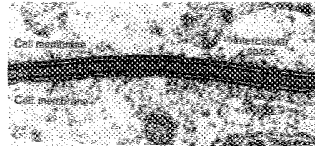


MICELLE E LIPOSOMI sono le strutture globulari dei fosfolipidi

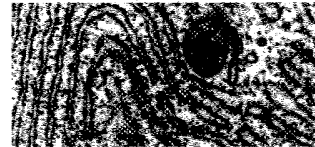
Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



membrana citoplasmatica struttura altamente specializzata che controlla il trasporto di ioni e metaboliti e il flusso di informazioni di varia natura che arrivano alla cellula



membrane intracellulari parte fondamentale degli organelli cellulari (nucleo, reticolo endoplasmatico, mitocondri, ecc.) e sedi di importanti fenomeni (conversione dell'energia e flusso di ioni e metaboliti).



Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



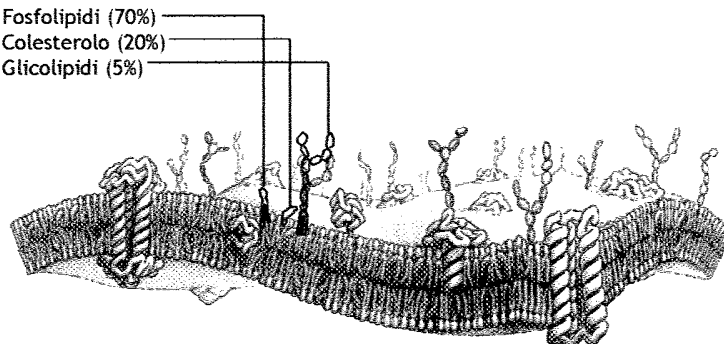
I lipidi di membrana sono il 50% della massa della membrana plasmatica.

Sono molto più numerosi delle proteine (50 lipidi per 1 proteina).

Un μm^2 di superficie di membrana contiene $5 \cdot 10^6$ molecole lipidiche e in una cellula animale vi sono più di 10^9 molecole diverse.

I lipidi sono:

- Fosfolipidi (70%)
- Colesterolo (20%)
- Glicolipidi (5%)



Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



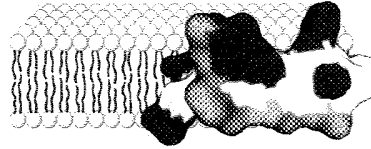
Proteine di membrana

14/30

diana.massai@polito.it, marco.ceriu@polito.it

Proteine transmembrana: le proteine transmembranalni possono attraversare i due strati della membrana o con una α -elica o con piú α -eliche o con sistemi di β -sheets denominati β -barrel costituiti da un elevato numero di β -sheets disposti circolarmente (anche oltre 20)

inserimento nello strato lipidico interno: le proteine immergono la parte idrofobica di una α -elica nello strato lipidico interno



nero idrofilico

grigio idrofobico

Single pass: attraversano una sola volta

Multi pass: attraversano piú volte, formano dei loop

- ✓ Alcune proteine integrali contengono catene lipidiche legate covalentemente alla catena peptidica (**lipid-anchored proteins**).
- ✓ I gruppi lipidici sono utilizzati come ancore che si inseriscono nella membrana cellulare.

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



Proteine di membrana

15/30

diana.massai@polito.it, marco.ceriu@polito.it

✓ **Proteine periferiche:** Non si inseriscono nel doppio strato lipidico, ma si associano alla sua superficie, intra- o extra-cellulare, interagendo con la testa polare dei lipidi o con le proteine integrali (le proteine del citoscheletro spectrina e actina).

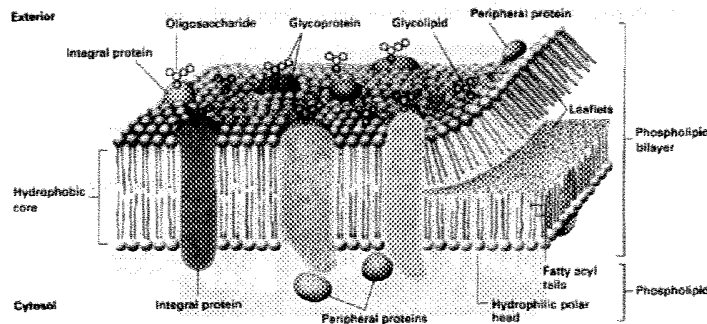
✓ La loro associazione con la membrana è transitoria e soggetta a regolazione mediante attivazione delle proteine stesse o dei substrati ai quali esse aderiscono.

✓ Le proteine periferiche possono quindi spostarsi fra citoplasma e membrana plasmatica a seconda delle necessita funzionali della cellula.

NON SONO SEMPRE SULLA MEMBRANA!!!

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13

Proteine di membrana



Proteine di membrana - funzinoli

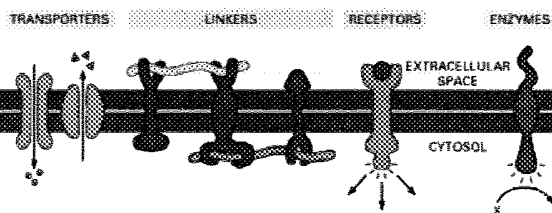
16/30

diana.massai@polito.it, marco.ceriu@polito.it

Proteine di membrana: funzione di trasporto di ioni e molecole

- funzione recettoriale, permettendo il riconoscimento di segnali extracellulari (controllo metabolico della cellula, l'azione di ormoni, farmaci, tossine, fenomeni di differenziamento e proliferazione cellulare);
- funzione enzimatica, con la generazione di segnali intracellulari, utilizzando le componenti lipidiche delle membrana;
- funzione di collegamento, fungendo da intermediari nella interazione funzionale tra due proteine (per es. fra recettore ed enzima);
- riconoscimento cellula-cellula per promuoverne la locomozione o l'adesione nel processo di formazione di un tessuto o abolirne l'influenza nel caso di una cellula estranea (rigetto);
- funzione strutturale e meccanica, costituendo punti di ancoraggio per strutture extra- e/o intra-cellulari

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13





glicolipidi e colesterolo

20/30

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

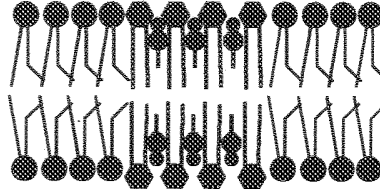
Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13

Glicolipidi e colesterolo lavorano insieme a formare microdomini funzionali nella membrana (rafts) che si muovono nel doppio strato (domini separati dal resto della membrana che presentano minore fluidità)

I microdomini funzionano come siti di riconoscimento per molecole specifiche esterne alla cellula

Simons and Ikonen (Nature, 387: 569-572, 1997):
I microdomini funzionano come piattaforme per l'attacco di proteine quando la membrana si muove verso l'interno della cellula e durante la trasduzione di segnali

R.E. Brown. J Cell Science 111: 1-9 1999:
I rafts servono a controllare l'impaccamento laterale delle proteine che si aggregano in microdomini



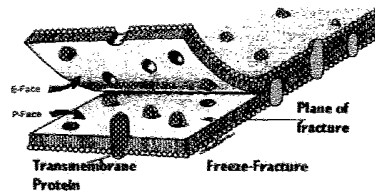
Freeze fracture / freeze etch technique

21/30

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13

- > Congelamento rapido di una cellula
- > Le cellule congelate vengono tagliate lungo un piano di frattura
- > Il piano di frattura si trova tra i due foglietti del doppio strato lipidico



- > I due campioni fratturati vengono rivestiti con uno strato di metallo pesante (etching)
- > Replica della superficie
- > Osservazione dei replicati:
 - ✓ regioni omogenee corrispondono a zone in cui ci sono solo lipidi
 - ✓ protrusioni e avvallamenti
 - ✓ strutture visibili negli avvallamenti (struttura della proteina transmembrana)



Membrane

22/30

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13

Stabilizzazione e proprietà meccaniche della membrana

Fattori che determinano la Stabilità

- ✓ Interazioni idrofobiche e legami idrogeno tra lipidi vicini
- ✓ Legami idrogeno tra proteine della membrana e lipidi
- ✓ Cariche negative sulle proteine che formano interazioni ioniche con cationi divalenti (Mg⁺² Ca⁺²) e con la testa idrofilica dei lipidi
- ✓ Alcune proteine sono libere di muoversi nella membrana altre sono ancorate alla struttura

Fattori che influenzano il comportamento meccanico della membrana cellulare

- ✓ lunghezza delle code,
- ✓ grado di saturazione dei legami idrocarburici (numero di interazioni di VdW),
- ✓ presenza di molecole di colesterolo (l'anello steroideo si frappone tra le catene idrocarburiche degli acidi grassi e interferisce con i loro movimenti),
- ✓ temperatura



Membrane: fluidità

26/30

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale -- A.A. 2012-13

- I principali fattori che determinano la fluidità della membrana:
- 1 temperatura
 - 2 lunghezza degli acidi grassi
 - 3 grado di insaturazione degli acidi grassi delle code dei fosfolipidi
 maggiore è il numero di catene con doppi legami, maggiore è il disordine nell'impaccamento delle code (varia a seconda della specie lipidica)
 - 4 caratteristiche della testa polare (volume)
 maggiore è lo spazio occupato dalla testa polare e minori sono i legami che stabilizzano le code
 - 5 concentrazione del colesterolo nella membrana
 il colesterolo determina una maggiore distanza tra le code, ma stabilizza la parte prossimale delle code

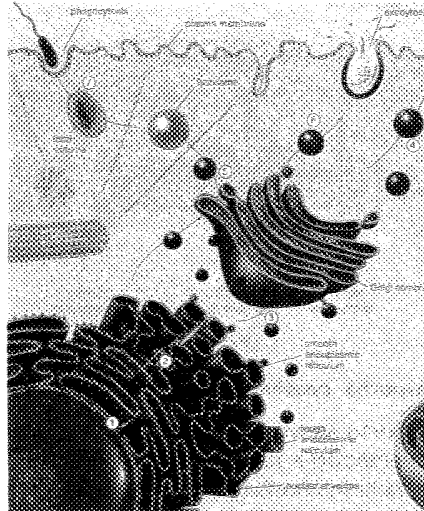


Membrane: funzioni

27/30

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

- protezione → barriera per molecole polari
- comportamento per domini sub-cellulari
- regolazione del trasporto
- ricezione selettiva
- accoppiamento cellulare
- punti di ancoraggio
- funzioni specializzate
- siti per le reazioni
- movimento organelli



Membrane: funzioni

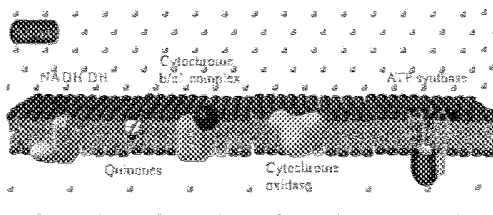
28/30

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale -- A.A. 2012-13

Produzione di energia

- ✓ Molte cellule utilizzano i processi respiratori per produrre energia
- ✓ Durante la respirazione: rottura di composti che contengono elettroni ad elevata energia e rilascio di tali elettroni
- ✓ Gli elettroni si muovono attraverso la membrana e vengono catturati da specifici accettori di elettroni.
- ✓ I protoni sono trasportati verso l'esterno e il lato esterno della membrana si carica positivamente mentre quello interno è carico negativamente (si ha quindi un gradiente elettrico, come in una batteria carica)
- ✓ L'energia può essere utilizzata direttamente (proton motive force) o canalizzata in proteine specifiche (ATP sintetasi, che convertono ADP in ATP)





Proteins

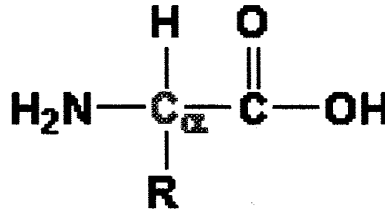
1/57

diana.massai@polito.it, marco.deri@pc

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

- The repeating units of proteins are aminoacids (aa).
- Aminoacids (aa) are organic molecules, thus constituted by a chain of carbon atoms (C). These molecules also contain the key elements of hydrogen, oxygen and nitrogen.
- In particular, a central C, called alpha carbon (C_α), is bound to a carboxylic group (COOH) on one side and to an aminic group (NH₂⁺) on the other side. The other two sides are saturated by an hydrogen atom (H) and by a side chain (R).

*PROTEINE
 aminoacidi
 Zwitterion
 legame peptidico
 aminoacidi terziari
 struttura*



8/57

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

There is a huge difference among the chemical properties of the side chains (R). However, these can be classified into 6 general groups, reported in the following table.

Tipo di catena laterale	Aminoacidi
Alifatica	Glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina
Contenente idrossile o zolfo	Serina, cisteina, treonina, metionina,
Aromatica	Fenilalanina, tiroxina, triptofano
Basica	Istidina, lisina, arginina
Acido e la sua ammido	Acido aspartico, acido glutammico, asparagina, glutammmina,
Ciclica	prolina

*legame
 sterico*



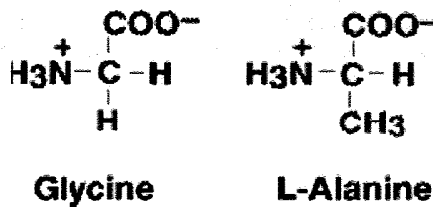
*parti dispendio
 ↓
 legami "semplicità"*



9/57

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



At physiological pH (7.4) the carboxylic group is deprotonated (R-COO⁻) and the amine group is protonated (R-NH₃⁺)

This compound is called **zwitterion**, and has net charge = 0



Peptide bond

From the knowledge of the angles of torsion of each aa in the peptide sequence, it is possible to reconstruct the protein backbone.

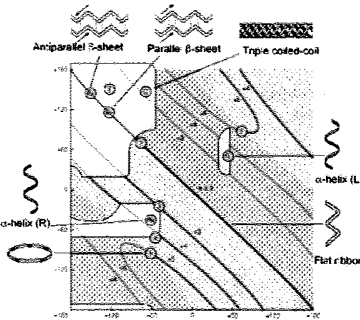
Not all of the values of the torsion angles ψ and ϕ are allowed owing to steric hindrance from the side chains.

The allowed combinations of angles ψ and ϕ are illustrated (circled and coloured) in the Ramachandran plot.

Biogegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



RAMACHANDRAN PLOT



The Ramachandran Plot serves to represent allowed and disallowed regions of the two torsional angles of each peptide bond in a polypeptide chain.

The y-axis reports the ψ values (angle C α -C').
The x-axis reports the ϕ values (angle N-C α).

For simplicity, you can think those bonds as relative to a single peptide bond (C α -C'-N-C α) between adjacent aa.

Biogegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

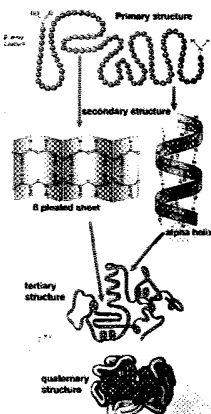


Peptide bond

>For simple secondary structures, as for example the α -helix, all residues are in the same conformation and have the same angles ψ and ϕ ; this means that, on the Ramachandran plot, the points corresponding to all residues of an α -helix will be overlapped.

>Not all of the combinations of ψ and ϕ that are theoretically possible compare in proteins. The reason is the steric hindrance: the sole allowed combinations of ψ and ϕ are those colored in the plot.

Biogegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Primary structure - linear sequence of aa (the two extremities are polar: terminal C- and N-). From the primary structure depend the following levels of organization, thus the structural characteristics of the molecule.

Secondary structure - spatial arrangement of the backbone, constituted by the sole C α , neglecting the conformations of the side chains.

Tertiary structure - relative organization of successive secondary structures: 3D shape of the overall peptide. It includes the conformations of the side chains

Quaternary structure - union of different tertiary structures.

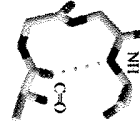
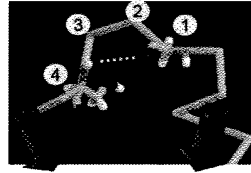
→ si vuol dire con quali atomi i carboni

Biogegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

LOOPS → **RIPIEGAMENTO** 22/57
diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

Secondary structures as alpha helix and beta sheet are connected with short sequences of aa, that realize bent regions, called **LOOPS**.

- Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13
- Region of connection between an alpha helix and a beta sheet.
 - Lengths and 3D configuration are variable.
 - Loops are localized on the surface area of proteins and present polar and non polar side chain groups.
 - The sequence of aa is extremely variable.
 - Flexible.
 - They can represent the regions of active sites.



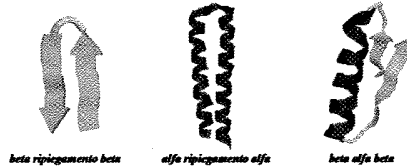
Loops: supra-secondary structures 23/57
diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

Beta-loop-beta: it is the simplest structural motif, implying the presence of two antiparallel filaments β unified with a bend. This motif is called **hairpin- β** or β - β unit. In general, the length of the loops is between 2-5 residues.

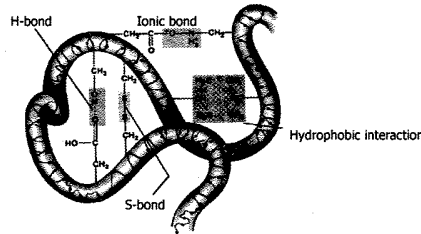
Buehler

Alfa-loop-alfa: two α -helices are joined by a loop.

Beta-alfa-beta: two antiparallel β -sheets (not necessarily lying on the same plane) are united by the interposition of an α -helix. The links between the helix and the two sheets are provided by loops.



Forces conditioning and regulating tertiary structures 24/57
diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

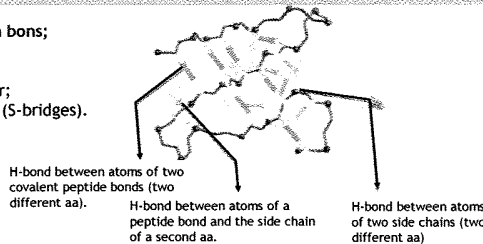


non a suo scipe i legami

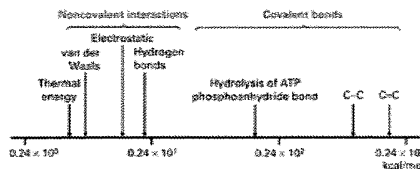
- Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13
- stabilized by the formation of H-bonds;
 - introversion of areas with hydrophobic aa (with non polar side chains);
 - external exposition of hydrophilic aa (with polar side chains);
 - formation of disulfide bonds (S-bridges);
 - Interaction with metal ions.

Different types of interactions between aa: 25/57
diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

- ✓Hydrogen bonds;
- ✓Ionic;
- ✓Polar;
- ✓Non-polar;
- ✓Covalent (S-bridges).



Most of the forces have non-covalent nature





Quaternary structure

30/57

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

- This level of protein structure applies only to those proteins that consist of more than one polypeptide chain, termed **subunits**.
- In such proteins, sometimes referred to as multisubunit proteins, the same kinds of non-covalent interaction that stabilizes the folded polypeptides also specify the assembly of complexes of subunits.
- Quaternary structure refers to the way in which the subunits of such proteins are assembled in the finished protein.
- Multisubunit proteins can have a number of identical (**homomeric**) or non-identical (**heteromeric**) subunits.
- The simplest multisubunit proteins are homodimers – two identical polypeptide chains that are independently folded but held together by non-covalent interactions.
 - ✓ An example of a homodimeric protein is the Cro repressor protein from bacteriophage lambda, which turns off expression of specific genes in its bacterial host.
 - ✓ Haemoglobin, the red blood cell protein responsible for carrying molecular oxygen, contains two each of two different subunits, termed α and β globin. Note the symmetry of the two subunits in both these quaternary structures.



Bacteriophage lambda Cro repressor

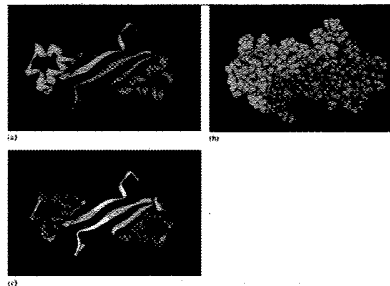
31/57

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Bacteriophage lambda Cro repressor protein is a homodimer.

It is represented here in three ways.



(a) Ribbon format, with the subunits coloured differently. (b) Space-filling format with the subunits coloured as in (a). (c) Ribbon format with the polypeptide backbone coloured according to secondary structure: α helix, red; β sheet, cyan; turn, green; random coil, white.

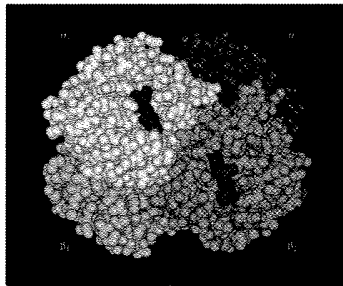


Human Haemoglobin

32/57

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



- ✓ Space-filling model of human haemoglobin in its deoxygenated form (deoxyhaemoglobin).
- ✓ The two α and two β subunits are indicated and are coloured differently.
- ✓ The haem complexes (coloured red) that associate with each subunit are only visible in the α_1 and β_2 subunits in this representation. (Based on pdb file 1a3n)



33/57

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

active cell time → protein motici

Proteins can be globular or fibrous → collagene: si assemble per formare strutture subcellulari fibrose, cheratina

A close relationship between structure and function exists.

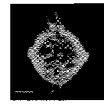
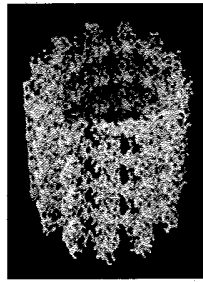
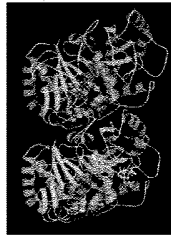


Proteine strutturali del citoscheletro

38/57

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Enzimi

39/57

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

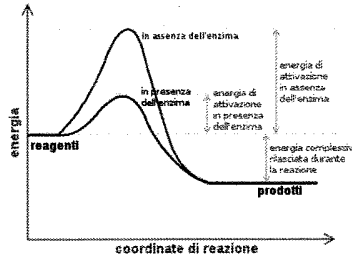
Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Cosa sono?

Proteine globulari complesse, formate da catene polipeptidiche. Sono i catalizzatori (acceleratori) dei sistemi biologici, importanti molecole che ne determinano tutte le trasformazioni chimiche cellulari.

Caratteristiche?

Si ripiegano nello spazio formando un incavo, detto sito attivo, in cui una molecola, detta substrato, si inserisce perfettamente.



A cosa servono?

Sono in grado di accelerare lo svolgimento di una reazione chimica, diminuendo l'energia richiesta per farla iniziare (energia di attivazione) aumentando, in ultima analisi, la velocità della reazione in oggetto.

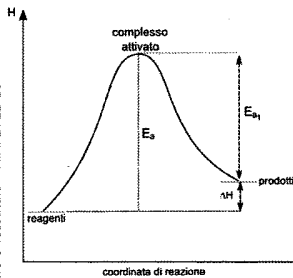


Enzimi

40/57

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



In una reazione chimica i reagenti non si trasformano direttamente nei prodotti, ma passano attraverso uno stadio intermedio: il complesso attivato, che ha un contenuto energetico superiore sia ai reagenti sia ai prodotti.

La differenza tra l'energia dei reagenti e quella del complesso attivato si chiama energia di attivazione. A questo punto gli enzimi "catalizzano" i reagenti diminuendo l'energia di attivazione e rendendo più semplice la reazione.

Gli enzimi sono altamente specifici e la loro attività è molto sensibile alle variazioni di pH, temperatura e concentrazione di substrato, infatti, ogni enzima è capace di agire solo nell'ambito di uno specifico intervallo di valori e sono in grado di catalizzare solo una reazione o pochissime reazioni simili, poiché il sito attivo interagisce con i reagenti in modo stereospecifico.



Enzimi

41/57

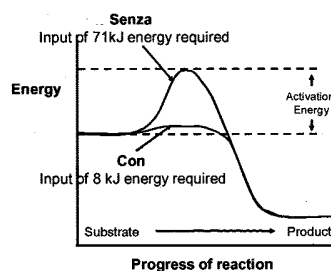
diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



L'enzima CATALASI accelera la rottura del perossido di idrogeno (H_2O_2), un prodotto tossico del metabolismo producendo acqua e ossigeno.

L'enzima abbassa l'energia di attivazione della lisi (morte cellulare).



STRUTTURA

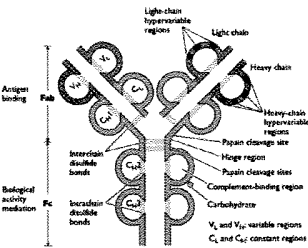
Bioingegneria Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13

Tali componenti sono poi organizzate a livello strutturale in un complesso proteico di tipo tetrameric. Le immunoglobuline sono infatti costituite da quattro catene glicoproteiche:

- Due catene pesanti H uguali fra di loro
- Due catene leggere L anch'esse uguali fra di loro

✓ Ogni catena è costituita da un dominio variabile (V_H per la catena pesante, V_L per la catena leggera) posto all'estremità ammino terminale e da uno (per la catena leggera) o più (3-4 per la catena pesante) domini costanti (C_L o C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4}) all'estremità carbossiterminale.

✓ All'interno di ciascun dominio variabile, a livello del sito di legame con l'antigene, sono presenti 3 segmenti caratterizzati da una estrema variabilità di sequenza e struttura.

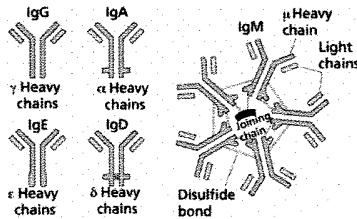


STRUTTURA

Bioingegneria Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13

Tali segmenti, responsabili della specificità di legame con l'antigene, vengono definiti regioni ipervariabili e sono intervallati dalle cosiddette regioni cornice (framework regions).

Le catene pesanti definiscono l'isotipo (o classe) anticorpale e vengono perciò suddivise in 5 classi strutturali denominate con le lettere greche gamma (γ), alfa (α), mio (μ), delta (δ), epsilon (ϵ) corrispondenti alle cinque principali classi funzionali di anticorpi (rispettivamente IgG, IgA, IgM, IgD e IgE).



□ **IgG:** sono la classe di anticorpi maggiormente presenti nel siero, rappresentando circa il 75% delle immunoglobuline circolanti.

□ **IgA:** costituiscono circa il 20% delle immunoglobuline sieriche (e ben il 60-70% delle totali) e sono presenti principalmente nelle secrezioni esterne, quali saliva, lacrime, muco delle vie respiratorie e del tubo digerente. Le IgA rappresentano un importante mezzo di difesa contro le infezioni locali.

□ **IgM:** costituiscono circa il 5-10% delle Ig totali. Le IgM infatti costituiscono la classe di anticorpi che per prima viene sintetizzata al contatto con un nuovo antigene e sono quindi parte della risposta immunitaria primaria

□ **IgD:** rappresentano lo 0,2% delle immunoglobuline circolanti. Sono presenti sulla membrana cellulare dei linfociti B dove, legato l'antigene per cui sono specifiche, inducono l'attivazione della cellula a proliferare, maturare a plasmacellula.

□ **IgE:** sono presenti nel siero in concentrazione bassissima, e sono monomeri. Sono responsabili della risposta ai parassiti.

Bioingegneria Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13

GCA	AGA									GGA			AUA
GCC	AGG									GGC			AUC
GCG	CGA	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	GGU	CAU	AUU	AUU
GCU	CGC	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU				AUU
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile				
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I				
UUA							AGC						
UUG					CCA	UCA	ACA					GUA	
CUA					CCC	UCC	ACC					GUC	UAA
CUC					CCG	UCG	ACG					GUG	UAG
CUG	AAA	AAU	UUC	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU			UGA	
CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU			UGA	
Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val			stop	
L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V				

$V = V_B + V_{MB}$
 \downarrow
 $V_C(u) \rightarrow u$ atomi
 \downarrow
 reappio degli atomi

Proteine - Folding 54/57
 diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

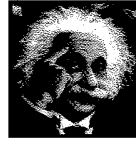


Problemativa:

Proteine con più domini, in assenza del dominio corrispondente, possono presentare superfici idrofobiche all'ambiente citoplasmatico, che è notevolmente affollato di prodotti di sintesi diversi. Aumenta così la probabilità che si formino legami indesiderati tra complessi proteici non corrispondenti.

Soluzione:

Presenza di **complessi proteici di ausilio** che assistono il ripiegamento favorendone la configurazione terziaria corretta.



Proteine - Folding 55/57
 diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

quando proteine e foldate più passore in numeri locali

CHAPERONINE \rightarrow nei ribosomi

Sono proteine di ausilio che svolgono l'azione di favorire e promuovere il corretto ripiegamento della struttura.

Il meccanismo del ripiegamento non è ancora del tutto chiaro, tuttavia è noto come l'aiuto da parte di chaperonine sia essenziale, alla luce del **paradosso di Levinthal**:



Deve esistere una procedura specifica di assunzione della struttura terziaria in quanto, al crescere del numero di residui amminoacidici della proteina, cresce esponenzialmente il numero di strutture tridimensionali possibili e un procedimento a caso durerebbe in media più del tempo medio di vita della proteina stessa.

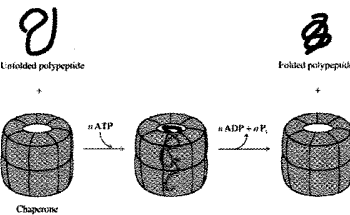
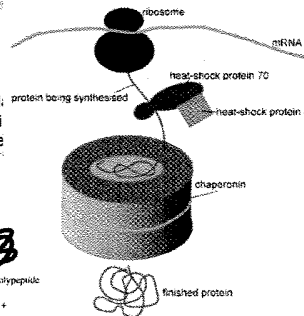
proteine globulari che aumentano il folding di proteine che non riescono ad approssarsi

Proteine - Folding 56/57

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

CHAPERONINE

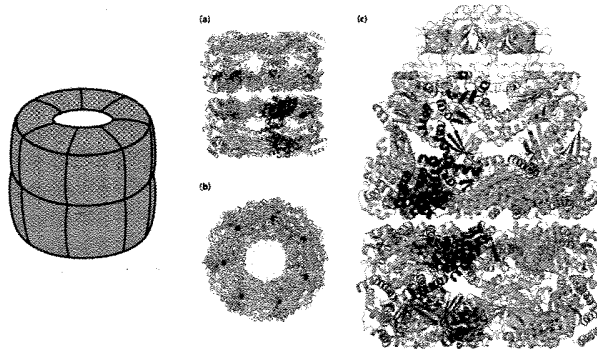
Funzione: isolare la catena peptidica di citoplasma cellulare durante il processo di ripiegamento, prevenendo l'aggregazione



Proteine - Folding 57/57
 diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

CHAPERONINE - Struttura quaternaria



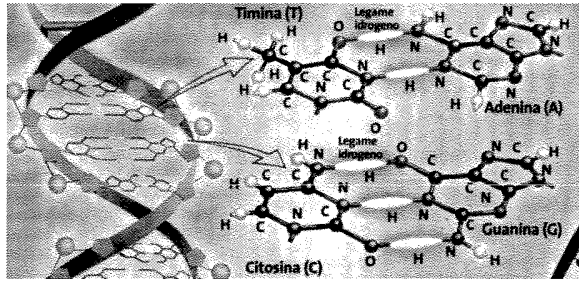


DNA

5/32

✓ Negli organismi viventi, il DNA non è quasi mai presente sotto forma di singolo filamento, ma come una coppia di filamenti saldamente associati tra loro. Essi si intrecciano tra loro a formare una struttura definita doppia elica.
 ✓ Ogni nucleotide è costituito da uno scheletro laterale, che ne permette il legame covalente con i nucleotidi adiacenti, e da una base azotata, che instaura legami idrogeno con la corrispondente base azotata presente sul filamento opposto

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13

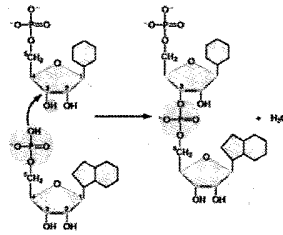


DNA

6/32

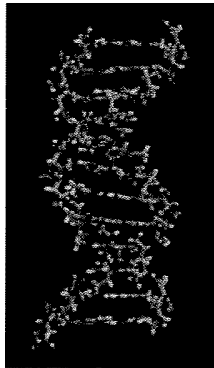
✓ All'interno di una singola elica i legami sono legami chimici covalenti (legame forte);
 ✓ la struttura laterale del DNA è composta da unità ripetute ed alternate di gruppi fosfato e di 2-deossiribosio, uno zucchero pentoso (a cinque atomi di C) che si lega ai fosfati adiacenti attraverso legami fosfodiesterici presso il terzo ed il quinto carbonio;
 ✓ ogni molecola di fosfato forma un ponte molecolare collegando, attraverso legami fosfodiesterici;
 ✓ il carbonio in posizione 3' di una molecola di deossiribosio con quello in posizione 5' dello zucchero successivo.
 ✓ Le due eliche affacciate si legano solo attraverso l'estremo delle basi opposto a quello impegnato con il deossiribosio fosfato, questi legami sono legami deboli (legame idrogeno che ha energie << del legame forte).

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



DNA

7/32



Il DNA è un lungo polimero costituito da unità ripetute di nucleotidi.

La catena del DNA è larga tra i 22 ed i 26 Ångström (da 2,2 a 2,6 nm) ed ogni unità nucleotidica è lunga 3,3 Ångstrom (0,33 nanometri).

Sebbene ogni unità occupi uno spazio decisamente ridotto, la lunghezza dei polimeri di DNA può essere sorprendentemente elevata, dal momento che ogni filamento può contenere diversi milioni di nucleotidi.

Ad esempio, il più grande cromosoma umano (il cromosoma 1) contiene quasi 250 milioni di paia di basi.

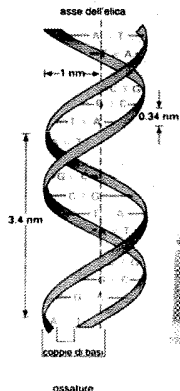
Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



DNA

8/32

b) diagramma schematico



Struttura:

- Doppia elica destrorsa,
- Raggio dell'elica 1 nm,
- 10 nucleotidi per passo dell'elica,
- Distanza tra due basi adiacenti della stessa elica 0.34 nm,
- Passo dell'elica 3.4 nm

Legami:

- Legami intramolecolari (all'interno di ogni singola elica) covalenti
- Legami intermolecolari (tra due eliche) idrogeno

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13

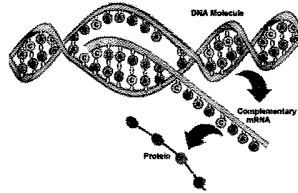


Trascrizione

13/32

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

- > La catena di nucleotidi del DNA che codifica per un determinato gene, viene copiata (trascritta) in RNA per via enzimatica.
- > La trascrizione si svolge all'interno del nucleo cellulare e richiede l'azione di particolari enzimi, quali le RNA polimerasi DNA-dipendenti, e di proteine, come i fattori trascrizionali.



Gene → sequenza di DNA che contiene le informazioni in grado di influire sulle caratteristiche del fenotipo dell'organismo.
La sequenza di basi di DNA è stampo per la sintesi di una molecola di RNA → tradotta in una molecola peptidica.



TRADUZIONE o SINTESI PROTEICA

14/32

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



La sintesi proteica. La sintesi proteica è il processo in cui il legame dei nucleotidi (a sinistra nella figura) viene tradotto nel linguaggio degli aminoacidi, che formano le proteine (a destra nella figura).

- > La **sintesi proteica** (traduzione → l'informazione contenuta nel DNA dei geni e trascritta in RNA, viene tradotta in proteine.
- > Nella **sintesi proteica** un **filamento di RNA messaggero** è usato come stampo per la produzione di una **specifica proteina**, che viene sintetizzata a partire dalla sua **estremità aminotermine**.
- > La **relazione** tra **triplette di basi dell'RNA (codoni)** e gli **AA delle proteine** viene chiamata **codice genetico**.
- > Nel processo di traduzione sono coinvolti diversi elementi
 - L'RNA messaggero (mRNA)
 - I ribosomi
 - L'RNA transfer (tRNA)
 - Le aminoacil tRNA-sintetasi
 - una serie di fattori di traduzione.



TRADUZIONE o SINTESI PROTEICA

15/32

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

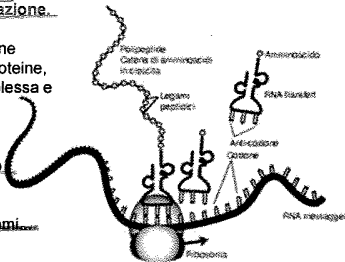
Ogni AA viene accoppiato alla sua molecola di tRNA da una **specifica aminoacil tRNA-sintetasi**.

Esistono 20 diverse aminoacil tRNA-sintetasi, una per ogni AA.

La **sintesi proteica** è strutturata in tre fasi: **inizio, allungamento e terminazione**.

Le fasi di allungamento e terminazione coinvolgono un numero limitato di proteine, mentre la fase di inizio è molto complessa e richiede l'intervento di più di 25 diversi fattori.

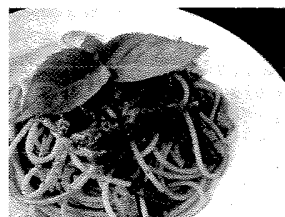
Su di un filamento di mRNA possono essere presenti più ribosomi che contemporaneamente lo traducono, originando complessi chiamati **polisomi**.



I Carboidrati

16/32

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Insieme con proteine, lipidi e acidi nucleici, sono una delle 4 principali biomolecole.

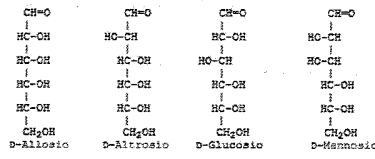
Vengono comunemente anche chiamati zuccheri o glucidi e sono in grado di svolgere numerose e importanti funzioni biologiche.



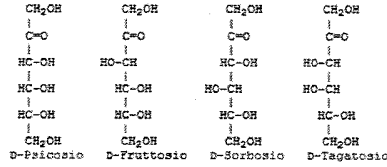


STRUTTURA - esempi

□ **Aldoesosi**



□ **Chetoesosi**



Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



I Carboidrati

Gli oligosaccaridi e i polisaccaridi sono composti da lunghe catene di monosaccaridi (monomeri) legati da legami glicosidici.

- ✓ Gli oligosaccaridi tipicamente contengono da sette a nove monosaccaridi;
- ✓ I polisaccaridi contengono più di dieci monosaccaridi.

Gli oligosaccaridi sono glucidi biologicamente attivi se coniugati con proteine (glicoproteine) e lipidi (glicolipidi). La loro maggiore funzione è il riconoscimento intercellulare.

- ✓ Glicoproteine: (proteine transmembrana membrana, anticorpi, proteoglicani nei tessuti connettivi)
- ✓ Glicolipidi: si trovano sulla superficie della membrana cellulari, funzione di riconoscimento

I polisaccaridi

- ✓ Peso molecolare è molto variabile - può variare da 10k a 1M Da (1 dalton= 1 uma=1.660*10⁻²⁷ Kg).
- ✓ A differenza degli oligosaccaridi sono quasi insolubili in acqua (le grosse molecole dei polisaccaridi si idratano solo in superficie e in maniera insufficiente a permettere la loro solubilizzazione).

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



POLISACCARIDI - funzioni biologiche

> **funzione di deposito** (per esempio, il glicogeno (*omopolisaccaride* – per idrolisi da origine ad un solo monosaccaride) funge da deposito del glucosio, essendo la forma polimerica meno soggetta agli effetti osmotici);

> **funzione strutturale**

- ✓ Glicosaminoglicani (GAG) - eteropolisaccaridi in quanto costituiti da dimeri (coppia di monosaccaridi diversi) che si ripetono in lunghissime sequenze polimeriche ad altissimo peso molecolare (macromolecole).

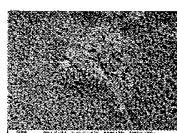
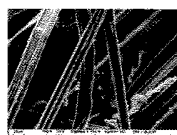
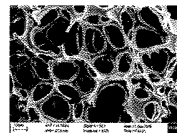
> **funzione di adesione e riconoscimento** (per esempio l'eparinsolfato, che ha un *pattern* di solfatazione facilmente riconoscibile dagli enzimi).

Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



I Carboidrati

CHITINA - CHITOSANO

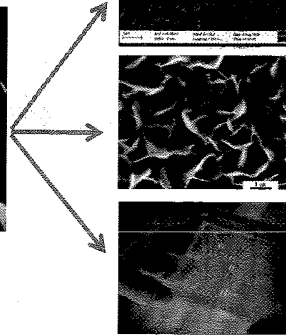
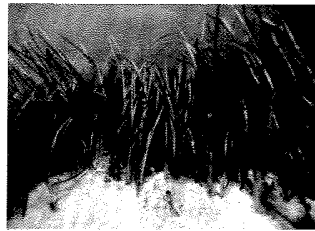


Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



AGAR/AGAR - AGAROSIO

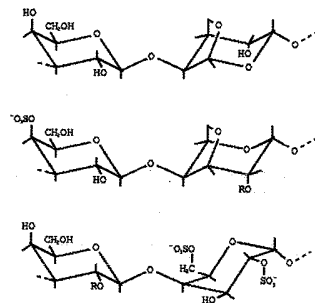
Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



AGAR/AGAR - AGAROSIO

L'agarosio è un polisaccaride purificato dall'agar-agar un polisaccaride usato come gelificante naturale a ricavato sua volta dalle alghe.

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



✓ È un polimero lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici.
 ✓ L'agarosio è uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione, mentre diventa solido man mano che si raffredda formando un gel grazie alla formazione di una matrice tridimensionale costituitasi attraverso dei legami a idrogeno tra le catene lineari.



AGAROSIO per Scaffold BIOMIMETICI e analisi del DNA

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

- L'agarosio ha utilizzi simili a quelli del collagene, ma non è biodegradabile.
- È usato come sistema iniettabile, può essere raffreddato rapidamente in situ usando vapori di azoto liquido.
 - L'agarosio è poco penetrabile dagli assoni, ma si è dimostrato un eccellente substrato per la crescita assonale se funzionalizzato con laminina.
- Il gel di agarosio è largamente utilizzato per la separazione elettroforetica di frammenti di DNA.
 - ✓ È composto da due catene di galattosio che si uniscono e assumono la conformazione a doppia elica;
 - ✓ Queste ultime si avvolgono così saldamente che le molecole di acqua rimangono trattenute negli interstizi.
 - ✓ Le due catene sono in grado di legarsi con i tratti terminali di altre eliche in maniera casuale, così da formare un'intricata rete di legami
 - ✓ L'organizzazione strutturale porta alla formazione di un gel con una complessa struttura tridimensionale di eliche contenente molecole d'acqua, detta HYDROGEL.



AGAROSIO - Suggestions

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

1. Mechanical and structural contribution of non-fibrillar matrix in uniaxial tension: a collagen-agarose co-gel model. Lake SP, Barocas VH. - 2011
2. Prestaining of PCR products with SYBR Green for agarose gel electrophoresis: advantages and limitations. Konschak R, Tinhofer I. - 2011
3. Time controlled release of Ara-C from agarose hydrogels using Layer-by-Layer assembly: an in vitro study. Mehrotra S, Lynam D, Liu C, Shahriari D, Lee I, Tuszynski M, Chan C. - 2011
4. Chondrocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells undergoing chondrogenesis in agarose hydrogels of solid and channelled architectures respond differentially to dynamic culture conditions. Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. - 2011
5. Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures. Szymanski A, Bellamkonda RV. - 2001

50% in massa di proteine
50% fosfolipidi

traslocazione / flip flop

integrità proteica di membrana

Biogeografia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



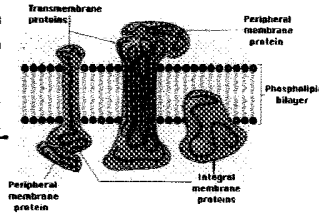
La cellula - Membrana cellulare/Proteine

9/52

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Le **PROTEINE DI MEMBRANA** si distinguono in due grandi categorie:

- **Proteine integrali**, legate al doppio strato della membrana, possono attraversarlo completamente o essere inserite parzialmente
- **Proteine periferiche**, poggiano sulla superficie interna o esterna della membrana e non hanno legami con l'interno idrofobico



Funzioni delle proteine di membrana:

- funzione di **trasporto di ioni e molecole**
- **funzione recettoriale**, permettendo il riconoscimento di segnali extracellulari
- **funzione enzimatica**, con la generazione di segnali intracellulari
- **funzione di collegamento**, fungendo da intermediari nella interazione funzionale tra due proteine
- **riconoscimento cellula-cellula** per promuoverne la locomozione o l'adesione nel processo di formazione di un tessuto o abolirne l'influenza nel caso di una cellula estranea
- **funzione strutturale e meccanica**, costituendo punti di ancoraggio per strutture extra- e/o intra-cellulari



La cellula - Membrana cellulare

10/52

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

La **membrana cellulare** controlla il **trasporto di ioni e metaboliti** e il **flusso di informazioni** di varia natura che arrivano alla cellula, **garantendo il mantenimento dei corretti livelli di pH** e delle condizioni ioniche internamente alla cellula, **nonostante le variazioni dell'ambiente esterno**.

Funzioni principali della membrana cellulare:

- **protezione**
- **regolazione del trasporto da e verso la cellula** o i compartimenti cellulari
- consente la **ricezione selettiva e la trasduzione dei segnali**
- **riconoscimento cellulare** ↔ **comunicazione**
- **fornisce punti di ancoraggio** per il citoscheletro e per gli elementi extracellulari
- **compartimento per domini subcellulari**
- forma **giunzioni** specializzate per l'adesione cellulare e per la comunicazione
- forma **siti per le reazioni enzimatiche**
- consente il **movimento di organelli**

Biogeografia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

le cellule sono separate e non si toccano a loro agio, sono separate e lo si toccano

le staminali si dividono e da lì vengono prodotte le differenziazioni grazie al citoscheletro



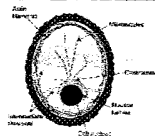
La cellula - Citoscheletro

12/52

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

CYTOSKELETON (the framework)

Studiare il **citoscheletro** è fondamentale per capire il **comportamento biomeccanico delle cellule**. Il **citoscheletro** è una **struttura 3D dinamica** che si estende in tutto il **citoplasma delle cellule eucariote** ed è costituito da un **network complesso di filamenti proteici** che possono adottare molteplici configurazioni.



Funzioni:

- **ruolo strutturale**, gli elementi partecipano a fornire resistenza e forma alla cellula
- **comunicazione**, gli elementi partecipano a realizzare un collegamento con la membrana plasmatica
- **supporto**, gli elementi partecipano a realizzare connessioni tra i diversi filamenti
- **trasduzione dei segnali**, gli elementi sono in grado di modificare la loro struttura e trasferire questi cambiamenti al nucleo
- **controllo e generazione di movimento**, gli elementi partecipano al movimento cellulare, a particolari funzioni quali fagocitosi, contrazione muscolare

Biogeografia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



La cellula - Citoscheletro

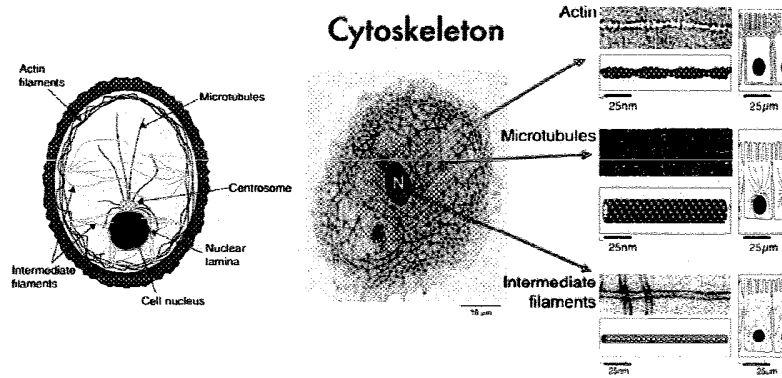
13/52

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

The cytoskeleton consists of **three types of filaments**, each with a **specialized protein composition**, their interactions determine the cell's mechanical behaviour:

- **ACTIN FILAMENTS/MICROFILAMENTS** (diameter = 7-9 nm)
- **MICROTUBULES** (diameter = 20-25 nm)
- **INTERMEDIATE FILAMENTS** (diameter = 10 nm)

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



La cellula - Citoscheletro

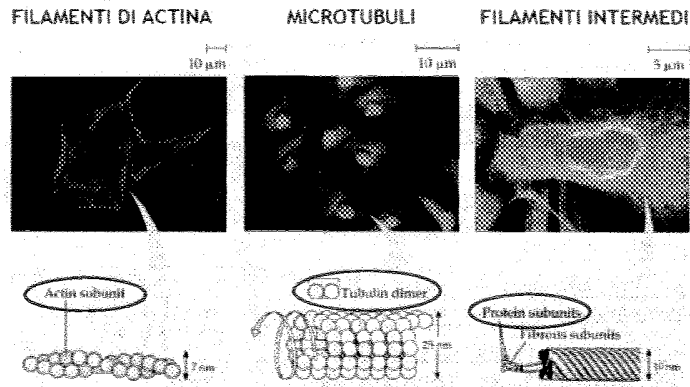
15/52

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

Caratteristiche in comune

- **polimeri**, in cui i **monomeri/subunità** sono **proteine** (legate da legami non covalenti), in una **organizzazione gerarchica multiscala**
- **struttura elicoidale**

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



La cellula - Citoscheletro

16/52

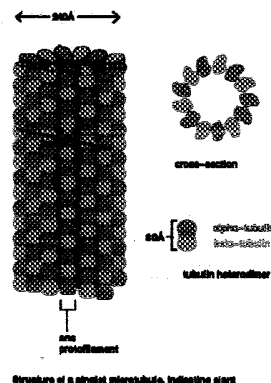
diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

Caratteristica comune di queste tre strutture è che, **nonostante possano raggiungere lunghezze considerevoli** (da alcune decine fino a centinaia di micrometri), **sono composte da piccole subunità proteiche** (**organizzazione gerarchica multiscala**)

Questa scelta **progettuale** consente alle cellule di **riadattarsi e riorganizzarsi a seconda delle condizioni** disassemblando parti di un filamento e **riassemblandolo** altrove.

Le strutture del citoscheletro combinano l'esigenza di **resistenza meccanica** e di **adattabilità** realizzando **numerosi protofilamenti**, ovvero **lunghe successioni di monomeri** che si **assemblano tra loro lateralmente**.

La **polimerizzazione** dei monomeri viene stabilizzata mediante un **associazione elicoidale** che determina un **assemblaggio meccanicamente più stabile e rigido**.



Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

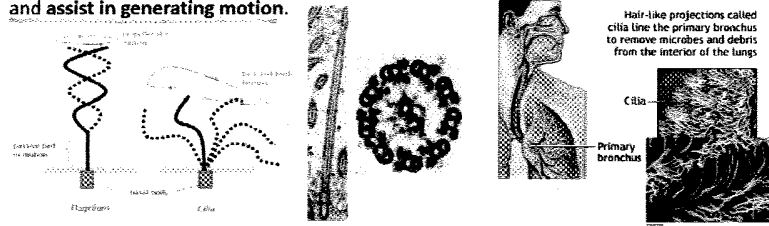


La cellula - Citoscheletro/Microtubuli

23/52

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

MT play also a key role in the structure of flagella (length = 0.05-2 mm, number = 1-4) and cilia (length = 5-25 μm, number = 10²-10³), where they provide structural rigidity and assist in generating motion.



Flagellum micrograph shows longitudinal and transverse cross-section, with the characteristic distribution of nine bundles of two MT around the periphery and two central MT.

The interconnecting filaments between the central and peripheral MT are motor proteins. Forces generated by these motor proteins, in conjunction with the structural integrity of the MT, produce the characteristic back-and-forth motion of the cilium.

MT also play a major role during cell division, where they form a basket-like network called the mitotic apparatus.



Biogeografia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



La cellula - Citoscheletro/Filamenti intermedi

25/52

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

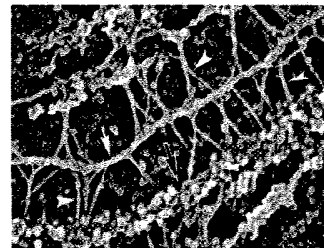
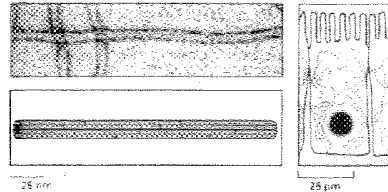
INTERMEDIATE FILAMENTS

There are currently six known classes of intermediate filament protein making up a very diverse group of molecules whose expression is cell-type specific.

Struttura a matassa (diametro = 10 nm) che si estende una parte attorno al nucleo (lamina nucleare) l'altra attraversa tutto il citoplasma conferendo resistenza meccanica.

I filamenti intermedi sono particolarmente presenti nelle cellule sottoposte a sforzi meccanici.

I filamenti intermedi sono fibre stabili ed insolubili, poiché le subunità fibrose si associano fianco a fianco in file sovrapposte. Possono quindi sopportare forze di stiramento molto maggiori dei MT o dei filamenti di actina.



Freccia bianca = Filamenti intermedi, freccia nera = MT

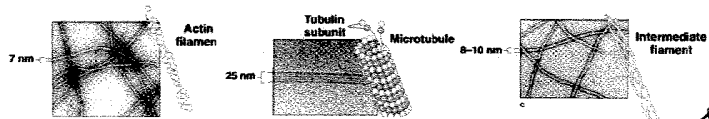
Biogeografia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



La cellula - Citoscheletro

27/52

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it



Proprietà	MICROFILAMENTI	MICROTUBULI	FILAMENTI INTERMEDI
Struttura	Fune formata da due fasci avvolti ad elica	Cilindri cavi formati dall'unione di 13 protofilamenti	Asta superavvolta formata dall'unione di subunità fibrose
Diametro	7 nm	25 nm diametro esterno 15 nm diametro interno	8-12 nm <i>è class. diverse</i>
Sub-unità	actina	α e β tubulina	Proteine fibrose
Funzioni	Mantenimento forma Cambiamento forma Divisione cellulare Contrazione muscolare	Mantenimento forma Movimento cellulare Movimento organelli Movimento cromosomi	Mantenimento forma Ancoraggio del nucleo e di altre strutture sub-cellulari

Resistenti



cellule di sforzi muscolari

*fasci centrali
e laterali
fasci paralleli*

possono creare o difetti → CATASTROFI

Studiati questo tolo!!!



Biogeografia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



La cellula - Apparato di Golgi

31/52

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Le proteine devono essere sottoposte ad una serie di passaggi. Certi più, altri meno in base al tipo biologico. → APPAR. DI GOLGI: prende le proteine fuori dal reticolo endoplasmatico, le modifica e le impacchetta in vescicole che sono spedite - dentro o fuori la cellula. Le molecole possono venire distrutte immediatamente.

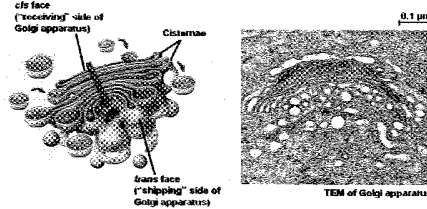
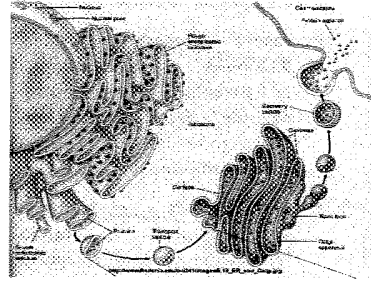
Biologia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

GOLGI APPARATUS (the packaging plants)

Proteins produced by the endoplasmic reticulum are not "ready for prime time". They typically must undergo a series of folding steps and post-translational modifications before they have biological activity.

This very important task is handled by the Golgi apparatus, which takes the protein output of the endoplasmic reticulum and trims, modifies, and packages it in membrane-delimited structures (the vesicles) that are sent to various locations within or outside the cell.

Misfolded and otherwise defective proteins must be disposed of immediately since they are potentially harmful to the cell.



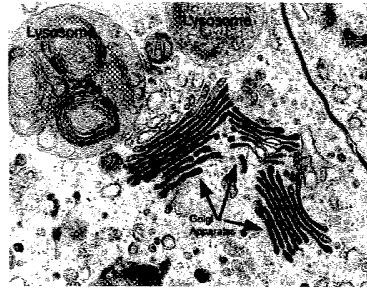
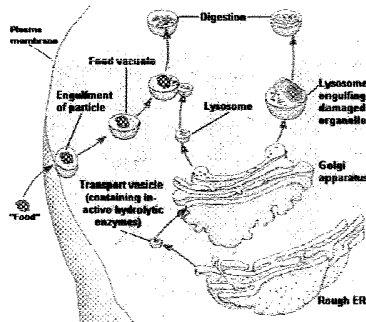
La cellula - Lisosomi

32/52

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

LYSOSOMES (the disposal system)

This system of vesicles contains enzymes (catalytic proteins) which act to break down metabolic by-products, misfolded proteins, ingested extracellular material, and other unwanted substances.



Biologia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



La cellula - ATP trasporta energia

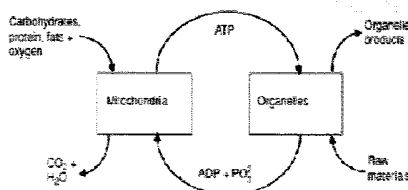
35/52

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

At the cellular level, energy-consuming tasks include:

- motion, including both cellular shape changes and locomotion of the cell on its substrate
- synthesis of compounds
- transport of ions and other molecules, both within the cell and between the cell and its surroundings

When we eat, the foodstuffs are acted upon by the digestive enzymes and broken down into simpler compounds, transferred into the bloodstream across the intestinal walls, and then transported throughout the body. Individual cells are therefore presented with a complex mixture of compounds from which they must obtain energy. Mitochondria are able to use compounds such as glucose and fatty acids to produce a energy-containing molecule that all cellular organelles can use.



Biologia Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

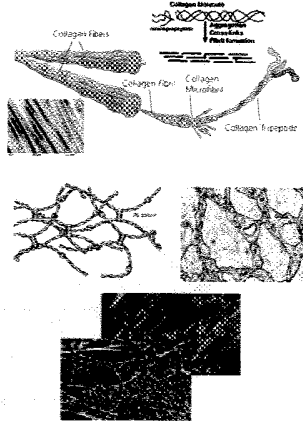


COLLAGEN

Collagen is a fibrous protein that imparts structure and rigidity to tissue. It occurs in many different types, and is the most abundant protein in higher vertebrates.

The more important types of collagen are:

- collagen TYPE I, forms large structural bundles that are present in tendons, ligaments, and other tissues subject to significant mechanical loading; has high tensile strength (tangent Young's modulus $\sim 1 \times 10^9$ Pa)
- collagen TYPE IV, forms X-shaped complexes that associate together to create a highly interconnected fibrous network; is abundant in basement membrane
- collagen TYPE VI, widely distributed throughout the ECM, this collagen helps cells to form attachments to the surrounding matrix.



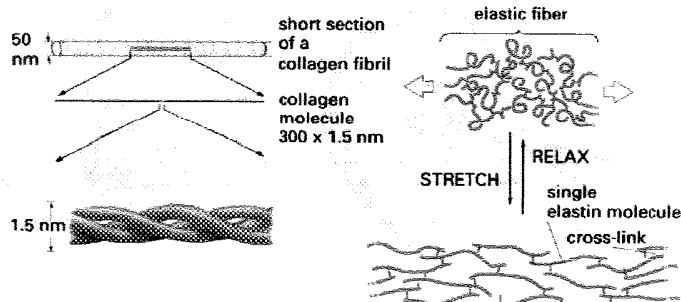
Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



ELASTIN

This fibrous elastic protein acts to impart elasticity and resilience to tissue. It is much more compliant than collagen (Young's modulus $\sim 3 \times 10^4$ Pa) and it is present in significant amounts in the walls of large arteries, lungs and skin.

Elastin polypeptide chains are cross-linked together to form rubberlike, elastic fibers. Each elastin molecule uncoils into a more extended conformation when the fiber is stretched and will recoil spontaneously as soon as the stretching force is relaxed.



Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13

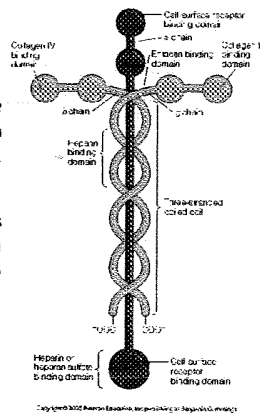
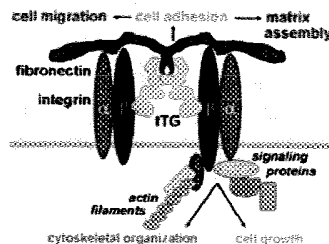


LAMININ and FIBRONECTIN

They are adhesion proteins.

There are 11 known isoforms of laminin, all of which are cross-shaped proteins that are abundant in basal lamina and bind collagen type IV and other matrix molecules. They are key components of the basement membrane.

Fibronectin is a large protein that has binding domains for collagen, cell-surface binding molecules (integrins) and heparin sulfate; it is the "all-purpose glue" of the ECM.



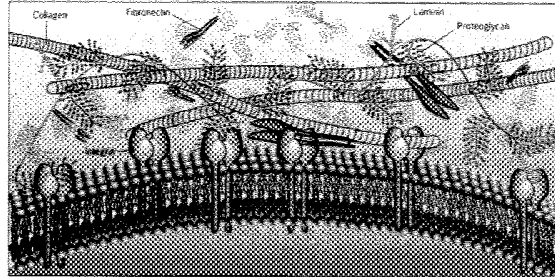
Bioingegneria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



When these components are put together, a composite structure results. The entire structure can be thought of as a biological "sponge" loaded with water. In this composite material:

- proteins act together to provide mechanical integrity and tissue structure, and to provide mechanical "scaffolding" for the resident cells
- while polysaccharides fill the empty spaces and hold water in the tissue

The role of the bound water in the tissue is crucial, since it provides the pathway whereby nutrients and other species are transported to and from the cells.



Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



There exists in tissues an exquisite balance between the anabolic process of ECM production and the catabolic process of ECM turnover, and the properties of ECM molecules make them ideal for cell and TE.

Their multifunctional nature makes them ideal for promotion of cell specific adhesion via integrins and other surface receptors. Conversely, they can be used to release cells from adhesion and thus migrate, for example, to cover a scaffold.

Moreover, they serve as efficient co-receptors for sequestration and delivery of growth factors, establishing morphogenic gradients recognized by cellular receptors during development, wound healing, and tissue repair.

These properties allow the ECM to serve as a rich source for mining and future development of novel TE applications. Indeed, a goal of TE is to successfully introduce replacement tissues that will, through stimulation of anabolic processes, lead to ECM production and acceptance of engineered materials rather than their immediate or eventual destruction via activation of catabolic pathways.

Lo scaffold nelle applicazioni di TE deve svolgere le stesse funzioni della ECM nell'ambiente fisiologico, quindi deve possedere tutte le proprietà dell'ECM fra cui una serie di ligandi specifici che promuovano l'adesione cellulare al materiale di cui lo scaffold è composto. Poiché la maggior parte dei materiali sintetici non è in grado di promuovere un'adeguata adesione, sono necessari opportuni trattamenti superficiali.

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



To facilitate biointegration, both degradable and nondegradable foreign materials can be modified with native ECM or motifs derived from proteins in the ECM. ECM-derived molecules can be used to coat implants, modify surfaces, direct cell growth and differentiation, and engineer cell phenotype and behavior.

A number of alternatives exist for the tissue engineer including commercial mixed matrices based upon the composition of basement membranes (collagen IV, laminin, perlecan, nidogen/entactin):

- One example of such a commercial matrix is Matrigel™ that is available in both growth factor replete and depleted forms. This matrix is extracted from Engelbreth-Holm-Swam (EHS) mouse sarcoma and provides a material similar to the mammalian basement membrane.
- Available from the global nonprofit ATCC (<http://www.atcc.org/>) is an ECM solution also representing a solubilized basement membrane solution similar to Matrigel. This preparation contains tissue plasminogen activator as well as a number of growth factors.

Both these products form a gel at room temperature that will support growth and differentiation of cells grown on (or in) it as a two- or three-dimensional matrix.

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Purified ECM molecules provide a reliable and predictable source for TE applications:

- **smaller molecules can be expressed as recombinant proteins** (produced from recombinant DNA, that is artificial engineered DNA) in either bacteria, insect, or mammalian cells in bioreactors. Each of these expression systems provides a set of advantages and disadvantages
- **for ECM molecules of large size or complexity** (collagens, many proteoglycans, non-collagenous glycoproteins), problems can occur related to size, microheterogeneity, yield, and scalability and it is possible to create **smaller expression constructs** that retain functions of individual protein domains.

An alternative to the use of recombinant ECM proteins is the use of **synthetic peptides or proteolytic fragments of native molecules** that retain selected functional properties of their parent molecules (RGD sequence).

Although the biological activities and biocompatibility of these materials are useful, **the lack of control over desired mechanical, degradation, and processing properties** has motivated the use of synthetic polymers such as:

- poly(glycolic acid), **PGA**
- poly(lactic acid), **PLA**
- poly(glycolic-co-lactic acid), **PLGA**
- poly(ethylene glycol) hydrogels, **PEG**

DEFINISMOLOGIA

Recettori di adesione cellula-cellula - Cadherine 8/26
 @aria.mazzoli@polito.it, marco.denu@polito.it

In **epithelial tissues (A)**, cadherins mediate **zonula adherens junctions**, which partition the cell membrane into apical and basolateral surfaces.

In **cardiac myocytes (B)**, they establish **intercalated discs**, which both stabilize gap junctional coupling and transmit contractile forces.

In **neuronal cells (C)**, they mechanically stabilize **synaptic junctions** by mediating adhesion between the presynaptic and postsynaptic cells.

Recettori di adesione cellula-cellula - Selectine 9/26
 @aria.mazzoli@polito.it, marco.denu@polito.it

SELECTINS

The L-, E-, and P-selectin molecules comprise a small family of lectin-like adhesion receptors. Selectin structure includes an amino-terminal domain that is homologous to calcium-dependent animal lectins, followed by an epidermal growth factor (EGF)-type domain, two to nine complement regulatory protein repeats, a transmembrane helical segment, and a short cytoplasmic tail.

Selectins mediate heterotypic cell-cell interactions. A major physiological role for selectins involves leukocyte adherence to endothelial cells and platelets during inflammatory processes.

Recettori di adesione cellula-cellula - Immunoglobulins 10/26
 @aria.mazzoli@polito.it, marco.denu@polito.it

IMMUNOGLOBULINS

Immunoglobulins comprise a very diverse group of adhesive receptors. Members of this family are defined by the presence of one or more copies of the Ig fold, a compact structure with two cysteine residues separated by 55-75 amino acids arranged as two antiparallel beta sheets.

Typically Ig CAMs have a large amino-terminal extracellular domain containing the Ig folds, a single transmembrane helical segment, and a cytoplasmic tail.

They are presented on the surface of activated endothelial cells and mediate heterotypic binding to integrins on activated leukocytes and neutrophils.

One of the most important contexts for Ig CAMs is the developing nervous system, where many different members of this superfamily are involved in axon guidance and in the establishment and maintenance of neural connections.

Adesione cellula-cellula 11/26
 @aria.mazzoli@polito.it, marco.denu@polito.it

Adherens Junctions (classic cadherins, actin microfilaments)

Desmosomes (desmosomal cadherins, intermediate filaments)

Tight Junctions (epithelial cells, fusion of plasma membranes)

Gap Junctions (muscle and nervous cells, direct communication between cells)

Biologia Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13

selective heterotipiche
 strutture web complicate!



Modello recettore-ligando

16/26

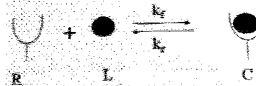
diana.massa@polito.it, marco.dario@polito.it

Le cellule sono estremamente sensibili all'ambiente esterno, non solo perché fonte di nutrienti, ma anche perché ricco di segnali biochimici che regolano i processi cellulari. La risposta delle cellule allo stimolo esterno dipende dal numero di recettori legati al ligando o "complessati".

Nel contesto dell'ingegneria dei tessuti, la conoscenza dei meccanismi di interazione tra recettori e ligandi, delle soglie di concentrazione e dei tempi caratteristici è fondamentale perché consente di controllare i processi cellulari di generazione del costruito.

Consideriamo il modello più semplice di legame tra recettore (R) e ligando (L), in condizioni di legame monovalente, reversibile e all'equilibrio:

- R = numero di recettori liberi per cellula
- L = concentrazione di ligando (moli/litro)
- C = numero di complessi recettore-ligando per cellula
- k_f = costante cinetica di associazione (litrimoli⁻¹s⁻¹)
- k_r = costante cinetica di dissociazione (s⁻¹)



Biomedicina Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13



Modello recettore-ligando

17/26

diana.massa@polito.it, marco.dario@polito.it

- R = numero di recettori liberi per cellula
- L = concentrazione di ligando (moli/litro)
- C = numero di complessi recettore-ligando per cellula
- k_f = costante cinetica di associazione (litrimoli⁻¹s⁻¹)
- k_r = costante cinetica di dissociazione (s⁻¹)
- $K_D = k_f / k_r$ = costante di equilibrio (moli/litro)
- N = numero di cellule per unità di volume
- R_T = numero totale di recettori per cellula (liberi + legati)
- L_0 = concentrazione iniziale di ligandi
- N_A = Numero di Avogadro (mol⁻¹)



Si può scrivere una semplice equazione cinetica

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

Ponendo delle condizioni di conservazione della massa

$$R_T = R + C$$

$$L_0 = L + NC/N_A$$

RISERVA
LIGANDI

Biomedicina Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13



Modello recettore-ligando

18/26

diana.massa@polito.it, marco.dario@polito.it

Supponendo che

$$L \gg NC/N_A$$

e quindi che

$$L = L_0$$

L'equazione può essere risolta allo stato stazionario (dC/dt=0)

$$k_f (R_T - C_{eq}) L_0 = k_r C_{eq}$$

da cui

$$C_{eq} = \frac{R_T L_0 / K_D}{1 + L_0 / K_D}$$

La frazione di recettori complessati è

$$\frac{C_{eq}}{R_T} = F_{eq} = \frac{L_0 / K_D}{1 + L_0 / K_D}$$



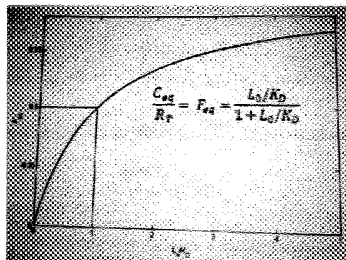
Modello recettore-ligando

19/26

diana.massa@polito.it, marco.dario@polito.it

Se $L_0 = K_D$, la frazione di recettori complessati è pari al 50%. Questa è la soglia spesso considerata per avere una risposta cellulare, anche se alcune cellule necessitano di pochi complessi per reagire.

Alti valori di K_D corrispondono a legami con bassa affinità in cui ci vuole una elevata concentrazione di ligandi affinché venga raggiunto un dato valore di F e viceversa. Di conseguenza, il valore di K_D è inversamente proporzionale all'affinità del legame.



Biomedicina Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13

NIGRAZIONE CELLULARE

Le cellule sono adese per secernere, assorbire e trasmettere segnali

Le cellule migrano per proliferare

formazione di adesione focale da una parte e di dissoluzione dei siti di attacco dall'altra contemporaneamente

La migrazione cellulare è un componente essenziale del normale sviluppo, delle difese immunitarie, della riparazione cellulare, della invasione tumorale

Biongegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Biongegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Biongegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Biongegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

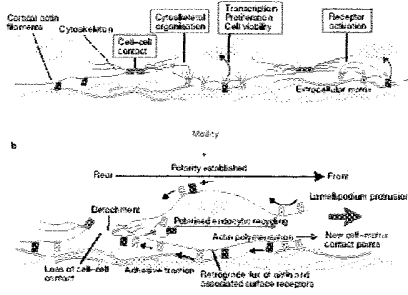
Adesione e migrazione cellulare

2/20

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

In general, cells attach to differentiate and carry out specialized cell functions such as secretion, absorption, or signal transmission.

They detach in order to migrate and proliferate. Interestingly, many epithelia undergo a form of programmed cell death (known as anoikis) if forcibly detached from their substrata.

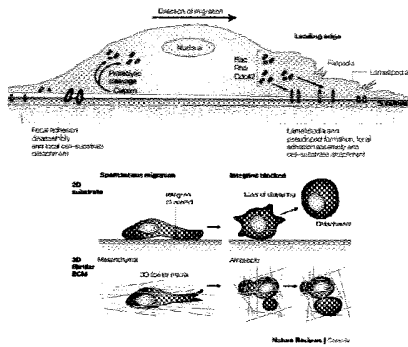


Adesione e migrazione cellulare

3/20

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Numerous studies of migrating cells have shown simultaneous formation of focal adhesions with substrata on the leading edge of the cell, and dissolution of attachment sites on the trailing end.



Migrazione cellulare

4/20

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Cell migration is an essential component of normal development, inflammation, tissue repair, angiogenesis, and tumor invasion.

After conception, selected cells of the developing mammalian zygote invade the uterine wall to establish the placenta, while the intricately programmed migration of other cells within the embryo shapes the complex form of the emerging organism.

The nervous system is another example of large-scale cell migration during fetal development. The growth of axons and dendrites is preceded by a phase of cell migration in which immature neurons (or neuroblasts) move from their birthplace to settle in some other location in order to make the right connections.

Certain kinds of white blood cells are able to migrate through the walls of blood vessels and into the surrounding tissues, actively seeking and engulfing sources of decay.

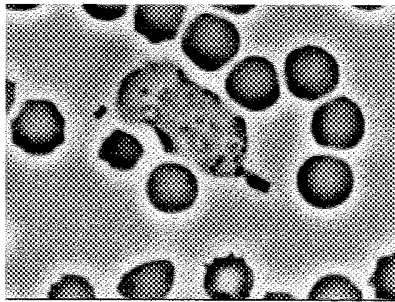
Tumor cell motility is also required for invasion and metastasis. The crawling malignant tumor cells that invade and disrupt tissue architecture account as much or more for the lethality of cancer as does uncontrolled growth.

Migrazione cellulare

5/20

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

One of the most prominent example of directed cell migration toward a chemoattractant is the targeting of pathogens by neutrophils. The pathogens release compounds that neutrophils recognize as foreign. Upon activation, the neutrophils crawl about, targeting local pathogens. Upon contacting the pathogens, the neutrophils engulf them, removing the source of chemoattractant.





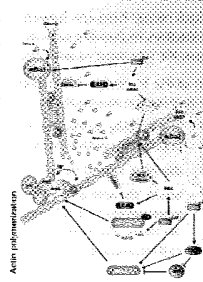
Migrazione cellulare – Protrusione

10/30

diana.mascia@polito.it, marco.denu@polito.it

Protrusion usually occurs in response to chemoattractive signals in the microenvironment that are detected by the cell (for example, leukocytes are induced to move towards pro-inflammatory cytokines released by injured tissue). However, some cells extend protrusions in a probing, exploratory manner in the absence of directional stimulation.

Scheme depicts the major mechanisms and molecules implicated in regulating and enabling actin polymerization/depolymerization and organization. The Arp2/3 complex induces branching by attaching to the side of a pre-existing filament and promoting de novo polymerization. Formins such as mDia1 and mDia2 induce processive actin polymerization by stacking themselves to the barbed end of the filament. The formins compete with actin capping proteins, such as gelsolin and cap2 (not depicted). Ena/VASP serves a dual role as an adaptor protein and a 'tear' capper, which enables actin polymerization through other molecules that are part of a complex (not shown). Myosin II (in green, between filaments) cross links antiparallel actin mediates contraction due to its ATPase-dependent motor domain, and its cross-linking, ATPase-independent scaffolds. Cofilin (grey arrowhead) severs actin filaments, promoting the formation of new barbed ends. It also generates actin monomers to be incorporated to the filaments via profilin/formin (readmilling). Another small protein, thymosin β_4 , sequesters actin monomers and maintains the pool of available monomers. Some of the signaling proteins that control these molecules are also shown. They include: Rho-kinase (ROCK), which is under the control of RhoA and activates LIMK to activate cofilin, blocks the myosin phosphatase, promoting myosin activation, and phosphatases and activates myosin directly. PAC also activates LIMK but it inhibits MLCK, increasing myosin II to the WAVE/Scar/Abi complex and WASP which activate the Arp2/3 complex, are under the control of Rac and Cdc42, respectively; finally, formins are also activated by small GTPases directly (mDia1 by RhoA; mDia2 by Cdc42). (Vicente-Mazaneres, 2005)



Biomedicina Cellulare e Tissutale – A.A. 2012-13



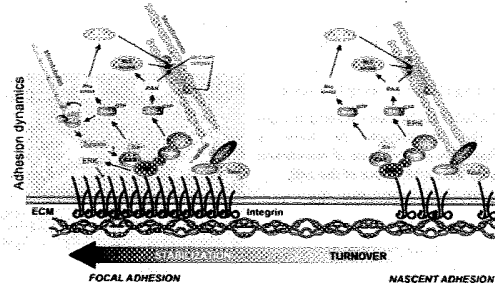
Migrazione cellulare – Adesione

11/30

diana.mascia@polito.it, marco.denu@polito.it

ADHESION

For the adhesion phase, integrins anchor the cell to its substratum by binding both to ECM molecules on the outside of the cell and to the actin cytoskeleton, through the regulatory proteins (vinculin, talin, α -actinin), on the inside.



Biomedicina Cellulare e Tissutale – A.A. 2012-13



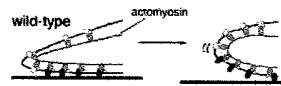
Migrazione cellulare – Traslocazione e retrazione

12/30

diana.mascia@polito.it, marco.denu@polito.it

TRANSLOCATION and RELEASE

Cell body translocation immediately follows protrusion in the direction of attachment and is independent of actin polymerization. This movement is propelled by a coordinated contraction of the actin-myosin cytoskeleton (depends on myosin II).



Rear release is associated with disassembly of the adhesions at the trailing edge. Mechanisms that promote adhesion disassembly:

- actomyosin contraction
- microtubule-induced adhesion relaxation
- endocytosis (cells absorb molecules by engulfing them) of adhesion receptors
- proteolytic cleavage (process of breaking the peptide bonds between amino acids in proteins) of focal adhesion proteins

If cell motion is faster than the release of the focal contacts, little bits of cellular material can be broken off and left behind.

Biomedicina Cellulare e Tissutale – A.A. 2012-13



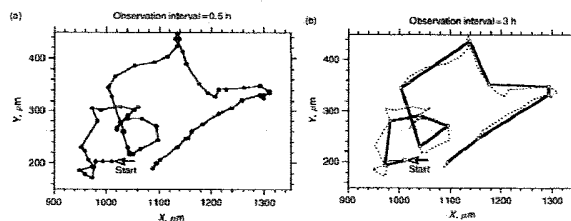
Migrazione cellulare – Moto Browniano

16/30

diana.mascia@polito.it, marco.denu@polito.it

Migration of individual mammalian cells in isotropic environments can be described as a persistent random walk. Over short time periods, cells follow a relatively straight path, showing persistence of movement (a).

If long time intervals are used to observe the cell position, however, cell movement appears similar to Brownian motion with frequent direction changes (b).



Biomedicina Cellulare e Tissutale – A.A. 2012-13

ANGIOGENESI

3 strati diversi:

- TUNICA INTIMA:

Supobstato con cellule
Endoteliali squamose unite
da matrice Extracellulare

- TUNICA MEDIA: è un tessuto

vascolare molto ricco con
tessuti lisci, fibre elastiche
e polisaccaridi

- TUNICA ADVENTITIA è fatto di

tessuto connettivo consistente
in vasi



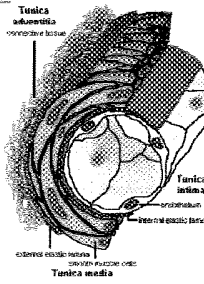
Vasi sanguigni

3/16

diana.massini@polito.it, marco.denucci@polito.it

Arteries and veins have the same basic structure. There are **three layers**, from inside to outside, while capillaries consist of little more than a layer of endothelium and occasional connective tissue:

- **TUNICA INTIMA** is a single layer of simple squamous endothelial cells glued by a polysaccharide intercellular matrix, surrounded by a thin layer of subendothelial connective tissue interlaced with a number of circularly arranged elastic bands called the internal elastic lamina;
- **TUNICA MEDIA** is rich in vascular smooth cells with circularly arranged elastic fibers, connective tissue, polysaccharide substances. Second and third layer are separated by another thick elastic band called external elastic lamina;
- **TUNICA ADVENTITIA** is made of connective tissue and contains nerves that supply the muscular layer, as well as nutrient capillaries (vasa vasorum) in the larger blood vessels.



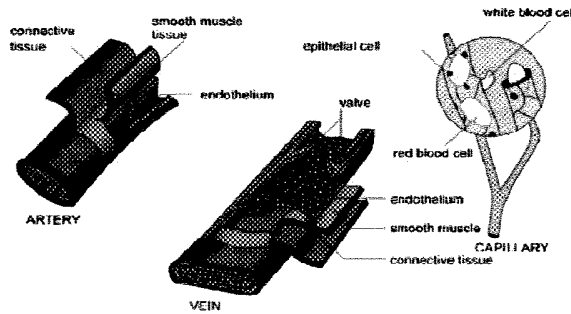
Biologia Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13



Vasi sanguigni

4/16

diana.massini@polito.it, marco.denucci@polito.it



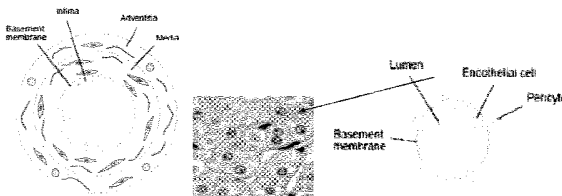
Biologia Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13



Vasi sanguigni

5/16

diana.massini@polito.it, marco.denucci@polito.it



Biologia Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13

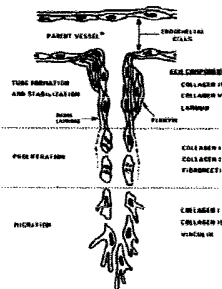


Angiogenesi

6/16

diana.massini@polito.it, marco.denucci@polito.it

Angiogenesis is a physiological process by which new blood vessels grow. It is an important natural process occurring in the body, both in health and in disease.



Two types of angiogenic processes exist:

- **VASCULOGENESIS** (sprouting angiogenesis)
- **INTUSSUSCEPTION** (intussusceptive angiogenesis)

Biologia Cellulare e Tissutale - A.A. 2012-13

Intussuscezione 13/16
 dana.massa@polito.it, marco.darui@polito.it

Intussusception (intussusceptive angiogenesis) is the internal division of the vessel lumen. In this type of vessel formation, the capillary wall extends into the lumen to split a single vessel in two.

Intussusception is important because it is a reorganization of existing cells. It allows a vast increase in the number of capillaries without a corresponding increase in the number of endothelial cells.

This is especially important in embryonic development as there are not enough resources to create a rich microvasculature with new cells every time a new vessel develops.

Intussuscezione 14/16
 dana.massa@polito.it, marco.darui@polito.it

There are four phases of intussusceptive angiogenesis:

1. The two opposing capillary walls establish a zone of contact.
2. The endothelial cell junctions are reorganized and the vessel bilayer is perforated to allow growth factors and cells to penetrate into the lumen.
3. A core is formed between the two new vessels at the zone of contact that is filled with smooth muscle cells and myofibroblasts. These cells begin laying collagen fibers into the core to provide an ECM for growth of the vessel lumen.
4. The core is fleshed out with no alterations to the basic structure.

Intussuscezione - Vasculogenesi 15/16
 dana.massa@polito.it, marco.darui@polito.it

Mother vessel → Intussusception → Daughter vessels

Mother vessel → Sprouting → New sprout

ANG. FISIOLOGICA
 Sviluppo embrionale
 orolatorio
 sviluppo placentare

ANG. FISIOPATOLOGICA
 processi infiammatori
 riparazione di ferite
 ischemie

ANG. PATOLOGICA
 neoplasie
 psoriasi
 aterosclerosi
 artite
 ulcera gastrica

Such a response is **not always beneficial** and may contribute to pathological states (cardiac and vascular hypertrophy caused by chronic high blood pressure).

It is generally agreed that **forces beyond the physiological range, both over- and underloading, could lead to adverse consequences.**

A vast amount of data has shown that **many of the biochemical events generated by cells in response to forces are similar to those that occur following recognition of chemical stimuli.**

The exact mechanisms by which cells transduce mechanical stimuli into biochemical signaling events (mechanochemical transduction) are not yet clear and are an active area of research.

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Although intracellular signaling events triggered by external forces have been elucidated in many cell types, the primary mechanosensor for transducing mechanical input into biochemical signals remains elusive.

It is hypothesized that forces may physically alter the molecular structure or displace the position of a sensor, thereby altering/triggering chemical signal transduction events.

In conjunction, mechanosensors should be located at a site where the force acts directly or can be transmitted to efficiently.

Since most forces first act directly on the plasma membrane, the majority of the mechanosensors that have been proposed are structures on the plasma membrane.

Membrane structures that have been implicated in the role of mechanosensors in several cell types include ion channels, G protein-linked receptors, tyrosine kinase receptors, and integrins.

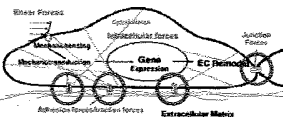
Alternatively, because forces applied to the plasma membrane are transferred to the cytoskeleton, it too could act as a mechanosensor. Of the proposed mechanosensors, cytoskeleton and integrins have been the most extensively studied.

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Evidence suggests that they regulate mechanotransduction via mechanical and chemical mechanisms.

When an external force is loaded on the cell, the biological responses originate at two types of specialized microscale structures:

- focal adhesions that link cells to their surrounding ECM
- adherens junctions that link adjacent cells



In response to externally applied forces, cells actively rearrange the adhesion sites and the organization and contractile activity of the cytoskeleton and redistribute their intracellular forces to equalize the external force.

The resulting change in cytoskeletal tension may convey a regulatory signal to the cell and subsequently alter its functional state.

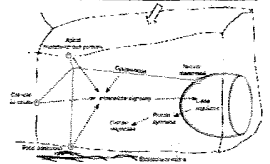
Dynamic changes in cytoskeleton organization, integrin-ECM binding, and traction forces may thus play a critical role in regulating mechanotransduction (e.g. ECs responses to shear stress).

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Finally, although each of the candidates mentioned above has been proposed to be a primary mechanosensor, it should be noted that they have a high degree of association with one another.

It is likely that several mechanosensors are induced simultaneously, hence, forces may be transduced to biological signals through interactions of activated mechanoreceptors.

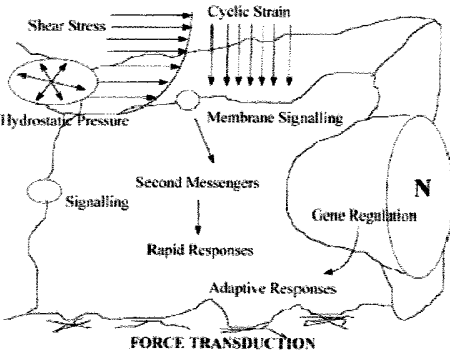
Such a "decentralized model" was first proposed by Davies to describe endothelial cell responses to mechanical stresses but is applicable to mechanically induced responses in other cell types (Davies&Tripathi, 1993; Davies, 1995).



In this model, forces acting on one region of the cell surface are also transmitted by the cytoskeleton to other locations where signaling can occur, such as focal adhesions at the cell-ECM interface, cell-cell junctions, the nuclear membrane; the cytoskeleton itself is also a mechanosensor.

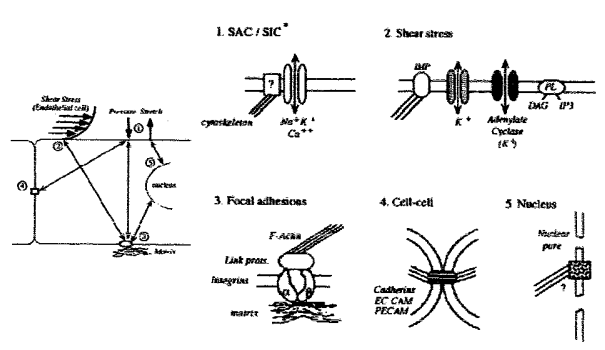
This model predicts mechanotransduction as an integrated response of multiple signaling networks that are spatially organized in the cell.

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Model of initiation of signal transduction in cells in response to shear stress, stretch, and pressure. Forces may directly activate individual mechanosensors or may be transmitted by the cytoskeleton to intracellular locations where signaling can occur. In either case, cascades of intracellular signaling events are initiated, leading to altered gene expression and cell behavior. (Davies, 1995)

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Diagrams showing mechanical stress sites in cells. SAC, stretch-activated ion channel; SIC, stretch-inactivated ion channel; IMP, integral membrane protein; PI, phospholipid; DAG, diacylglycerol; IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; prots., proteins; EC-CAM, endothelial to cell adhesion molecule; PECAM, platelet endothelial cell adhesion molecule. (Davies&Tripathi, 1993)

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Several techniques have been developed to characterize traction forces by measuring the deformation of elastic substrates.

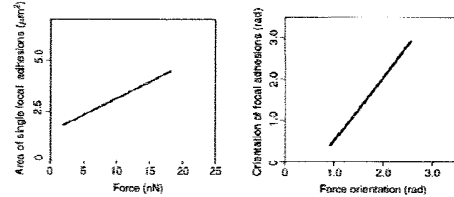
These methods can be combined with fluorescence imaging of focal adhesion proteins in living cells (e.g., green fluorescent protein [GFP]-tagged vinculin) to examine the relationship between the size/shape of focal adhesions and the forces transmitted through them over time.

Many studies have demonstrated conclusively that focal adhesions transmit cytoskeletal forces in the range of several nN per square micrometers to the underlying substrate.

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

In addition, it was found that in stationary fibroblasts expressing GFP-tagged vinculin:

- the size of focal adhesions is proportional to the local transmitted force
- the orientation of focal adhesions is parallel to the direction of the force applied at each focal adhesion



Fibroblasts expressing GFP-tagged vinculin were cultured on silicone elastomers imprinted with micropatterns of dots. The traction force applied by the cell on the substrate was calculated to the precision of a single adhesion site based on the displacements of dots (markers) and the locations of the focal adhesions. (Batalan, 2001)

The relaxation of the forces (induced by contractility inhibitors) and the disassembly of focal adhesions occurred simultaneously.

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

It is important to note that the traction force is directly related, but not identical, to the intracellular contractile force, part of which could be dissipated due to cell deformation or other cellular processes.

Furthermore, the magnitude and direction of traction forces vary among different regions of a cell. Experimental evidence shows that the average traction force magnitude over the entire cell area correlates with the state of cell contraction.

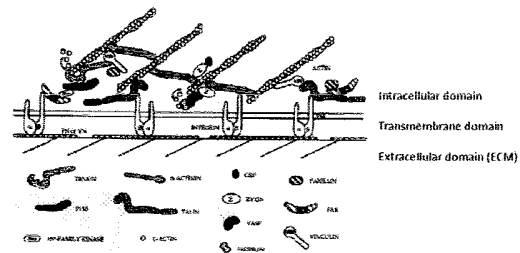
Finally, in addition to the ECM, other structures exist that may provide mechanical support for the tensed actin network in the cytoplasm. Candidates include microtubules and cell-cell contacts.

Cells in a confluent monolayer generally form fewer and smaller focal adhesions with the ECM than subconfluent cells, suggesting a decreased tension at the interface between the ECM and a cell monolayer (Ryan, 2001; Nelson, 2004).

The interactions between groups of cells and the ECM define "the resting stress field" within a tissue and are essential for guiding tissue development, remodeling, repair, and maintaining tissue homeostasis.

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

The effect of ECM molecules on cells is primarily mediated through integrins. It is well recognized that the chemical composition of the ECM influences integrin-mediated signaling pathways.



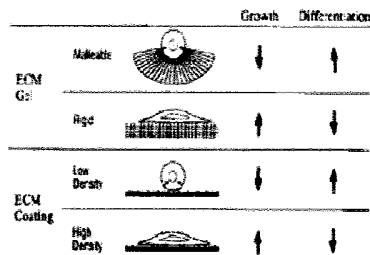
However, a number of observations have shown that adhesion to the ECM (i.e., ligand occupation) alone is not sufficient to elicit a complete integrin-mediated response unless the matrix proteins are immobilized and can physically resist tension.

Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

In vitro studies have demonstrated that although many integrin signaling events can be induced in suspended cells by allowing the cells to bind to ECM-coated microbeads, these cells never enter S phase (synthesis phase, the part of the cell cycle in which DNA is replicated) and may even undergo apoptosis.

The tension-dependent control of cell growth is attributed to ensure that only anchored cells can grow. Loss of this control (i.e., anchorage independence) is a hallmark of cancerous cells.

While the chemical composition of the ECM determines whether a cell can bind to it or not, once ligation is established, the development of tension is influenced by the physicality of the ECM.

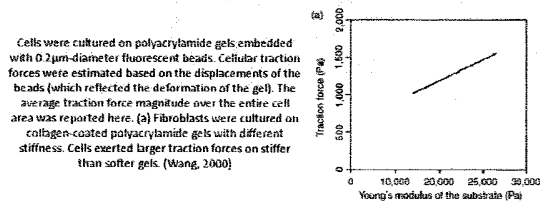


Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Because the mechanical properties of the ECM determine its deformation under compressive loads, they affect the level of tension that a cell can develop; a rigid surface can resist higher tension than a softer surface and thus allows cells to carry more tension in the cytoskeleton.

Experimental observations have confirmed this notion. Researchers (Pelham & Wang, 1997; Wang, 2000) have developed ECM-coated polyacrylamide substrates that allow the compliance to be varied while maintaining a constant chemical environment.

When compared with rigid substrates, fibroblasts grown on soft substrates exert smaller traction forces, indicating a decrease in their intracellular tension.



Cells were cultured on polyacrylamide gels embedded with 0.2 µm-diameter fluorescent beads. Cellular traction forces were estimated based on the displacements of the beads (which reflected the deformation of the gel). The average traction force magnitude over the entire cell area was reported here. (a) Fibroblasts were cultured on collagen-coated polyacrylamide gels with different stiffness. Cells exerted larger traction forces on stiffer than softer gels. (Wang, 2000)

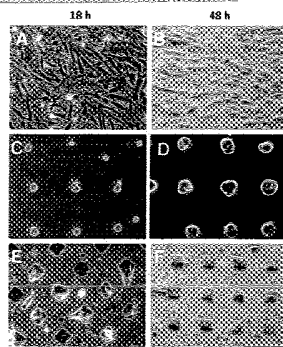
Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



This issue has been recently resolved by advances in micropatterning techniques, which allow the synthesis of surfaces on which different micron-sized islands are coated with the same ECM density and surrounded by non-adhesive regions to confine cell spreading.

When ECM islands are created on elastic substrates, traction forces can be estimated based on substrate deformation.

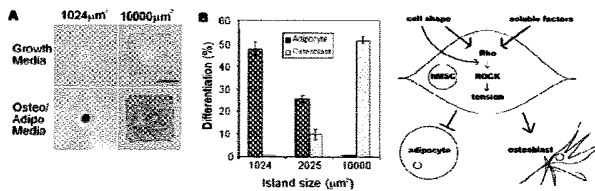
Phase-contrast images of smooth muscle cells cultured for 18 (A, C, E) or 48 (B, D, F) h on polyacrylamide gels on which collagen was either coated equally across its surface (A, B) or limited to micrometer-sized islands of defined size, shape, and position (C-F). Cells spread and exhibited pleomorphic forms on unpatterned gels (A), resulting in formation of a confluent monolayer by 48 h of culture (B). In contrast, cells cultured on similarly coated circular adhesive islands, 25µm (C) or 50µm (D) diameter, or on square islands with 50µm edges (E, F), remained constrained to the size and shape of the islands for the entire period of study (Wang, 2002)



Biogenegria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



Using the micropatterned substrate mentioned above, a recent study showed that human mesenchymal stem cells undergo osteogenesis when allowed to spread out (cell area=10000µm²) but become adipocytes when confined with a small area (=1000 µm²): this shape-dependent control of lineage commitment is mediated by the Rho GTPase, specifically via its effect on ROCK-mediated cytoskeletal tension.



(A) Brightfield images of hMSCs plated onto small (1024 µm²) or large (10000 µm²) fibronectin islands after 1 week in growth or mixed media. Lipids stain red, alkaline phosphatase stains blue. Scale bar: 50 µm
 (B) Percentage differentiation of hMSCs plated onto 1024, 2025, or 10000 µm² islands after 1 week of culture in mixed media (McBeath, 2004)

Biogenegria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



The control of cell function by the ECM is a subject under vigorous investigation in the field of cell biology and has great potential in TE applications.

While most studies have previously focused on the chemical composition of the ECM, it is becoming clear that the physicality of the ECM scaffold is equally important as it has a profound impact on the cellular tension. Thus, design of future artificial ECMs for TE applications should take into consideration both the chemical and physical properties of ECM scaffolds.

It is important to note that the mechanical influence between cells and ECM scaffolds is mutual. Cells exert strong traction forces that deform and rearrange their surrounding matrix proteins. Hence, traction forces may affect the structure of the scaffolds (e.g., porosity, pore size, etc.), and changes in material properties will feedback to affect cell functions.

Finally, cells in the body exist in a dynamic mechanical environment. Cell-scaffold constructs in situ will inevitably experience mechanical loading. Therefore, it is important to understand how the material properties of the scaffold will be affected by mechanical forces, and how cells embedded within the scaffold will sense and respond to these physiologic loads transmitted through the scaffold.

Biogenegria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



Concluding, three critical elements define the mechanical microenvironment of a cell:

- self-generated forces
- counter forces from the ECM
- externally applied forces in the body

Extensive work still needs to be done to create a coherent theory of mechanotransduction processes.

At the cellular level, the nature of the primary mechanosensor(s) remains to be a central question.

At the tissue level, tissue-scale responses to forces result from a dynamic and orchestrated interaction between different cell types in a 3D matrix environment.

In most of the in vitro studies, mechanical stimuli are imposed on monolayer cell cultures made of a single cell type. Although cultured cells sense and respond to mechanical stimulation in this setting, it is not yet clear whether the same responses or sensing mechanisms occur in vivo.

Biogenegria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



It was found that cultured cells spread to take the size and shape of the islands, and that traction forces increased as cell spreading was promoted.

These results indicate that larger cells carry greater cytoskeletal tension, and demonstrate that it is the level of cell spreading, rather than ECM density, that influences cell tension.

Furthermore, blocking the generation of actomyosin-based tension in well-spread cells (with an inhibitor that does not alter cell shape) was found to inhibit cell growth; thus, cytoskeletal tension is required for shape-dependent growth control.

There is an intimate crosstalk between the generation of cytoskeletal tension and the degree of cell distortion, the latter being restricted by the ECM area that is available for cell attachment. In the context of TE applications, the spatial distribution of ECM ligands may be a powerful means for controlling cell behavior.

Biogenegria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



Finally, the studies summarized above address the spatial effect of the ECM on the extent of cell distortion and tension in a two-dimensional cell culture system. With few exceptions, the mechanical interaction between a cell and the ECM occurs around the whole cell surface in a true physiological setting.

While there is not yet a direct measurement method to correlate tractions and the spatial distribution of ECM ligands in a 3D system, it is likely that the correlation is similar to that in a planar culture system.

Biogenegria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



Conventional cell culture techniques grow cells under static conditions; in large-scale bioreactors, flow and mixing patterns are introduced merely to enhance spatially uniform cell distributions on 3D scaffolds and provide efficient mass transfer.

As the significance of externally applied mechanical forces in maintaining appropriate cell physiology has come into the light, tissue engineers have incorporated mechanical stresses into bioreactor design and found that physiological loading has positive effects on growing cells/tissues in vitro.

The application of cyclic stretch to vascular SMCs cultured in collagen gels can help maintain the contractile phenotype of SMCs, align them in the correct physiological orientation, and improve the mechanical properties of cell-gel composites.

Researchers have found that artificial cartilage grown under cyclic compressive loading has superior biochemical compositions and material properties than those grown statically.

These results show that appropriate mechanical stimulation may be a determining factor of tissue development in vitro and may improve the performance of engineered tissues in the body.

Biogenegria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



In the context of TE, it is crucial to understand:

- how the physicality of scaffolds affects cells
- how the structure, composition, and mechanical properties of scaffolds may change as a result of traction forces from the cells and the external forces from the body
- how scaffolds affect cells to sense the external forces

These are just a few of the challenges for the future.

Biogenegria Cellulare e Tessutale – A.A. 2012-13



Meccanica dei corpi deformabili

8/21
diana.massa@polito.it; marco.denu@polito.it

One **key distinction between stress and pressure has to do with orientation**. The **pressure** at any point in a fluid **does not depend on the orientation**. For a given point inside a fluid, the vertical and horizontal pressures at that location are always the same. **Pressure is a scalar quantity**.

By contrast, **stress depends strongly on orientation**. In our axially loaded column example, the stress in the vertical direction is F/A , yet the stress in the horizontal direction is zero, because there is no load in the horizontal direction.

The reason of this difference is the **ability of the fluid molecules to flow under load and reorient the internal force distribution**. Solid molecules are more strongly bound to their neighbors and are **not free to redistribute under load**.

Stress and strain are even more complicated, since they **depend on the direction of forces and displacements and on the direction of the area (or displacement) to which they apply**. **Stress and strain are tensors**.



Meccanica dei corpi deformabili – Sforzo e deformazione normale

6/21
diana.massa@polito.it; marco.denu@polito.it

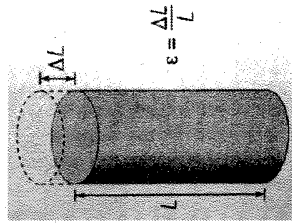
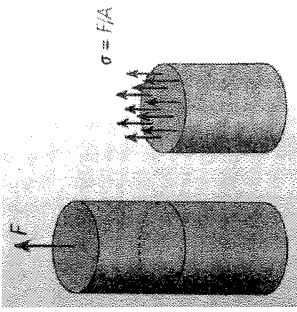
We can imagine a **cut-plane perpendicular to the long axis of the column**. Because the force across this area is distributed evenly, we can apply an analogy to pressure and define **stress, σ (N/m^2)**, to be the **force per unit area**:

$$\sigma = F/A$$

This stress is considered a **normal stress**, because the force is acting perpendicular across the area. **Tensile stresses are assumed to be positive** by convention, and **compressive stresses are negative** (opposite sign convention is used for pressure).

We can define **strain** as a **change in the length of an object scaled by its original length**. Consider the column, let the initial length be denoted as L . When the load is applied, the column extends by a small amount, ΔL , and the total length of the column is $L + \Delta L$. The strain, ϵ **dimensionless**, is defined as:

$$\epsilon = \Delta L/L$$

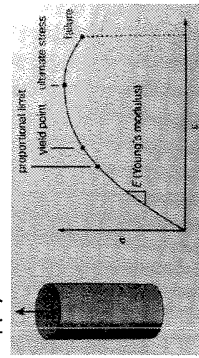


Meccanica dei corpi deformabili – Sforzo e deformazione normale

7/21
diana.massa@polito.it; marco.denu@polito.it

Let us see **how stress and strain relate to each other** to help us understand the behavior of a material. The column is loaded with **axial tension** and we record the deformation of the tip as a function of the load we apply. Assume that:

- the column is **uniform in its material properties (homogeneous)**
- It behaves as an **elastic material**
- its **material behavior is the same in all directions (isotropic)**



Although the two quantities we directly measure are the tip displacement and the force, **we calculate the stress and strain and plot them versus each other**.

For many materials, this plot is a simple line, such materials are known as **linear (linear elastic) materials**. The **slope** of this line is known as the **Young's modulus, E (N/m^2)**, of the material:

$$\sigma = E\epsilon$$

As the load increases, a stress is eventually reached, known as the **proportional limit** where it no longer behaves linearly. The **stress at failure** is the **ultimate stress or strength of the material**.



Meccanica dei corpi deformabili – Sforzo e deformazione di taglio

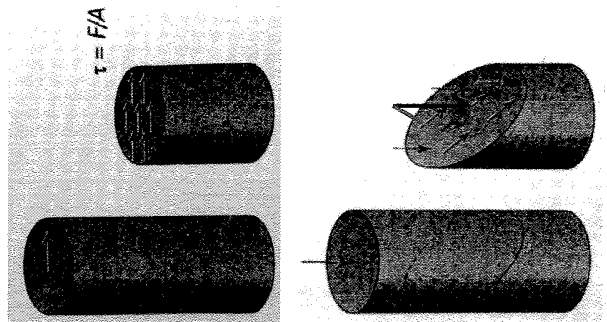
9/21
diana.massa@polito.it; marco.denu@polito.it

What sort of stress results if we **load the column perpendicular to the long axis** (parallel to the plane)?

Consider the imaginary cut-plane some distance away from the region of load application. The force is distributed evenly through the cross section, but now the **small distributed forces are lined up parallel to the plane** rather than perpendicular. This type of stress is called **shear stress**:

$$\tau = F/A$$

If we select a **cut-plane that is oriented obliquely** to the axis of the column, **the distributed forces across the surface will be a mixture of parallel and perpendicular oriented forces**. In general, **stress is a mixture of normal and shear stress**.

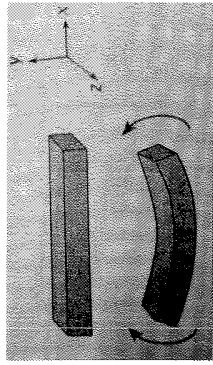




Meccanica dei corpi deformabili – Cinematica di una trave

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

14/21



Consider a beam that is loaded by a bending moment such that it takes on a curved shape.

We make 3 simplifying assumptions about the deformation that characterizes the kinematics of the problem:

- any **y-z-plane** in the undeformed beam will remain a plane in the deformed situation (y-z-planes rotate)
- the **plane sections only rotate and do not slide** relative to each other (ignoring the effect of shear)
- as the beam deforms, the **y-z-planes rotate** in such a way as to remain **perpendicular to any imaginary line** in the beam **originally oriented in the x-direction**

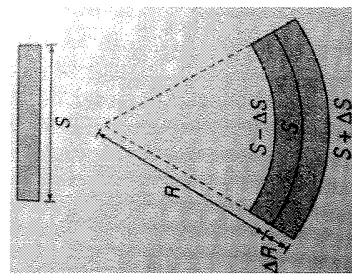
With these assumptions, the **deformation of every point in the beam is fully defined**. The **deformed state is fully defined by knowing the displacement of the central axis of the beam only**. The beam becomes a simple one-dimensional problem of determining the **displacement in the y-direction**, which we denote $w(x)$. Next, we need to determine the **strain in the beam as a function of $w(x)$** .



Meccanica dei corpi deformabili – Cinematica di una trave

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

15/21



To accomplish this, we need to determine the amount of stretch or strain that lines initially oriented parallel to the x-axis experience as the beam deforms.

Consider 3 lines on the beam (top surface, bottom surface and central axis). If the section is small enough, the deformed shape of each of these lines can be approximated as sections of a circle:

- R = radius of the deformed central axis
- $R - \Delta R$ = radius of the deformed top surface
- $R + \Delta R$ = radius of the deformed bottom surface

We assume that the **initial length of a line along the central axis** in our section of beam is S . In the deformed configuration, the **central axis is neither lengthened or shortened**, i.e. the **strain at the central axis is zero** and is referred as **neutral axis**.

Because the **ratio of circumference to radius is constant** for similar circular sections:

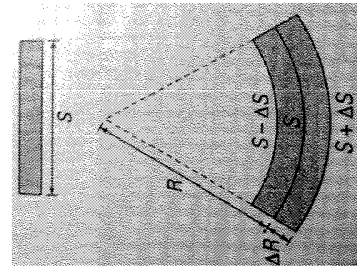
$$\frac{S + \Delta S}{R + \Delta R} = \frac{S}{R} \quad \longrightarrow \quad \frac{\Delta S}{S} = \frac{\Delta R}{R}$$



Meccanica dei corpi deformabili – Cinematica di una trave

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

16/21



The quantity $\Delta S/S$ is the **change in length of one of our imaginary lines normalized by its initial length**, that is exactly our definition of strain.

ΔR is the **distance to the imaginary line in the y-direction** measured from the neutral axis. If we position the origin of our coordinate system so that it lies on the neutral axis, we have a **simple expression for the strain in the beam**:

$$\epsilon(y) = y/R$$

The **radius is not a constant**, it is a **function of the displacement $w(x)$** . To formulate equations that we can solve, we must make this dependency explicit.

The quantity $1/R$ is also the **local curvature** of the beam typically denoted as k . The local slope of a curve is given by its first derivative, but the **local curvature is given by the second derivative**. Therefore, **strain is the product of the second derivative of the displacement and the distance from the neutral axis**:

$$\epsilon(y) = \frac{y}{R} = yk = y \frac{d^2 w}{dx^2}$$

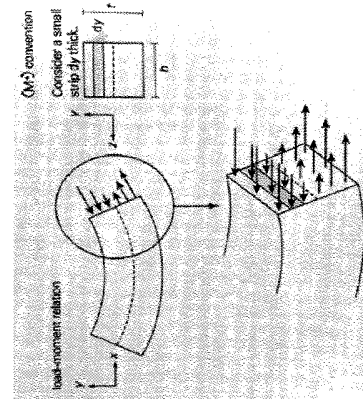
Kinematics in a beam are the strain-displacement relationship.



Meccanica dei corpi deformabili – Equilibrio di una trave

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

17/21



The next step in deriving the beam-bending equations is to **make use of equilibrium to relate the moment at a section within the beam to the stress at each point within the beam**.

At the **inner side**, the beam will be **compressed** (negative stress) to a shorter total length, **whereas at the outer side the beam will be stretched** (positive stress). At the neutral axis the stress is zero.

The **stress in a beam varies linearly through the cross section** and the stress resultant is the **bending moment**.

Consider a plane that cuts through an arbitrary point in the beam at a location x . For a small strip across the face in the y - z -plane of thickness dy and width b , the **contribution to the total moment by the stress exerted on the strip is simply the total force times the moment arm**.

The **moment arm can be calculated** from any arbitrary point; here the most logical place is the origin of the coordinate system that we located at the neutral axis.

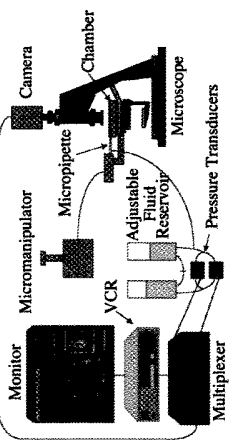


Aspirazione con micropipetta

The negative pressure can be applied in a variety of ways. One way is to apply the suction by mouth, this method provides a lot of control.

Another common way is to connect the micropipette to tubing that runs to a water-filled reservoir with controllable height. Decreasing the height of the fluid surface in the reservoir relative to the height of the fluid surface in the dish in which cells are cultured creates a suction pressure within the micropipette.

In theory, the minimum suction pressure that can be applied is determined by the minimum change in height of the fluid reservoir that can be achieved (typically ~ 0.01 Pa). In practice the resolution is worse (~ 1 Pa), owing to drift caused by water evaporating from the reservoir. The maximum pressure that can be applied is on the order of the atmospheric pressure, resulting in a wide range of forces (from ~ 10 pN to ~ 100 nN).



1. con la bocca
2. capillare

uno dei primi metodi utilizzati per studiare il comportamento delle cellule

Aspirazione con micropipetta e Dispositivi per stimolazione meccanica

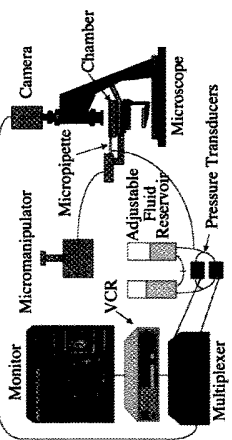


Aspirazione con micropipetta

The negative pressure can be applied in a variety of ways. One way is to apply the suction by mouth, this method provides a lot of control.

Another common way is to connect the micropipette to tubing that runs to a water-filled reservoir with controllable height. Decreasing the height of the fluid surface in the reservoir relative to the height of the fluid surface in the dish in which cells are cultured creates a suction pressure within the micropipette.

In theory, the minimum suction pressure that can be applied is determined by the minimum change in height of the fluid reservoir that can be achieved (typically ~ 0.01 Pa). In practice the resolution is worse (~ 1 Pa), owing to drift caused by water evaporating from the reservoir. The maximum pressure that can be applied is on the order of the atmospheric pressure, resulting in a wide range of forces (from ~ 10 pN to ~ 100 nN).



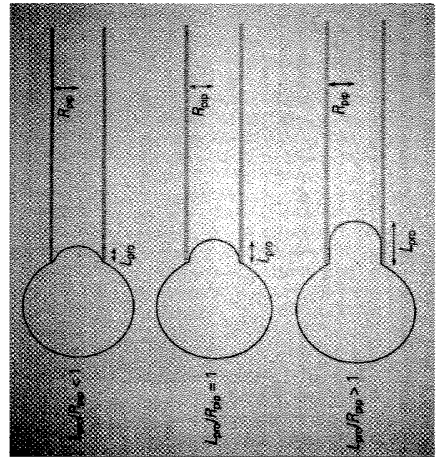
1. con la bocca
2. capillare



Aspirazione con micropipetta

Once the cell is drawn into the micropipette, the morphology of the cell relative to the pipette can be divided into 3 regimes:

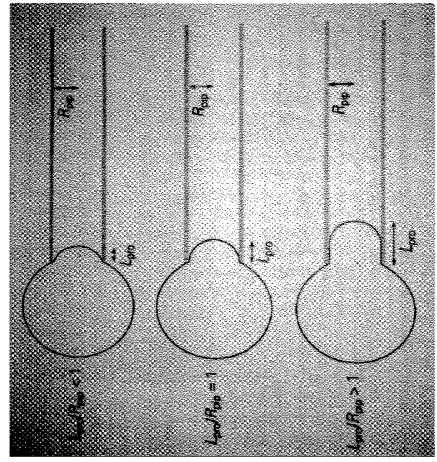
1. when the length of the protrusion of the cell into the pipette L_{pip} is less than the radius of the pipette R_{pip} ($L_{pip}/R_{pip} < 1$)
2. when the protrusion length is equal to the pipette radius ($L_{pip}/R_{pip} = 1$), and the protrusion is hemispherical
3. when the protrusion length is longer than the pipette radius ($L_{pip}/R_{pip} > 1$), and the protrusion is cylindrical with hemispherical cap (the radius of the hemispherical cap is R_{pip})



Aspirazione con micropipetta

Once the cell is drawn into the micropipette, the morphology of the cell relative to the pipette can be divided into 3 regimes:

1. when the length of the protrusion of the cell into the pipette L_{pip} is less than the radius of the pipette R_{pip} ($L_{pip}/R_{pip} < 1$)
2. when the protrusion length is equal to the pipette radius ($L_{pip}/R_{pip} = 1$), and the protrusion is hemispherical
3. when the protrusion length is longer than the pipette radius ($L_{pip}/R_{pip} > 1$), and the protrusion is cylindrical with hemispherical cap (the radius of the hemispherical cap is R_{pip})

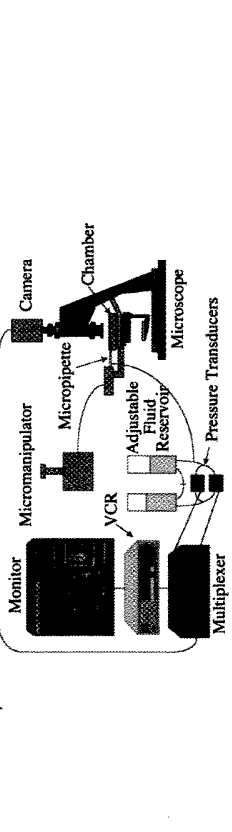


Aspirazione con micropipetta

Micropipette aspiration was one of the first methods used to examine cellular behavior and is responsible for some remarkably important and surprising insights into cellular behavior. Some of the earliest mechanical measurements of cell membranes were made using micropipette aspiration experiments. These measurements were based on the concept that cells were pouches with fluid interiors.

These experiments not only allow one to make measurements of cell membrane mechanical properties, but they also provide insight into the mechanical behavior of whole cells.

A micropipette is a rigid tube (usually glass) that tapers to a diameter of several μm at the tip (near the tip the diameter is constant). It is hollow all the way through its length and a suction (negative) pressure is applied to the interior (lumen). If the end is brought in proximity to a cell while suction is applied, a seal will form, and the cell will be drawn into the micropipette, forming a protrusion.

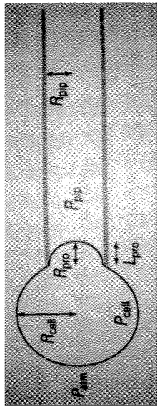




Aspirazione con micropipetta

9/...

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it



Combining the two equations, we obtain

$$P_{cem} - P_{pip} = \Delta P = 2\gamma \left(\frac{1}{R_{pro}} - \frac{1}{R_{cell}} \right)$$

which relates the difference between the pressure in the surroundings and in the pipette with the radius of the cell inside and outside of the pipette for a cell with a given surface tension.

We assume the surface tension is constant throughout the cell, even in the "crease" region where the cell contacts the micropipette and in the protrusion area.

Using the last equation, we can now easily measure surface tension. Once the cell is drawn into the micropipette such that the protrusion is hemispherical ($L_{pro} = R_{pip}$), then the radius of the protrusion equals the radius of the pipette ($R_{pro} = R_{pip}$), hence

$$\Delta P = 2\gamma \left(\frac{1}{R_{pip}} - \frac{1}{R_{cell}} \right)$$

The pressure ΔP is controlled by the user, and R_{pip} is also known. The cell radius R_{cell} can be measured optically under a microscope, allowing one to calculate the surface tension γ .



Aspirazione con micropipetta

11/...

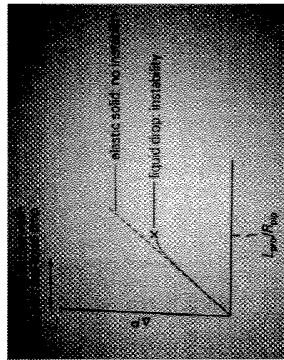
diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Some cells would "rush in" after applying any pressure greater than the critical pressure at which $L_{pro} = R_{pip}$. Examine what happens to the terms at the right-hand side of the equation

$$\Delta P = 2\gamma \left(\frac{1}{R_{pro}} - \frac{1}{R_{cell}} \right)$$

γ is constant for liquid drops, and approximately constant for neutrophils. R_{pro} will also remain constant, R_{cell} cannot increase (the volume remains constant). Therefore, if we increase ΔP (left-hand side) we cannot increase the right-hand side of the equation and the equilibrium cannot be satisfied, this produces an instability and the cell will rush within the pipette.

When researchers performed experiments on endothelial cells or chondrocytes, they found that they would not rush into the pipette since these cells do not behave like a liquid drop, but their mechanical behavior is more similar to an elastic solid.



Aspirazione con micropipetta

10/...

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Evans and Yeung performed this experiment using different micropipette diameters and found a surface tension of ~ 35 pN/μm in neutrophils. This tension was found to be independent of the pipette diameter.

For a liquid drop, the surface tension will remain constant as it is aspirated into a micropipette. In reality, cells do not behave like a perfect liquid drop. This is because the cell membrane area increases as it is aspirated, resulting in a slight increase in surface tension. The increase in tension per unit areal strain is given by what is called the areal expansion modulus (39 pN/μm). In the undeformed state, the resting surface tension resulted 24 pN/μm.

Why is this tension in the undeformed state important in neutrophils? Neutrophils circulate in the blood and therefore need to squeeze through small capillaries with diameters smaller than the cells themselves.

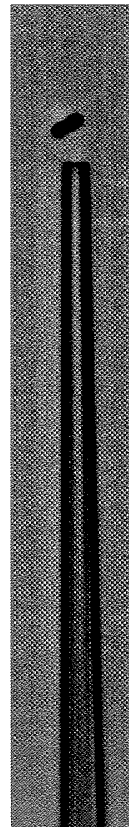
As neutrophils squeeze through capillaries, the shape of the cells transform from a sphere into a cylinder with hemispherical caps at both ends, with an increase in surface area but maintaining constant volume. This is possible since neutrophils contain many microscopic folds in their membrane, therefore their "apparent" surface area is much less than the actual surface area of the membrane. The folds allow the neutrophils to substantially increase their apparent surface area without actually increasing the surface area of the membrane.



Aspirazione con micropipetta

12/...

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it



<https://www.youtube.com/watch?v=A-Qg-Ty7ROo>



Dispositivi per stimolazione meccanica in vitro

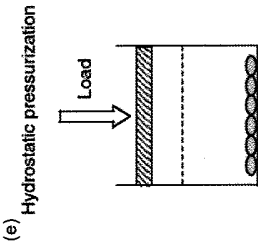
diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

19/...

PRESSURE/COMPRESSION

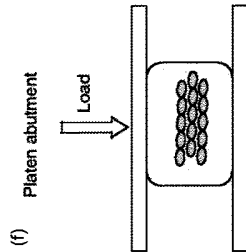
Hydrostatic pressurization is commonly used for investigating the effect of elevated pressure on cell functions (e). This approach is simple and can deliver static and cyclic loading.

Inherent problem: increase in the concentration of dissolved gases due to elevated pressure of the gas phase may affect cell functions.



An alternative is to use direct platen abutment (f). A 3D specimen (cells that are seeded in a matrix) is placed between two flat plates, the bottom plate remains stationary, whereas the top plate is pushed downward to deliver unconfined uniaxial compression (specimen can freely expand laterally) or confined compression, statically or cyclically.

Inherent problem: the loading is strongly dependent on the cell-matrix adhesion.



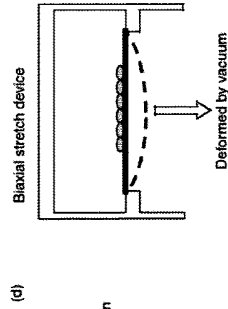
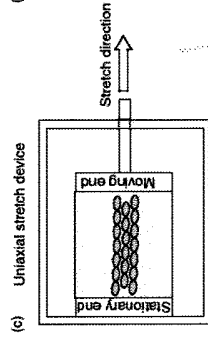
STRETCH

A common method for in vitro studies of stretch effects on cells involves culturing cells on a flexible substrate, such as a silicone membrane, and then stretching the membrane with a controlled strain magnitude, frequency, and duration.

Cells can be exposed to uniaxial (c) or biaxial stretch (d).

Inherent problems:

- the load delivered to cells is dependent on the state of adhesion between the cells and their substrate
- fluid shear stress is neglected, although often it is present concurrently with the imposed substrate deformation, due to coupled motion of the nutrient media



Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

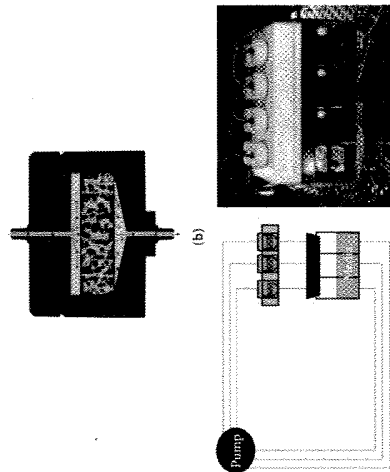


Dispositivi per stimolazione meccanica in vitro

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

20/...

BIOREATTORI PER STIMOLARE A COMPRESIONE



Sailon et al., 2009

C10 - 12 CarriGen



Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Biomeccanica Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



Dispositivi per stimolazione meccanica in vitro

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

17/...

BIOREATTORI PER STIMOLARE A TRAZIONE

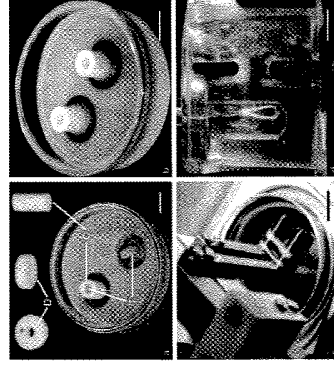


Figure 1. Experimental setup for EHT preparation, culture, and analysis of contractile function. a. Casting mold assembly. Silicone tubing (T) was glued to the surface of glass culture dishes. Silicone tubing was used to connect the dishes to the EHT cone tubing to function as removable spacers during casting mold preparation and EHT culture. b. EHT condensation around the central Teflon cylinder in casting molds. c. EHTs after transfer to the Petri dish. d. EHTs after transfer to the stretch apparatus to continue culture under unidirectional and cyclic stretch (10%, 2 Hz). e. EHT in a thermostated organ bath. Isometric force was measured in Tyrode's solution under pulse-field stimulation (37°C, 2 Hz, 5 ms, and 80 to 100 mV). Bars=10 mm.

Zimmermann et al., 2002



Dispositivi per stimolazione meccanica in vitro

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

18/...

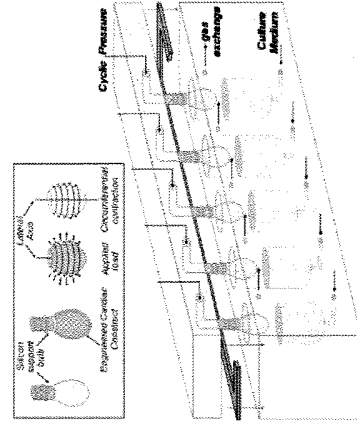


FIGURE 1. Strain stimulation bioreactor for the *in vitro* cultivation of engineered cardiac tissue. The bioreactor consists of a cylindrical chamber, a piston, and a gas exchange system. Cyclic pressure inflates the silicone bulb, causing applied load in the circumferential and radial directions (top panel).

Gonen-Wadmany et al., 2004

BIOPOLIMERI



2/39

Biofilaments

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

> The various biopolymers and biofilaments in the cell display bending resistances whose numerical values span six orders of magnitude: e.g.,

- highly flexible alkanes
- stiffer protein polymers such as F-actin,
- moderately rigid microtubules

> Viewed on micron length scales, these filaments may appear to be erratic, rambunctious chains or gently curved rods, and their *elastic properties may be dominated by entropic or energetic effects.*

> In selecting a formalism for interpreting the characteristics of cellular filaments, one can choose among several simple pictures of linear polymers, each picture emphasizing different aspects of the polymer.

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

filamenti caratterizzati da:
 - proprietà elastiche variabile da forte a debole
 - catene vicinate spesso o tanto



3/39

Modelling Flexible Rods

Different ways to model biopolymers (such as: DNA, Microtubule, actin, collagen etc...)

smoothly curving rod

wiggly segmented chain



There are links between their parameterizations.

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it



4/39

Modelling Flexible Rods

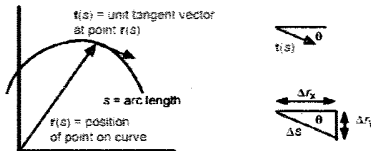
Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Rod as a continuous curve with no kinks or discontinuities, and ignore, for the time being, its cross-sectional shape and material composition.

Arc length and curvature

Each point on the curve corresponds to a position vector r , represented by the familiar Cartesian triplet (x, y, z) . It is often convenient to write r and other characteristics of the curve in a parametric representation as a function of the arc length s , say $r(s)$ or $[x(s), y(s), z(s)]$, where s follows along the contour of the curve, running from 0 at one end to the full contour length L_c at the other.

e.g., the equation $x^2 + y^2 = R^2$ of a circle of radius R lying in the xy plane is represented in the parametric approach by $x(s) = R\cos(s/R)$ and $y(s) = R\sin(s/R)$, where the arc length s is zero at $(x, y) = (R, 0)$.



Curvature: describe a line by positions $r(s)$ where arc length s runs from 0 to L_c , the contour length

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

• le catene non hanno buchi o discontinuità
 • definizione della curvatura con parametri continui

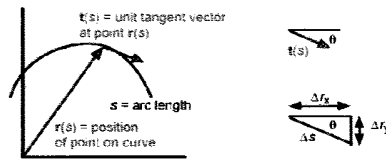


5/39

Modelling Flexible Rods

The **unit tangent vector** t characterizes the direction of the curve as it winds its way through space. For example, in two dimensions, t has (x, y) components $(\cos\theta, \sin\theta)$, where θ is the angle between t and the x -axis.

For a short section of arc Δs , over which the curve appears straight, the pair $(\cos\theta, \sin\theta)$ can be replaced by $(\Delta r_x/\Delta s, \Delta r_y/\Delta s)$



3D

- unit tangent vector t has components $(\Delta r_x/\Delta s, \Delta r_y/\Delta s, \Delta r_z/\Delta s) = (\partial r_x/\partial s, \partial r_y/\partial s, \partial r_z/\partial s)$ in the infinitesimal limit. Hence $t(s) = \partial r / \partial s$ (1)

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

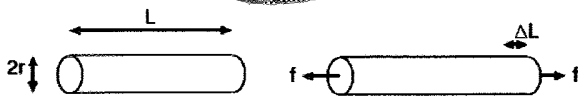


10/39

Stretching an Elastic Rod

- ✓ Suppose we have a rod of equilibrium length L and circular cross section, where the cross-section radius is r .
- ✓ We imagine that the material that the rod is homogeneous and elastic.
- ✓ Many materials are not elastic, e.g. water.
- ✓ However, dsDNA, actin and microtubules are all elastic objects.
- ✓ We stretch (or compress) the rod by force f . We say that the *stress or force per area applied to the interior of the rod* is

$$\sigma = f / (\pi r^2)$$



diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale -- A.A. 2012-13



11/39

Stretching an Elastic Rod

- ✓ The starting point for all of elasticity theory is doing this experiment and finding that the fractional change in length of the rod (the *elongational strain*) is proportional to the applied stress, for small deformations:

$$\frac{\Delta L}{L} = \frac{\sigma}{Y} + O(\sigma^2)$$

- ✓ The proportionality constant Y has units of stress (force/area = pressure = energy/volume; MKS units are $N/m^2 = Pa = J/m^3$), and is called the *Young modulus, or sometimes the elongational modulus*.
- ✓ The Young modulus describes the stretchability of an elastic material, in an *intensive (volume- and shape-independent) way*.
- ✓ A biophysical interpretation of Y is as the stress (force per area) at which our rod stretched to double its equilibrium length.
- ✓ Since most materials have nonlinear elasticity which destroys the linear relation between stress and strain, a slightly better thing to think is that $0.01 Y$ is the stress at which a rod stretches by 1%.

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale -- A.A. 2012-13



12/39

Some examples

Material	Young modulus
Diamond	$1.2 \cdot 10^{12}$
Steel	$2 \cdot 10^{11}$
Glass	10^{11}
Bone	$2 \cdot 10^{11}$
dry cellulose	$8 \cdot 10^{10}$
bone (tension)	$1.6 \cdot 10^{10}$
Wood (along grain)	$1.4 \cdot 10^{10}$
Collagen	$1-2 \cdot 10^9$
Folded protein	10^9
Plexiglass	$4 \cdot 10^8$
dsDNA	3×10^8
Rubber	$7 \cdot 10^6$
Polymer gel	10^4
Chromosome folded	300

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale -- A.A. 2012-13



13/39

Biophysical Interpretation of Youngs Modulus

□ So, folded biopolymers are like little pieces of hard plastic. This is no surprise since both are held together by non-covalent bonds of about the same strength and density.

□ This leads to a way to think about Y in terms of the cohesive energy per volume holding a material together.

□ Biopolymers are held together by interactions each of which are a few $k_B T$ ($1 k_B T = 4 \cdot 10^{-21} J$ at $T=300K$) in strength, with a density of an interaction for every 10 or so cubic angstroms (the volume of a nucleotide or amino acid). So we could guess:

$$Y = \frac{4 \cdot 10^{-21} \cdot 1}{10 \cdot 10^{-30} m^3} = 4 \cdot 10^8 Pa \quad \text{Close to dsDNA or folded protein } Y$$

This kind of thinking works for other materials too: crystalline metals and glasses are held together by covalent bonds of eV energies, at a density of a few bonds per cubic angstrom. So we can guess the typical modulus of a covalently bonded crystal:

$$Y = 10^{-19} J / 10^{-30} m^3 = 10^{11} Pa \quad 1 \text{ eV} \sim 10^{-19} J$$

which is again not too far from the truth.

Bio

diana.massai@polito.it, marco.denu@polito.it



20/39

Bending Elasticity of a Thin Rod

The deformation energy per unit length of the arc

$$E_{\text{bend}}/L_c = \kappa_f / 2R_c^2 = YI / 2R_c^2 \quad \kappa_f = \text{flexural rigidity; units of [energy]}\cdot\text{[length]}$$

Alternatively, then, the energy per unit length could be written as

$$E_{\text{bend}}/L_c = \kappa_f / 2R_c^2 = YI / 2R_c^2 = \kappa_f (\partial v / \partial s)^2 / 2$$

Further, there is no need for the curvature to be constant along the length of the filament

and the general expression for the total energy becomes

$$E_{\text{bend}} = (\kappa_f / 2) \int_0^{L_c} (\partial v / \partial s)^2 ds \quad \text{(Kratky-Porod model)} \quad (8)$$

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it



21/39

Bending Elasticity of a Thin Rod

$$k_f = YI \quad I \rightarrow \text{second moment of area} \\ \text{Is not the standard inertia moment}$$

The moment of inertia of the cross section is defined somewhat similarly to the moment of inertia of the mass: it is an area-weighted integral of the squared distance from an axis

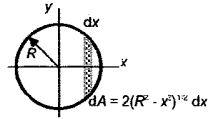
$$J_y = \int x^2 dA \quad (2.10)$$

where the xy plane defined by the integration axes is perpendicular to the length of the rod, and dA is an element of surface area in that plane. For example, if the rod is a cylinder of radius R , the cross section has the shape of a solid disk with an area element dA at position x given by $dA = 2(R^2 - x^2)^{1/2} dx$, as shown in Fig. 2.9. Hence,

$$J_y = 4 \int_0^R x^2 (R^2 - x^2)^{1/2} dx = \pi R^4 / 4 \quad \text{(solid cylinder)} \quad (2.11)$$

Should the rod have a hollow core of radius R_c , like a microtubule, then the moment of inertia in Eq. (2.11) would be reduced by the moment of inertia $\pi R_c^4 / 4$ of the core:

$$J_y = \pi(R^4 - R_c^4) / 4 \quad \text{(hollow cylinder)} \quad (2.12)$$



diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it



22/39

Second moment of area for some cross section

Rectangular cross section

$$I_x = \frac{bh^3}{12}$$

- b = width (x -dimension),
- h = height (y -dimension)

$$I_y = \frac{hb^3}{12}$$

- b = width (x -dimension),
- h = height (y -dimension)

Circular cross section

$$I_0 = \frac{\pi r^4}{4} = \frac{\pi d^4}{64}$$

- r = radius,
- d = diameter

Hollow Cylindrical Cross Section

$$I_0 = \frac{\pi}{64} (D_o^4 - D_i^4)$$

- D_o = Outside Diameter
- D_i = Inside Diameter

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it



23/39

Fluctuations and persistence length

- > At zero temperature, a filament adopts a shape that minimizes its energy, which corresponds to a straight rod
- > At non-zero temperature, the filament exchanges energy with its environment, permitting the shape to fluctuate
- > According to the bending energy of a filament rises as its shape becomes more contorted and the local curvature along the filament grows; hence, the bending energy of the configurations increases from left to right



- > Now, the probability $P(E)$ of the filament being found in a specific configuration with energy E is proportional to the Boltzmann factor $\exp(-\beta E)$, where is the inverse temperature $\beta = 1/kBT$

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

a zero grad. il filamento minimizza l'energia → allungato
 a T > 0 il filamento inizia ad oscillare
 All'aumentare di T aumenta il contorcimento del filamento



24/39

The Boltzmann Factor

The Boltzmann factor tells us that the larger is the energy required to deform the filament into a specific shape, the lower is the probability that the filament will have that shape, all other things being equal.

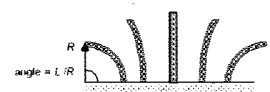
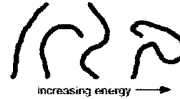
Thus, a filament will adopt configurations with small average curvature if their flexural rigidity is high or the temperature is low; their shape will resemble sections of circles, becoming contorted only at high temperatures.



25/39

Fluctuations and persistence length

Let us assume that our filament can sustain only gentle curves and has constant curvature; neither is our filament so long that it closes upon itself.



arc s of a circle with radius R_c : $\theta = s / R_c$

(5) says this configuration has an energy:

$$E_{\text{arc}} = \kappa_f s / 2R_c^2 = \kappa_f \theta^2 / 2s \quad (9)$$

probability $\chi(E)$ of the filament being found with energy E is proportional to the Boltzmann factor $\exp(-\beta E)$

for arcs of circles, the probability of each configuration is equal to $\chi(E_{\text{arc}})$, and

Mean square value of θ

$$\langle \theta^2 \rangle = \int \theta^2 \chi(E_{\text{arc}}) d\Omega / \int \chi(E_{\text{arc}}) d\Omega$$

- fixed end of the filament defines the z -axis, free end is described by the angles θ and ϕ ; integral over the solid angle $d\Omega = \sin\theta d\theta d\phi$ (in 3D)

diana.massai@polito.it, marco.deri@polito.it

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

Bioingegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13



36/39

Fluctuations and persistence length

A. 2D

Tessur

a Cell

Bioin

- E_{arc} is independent of ϕ , so the azimuthal integral cancels out, leaving

$$\langle \theta^2 \rangle = \int \theta^2 \exp(-\beta E_{arc}) \sin \theta \, d\theta / \int \exp(-\beta E_{arc}) \sin \theta \, d\theta$$

- using the small angle approximation $\sin \theta \sim \theta$. Hypothesis of stiff filament

$$\langle \theta^2 \rangle = \int \theta^3 \exp(-[\beta \kappa_f / 2s] \theta^2) \, d\theta / \int \theta \exp(-[\beta \kappa_f / 2s] \theta^2) \, d\theta = (2s / \beta \kappa_f) \int x^3 \exp(-x^2) \, dx / \int x \exp(-x^2) \, dx,$$

where $x = (\beta \kappa_f / 2s)^{1/2} \theta$

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it



37/39

Fluctuations and persistence length

Infinite configurations for small oscillations

Biongegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

- in the small oscillation approximation, the upper limits of the integrals in (12) can be taken to be infinite, whence

$$\int x^3 \exp(-x^2) \, dx = \int x \exp(-x^2) \, dx = 1/2$$

$$\langle \theta^2 \rangle = 2s / \beta \kappa_f \quad (\text{small oscillations in 3D}). \quad (13)$$

- combination $\beta \kappa_f$ is defined as the persistence length ξ_p of the filament:

$$\xi_p = \beta \kappa_f \quad (\text{units of [length]}) \quad (14)$$

- Note that the persistence length decreases with increasing temperature.

Note:

Si va a infinito perchè tanto l'esponenziale butta giù i termini per x che tende a infinito!!
Gli integrali sono particolari vedi a slide 39!!

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it



38/39

Fluctuations and persistence length

1. Filament in 2D

For the fluctuating filament problem, if the tip is confined to a plane, the angular integral in the calculation of $\langle \theta^2 \rangle$ involves $d\theta$, not the solid angle $d\Omega$. Thus,

$$\langle \theta^2 \rangle = (2s / \beta \kappa_f) \int x^2 \exp(-x^2) \, dx / \int \exp(-x^2) \, dx$$

where $x = (\beta \kappa_f / 2s)^{1/2} \theta$

Integrated from 0 to ∞ , the integrals are

$$\int x^2 \exp(-x^2) \, dx = \sqrt{\pi} / 4 \quad \int \exp(-x^2) \, dx = \sqrt{\pi} / 2$$

$$\langle \theta^2 \rangle = (2s / \beta \kappa_f) \cdot 1/2 = s / \beta \kappa_f$$

This is half of $\langle \theta^2 \rangle$ in 3D, meaning that the persistence length is

$$\xi_p = 2\beta \kappa_f \quad (2 \text{ dimensions}).$$

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

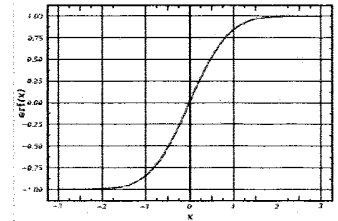


39/39

Just to remember...

Biongegneria Cellulare e Tessutale - A.A. 2012-13

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} \, dt.$$



$$\int x e^{-cx^2} \, dx = -\frac{1}{2c} e^{-cx^2}$$

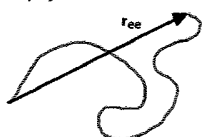
$$\int_0^\infty x^n e^{-ax^2} \, dx = \begin{cases} \frac{1}{2} \Gamma(\frac{n+1}{2}) / a^{\frac{n+1}{2}} & (n > -1, a > 0) \\ \frac{(2k-1)!!}{2^{k+1} a^k} \sqrt{\frac{\pi}{a}} & (n = 2k, k \text{ integer}, a > 0) \\ \frac{k!}{2a^{k+1}} & (n = 2k + 1, k \text{ integer}, a > 0) \end{cases}$$

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito.it

8/46

Ideal chains and flexible filament

A flexible filament or polymer has an end-to-end displacement vector r_{ee} that is less than the contour length L_c of the polymer.



cerca di usare la distanza tra i 2 filamenti

$r(s)$ = position at arc length s , so that

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \langle [r(L_c) - r(0)]^2 \rangle \quad \langle \dots \rangle = \text{ensemble average} \quad (1)$$

cast (1) into an integral using the unit tangent vector $t(s) = \partial r / \partial s$

$$r(s) = r(0) + \int_0^s du t(u), \quad (2)$$

then

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \int_0^{L_c} \int_0^{L_c} du dv \langle t(u) \cdot t(v) \rangle. \quad (3)$$

replace the correlation function $\langle t(u) \cdot t(v) \rangle$ by $\exp(-s/\xi_p)$

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \int_0^{L_c} \int_0^{L_c} du dv \exp(-|u-v|/\xi_p). \quad (4)$$

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito

9/46

Ideal chains and flexible filament

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \int_0^{L_c} \int_0^{L_c} du dv \exp(-|u-v|/\xi_p). \quad (4)$$

the argument of the exponential must be negative: break the integral into 2 pieces where one integration variable is kept less than the other:

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = 2 \int_0^{L_c} du \int_0^u dv \exp(-[u-v]/\xi_p). \quad (5)$$

solve this integral using a few changes of variables

$$\begin{aligned} \int_0^{L_c} du \exp(-u/\xi_p) \int_0^u dv \exp(v/\xi_p) &= 2 \int_0^{L_c} du \exp(-u/\xi_p) \cdot \xi_p \cdot [\exp(u/\xi_p) - 1] \\ &= 2\xi_p^2 \int_0^{L_c/\xi_p} dw [1 - \exp(-w)]. \end{aligned} \quad (6)$$

Notes:

- The two pieces of the integral are chosen identical that's the reason of the coefficient equal to 2!
- The variable w is equal to u/ξ_p

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito

10/46

Ideal chains and flexible filament

- evaluating the last integral gives

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = 2\xi_p^2 \{ (L_c/\xi_p - 0) + [\exp(-L_c/\xi_p) - 1] \}. \quad (7)$$

or

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = 2\xi_p L_c - 2\xi_p^2 [1 - \exp(-L_c/\xi_p)] \quad (7)$$

- rod-like limit** $\xi_p \gg L_c$:

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = 2\xi_p L_c - 2\xi_p^2 [1 - (1 - (L_c/\xi_p) + (L_c/\xi_p)^2/2 \dots)] = 2\xi_p L_c - 2\xi_p^2 L_c + 2L_c^2/2$$

or $\langle r_{ee}^2 \rangle^{1/2} = L_c$

- spaghetti-like limit** $\xi_p \ll L_c$: the exponential in (7) vanishes and

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = 2\xi_p L_c - 2\xi_p^2 = 2\xi_p L_c \quad (8)$$

over long distances compared to the persistence length, $\langle r_{ee}^2 \rangle^{1/2}$ grows like the square root of the contour length, **not as the contour length itself (as in the case of the rod-like limit)**. In other words, long polymers appear convoluted, and their average linear dimension increases much

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito


11/46

Ideal chains and filament: Discrete representation

Relating the geometry of a continuous biopolymer to its monomeric constituents

Discrete representation: polymer is a set of bond vectors b_i with the same magnitude and direction as the monomers **freely jointed chain**

- construct r_{ee} from all N vectors along the chain

$$r_{ee} = \sum_{i=1}^N b_i \quad (9)$$


- take the ensemble average over all chains with the same N

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \sum_i \sum_j \langle b_i \cdot b_j \rangle. \quad (10)$$

- now assume that all b_i have the same length b . Break the sum up into 2 parts

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \sum_{i=j} \langle b_i \cdot b_j \rangle + \sum_{i \neq j} \langle b_i \cdot b_j \rangle \quad (11)$$

the first summation has N terms, all of the form $b_i \cdot b_i = b^2$. the second term is a sum over randomly oriented vectors, with any b_i being uncorrelated with respect to any other b_j . Thus

$$\sum_{i \neq j} \langle b_i \cdot b_j \rangle = 0$$

- add two contributions in (11) to give

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = Nb^2 \quad (\text{random chain}) \quad (12)$$

polito

12/46

Ideal chains and filament: Discrete representation

or, since $L_c = Nb$

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = L_c b \quad (13)$$

- the form of Eq. (13) is the same as Eq. (8), and we can identify

$$\xi_p = b/2 \quad (\text{random chain}) \quad (14)$$

- in Eqs. (8) and (13), the power law behavior

$$\langle r_{ee}^2 \rangle^{1/2} \sim N^{1/2} \quad \text{is called ideal scaling}$$

Note that the determination of the ideal scaling exponent does not depend on the dimension of space in which the chain resides: random chains in two dimensions (i.e., confined to a plane) or three dimensions both exhibit the same scaling behaviour. Even if the bond geometry is somewhat restricted, ideal scaling still applies if the chains are permitted to intersect themselves.

Self avoiding filaments si comporta con questa formula non bisogna fare troppi conti!

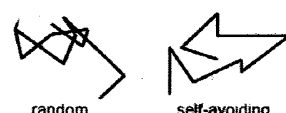
diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito

13/46

Other chain geometries

Self-avoiding chains

- physical systems have an excluded volume that enforces self-avoidance of the chain



- example: a self-avoiding chain in one dimension cannot reverse on itself from one step to the next, so that $r_{ee} \sim L_c^3$ (vs $\langle r_{ee}^2 \rangle^{1/2} \sim L_c^{1/2}$ for all ideal chains)

Similar conclusion can be drawn for chains in 2 or 3 dimensions

Flory shown that the scaling exponent for self-avoiding linear chains should be in the form

$$N^{v_{FL}} \quad v_{FL} = 3/(2+d)$$

$d \rightarrow$ embedding dimension

diana.massai@polito.it, marco.deriu@polito