SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE
XXVIII CICLO

Dott.ssa Maria Grazia Masiello

La Dott.ssa Maria Grazia Masiello, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso i laboratori del Dipartimento di Chirurgia "P. Valdoni", Sapienza Università di Roma, ed i laboratori del Kennedy Space Center (struttura per il lancio di veicoli spaziali della NASA, Cape Canaveral, Florida, USA), sotto la supervisione del Prof. Mariano Bizzarri.

Nel corso del Dottorato, la Dott.ssa Masiello si è occupata di valutare gli effetti indotti dalla microgravità su colture cellulari bidimensionali di una linea di osteoblasti murini, MC3T3-E1, e su colture bidimensionali e tridimensionali della linea mammaria umana non tumorigenica MCF-10A, e due linee di adenocarcinoma mammario umano: MCF-7, con un moderato potenziale metastatico ed MDA-MB-231, con un elevato potenziale metastatico.
La forza di gravità viene considerata raramente un parametro sperimentale negli studi biologici, tuttavia, negli ultimi anni, i voli spaziali hanno fornito l'opportunità di eseguire esperimenti in microgravità, dimostrando come nello spazio, dove la forza di gravità è ridotta, le cellule subiscano profondi cambiamenti morfologici e funzionali. Tale forza, apparentemente debole, ha dunque un notevole impatto sulla biologia cellulare.
Diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione alla microgravità altera, in maniera transiente o permanente, importanti processi biologici, quali, espressione genica, *signalling* cellulare, proliferazione, sopravvivenza, differenziamento, morfologia cellulare. Tuttavia, il modo in cui le cellule sentono questi stimoli e li convertono in risposte biochimiche rimane una questione aperta. Recenti studi hanno individuato nel citoscheletro l'iniziale sensore delle variazioni del fattore fisico gravità. Poichè il citoscheletro gioca un ruolo chiave in molti processi fisiologici cellulari ed è ben noto in letteratura che la microgravità influenza l'architettura citoscheletrica cellulare, risulta chiaro che la sua disorganizzazione compromette notevolmente la morfologia e la funzionalità cellulare.
La Dott.ssa Masiello, ha effettuato gli esperimenti sia su colture cellulari bidimensionali, allo scopo di verificare quanto tali effetti dipendano dal tempo di esposizione del campione alla microgravità ed entro quale limite temporale possano essere definiti reversibili, che tridimensionali, al fine di definire un nuovo protocollo sperimentale.
La condizione di microgravità è stata simulata in laboratorio utilizzando un clinostato 3D, la Desktop Random Positioning Machine (RPM), posta in un incubatore standard a CO_2 al 5% e a 37°C di temperatura. Tale strumento, sotto il controllo di un apposito software, imprime un

movimento rotatorio randomico, in uno spazio tridimensionale, a due assi cardanici, ed è così in grado di fornire un continuo cambiamento di orientamento, relativo al vettore gravità, di un esperimento biologico. Gli effetti generati dalla RPM sono equiparabili a quelli della microgravità reale, a patto che i cambi di direzione siano più veloci del tempo di risposta del sistema alla gravità.

Durante il primo anno di Dottorato, la Dott.ssa Masiello ha focalizzato la sua attenzione sulla linea cellulare di osteoblasti murini MC3T3-E1, che rappresenta un ottimo modello di studio, in quanto è ben documentato in letteratura che l'apparato scheletrico è molto sensibile agli stimoli meccanici ambientali. L'analisi morfologica quantitativa è stata eseguita su immagini acquisite al microscopio ottico. L'osservazione ha evidenziato la presenza di due distinti fenotipi morfologici nei campioni esposti a microgravità simulata per 48 ore, uno, indistinguibile dalle cellule cresciute *on ground,* l'altro, invece, ha mostrato valori significativamente più alti dei parametri morfologici analizzati, quali dimensione frattale, *roundness* ed area della superficie cellulare. Inoltre, sono stati osservati, in seguito all'esposizione a microgravità simulata, significativi cambiamenti funzionali. Le MC3T3-E1 hanno mostrato una diminuzione della proliferazione in maniera tempo-dipendente, rispetto alle cellule coltivate in gravità normale fino a 72 ore di coltura. Le differenze sono risultate statisticamente significative a partire dalle 48 ore. Alla ridotta proliferazione si è associato un aumento del rate apoptotico, sempre in maniera tempo-dipendente, rispetto alle cellule coltivate in gravità normale. L'aumento della percentuale di cellule apoptotiche è risultato statisticamente significativo a partire dalle 24 ore, raggiungendo il valore più elevato a 72 ore di trattamento. L'esposizione alla microgravità simulata ha modificato, in queste cellule, anche la distribuzione delle varie fasi del ciclo cellulare. A 24 ore di coltura si è osservato un notevole aumento della percentuale di cellule in fase G2/M nei campioni sottoposti a microgravità rispetto a quelli coltivati in condizioni normali, in accordo con i dati di apoptosi.

Lo stress meccanico è in grado di influenzare numerose vie di segnale. Data la ridotta proliferazione e l'aumentato rate apoptotico, in cellule esposte a microgravità sono stati indagati i livelli proteici di fattori cardine dei pathway di proliferazione, come fosfo-ERK, e di sopravvivenza, come fosfo-Akt. Le MC3T3-E1, sottoposte per 24 ore a microgravità simulata, hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa del rapporto p-Akt/Akt e del rapporto p-ERK/ERK, rispetto ai controlli *on ground*. Inoltre, è stata osservata una riduzione statisticamente significativa dell'espressione proteica della β-1-integrina. Poichè le integrine rivestono un ruolo importante nei processi di adesione e nella riorganizzazione citoscheletrica, è possibile ipotizzare che la microgravità alteri i processi di adesione delle cellule.

Durante il secondo e terzo anno di dottorato, la Dott.ssa Masiello ha focalizzato la sua attenzione su una linea cellulare mammaria umana non tumorigenica, MCF-10, e due linee di adenocarcinoma mammario umano: MCF-7, con un moderato potenziale metastatico ed MDA-MB-231, con un elevato potenziale metastatico, modelli cellulari ancora poco studiati in microgravità.

L'analisi morfologica quantitativa effettuata sulle MCF-10A ha evidenziato la presenza di due differenti popolazioni cellulari, con una diversa distribuzione dell'area di superficie nelle cellule esposte a microgravità simulata per 24 e 72 ore, rispetto al controllo *on ground*, la cui distribuzione appare, invece, omogenea.

Dopo 24h di esposizione a microgravità simulata è stato evidenziato un drammatico riarrangiamento del citoscheletro. I filamenti di actina apparivano localizzati prevalentemente in regione corticale, mentre il network risultava completamente disorganizzato nel citosol, a differenza del controllo *on ground*, in cui appariva molto ben organizzato. Anche i microtubuli apparivano disorganizzati con un maggiore addensamento in posizione perinucleare nei campioni esposti a microgravità simulata, mentre nei campioni *on ground* si disponevano in maniera ordinata, muovendosi dalla zona perinucleare, dove vi era un maggiore addensamento, verso la periferia.

Non sono state evidenziate modificazioni nella distribuzione delle fasi del ciclo cellulare nè nei livelli proteici di Ciclina D1. L'apoptosi e l'espressione proteica di PARP-clivato (Cl-PARP) non hanno mostrato differenze tra le cellule esposte a microgravità simulata e il controllo *on ground*. Non è stata osservata alcuna variazione nella proliferazione e nel pathway di sopravvivenza

Akt/survivin. Tuttavia, la fosforilazione di ERK è aumentata in maniera statisticamente significativa, già dopo 24 ore di esposizione alla microgravità e mantenuta anche dopo le 72 ore. Questi risultati suggeriscono dunque, che nonostante ERK giochi un ruolo chiave nel processo proliferativo, agendo come regolatore positivo della progressione nel ciclo cellulare, l'intensa attivazione di ERK sia, in questo caso, responsabile dell'arresto del ciclo cellulare nello stato G1/S.
Diverso è lo scenario osservato nelle due linee cellulari di adenocarcinoma mammario umano MCF-7 e MDA-MB-231. Entrambe le linee, in normogravità, crescono in monostrato in colture bidimensionali. Tuttavia, l'esposizione alla microgravità simulata determina uno *switch* fenotipico in due popolazioni, di cui una rimane adesa al substrato ed assume la morfologia tipica della propria linea cellulare, l'altra si stacca dal substrato e si organizza a formare delle mammosfere fluttuanti nel terreno di coltura. Le mammosfere, ricollocate in un campo gravitazionale normale di 1g, riaderiscono al substrato già dopo 6 ore, riacquisendo i caratteristici tratti morfologici nativi della linea cellulare da cui si sono originate dopo 24 ore.
In entrambe le linee cellulari, l'analisi morfologica quantitativa dei parametri: distribuzione dell'area di superficie, *roundness*, *solidity* e dimensione frattale, ha messo in evidenza differenze significative nelle tre popolazioni *on ground*, cellule in RPM aderenti, cellule in RPM fluttuanti, di ciscuna linea. Nelle popolazioni di controllo *on ground* l'actina appariva ben organizzata e i microtubuli si disponevano in maniera ordinata. Nelle cellule esposte a microgravità simulata aderenti al substrato, i filamenti actinici apparivano disorganizzati nel citosol, localizzandosi sul bordo cellulare nelle MDA-MB-231, e a livello delle giunzioni nelle MCF-7. In entrambe le linee cellulari, inoltre, i microtubuli apparivano disorganizzati con un maggiore addensamento in posizione perinucleare. Nelle cellule in sospensione, il network actinico appariva completamente distrutto nel citoplasma, concentrandosi principalmente sul bordo. I microtubuli apparivano completamente distrutti e diffusi in tutto il citoplasma.
Nel caso delle MCF-7, in entrambe le popolazioni esposte a microgravità simulata, aderenti e fluttuanti, è stata osservata una diminuzione della proliferazione rispetto alle cellule coltivate in gravità normale, già dopo 24 ore di coltura. La popolazione fluttuante ha mostrato un aumento della percentuale di cellule apoptotiche statisticamente significativo dopo 72 ore di esposizione alla microgravità. Tale risultato è in accordo con, rispettivamente, l'aumento e la riduzione, entrambi significativi, dei livelli proteici di Cl-PARP e survivin. L'esposizione alla microgravità simulata non ha, tuttavia, modificato la distribuzione delle fasi del ciclo cellulare nelle tre popolazioni, nonostante sia stato osservato un aumento, non significativo, della percentuale delle cellule in fase G2/M nelle cellule in sospensione. La riduzione significativa dei livelli proteici di Ciclina D1 a 24 ore, rispetto al controllo *on ground* e alle cellule in adesione, è in accordo con i dati del ciclo cellulare. Inoltre, è stata osservata una riduzione significativa della fosforilazione di ERK nelle mammosfere rispetto al controllo *on ground* e alla popolazione cellulare aderente. Tale riduzione sembra essere controbilanciata dall'aumento della fosforilazione di Akt già dopo 24 ore, ma che diventa statisticamente significativo dopo 72 ore. Sulla base di queste osservazioni, si può ipotizzare che l'aumento della fosforilazione di Akt, nelle cellule fluttuanti, abbia un ruolo compensatorio al fine di favorire la sopravvivenza cellulare in microgravità.
Le cellule MDA-MB-231 in sospensione presentavano, a 24 e 72 ore, una persistente inibizione della crescita cellulare, confermata dai ridotti livelli di Ciclina D1. Al contrario, le cellule in adesione mostravano una distribuzione del ciclo simile al controllo ed un aumento significativo dei livelli di Ciclina D1. Si è osservato un aumento significativo del *rate* apoptotico nelle cellule in sospensione, confermato dall'aumento dei livelli proteici di Bax e Cl-PARP. Inoltre, è stata evidenziata una riduzione dell'espressione proteica di marcatori coinvolti nei pathway di sopravvivenza e di proliferazione, come p-Akt, survivin e p-ERK. Viceversa, nelle cellule in adesione dopo un'iniziale riduzione significativa a 24 ore dei livelli proteici di p-Akt e survivin, ne è stato evidenziato un aumento altrettanto significativo a 72 ore.
I dati ottenuti nelle colture cellulari bidimensionali mostrano che la microgravità determina la formazione di due fenotipi cellulari distinti.

Nelle linee normali, MC3T3-E1 e MCF-10A, i due fenotipi cellulari, morfologicamente distinti, restano adesi al substrato. Viceversa, nelle linee tumorali, MCF-7 e MDA-MB-231, un fenotipo cellulare rimane adeso al substrato, l'altro fluttua nel terreno di coltura. In questo caso, i due fenotipi cellulari sono morfologicamente e funzionalmente distinti.
Si può ipotizzare quindi che tali significative differenze nella forma, nell'architettura dei pathway biochimici e nei processi comportamentali delle varie linee oggetto di studio, dipendano strettamente dalle caratteristiche intrinseche di ciascuna, compreso il grado di tumorigenicità e la rigidità strutturale.
Tuttavia, i cambiamenti morfologici, indotti dall'esposizione alla microgravità simulata, possono essere considerati adattativi e reversibili nelle cellule neoplastiche, in quanto, ricollocandole in normogravità, esse riacquisiscono il loro fenotipo originale.

Il secondo obiettivo di questo studio riguardava la messa a punto di un protocollo sperimentale di coltura tridimensionale in microgravità simulata. A tal fine, le tre linee cellulari mammarie umane, di cui una non tumorigenica, MCF-10, e due cancerose, MCF-7 e MDA-MB-231, sono state seminate all'interno di una matrice proteica gelatinosa, il Matrigel, ed esposte a microgravità simulata per 72 ore. Nelle linee MCF-10A e MCF-7 si è osservata la formazione di strutture aciniformi tipiche della ghiandola mammaria, sia nei campioni esposti a microgravità simulata sia nei campioni in normogravità. Viceversa, nelle MDA-MB-231 non è stata osservata la formazione di alcuna struttura in entrambe le condizioni sperimentali di coltura.
Una parte di questi esperimenti è stata ripetuta in microgravità reale, a bordo della Stazione Spaziale Internazionale (ISS), nell'ambito del progetto di ricerca "CYTOSPACE – Microgravity and cells: morphotype and phenotype correlation".
L'obiettivo del progetto è definire il modello teorico-sperimentale in grado di determinare l'influenza del fattore fisico microgravità sull'espressione genica, influenza che si esercita attraverso la modificazione della forma cellulare. L'esperimento prevede l'esecuzione di un protocollo scientifico mirato a valutare se le modifiche citoscheletriche indotte dalla microgravità reale si traducano in cambiamenti della forma e conseguentemente dell'espressione genica. Il modello cellulare utilizzato in questo studio è rappresentato dalla linea cellulare di adenocarcinoma mammario umano MCF-7. È noto in letteratura che alcune sostanze naturali sono in grado di agire come stabilizzatori del citoscheletro cellulare. A tal proposito, in questo studio la scelta è ricaduta sulla melatonina, al fine di contrastare gli effetti indotti dall'esposizione alla microgravità reale. A bordo della ISS, l'esperimento è stato eseguito impiegando le "*Experiment Units*", sistemi di coltura capaci di svolgere in modo automatizzato il protocollo scientifico. Le colture cellulari sono state alimentate attraverso l'iniezione di un idoneo terreno di coltura capace di conferire i nutrienti necessari alle cellule ed i chemicals previsti dal protocollo. Alla fine dell'esperimento i campioni sono stati fissati e riportati a terra per consentirne l'analisi, tuttora in fase preliminare.

PUBBLICAZIONI 2012-2015

Pasqualato A, Lei V, Cucina A, Dinicola S, D'Anselmi F, Proietti S, **Masiello MG**, Palombo A, Bizzarri M. Shape in migration: quantitative image analysis of migrating chemoresistant HCT-8 colon cancer cells. Cell Adh Migr. 2013 Sep-Oct; 7(5):450-9.

Dinicola S, Morini V, Coluccia P, Proietti S, D'Anselmi F, Pasqualato A, **Masiello MG**, Palombo A, De Toma G, Bizzarri M, Cucina A. Nicotine increases survival in human colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. Toxicol In Vitro. 2013 Dec; 27(8):2256-63.

D'Anselmi F, **Masiello MG**, Cucina A, Proietti S, Dinicola S, Pasqualato A, Ricci G, Dobrowolny G, Catizone A, Palombo A, Bizzarri M. Microenvironment promotes tumor cell reprogramming in human breast cancer cell lines. PLoS One. 2013 Dec 30;8(12):e83770.

Proietti S, Cucina A, Dobrowolny G, D'Anselmi F, Dinicola S, **Masiello MG**, Pasqualato A, Palombo A, Morini V, Reiter RJ, Bizzarri M. Melatonin down-regulates MDM2 gene expression and enhances p53 acetylation in MCF-7 cells. J. Pineal Res. 2014;57:120–129.

Ferranti F, Caruso M, Cammarota M, **Masiello MG**, Corano Scheri K, Fabrizi C, Fumagalli L, Schiraldi C, Cucina A, Catizone A, Ricci G. Cytoskeleton Modifications and Autophagy Induction in TCam-2 Seminoma Cells Exposed to Simulated Microgravity. BioMed Res Int. 2014; 2014:904396.

Masiello MG, Cucina A, Proietti S, Palombo A, Coluccia P, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Morini V, Bizzarri M. Phenotypic switch induced by simulated microgravity on MDA-MB-231 breast cancer cells. BioMed Res Int. 2014; 2014:652434.

Pisanu ME, De Vitis C, Noto A, **Masiello MG**, Coluccia P, Proietti S, Giovagnoli MR, Ricci A, Giarnieri E, Cucina A, Ciliberto G, Bizzarri M and Mancini R. Lung cancer stem cell lose their stemness default state after exposure to microgravity. BioMed Res Int. 2014; 2014:470253.

Dinicola S, **Masiello MG**, Proietti S, Coluccia P, Fabrizi G, Palombo A, Micciulla F, Bistarelli S, Ricci G, Catizone A, De Toma G, Bizzarri M, Bellucci S, Cucina A. Multiwalled carbon nanotube buckypaper induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia cell lines through modulation of AKT and MAPK signaling pathways. Toxicol In Vitro. 2015 Oct;29(7):1298-308.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa della Dott.ssa **Maria Grazia Masiello** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

CELL BIOLOGICAL FUNCTIONS AND BEHAVIOR IN DIFFERENT GRAVITATIONAL FIELDS

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi