

Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare  
Ciclo XIX

Relazione IV°anno

TITOLO:

“Effetti dello stress meccanico  
sulla morfologia delle adesioni focali”

Candidato: Francesca Boccafoschi

*Tutor:* Prof. Mario Cannas

# Sezione 1

## Risultati Scientifici

### **Introduzione**

Le cellule che costituiscono i tessuti sono sottoposte a numerose interazioni fisiche con l'ambiente circostante e sono dunque esposte a forze meccaniche quali lo "shear stress", la compressione e lo stiramento, a seconda del tessuto interessato. La "meccanotrasduzione", nota come il processo di conversione dagli stimoli meccanici ai cambiamenti biochimici intracellulari, pare essere un punto cruciale per lo sviluppo e il funzionamento dei tessuti; inoltre, risultano in letteratura sempre maggiori evidenze che suggeriscono che gli stimoli meccanici regolano il comportamento cellulare in maniera simile agli stimoli biochimici, quali ad esempio i fattori di crescita [Geiger et al., 2002]. Sono riportati in letteratura vari studi riguardanti il comportamento cellulare in presenza di variazioni degli stress fisiopatologici [Adams et al., 2006; Reeves et al., 2006; Lehoux et al., 2006; Iatridis et al., 2006; Wang et al., 2006]. E' noto che il citoscheletro ed altri elementi strutturali hanno un ruolo ben definito nella meccanotrasduzione, essendo capaci di trasmettere e modulare gli stimoli meccanici tramite i siti di adesione focale, le giunzioni cellula-cellula e le matrici extracellulari-cellula [Yoshigi et al., 2005; Cattaruzza et al., 2004; Shikata et al., 2005]. Infatti, gli stress meccanici stimolano l'attivazione conformazionale delle integrine e migliorano l'adesione cellulare alla matrice extracellulare che durante le stimolazioni meccaniche spostano le glicoproteine che interagiscono con le integrine [Jalali et al., 2001]. Il dominio citoplasmatico delle integrine è funzionalmente legato a diverse proteine intracellulari che costituiscono il citoscheletro e a numerose chinasi, formando un'interfaccia dei segnali tra matrice extracellulare e la cellula; il network proteinico si trova nella faccia citoplasmatica dei siti di adesione. Fino ad oggi, più di 50 proteine sono riconosciute per essere associate con i contatti focali ed includono proteine citoscheletriche (vinculina, tensina, paxillina,  $\alpha$ -actinina e talina), tirosine chinasi (Src, FAK, PYK2), serina/treonina chinasi (ILK, PKC), modulatori di piccole GTPasi (ASAP1, Graf), tirosina fosfatasi (SHP-2) e altri enzimi (PI3K) [Zamir et al., 2001].

La Vinculina si localizza nella faccia citoplasmatica dei siti di adesione cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare ed è necessaria per un'adesione stabile. La microscopia elettronica ha evidenziato che la proteina vinculina consiste di una testa globulare, che contiene i siti di legame per  $\alpha$ -actinina, talina e per la coda della proteina stessa che ha la capacità di legare non solo la testa della proteina attraverso un dominio ricco in prolina ma anche paxillina, f-actina, fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) [Milam et al, 1985]. La transizione da una conformazione chiusa ad

una aperta è indotta dal legame del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> con la coda della proteina. Dunque, in seguito all'attivazione tramite PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> la vinculina sembra facilitare l'assemblaggio dei contatti focali tramite il crosslinking e il reclutamento delle varie proteine coinvolte nell'adesione [Zamir et al., 2001]. Diversi studi sottolineano come, tramite il complesso proteico delle adesioni focali, il comportamento cellulare possa essere modificato dallo stress meccanico applicato. La prima evidenza è che uno stiramento lineare del substrato di adesione allinea le cellule prevalentemente in direzione perpendicolare allo stress e tale orientamento dipende dall'ordine di grandezza della deformazione [Wang et al., 2000; Shirinsky et al., 1989; Neidlinger-Wilke et al., 2002; Henshaw et al., 2006]. Le cellule sottoposte a deformazione riorganizzano l'actina citoscheletrica e allineano il proprio asse maggiore nella direzione in cui la deformazione del substrato risulta minima [Takemasa et al., 1998]. Inoltre, a livello molecolare, le proteine coinvolte nella distensione cellulare, nella morfogenesi, nella proliferazione, nell'apoptosi e nella migrazione vengono alterate da un ambiente dinamico [Reusch et al., 1997; Iwasaki et al., 2000; Lan et al., 1994; Mayr et al., 2000; Asanuma et al., 2003; Dimmeler et al., 1996; Cornelissen et al., 2004].

### **Scopo del lavoro**

In questo studio sono state confrontate due diverse deformazioni del substrato, ciclica e statica, al fine di evidenziarne gli effetti sull'orientamento cellulare e sulla morfologia e l'espressione dei contatti focali. Tenendo in considerazione il fatto che la vinculina gioca un ruolo fondamentale nell'assemblaggio e nell'attivazione dei contatti focali, legandosi a diverse proteine coinvolte nella placca di adesione e permettendo la connessione fra queste e l'f-actina citoscheletrica, abbiamo studiato il riarrangiamento della vinculina in seguito alla deformazione del substrato. Sono state eseguite delle analisi morfologiche e morfometriche sui contatti focali di fibroblasti in ambiente statico e dinamico (ciclico e fisso) considerando la presenza e la localizzazione della vinculina lungo i filamenti di actina usando tecniche di microscopia a fluorescenza e quantificazioni morfometriche.

I risultati, supportati anche da analisi in western blot e RT-PCR, evidenziano come lo stress meccanico indotto da uno stiramento del substrato ha un ruolo fondamentale nell'orientamento cellulare, nella maturazione e nella morfologia dei contatti focali, ma non nella sintesi e nell'espressione della proteina vinculina.

## **Materiali e Metodi**

### *Materiali*

Fogli di silicone dello spessore di 0,1mm sono stati usati come substrato deformabile (Specialty Manufacturing Inc. Saginaw, MI, USA). Il silicone è stato sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 121°C e trattato con fibronectina (10µg/ml Sigma, Italia) per un'ora a temperatura ambiente prima della semina cellulare.

### *Colture cellulari*

E' stata utilizzata la linea cellulare di fibroblasti MRC5 (ATCC CRL 171) di derivazione polmonare umana ad una concentrazione di  $15 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>. Le cellule sono state coltivate in DMEM arricchito con 10% di siero bovino fetale, glutammina (2mM), penicillina (100U/ml) e streptomycina (100µg/ml) (Euroclone, Italy). Le cellule seminate su silicone pretrattato sono state mantenute a 37°C in atmosfera umida con 5% CO<sub>2</sub> in condizioni statiche per 24h prima di applicare lo deformazione meccanica al substrato.

### *Stress meccanici*

Nel seguente lavoro è stato utilizzato lo strumento Instron 5564 (Instron Corporation, Canton, MA, USA). Lo strumento comprende: una console per il controllo elettronico dei parametri impostati, una cella di carico (limite 2,5N in tensione), un braccio meccanico per la deformazione del substrato. I campioni sono stati immersi in una camera per colture verticali in presenza di terreno di coltura mantenuto a 37°C in un bagnetto termostato. Il substrato è stato deformato al 2% in lunghezza per 3 ore. La deformazione è stata applicata in maniera ciclica (2% 1Hz) o statica (2% fisso).

### *Orientamento cellulare*

Per valutare la percentuale di cellule orientate sul controllo e sui campioni in seguito all'applicazione dello stress meccanico, le cellule sono state fissate con formaldeide al 3,7% per 30 minuti e colorate per 10 con blu di toluidina 0,01% in acqua demonizzata pH8. Sono stati acquisiti sette campi scelti random per ogni campione e le misurazioni per ogni condizione di stress applicato sono state ripetute in triplicato (n=21). Una griglia con diversi angoli di orientamento (0-30°; 30-60° and 60-90° rispetto alla direzione dello stiramento) è stata applicata su ogni immagine acquisita

e l'orientamento cellulare è stato misurato e riportato in grafico come percentuale di cellule orientate per ognuno dei tre angoli considerati.

#### *Microscopia a fluorescenza*

Al fine di valutare l'espressione e la localizzazione della proteina vinculina, le cellule sono state fissate in formaldeide 3,7% per 30 minuti a 4°C e poi marcate con anticorpo (1:300 in PBS, Oncogene, Italia) seguito da un'incubazione con anticorpo secondario coniugato Texas-red (1:500 in PBS, Santa Cruz, Italia). Per la colorazione dei microtubuli le cellule sono state incubate con un anticorpo anti-tubulina (1:100 in PBS, Sigma, Italia) seguito da un anticorpo secondario coniugato con fluoresceina (1:500 in PBS, Santa Cruz, Italia). I nuclei sono stati evidenziati con la colorazione DAPI. I contatti focali vinculina-positivi sono stati osservati al microscopio a fluorescenza (Leica, DM 2500) all'ingrandimento 40x. I contatti focali sono stati esaminati quantitativamente (10 immagine/campione) in esperimenti condotti in triplicato (n=30). Il sistema di analisi è composto da un microscopio a fluorescenza connesso ad un computer provvisto di un software per l'analisi d'immagine (Leica Q-Win) calibrato per l'ingrandimento 40x. Vari parametri incluso il numero di contatti focali per cellula, la lunghezza media e l'area media delle aree di adesione vinculina-positiva sono state misurate. I risultati ottenuti dalle cellule di controllo coltivate in condizioni statiche sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle cellule coltivate in ambiente dinamico in deformazione ciclica (2% 1Hz 3h) o fissa (2% 3h).

#### *Western blot*

Per quantificare l'espressione totale della vinculina, sono state eseguite delle analisi di western blot. Le cellule sono state lisate in RIPA (25mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% sodium deoxycolate, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>3</sub>, 0,1% SDS, 50mM sodium fluoride, 1% Triton, 0,5M EDTA, 10µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 1µg/ml pepstatin, 1mM PMSF) per 30 minuti in ghiaccio. La concentrazione delle proteine totali è stata determinata con il saggio dell'acido bicinconinico (Pierce, Rockford, IL). 10µg di proteine totale sono stati utilizzati per l'elettroforesi in SDS-PAGE (7,5% di acrilammide) e trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Le proteine trasferite sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente in 5% latte liofilizzato in PBS, pH 7.4, e incubate per 12 ore a 4°C con anticorpo anti-vinculina (1:500 in PBS Calbiochem, Darmstadt, Germania). Dopo tre lavaggi in PBS 0,1% Tween 20, le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpo secondario coniugato con perossidasi (1:2000 in PBS Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Le bande sono state visualizzate tramite rivelazione in ECL e l'utilizzo della strumentazione VersaDoc (BioRad, Italia). I risultati ottenuti con l'anticorpo antivinculina sono stati normalizzati reincubando le membrane

con anticorpo antitubulina e eseguendo la densitometria sulle bande ottenute con il software QuantityOne (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

#### *RT-PCR*

L'RNA totale è stato estratto dai fibroblasti e misurato con RediPlate™ 96 RiboGreen® RNA Quantitation Kit (Molecular Probes Inc, Eugene, OR). 1 µg di RNA è stato retrotrascritto in cDNA (Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit (Sigma)), e amplificato in 50 µl con la reazione PCR. I prodotti della PCR sono stati separati su bgel di agarosio e i frammenti ottenuti (360 pb per la β-actina and 125 pb per la vinculin) sono stati acquisiti tramite lo strumento Bio-Rad Gel Doc1000 e la densitometria è stata eseguita tramite in software Quantity One (BioRad).

#### *Analisi statistiche*

Il t-test di Bonferroni è stato applicato per valutare le differenze nell'orientamento cellulare, il numero, la lunghezza e l'area delle adesioni focali vinculina-positive e i risultati del western blot e della RT-PCR. Le differenze sono state considerate statisticamente significative quando  $p < 0.05$ .

## **Risultati**

#### *Quantificazione dell'orientamento cellulare*

Le cellule non stressate meccanicamente nel controllo hanno una distribuzione casuale, senza differenze significative tra le percentuali delle cellule allineate nei tre angoli di orientamento. Le percentuali aumentano statisticamente nel range (60-90°) nei risultati ottenuti sui substrati stressati rispetto al controllo. Le cellule sottoposte ai due differenti tipi di stress (2% ciclico a 1Hz e 2% fisso) mostrano un comportamento simile, con circa il 60% di cellule allineate perpendicolarmente alla direzione dello stress applicato, insieme ad una riduzione significativa della percentuale di cellule allineate nei range 0-30° e 30-60°. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra le cellule coltivate su silicone deformato in maniera ciclica o fissa. (Figura 1)

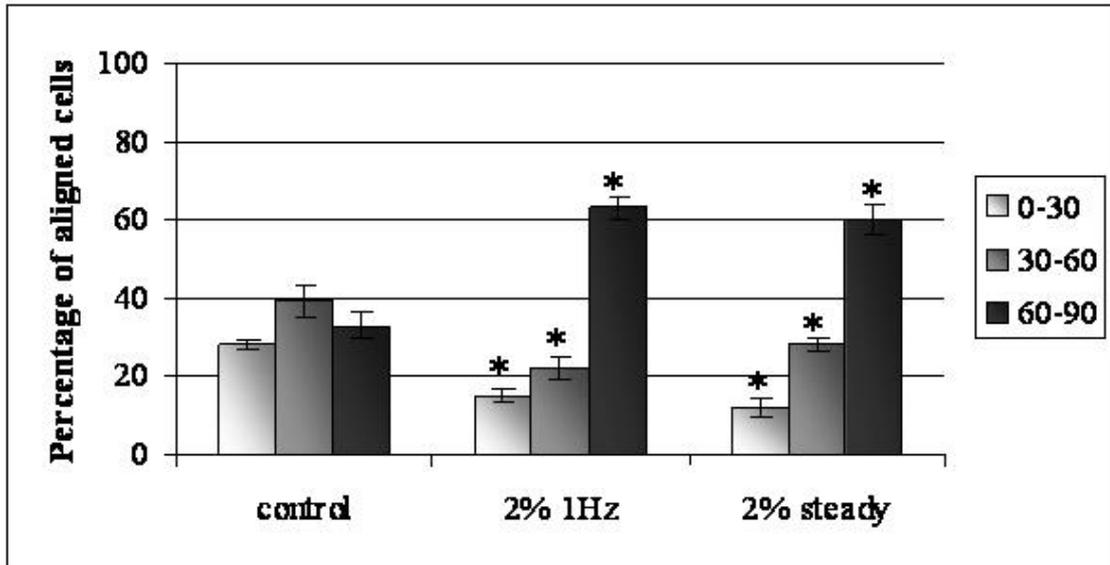


Figure 1

### *Microscopia a fluorescenza*

La figura 2A è rappresentativa delle immagini a fluorescenza ottenute. Le adesioni focali vinculina-positiva presenti sulla membrana delle cellule di controllo hanno una forma pressoché tondeggianti e sono distribuite in punti definiti mentre nelle cellule sottoposte a stress meccanico hanno una forma allungata e sono distribuite prevalentemente lungo la membrana cellulare seguendo la direzioni di orientamento delle cellule. La morfologia dei contatti focali ottenuti nei due tipi di stress meccanico applicato sono estremamente confrontabili.

I grafici in Figura 2B-C-D mostrano i dati morfometrici ottenuti dai contatti focali vinculina-positivi osservati al microscopio a fluorescenza. La Figura 2B riporta il numero di contatti focali per cellula. Quando le cellule sono sottoposte a stress meccanico il numero di contatti focali per cellula è statisticamente più alto rispetto al controllo. Il controllo ha una media di  $7 \pm 3$  siti di adesione vinculina-positivi per cellula; il numero aumenta nel caso dello stress meccanico ciclico (2% 1Hz) e fisso (2%) raggiungendo una media di  $10 \pm 4$  e di  $12 \pm 4$  rispettivamente. I risultati ottenuti in entrambe le stimolazioni meccaniche non sono statisticamente differenti.

La Figura 2C mostra i risultati riguardanti la lunghezza dei siti di adesione vinculina-positivi ottenuti tramite misurazioni morfometriche. I siti di adesione sono più lunghi e i risultati hanno evidenza statistica nel caso in cui venga applicato alle cellule una deformazione del substrato sia di tipo ciclico sia fisso. La lunghezza dei siti di adesione nel controllo ha una media di  $3,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$  mentre la deformazione meccanica causa un profondo cambiamento con una media di  $7,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$  e di  $8,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$  in presenza di stress ciclico e fisso rispettivamente.

La Figura 2D evidenzia che lo stress meccanico influenza anche l'area dei contatti focali. Le misure morfometriche delle aree dei contatti focali vinculina-positivi aumentano in valore in presenza di entrambi i tipi di deformazione del substrato.

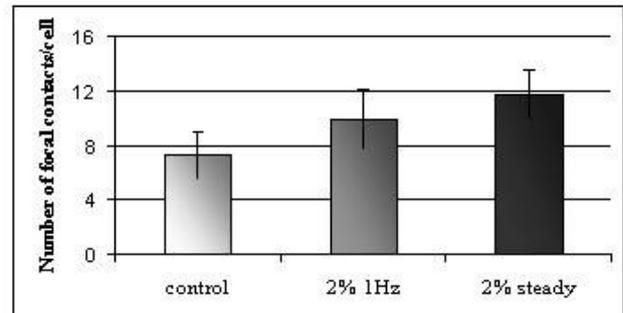
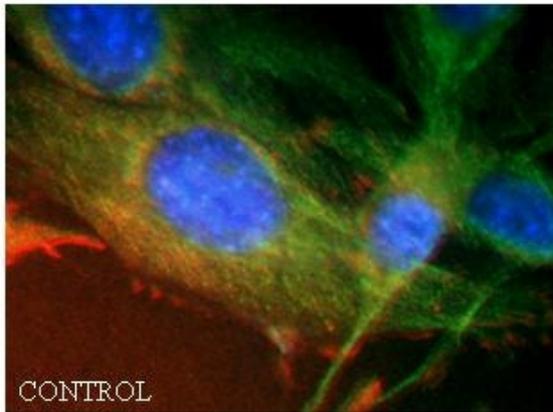


Figure 2B

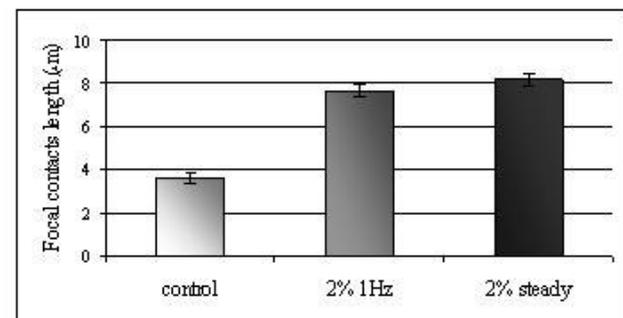
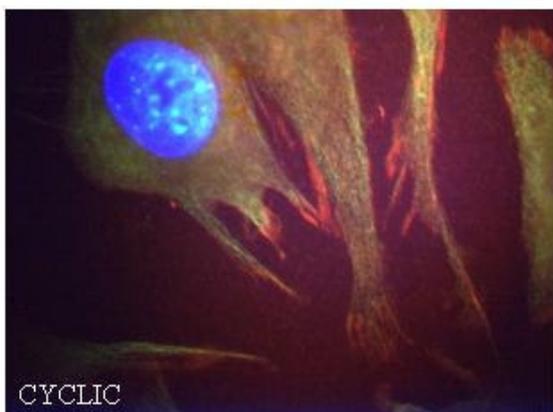


Figure 2C

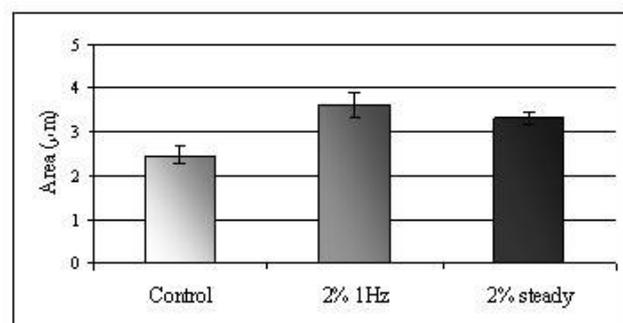
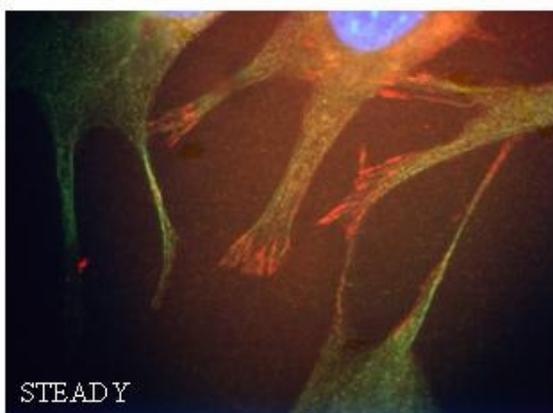


Figure 2D

Figure 2A

### Western blot e RT-PCR

Al fine di rifiutare l'ipotesi che le diverse morfologie dei contatti focali fosse dovuta ad una presenza di vinculina neo-sintetizzata in seguito all'applicazione dello stress meccanico, sono state eseguite delle analisi di RT-PCR e western blot. Come mostrato in Figura 3, la sintesi e l'espressione non vengono alterate in seguito alla deformazione del substrato. Infatti, la vinculina evidenziata nei campioni di controllo e nelle cellule stressate hanno la stessa intensità e valori di densitometria, ottenuti normalizzando le bande ottenute per la vinculina con la tubulina e i livelli di  $\beta$ -actina. Entrambe i risultati, ottenuti dalle analisi di RT-PCR e western blot, mostrano che non ci sono differenze significative tra i campioni. Dunque, dopo tre ore, lo stress meccanico sembra non interferire con la sintesi e l'espressione di vinculina.

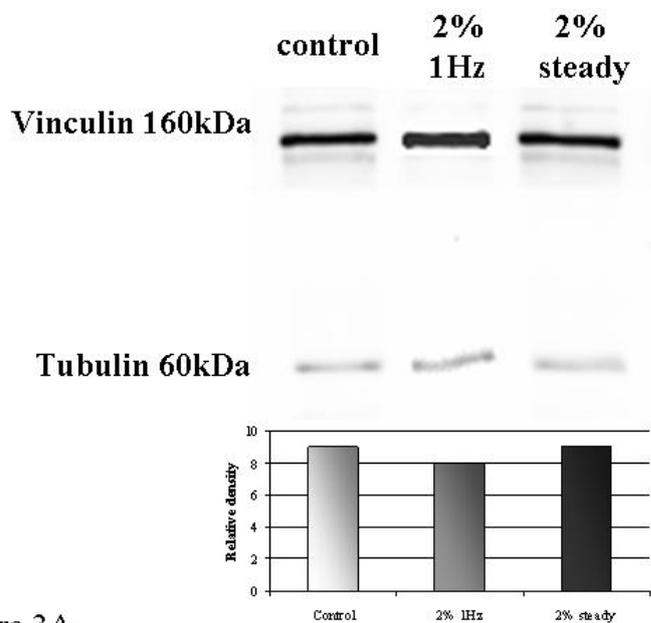


Figure 3A

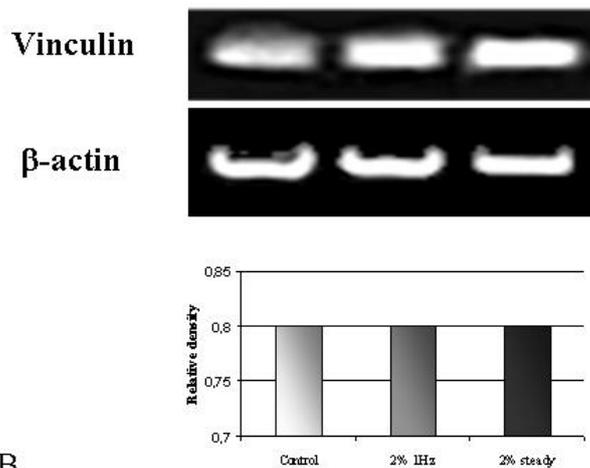


Figure 3B

## Discussione

Lo stress meccanico è generalmente presente nei tessuti e nelle cellule del corpo umano. L'intensità dello stress, la frequenza e la durata variano in maniera significativa a seconda delle funzioni del tessuto e della localizzazione. Per esempio, le deformazioni dei tessuti rientrano in un range dall'1% a più del 25% con frequenze da 0Hz, nel caso di deformazioni fisse, come nello stiramento dei tendini, a 1Hz come nel caso dei vasi sanguigni. Queste forze, generate da tensioni esterne o dalle proprietà contrattili delle cellule stesse, possono influenzare la forma e l'orientamento cellulare come conseguenza della riorganizzazione del citoscheletro tramite processi intracellulari.

Le integrine sono implicate in maniera significativa come meccanosensori [Katsumi et al., 2004] e le adesioni focali risultano come strutture altamente dinamiche, influenzate dalle condizioni esterne. È dimostrato che l'area e la presenza delle adesioni focali dipendono linearmente dalle forze meccaniche applicate alle cellule [Balaban et al., 2001].

Nel presente studio emerge che il comportamento cellulare è confrontabile in entrambi i casi, sottolineando che la frequenza non influenza le cellule nel primo periodo di stiramento del substrato (3 ore). Infatti, una deformazione del 2% e non la frequenza applicata gioca il ruolo principale nella risposta cellulare. Dunque, i cambiamenti strutturali del substrato promuovono una profonda modificazione nell'adesione cellulare in termini di morfologia dei contatti focali e dell'attivazione dei processi di meccanotrasduzione.

Il numero delle adesioni focali aumenta per contrastare la forza applicata dalla deformazione del substrato; inoltre, i contatti focali cambiano drasticamente dopo l'applicazione degli stress meccanici, risultando modificati nella lunghezza e nell'area. Una transizione da un "complesso focale nascente" ad un'adesione focale matura dipende da un aumento della densità dell'integrina  $\alpha_v\beta_3$  e la subunità della  $\beta_3$ -integrina può spostarsi utilizzando i filamenti di miosina II [Ballestran 2001; Tsuruta 2002]. Nel caso degli stress meccanici possiamo ipotizzare che i cambiamenti morfologici siano soggetti ad una dislocazione delle integrine lungo la membrana risultando in una riorganizzazione del citoscheletro. Inoltre, una transizione da una conformazione inattiva (chiusa) ad una attiva (aperta) della vinculina può anche essere prodotta dalle forze meccaniche al fine di esporre i siti di legame capaci di mediare nuove interazioni molecolari [Geiger 2001].

Dunque, la vinculina attiva espone i siti di legame per proteine strutturali e di adesione che modificano l'adesione focale e di conseguenza la morfologia cellulare. In futuro, sarà interessante studiare il ruolo del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) quale principale regolatore dell'attività della vinculina e in generale dell'assemblaggio dei contatti focali [Sechi 2000; DeMali 2004]. Lo stress meccanico come osservato in questo lavoro, coinvolge una più estensiva

attivazione della vinculina, che espone siti di legame selettivi per f-actina e per altre proteine coinvolte nell'adesione cellulare. Le analisi di RT-PCR e western blot confermano che lo stress meccanico non aumenta la sintesi di vinculina nel breve periodo. Dunque, questi dati supportano l'ipotesi che il cambiamento morfologico delle adesioni focali è dovuto ad una modificazione conformazionale della vinculina nello stato attivato, capace di legare i filamenti di actina in maniera più estensiva e non ad un aumento della sintesi della proteina stessa. Di conseguenza, al fine di contrastare lo stress meccanico, le cellule sono capaci non solo di orientare il corpo cellulare perpendicolarmente alla direzione dello stress per minimizzare le forze dirette contro la cellula, ma anche di modificare l'organizzazione di adesione per aderire in modo più forte al substrato. Questo studio può essere un importante capitolo volto a nuove applicazioni nell'ingegneria tissutale al fine di ottenere tessuti con strutture molecolari inalterate capaci di mimare le condizioni fisiologiche.

## **Bibliografia**

1. Adams MA. 2006. The mechanical environment of chondrocytes in articular cartilage. *Biorheology* 43: 537-45.
2. Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS. 2003. Uniaxial strain up-regulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1778-84.
3. Balaban NQ, Schwarz US, Rivelino D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, Geiger B. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3: 466-72.
4. Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. 2001. Marching at the front and dragging behind: differential  $\alpha_v\beta_3$ -integrin turnover regulates focal adhesion behaviour. *J Cell Biol* 155: 1319-32.
5. Cattaruzza M, Lattrich C, Hecker M. 2004 Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 43: 726-30.
6. Cornesselin J, Armstrong J, Holt CM. 2004. Mechanical stretch induces phosphorylation of p38-MAPK and apoptosis in human saphenous vein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 451-6.
7. DeMali KA. 2004. Vinculin – a dynamic regulator of cell adhesion. *Trends in Biochemical Sciences* 29:565-567.

8. Dimmeler S, Heandeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM. 1996. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 399: 71-4.
9. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 793-805.
10. Geiger B, Bershadsky A. 2002. exploring the neighbourhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell* 110: 139-142.
11. Henshaw DR, Attia E, Bhargava M, Hannafin JA. 2006. Canine ACL fibroblast integrin expression and cell alignment in response to cyclic tensile strain in three-dimensional collagen gels. *J Orthop Res* 24: 481-90.
12. Iatridis JC, MacLean JJ, Roughley PJ, Alini M. 2006. Effects of mechanical loading on intervertebral disc metabolism in vivo. *J Bone Joint Surg Am* 88 suppl 2: 41-6.
13. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y. 2000. Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H521-9.
14. Jalali S, Del Pozo MA, Chen K, Miao H, Li Y, Schwartz MA, Shyy JY, Chien S. 2001. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci* 98: 1042-46.
15. Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA. 2004. Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* 279: 12001-4.
16. Lan QX, Mercurius KO, Davies PF. 1994. Stimulation of transcription factors NFkB and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 950-6.
17. Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. 2006. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Int Med* 259: 381-392.
18. Mayr M, Li C, Zou Y, Huemer U, Hu y, Xu Q. 2000 Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases. *FASEB J* 14: 261-70.
19. Neidlinger-Wilke C, Grood E, Claes L, Brand R. 2002. Fibroblast orientation to stretch begins within three hours. *J Orthop Res* 20: 953-6.
20. Reeves ND. 2006. Adaptation of the tendon to mechanical usage. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 6: 174-80.
21. Reusch HP, Chan G, Ives HE, Nemenoff RA. 1997. Activation of JNK/SAPK and ERK by mechanical strain in vascular smooth muscle cells depends on extracellular matrix composition. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 239-44.

22. Rivelino D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. 2001. Focal contacts as mechanosensor: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153: 1175-85.
23. Sechi AS, Wehland J. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P2 influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* 113: 3685-3695.
24. Shikata Y, Rios A, Kawkitinarong K, DePaola N, Garcia JGN, Birukov KG. 2005. Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodelling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells. *Exp Cell Res* 304: 40-9.
25. Shirinsky VP, Antonov AS, Birukov KG, Sobolevsky AV, Romanov YA, Kabaeva NV, Antonova GN, Smirnov VN. 1989. Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. *J Cell Biol* 109: 331-9.
26. Takemasa T, Yamaguchi T, Yamamoto Y, Sugimoto K, Yamashita K. 1998. Oblique alignment of stress fibers in cells reduces the mechanical stress in cyclically deforming fields. *Eur J Cell Biol* 77: 91-9.
27. Tsuruta D, Gonzales M, Hopkinson SB, Otey C, Khuon S, Goldman RD, Jones JC. 2002. Microfilament-dependent movement of the beta3 integrin subunit within focal contacts of endothelial cells. *FASEB J* 16: 866-78.
28. Wang HQ, Zhao L. 2006. Impact of mechanical stress and tension-stress on angiogenesis in wound healing. *Chin J Traumatol* 9: 118-24.
29. Wang JH, Grood ES, Florer J, Wenstrup R. 2000. Alignment and proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching. *J Biomech* 33: 729-35.
30. Yoshigi M, Hoffman LM, Jensen CC, Yost HJ, Beckerle MC. 2005. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol* 171: 209-15.
31. Zamir E, Geiger B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114: 3583-90.

## Sezione 2

### Attività formative

#### **CORSI FREQUENTATI**

*Biomateriaux et organes artificiels*. Corso inter-facoltà per studenti laureati presso il Dipartimento di Ingegneria dei Materiali, Università Laval, Quebec City (QC), Canada. Durata del corso: gennaio-aprile 2004. Totale: 45 ore.

Biostatistica e Biomedicina. SIS Torino, 13 Giugno 2006

Corso statistica prof. Magnani (10 ore) 3-29 Maggio 2007

#### **SEMINARI III anno**

18 Novembre 2005 “Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits” Dr. Diego Cotella

22 novembre 2005 “HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications” Prof. Luigi Adinolfi

25 Novembre 2005 “Mechanisms of transcriptional regulation of disease” Prof. Robert Tjian

19 Gennaio 2006 “Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation” Prof. ssa Maria Grano

15 Febbraio 2006 “Anticorpi Ricombinanti: un potente Tool Biotecnologico” Prof. Daniele Sblattero

20 Febbraio 2006 “Tecniche di biologia e genetica molecolare nella diagnostica del carcinoma del colon” Dott.ssa Daniela Furlan

13 Marzo 2006 “Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia” Dr. Antonia Follenzi

20 Marzo 2006 “The natural course of preclinical type I diabetes” Prof. Mikael Knip

30 Marzo 2006 “Analisi spettrale dell'intervallo RR dell'elettrocardiogramma. Un moderno strumento per l'analisi digitale dell'attività elettrica cardiaca” Dott. Andrea Brunori

6 Aprile 2006 “Aspetti immunogenetici e terapeutici della Hairy Cell Leucemia” Dott. F. Forconi

4 Maggio 2006 “Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale” Dott. Luciano Mutti

30 Maggio 2006 “Sperm mediated gene transfer. Storia e applicazioni” Dr. Marialuisa Lavitrano

15 Giugno 2006 “Melusin: a stretch sensor molecule controlling adaptive cardiac remodeling to pressure overload” Prof. Guido Tarone

27 Giugno 2006 “Osteointegrazione e superfici implantari” Prof.ssa Lia Rimondini

13 Luglio 2006 “L’approccio riabilitativo delle malattie cardiovascolare” Dott. P. Giannuzzi

11 Settembre 2006 “The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis” Dr Prof. Dieter Brömme

## **SEMINARI IV anno**

29 novembre 2006 – “Nuove frontiere dei biomateriali: applicazioni cliniche” – Prof. Rolando Barbucci

12 gennaio 2007 - "Autoantibodies in systemic sclerosis: from clinical subsets to pathogenic functions" - Prof. Chizzolini

18 gennaio 2007 - “Patogenesi del diabete mellito di tipo i: stiamo perdendo o stiamo vincendo?” - Prof. Franco Bottazzo

25 gennaio 2007 – “Nuovi ruoli per le proteine adattatrici p130cas e p140cap nella trasformazione tumorale e nel carcinoma alla mammella” – Prof.ssa Paola Defilippi,

22 febbraio 2007 - “Fragile x syndrome from rna metabolism impairment to spine dysmorphogenesis” - prof.ssa Claudia Bagni

14 marzo 2007 - “Protein microarrays development of new surfaces for improved sensitivity” - DR. Marina Cretich

15 marzo 2007 - “Le colangiopatie autoimmuni” - Prof. Mauro Podda

29 marzo 2007 - “Marcatori farmacogenomici nel carcinoma coloretale: quali prospettive per una terapia personalizzata?” - Prof. Enrico Mini

19 aprile 2007 – “Pathofenic viruses: smart manipulators of the interferon system” - Prof. Otto Haller

16 maggio 2007 – “Difetti genetici del pre-b cell receptor” – Simona Ferrari

23 maggio 2007 - “Predisposizione genetica al cancro polmonare” - Dott. Tommaso A. Dragani

25 maggio 2007 – “The regulation of hematopoietic stem cells by smad signaling” - Stefan Karlsson Ph.D. M.D.

28 maggio 2007 – “Translating basic science into therapeutic strategies for shwachman diamond syndrome” - Steven R. Ellis Ph.D.

29 maggio 2007 – “Risk assessment for pesticides ” - Prof. David Coggon

04 giugno 2007 – “Sindromi autoinfiammatorie” – Prof. Alberto MARTINI

14 giugno 2007 - “La genesi dei gliomi e i suoi risvolti prognostici e terapeutici” - Davide Schiffer Ph.D. M.D.

21 giugno 2007 - "Bioinformatics tools for the analysis of utrs and for the prediction of alternative spliced transcripts" - DOTT. FLAVIO MIGNONE PH.D.

## CONGRESSI FREQUENTATI:

2007 Annual Meeting Society of Biomaterials – Chicago (Il, USA), 18-21 Aprile 2007

Congresso Nazionale Biomateriali 2006 – Vico Equense (Na), 13-16 Settembre 2006

Ceramics, Cells and Tissues – Materials for scaffolding of biologically engineered systems  
Faenza, Italy, 23-27 maggio 2006

INCTC International New Cardiovascular Tissue Congress – Quebec City (Quebec) Canada 10/11  
Settembre 2004

2<sup>nd</sup> Joint Quebec-New York Workshop on Nanotechnology – Albany, New York, USA 25 Ottobre  
2005

ISAB 2005- 3rd International Symposium on Advanced Biomaterials/Biomechanics – Montreal  
(Quebec) Canada 3/6 Aprile 2005

24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Canadian Biomaterials Society – Waterloo (Ontario) Canada 26-28  
Maggio 2005

## COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

A) Comunicazioni presentate personalmente

**“Focal adhesions of fibroblasts on dynamic surfaces: an additional approach for tissue engineering”**  
(poster) F. Boccafoschi, M. Bosetti, M.F. Cannas

Congresso: 2007 Annual Meeting Society of Biomaterials – Chicago (Il, USA), 18-21 Aprile 2007

**“Cell configuration for focal adhesions in cells seeded onto zinc-doped silicate-bioglasses”**  
(comunicazione orale)

F. Boccafoschi, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, A. Pedone, V. Bolis, C. Menzioni, M. Cannas

Congresso: Ceramics, Cells and Tissues – Materials for scaffolding of biologically engineered systems  
Faenza, Italy, 23-27 maggio 2006

**“Collagen-based scaffold for tissue engineering: biological performances”** (poster)

F. Boccafoschi, J. Habermehl, D. Mantovani

Congresso: INCTC International New Cardiovascular Tissue Congress – Quebec City (Quebec)  
Canada 10/11 Settembre 2004

**“Biological performances of carbon-coated PTFE” (poster)**

Boccafoschi F., Chevallier P., Sarkissian A. Mantovani D.

Congresso: ISAB 2005- 3rd International Symposium on Advanced Biomaterials/Biomechanics – Montreal (Quebec) Canada 3/6 Aprile 2005

**“Collagen-based Scaffold for Vascular Tissue Engineering” (comunicazione orale)**

Jason Habermehl, Francesca Boccafoschi, Joanna Skopinska, Diego Mantovani

Congresso: ISAB 2005- 3rd International Symposium on Advanced Biomaterials/Biomechanics – Montreal (Quebec) Canada 3/6 Aprile 2005

**“Vascular tissue engineering: an original approach for cylindrical collagen-based scaffolds” (comunicazione orale)**

F. Boccafoschi<sup>a,b</sup>, J. Habermehl<sup>a</sup>, D. Mantovani<sup>a\*</sup>

Congresso: 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Canadian Biomaterials Society – Waterloo (Ontario) Canada 26-28 Maggio 2005

**“Collagen-based Scaffold for Vascular Tissue Engineering” (poster)**

Jason Habermehl, Francesca Boccafoschi, Joanna Skopinska, Diego Mantovani

Congresso: 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Canadian Biomaterials Society – Waterloo (Ontario) Canada 26-28 Maggio 2005

B) Altre comunicazioni

**“Fattori di crescita sull’attività degli osteoblasti umani: possibile utilizzo nella rigenerazione ossea.” (comunicazione orale)** Bosetti M., Boccafoschi F., Cannas M.

Congresso: Congresso Nazionale Biomateriali 2006 – Vico Equense (Na), 13-16 Settembre 2006

**“Syntheses and characterization of carbon-based nanostructured materials” (poster)**

Boccafoschi F., Foursa M., Coté C., Hirose A., Mantovani D., Sarkissian A., Turgeon S., Xiao C., Yang Q.

Congresso: 2<sup>nd</sup> Joint Quebec-New York Workshop on Nanotechnology – Albany, New York, USA 25 Ottobre 2005

## **ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO**

### **“Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering”**

Bosetti M, Boccafoschi F, Leigheb M, Cannas M

Rivista: Biomol Eng (2007) in press

### **“Properties of Zinc Releasing Surfaces for Clinical Applications”**

G. Lusvardi, G. Makavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, A. Pedone, U. Segre, V. Aina, A. Perardi, C. Morterra, F. Boccafoschi, S. Gatti, M. Bosetti, M. Cannas

Rivista: J Biomater Appl. 2007 Jul 30 in press

### **“Preparation and characterization of a scaffold for vascular tissue engineering by direct-assembly of collagen and cells in a cylindrical geometry”**

F. Boccafoschi, N. Rajan, J. Habermehl, D. Mantovani

Rivista: Macromol Biosci. 2007 May 10;7(5):719-26.

### **“Biological Performances of Collagen-based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering”**

F. Boccafoschi, J. Habermehl, S. Vesentini, D. Mantovani

Rivista: Biomaterials. 2005 Dec;26(35):7410-7.

### **“Design of a Perfusion Bioreactor Specific to the Regeneration of Vascular Tissues under Mechanical Stresses”**

K. Bilodeau, F. Couet, F. Boccafoschi, D. Mantovani

Rivista: Artif Organs. 2005 Nov;29(11):906-12.

### **“Preparation of a ready-to-use, stockable and neutralized reconstituted collagen. Effects of the preparation method on properties of collagen films.”**

J. Habermehl, J. Skopinska, F. Boccafoschi, A. Sionkowska, H. Kaczmarek, G. Laroche, D. Mantovani

Rivista: Macromol Biosci. 2005 Sep 16;5(9):821-8.

**“Evaluation of bioresorbable implants from bovine bone: in vitro preliminary observations”**

F. Boccafoschi, M. Bosetti, M. Cannas

Rivista: Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics (JABB) 2005; 3: 35 – 41.

**“The induction of MMP-9 release from granulocytes by vitamin E in UHMWPE”**

F. Reno, P. Bracco, F. Lombardi, F. Boccafoschi, L. Costa, M. Cannas

Rivista: Biomaterials. 2004 Mar;25(6):995-1001.