

A nano-biomechanika szerepe agyi áttétek kialakulásában és az amiotrófiás laterálszklerózisban

PhD értekezés tézisei

Varga Béla



Témavezetők:

Dr. Váró György

Biofizika Intézet
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Szeged, Magyarország

Dr. Gergely Csilla

Laboratoire Charles Coulomb
Université de Montpellier
Montpellier, Franciaország



Szeged

2018

Bevezetés és célkitűzések

Az agyi áttétképződés és az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) egyaránt súlyos betegségek, amelyeknek a túlélési ideje rövid. Ezen betegségek patogén folyamatainak részletes megismerése alapvető fontosságú a korai diagnosztikai eljárások és hatékony terápiák kifejlesztésében. Munkánk során atomerő mikroszkóp (AFM) felhasználásán alapuló nanomechanikai módszereket alkalmaztunk, ezen betegségek különböző aspektusaira vonatkozó fontos kérdések megválaszolására.

A nano-biomechanika egy fejlődő kutatási terület, mely hidat képez a fizikai és biológiai tudományok között és célja az élő szervezetek nanomechanikai aspektusainak feltárása [1]. Ezen átfogó terület eszköztárának főbb elemei az atomerő mikroszkóp, a mágneses csipesz, az optikai csipesz és aljzat-deformációs (traction force) mikroszkópia. A fentiek közül talán az AFM a legsokoldalúbb, mely a nano-skálájú erők pontos és megbízható meghatározására képes.

Munkánk főbb célkitűzései:

- A metasztatikus tumorsejtek és endotél réteg közötti kölcsönhatások nanomechanikai paramétereinek közvetlen számszerűsítésével, és pontos térbeli feltérképezésével, bepillantást nyerni a daganatos sejtek felszíni kitapadási mechanizmusába, azok agyi parenchimába történő extravazációja során.
- Összehasonlítást végezni különböző rosszindulatú melanóma sejtek mechanikai fenotípusára vonatkozóan, azt vizsgálva, hogy a metasztatikus potenciál mennyiben mutatható ki a tumorsejtek nanomechanikai tulajdonságaiban.
- Tanulmányozni a citotoxikus T-sejteknek az ALS pathomechanizmusában játszott szerepét, meghatározva a CD8⁺ T sejtek és a motoneuronok között mért rövid időtartamú tapadási erőket.
- Az ALS kialakulásának korai jeleit keresve, átfogó összehasonlítást végezni ALS eredetű valamint egészséges egyedekből származó differenciált vázizomsejtek rugalmasságára vonatkozóan.

Alkalmazott módszerek

Az AFM egy nem-optikai mikroszkópai eljárás, amely egy nagyon hajlékony konzol végén elhelyezkedő rendkívül hegyes tűre gyakorolt erők mérésének segítségével egy felület nagyfelbontású háromdimenziós leképezésére képes [2]. A nagy felbontású képalkotás mellett az AFM erő-spektroszkópai mérések révén alkalmazható különféle minták fiziko-kémiai tulajdonságainak kvantitatív jellemzésére [3]. További fontos előnye, hogy nem igényel bonyolult minta előkészítést és lehetővé teszi azok a fiziológiai közelítő környezetben való mérését.

Erő-spektroszkópai mérések során a konzol vízszintes (x,y) pozíciója rögzített, míg függőleges irányú (z) elmozdulása és a rá ható erők okozta elhajlása regisztrálásra kerül, ún. erő-távolság görbék formájában. Ezekből sokoldalú információ nyerhető ki a minta mechanikai tulajdonságaira, valamint a felület és a tű kölcsönhatására vonatkozóan, úgymint rugalmassági (vagy Young) modulus, adhéziós erők, de akár egyéni szakadások száma, mérete és az érintkezési ponttól mért távolsága is meghatározható. A mintára egy rácsszerkezetet vetítve, majd minden egyes rácspontban erőmérést végezve feltérképezhető egy teljes szövet, sejt, vagy akár egyes szubcelluláris részecskék mechanikai jellemzőinek térbeli eloszlása. Egy továbbfejlesztett eljárás az egy-sejt erő-spektroszkópia (SCFS) [4], ahol akár maguk a biológiai minták is szolgálhatnak szondaként. A tűt különböző molekulákkal funkcionálizálva [5], specifikus molekulák közti kötések mérhetőek. A tű baktériumokkal való funkcionálizálása esetén [6], azok különböző felületekhez való adhéziója vizsgálható. Ugyanakkor élő sejtek is rögzíthetőek a konzolra, mely a sejtek közti erők közvetlen mérését teszi lehetővé [7].

Eredmények és kiértékelésük

I. A metasztatikus melanóma nanomechanikája

A rák egyik legfenyegetőbb aspektusa az áttétképződés, mely a rákban szenvedő betegek elhalálzásának legfőbb oka is egyben. Mindközül az agyi áttéteknek a legrosszabb a prognózisa [8]. A melanóma, annak ellenére, hogy a rákos megbetegedések 1-2%-ért felelős, mégis az egyik leggyakrabban agyi áttétet képező ráktípus [9]. Ugyanakkor a legagresszívebb és a terápiákkal szemben leginkább ellenálló ráktípusnak tartják. Mivel a központi idegrendszer nem rendelkezik klasszikus nyirokhálózattal, a tumor sejtek csupán a vérér hálózat útján kerülhetnek az agyba. Egy malignus tumorsejt, ahhoz, hogy agyi áttétet képezhessen először le kell szakadnia az elsődleges daganatról, behatolnia a közeli szövetekbe, majd áttörve az érfalat intravazációval bekerülnie a vérkeringésbe. Így jut el távolabbi szövetekhez, szervekhez, ahol extravazációval elhagyja az érhálózatot, behatol az agyi kötőszövetbe és ott osztódás révén másodlagos tumorokat képez. Az agyi metasztázis kialakulásával kapcsolatos AFM-alapú nanomechanikai méréseink célja a vérben keringő daganatsejtek a vér-agy gátat alkotó endotél-réteghez történő kitapadásának modellezése és vizsgálata volt.

I.1. Melanóma - endotél sejt kölcsönhatások közvetlen feltérképezése

A metasztatikus ráksejteknek agyi kötőszövetbe való extravazációjában szerepet játszó „pásztázó” mechanizmusok modellezéséhez erő-térképeket készítettünk, egy-sejt erőméréseket végezve az áttétképző melanóma és az agyi endotél-sejtek között. A konfluens agyi endotél sejtréteg tapadási és rugalmassági tulajdonságainak közvetlen feltérképezéséhez egyetlen daganat-sejttel funkcionális konzolokat alkalmaztunk szondaként. Az így funkcionális szonda alkalmas számos nanomechanikai paraméter meghatározására. Célunk a melanóma sejt és az agyi endotél réteg közötti tapadási erők és rugalmassági jellemzők térbeli eloszlásának meghatározása és elemzése volt. A szakirodalomban sajnos nem található egyértelmű modell, amely két élő (tetszőleges alakú) sejt összeérintése során kapott görbék alapján leírja azok rugalmassági jellemzőit. Ennek ellenére a kölcsönhatás különböző munka-szerű paraméterei a háttérmechanizmusok jó indikátorai lehetnek. Méréseink során meghatároztuk a teljes

elasztikus (vagy deformációs) munkát, amely a konzol elhajlására és a két sejt deformációjára fordítódik, továbbá a mérési ciklus alatt disszipált munkát, maximális tapadási erőt, valamint a teljes tapadási (vagy szétválási) munkát és két komponensét (közele és távoli munka), amely a két sejt szétválását jellemzi.

Bár a sejt-sejt közötti adhéziós mérések egyre több tanulmány alapját képezik, mostanáig egy élő sejtréteg másik sejttel való rugalmasságának és tapadásának térbeli leképezését még nem publikálták. Mivel a rövid-idejű intercelluláris adhéziós méréseink során a kölcsönhatást követően mindkét sejt deformációt szenved, a kinyert paraméterek nem az egyedülálló sejteket, hanem az "egész" rendszert jellemzik. Az egyes paraméterek egymástól való függésének jobb szemléltetése érdekében kereszt-korrelációs diagramot készítettünk. Érdekes módon adataink azt mutatták, hogy a tapadási tulajdonságok csak kismértékben függenek az elasztikus jellemzőktől. A mért paraméterek kereszt-korrelációinak vizsgálata kimutatta, hogy a szakadások (távoli-szétválások), a deformációval (közele-szétválások) ellentétben, erősen hozzájárulnak a maximális tapadási erőhöz és a teljes tapadási munkához, ugyanakkor rávilágított az elnyúlt pányva-szerű kötések fontosságára a sikeres kitapadásban.

I.2. A melanóma sejtek agyi endotél rétegre való kitapadásának dinamikája

Már évtizedek óta ismert, hogy az egyes rákos sejtek alacsony rugalmassági modulust mutatnak az egészséges sejtekhez képest, ahogyan ez a legtöbb rák típusnál kiderült [10]. Azonban az, hogy miképpen kapcsolódik a metasztatikus potenciál a tumorsejt autonóm és más sejtekkel szembeni nanomechanikai tulajdonságaihoz, kevésbé feltárt terület [11–14]. Egy következő kísérletsorozatban, egy-sejt erő-spektroszkópiát alkalmazva, a malignitás különböző szintjei és a tumor-endotél kölcsönhatások nanomechanikai paraméterei közti kapcsolatot vizsgáltuk. Három, különböző invazivitási szinttel rendelkező, melanóma sejtípust (WM35, A2058 és A375) hasonlítottunk össze. Az intercelluláris kölcsönhatások mérése mellett minden esetben, ugyanazon melanoma sejteknek a Petri-csésze sejtmentes felületével szembeni kölcsönhatását is ellenőriztük. Mivel nincs megfelelő modell, amely leírná a két sejt összenyomásából adódó elasztikus és plasztikus jellemzőket, ezért a vizsgált sejtípusok *in situ* rugalmasságának összehasonlítása céljából egy új paramétert vezettünk be, amelyet relatív

elasztikusságnak neveztünk el. Ez a viszonylagos dimenzió nélküli paraméter a rendszer által végrehajtott remanens és teljes munka arányaként volt meghatározva. Az értékei 0 és 1 között változnak, ahol 0 a tökéletes plasztikusságnak, míg 1 a tökéletes rugalmasságnak felel meg. A Young modulus, mint a leggyakrabban használt paraméter a sejtek rugalmasságának jellemzésére, szintén meghatározásra került. A további vizsgált paraméterek a maximális tapadási erő, valamint az egyéni szakadási események száma, mértéke és érintkezési ponttól számított távolsága voltak.

A sejtmentes Petri csésze felületen végrehajtott kontroll erőmérések azt mutatták, hogy a kapott viszonylagos rugalmasság túlnyomórészt a melanóma sejtek jellemzője, melyhez az endotélsejtek csak kis mértékben járulnak hozzá. Emellett a viszonylagos rugalmasságban a melanómasejt-típusok szerinti erős függés volt megfigyelhető, ahol a WM35 sejtek bizonyultak a leginkább rugalmasan deformálhatónak, melyeket az A2058 majd az A375 sejtípusok követték, egyre plasztikusabb alakváltozást mutatva. A viszonylagos rugalmassághoz hasonlóan a WM35 sejtek rendelkeztek a legmagasabb rugalmassági modulus értékekkel, majd az A2058 és végül A375 sejtek mutatkoztak a legpuhábbnak. A melanóma sejtek és az endotélréteg összenyomásakor mért maximális adhéziós erők értékei a metasztatikus mértékével arányosan növekedtek. Ugyanez az endotél-mentes felület esetében nem volt megfigyelhető. Továbbá a maximális adhéziós erő fordított arányosságot mutatott a viszonylagos rugalmassággal, míg egyenes arányosságot a szakadások számával szemben. Így a nagymértékben metasztatikus sejtek kulcs-jellemzőinek az alacsony viszonylagos rugalmasság, az erős tapadóképesség és a nagyszámú egyéni szakadás mutatkozott. Az egyedi szétszakadási események mértékének és előfordulási távolságának számszerűsítése ugyanakkor rámutatott, hogy az invazív melanóma pányva-szerű kapcsolódásai meghatározóak a metasztázis képződés folyamatában. A konfluens agyi endotél réteg és a három különböző invazivitású melanóma sejt között mért adhéziós erődinamikai adatok rávilágítanak a mechanikai tulajdonságok fontosságára az intercelluláris folyamatokban. Emellett a rugalmassági és a tapadási erők biomarkerként való alkalmazását is előrevetítik.

II. Az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) nanomechanikai aspektusai

Az ALS egy halálos neurodegeneratív betegség, amely az emberi mozgásrendszer fokozatos leépülését okozza. Az ALS eredete az esetek 5-10%-ában örökletes, vagy familiáris (fALS), míg a diagnosztizált betegségek nagyobb része sporadikus eredetű (sALS) [15]. A réz/cink- ion-kötő szuperoxid-diszmutáz (SOD1) génjének mutációja a betegség kialakulásának egyik fő oka [16], mely a familiáris ALS 20%-ában [17] és a sporadikus ALS 5%-ban mutatható ki [15]. Az SOD1^{G93A} mutáns humán gént kifejező transzgenikus egér jó modellnek bizonyult a humán ALS betegség esetében [17]. Kísérleteinkben ezen egérmodellből izolált primer sejtek nanomechanikáját vizsgáltuk, mégpedig a limfociták motoneuronokkal való kölcsönhatását, valamint a miotubulusok elaszticitását, melyek mind hozzájárulhatnak az ALS kialakulásának pontosabb megértéséhez.

II.1. Kölcsönhatási erők motoneuronok és ALS egérmodellből izolált T-sejtek között

A T- sejtek, vagy más néven T limfociták, kulcsszerepet játszanak a sejtes immunitásban, a potenciális kórokozók felismerésében és kiküszöbölésében. Ezen folyamatokban résztvevő erők és molekuláris kapcsolatok leírására már több tanulmány született, feltárva az immunválasz számos aspektusát [18,19]. Ezen végzetes neurodegeneratív betegség patológiája összetett, amely nem korlátozódik az idegsejtek autonóm pusztulására, hanem több sejtípus hozzájárulását és gyulladásozó folyamatokat is magában foglal. Megállapították, hogy az ALS korai szakaszát a segítő (helper) T-sejtek felhalmozódása jellemzi [20]. Azonban a betegség előrehaladtával citotoxikus CD8⁺ T sejtek is behatolnak a központi idegrendszerbe [21]. Ezen kölcsönhatások tanulmányozásával célunk az ALS egérből származó CD8⁺ T-sejtek, együttműködőink *in vitro* ko-kultúrák kísérleteiben kimutatott [22], kontakt-függő neurotoxikus aktivitásának számszerűsítése volt. Összehasonlítva a vad típusból és a mutáns egérből izolált (SOD1^{G93A}) CD8⁺ citotoxikus T-sejteknek a vad típusú egerekből izolált motoneuronokkal szembeni adhézión tulajdonságait, szignifikáns különbségeket tapasztaltunk. A mutáns egerekből származó T-sejtek megnövekedett adhézión erőt mutattak az egészséges egyedekből izolált limfocitákéhoz képest. Továbbá, a felismerő

folyamatokban résztvevő pMHC-I és a TCR molekulák közötti specifikus kötéseket blokkolva, a mutáns T-sejtek esetében szignifikáns adhéziós-erő csökkenés volt megfigyelhető, míg a vad típusú T-sejtek csak kis mértékben vagy egyáltalán nem mutattak változást. Mindezek megerősítik a citotoxikus T-sejtek hozzájárulását az ALS kialakulásához, mint az idegrendszeri degeneráció aktív résztvevői.

II.2. ALS egérmodellből származó miotubulusok elaszticitása

Az izomsejt-képződés egy többlépéses és rendkívül szabályozott folyamat. Az izomsejtek elsődleges prekursorai a mioblasztok. Az egyedi mioblasztok fúziójából alakulnak ki a miotubulusok, amelyek több, centrálisan elhelyezkedő sejtmagot tartalmazó fejlődő izomrostok. Bár számos tanulmány megvizsgálta a különböző eredetű, és különböző differenciáltsági szinttel rendelkező egészséges vázizomsejtek mechanikai tulajdonságait [23–25], kevesen kutatták a betegségek vázizomsejtek rugalmasságára gyakorolt hatását, ezek közül is a legtöbb tanulmány főként az izomdisztrófiákra irányult [26–28]. Egy további tanulmány során átfogó összehasonlítást végeztünk az egészséges és az ALS-ben szenvedő egerekből származó differenciált primer izomsejtek Young-modulusára vonatkozóan. Nagy felbontású nanomechanikai térképeket készítettünk egyedi megnyúlt mioblasztokról és különböző vastagságú multinukleáris miotubulusokról. Az egyedi mioblasztok esetében mért Young modulusban szignifikáns különbség mutatkozott azok centrális részein és végnyúlványain mért értékek között. Megvizsgáltuk továbbá a sejtek aktin és miozin tartalmának az elaszticitásra gyakorolt hatását. Immunfluoreszcens képeken kimutattuk, a fúzió előtt álló aktinban gazdag kapcsolódási régiókat. Emellett számszerűsítettük a különböző aktin és miozin kódoló gének expressziós szintjét.

A miotubulusokra vonatkozóan különbségeket tapasztaltunk a vékony és vastag vad típusú miotubulusok rugalmassága között, utalva a két populáció közti érettségi különbségekre. Hasonló jelenség a SOD1 mutáns miotubulusok esetében nem volt megfigyelhető. A vékony, kevésbé érett miotubulusok rugalmassági modulusa nem mutatott szignifikáns eltérést a vastagabb, ezért érettebb miotubulusokhoz képest. Ez a megfigyelés, amely az ALS-eredetű miotubulusok fokozott autonóm keményedését

mutatja, lényeges lehet ezen gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegség lefolyásának megértésében.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy sejtszintű mechanikai vizsgálataink két súlyos betegség különböző aspektusaira irányultak, nagyban hozzájárulva azok háttérfolyamatainak megértéséhez. Munkánk, ugyanakkor alátámasztja az AFM-alapú nanomechanikai módszerek relevanciáját és fontos szerepét a különböző betegségek patofiziológiájának, kialakulásának, diagnosztikájának és progressziójának megismerésében, hozzájárulva akár új hatékonyabb jövőbeli terápiák kifejlesztéséhez.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- I. **Varga B.**, Fazakas C., Molnár J., Wilhelm I., Domokos R. A., Krizbai I. A., Szegletes Z., Váró G., Végh A. G. **Direct mapping of melanoma cell - endothelial cell interactions**, *J. Mol. Recognit.* **2017**, 30(6):e2603, DOI: 10.1002/jmr.2603
IF: 2.175
- II. **Varga B.**, Domokos R. A., Fazakas C., Wilhelm I., Krizbai I. A., Szegletes Z., Gergely C., Váró G., Végh A. G. **De-adhesion dynamics of melanoma cells from brain endothelial layer**, *BBA Gen. Subjects*, **2018**, 1862(3):745-751, DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.10.013
IF: 4.702
- III. **Varga B.**, Martin M., Hilaire C., Sanchez-Vicente A., Areias J., Salsac C., Cuisinier F.J.G., Cedric Raoul C., Scamps F., and Gergely C. **Myotube elasticity of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model** (Revised manuscript submitted to *Sci.Rep.*)

Bibliográfia

- [1] K.K. Liu, M.L. Oyen, Nanobiomechanics of living materials, *Interface Focus*. 4 (2014). doi:10.1098/rsfs.2014.0001.
- [2] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Atomic Force Microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930–933. doi:10.1103/PhysRevLett.56.930.
- [3] B. Cappella, G. Dietler, Force-distance curves by atomic force microscopy, *Surf. Sci. Rep.* 34 (1999) 1–104. doi:10.1016/S0167-5729(99)00003-5.
- [4] A. V Taubenberger, D.W. Hutmacher, D.J. Müller, Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials., *Tissue Eng. Part B*. 20 (2014) 40–55. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0125.
- [5] O.K. Dudko, G. Hummers, A. Szabo, Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 15755–15760.
- [6] A. Beaussart, S. El-Kirat-Chatel, Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy, *Nat. Protoc.* 9 (2014) 1049–55. doi:10.1038/nprot.2014.066.
- [7] J. Friedrichs, K.R. Legate, R. Schubert, M. Bharadwaj, C. Werner, D.J. Müller, M. Benoit, A practical guide to quantify cell adhesion using single-cell force spectroscopy, *Methods*. 60 (2013) 169–178. doi:10.1016/j.ymeth.2013.01.006.
- [8] E. Fokas, J.P. Steinbach, C. Rödel, Biology of brain metastases and novel targeted therapies: Time to translate the research, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1835 (2013) 61–75. doi:10.1016/j.bbcan.2012.10.005.
- [9] S. Madajewicz, C. Karakousis, C.R. West, J. Caracandas, A.M. Avellanosa, Malignant Melanoma Brain Metastases, *Cancer*. 53 (1984) 2550–2552.
- [10] J. Zemła, J. Danilkiewicz, B. Orzechowska, J. Pabijan, S. Seweryn, M. Lekka, Atomic force microscopy as a tool for assessing the cellular elasticity and adhesiveness to identify cancer cells and tissues, *Semin. Cell Dev. Biol.* 73 (2017) 115–124. doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.029.
- [11] Z. Zhou, C. Zheng, S. Li, X. Zhou, Z. Liu, Q. He, N. Zhang, A. Ngan, AFM nanoindentation detection of the elastic modulus of tongue squamous carcinoma cells with different metastatic potentials, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9 (2013) 864–874. doi:10.1016/j.nano.2013.04.001.
- [12] T. Watanabe, H. Kuramochi, A. Takahashi, K. Imai, N. Katsuta, T. Nakayama, H. Fujiki, M.

- Suganuma, Higher cell stiffness indicating lower metastatic potential in B16 melanoma cell variants and in (2)-epigallocatechin gallate-treated cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138 (2012) 859–866. doi:10.1007/s00432-012-1159-5.
- [13] W. Xu, R. Mezencev, B. Kim, L. Wang, J. McDonald, T. Sulchek, Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells, *PLoS One.* 7 (2012) e46609. doi:10.1371/journal.pone.0046609.
- [14] R. Omidvar, M. Tafazzoli-shadpour, M.A. Shokrgozar, M. Rostami, Atomic force microscope-based single cell force spectroscopy of breast cancer cell lines: An approach for evaluating cellular invasion, *J. Biomech.* 47 (2014) 3373–3379. doi:10.1016/j.jbiomech.2014.08.002.
- [15] M.C. Kiernan, S. Vucic, B.C. Cheah, M.R. Turner, A. Eisen, O. Hardiman, J.R. Burrell, M.C. Zoing, Amyotrophic lateral sclerosis, *Lancet.* 377 (2011) 942–955. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7.
- [16] D. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, A. Hentati, H. Deng, R.H. Brown, Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature.* 362 (1993) 59–62.
- [17] M.E. Gurney, H. Pu, A.Y. Chiu, M.C.D. Canto, C.Y. Polchow, D.D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y.W. Kwon, H. Deng, W. Chen, P. Zhai, R.L. Sufit, T. Siddique, Motor Neuron Degeneration in Mice That Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation, *Science* (80-.). 264 (1994) 1772–1775. doi:10.1126/science.8209258.
- [18] B.H. Hosseini, I. Louban, D. Djandji, G.H. Wabnitz, J. Deeg, N. Bulbuc, Y. Samstag, M. Gunzer, J.P. Spatz, G.J. Hämmerling, Immune synapse formation determines interaction forces between T cells and antigen-presenting cells measured by atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 2373–2373. doi:10.1073/pnas.1000184107.
- [19] P. Sundd, M.K. Pospieszalska, K. Ley, Neutrophil rolling at high shear: Flattening, catch bond behavior, tethers and slings, *Mol. Immunol.* 55 (2013) 59–69. doi:10.1016/j.molimm.2012.10.025.
- [20] J.S. Henkel, D.R. Beers, S. Wen, A.L. Rivera, K.M. Toennis, J.E. Appel, W. Zhao, D.H. Moore, S.Z. Powell, S.H. Appel, Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival, *EMBO Mol. Med.* 5 (2013) 64–79. doi:10.1002/emmm.201201544.
- [21] I.M. Chiu, A. Chen, Y. Zheng, B. Kosaras, S.A. Tsiftoglou, T.K. Vartanian, R.H. Brown, M.C.

- Carroll, T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 17913–17918. doi:10.1073/pnas.0804610105.
- [22] E. Coque, *La neuroimmunité dans la sclérose latérale amyotrophique (defended Thesis)*, Université de Montpellier, 2017.
- [23] A.B. Mathur, A.M. Collinsworth, W.M. Reichert, W.E. Kraus, G.A. Truskey, Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy, *J. Biomech.* 34 (2001) 1545–1553. doi:10.1016/S0021-9290(01)00149-X.
- [24] A.M. Collinsworth, S. Zhang, W.E. Kraus, G.A. Truskey, Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283 (2002) C1219–C1227. doi:10.1152/ajpcell.00502.2001.
- [25] E. Defranchi, E. Bonaccorso, M. Tedesco, M. Canato, E. Pavan, R. Raiteri, C. Reggiani, Imaging and elasticity measurements of the sarcolemma of fully differentiated skeletal muscle fibres, *Microsc. Res. Tech.* 67 (2005) 27–35. doi:10.1002/jemt.20177.
- [26] C. Pasternak, S. Wong, E.L. Elson, Mechanical function of dystrophin in muscle cells, *J. Cell Biol.* 128 (1995) 355–361. doi:10.1083/jcb.128.3.355.
- [27] S. Puttini, M. Lekka, O.M. Dorchies, D. Saugy, T. Incitti, U.T. Ruegg, I. Bozzoni, A.J. Kulik, N. Mermod, Gene-mediated Restoration of Normal Myofiber Elasticity in Dystrophic Muscles, *Mol. Ther.* 17 (2009) 19–25. doi:10.1038/mt.2008.239.
- [28] R.W. van Zwieten, S. Puttini, M. Lekka, G. Witz, E. Gicquel-Zouida, I. Richard, J.A. Lobrinus, F. Chevalley, H. Brune, G. Dietler, A.J. Kulik, T. Kuntzer, N. Mermod, Assessing dystrophies and other muscle diseases at the nanometer scale by atomic force microscopy, *Nanomedicine.* 9 (2014) 393–406. doi:10.2217/nmm.12.215.