



SCUOLA
NORMALE
SUPERIORE

RELAZIONE ATTIVITA' ANNUALE DEI PERFEZIONANDI/DOTTORANDI – SECONDO ANNO
REPORT ON THE PHD ACTIVITY – SECOND YEAR

NOME E COGNOME NAME AND SURNAME	Roberta Mezzena
DISCIPLINA PHD COURSE	Nanoscienze

CORSI FREQUENTATI CON SOSTENIMENTO DI ESAME FINALE ATTENDED COURSES (WITH FINAL EXAM)	VOTAZIONE RIPORTATA MARK	NUMERO DI ORE HOURS
Ciclo di seminari – Biophysical Sciences (codice NS01633)	30/30	45

CORSI FREQUENTATI SENZA SOSTENIMENTO DI ESAME FINALE ATTENDED COURSES (ATTENDANCE ONLY)	NUMERO DI ORE HOURS

ALTRE ATTIVITÀ FORMATIVE (SEMINARI, WORKSHOP, SCUOLE ESTIVE, ECC.) – DESCRIZIONE OTHER PHD ORIENTED ACTIVITIES (SEMINARS, WORKSHOPS, SUMMER SCHOOLS, ETC) – DESCRIPTION	NUMERO DI ORE HOURS
NANO Colloquia 24/10/2019: Matteo Agostini, “Surface-acoustic-wave based biomedical devices: from basic research to industrial application”	1
NANO Colloquia 20/02/2020: Ambra Del Grosso, “Nanoparticle-mediated enzyme replacement therapy and autophagy modulation in Krabbe disease”	1
NANO Colloquia 18/06/2020: Melissa Santi “Targeting strategies to improve cancer treatment”	1
European School On Nanosciences & Nanotechnologies 2020 Online 24/08/2020 – 04/09/2020	65



ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA (MAX. 8.000 CARATTERI)*

RESEARCH ACTIVITY (MAX. 8000 CHARACTERS)

Al primo anno di perfezionamento mi sono concentrata, da un lato, sulla realizzazione di scaffold microstrutturati in chitosano e, dall'altro, mi sono focalizzata sullo studio della malattia di Krabbe (KD) *in vitro*, in modello di fibroblasti primari. Durante questo secondo anno ho quindi portato avanti entrambi i progetti nati l'anno precedente.

La malattia di Krabbe è una malattia genetica rara da accumulo lisosomiale che causa una degenerazione progressiva a livello del sistema nervoso centrale (CNS) e periferico (PNS). È causata dalla mutazione del gene GALC, che codifica per l'enzima galactosylcerebrosidase, fondamentale per il catabolismo dei derivati della ceramide, in particolare per la psicosina (PSY) che in sua assenza si accumula a livello di CNS e PNS. Varie tipologie di trattamento per il recupero enzimatico sono oggetto di studio, come la terapia genica e la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), purtroppo però il coinvolgimento di diversi pathway molecolari fondamentali per la sopravvivenza cellulare (tra cui stress ossidativo, omeostasi, autofagia e infiammazione) fa sì che la regressione della sintomatologia sia ancora un target lontano. Un miglioramento, come già proposto in letteratura e presente in diversi trial clinici per altre malattie da accumulo lisosomiale, è l'utilizzo combinato di diversi trattamenti, agendo sia tramite ERT che a livello dei processi cellulari compromessi, come ad esempio l'autofagia e i processi catabolici messi in atto per un corretto equilibrio cellulare. L'autofagia è un processo fondamentale (che garantisce la degradazione e il ricircolo dei componenti) implicato in molte funzioni cellulari e disregolato nella KD. Ad esempio, le cellule per muoversi devono aderire all'ambiente esterno con degli ancoraggi proteici detti adesioni focali (FAs), muoversi su questi ancoraggi, e poi rilasciare l'ancoraggio per crearne uno nuovo: il ricircolo di queste componenti avviene grazie all'autofagia. E infatti diversi punti di contatto tra l'autofagia e i meccanismi di meccano-trasduzione sono riportati in letteratura. Per questa ragione ho effettuato esperimenti di migrazione *in vitro* su fibroblasti primari estratti dal topo Twitcher (modello murino di KD che presenta due copie mutate del gene GALC) trovando disregolate alcune risposte nelle cellule GALC-deficient (TWI) rispetto al corrispettivo sano. Dai dati sull'adesione emerge che le cellule GALC-deficient tendono ad avere un numero maggiore di FAs per cellula. Inoltre, dai dati di migrazione collettiva, valutata con esperimenti di wound healing (in cui le cellule sono presenti su due fronti distanti pressappoco 500 micrometri e devono richiudere il gap) emerge che le cellule GALC-deficient sono più lente nel richiudere lo spazio tra i due fronti. L'aumento di FAs e la riduzione nella velocità di migrazione fa pensare che le cellule TWI abbiano un ingolfamento nel turnover delle FAs, fondamentali per la migrazione cellulare. La mia ipotesi vede nell'assenza di GALC la causa di affaticamento del processo autofagico necessario per il riciclo delle componenti necessarie alla migrazione e questo determina un rallentamento del movimento cellulare.



Inoltre, ho messo a punto un protocollo di estrazione di cellule primarie neurali partendo da tessuti di corteccia cerebrale da singoli topi, in particolare astrociti, oligodendrociti e microglia. Questo protocollo serve per ottenere cellule primarie neurali come modello per la KD e verranno quindi utilizzate per condurre degli esperimenti *in vitro* per testare la clearance della PSY con l'utilizzo di nanoparticelle caricate con il GALC per lo sviluppo di una nuova terapia ERT per la KD. In parallelo verranno condotti degli studi di migrazione *in vitro*, valutando eventuali deficit ed effetti di modulatori dell'autofagia.

Riguardo allo studio dei meccanismi di meccano-trasduzione e migrazione, ho lavorato all'analisi di questi processi in un modello patologico del neurosviluppo contribuendo al lavoro "Study of adhesion and migration dynamics in Ubiquitin E3A ligase (UBE3A)-silenced SYSH5Y neuroblastoma cells by micro-structured surfaces". UBE3A svolge una funzione fondamentale per quanto riguarda il corretto sviluppo cerebrale e livelli non corretti di questa proteina provocano importanti perturbazioni nel sistema: infatti la sua mancanza causa la Sindrome di Angelman. Questo studio ha mostrato come l'assenza di UBE3A determini un deficit nei meccanismi di meccanosensing mediato da adesioni focali. C'è una riduzione nella maturazione delle FAs, sebbene la loro densità rimanga invariata. La migrazione delle cellule neuronali Ube3a-silenced, in generale, non risulta significativamente compromessa ma mostra un lieve ritardo nella migrazione collettiva.

Infine, ho collaborato all'implementazione della procedura di produzione di film di chitosano microstrutturati per applicazioni nella rigenerazione nervosa. Il protocollo di solvent casting è stato semplificato, velocizzato e standardizzato, ottimizzandolo. In dettaglio la nuova procedura richiede:

1. Preparazione di una soluzione di chitosano con agitazione overnight, per ottenere soluzioni omogenee.
2. Deposizione della soluzione sulla mold patternata ed evaporazione del solvente a temperatura ambiente per 10-12 ore, così da avere film meno rigidi e fragili.
3. Neutralizzazione per 30 minuti con soluzione 0.5% NaOH, così da stressare meno le maglie del polimero e avere un substrato più cell-friendly rispetto al precedente.

Questo ha abbattuto i tempi di realizzazione dei film di chitosano da 11 ore a 1 ora e 30 minuti come tempo-uomo. Infine, la procedura è stata trasferita completamente fuori dalla cleanroom, rendendola ripetibile anche in altri laboratori privi di questa tipologia di strumentazioni.

Questi film microstrutturati sono poi stati testati *in vitro* con una linea di Schwannoma (RT4-D6P2T) in quanto, in presenza di un danno ai nervi periferici, le cellule di Schwann sono tra le prime a reagire e colonizzare la ferita. Quindi è stata testata l'abilità dei film di chitosano patternati nell'aumentare la proliferazione e guidare la migrazione collettiva *in vitro*. Sono stati utilizzati tre pattern con anisotropia e asimmetria diversa (grating GR, triangoli isosceli ISO e



SCUOLA
NORMALE
SUPERIORE

triangoli scaleni SCA) con creste e valli di 4-6 micrometri, ed è stato possibile osservare come, in generale, questi pattern abbiano la capacità di modificare la morfologia e la motilità cellulari. Nel dettaglio, i substrati a triangoli SCA hanno permesso una maggiore adesione e proliferazione nonché una migliore migrazione delle cellule di Schwann. L'organizzazione citoscheletrica delle fibre di actina risulta ben orientata rispetto al pattern ma presenta una dispersione notevolmente maggiore sui substrati SCA in confronto agli altri. Simili risultati sono stati ottenuti anche analizzando la morfologia dei nuclei.

Questi risultati fanno presagire quanto possa essere interessante l'utilizzo di questi substrati anisotropici asimetrici a triangoli SCA per la rigenerazione dei nervi periferici.

*se si intende sottoporre una relazione di ricerca più estesa, utilizzare il campo per una descrizione sintetica e allegare il documento in formato .pdf

If you are going to submit a longer report, please fill the box with a synthetic abstract and attach a document in pdf format

EVENTUALI PUBBLICAZIONI PUBLICATIONS (IF AVAILABLE)

Study of adhesion and migration dynamics in Ubiquitin E3A ligase (UBE3A)-silenced SYSH5Y neuroblastoma cells by micro-structured surfaces Roberta Mezzena, Cecilia Masciullo, Sara Antonini, Federico Cremisi, Martin Scheffner, Marco Cecchini and Ilaria Tonazzini, *Nanotechnology*2020 <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6528/abbb03/meta>

NOME DEL RELATORE THESIS ADVISOR

Relatore: Marco Cecchini

Supervisore interno: Gian Michele Ratto

DATA

18/10/2020

FIRMA

SIGNATURE