
Microscopia a forza atomica per lo studio delle proprietà citomeccaniche

Mariafrancesca Cascione, Valeria De Matteis, Rosaria Rinaldi

Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi", Università del Salento, Lecce

1. Overview

Da numerosi decenni il legame tra Biomeccanica e Medicina è oggetto di notevole attenzione da parte della comunità scientifica al fine di stabilire una connessione tra struttura cellulare, funzione biologica, proprietà meccaniche e stato di salute/malattia.

In particolare, la meccanobiologia costituisce oggi uno tra i settori emergenti della ricerca di base; essa si focalizza prima sulla comprensione del ruolo che le forze fisiche giocano nella comunicazione e nella regolazione delle funzioni cellulari, poi sul coinvolgimento di tali forze nei processi più complessi come lo sviluppo dei tessuti e degli organi fino a comprendere l'origine e la progressione della malattia.

Le cellule costituiscono le unità fondamentali di tutti gli organismi viventi; in un uomo adulto si contano approssimativamente 10^{14} cellule eucariotiche e la loro morfologia varia a seconda della funzione biologica che esse svolgono.

L'assolvimento delle funzioni fisiologiche è

regolato da una serie di eventi intra ed extracellulari, molti dei quali coinvolgono fenomeni meccanici; infatti, le cellule sono continuamente sottoposte a stimolazioni meccaniche: forze di taglio (dovute al flusso d'aria o di sangue), forze di compressione (dovute al movimento delle cellule attraverso i tessuti), tensione (trasmessa dalle cellule aderenti o dalla matrice extracellulare).

Le cellule rispondono a queste forze regolando la loro forma, l'organizzazione interna e il comportamento, mediante l'attivazione di *pathway* biochimici che inducono a valle una serie di risposte. Tra queste, l'alterazione dell'attività delle proteine transmembrana (proteine canale) e *up-* o *down-regulation* dell'espressione genica.

La cellula eucariotica è costituita da diversi componenti cellulari; tra questi la membrana plasmatica o cellulare, il citoscheletro, organelli intracellulari (lisosomi, mitocondri, apparato del Golgi) e nucleo, i quali concorrono a determinare il comportamento meccanico dell'intera cellula, giacché ciascun componente assolve a precise

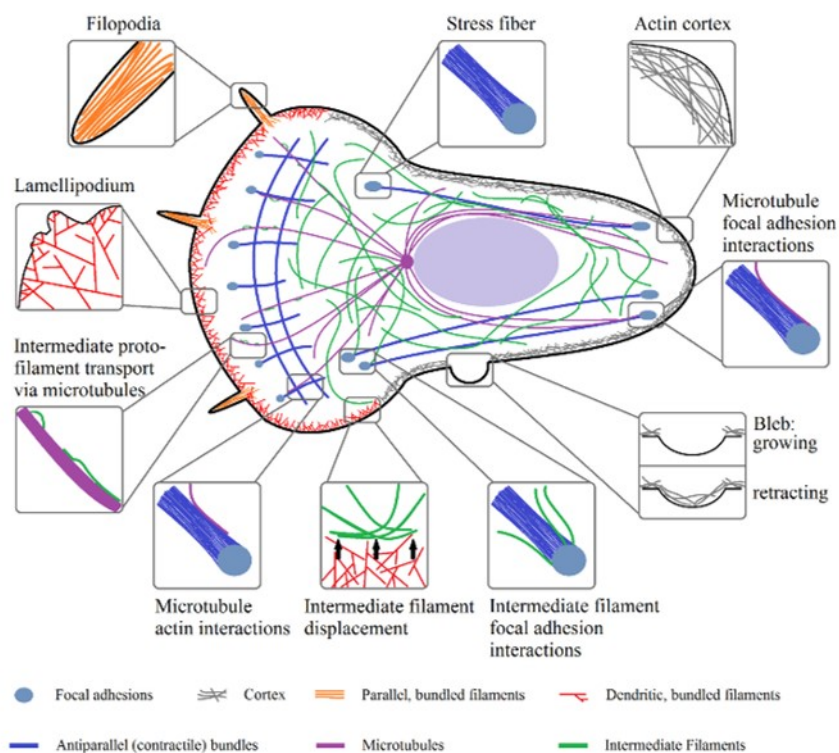


Figura 1: Rappresentazione schematica di actina, microtubuli e filamenti intermedi all'interno di una cellula e loro interazioni [1].

funzioni sia biologiche sia mecano-strutturali. In particolare, la membrana cellulare, che isola l'ambiente intracellulare dal microambiente extracellulare, non solo regola gli scambi di ioni e molecole, ma è anche in grado di trasferire le forze di carico percepite al citoscheletro. Quest'ultimo è un reticolo costituito da filamenti proteici fittamente interconnessi tra di loro i quali hanno la funzione di strutturare e organizzare il citoplasma determinando la forma della cellula.

Questi filamenti (Figura 1) sono di tre tipologie: filamenti di actina, microtubuli e filamenti intermedi. In particolare, i filamenti di actina e i microtubuli hanno un ruolo fondamentale nella generazione del movimento della cellula e degli organelli: infatti il citoscheletro può deformarsi facilitando la trasmissione dei segnali meccanici provenienti dall'ambiente extracellulare fino al nucleo e viceversa mediante la loro compressione o la trazione.

Il nucleo risente dello stimolo meccanico che si propaga all'interno della cellula grazie alla

presenza della lamina nucleare, costituita da un reticolo di filamenti intermedi presente al di sotto della membrana nucleare interna. L'impulso meccanico attiva o inibisce la trascrizione di specifici geni che conseguentemente attiveranno dei *pathway* biochimici tali da alterare la struttura citoscheletrica al fine di resistere alla forza percepita. Il citoscheletro, dunque, gioca un ruolo fondamentale nel processo di trasmissione del segnale fisico e nella risposta meccanica cellulare allo stimolo percepito.

Il processo mediante il quale le cellule rispondono alle forze meccaniche esterne può essere suddiviso in tre fasi: *meccanosensing*, *mechano-transduction* e *mechanoresponse*. La forza esercitata sulla superficie cellulare è percepita da recettori di membrana (*meccanosensing*) strettamente connessi alle fibre del citoscheletro; tale continuità meccanica permette alle forze di propagarsi nella cellula (*mechano-transduction*). Gli effetti della forza trasmessa sono specifici per ogni sistema; tuttavia, il processo di *meccanosensing* è lo stesso: le macromolecole sensibili allo stimolo meccanico promuovono un riarrangiamento

conformazionale per bilanciare la forza percepita. La nuova configurazione altera le funzioni specifiche associate a determinate molecole innescando altresì una cascata di eventi biochimici multipli (*mechanoresponse*).

Parallelamente la cellula, perturbata da uno stimolo di tipo chimico e/o da una mutazione genetica, può generare forze meccaniche che trasferisce al microambiente extracellulare, determinando alterazioni nell'espressione di alcune proteine mediante meccanismi di *feedback* positivi. Tale variazione può alterare le proprietà meccaniche dell'ambiente extracellulare, come l'elasticità e la viscosità, le quali verranno percepite da altre cellule vicine che, a loro volta, avvieranno una risposta meccanica di tipo adattativo.

Pertanto, la caratterizzazione del comportamento meccanico cellulare si configura come un elemento chiave per lo studio dell'insorgenza e la progressione di malattie, così come può essere utilizzata per caratterizzare la risposta citotossica all'esposizione di nanomateriali [2].

2. Tecniche di caratterizzazione

Negli ultimi anni, per quantificare le proprietà meccaniche di una singola cellula e dei principali componenti, sono state ottimizzate diverse tecniche di misurazione, le quali possono essere essenzialmente suddivise in tre categorie:

1. tecniche per misurare la deformazione indotta dall'applicazione di forze controllate su una parte o sull'intera cellula, tra cui la *magnetic twisting cytometry*, *micropipette aspiration*, *microplate manipulation*, *optical tweezers* e *atomic force microscopy*;
2. tecniche per monitorare la capacità cellulare di generare forze al suo interno che determinano una deformazione del suo microambiente, come la *traction force microscopy* e la *micropillar traction force*;
3. tecniche per quantificare le forze intracellulari, come la *multiple particle tracking microrheology*.

Ad oggi i lavori riportati in letteratura sulla caratterizzazione del comportamento citomeccanico sono principalmente stati realizzati usando

tecniche basate sullo studio della deformabilità del corpo cellulare, o analogamente della resistenza alla deformazione, valutata nel tempo, indotta da forze esterne controllate. In particolare, il microscopio a forza atomica è uno strumento di elezione giacché permette di investigare un'ampia gamma di campioni biologici, che vanno dalla singola biomolecola, alla cellula, fino ad un tessuto biologico.

2.1 Microscopia a forza atomica

Il microscopio a forza atomica appartiene alla famiglia dei microscopi a scansione di sonda (*scanning probe microscopes*, SPM), così chiamati proprio per indicare che l'osservazione della superficie del campione è ottenuta mediante l'interazione puntuale tra gli strati atomici superficiali del campione investigato e una sonda fisica che lo scansiona.

Per immaginare quello che succede durante una misura, possiamo pensare al nostro campione come un vinile e alla sonda come alla puntina di un giradischi; a seconda del tipo di interazione fisica che trasdotta elettronicamente permetterà di godere della musica che intendiamo ascoltare, potremmo distinguere diversi tipi di microscopi a scansione. In particolare, nel caso del microscopio a forza atomica (che da qui in poi indicheremo come AFM), la sonda, costituita da una punta fissata all'estremità libera di un *cantilever* flessibile, scansiona il campione ed interagisce puntualmente con la sua superficie. La forza punta-campione, che causa la deflessione del *cantilever*, è dovuta all'interazione tra gli atomi dell'estremità della punta e quelli della superficie vicino alla punta stessa. Essa può essere descritta, con buona approssimazione, dal potenziale di Lennard-Jones:

$$U(z) = U_0 \left[- \left(\frac{z_0}{z} \right)^6 + a_{12} \left(\frac{z_0}{z} \right)^{12} \right]$$

dove si è indicato con z la distanza relativa punta-campione e con z_0 la distanza di equilibrio a cui corrisponde il valore minimo del potenziale U_0 , e a_{12} è una costante.

Nell'espressione del potenziale di Lennard-Jones il primo termine descrive un'attrazione a lungo raggio portata dalle interazioni dipolo-dipolo mentre il secondo termine esprime

me una repulsione a breve distanza dovuta alla sovrapposizione degli orbitali atomici.

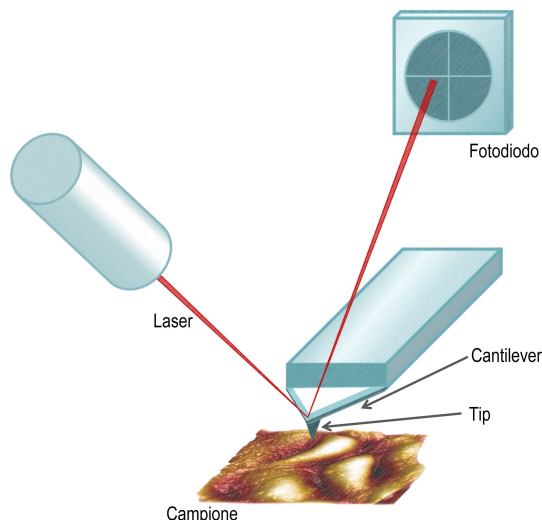


Figura 2: Set-up AFM di base. Una tip appuntita è fissata all'apice di un cantilever flessibile. Puntualmente, la forza di interazione tra punta-campione, in funzione della loro distanza relativa, è calcolata dalla deflessione subita dal cantilever. Quest'ultima è misurata sfruttando il principio della leva ottica.

La sonda di un AFM (figura 2), costituita da una tip molto appuntita (\sim pochi nm), è fissata all'estremità libera di un cantilever flessibile. Il movimento relativo della sonda rispetto alla superficie del campione è guidato da uno scanner piezoelettrico.

Quando la sonda scorre sulle superficie da investigare, il parametro z (corrispondente alla distanza relativa punta-campione) cambia puntualmente in funzione della topografia del campione stesso, a cui corrisponde una variazione della forza di interazione che induce una deflessione del cantilever. Tale deflessione è estremamente piccola da rilevare giacché le forze di interazione sono molto piccole (<1 nN), così per quantificarla è necessario ricorrere al metodo della leva ottica, per cui sull'estremità del cantilever, in corrispondenza della punta, viene focalizzato un fascio laser: quando la flessione del cantilever cambia, l'angolo incidente del raggio laser sul cantilever viene modificato e di conseguenza anche la direzione del raggio riflesso. La posizione del raggio riflesso viene rilevata mediante un fotodiodo a due o a quattro quadranti (figura 2). In definitiva, mappando l'interazione locale tra la punta ed il campione, determinata indirettamente dalla

misura della deflessione del cantilever, sarà possibile ottenere immagini con elevata risoluzione ($\sim \text{\AA}$) della superficie investigata.

Le proprietà meccaniche locali della superficie possono essere studiate usando lo AFM in modalità spettroscopia di forza. Anche per questo caso si tratta di un'analisi puntuale in cui la forza di interazione tra la punta e il campione è legata alla loro distanza relativa.

L'indentazione, introdotta all'inizio degli anni '70 e poi ottimizzata dallo sviluppo tecnologico, è oggi una metodologia convenzionale per stimare le proprietà elastiche dei materiali a livello micro- e nanometrico ad alta risoluzione.

Questo metodo si basa su una punta in grado di penetrare nel campione e di deformarlo. La forza di interazione aumenta con la riduzione della distanza relativa punta-campione, passando da zero a un valore massimo e tornando a zero quando la punta è posizionata nuovamente nel punto di partenza.

Idealmente, le curve forza-distanza forniscono la forza percepita dalla punta e la distanza punta-campione permettendo di determinare il modulo di Young locale. Nella pratica, questi valori non sono misurati direttamente: la distanza punta-campione d si ottiene per sottrazione dello spostamento z -piezo (che muove la sonda o il campione a seconda della configurazione AFM) e la deflessione del cantilever, che deve essere calibrato per ogni esperimento. Inoltre i valori della forza sono calcolati utilizzando la legge di Hooke ad ogni deflessione del cantilever.

La misura della forza è composta da due curve corrispondenti all'avvicinamento e alla ritrazione della sonda (figura 3) [3].

Come mostrato nella figura 3, è possibile discriminare varie porzioni [4]. Il cantilever e il campione sono inizialmente lontani e non interagiscono (1). Successivamente la sonda si avvicina alla superficie del campione e percepisce forze attrattive a lungo raggio che deviano il cantilever verso il basso: queste forze sono principalmente forze di Van der Waals (dovute all'interazione intermolecolare), ma sono coinvolte anche forze elettrostatiche. Quando l'intensità del gradiente di forza attrattiva (pendenza della curva) supera il contatto elastico del cantilever k_c , la punta entra in contatto con il campione. In questo momento inizia l'indentazione e una deformazione - ela-

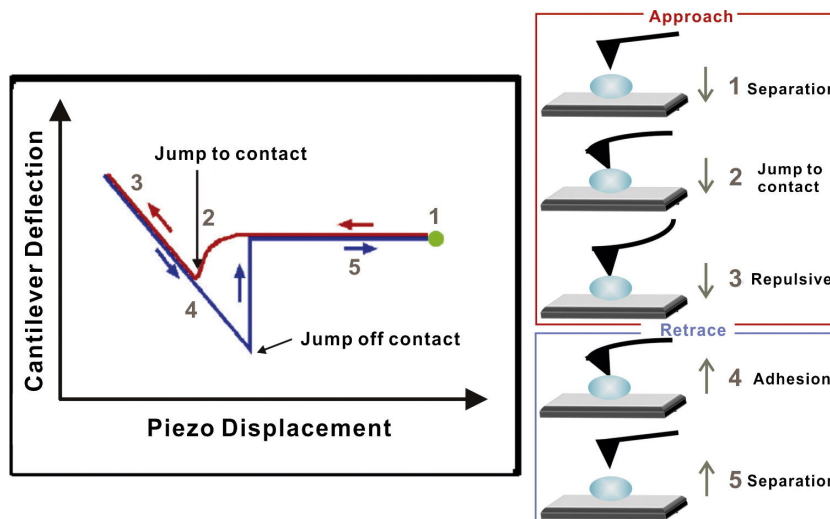


Figura 3: Rappresentazione schematica della curva forza-distanza. Le fasi di approccio e retrazione sono mostrate nella figura a destra [3].

stica, in prima approssimazione - è indotta sul campione (2-3). Non appena la forza di interazione punta-campione raggiunge il valore massimo, impostato dall'operatore, la sonda viene ritirata dal campione ma l'adesione stabilita tra punta e superficie del campione mantiene ancora il contatto (4) fino alla distanza corrispondente al punto di contatto instabile in cui la costante elastica del *cantilever* supera il gradiente della forza di interazione e la punta perde definitivamente il contatto (5).

La modalità di forza non fornisce informazioni topografiche ed in generale richiede che le superfici da caratterizzare siano pulite ed omogenee. Queste condizioni sono praticamente impossibili da soddisfare a causa dell'intrinseca eterogeneità dei campioni biologici e della presenza di una soluzione *buffer* in cui tali campioni sono mantenuti al fine di preservare l'omeostasi mimando il naturale ambiente fisiologico cellulare. Per queste ragioni è necessario raccogliere e analizzare una grande quantità di curve di forza.

Per superare questi limiti è stata introdotta la possibilità di acquisire immagini forza-volume (FV) con la quale è possibile acquisire simultaneamente dati di topografia e di interazione punta-campione su un'area specifica, creando una immagine topografica in cui ad ogni *pixel* corrisponde una curva forza-distanza (Figura 4).

Le curve forza-distanza collezionate contengono molte informazioni sulle proprietà della superficie del materiale, esse però non so-

no direttamente accessibili ma possono essere estratte analizzando opportunamente i dati di indentazione; a tal fine sono stati sviluppati diversi metodi empirici o semi-empirici basati sulla teoria della meccanica del contatto.

Quando due corpi vengono messi in contatto subiscono una deformazione che coinvolge principalmente la regione di contatto le cui dimensioni variano con la geometria delle superfici coinvolte; dunque, per ottenere informazioni sulle proprietà meccaniche di un materiale è necessario stabilire la relazione tra la forza applicata a un corpo e la sua corrispondente deformazione. In linea di principio la deformazione non è solo dovuta alla forza applicata, ma è anche influenzata dalle forze intermolecolari tra le superfici; queste sono trascurabili su macroscale, ma giocano un ruolo importante quando le dimensioni diminuiscono.

I primi studi di meccanica del contatto furono realizzati da Hertz. Egli sviluppò un modello teorico per descrivere le deformazioni locali, continue e piccole di un semispazio elastico sottoposto a un carico applicato da una sfera. Le ipotesi di partenza sono necessarie per poter sfruttare la teoria classica dell'elasticità lineare; Hertz inoltre trascurò completamente il contributo alla deformazione indotto dalle forze di attrito e di adesione. Queste ultime furono prese in considerazione nella teoria JKR, ottenuta dai contributi di Johnson, Kendall e Roberts [5], in cui si assume che le forze adesive deformino la superficie solo

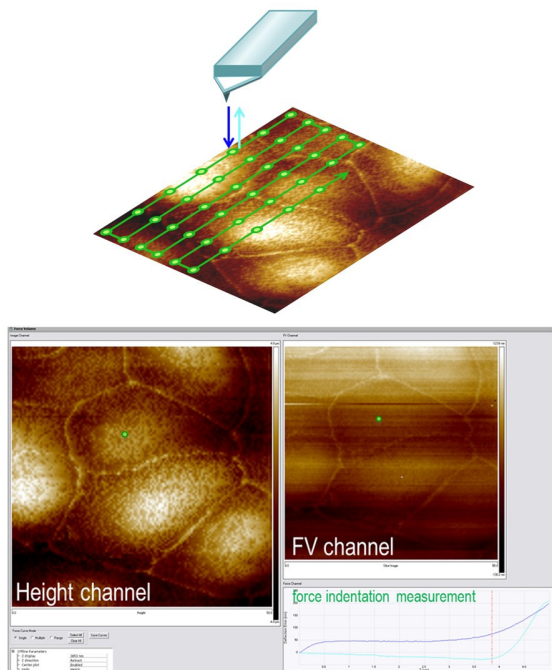


Figura 4: Rappresentazione schematica della modalità di lavoro force-volume. Nell'immagine in alto, la linea verde indica il movimento raster della sonda AFM sulla superficie del campione. Nei punti indicati la punta esegue un ciclo completo di indentazione. Nell'immagine in basso è riportato uno screen dell'interfaccia del software di acquisizione e analisi: è possibile visualizzare contemporaneamente la topografia (height channel) ed il canale force volume (FV channel). I pixel delle due immagini sono biunivocamente correlati, così ad ogni pixel del canale di topografia corrisponde una curva forza-distanza.

all'interno della regione di contatto. Al contrario Derjaguin, Muller e Toporov presentarono un modello (DMT) in cui le forze adesive agiscono solo all'esterno della regione di contatto, mentre all'interno della stessa considerarono valido il modello di Hertz [6]. Le teorie JKR e DMT possono essere assunte come casi estremi della stessa teoria e per studiare i casi tra queste condizioni limite vengono sviluppati diversi modelli. Maugis ha formulato una teoria più completa per risolvere il problema del contatto meccanico, ma la sua complessità ne limita le applicazioni [7]

Nonostante il continuo sviluppo nella modellazione delle proprietà meccaniche dei campioni biologici, la teoria del contatto di Hertz ha un ruolo fondamentale nell'analisi dell'elasticità delle singole cellule, ma risulta valida solo nel caso

di un indentatore sferico. Sneddon estese, apportando delle correzioni, il modello di Hertz a qualsiasi solido di rotazione [8]. Anche questo modello è valido per deformazioni elastiche lineari; tuttavia è possibile tener conto del contributo plastico alla deformazione introducendo dei fattori di correzione, come proposto da Oliver e Pharr [9], i quali assunsero che un recupero completamente elastico del materiale è possibile solo nella porzione iniziale della fase di scarico, mentre la fase di carico è caratterizzata da un comportamento elasto-plastico. Questo modello però continua a trascurare le forze adesive all'interfaccia.

Da questo breve e conciso excursus è palese come lo sforzo per modellizzare completamente la meccanica di contatto tra due corpi non sia un esercizio banale. Oggi si ricorre a script computazionali che calcolano in modo ricorsivo gli errori per ottenere un fit ottimale delle curve sperimentali di indentazione.

2.2 Applicazione della microscopia a forza atomica in campo biologico

Alla fine degli anni '80 la microscopia a forza atomica viene sviluppata per caratterizzare le superfici di solidi non conduttivi come polimeri, ceramiche, materiali compositi e vetro; successivamente, grazie alla possibilità di lavorare in liquido, l'applicazione dello AFM è stato esteso all'ambito biologico fino a diventare oggi uno strumento molto interessante e spendibile dal punto di vista della ricerca biomedica incentrata specialmente sulla comprensione di meccanismi specifici a livello sia cellulare sia di singola biomolecola.

Caratterizzazione meccanica della membrana cellulare come indicatore dello stato di salute della cellula

Per poter analizzare cellule vitali (*in living*) utilizzando l'AFM, è necessario che esse crescano in adesione su un substrato specifico a volte opportunamente funzionalizzato; pertanto le cellule aderenti sono maggiormente adatte per queste misure. Le linee cellulari che crescono in sospensione richiedono uno *step* di fissazione con aldeidi: questo trattamento blocca le cellule perdendo così la condizione di vitalità e non poten-

do più valutare la risposta dinamica allo stimolo indotto.

L'AFM è utilizzato per analizzare la morfologia di diversi tipi cellulari, spaziando da cellule nervose a cellule con caratteristiche completamente diverse, come le cellule renali. In particolare, nelle cellule gliali possono essere analizzati i mitocondri, i canali del calcio sul terminale nervoso presinaptico [10, 11] e anche le vescicole sinaptiche, ottenendo informazioni riguardanti la loro forma e le loro dimensioni [12]. Sulla superficie delle cellule dell'apparato gastrointestinale e del tubulo renale è possibile visualizzare anche alcuni elementi tipici della membrana apicale di questi tessuti, ossia i microvilli; in tal caso il processo di fissazione deve essere necessariamente effettuato poiché la scansione con l'AFM *in living* potrebbe deformare la struttura cellulare.

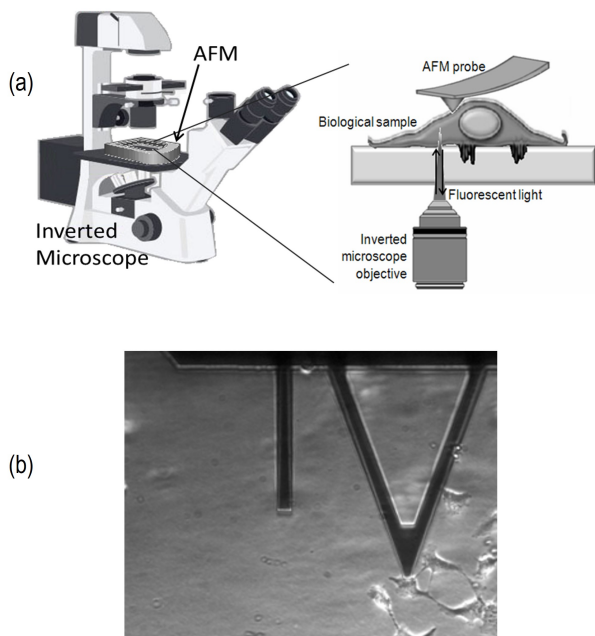


Figura 5: (a) Rappresentazione schematica di AFM assemblato su un microscopio ottico invertito. (b) Immagine ottica (obiettivo 20x) Posizionamento della punta AFM sulla superficie di una cellula [14].

Anche i meccanismi di migrazione cellulare possono essere analizzati mediante AFM grazie all'analisi di alcune sottili proiezioni citoplasmatiche, quali filopodi e lamellipodi, che si formano sul fronte di avanzamento delle cellule. Inoltre possono essere studiati i riarrangiamenti citoscheletrici, il citoplasma, i movimenti di organelli e vescicole e infine le giunzioni cellulari. È

possibile anche analizzare il rilascio di particelle virali da cellule infettate da virus.

Modificando la geometria e funzionalizzando la punta dell'AFM con opportuni gruppi chimici, è possibile eseguire una innumerevole serie di studi che possono riguardare aree molto ridotte della superficie o l'intero corpo cellulare [50]. L'applicazione della forza alla singola cellula induce una risposta che si manifesta in un rimodellamento del citoscheletro e quindi della forma cellulare; tale risposta è puntuale e dipende dalla durata e dall'intensità della forza applicata.

Negli ultimi anni, sono state studiate usando la microscopia a forza atomica le proprietà meccaniche di diverse tipologie di linee cellulari, come cellule della prostata, della vescica, dell'epitelio polmonare [13], del seno, del sangue e delle ossa. In genere non si tratta di misure assolute ma relative: si caratterizza come varia il comportamento meccanico cellulare a seguito di uno stimolo biologico, chimico o fisico.

Per comprendere la forte connessione tra i *pathways* biochimici e le risposte citomeccaniche possono essere effettuati studi sistematici sulle proprietà meccaniche delle cellule in funzione delle loro condizioni fisiologiche. Per ottenere una conoscenza più approfondita di questo argomento, i dati acquisiti dall'AFM devono essere confrontati con quelli derivati da altre tecniche, principalmente microscopia ottica e in fluorescenza.

In questa prospettiva sono stati effettuati molti studi condotti in parallelo. In alcuni casi, però, i risultati ottenuti con le diverse tecniche possono essere difficili da correlare data l'eterogeneità del campione investigato. Per superare queste problematiche sono stati sviluppati sistemi ibridi che permettono la visualizzazione del campione sia con un sistema ottico che con la microscopia a forza atomica.

In particolare, utilizzando una configurazione microscopica invertita, è possibile analizzare il campione sia dal basso, con la microscopia ottica, sia dall'alto mappando la sua superficie per mezzo della sonda AFM (Figura 5a); quindi il *set-up* ibrido è usato per registrare simultaneamente acquisizioni AFM e quelle di microscopia a luce trasmessa.

L'integrazione dell'AFM con un microscopio ottico aumenta fortemente le prestazioni di en-

trambe le tecniche. Dal punto di vista pratico, il loro accoppiamento facilita il posizionamento della sonda AFM sul campione scelto (Figura 5b): questo è fondamentale nei casi sperimentali che richiedono la funzionalizzazione della punta. Inoltre, l'aggiunta di componenti specifici al *set-up* permette molte configurazioni: tra queste, la combinazione della microscopia a fluorescenza con la quella a forza atomica permette di valutare contemporaneamente alcuni processi biologici in termini di variazioni meccaniche e morfologiche.

L'AFM può essere combinato con la microscopia a confocale (CLSM) in modo da valutare in tempo reale l'effetto dello *stress* meccanico su definite strutture cellulari opportunamente marcate con specifici fluorocromi. L'AFM può essere accoppiata con la *stimulated emission depletion microscopy* (STED), che fornisce visualizzazione a maggiore risoluzione rispetto alla fluorescenza in microscopia confocale.

Per studiare un evento biologico nella regione di contatto cellula-substrato, la microscopia TIRF è ampiamente utilizzata. La sua implementazione in un sistema ibrido con AFM permette di visualizzare le forze di trasmissione all'interno di alcune tipologie cellulari, come le cellule endoteliali, o di cellule polarizzate, permettendo la visualizzazione di membrane apicali e basali.

Il sistema integrato e le sue applicazioni sono stati analizzati nella review intitolata "Atomic Force Microscopy combined with Optical Microscopy for Cell Investigation".

Nonostante i recenti progressi della tecnica AFM, gli studi sui campioni biologici rimangono ad oggi molto complicati da eseguire ed interpretare; ciò è dovuto principalmente sia all'eterogeneità degli elementi strutturali costituenti la cellula, sia alla possibilità che ciascuna cellula si trovi in uno specifico momento del proprio ciclo vitale.

La caratterizzazione delle proprietà meccaniche della membrana cellulare risente inoltre della profondità di indentazione. Per tale ragione il protocollo sperimentale convenzionalmente usato impone che essa sia inferiore al 10-15 % rispetto all'altezza cellulare. A queste profondità la risposta meccanica cellulare è essenzialmente dovuta alla rete di filamenti di actina corticale,

i quali, essendo organizzati in modo disomogeneo, determinano una distribuzione dei valori del modulo elastico sulla membrana cellulare. Tuttavia il contributo di elementi subcellulari più profondi può fornire dati importanti per comprendere al meglio il comportamento meccanico nella progressione della malattia.

L'AFM è anche utilizzato per studiare le proprietà di adesione dei campioni biologici (cellule, specifici compartimenti cellulari, molecole). Infatti un'appropriata funzionalizzazione della punta, mediante cellule o proteine, offre la possibilità di manipolare e sondare molecole adese alla superficie cellulare (recettori, sensori e trasduttori). In questo modo si possono studiare le singole molecole misurando le forze intermolecolari e intramolecolari, quindi sviluppare nuove strategie per il rilascio controllato di farmaci.

Alcuni casi di studio:

- **Progressione tumorale**
Per comprendere meglio i meccanismi biofisici alla base dell'insorgenza e della progressione tumorale, sono stati realizzati numerosi studi volti a caratterizzare la variazione delle proprietà meccaniche nelle cellule tumorali primarie sia rispetto alla loro controparte benigna, sia rispetto a quella metastatica.

In linea generale è stato ampiamente osservato che le cellule tumorali sono molto più soffici rispetto alle cellule sane; ad esempio, le cellule del cancro della vescica umana posseggono una elasticità maggiore rispetto alle normali cellule epiteliali e che le cellule MCF-7 del cancro al seno umano sono più morbide delle cellule MCF-10.

Numerose evidenze sperimentali riportate in letteratura scientifica dimostrano come le cellule di adenocarcinoma metastatico (polmone, seno e cancro del pancreas), benché morfologicamente simili alle cellule sane secondo l'analisi istopatologica, presentino un comportamento meccanico profondamente diverso [13, 16]. Analoghi risultati sono stati ottenuti quantificando i valori del Modulo di Young delle cellule tumorali polmonari PC-9 [17].

Lo studio della variazione delle proprietà meccaniche cellulari può aiutare a comprendere il processo di transizione epitelio-mesenchimale. Tale fenomeno risulta alla base della progressione tumorale e della metastatizzazione [18]: le cellule diventano più soffici, perdono l'aderenza con le cellule vicine e con la matrice extracellulare, migrando nei tessuti circostanti [19]. Nel dettaglio, le cellule epiteliali, perdendo la loro polarità (apicale-basale) e la loro tipica architettura citoscheletrica, assumono un fenotipo simil-mesenchimale. Questa nuova conformazione rende le cellule più soffici, quindi capaci di penetrare nello stroma e raggiungere siti distali, viaggiando all'interno dei vasi sanguigni o linfatici.

Nel processo di metastatizzazione l'ambiente extracellulare gioca un ruolo chiave: gli stimoli meccanici trasmessi da una matrice extracellulare rigida (forza esogena) influenzano il comportamento cellulare e di conseguenza la tensione citoscheletrica (forza endogena). Questo signaling esterno attiva l'espressione di alcuni oncogeni e fattori trascrizionali; la loro deregolazione porta alla carcinogenesi, connettendo i segnali biochimici prodotti dagli oncogeni con il microambiente rigido e favorendo e sostenendo la trasformazione oncogenica.

L'adesione cellulare alla matrice extracellulare e la corrispondente risposta citomeccanica costituiscono processi fisiologici altamente correlati tra loro; pertanto la loro caratterizzazione rappresenta una strategia chiave per identificare l'impatto delle forze adesive sulla regolazione del comportamento cellulare.

- **Citotossicità indotta da esposizione a nanomateriali**
L'ultimo decennio il crescente utilizzo di nanoparticelle (NPs) in svariati prodotti commerciali e in applicazioni in campo medico ha sollevato diverse preoccupazioni circa la loro tossicità. Le proprietà chimico-fisiche delle NPs, cioè la dimensione, la forma, la carica superficiale, ecc. influenzano la loro interazione con membrana cellulare, organelli e strutture del citoscheletro,

innescando una serie di eventi che modificano le normali funzioni cellulari. Nonostante la comunità scientifica abbia rivolto molta attenzione sulle possibili conseguenze indotte dalle nanoparticelle *in vivo* ed *in vitro* dal punto di vista chimico-biologico [20], l'impatto sulla meccanica cellulare è ancora poco indagato.

Come precedentemente argomentato, L'AFM è stata ampiamente utilizzata per quantificare le alterazioni morfo-meccaniche indotte dalla progressione della malattia e/o per valutare gli effetti prodotti da farmaci specifici. Allo stesso modo questa tecnica potrebbe essere usata per capire come le NPs agiscono sulla meccanica cellulare influenzando specifiche funzioni cellulari.

In un recente lavoro sono stati infatti studiati i cambiamenti biomeccanici indotti da NPs di selenio (Se NPs) in linee cellulari di adenocarcinoma mammario (MCF-7). Tali NPs determinano l'insorgenza di alterazioni morfologiche a carico dei filamenti di actina provocando un aumento del modulo di Young. Le stesse cellule sono state utilizzate per testare NPs di argento (Ag NPs) rivestite di citrato. In questo caso le Ag NPs stimolano un'alterazione della struttura di organelli subcellulari (lisosomi e mitocondri), oltre alla riorganizzazione dell'*actina* corticale [22], che si riflette in una notevole riduzione della rigidità cellulare; tale risultato potrebbe provocare un distacco delle cellule dalla membrana basale, innescando il processo di metastatizzazione.

In altri studi è stato visto come altre tipologie di NPs possono provocare un effetto opposto sulla meccanica cellulare che però dipende anche dalla linea cellulare utilizzata. Per esempio, le NPs di ossido di silicio (Si O₂ NPs) e di ossido di titanio (Ti O₂ NPs) possono provocare alternativamente un aumento o una diminuzione dell'elasticità di membrana a seconda della linea cellulare utilizzata (adenocarcinoma del colon e adenocarcinoma alveolare) [2]. L'aumento o la diminuzione del valore del modulo di Young ha conseguenze differenti sulla meccanica cellulare. In particolare, valo-

ri molto ridotti sono associati al fenomeno della progressione tumorale indotta dalla rottura delle giunzioni cellulari e alla conseguente migrazione nel tessuto circostante. Al contrario l'aumento del valore di modulo di Young può essere deleterio per tutti quegli eventi cellulari che richiedono mobilità cellulare, come lo sviluppo embrionale e la differenziazione cellulare. Quindi diversi tipi di NPs possono alterare o inibire la mobilità cellulare.

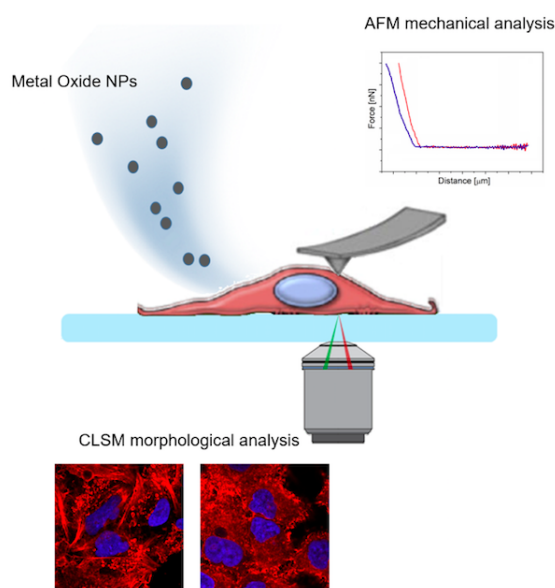


Figura 6: Studio della meccanica cellulare mediante AFM combinato con microscopia confocale per lo studio della tossicità indotta da NPs di ossido di metalli.

In questo scenario l'indagine biomeccanica (Figura 6) rappresenta un potente strumento per studiare la citotossicità delle NPs al fine di sviluppare nuovi protocolli basati sulla meccanica cellulare da abbinare ai test di tossicità standard. Il comportamento meccanico delle cellule potrebbe quindi predirne il destino e, indirettamente, anche la tipologia di patologie che potrebbero manifestarsi.

- Studi di *unfolding* proteico
L'insorgenza di malattie neurodegenerative è essenzialmente dovuta ad un'alterazione nel ripiegamento (*misfolding*) di alcune proteine presenti nella matrice extracellulare

del tessuto neuronale. L'alterato stato conformazionale, caratterizzato da una struttura a β -foglietto, rende queste proteine insolubili [93], tendendo così ad accumularsi sulla membrana cellulare e formando degli aggregati fibrillari amiloidi; la loro presenza induce una risposta citotossica e impedisce il corretto funzionamento delle cellule nervose.

Negli ultimi decenni la necessità di superare il limite di efficacia (in media del 30 %) delle attuali terapie farmacologiche in uso contro le patologie neurodegenerative, ha sollecitato lo sviluppo di approcci complementari a quelli propriamente biomedici. In particolare, nell'ultimo ventennio, sono stati condotti numerosi studi *in vitro* basati su evidenze sperimentali ottenute mediante dicroismo circolare, spettrometria di massa e spettroscopia infrarossa [96] tesi a caratterizzare la composizione e la conformazione degli aggregati amiloidi; queste tecniche, tuttavia, non riescono a risolvere le singole specie che compongono gli aggregati amiloidi.

La microscopia a forza atomica appare particolarmente utile per caratterizzare i singoli costituenti degli aggregati amiloidi su scala nanometrica, fornendo indicazioni circa le proprietà strutturali (altezza, larghezza e periodicità) e biofisiche (flessibilità, confezionamento di singoli protofilamenti all'interno di fibrille mature, citotossicità) di ciascuna specie costituente [23].

Inoltre, la recente applicazione di nuove metodologie basate su AFM, come la mappatura nanomeccanica quantitativa, rappresenta una metodologia proficua per caratterizzare il processo di *misfolding* dei monomeri e per chiarire i meccanismi molecolari del polimorfismo e della formazione dell'amiloide. Nelle misure di spettroscopia a forza atomica la sonda AFM è stata usata per allungare, comprimere e manipolare spazialmente le macromolecole di amiloide studiandone così il comportamento meccanico, tentando di quantificare le forze di interazione all'interno dei β -foglietti delle proteine amiloidi. Parallelamente, misure di nanoindentazione sono state eseguite per misurare i

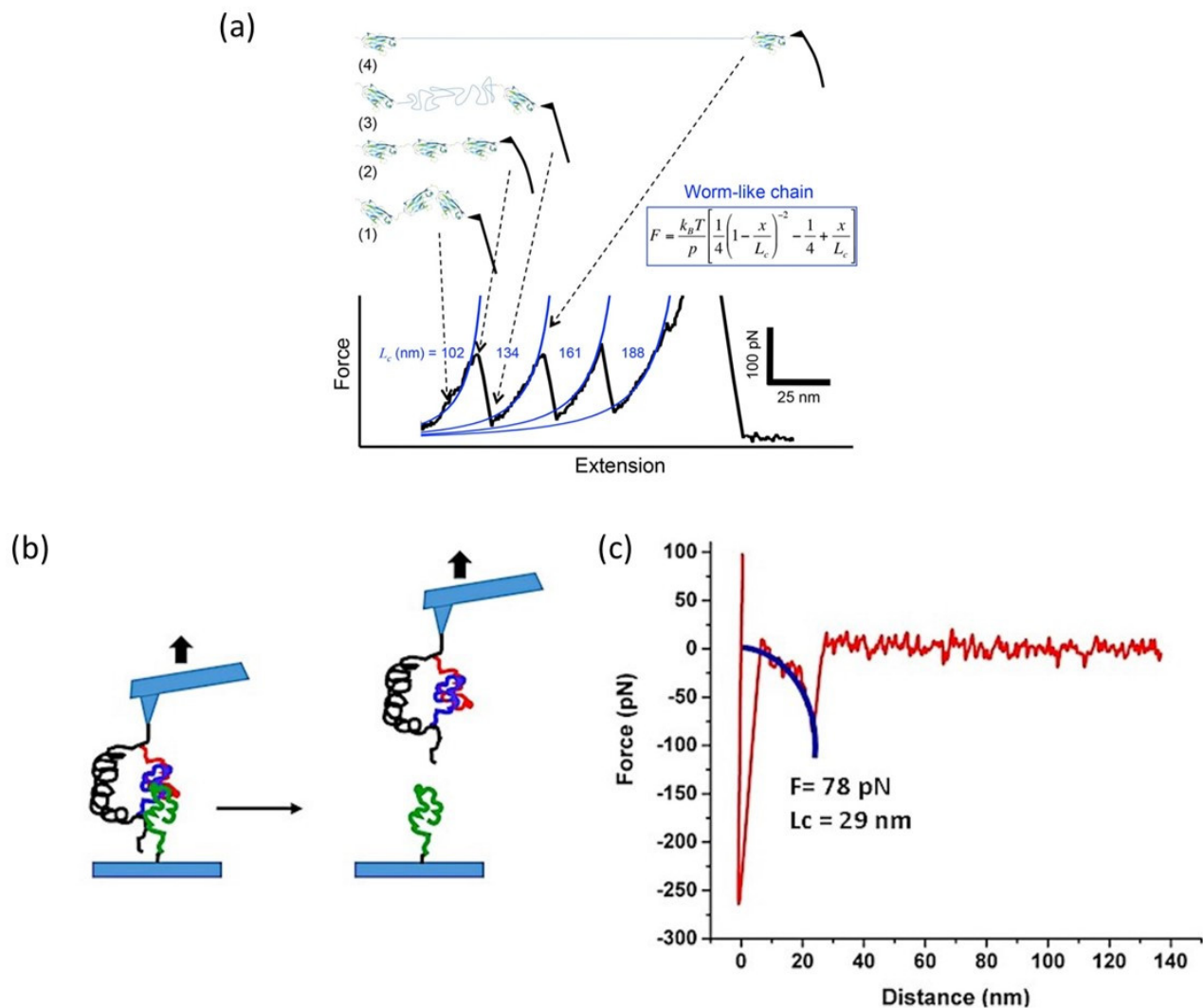


Figura 7: Schema rappresentativo dello studio di unfolding proteico mediante spettroscopia di forza (chemical force microscopy). Il regime iniziale della curva riflette l'allungamento del multimero Titina, seguito dallo spiegamento di un dominio, caratterizzato da un calo della forza. L'estensione forzata della catena polipeptidica dispiegata può essere spiegata dal modello worm like chain (WLC) [24]. (b) Rappresentazione schematica del set-up sperimentale AFM per l'analisi del trimero $A\beta_{42}$ (ciascun monomero è rappresentato da un colore diverso). (c) Tipica Curva forza-distanza; la curva blu si riferisce al WLC [25].

moduli elastici intrinseci di diverse classi di fibrille amiloidi mature (figura 8), come β -lattoglobulina, β -nucleina, $A\beta_{42}$, albumina, insulina, lisozima, e proteina Tau.

Le strategie di caratterizzazione basate sulla microscopia a forza atomica possono fornire informazioni fondamentali per comprendere il processo di aggregazione delle proteine mal ripiegate all'interno delle fibrille e delle placche amiloidi, suggerendo strategie farmacologiche innovative e altamente selettive, come la progettazione di molecole capaci di interferire le proteine mal

ripiegate impedendone l'aggregazione.



- [1] T. Hohmann, F. Deghani: *The Cytoskeleton - A Complex Interacting Meshwork.*, Cells, 8 (2019) 362.
- [2] V. De Matteis, M. Cascione, C. C. Toma, P. Pellegrino, L. Rizzello, R. Rinaldi: *Tailoring Cell Morphomechanical Perturbations Through Metal Oxide Nanoparticles*, Nanoscale Res. Lett., 14 (2019) .
- [3] S. Hsieh, T. Li, C.W. Hsieh, M.L. Kung, S.L. Hsieh, D.C. Wu, C.H. Kuo, M.H. Tai, H.M. Wang, W.J. Wu, B.W. Yeh: *Advances in cellular nanoscale force detection and manipulation*, Arab. J. Chem., 12 (2019) 3163.

- [4] B. M. Carpick, J. Bateas: *Scanning Probe Studies of Nano-scale Adhesion Between Solids in the Presence of Liquids and Monolayer Films*. Springer Handbook of Nanotechnology, Springer Handbooks. Springer, Berlin (2007).
- [5] K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts: *Surface Energy and the Contact of Elastic Solids*, Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci., 324 (1971) 1558.
- [6] B.V Derjaguin, V.M. Muller, Y. Toporov: *Effect of contact deformations on the adhesion of particles*, J. Colloid Interface Sci., 53 (1975) 314.
- [7] D. Maugis: *Adhesion of spheres: The JKR-DMT transition using a dugdale model*, J. Colloid Interface Sci., 150 (1992) 150.
D. Maugis: *Extension of the Johnson-Kendall-Roberts Theory of the Elastic Contact of Spheres to Large Contact Radii*, Langmuir, 11 (1995) 679.
- [8] I. N. Sneddon: *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*, Int. J. Eng. Sci., 3 (1965) 47.
- [9] W. Oliver, G. An. Pharr: *An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments*, J. Mater. Res., 7 (1992) 1564.
- [10] E. H. V. Parpura, P.G. Haydon: *Three-dimensional imaging of living neurons and glia with the atomic force microscope*, J. Cell Sci., 104 (1993) 427.
- [11] E. H. Philip, G. Haydon, E. F. Stanley: *Localization of Individual Calcium Channels at the Release Face of a Presynaptic Nerve Terminal*, Neuron, 13 (1994) 1275.
- [12] P. G. H. V. Parpura, R. T. Doyle, T. A. Basarsky, E. Henderson: *Dynamic Imaging of Purified Individual Synaptic Vesicles*, Neuroimage, 2 (1995) 3.
- [13] S. E. Cross, Y. Jin, J. Rao, J. K. Gimzewski: *Nano-mechanical analysis of cells from cancer patients*, Nature Nanotechnology, 2 (2007) 780.
- [14] M. Cascione, V. De Matteis, R. Rinaldi, S. Leporatti: *Atomic force microscopy combined with optical microscopy for cells investigation*, Microsc. Res. Tech., 80 (2017) 109.
- [15] M. Lekka: *Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM*, BioNanoSci., 6 (2016) 65.
- [16] W. Xu, R. Mezencev, B. Kim, L. Wang, J. McDonald, T. Sulchek: *Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells*, PLoS One, 7 (2012) .
- [17] X. Deng, F. Xiong, X. Li, B. Xiang, X. Wu, C. Guo, X. Li, Y. Li, G. Li, W. Xiong, Z. Zeng: *Application of atomic force microscopy in cancer research*, J. Nanobiotech., 16 (2018) .
- [18] A. Dongre, R.A. Weinberg: *New insights into the mechanisms of epithelial - mesenchymal transition and implications for cancer*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 20 (2019) 69.
- [19] M. Cascione, S. Leporatti, F. Dituri, G. Giannelli: *Molecular Sciences Transforming Growth Factor- β Promotes Morphomechanical Effects Involved in Epithelial to Mesenchymal Transition in Living Hepatocellular Carcinoma*, Int. J. Mol. Sc., 20 (2019) 108.
- [20] V. De Matteis: *Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation*, Toxics, 5 (2017) 1.
- [21] J. Pi, F. Yang, H. Jin, X. Huang, R. Liu, P. Yang, J. Cai: *Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin*, Bioorganic Med. Chem. Lett., 23 (2013) 6296.
- [22] V. De Matteis, M. Cascione, C.C. Toma, S. Leporatti: *Morphomechanical and organelle perturbation induced by silver nanoparticle exposure*, J. Nanopart. Res., 20 (2018) 273.
- [23] F.S. Ruggeri, J. Habchi, A. Cerreta, G. Dietler: *AFM-Based Single Molecule Techniques: Unraveling the Amyloid Pathogenic Species*, Curr. Pharm. Des., 22 (2016) 3950.
- [24] F. Rico, A. Rigato, L. Picas, S. Scheuring: *Mechanics of proteins with a focus on atomic force microscopy*, J. Nanobiotechnol., 11 (2013) .
- [25] S. Maity, Y.L. Lyubchenko: *AFM Probing of Amyloid-Beta 42 Dimers and Trimers*, Front. Mol. Biosci., 24 (2020) .



Mariafrancesca Cascione: è ricercatrice in Fisica della Materia presso il Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi" dell'Università del Salento. Si occupa di biofisica, in particolare di caratterizzazione delle proprietà morfomeccaniche cellulari in vitro, utilizzando tecniche di spettroscopia di forza combinate con indagini di fluorescenza, al fine di comprendere i meccanismi fisici sia alla base dell'insorgenza e della progressione di malattie come il cancro e le neurodegenerazione, sia quelli coinvolti nella risposta citotossica a seguito di esposizione a materiali nanostrutturati.

Valeria De Metteis: è ricercatrice presso il Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi" dell'Università del Salento. Nel 2020, è stata visiting researcher presso l'Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC) di Barcellona. Si occupa della sintesi e caratterizzazione di nanomateriali plasmonici e ibridi (organici/inorganici) con diverse proprietà chimico-fisiche, per studiare i meccanismi di interazione con cellule tumorali e valutare la risposta infiammatoria e meccanica, al fine di sviluppare nanosistemi responsivi a stimoli fisici per il trattamento del cancro e di altre patologie degenerative.

Rosaria Rinaldi: è professoressa di prima fascia di Struttura della Materia presso il Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi" dell'Università del Salento e associata all'Istituto di Microelettronica e Microsistemi del CNR. Dirige il

laboratorio di Nanobiotecnologie, Nanomedicina e Nanobioelettronica dell'Università del Salento ed è responsabile del laboratorio regionale Nabidit e del laboratorio BioOpenLab appartenente alla infrastruttura europea CERIC ERIC. È autrice di circa 330 pubblicazioni, 11 brevetti e diverse monografie.

