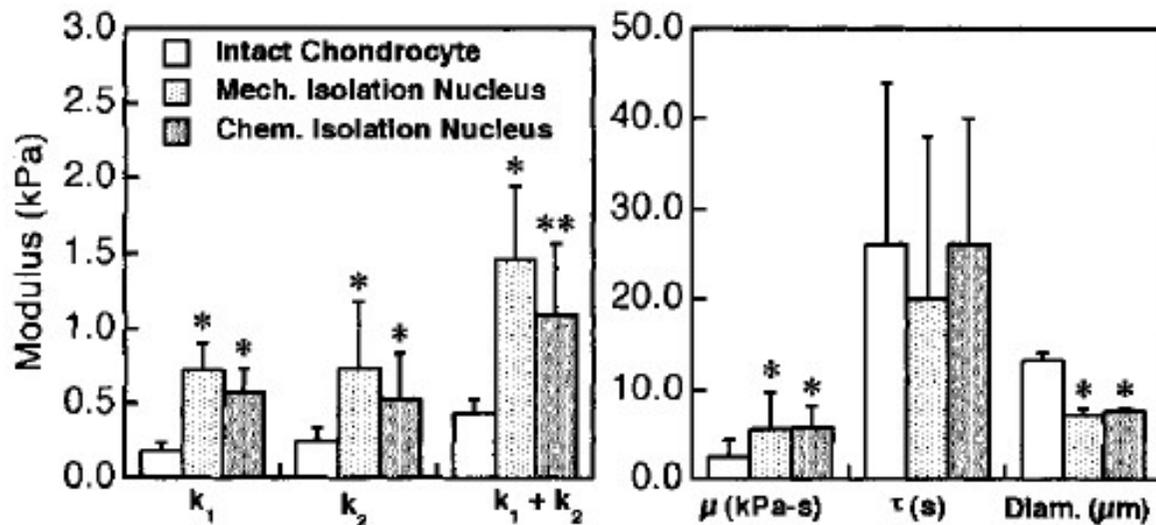


Proprietà meccaniche del nucleo

- Il nucleo è da 2 a più di 10 volte più rigido e più viscoso rispetto al citoscheletro (dipende dal tipo di cellula e dal metodo di misura applicato)
- Il comportamento **viscoelastico** è determinato principalmente dalla lamina nucleare e dalla cromatina (legate dalle proteine del complesso SUN)
- Es: aspirazione con micropipetta di condrociti (modello SLS)



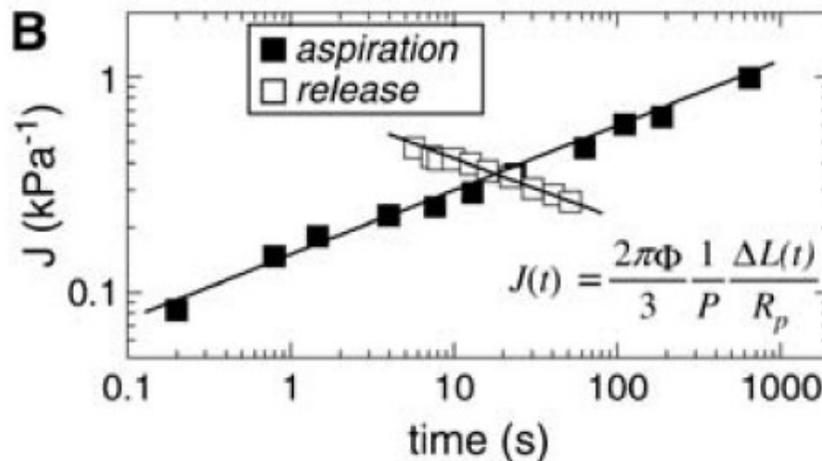
Mechanical properties of cells and mechanically or chemically isolated nuclei. Chondrocyte nuclei exhibited instantaneous and equilibrium elastic moduli that were 3–4 times greater and an apparent viscosity that was more than 2 times greater than that of intact chondrocytes. The mechanically isolated nuclei also exhibited a significantly higher equilibrium modulus as compared to chemically isolated nuclei, * P , 0.05 vs intact cells, ** P , 0.05 vs mechanically isolated nuclei. Results are presented as mean \pm SD, $n = 15\text{--}20$ per group.

$$L(t) = \frac{\phi a \Delta P}{\pi k_1} \left[1 - \left(\frac{k_1}{k_1 + k_2} - 1 \right) e^{-t/\tau} \right]$$

Proprietà meccaniche del nucleo

- Comportamento viscoelastico di nuclei isolati di cellule TC7:
 - Aspirazione con micropipetta su nuclei isolati (legge di potenza):

$$J(t) = \frac{2\pi\Phi}{3} \frac{1}{P} \frac{\Delta L(t)}{R_p} = A \left(\frac{t}{\text{sec}} \right)^\alpha \quad [=] \frac{1}{\text{kPa}}$$



Creep compliance, J , as a function of time shows power-law behavior over four decades with an exponent ≈ 0.3 . When the pressure is released, the projection length decreases with the same exponent.

- In generale, il nucleo mostra un' elevata rigidità per brevi carichi (protezione da stress meccanici istantanei), che si riduce per carichi più lunghi (influenza degli stress meccanici prolungati sull'espressione genica)

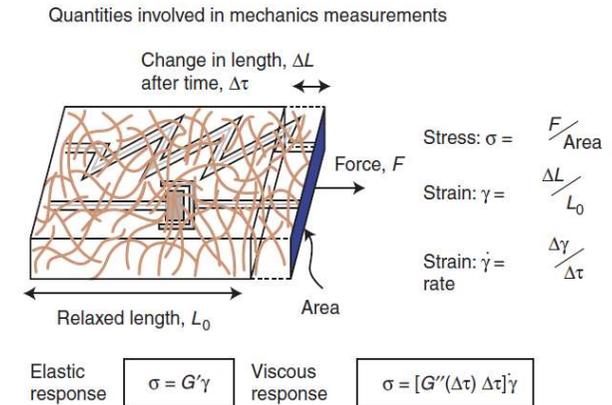
Proprietà meccaniche del nucleo

- Misure su cellule intatte vs nuclei isolati
 - Cellule intatte:
 - PRO: Rappresentano la condizione fisiologica per le cellule
 - CONTRO: Le proprietà meccaniche del nucleo possono essere mascherate dalle altre strutture cellulari (es. citoscheletro)
 - Nuclei isolati (meccanicamente o chimicamente):
 - PRO: Misura diretta delle proprietà del nucleo
 - CONTRO:
 - Possibilità di danneggiamento del nucleo durante l'isolamento
 - Difficoltà di mantenere condizioni fisiologiche
 - Es: la configurazione della cromatina risente della concentrazione di Ca^{2+} e Mg^{2+} , influenzando sulle proprietà meccaniche

Proprietà meccaniche del citoscheletro

- Filamenti citoscheletrici come polimeri lineari?

- Filamenti di actina
- Filamenti intermedi
- Microtubuli



- Differenze fondamentali rispetto ai polimeri tradizionali:

- I singoli filamenti citoscheletrici sono più lunghi e più rigidi, visibili come singoli filamenti estesi e non come strutture attorcigliate al microscopio ottico/elettronico
- La maggiore lunghezza e rigidità ha importanti conseguenze sulle proprietà meccaniche: possono formare strutture tridimensionali con frazione volumetrica molto ridotta.
 - Ad es. per avere la stessa stiffness di un gel di poliacrilamide al 5% è sufficiente una concentrazione di due ordini di grandezza in meno di filamenti di actina.
- La rigidità dei network formati aumenta con la deformazione (strain stiffening)
- I polimeri citoscheletrici sono polielettroliti anionici, il che influenza il loro modo di assemblarsi
- Sono strutture altamente dinamiche, e la presenza di motori proteici li rende polimeri attivi, fuori dall'equilibrio termodinamico.

Proprietà meccaniche del citoscheletro

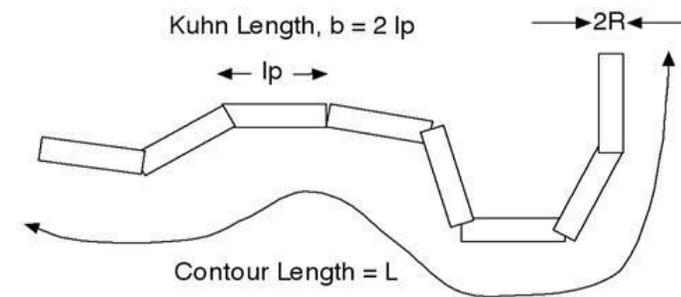
- Le proprietà del citoscheletro dipendono da:
 - Proprietà e concentrazione dei singoli filamenti
 - Concentrazione e proprietà meccaniche delle proteine di legame (binding protein e cross-linkers)
 - Struttura del network (fasci vs network tridimensionali)
- Definizioni importanti sulle proprietà dei singoli filamenti:

- Lunghezza di persistenza (*persistence length*), l_p : massima lunghezza per cui un polimero mantiene la stessa direzione in presenza delle forze Browniane dovute all'energia termica
- Lunghezza di contorno (*contour length*), l_c : massima lunghezza a cui può essere fisicamente esteso un polimero
- Per una struttura cilindrica uniforme:

$$l_p = \kappa_B / kT$$

$$\kappa_B = EI$$

κ_B = modulo di flessione
 k = costante di Boltzmann
 T = temperatura assoluta
 E = modulo di Young
 I = momento d'inerzia



Proprietà dei singoli filamenti

- A seconda dei valori relativi di I_p e di l_c , si distinguono:
 - $l_c \gg l_p$: filamenti flessibili, l'energia termica genera grandi fluttuazioni trasversali
 - $l_c \ll l_p$: filamenti rigidi, non fluttuazioni termiche trasversali ma movimenti come barrette rigide
 - $l_c \approx l_p$: filamenti semiflessibili
- Per i filamenti citoscheletrici $l_c \approx 10 \mu\text{m}$:

- filamenti intermedi: l_p varia da 200 nm a $\approx 1 \mu\text{m}$ -> filamenti flessibili

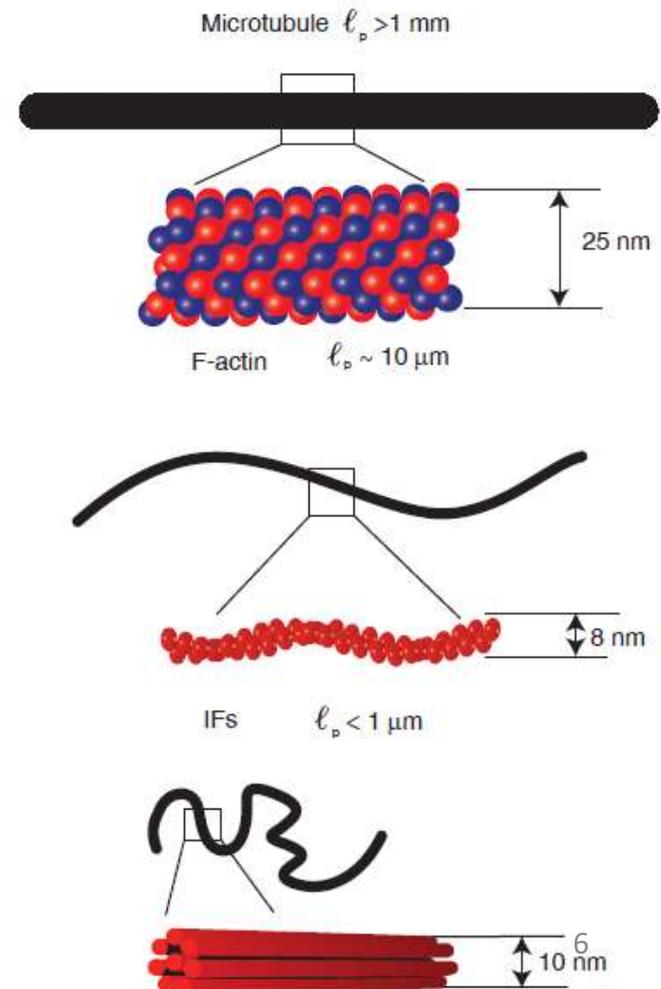
$$K_B = 4-12 \times 10^{-27} \text{ Nm}^2 \quad E = 1-5 \text{ GPa}$$

- microtubuli: l_p può arrivare a 1 mm -> filamenti rigidi

$$K_B = 2.6 \times 10^{-23} \text{ Nm}^2 \quad E = 1.9 \text{ GPa}$$

- microfilamenti: l_p compresa tra 3 e 17 μm -> filamenti semiflessibili

$$K_B = 7 \times 10^{-26} \text{ Nm}^2 \quad E = 1.3-2.5 \text{ GPa}$$

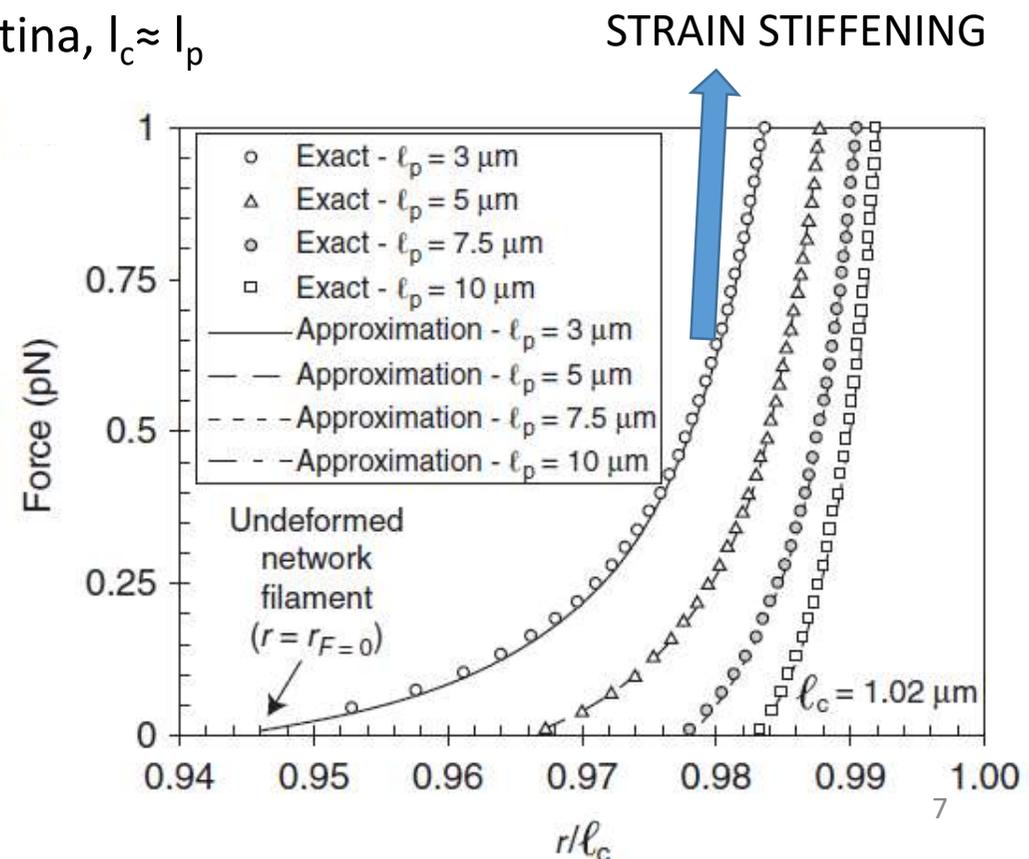


Proprietà dei singoli filamenti

- Il comportamento forza-estensione dei filamenti citoscheletrici è fortemente non lineare, dovuto alla combinazione di contributi elastici (entalpici, ‘bacchetta rigida’) e viscosi (‘entropici, “gomitolo avvolto”)
- La relazione forza-estensione è stata determinata sia tramite simulazioni numeriche che con modelli analitici
- Esempio: microfilamenti di actina, $l_c \approx l_p$

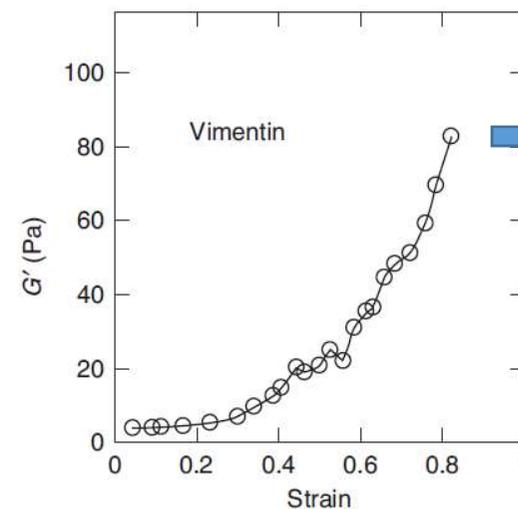
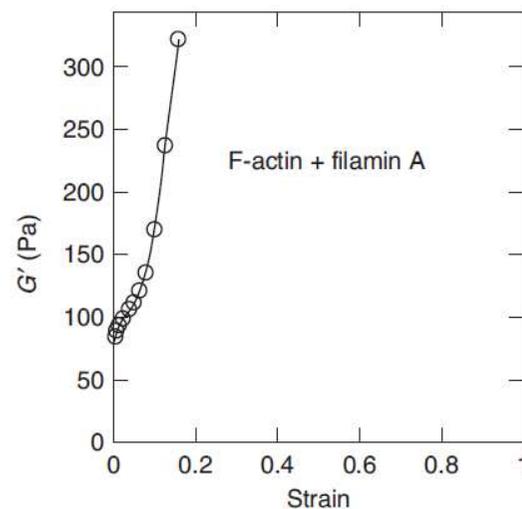
$$F \sim \frac{kT}{l_p} \left(\frac{1}{4(1 - r/l_c)^2} \right) \left(\frac{l_c}{l_p} - 6(1 - r/l_c) \right) \left(\frac{l_c}{l_p} - 2(1 - r/l_c) \right),$$

r = distanza tra i due capi del filamento



Strain stiffening del network

- Non-linearità forza-estensione -> non linearità sforzo-deformazione del network polimerico
- Strain stiffening: la rigidità del materiale aumenta con la deformazione
- Caratterizzazione tramite reometro a piatti:
 - formazione del network (filamenti puri, misti e/o reticolati).
 - applicazione di uno sforzo (o deformazione) di taglio (statico o in oscillatorio)
 - misura della deformazione (o della forza di resistenza)
 - (forza/area del piatto) / deformazione-> modulo di taglio (shear modulus)



Deformazione 10% -> 80%
↓
Incremento del modulo elastico di 1 ordg

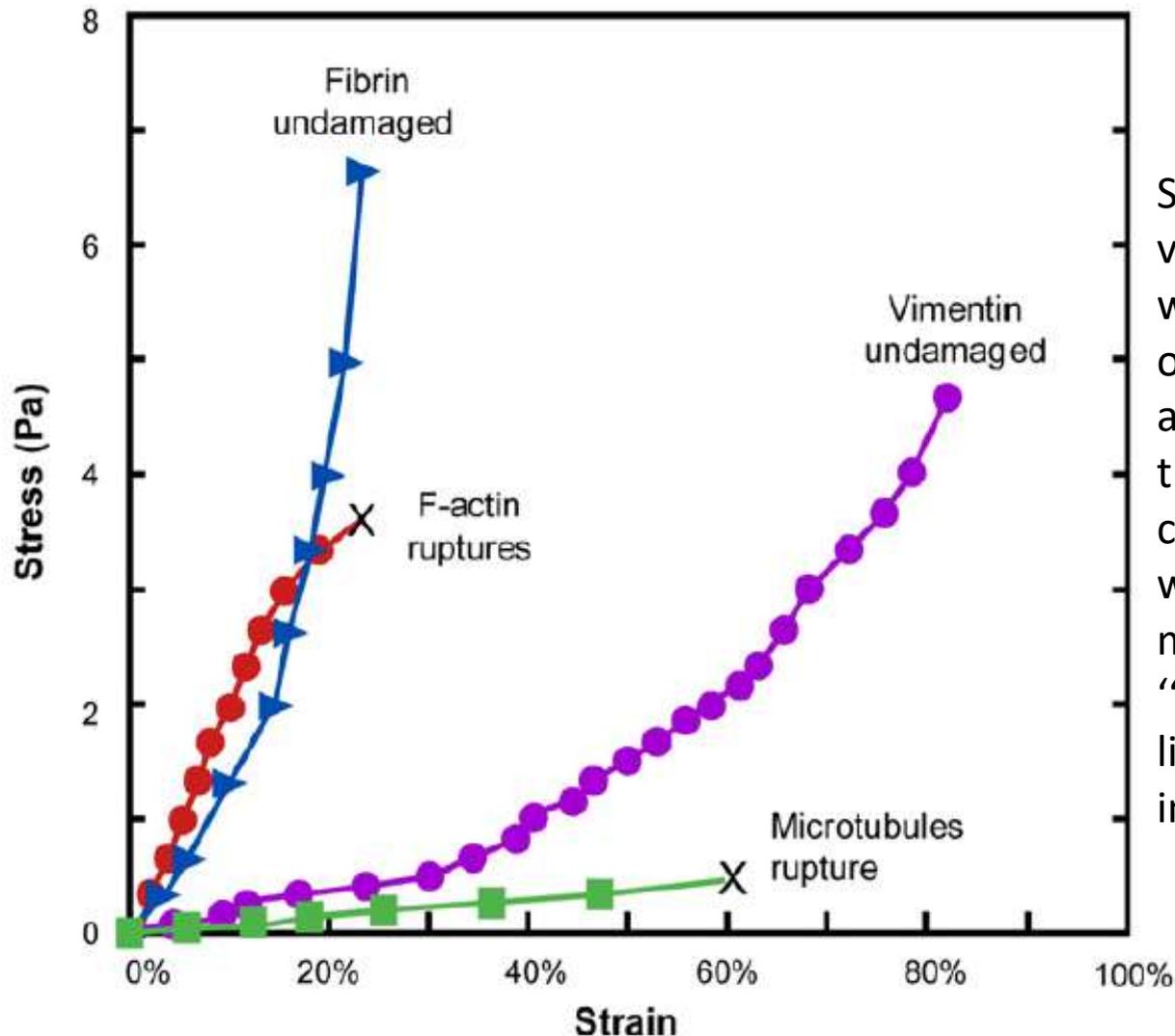
L'irrigidimento di questi network è solitamente reversibile, a meno che la deformazione applicata non sia tale da rompere i filamenti o i reticoli -> STRAIN SOFTENING

Strain stiffening del network

- Lo strain stiffening è determinato da flessione, allungamento, riarrangiamento dei filamenti del reticolo in risposta alla deformazione applicata
- 2 meccanismi di spiegazione del fenomeno:
 - meccanismo affine (entropico):
 - la deformazione locale in ciascun punto è uguale alla deformazione macroscopica del campione, uniforme
 - l'irrigidimento è dovuto alla resistenza allo stiramento di ciascun polimero, che riduce le fluttuazioni termiche e l'entropia termica del filamento
 - meccanismo non affine (entalpico):
 - all'inizio i filamenti si flettono piuttosto che allungarsi (minore energia richiesta)
 - all'aumento della deformazione, i filamenti si riorganizzano nella direzione dello sforzo ed iniziano ad allungarsi
 - l'irrigidimento è dovuto al passaggio dalla flessione all'allungamento dei filamenti

Proprietà dei network puri

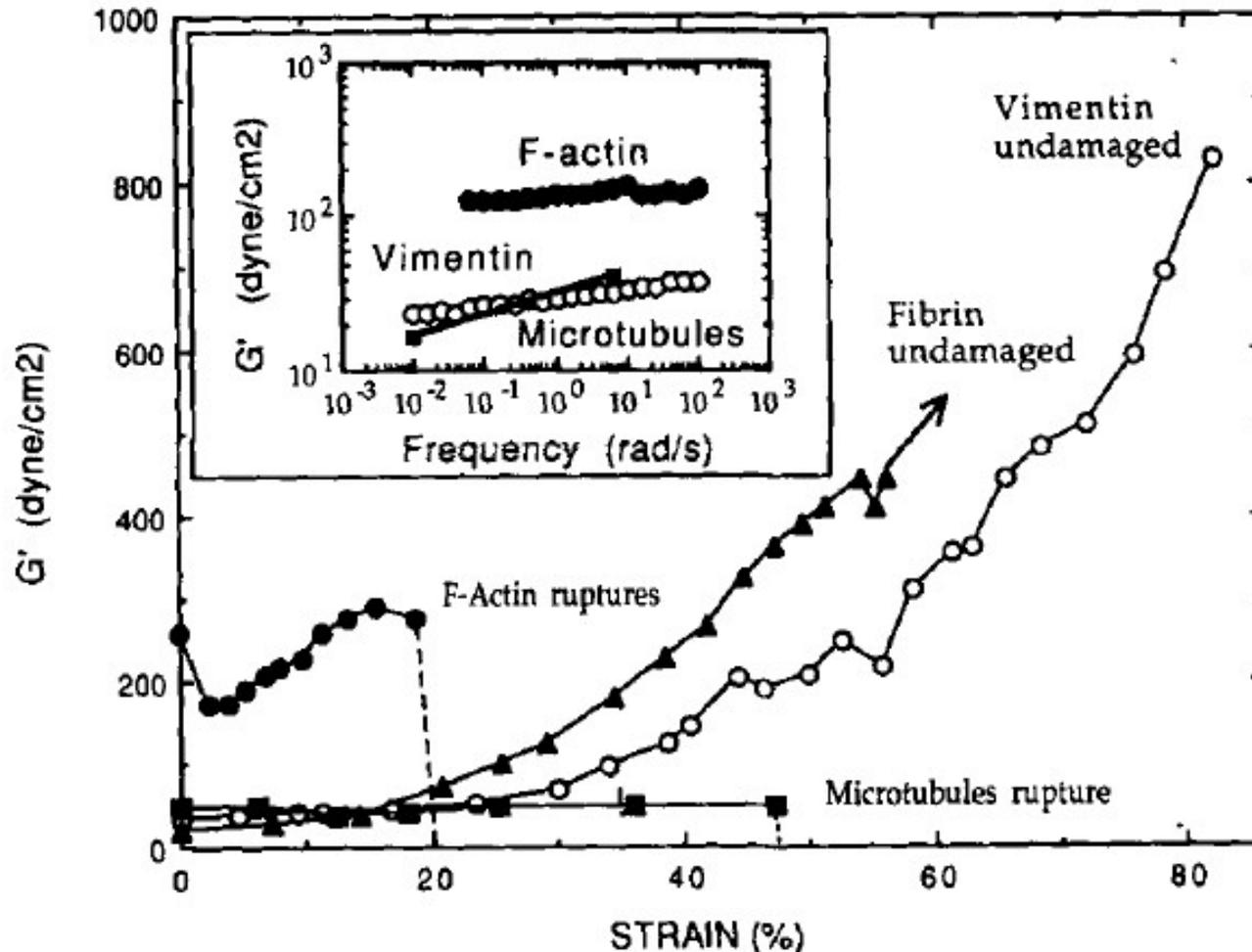
- Stress vs strain



Stress–strain curves of actin, vimentin, tubulin and fibrin for which the data points were obtained by monitoring strains at 30 s after the imposition of the shear stress. The concentration of each sample was 2 mg/ml. F-actin and microtubule networks “rupture” by flowing like a liquid at the value of strain indicated by the symbol “X”.

Proprietà dei network puri

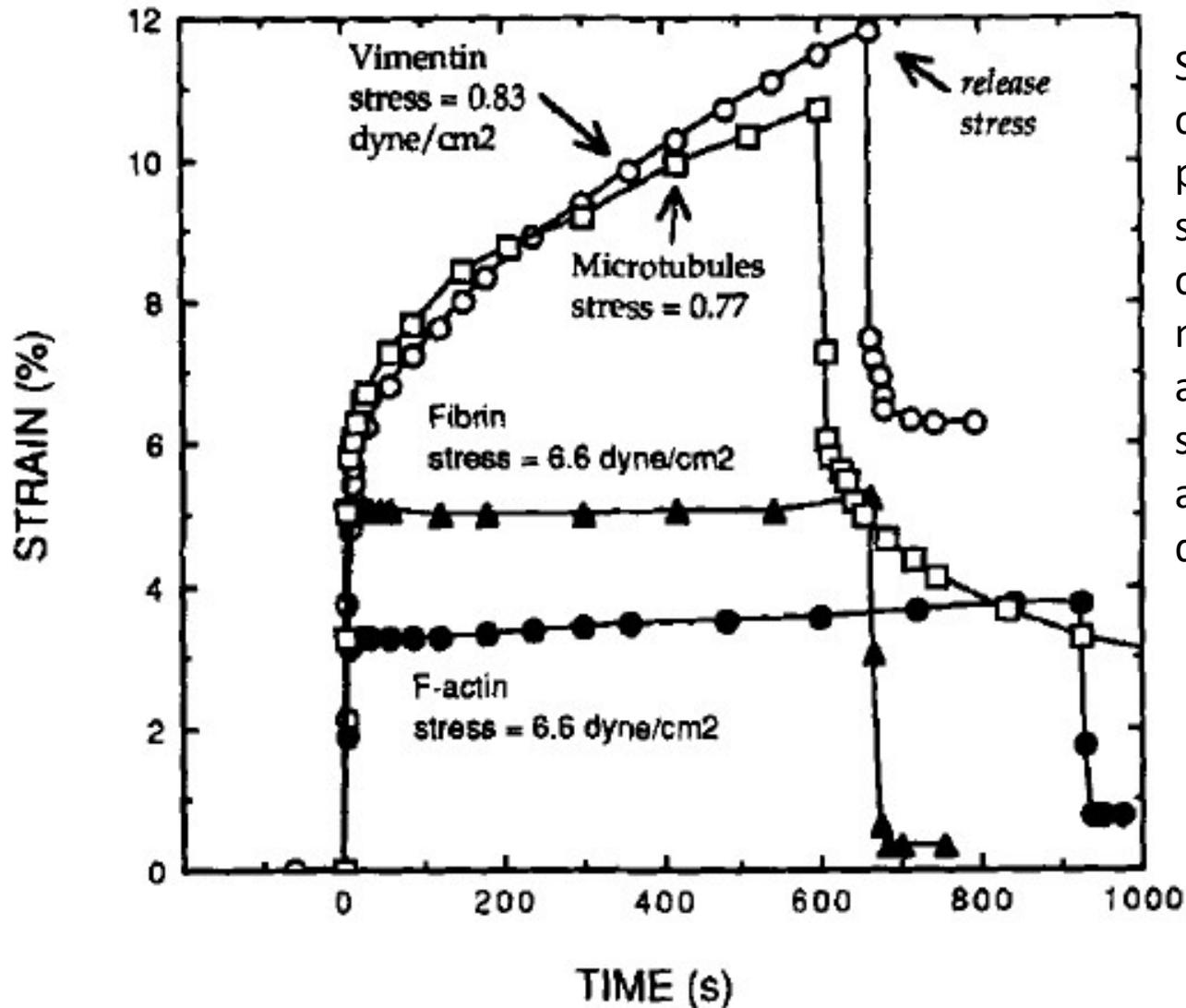
- Modulo elastico vs deformazione e vs frequenza



Strain dependence of dynamic shear modulus. The small strain modulus of the four filament networks was measured by free oscillations imposed on samples held at constant shear strains as described elsewhere (Janmey et al., 1983). The concentration of fibrin was 1 mg/ml, and that of all others was 2 mg/ml. The resonance frequency of oscillation ranged from 1 to 15 rad/s, depending on the sample volume and G' . (*Inset*) Frequency dependence of dynamic shear modulus. The dynamic storage shear moduli, G' , of 2 mg/ml vimentin and 1.5 mg/ml F-actin were measured from oscillating strains of 1 or 2% using a Rheometrics instrument.

Proprietà dei network puri

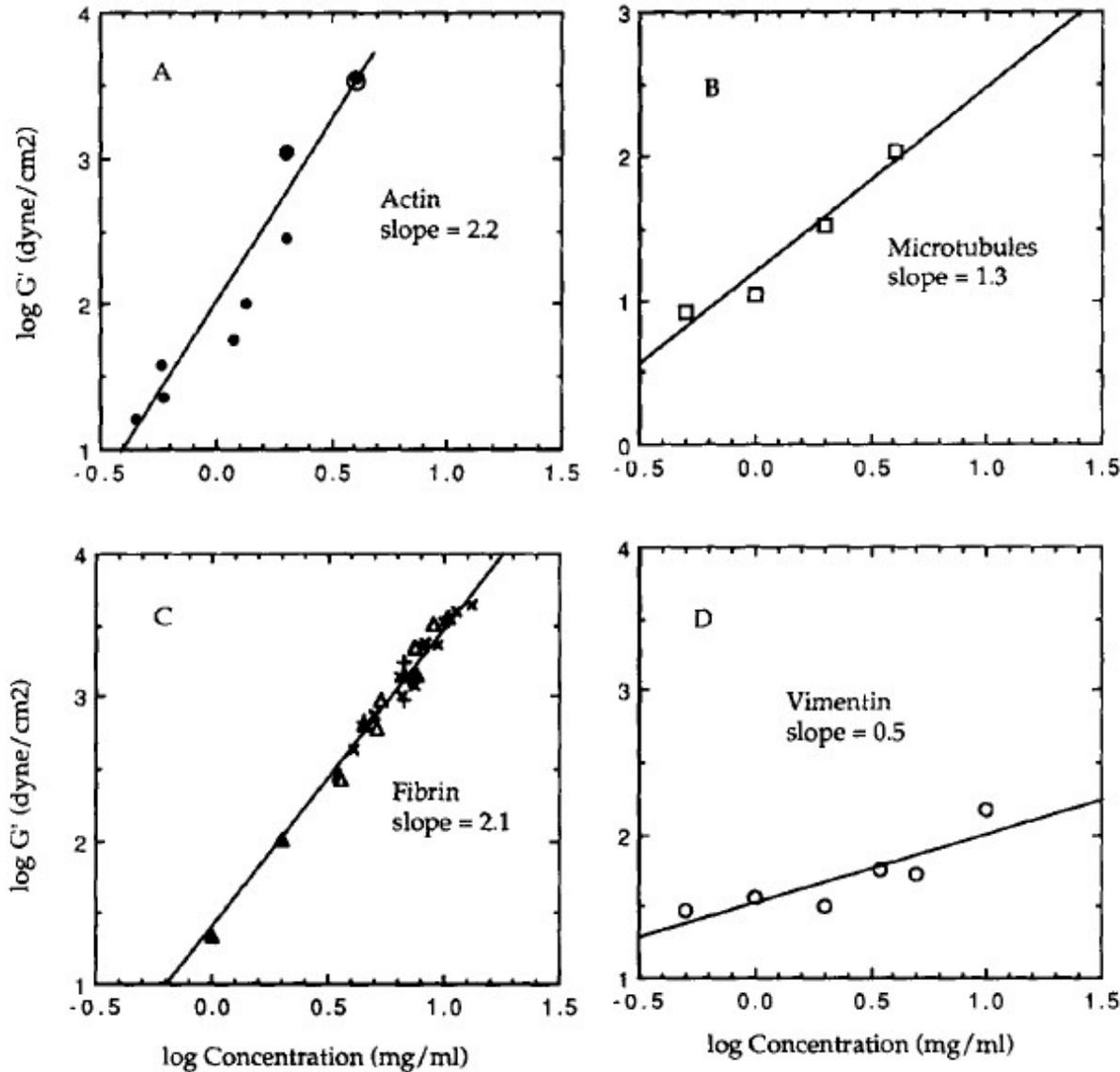
- Comportamento a creep



Slow shear flow under constant stress. The different polymer networks were strained by imposition of constant shear stresses, as noted, and allowed to recover after removing the deforming stress. The stress was imposed and released at a rate of $\approx 1 \text{ dyn.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Proprietà dei network puri

- Modulo elastico vs concentrazione



Plot of the storage modulus of the four biopolymers, actin, vimentin, tubulin and fibrin, as a function of their protein concentrations, plotted on a log-log scale.

Reticoli puri di actina

- Rappresentano il sistema più abbondantemente studiato
- Formano gel debolmente elastici ($E \approx$ decine di Pa), dovuti all'intreccio dei microfilamenti di actina
- Il comportamento elastico G' prevale su quello viscoso G''
- Mostrano comunque un debole strain stiffening fino a cedimento del network
- Il modulo complesso di shear G^* segue:
 - Legge di potenza con esponente molto basso se $0.01 < f < 10$ Hz
 - $G^* \sim \omega^{3/4}$ se $10 < f < 10000$ Hz
- Per polimeri semiflessibili, vale la relazione

$$G' = \frac{\sigma}{\gamma} \sim \frac{\kappa_B}{k_b T \xi^2 l_e^3}$$

κ_B = modulo di flessione

k_b = costante di Boltzmann

T = temperatura assoluta

ξ = dimensione della mesh

l_e = lunghezza tra entanglements

Reticoli puri di microtubuli

- è il sistema meno studiato, dovuto alla difficoltà di formare reticoli con entanglements di microtubuli (l_p fino a 1 mm)
- i pochi studi riportati mostrano moduli elastici molto bassi dovuti alla scarsa interazione tra filamenti rigidi
- Il comportamento elastico domina su quello viscoso
- esistono pochi reticolanti di microtubuli tali da dare sistemi meccanicamente stabili
- al di sopra della deformazione critica si ha il cedimento del network (strain softening)

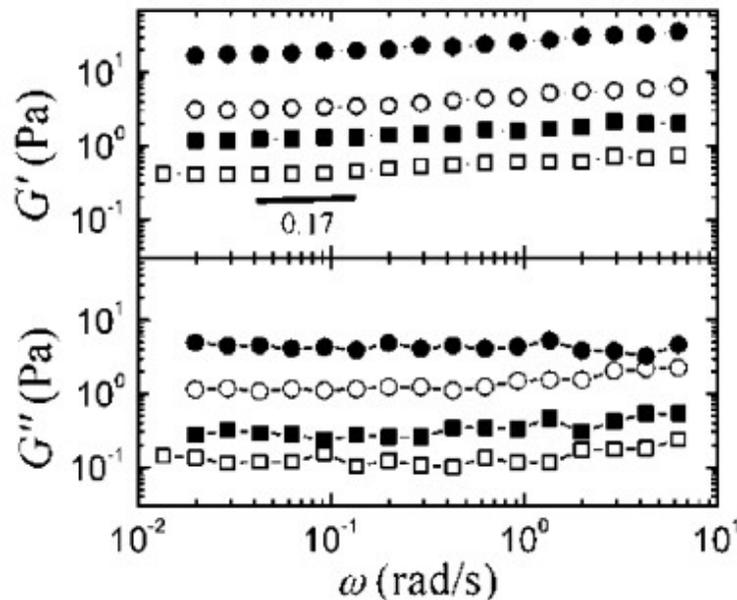


Figure 3. Linear viscoelastic shear moduli of entangled microtubule solutions (open symbols) and cross-linked networks (solid symbols) for $c_T = 1$ mg/mL (squares) and 5 mg/mL (circles). The elastic modulus, G' , dominates over the viscous modulus, G'' . The elastic moduli exhibit a rather weak power law scaling with frequency ω , with an exponent of 0.14 for cross-linked networks and 0.17 for entangled solutions. The cross-linked networks are 3–6 times stiffer than the solutions.

Reticoli puri di microtubuli

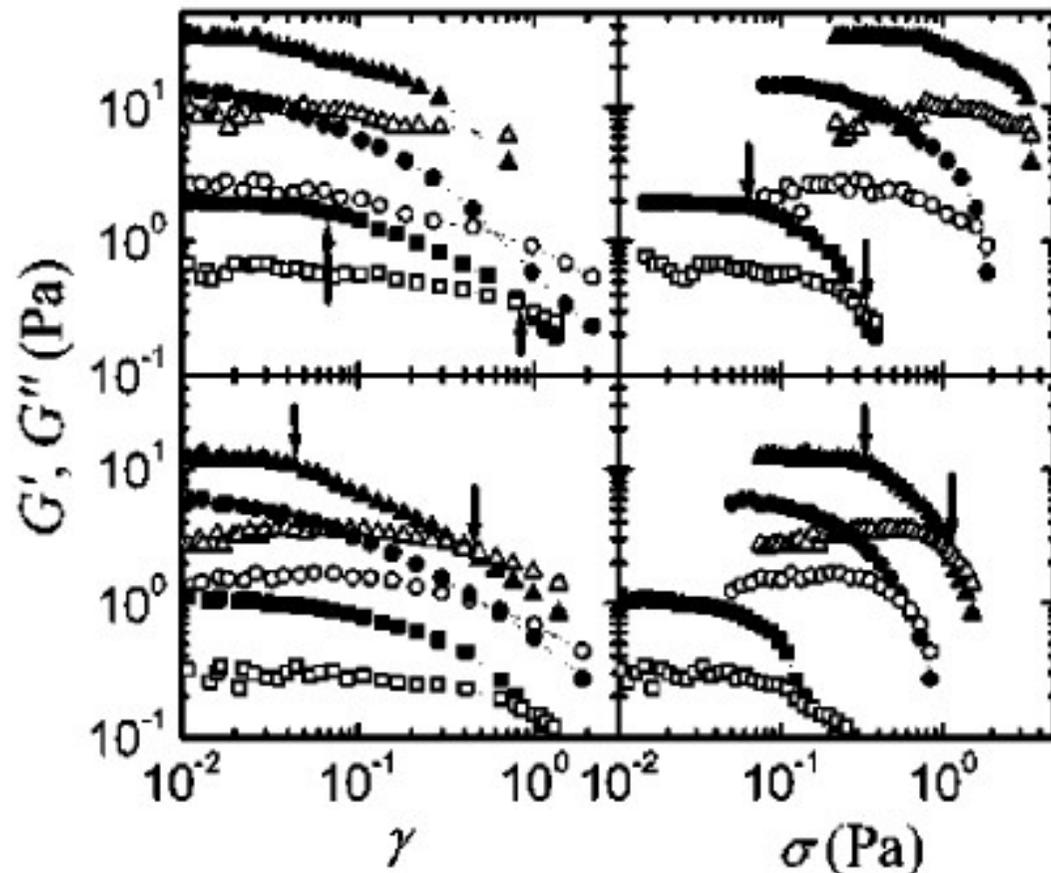
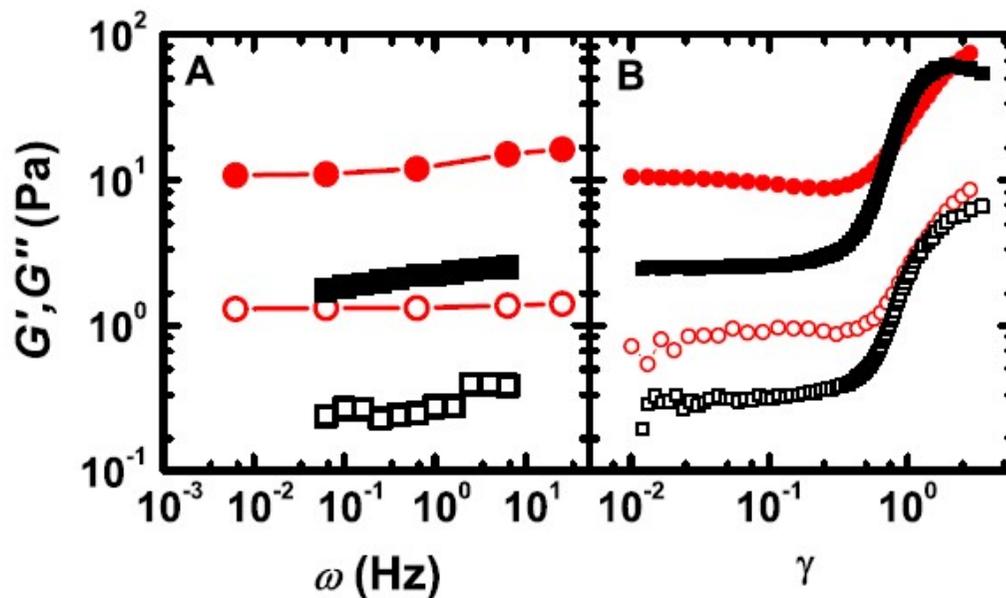


Figure 7. Oscillatory measurements of G' (solid symbols) and G'' (open symbols) at large amplitudes of applied strain and stress for microtubule networks (A, upper left, and B, upper right) and solutions (C, lower left, and D, lower right) for $c_T = 1$ mg/mL (squares), 3 mg/mL (circles), and 5 mg/mL (triangles). The critical stress and strain are the onset of the nonlinear elastic response, and the yield stress and strain are defined as the stress and strain where G' equals G'' , as shown by the arrows. The elastic modulus is linear up to a maximum strain of ~ 0.1 , and the networks yield at maximum strain of ~ 0.9 (for $c_T = 1$ mg/mL).

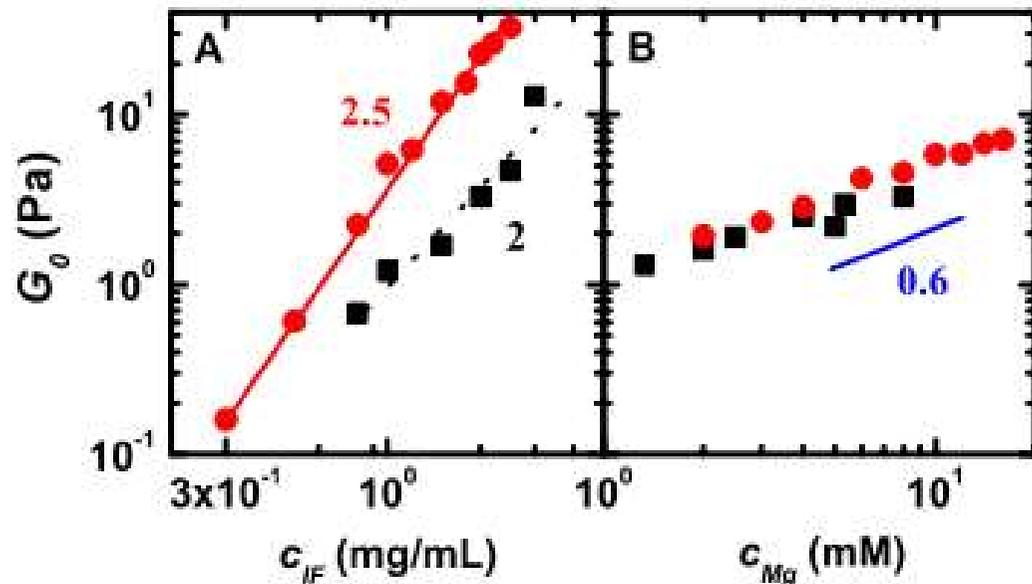
Reticoli puri di filamenti intermedi

- Formano gel debolmente elastici in campo lineare, il comportamento elastico domina sul comportamento viscoso
- Per alti valori di stress o deformazioni, danno luogo a fenomeni di strain stiffening
- Non sono noti molti cross-linkers, ma l'elevata carica anionica dei filamenti intermedi rende gli ioni divalenti degli effettivi reticolanti



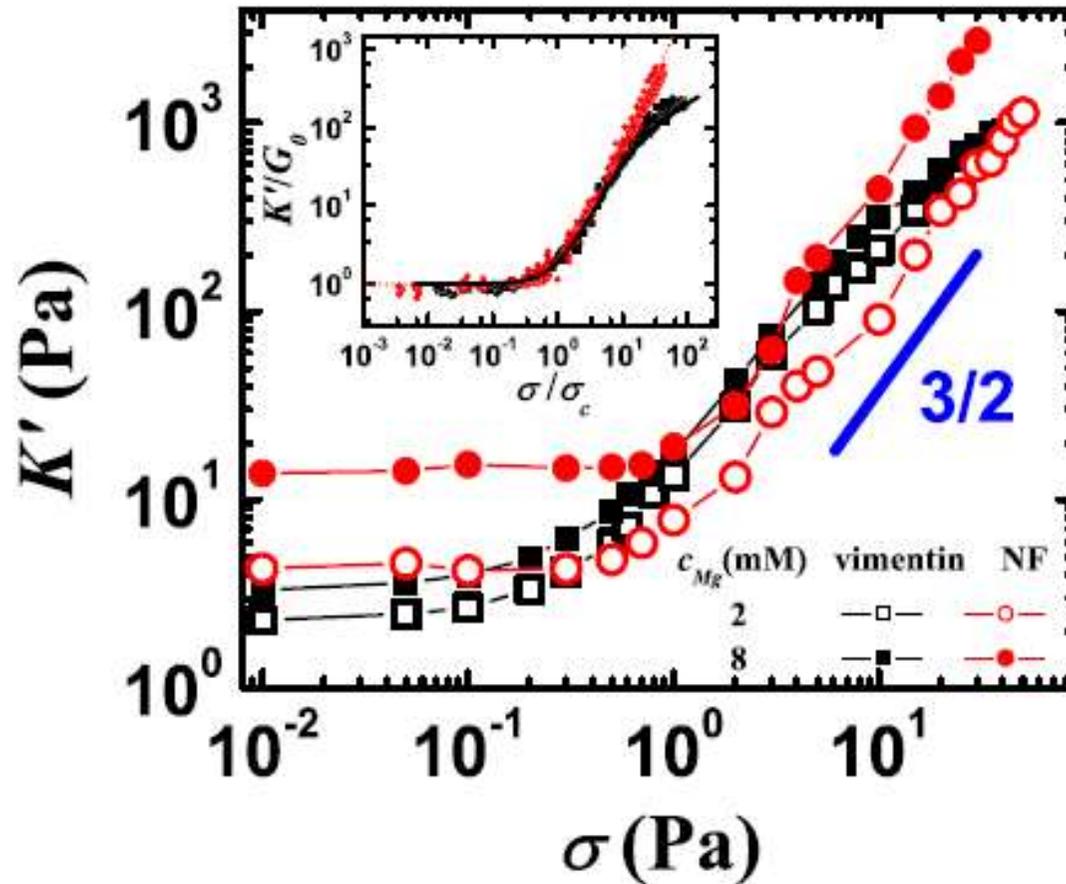
(a) G' (solid symbols) and G'' (open symbols) as a function of frequency in the linear regime. (b) G' (solid symbols) and G'' (open symbols) as a function of strain, γ . Samples of vimentin (squares) and neurofilaments (circles) are probed at a 2 mg/ml filament concentration and at 5 mM Mg^{2+} .

Reticoli puri di filamenti intermedi



G_0 as a function of c_{IF} holding R constant, where $R = 1000$ for neurofilaments (circles) and $R = 215$ for vimentin (squares). Solid line is obtained using a regression fit and depicts $G_0 \approx c_{NF}^{2.5}$ for neurofilaments, while dashed line depicts $G_0 \approx c_v^2$. (b) G_0 as a function of c_{Mg} holding c_{IF} constant, where $c_{IF} = 1$ mg/ml for neurofilaments (circles) and $c_{IF} = 2$ mg/ml for vimentin (squares)

Reticoli puri di filamenti intermedi



K' at 0,6 rad/sec as a function of σ_0 for vimentin and neurofilament networks: [$c_{Mg} = 2$ mM (open symbols), $c_{Mg} = 8$ mM (solid symbols) and $c_{IF} = 2$ mg/ml (all symbols)]. The solid line shows a $3/2$ power law. The inset shows the data sets rescaled by σ_0 and G_0 depicting the universal form of the stiffening response; the rescaled theory is indicated by the dashed red line, while the solid black line depicts the deviation due to enthalpic backbone stretching.

Considerazioni

- I network di actina mostrano la più alta rigidità per basse deformazioni:
 - Costituiscono la corteccia sotto la membrana cellulare:
 - Resistenza alle forze esterne
 - Generazione di forze nell'interazione con l'esterno
- Oltre una certa deformazione, i network di F-actina diventano fluidi:
 - Importante nella depolimerizzazione legata al movimento della cellula
- I filamenti intermedi mostrano la più alta resistenza alla deformazione e danno strain stiffening
 - Mantenimento dell'integrità cellulare ad alte deformazioni
- I microtubuli non danno grande contributo viscoelastico
 - Importanti nell'interazione con gli altri filamenti citoscheletrici

Reticoli misti F-actina - microtubuli

- Piccole quantità di microtubuli aumentano la rigidità del network di actina
 - È favorito un meccanismo di irrigidimento affine, dovuto alla rigidità dei microtubuli che ostacolano la flessione dei microfilamenti
- Al contempo, è aumentata la resistenza a compressione dei microtubuli
 - Difficoltà di grandi deformazioni nel network di actina

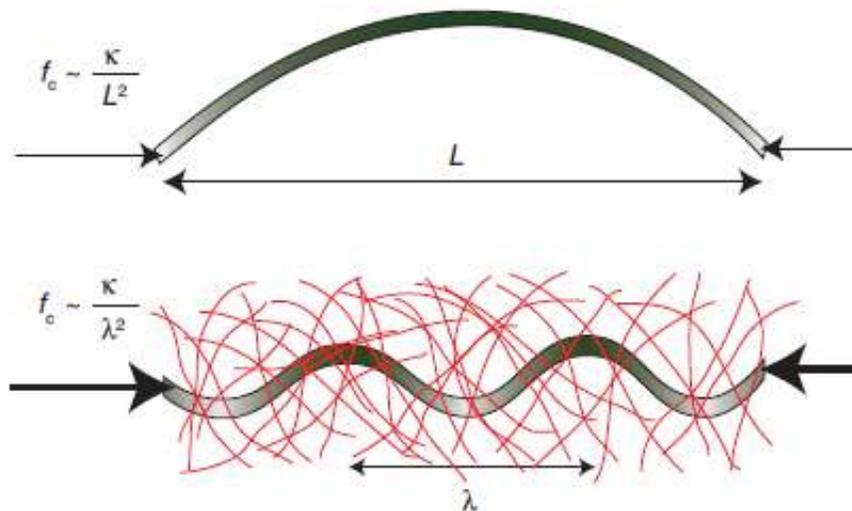
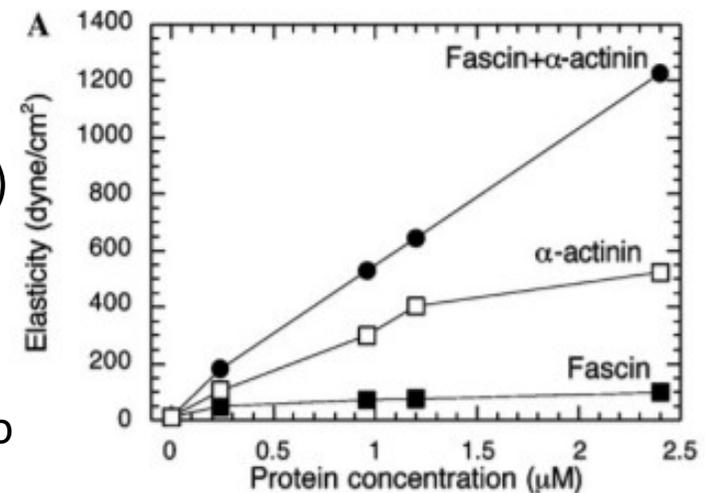
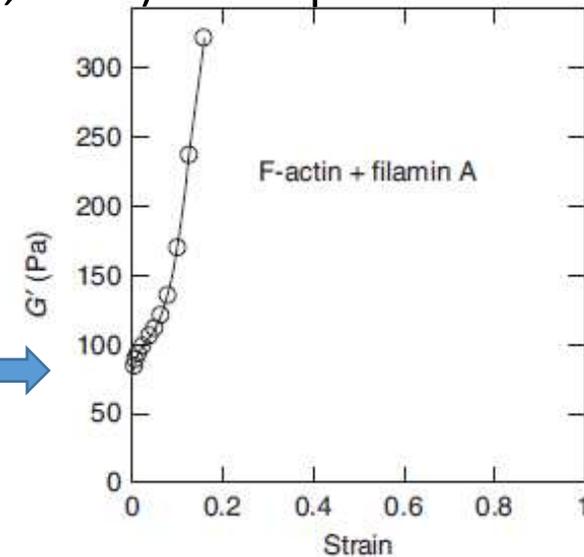


Figure 6. Buckling of stiff rods under compression, with and without a supporting elastic gel. A compressive force f_c is applied to a rod of unbent length L and bending modulus κ . For a free rod (*upper image*), large-scale bending is free to occur (bending exaggerated for clarity). In the presence of a surrounding gel (*lower image*), large displacements are suppressed and short-wavelength buckling occurs instead and the compressive force depends on the characteristic length scale of the buckling, given by λ . (Reprinted from Brangwynne et al. 2006.)

Cross-link dei filamenti citoscheletrici

- I cross-linker dell'actina (*Actin cross-linker protein, ACLP*) sono i più numerosi e studiati rispetto agli altri filamenti
- A seconda dell'ACLP, si formano fasci actinici (es α -actinina) o network tridimensionali (es. filamina A)
- Comportano un incremento del modulo elastico del network e danno strain stiffening
- Le proprietà del network dipendono da:
 - Lunghezza dei filamenti
 - Dimensione della mesh (rapporto actina/crosslinker)
 - Tipo di ACLP (forza di adesione all'actina, proprietà meccaniche del crosslinker)
- Esistono fenomeni cooperativi/competitivi tra diverse ACLP (es. cooperativo α -actinina e fascina)
- Al di sopra di una deformazione critica, il network cede per:
 - Rottura dei legami ACLP-actina
 - Buckling dei filamenti di actina (per stress molto elevati)



Effetti dei cross-linkers

- A livello fisiologico, i reticoli formati sono spesso dinamici e le proprietà sono influenzate da:
 - Temperatura: ad esempio, la velocità di legame di α -actinina dipende da T:
 - Passando da 8 °C a 25 °C, il reticolo diventa meno elastico e più viscoso per la riduzione dell'affinità di legame
 - A temperature fisiologiche è aumentata la velocità di rottura del legame con F-actin: rimodellazione del network per tempi lunghi, fondamentale per la riorganizzazione fisiologica del citoscheletro
 - Forza: il carico applicato può modificare la dinamica di legame:
 - F-actina reticolata con fascina: rottura del legame dipendente da velocità di carico -> riduzione della rigidità indotta meccanicamente
 - Lo stress applicato può anche aumentare il tempo di legame del cross-linker e ritardare il rilassamento del network -> resistenza alle deformazioni meccaniche

Effetti dei cross-linkers

- A livello fisiologico, i reticoli formati sono spesso dinamici e le proprietà sono influenzate da:
 - Tipo di reticolante: flessibile vs rigido
 - F-actina reticolata con filamina A (FLNa), flessibile:
 - network determinato da due polimeri semiflessibili;
 - ridotta dipendenza E vs concentrazione di cross-linker rispetto a cross linker rigido;
 - strain stiffening dovuto all'irrigidimento del cross-linker e non dell'actina;
 - Rottura del reticolo a deformazioni \gg che con linker rigido
 - Cedimento per rottura del cross-linker e non dei legami coi filamenti di actina

Strain stiffening del network

- La transizione tra affine e non affine è regolata da 3 parametri:
 - la lunghezza di contorno L_c
 - la distanza tra i crosslinker l_c (determina la dimensione della mesh, ξ)
 - lunghezza del materiale $l_b = \sqrt{\kappa_B/\mu}$, con μ = modulo di stretching

$$\lambda = \frac{L_c}{\sqrt[3]{l_c^3/l_b}}$$

$\lambda < 2$, meccanismo non affine

$\lambda > 20$, meccanismo affine

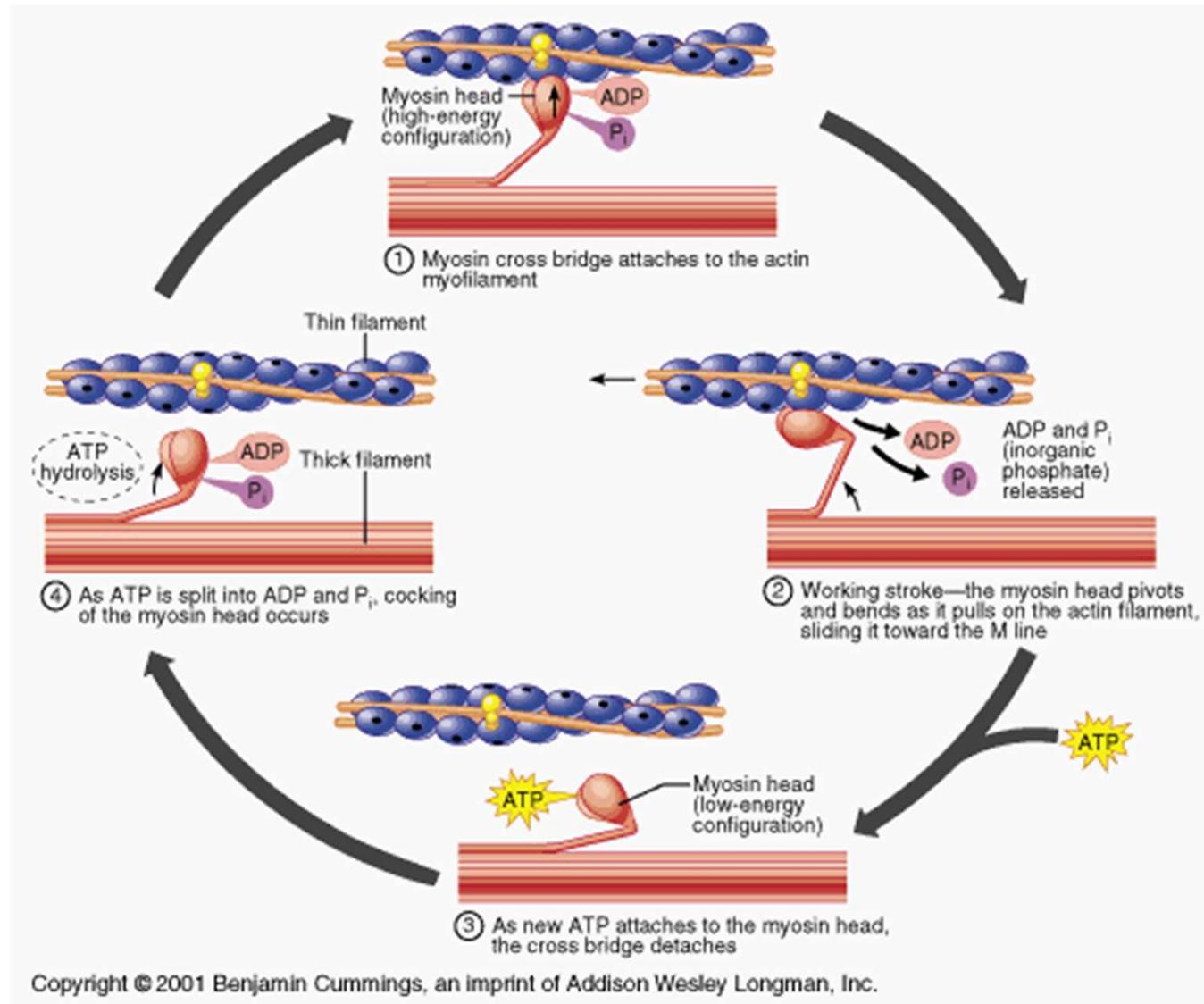
$2 < \lambda < 20$ zona di transizione

Per alte concentrazioni di crosslinker (basso l_c) prevale contributo di stretching (affine), per alti l_c prevale il contributo di bending (non affine)

Es: diminuendo la concentrazione di reticolante, i microfilamenti passano da un meccanismo affine (sistema denso isotropo) ad uno non affine (reticolo rado anisotropo)

Sistemi attivi vs passivi

- I motori proteici (miosina, kinesina e dineina) hanno lo stesso effetto di strain stiffening delle forze esterne, generando tensione interna alla cellula



Sistemi attivi vs passivi

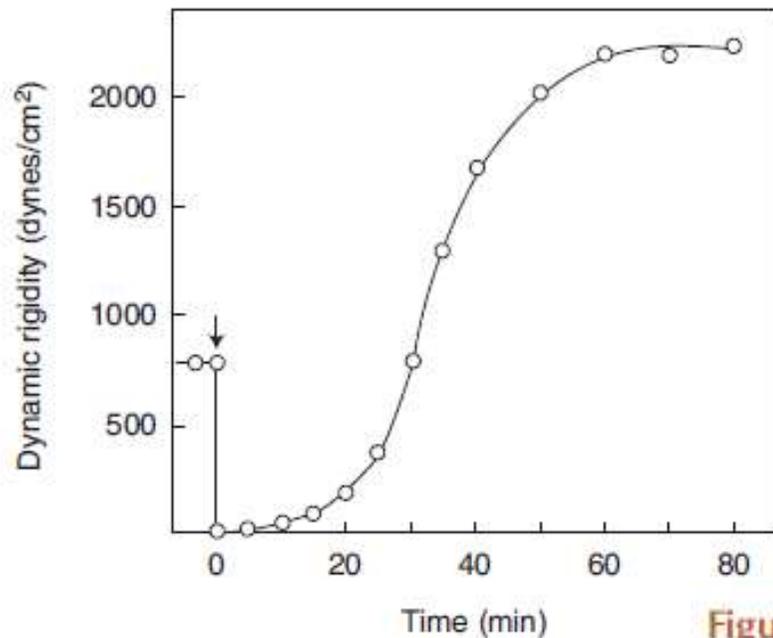


Figure 5. The effect of ATP on the dynamic rigidity of a heavy meromyosin–F-actin gel (heavy meromyosin, 4.0 mg/mL; F-actin, 2.0 mg/mL). The arrow indicates the time of addition of 5 mM ATP, causing an instantaneous drop in rigidity that recovers with time as the myosin hydrolyzes the ATP. (Adapted from Abe and Maruyama 1971, with permission from Elsevier.)

- A valori fisiologici di actina (10-20 mg/mL), la rigidità del network può arrivare a 10 kPa, anche in assenza di microtubuli e IFs.
- La presenza dei motori molecolari ritarda lo strain stiffening delle forze esterne, ma se queste superano la tensione interna, il sistema cede

Pro e contro del modello

PRO

- Analogie con le cellule:
 - Ad alte frequenze, $G^* \sim \omega^{3/4}$
 - Strain stiffening simile ai network citoscheletrici
 - moduli elastici compresi tra centinaia di Pa a decine di kPa e viscosità di poche centinaia di Pa·s, confrontabili con i valori osservati per reticoli citoscheletrici
- Il modello permette di capire il ruolo dei singoli componenti e delle loro interazioni
- Il modello permette di correlare i dati di viscoelasticità con i parametri del reticolo. Ad esempio, per reticoli di F-actina:
 $E \sim (k_B T) l_p^2 / \lambda^5$, con l_p persistence length e λ lunghezza degli entanglements

CONTRO

- Il modello non è predittivo della complessa dinamica cellulare (no correlazione tra microstruttura cellulare e proprietà meccaniche) e dello stato di pre-stress.