

PROGETTO DI RICERCA FIRB-CRISMA

Tecnologie per la manipolazione su scala nanometrica dei materiali e loro applicazione biomedica

WORKPACKAGE 2

Unità di ricerca Prof.ssa Maria Luisa Brandi

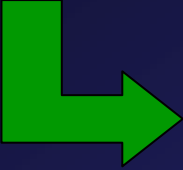


**MATERIALI NANOSTRUTTURATI
PER TESSUTI CONNETTIVI
MINERALIZZATI**

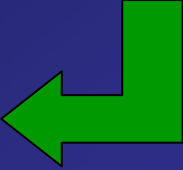


TESSUTO ADIPOSO

MIDOLLO OSSEO



COLTURE CELLULARI PRIMARIE



PREADIPOCITI
PA



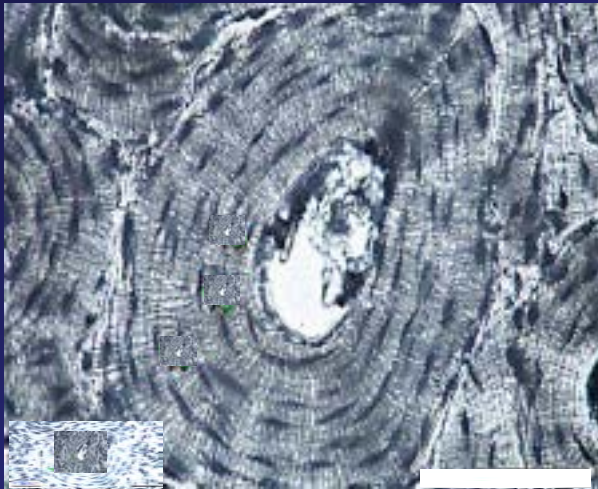
BONE MARROW CELLS
BMC

DIFFERENZIAZIONE

Dexametasone



Jaiswal
(J CELL BIOCHEM 1997)

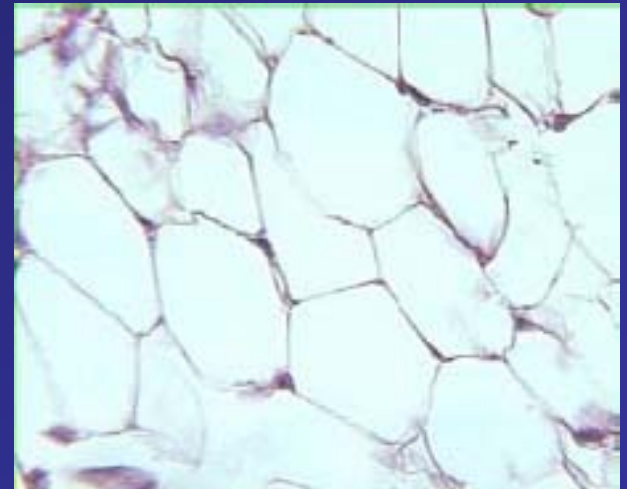


OSSO

Dexametasone + insulina



Pittenger
(SCIENCE 1999)



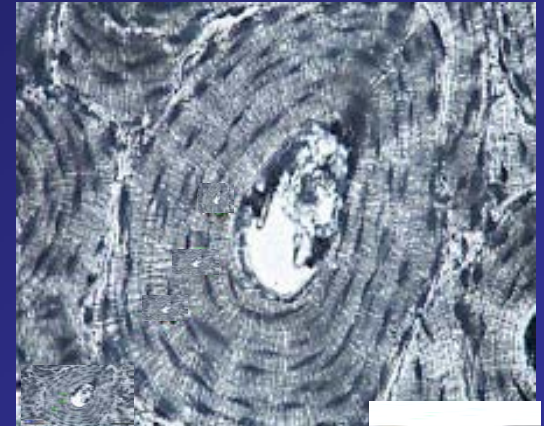
GRASSO

Mezzo di coltura DIFFERENZIANTE

F12 COON'S MODIFICATION + 10% FCS +1% Ab

+

Vitamina C
 β -glicerofosfato
Dexametasone
Vitamina D



Vitamina C: promuove la formazione e di matrice extracellulare, e la maturazione e la deposizione di tutti i tipi di collagene

β -glicerofosfato: i fosfati organici promuovono la mineralizzazione

Dexametasone: promuove differenziamento ed aumenta la calcificazione in vitro

Vitamina D: promuove la mineralizzante

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELLE LINEE CELLULARI

- CITOFLUORIMETRIA
- ANALISI QUALITATIVA DELL'ESPRESSIONE GENICA
MEDIANTE *RT-PCR*
- ANALISI QUANTITATIVA DELL'ESPRESSIONE GENICA
MEDIANTE *PCR QUANTITATIVA* E DOSAGGIO
FLUORIMETRICO DELL'ALP

CARATTERIZZAZIONE
FENOTIPICA DELLE POPOLAZIONI
CELLULARI: PROFILO DEI
MARKERS CD

Molecular Biology of the Cell
Vol. 13, 4279–4295, December 2002

Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells^D

Patricia A. Zuk,^{*†} Min Zhu,^{*} Peter Ashjian,^{*} Daniel A. De Ugarte,^{*} Jerry I. Huang,^{*} Hiroshi Mizuno,^{*} Zeni C. Alfonso,[‡] John K. Fraser,[‡] Prosper Benhaim,^{*} and Marc H. Hedrick^{*}

	PA	BMC
CD Antigen		
CD13	+	+
CD14	-	-
CD16	-	-
CD29	+	+
CD31	-	-
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD49d (integrina $\alpha 4$)	+	-
CD56	-	-
CD61	-	-
CD62E	-	-
CD71	+	+
CD90	+	+
CD104	-	-
CD105/SH2	+	+
CD106 (VCAM)	-	+
SH3	+	+
STRO-1	+	+

ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DA CELLULE

1. Pellet di cellule (10^5 - 10^6 di cellule)
2. Aggiunta del reagente TRIzol (1 ml), omogenizzazione, incubazione, aggiunta di cloroformio (0,2 ml), agitazione, incubazione, centrifugazione: *la miscela si separa in una fase rossa (fenolo-cloroformio), un'interfase ed una fase acquosa superiore incolore contenente l'RNA.*
3. Recupero della fase acquosa e precipitazione con isopropanolo (1 ml).
4. Centrifugazione, eliminazione del sopranatante, lavaggio dei sali con etanolo al 70% (1 ml), centrifugazione e rimozione del liquido sopranatante.
5. Il precipitato è asciugato all'aria per eliminare ogni traccia di etanolo e solubilizzato in 50 μ l di H₂O sterile e RNase-free.

CONTROLLO QUALITA' e QUANTITA' DELL'RNA ESTRATTO

Qualità (integrità e contaminazione da genomico) → gel di agarosio 0,8%

Quantità → lettura spettrofotometrica a $\lambda = 260\text{nm}$

SINTESI DI cDNA DALL'RNA TOTALE

1 µg di RNA totale di ciascun campione è stato reversato mediante l'utilizzo di oligo(dT) ed un kit di retro-trascrizione (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega), e conservato a -20°C.

CONTROLLO DELLA SINTESI DI cDNA

analisi dell'espressione del gene housekeeping *β-ACTINA*.

Analisi qualitativa dell'espressione genica mediante RT-PCR nelle cellule differenziate

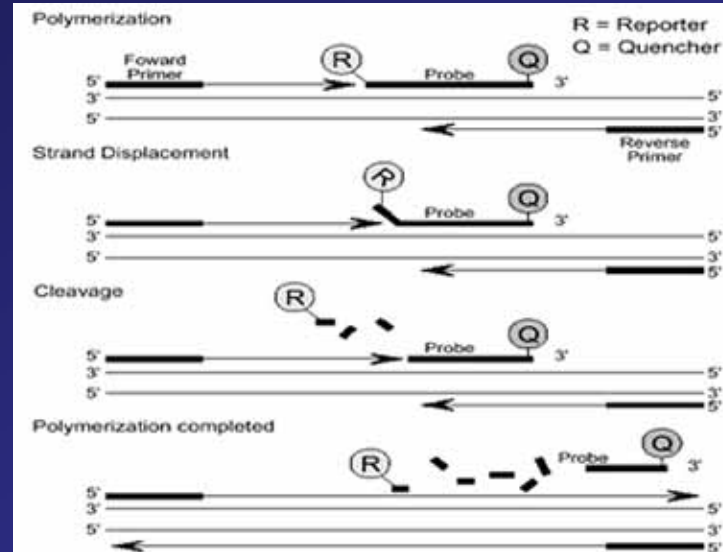
LINEA CELLULARE	GENE
OSSO	Osteonectina
	Osteopontina
	Osteocalcina
	CBFA1 (Core binding factor α -1)
	Collagene tipo I α 1
	Bone morphogenic protein (BMP2)
	Recettore della Vitamina D
	Recettore del PTH
GRASSO	aP2 (adipocyte fatty acid binding protein)
	LPL (lipoprotein lipase)
	PPAR γ 1 (peroxisome-proliferating activated receptor γ 1)
	PPAR γ 2 (peroxisome-proliferating activated receptor γ 2)
	Leptina
	GLUT-4 (glucose transporter 4)

Analisi quantitativa dell'espressione genica

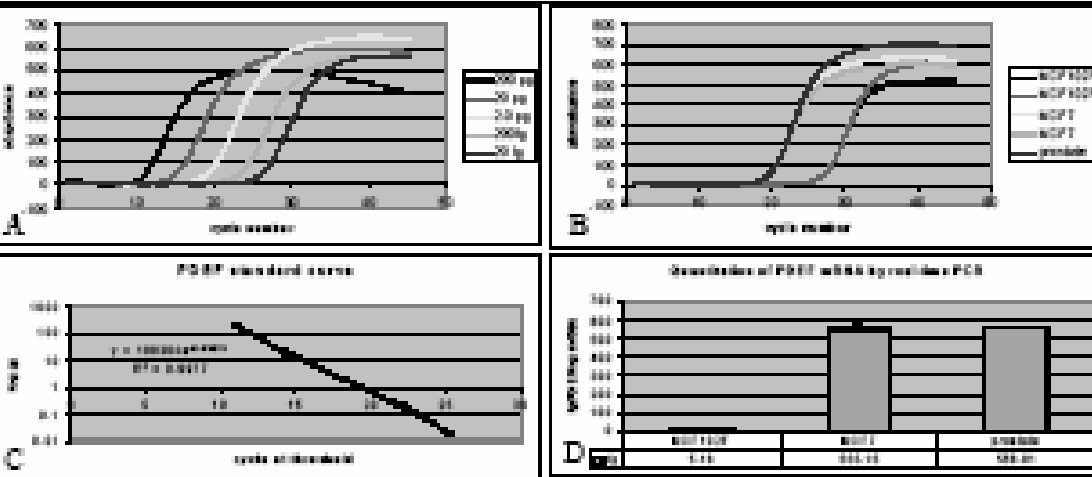
Sonde TaqMan legate ad un fluoroforo reporter in 5' (Fam) e ad un quencher (BQ1) al 3' (100 nM finale)

Primers disegnati su esoni diversi (Proligo) (ciascuno 500 nM finale)

1x QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen)



Lyamiche, V., et al. Science 260, 778-783 (1993)



STRUMENTO utilizzato:

Stratagene Mx3000-P
Detection System con
relativo software per
l'elaborazione dei dati

GENI IMPLICATI NELLA DIFFERENZIAZIONE IN SENSO OSTEOLASTICO

RUNX2 e SMAD1

- markers di differenziazione precoce
- regolano la trascrizione di altri geni implicati nella differenziazione in senso osteoblastico (es.: collagene di tipo I)

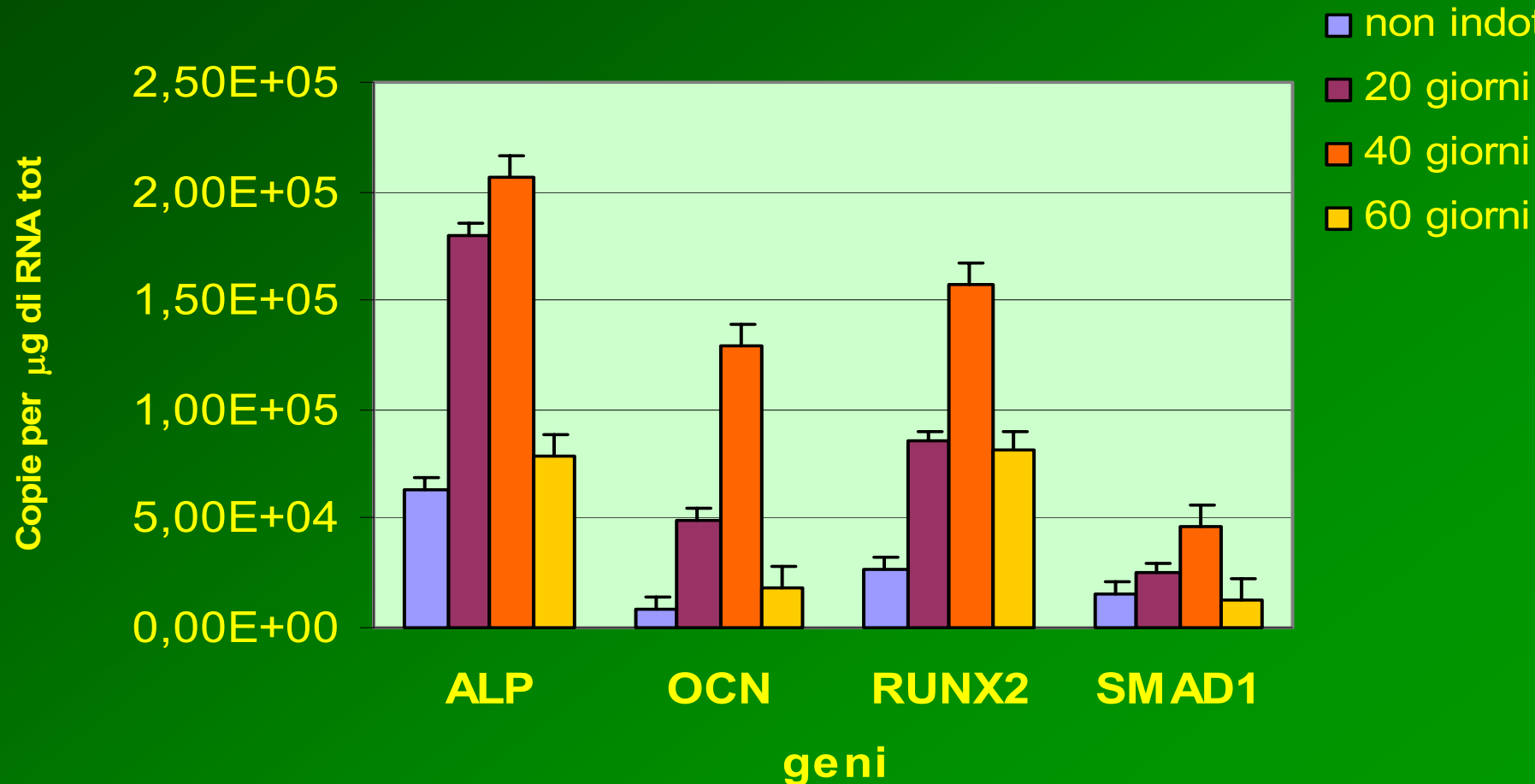
Fosfatasi Alcalina ossea (ALP)

- marker di differenziazione intermedio, quando le cellule iniziano a mineralizzare la matrice, la quantità di ALP diminuisce ed aumenta quella della osteocalcina
- negli osteoblasti determina la lisi del pirofosfato

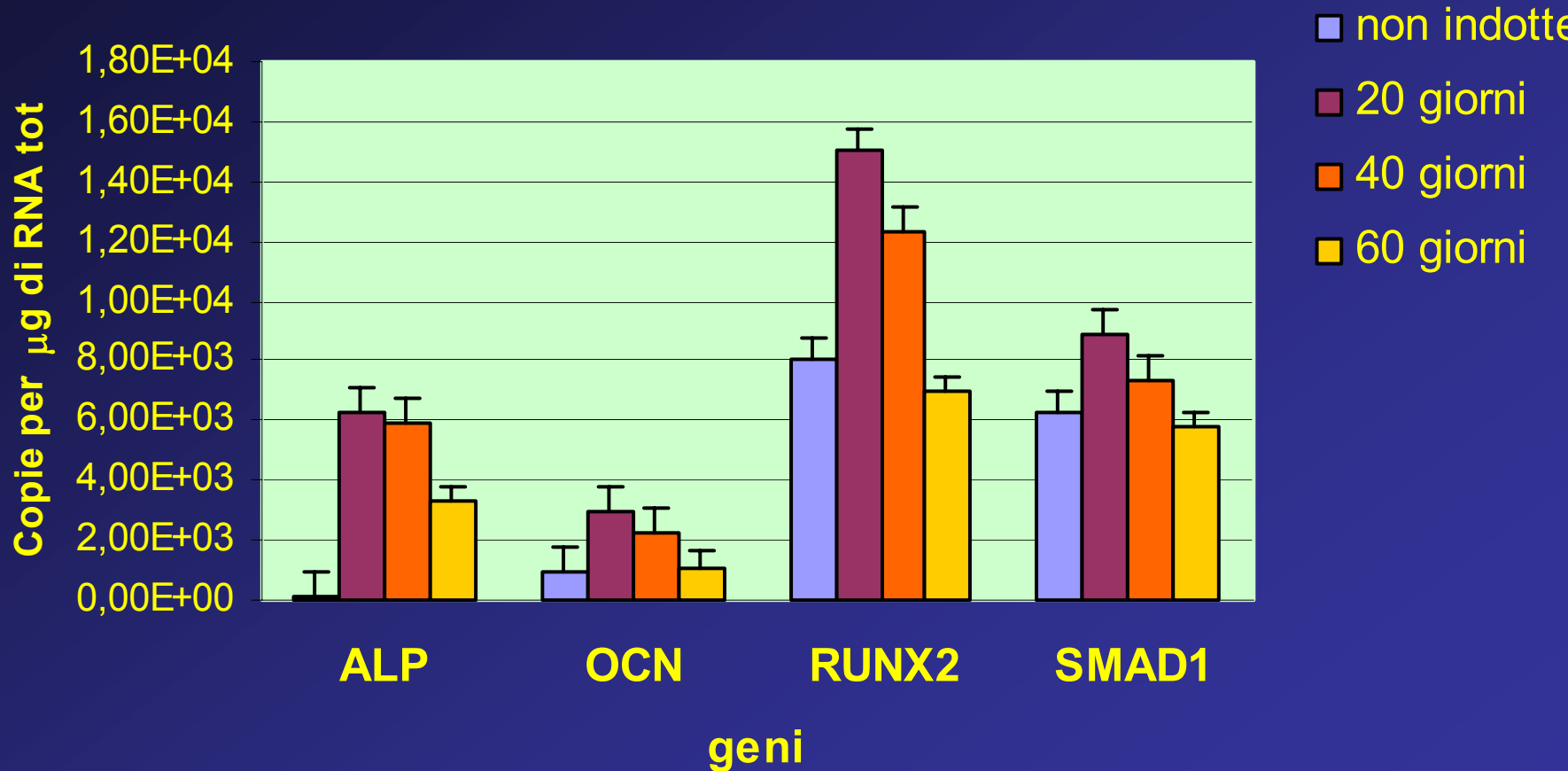
Osteocalcina (OCN)

- marker di differenziazione tardivo, interagisce con l'idrossiapatite della matrice
- proteina estremamente specifica per l'osso, prodotta praticamente solo dagli osteoblasti

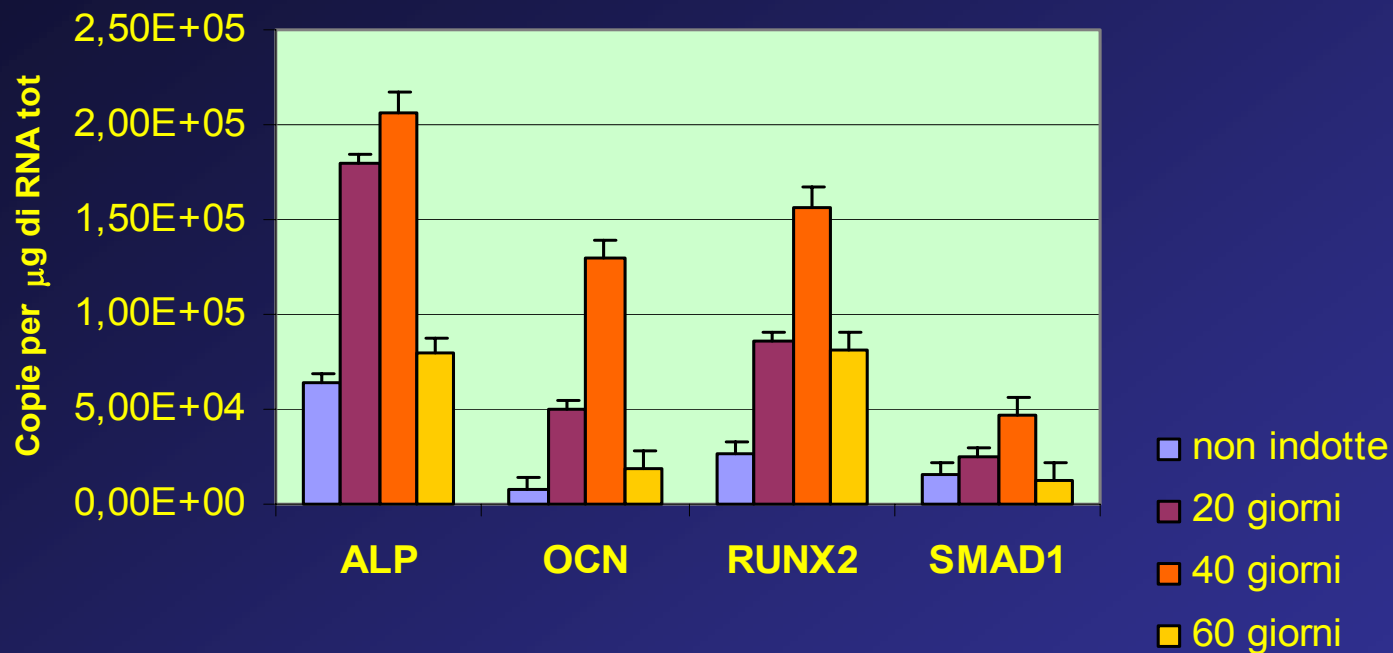
Espressione dei geni caratterizzanti l'induzione in senso osteoblastico nella linea cellulare BMC1



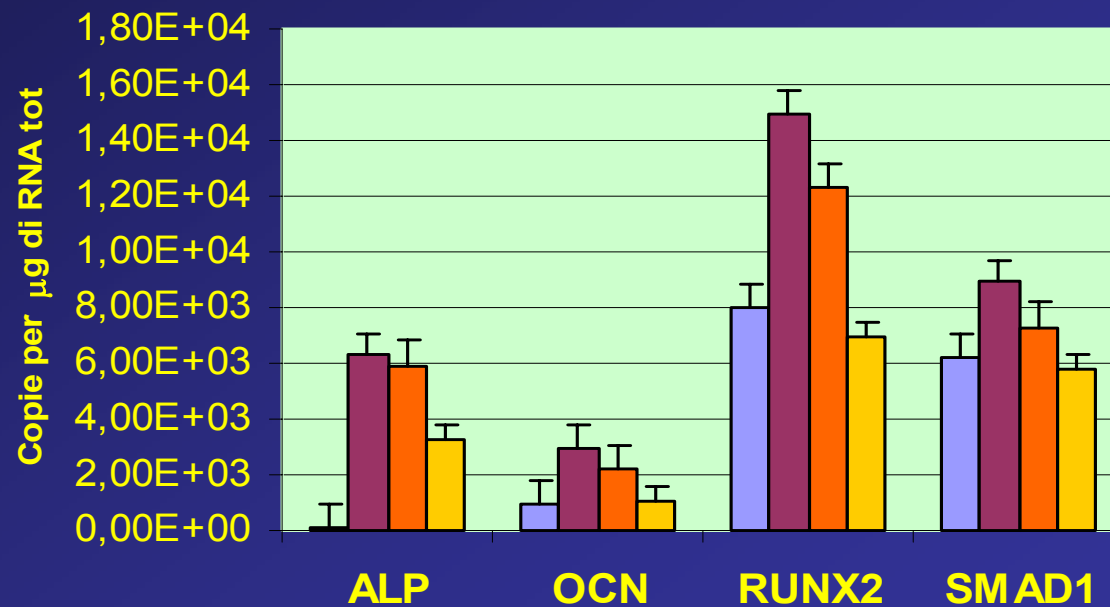
Espressione dei geni caratterizzanti l'induzione in senso osteoblastico nella linea cellulare PA1



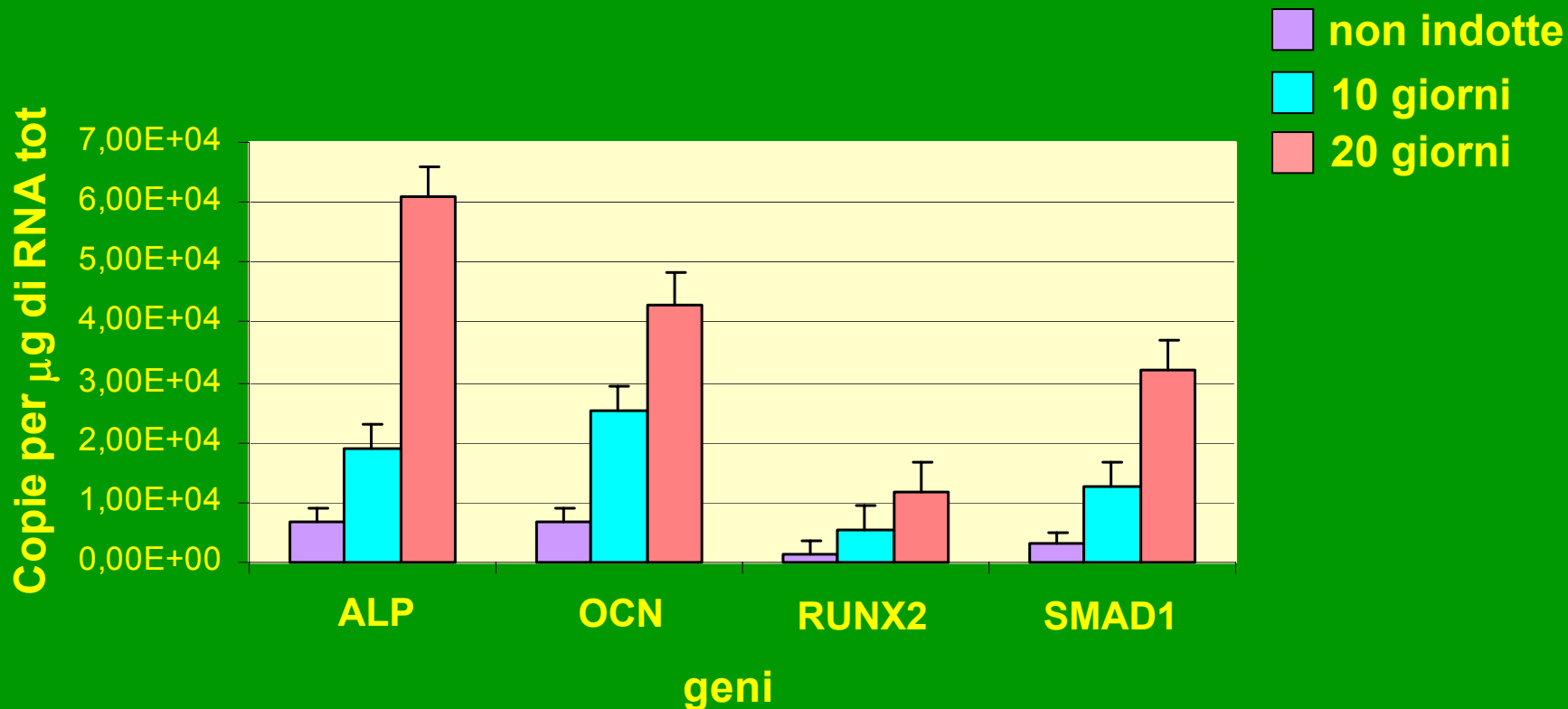
BMC1



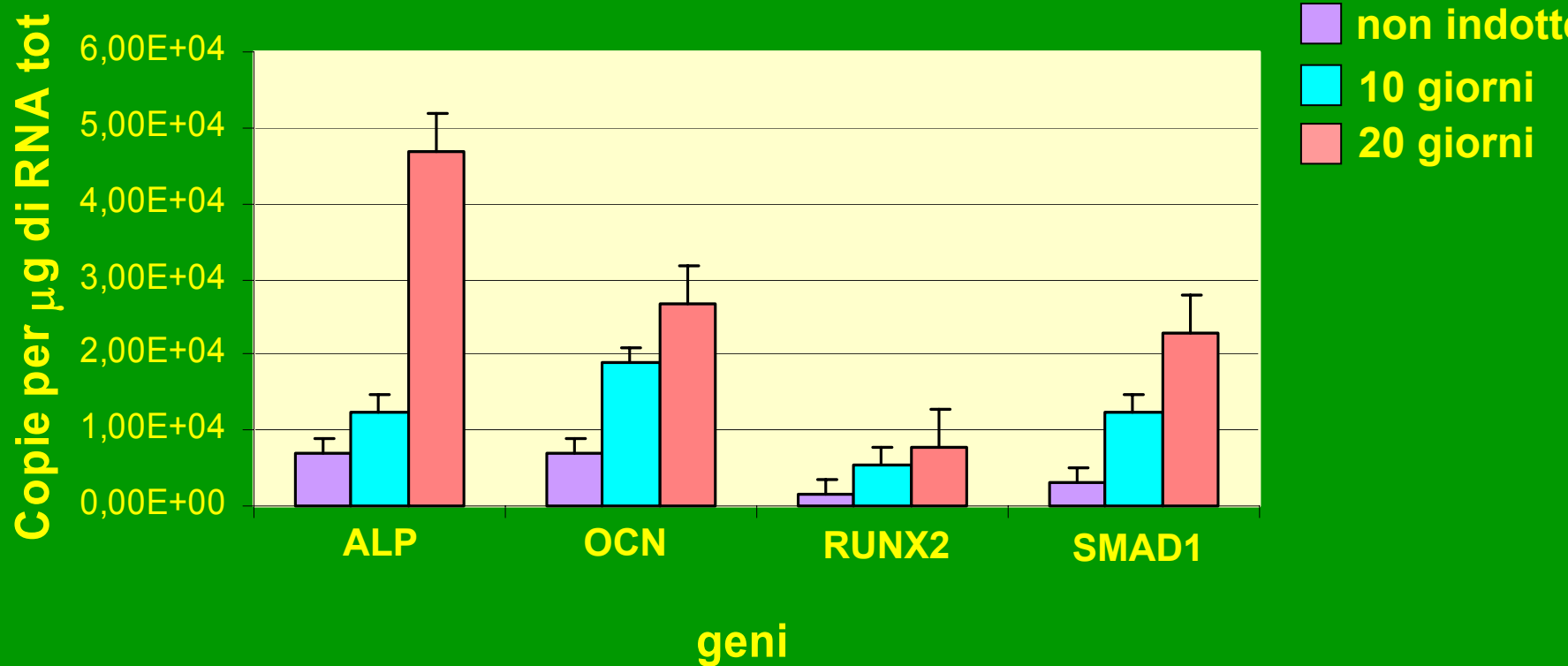
PA1



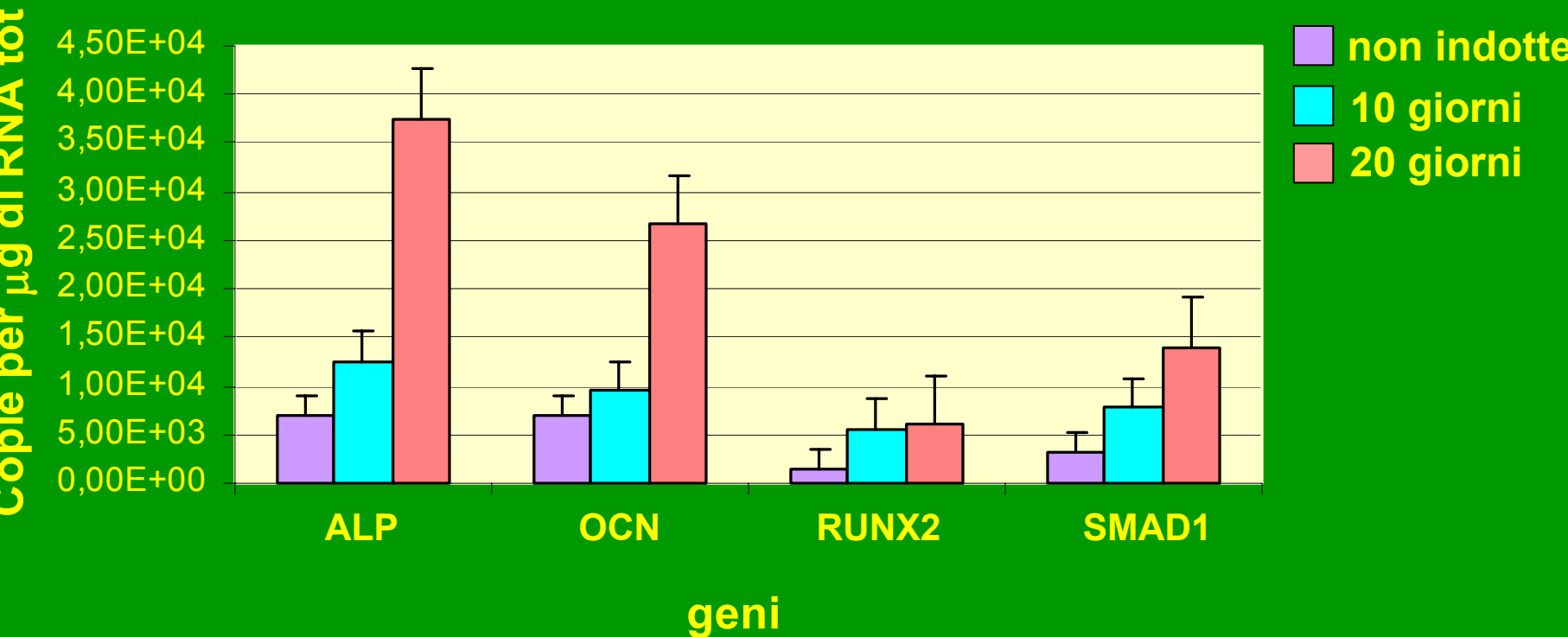
Espressione dei geni caratterizzanti l'induzione in senso osteoblastico nelle cellule BMC1 indotte a tempi brevi su POLISTIRENE



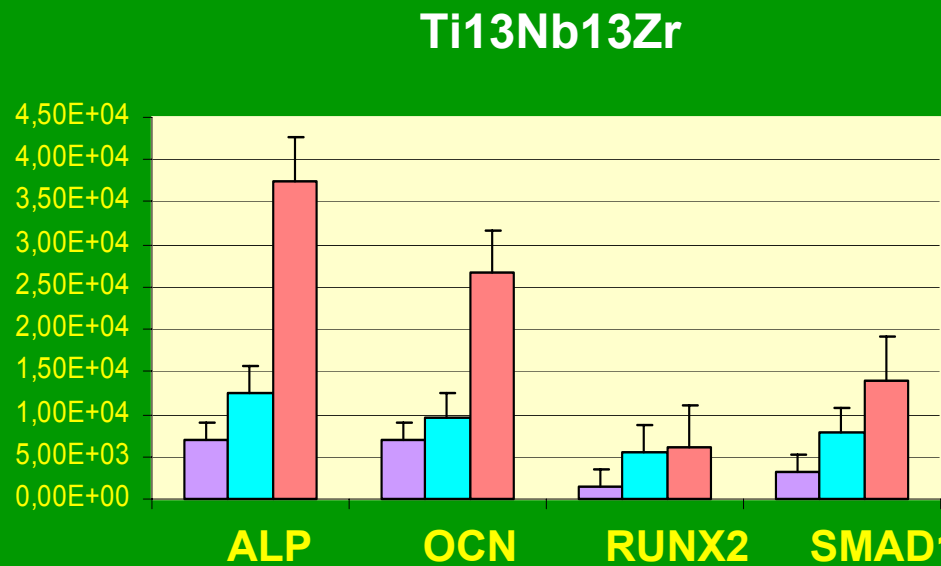
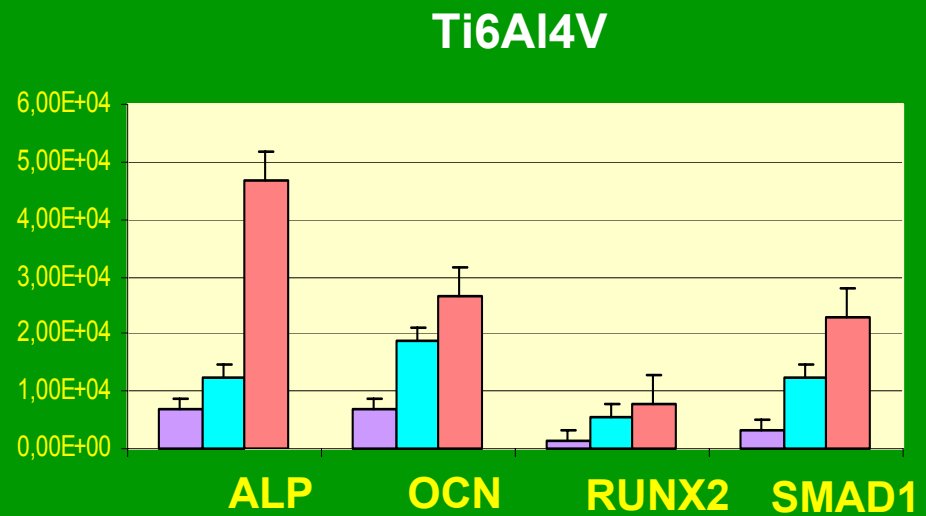
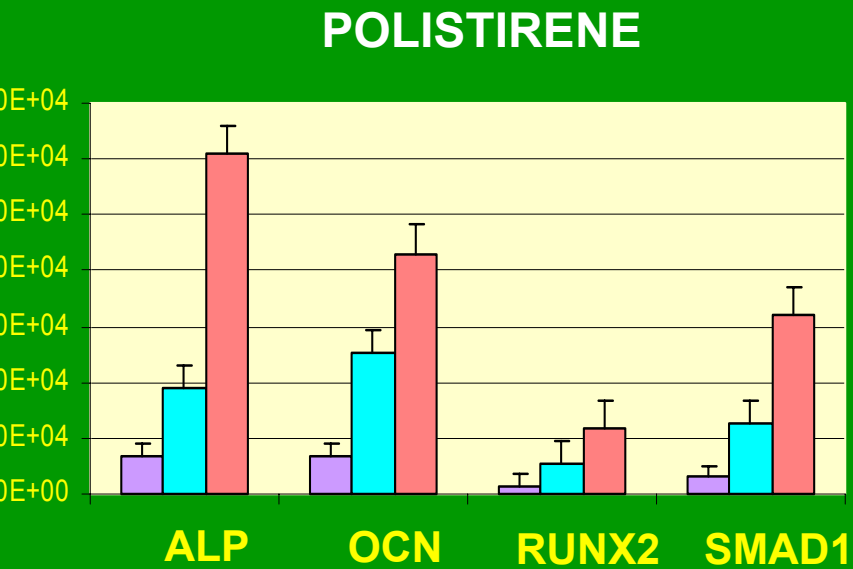
Espressione dei geni caratterizzanti l'induzione in senso osteoblastico nelle cellule BMC1 indotte a tempi brevi su Ti6Al4V



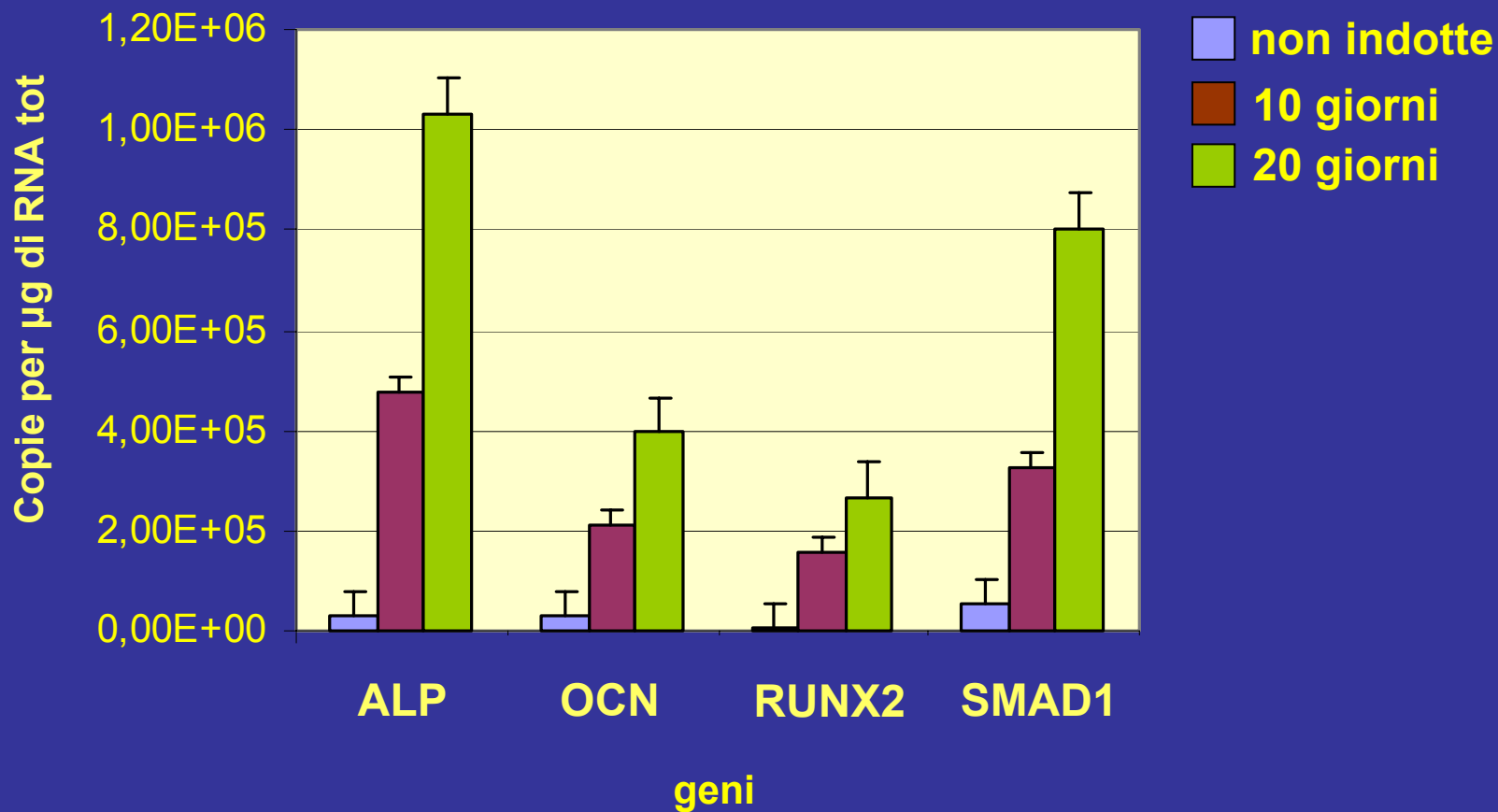
Espressione dei geni caratterizzanti l'induzione in senso osteoblastico nelle cellule BMC1 a tempi brevi su Ti13Nb13Zr



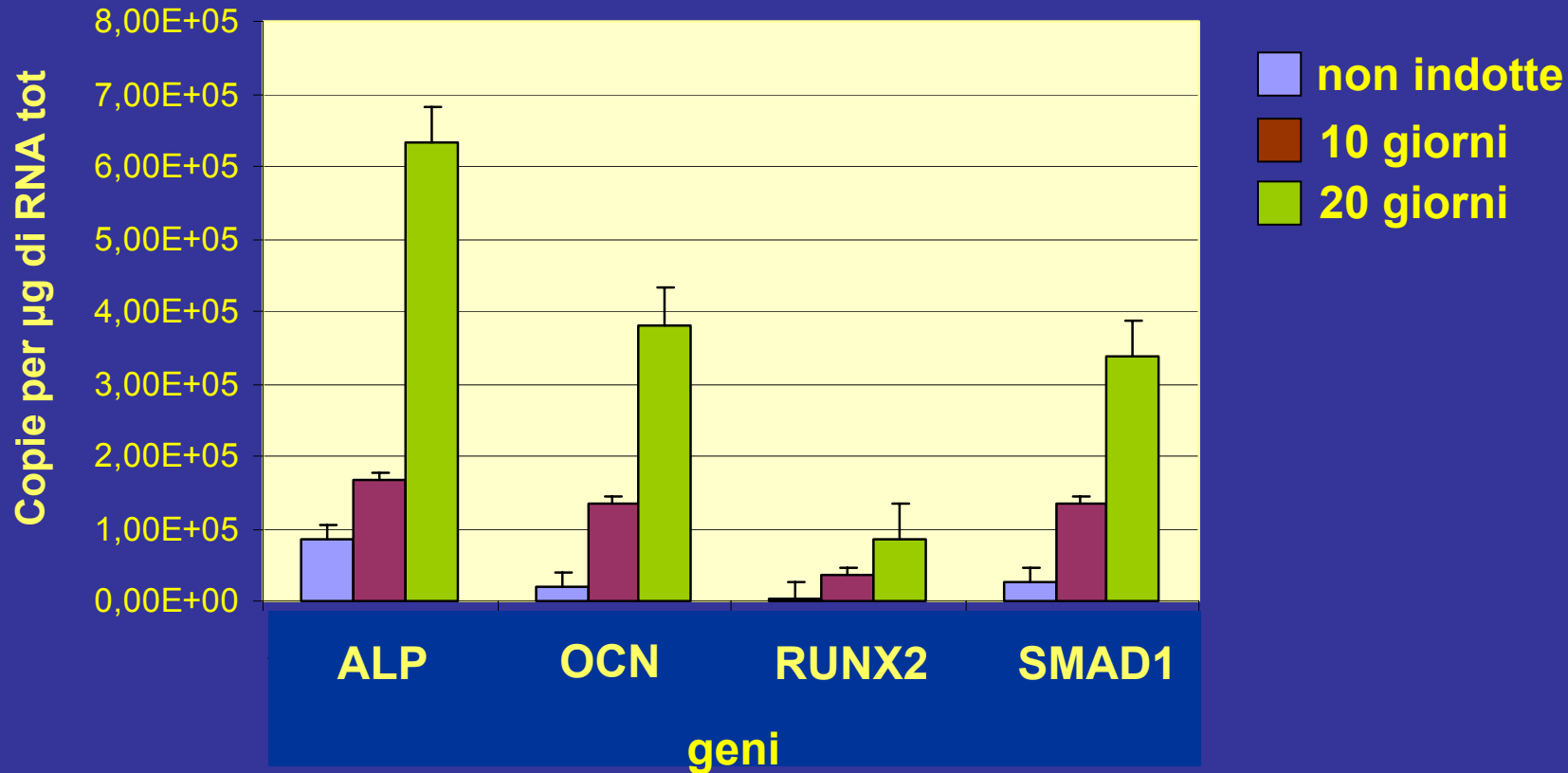
BMC1



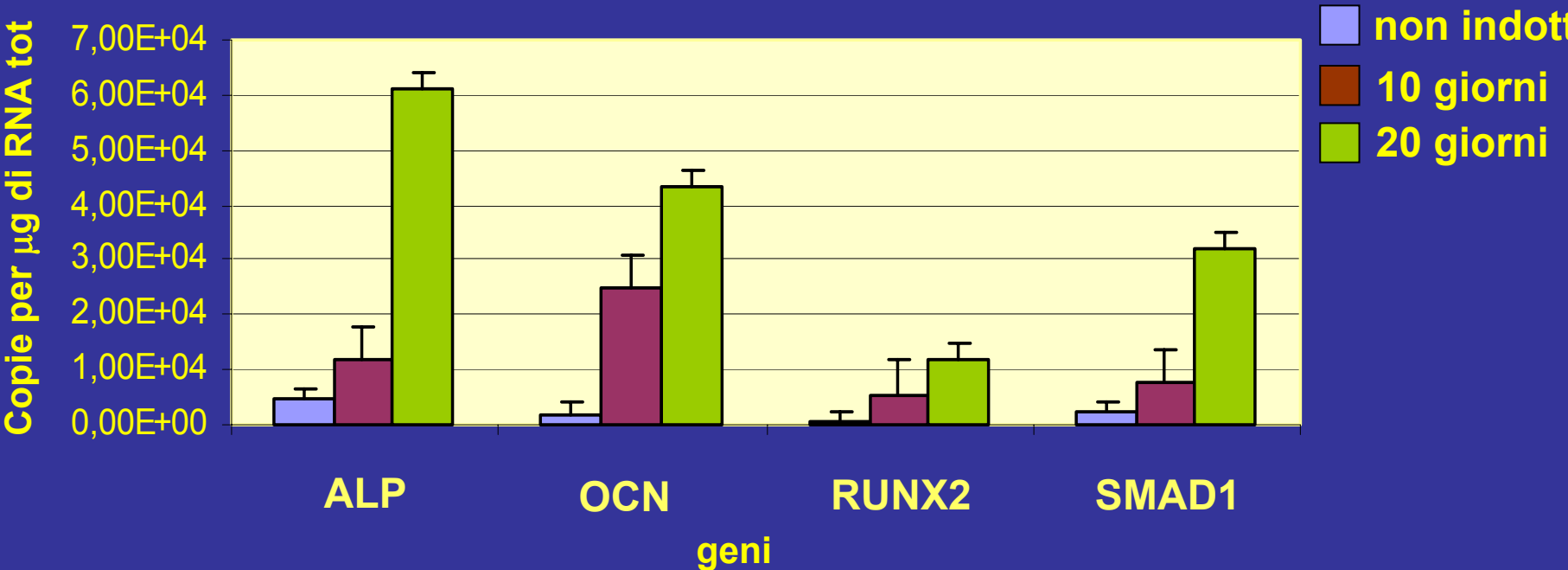
Espressione dei geni caratterizzanti l'induzione in senso osteoblastico nelle cellule PA1 indotte a tempi brevi su POLISTIRENE



Espressione dei geni caratterizzanti l'induzione in senso osteoblastico nelle cellule PA1 indotte a tempi brevi su Ti6Al4V

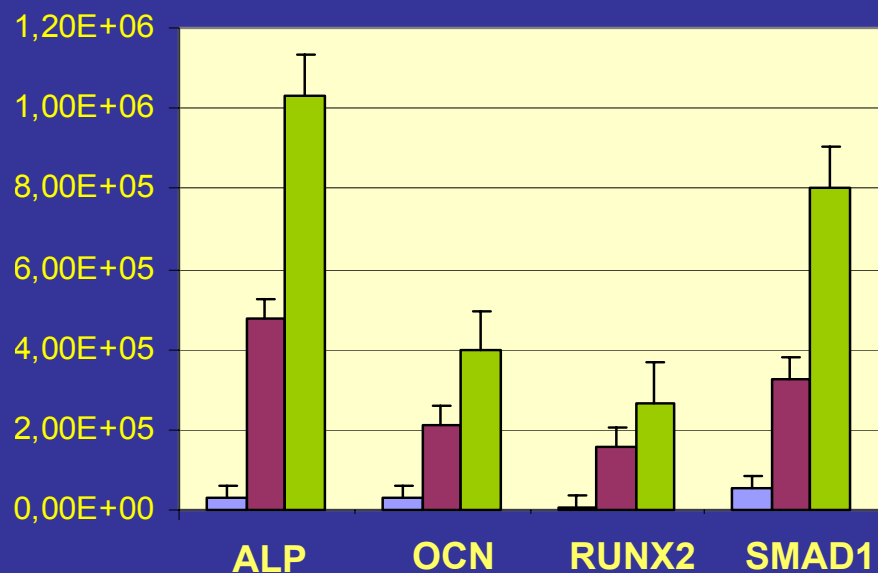


Espressione dei geni caratterizzanti l'induzione in senso osteoblastico nelle cellule PA1 a tempi brevi su Ti13Nb13Zr

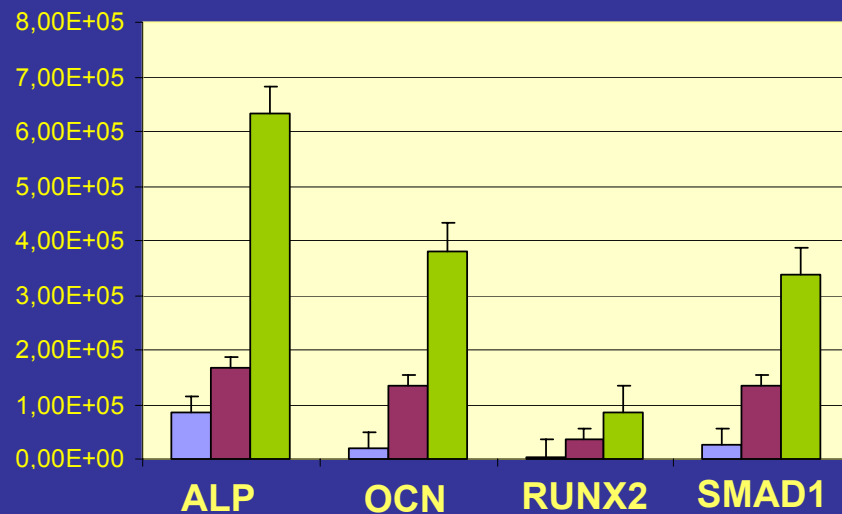


PA1

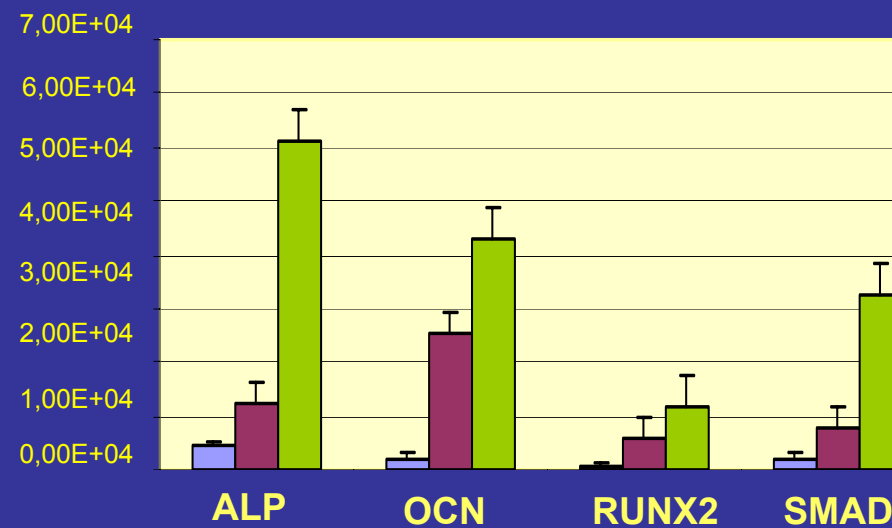
POLYSTIRENE



Ti6Al4V



Ti13Nb13Zr



DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI ALP MEDIANTE DOSAGGIO FLUORIMETRICO

- ✓ Cellule seminate in piastre da 12 pozzetti (circa 120.000 cellule/pozzetto)
- ✓ Induzione in senso osteoblastico per 0-10-20 giorni
- ✓ Dosaggio: eliminazione del mezzo condizionato

aggiunta di tampone Tris HCl pH 8.3 + 4-MUP

incubazione a 37°C per tempo variabile da 15' a 2 h

lettura al fluorimetro con λ_{ex} 365 nm e λ_{em} 445 nm

4-METILUMBELLIFERILFOSFATO
(4-MUP)



4-METILUMBELLIFERONE
(4-MU)



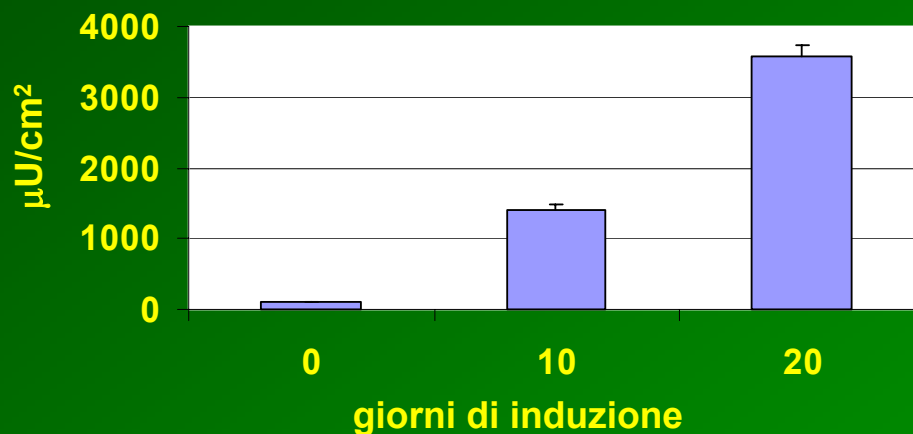
FOSFATO
(P)

- ✓ Espressione di ALP come attività enzimatica/unità di superficie ($\mu\text{U}/\text{cm}^2$)*

* Unità di ALP = quantità di enzima che idrolizza 1 μM di 4-MUP a 4-MU in 1 min a 37°C a pH 8.3

Determinazione dell'attività di ALP mediante DOSAGGIO FLUORIMETRICO nella linea BMC1 coltivata in condizioni osteogeniche

Polistirene



Ti6Al4V

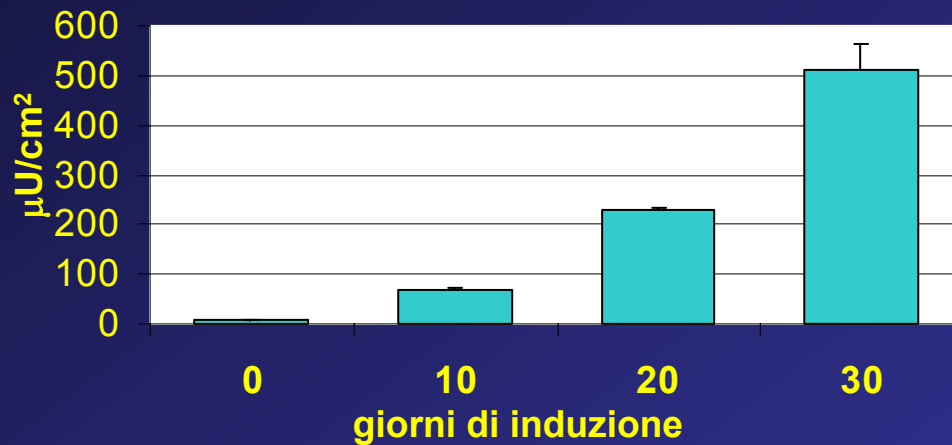


Ti13Nb13Zr

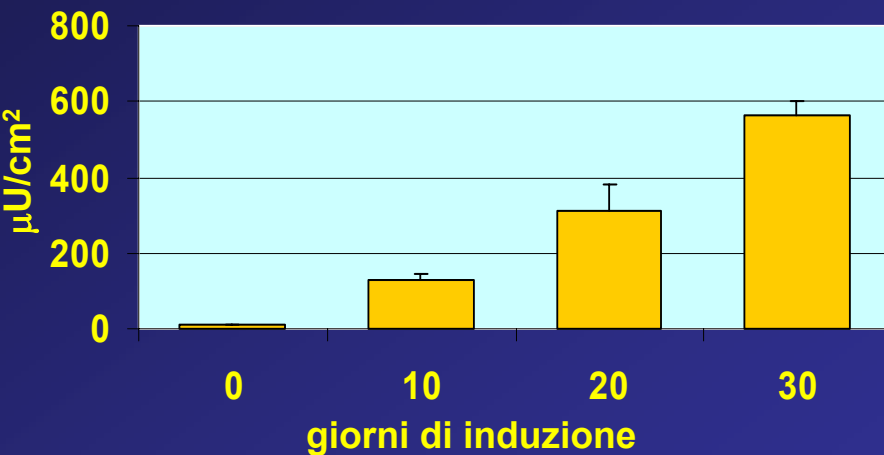


Determinazione dell'attività di ALP mediante DOSAGGIO FLUORIMETRICO nella linea PA1 coltivata in condizioni osteogeniche

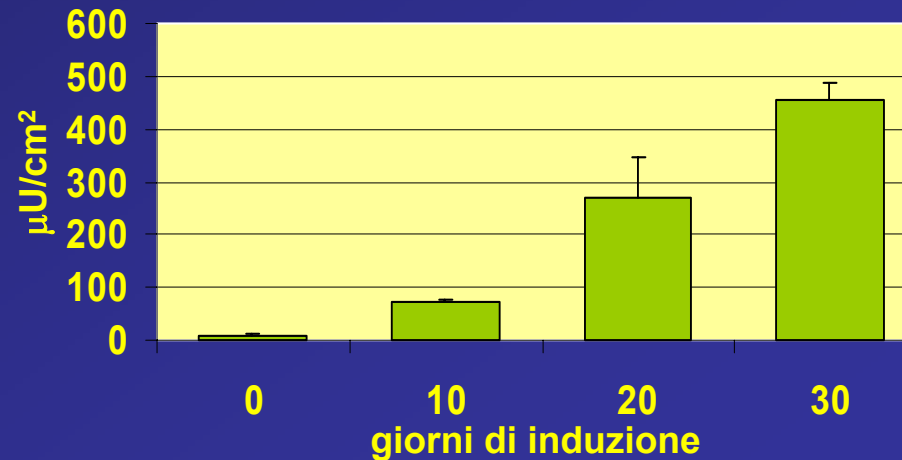
Polistirene



Ti6Al4V



Ti13Nb13Zr



CONCLUSIONI

- ✓ Le due linee cellulari primarie BMC1 e PA1 utilizzate negli esperimenti rappresentano un buon modello per lo studio della differenziazione in senso osteoblastico su biomateriali nanostrutturati.
- ✓ Lo stadio di differenziazione, valutato mediante dosaggio dell'attività enzimatica ALP e misura del livello di espressione dei geni *ALP*, *OCN*, *RUNX2* e *SMAD1*, delle cellule indotte su biomateriali nanostrutturati Ti13Nb13Zr e non nanostrutturati Ti6Al4V è paragonabile a quello raggiunto su plastica da coltura.