

Mutació del domini Heparin Binding II de la fibronectina: generació d'una seqüència RGD per guiar la resposta de cèl·lules mare mesenquimals

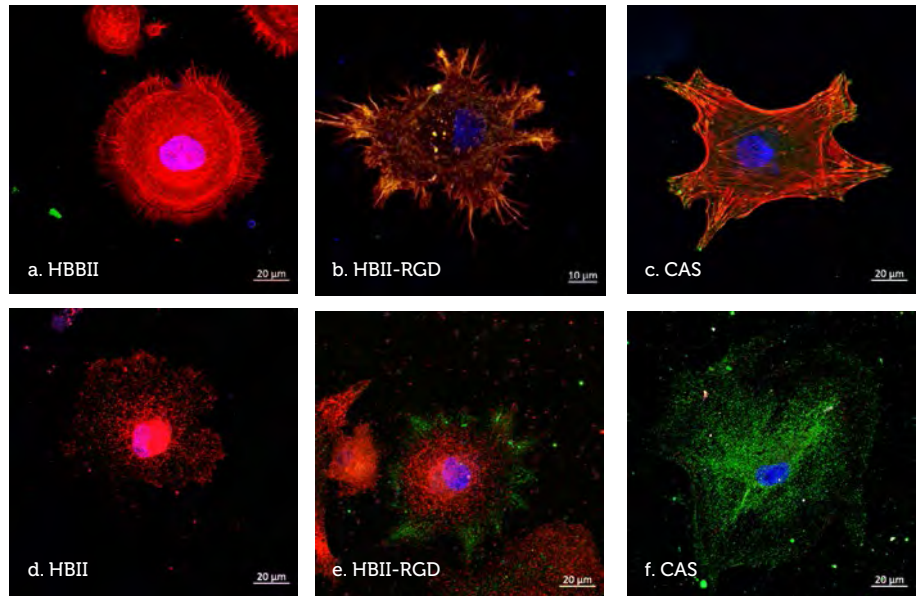
Maria Gelabert

Aproximadament un milió de malucs són reemplaçats anualment per pròtesis en tot el món, moltes de les quals són fetes de titani, ja que és biocompatible i té unes propietats mecàniques adequades per a la substitució òssia. El problema és que la interacció del cos humà amb materials externs que han d'aguantar una càrrega actualment encara presenta alguns reptes i, a vegades, les pròtesis fallen. Una possible raó n'és la pobre osteointegració que presenta el titani, ja que no és bioactiu i les cèl·lules el detecten com un material aliè al cos. Una tècnica per aconseguir una bona regeneració òssia és mimetitzar la matriu extracel·lular per «enganyar les cèl·lules», mitjançant la funcionalització del titani.

Què és la matriu extracel·lular?

La matriu extracel·lular és secretada per les cèl·lules amb l'objectiu de crear un ambient adequat on créixer i comunicar-se entre elles. Està formada per un conjunt de components (proteïnes estructurals, proteoglicans i glicoproteïnes), que interaccionen amb les cèl·lules mitjançant dominis i receptors específics i en regulen el comportament. Entre aquests components hi ha la fibronectina, una glicoproteïna que interactua amb molts tipus cel·lulars i que és necessària per a l'adhesió, la migració, el creixement i la diferenciació de les cèl·lules (Gil, *et al.*, 1993; Pankov, 2002). En la fibronectina hi ha dos fragments que són importants per a la regeneració òssia:

- CAS (FNIII8-10), Cell Attachment Site: permet l'adhesió cel·lular gràcies principalment a la seqüència RGD (Arg-Gly-Asp, FNIII10). Interacciona amb la cèl·lula mitjançant el sindecà-4.
- HBII (FNIII12-14), Heparin Binding II: és un fragment que s'uneix de forma específica a Growth Factors (Martino *et al.*, 2010) i n'estimula la diferenciació. Interacciona amb la cèl·lula mitjançant la integrina- β 1.



↑ Figura 1: Immunofluorescència de cèl·lules mare mesenquimals adherides (4 h) sobre titani funcionalitzat amb HBII (a i d), HBII mutat (b i e) i CAS (c i f). Marcatge d'actina (vermell) i vinculina (verd) en a, b i c; i sindecà-4 (vermell) i integrina- β 1 (verd) en d, e i f.

Mutació del fragment HBII i funcionalització del titani

Per millorar l'osteointegració del titani es necessita aconseguir una doble funcionalitat de la superfície:

- Millorar l'adhesió de les cèl·lules mare mesenquimals¹
- Millorar la diferenciació a osteoblasts²

Aquesta doble funció es pot aconseguir amb els dos fragments de la fibronectina comentats (CAS i HBII). El problema és que quan es posen dos fragments en la superfície del titani no es pot controlar en quina proporció s'enganxen i, aleshores, es perd reproductibilitat. Per això és interessant aconseguir una sola molècula amb una capacitat dual.

En el projecte s'ha aconseguit aquesta molècula d'interès mitjançant la mutació del frag-

ment HBII per introduir un domini RGD en un *loop* exposat. Aquest procés s'ha dut a terme mitjançant tècniques de PCR i clonatge, i s'ha comprovat que s'havia aconseguit l'objectiu mitjançant seqüenciació.

¹ Les cèl·lules mare mesenquimals són cèl·lules pluripotents localitzades en el moll de l'os que, entre altres tipus cel·lulars, poden originar osteoblasts i, per tant, són les responsables de la regeneració òssia.

² Cèl·lules localitzades en la matriu òssia encarregades de la síntesi dels components orgànics de la matriu que forma l'os. Són cèl·lules madures originades a partir de cèl·lules mare mesenquimals.

Mutació del domini Heparin Binding II de la fibronectina: generació d'una seqüència RGD per guiar la resposta de cèl·lules mare mesenquimals

Un cop aconseguit el fragment HBII mutat, s'ha enganxat per enllaços covalents a la superfície del titani tot formant una capa proteica mitjançant la silanització. S'ha estudiat la capa formada per diferents tècniques, com és l'angle de contacte, la microbalança de cristall de quars o la immunofluorescència.

Millora de l'adhesió cel·lular amb el HBII mutat

El primer punt era aconseguir que el fragment HBII permetés una millor adhesió cel·lular gràcies a la mutació per afegir un domini RGD. Es va fer a una adhesió de les cèl·lules mare mesenquimals humanes al cap de quatre hores i es va observar la morfologia de les cèl·lules i la formació d'adhesions focals mitjançant el marcatge de l'actina (vermell) i vinculina (verd) per immunofluorescència. En la Figura 1 es pot veure que en afegir el domini

RGD les cèl·lules es poden estirar molt més i formen adhesions focals; així doncs, s'aconsegueix una millor adhesió. A més, la colocalització de sindecà-4 i integrina- β 1 ens confirma l'acció dual de la molècula mutada, ja que de forma general el fragment HBII només interacciona amb sindecà-4 i el fragment CAS només amb integrina- β 1.

Millora de la diferenciació cel·lular a osteoblast

Per estudiar la diferenciació cel·lular es va fer un seguiment de l'expressió gènica durant set dies mitjançant RT-qPCR. Es van estudiar gens que estan sobreexpressats quan les cèl·lules mare mesenquimals es diferencien a os, com l'ALP, BMP-2, RUNX2 o la osteocalcina; i es va observar que en posar la mutació en el fragment HBII la diferenciació es mantenia i era major que la obtinguda amb CAS.

Conclusions

Al final d'aquest projecte es va aconseguir obtenir una molècula amb capacitat dual (adhesió i diferenciació cel·lular) que es va poder utilitzar per funcionar el titani. Gràcies a això es va obtenir un titani bioactiu sobre el qual les cèl·lules mare mesenquimals es poden unir millor (podria millorar l'osteointegració de la pròtesi) i diferenciar més ràpidament a os (podria facilitar la regeneració òssia). El proper pas seria estudiar-ne l'aplicabilitat en pacients que necessitin un implant de titani.

Bibliografia

- GIL, F. J.; PLANELL, J. A. (1993). «Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones». *Biomechanica*.
- PANKOV, R.; KENNETH, M. (2002). «Fibronectin at a glance». *Cell Sci. a Glance*.
- MARTINO, M. M.; HUBBELL, J. A. (2010). «The 12th – 14th type III repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth factor-binding domain». *FASEB J.*