

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE

Tecnologie Biomediche

Ciclo XXII

MED/33 – Malattie dell'apparato locomotore

**CONTROLLO MOLECOLARE DEL DIFFERENZIAMENTO
OSTEOBLASTICO PER APPLICAZIONI NEL CAMPO
DELLA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO**

Presentata da: Dott.ssa Serena Rubina Baglio

Coordinatore Dottorato

Chiar.ma Prof.ssa Marialuisa Zerbini

Relatore

Chiar.mo Prof. Nicola Baldini

Correlatore

Dott.ssa Donatella Granchi

Esame finale anno 2010

INDICE

| | |
|--|-----------|
| Introduzione | 3 |
| Il processo di guarigione ossea | 3 |
| Ruolo delle cellule staminali | 8 |
| Eventi molecolari della riparazione ossea | 13 |
| Ruolo dei fattori di crescita | 20 |
| <i>Evoluzione temporale del profilo di espressione genica durante il differenziamento osteoblastico di cellule mesenchimali staminali (hMSC)</i> | 28 |
| Obiettivo dello studio | 28 |
| Materiale e Metodo | 29 |
| Coltura e caratterizzazione delle hMSC | 29 |
| Profilo di espressione genica su larga scala | 33 |
| Validazione dei dati microarray | 34 |
| Analisi statistica | 35 |
| Risultati | 36 |
| Caratterizzazione delle colture | 36 |
| Analisi su larga scala del profilo di espressione genica delle hMSC | 39 |
| Validazione dei risultati microarray tramite qRT-PCR | 42 |
| Lista di geni per il monitoraggio delle colture di hMSC | 43 |
| Discussione | 50 |
| Conclusioni | 55 |
| <i>Analisi dell'espressione genica di hMSC coltivate su biomateriali per applicazioni protesiche</i> | 56 |
| Obiettivo dello studio | 56 |
| Materiale e metodo | 57 |
| Scaffold tridimensionali (3D) | 57 |
| Colture cellulari | 58 |

| | |
|--|-----------|
| Estrazione dell'RNA _____ | 58 |
| Real Time PCR _____ | 59 |
| Analisi dei dati _____ | 61 |
| Risultati e discussione _____ | 61 |
| Analisi di espressione genica delle hMSC coltivate su nanocompositi _____ | 61 |
| Analisi della performance dei nanocompositi _____ | 67 |
| Conclusioni _____ | 69 |
| <i>Valutazione del potenziale osteogenetico di hMSC in pazienti affetti da pseudoartrosi congenita della tibia</i> _____ | <i>70</i> |
| Introduzione _____ | 70 |
| Pazienti e metodo _____ | 71 |
| Pazienti _____ | 71 |
| Colture cellulari _____ | 72 |
| Caratterizzazione delle proprietà osteogeniche delle cellule _____ | 73 |
| Analisi statistica _____ | 75 |
| Risultati _____ | 76 |
| Potenziale osteogenetico delle hMSC in pazienti affetti da pseudoartrosi congenita della tibia _____ | 76 |
| Effetto del siero autologo sulle proprietà osteogenetiche delle IC-MS C e delle P-MS C _____ | 80 |
| Effetto del sovrantante degli osteoblasti sul differenziamento delle IC-MS C _ | 81 |
| Discussione _____ | 85 |
| Bibliografia _____ | 88 |

Introduzione

L'osso è un tessuto vascolarizzato altamente dinamico, costantemente soggetto a rimodellamento durante tutto il corso della vita. Il rimodellamento costante fornisce un meccanismo di guarigione e rigenerazione dei tessuti danneggiati in assenza di formazione di cicatrice. Tale proprietà si applica non solo alla sequenza di eventi scatenati da un insulto traumatico, quale una frattura, ma anche quando si rende necessario l'innesto di un impianto artificiale endosseo.

I meccanismi molecolari della riparazione ossea ripercorrono il processo di formazione del tessuto scheletrico durante lo sviluppo embrionario.¹ Molteplici fattori, fra cui le citochine e i fattori di crescita contenuti nella matrice extracellulare (ECM), interagiscono con diversi tipi cellulari (cellule staminali mesenchimali, cellule del tessuto osseo e della cartilagine e cellule endoteliali) che vengono reclutati al sito del danno tissutale. Tali fattori regolano i meccanismi di segnalazione intra- ed extracellulare che, attraverso i processi di migrazione, proliferazione, chemiotassi, differenziamento e sintesi di proteine extracellulari, sono responsabili dei fenomeni di osteoconduzione ed osteoinduzione.²

Il processo di guarigione ossea

La complessa serie di eventi cellulari che conducono alla guarigione ossea sono stati ampiamente studiati su modelli sperimentali.³ Istologicamente si distinguono una fase infiammatoria precoce (formazione dell'ematoma, infiammazione, angiogenesi) con formazione del tessuto di granulazione, una fase riparativa, caratterizzata dalla formazione del callo cartilagineo e osseo immaturo e, successivamente, dalla sostituzione del callo con osso lamellare, e una fase di rimodellamento tardiva, che consente, nel tempo, di ripristinare la forma originale dell'osso.

Infiammazione. In caso di frattura il trauma consiste non solo nell'interruzione dell'integrità scheletrica, ma anche nella distruzione della struttura vascolare, che compromette l'apporto di nutrienti al sito della lesione. Ciò determina una ridotta tensione di ossigeno e la distruzione dell'architettura del midollo. L'ematoma che si genera tra i capi di frattura rappresenta una fonte di molecole segnale (fattori di crescita e citochine) per i precursori monocito-macrofagici e osteo-condroblastici.⁴ I macrofagi e

le altre cellule infiammatorie reclutate secernono *fibroblast growth factor* (FGF), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor β* (TGF β), *insulin-like growth factor I* (IGF-I) ed una varietà di citochine, fra cui interleuchina 1 (IL-1) e interleuchina 6 (IL-6). A loro volta, queste hanno un effetto chemiotattico sulle cellule infiammatorie e sui precursori osteoblastici.^{5,6} Durante la fase precoce, i precursori mesenchimali proliferano e si differenziano in senso osteogenetico e condrogenetico⁷ (Figura 1); si assiste inoltre alla formazione di nuovi vasi sanguigni per gemmazione dalle strutture vascolari preesistenti attraverso una complessa catena di eventi: degradazione enzimatica della membrana basale, migrazione delle cellule endoteliali in direzione dello stimolo angiogenetico, proliferazione, maturazione e organizzazione delle cellule endoteliali in tubi capillari. Tale processo è regolato da FGF, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e angiopoietina 1 e 2.

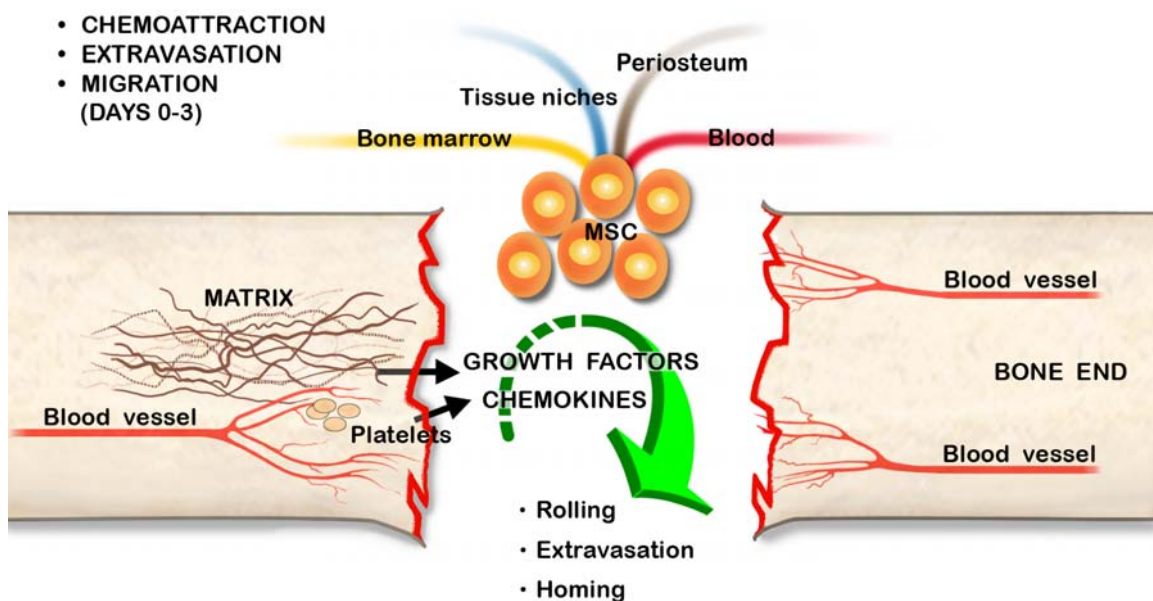


Figura 1. Le cellule staminali mesenchimali (hMSC) provenienti da sangue, periostio, midollo osseo e altre nicchie tissutali, migrano al sito della frattura ossea. I fattori di crescita TGF β , FGF, PDGF e IGF-I e le chemochine IL-1, IL-6 e TNF- α , rilasciati dalla ECM e dalle piastrine, promuovono il reclutamento, la migrazione, la proliferazione e l'homing delle hMSC al sito della lesione.

Riparazione. L'ossificazione intramembranosa ha inizio pochi giorni dopo il danno tissutale, mentre l'ossificazione encondrale, che coinvolge i tessuti adiacenti al sito della frattura, si sviluppa nell'arco di un mese circa. L'area subperiostale e i tessuti molli immediatamente circostanti il sito della frattura formano il cosiddetto 'callo duro' e creano direttamente nuovo tessuto osseo. In tale processo i precursori mesenchimali reclutati al sito della lesione si differenziano in senso osteoblastico e producono sia osso compatto che osso trabecolare senza indurre la formazione di cartilagine.

L'ossificazione encondrale coinvolge il reclutamento e la proliferazione dei progenitori multipotenti ed il loro differenziamento in cartilagine. La proliferazione delle cellule staminali mesenchimali (hMSC) è già apprezzabile 3 giorni dopo la frattura e rimane elevata per alcuni giorni.⁸ (Figura 2)

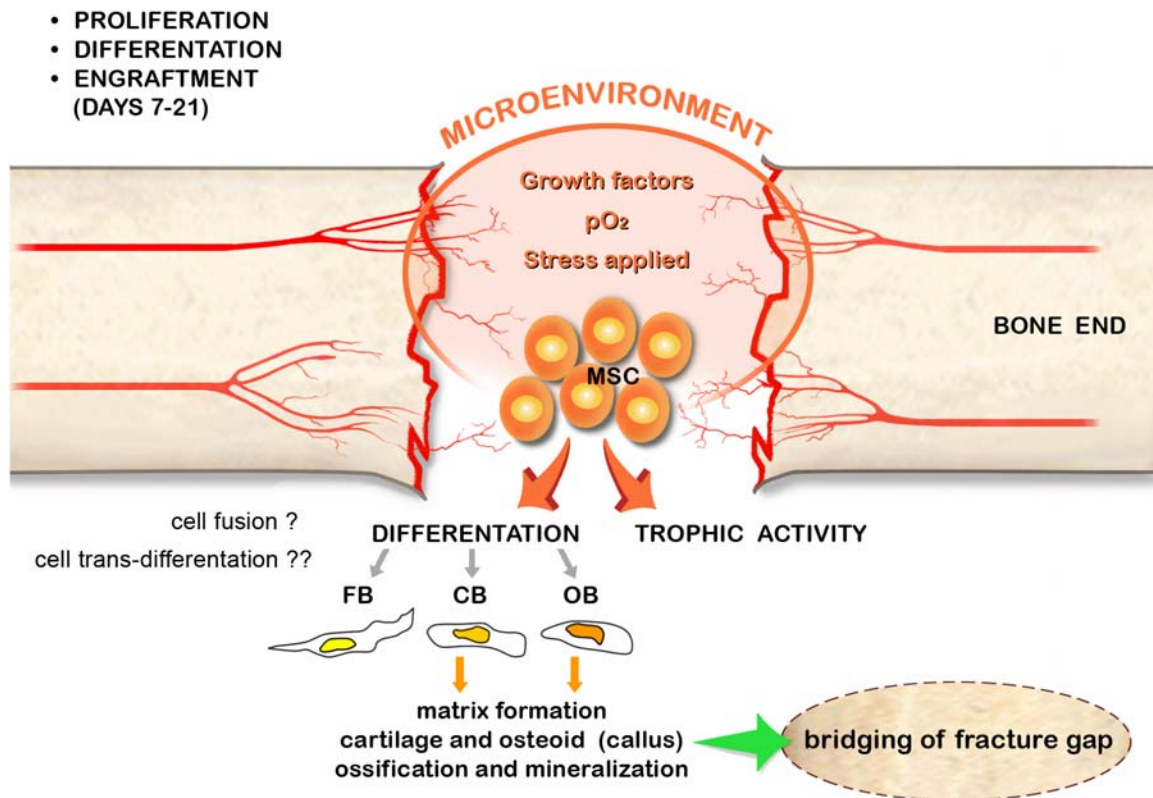


Figura 2. Nel sito della frattura, fattori microambientali, quali ridotta tensione dell'ossigeno, sollecitazioni meccaniche e fattori di crescita, inducono il differenziamento delle hMSC in fibroblasti (FB), condroblasti (CB) ed osteoblasti (OB). Tali cellule sintetizzano la ECM che andrà incontro ad un processo di calcificazione per poi essere convertita in osso. Recentemente è stato ipotizzato che le hMSC possiedano anche una rilevante attività 'trofica' oltre alla nota abilità differenziativa.³²

La condrogenesi determina la formazione di un callo cartilagineo che riempie e stabilizza il sito della frattura. I condrociti del callo cartilagineo adiacenti al callo osseo rilasciano calcio mitocondriale nella matrice e depongono collagene di tipo II ed aggregano. Dopo 2 settimane tali cellule vanno incontro a ipertrofia e producono collagene di tipo X. In seguito, la membrana, parzialmente mineralizzata, viene riassorbita e sostituita con una matrice formata principalmente da collagene di tipo I.

I condrociti rilasciano fosfatasi e proteasi per preparare la matrice alla successiva mineralizzazione.⁹ L'attività delle fosfatasi consiste nel rendere disponibili gruppi fosfato, che reagiscono con il calcio rilasciato dai mitocondri determinando la precipitazione del fosfato di calcio e quindi la calcificazione della cartilagine. Le proteasi degradano i proteoglicani che impediscono la mineralizzazione, permettendo ai condrociti di controllare la velocità e l'andamento chimico-fisico del processo di mineralizzazione della cartilagine. Dopo 4-5 settimane si attivano i condroclasti, cellule multinucleate responsabili della degradazione della cartilagine calcificata. Durante il riassorbimento della matrice cartilaginea, i condroclasti inviano dei segnali che permettono ai vasi sanguigni di penetrare nel tessuto, portando con sé cellule mesenchimali staminali perivascolari che si differenzieranno in cellule osteoprogenitrici. Le cellule endoteliali, assieme ad altri tipi cellulari che esprimono metalloproteasi, facilitano l'invasione vascolare e la rimozione dei setti e delle strutture cartilaginee residue.¹⁰

I tessuti derivanti dall'ossificazione intramembranosa ed encondrale crescono fino a congiungersi, e dopo 6-7 settimane si osserva una combinazione di cartilagine calcificata e nuovo osso reticolare. La transizione da cartilagine a osso coinvolge una serie di eventi programmati di rimozione cellulare e modificazione della matrice, durante la quale i condrociti vanno incontro a apoptosi.¹¹

Rimodellamento. La completa guarigione della frattura si ottiene durante la fase di rimodellamento, in cui osteoblasti ed osteoclasti cooperano al fine di convertire il callo della frattura in una struttura ossea capace di sostenere i carichi meccanici fisiologici.

A differenza di quanto accade nel corso dello sviluppo delle ossa lunghe, in cui la crescita apposizionale periostale è bilanciata dal riassorbimento della superficie endostale, nel rimodellamento del callo della frattura si assiste ad una rimozione esterna di osso e ad una apposizione sulle superfici interne. L'osso trabecolare è prima riassorbito dagli osteoclasti, a livello di una cavità di riassorbimento poco profonda

chiamata lacuna di Howship. Ogni cellula acidifica lo spazio extracellulare locale e secerne enzimi lisosomiali, proteasi seriniche, collagenasi e la fosfatasi acida tartrato-resistente 5b, che degradano la matrice ossea. La distruzione enzimatica della matrice ossea determina il rilascio di varie proteine, tra cui i fattori di crescita immagazzinati precedentemente durante la formazione di osso. Essi, assieme alle citochine prodotte dagli osteoclasti e da altre cellule, reclutano al sito di lesione gli osteoprogenitori che si differenziano in osteoblasti. Gli osteoblasti penetrano nelle cavità di riassorbimento, producono nuova matrice ossea di tipo intrecciato o lamellare e, rimanendovi intrappolati, si differenziano in osteociti.¹² Infine alcuni osteoblasti assumono una morfologia piatta e si dispongono sulle superfici quiescenti dell'osso (c.d. 'bone lining cells').

L'angiogenesi ha un ruolo di fondamentale importanza nella regolazione del rimodellamento osseo e della riparazione delle fratture. Fattori angiogenici quali VEGF ed endotelina sono regolatori dell'osteoclasto e dell'osteoblasto ed inoltre la formazione di vasi sanguigni è funzionale al trasporto di precursori osteoclastici ed osteoblastici circolanti al sito di rimodellamento attivo. L'interfaccia tra le superfici ossee ed il midollo osseo presenta strutture vascolari, i capillari sinusoidali paratrabecolari, che possiedono una parete interna costituita da cellule endoteliali ed una esterna formata da uno strato di osteoblasti. Il rimodellamento osseo è associato ad un flusso sanguigno più intenso attraverso i microvasi che si adattano alla superficie dell'osso spugnoso.¹³ Inoltre è stata caratterizzata una struttura vascolare specializzata, '*bone remodeling compartment*' (BRC),¹⁴ composta da cellule piatte dotate di tutte le caratteristiche delle *bone lining cells*. Tali cellule esprimono le principali citochine ed i fattori di crescita osteotropi, rendendo il BRC la struttura candidata per l'accoppiamento dei processi di riassorbimento e formazione ossea. La secrezione di tali fattori in uno spazio confinato e separato dal midollo osseo faciliterebbe la regolazione locale del rimodellamento senza interferire con i fattori di crescita secreti dalle cellule del sangue nel midollo.

Ruolo delle cellule staminali

Come descritto in precedenza, in seguito ad una frattura l'integrità dello scheletro è normalmente ripristinata attraverso meccanismi di riparazione ossea, talvolta con l'aiuto di dispositivi ortopedici che ottimizzano la stabilità meccanica. Quando il difetto osseo è troppo esteso si rendono necessarie soluzioni alternative per potenziare l'unione ossea secondaria. In tale contesto si inseriscono la rigenerazione ossea e l'ingegneria tissutale.¹⁵

Friedenstein et al.¹⁶ descrissero per la prima volta precursori clonogenici multipotenti presenti nello stroma del midollo osseo, denominandoli '*colony forming unit fibroblasts*' (CFU-Fs). Il termine 'staminale' identifica una cellula capace di proliferare, autorigenerarsi (*self-renewal*), differenziarsi e rigenerare tessuti in vivo. Esistono due tipi di cellule staminali: embrionali e non embrionali (o cellule staminali adulte). Le cellule staminali embrionali (ESC) derivano dalle cellule interne della blastocisti, pochi giorni dopo la fecondazione dell'uovo, e possono convertirsi in cellule di qualunque linea differenziativa. Le cellule staminali provenienti dal midollo osseo adulto sono state studiate ampiamente per il trattamento di disturbi ematologici. Sebbene la staminalità di tali cellule non sia stata dimostrata, l'acronimo hMSC indica 'human multipotent mesenchymal stromal cell' e definisce cellule non emopoietiche (CD34-) derivate dallo stroma, aderenti alla plastica e capaci di differenziare in osteoblasti, adipociti, o condroblasti *in vitro*.^{17,18}

Per quanto riguarda le applicazioni cliniche, per ragioni etiche non è consentito l'uso delle ESC indotte al completo differenziamento prima del trapianto, dal momento che si renderebbe necessaria la distruzione dell'embrione di origine. Le hMSC autologhe sono invece usate in protocolli clinici per il trattamento della cardiopatia ischemica, di malattie vascolari, di lesioni del midollo spinale, di mancata consolidazione di fratture, dell'osteogenesi imperfetta, di malattie neurologiche e del diabete di tipo I.¹⁹ Tali cellule sono state isolate da midollo osseo, periostio, tessuto adiposo, tessuto muscolare, sinovia, polpa dentale, fluido amniotico e tessuti fetali, ma l'importanza, l'attività e i loro siti di deposito *in vivo* sono ancora solo parzialmente conosciuti.

Sfortunatamente non esiste un antigene di superficie unicamente espresso dalle hMSC, e ciò ne impedisce la selezione a partire da una popolazione eterogenea quale è il midollo osseo. L'antigene STRO-1, che è presente sulle CFU-F del midollo osseo e che definisce potenzialmente una sottopopolazione di precursori delle hMSC, è comune ai

precursori eritroidi. Il fattore di trascrizione Oct-4, che è espresso dalle ESC totipotenti ed ha un ruolo essenziale nel determinare la totipotenza e la staminalità, è stato rilevato nelle cellule mononucleari del sangue periferico.²⁰ Recentemente, SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4), specifico per ESC, eritrociti ed alcune cellule neurali, è stato descritto come marcatore delle hMSC.²¹

Le hMSC esprimono antigeni quali CD105, CD90, CD73, LNGFR, D7-Fib e CD44, ma durante l'espansione *in vitro* si assiste alla perdita di alcuni di essi,²² pertanto tali cellule vengono identificate tramite una combinazione di saggi biochimici, morfologici e funzionali.

Il midollo osseo è costituito da cellule stromali ed ematopoietiche; le prime comprendono cellule commissionate, come adipociti ed osteoblasti, e precursori multipotenti. La percentuale di hMSC nel midollo osseo è molto bassa (0,001-0,01%). Il tessuto adiposo contiene cellule staminali multipotenti molto simili alle hMSC del midollo osseo e che possono essere isolate in elevata quantità dal tessuto derivante dalla liposuzione cosmetica. La proporzione di CFU-F, che rappresentano la reale componente di precursori nella popolazione totale di hMSC *in vitro*, è di 1:100 in cellule derivate dal tessuto adiposo, ossia circa 500 volte più alta che nel midollo osseo.²³

La presenza di precursori osteogenetici nel sangue è controversa; in ogni caso la loro quantità risulta molto bassa e dipende dal metodo di isolamento.²⁴ È possibile che il numero di precursori sia sottostimato a causa del metodo di selezione per aderenza su plastica, ma è comunque interessante che la loro quantità aumenti in seguito a fratture ossee, ustioni acute ed infarto miocardico.^{25,26}

I periciti subendoteliali, che forniscono supporto meccanico, stabilità e contrattilità ai vasi di piccole e grandi dimensioni, sono considerati precursori delle hMSC, in quanto capaci di dare origine ad osteoblasti, condrociti ed adipociti.²⁷

Una popolazione di cellule multipotenti e clonogeniche è stata inoltre ottenuta dal fegato e dal cuore. Tali cellule sono capaci di differenziarsi in tipi cellulari morfologicamente e funzionalmente corrispondenti a quelli derivati dai tre foglietti embrionali²⁸ e corrispondono alle c.d. 'multipotent adult progenitor cells' (MAPC). Le MAPC vengono considerate potenzialmente equivalenti alle ESC, con le quali hanno in comune il potenziale differenziativo multipotente e l'elevata capacità proliferativa; inoltre, quando sono iniettate nella blastocisti, esse contribuiscono alla generazione della maggior parte dei tipi cellulari somatici.²⁹ Tali cellule soddisfano pienamente la

definizione di staminalità; a differenza delle ESC, possono essere isolate dal midollo osseo autologo ed utilizzate, senza il rischio di formazione di un teratoma, prima di essere indotte a differenziare, o possono trovare applicazione in terapie locali o sistemiche in seguito a manipolazione genetica.

La plasticità delle hMSC è un ulteriore oggetto di discussione, dal momento che i diversi protocolli sperimentali determinano la selezione di diverse popolazioni di hMSC effettivamente isolate e saggiate. Le hMSC possono riparare un tessuto danneggiato differenziandosi nel fenotipo opportuno, rilasciando citochine e fattori di crescita ed andando incontro a fusione cellulare. Le principali prove della loro plasticità *in vitro* sono: la capacità di ‘de-differenziarsi’ a partire da un fenotipo condrocitico o adipocitico precedentemente acquisito, per poi progredire verso la linea differenziativa osteoblastica; la capacità di ‘trans-differenziarsi’, ossia di andare incontro al processo noto come ‘transizione epitelio-mesenchimale’ (EMT). Tuttavia, alcuni autori ritengono che ad essere responsabile del cambiamento fenotipico delle hMSC sia la fusione cellulare piuttosto che i due meccanismi sopra descritti, pertanto la plasticità osservata sarebbe semplicemente correlata all’eterogeneità della popolazione.³⁰

Anche la consistenza della matrice cellulare potrebbe guidare inizialmente il commissionamento delle hMSC, sebbene non sia sufficiente per il completamento del differenziamento.³¹ Su substrati semi-solidi (0,1-1 kPa), che simulano la consistenza del tessuto cerebrale, le hMSC mostrano un fenotipo neuronale; su substrati di rigidità intermedia (8-17 kPa) esse si differenziano in mioblasti e su substrati rigidi (25-40 kPa), somiglianti ad osteoni, assumono il fenotipo osteoblastico. Se lo stimolo committente è prolungato per qualche settimana, il differenziamento non è reversibile o revocabile tramite l’aggiunta di fattori solubili specifici per un’altra linea differenziativa. Tale osservazione, oltre ad essere consistente con la perdita di elasticità delle cellule differenziate, mette in evidenza il ruolo del microambiente (in particolare dei fattori meccanici) nel determinare il destino delle cellule indifferenziate e suggerisce un ulteriore meccanismo tramite il quale potrebbe essere definito l’homing delle cellule. (Figura 3)

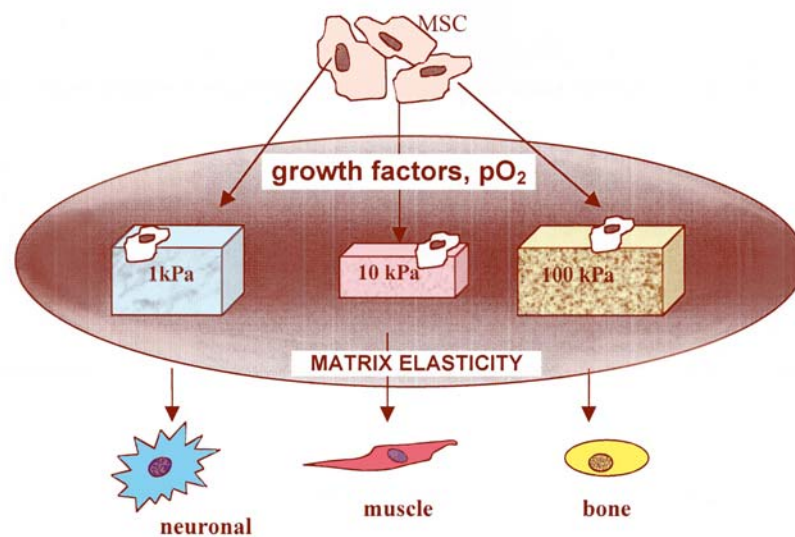


Figura 3. Il differenziamento delle hMSC è influenzato dalla consistenza della matrice extracellulare circostante, che fornisce alle cellule un segnale meccanico. Come descritto da Engler et al.,³¹ un substrato semi-solido (1kPa) può indurre l’acquisizione di un fenotipo neuronale; un substrato di rigidità intermedia (10kPa) determina l’acquisizione di un fenotipo mioblastico ed un substrato rigido (100kPa) induce il differenziamento delle hMSC in osteoblasti.

Le hMSC riscuotono grande interesse nel campo dell’ingegneria tissutale in quanto possono facilmente essere isolate dal midollo osseo attraverso disgregazione meccanica, sono in grado di eludere il riconoscimento da parte del sistema immunitario dell’ospite ed esibiscono proprietà immunosoppressive, in condizioni ottimali mostrano una buona capacità di autoreplicazione, essendo in grado di andare incontro a 25-40 passaggi cellulari *in vitro*.

Esistono tre differenti modalità di utilizzo delle hMSC nell’ambito dell’ingegneria tissutale ossea: 1) è possibile seminare le cellule su *scaffold* ed impiantare il sistema cellule-*scaffold* dopo un breve periodo di incubazione *ex vivo*; 2) il sistema può essere incubato in terreno differenziante in modo da stimolare la progressione verso una specifica linea differenziativa; 3) lo *scaffold* può essere funzionalizzato con siti specifici per l’ancoraggio cellulare o con fattori che facilitino il reclutamento cellulare (chemiotassi) e quindi impiantato.

Evidenze sperimentali documentano che, sebbene le hMSC siano in grado di differenziarsi in risposta a stimoli microambientali, l’effetto terapeutico derivi da proprietà differenti. Dal momento che soltanto un numero relativamente limitato di cellule va incontro a differenziamento completo, la guarigione tissutale successiva

all'impianto di hMSC potrebbe essere dovuta alla produzione di citochine anti-infiammatorie, alla sovraespressione di fattori di crescita e alle proprietà immunomodulanti delle cellule. Tale attività trofica impedisce la formazione di cicatrici, inibisce l'apoptosi, stimola l'angiogenesi ed induce la proliferazione di cellule progenitrici residenti.³² (Figura 4)

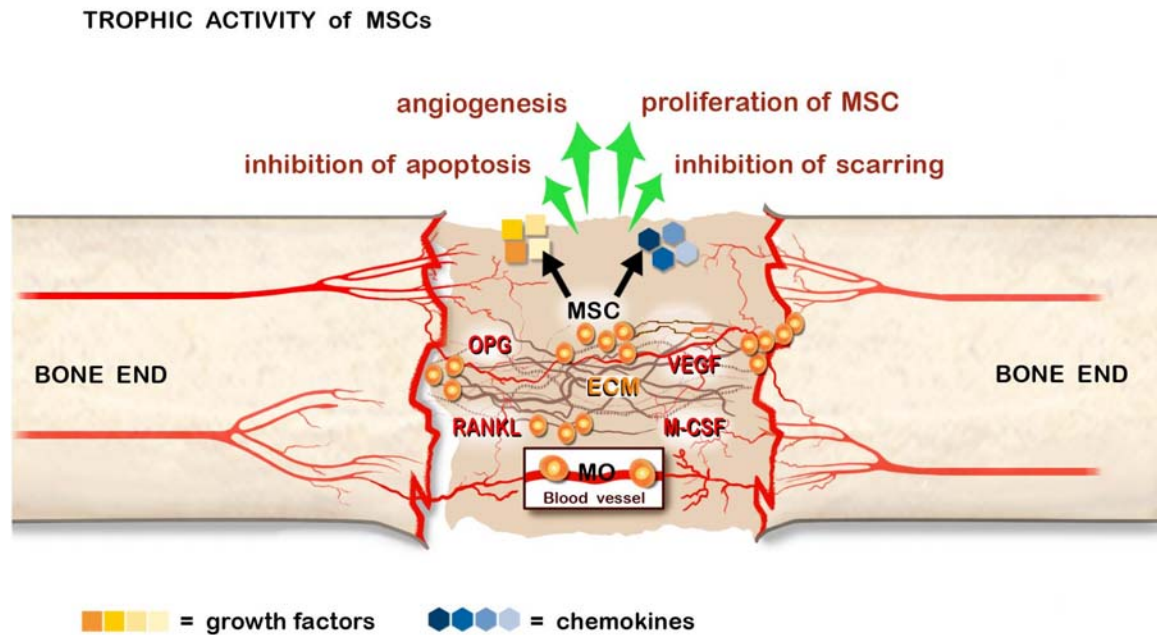


Figura 4. Durante il processo di guarigione di una frattura, i monociti (MO) secernono diversi fattori che vengono ritenuti nella matrice extracellulare (ECM). Oltre alla capacità differenziativa multipotente, le hMSC rilasciano una varietà di fattori bioattivi (OPG: osteoprotegerina; RANKL: *receptor activator for nuclear factor kappaB-ligand*; M-CSF: *macrophage colony stimulating factor*; VEGF) che impediscono la formazione di cicatrice, inibiscono l'apoptosi, stimolano l'angiogenesi ed inducono la mitosi di cellule progenitrici residenti. Tale capacità è stata recentemente definita da A.I. Caplan 'attività trofica'.³²

Recentemente sono state messe in luce alcune differenze tra le cellule stromali del midollo osseo (BMSC), da tempo risorsa prescelta per applicazioni di ingegneria tissutale, e le hMSC ottenute dal tessuto adiposo, definite 'processed lipoaspirate cells' (PLA cells). Alcune molecole di adesione e alcuni marcatori di superficie associati all'ematopoiesi e alla migrazione sono infatti distribuiti diversamente nelle due popolazioni: le BMSC esprimono livelli più elevati di *vascular cell adhesion molecule-1*, mentre le hMSC derivate dal tessuto adiposo presentano maggiori quantità di integrina $\alpha 4$ ed *intercellular adhesion molecule-1*. Poiché tali molecole di adesione sono

coinvolte nella mobilitazione e nell'*homing* cellulare, si ritiene che le hMSC derivate da tessuto adiposo e midollo abbiano diverse proprietà di *homing* in siti distanti. Ad ogni modo, aspirati cellulari derivanti da entrambe le sorgenti sono stati utilizzati per applicazioni di ingegneria tissutale di osso, cartilagine, tessuto adiposo e vasi sanguigni.³³

Partendo dall'assunto che il programma predefinito di differenziamento delle hMSC sia osteogenetico, la formazione di nuovo tessuto osseo sembrerebbe un obiettivo relativamente semplice da raggiungere. Tuttavia, esistono una varietà di fattori che limitano il completo successo delle applicazioni *in vivo*: l'elevato numero di cellule necessarie per la formazione di una quantità di tessuto relativamente ridotta; la scarsa proporzione di cellule stromali non emopoietiche nel midollo osseo; la ridotta percentuale di CFU-F o MAPC nei tessuti adulti; il difficile mantenimento di un'elevata capacità proliferativa durante l'espansione cellulare; il rischio di contaminazione batterica durante una manipolazione prolungata *ex vivo*. Inoltre, al momento dell'impianto, le hMSC devono far fronte allo stress generato dal trapianto e ad un ambiente ostile quale il tessuto danneggiato, che presenta ischemia ed infiammazione.

Eventi molecolari della riparazione ossea

Le attività cellulari nelle diverse fasi della guarigione ossea sono regolate da programmi trascrizionali che coinvolgono centinaia di geni. La tecnologia microarray ha permesso di eseguire l'analisi su larga scala del trascrittoma nelle diverse fasi del processo di guarigione della frattura.³⁴ Il gruppo di Li *et al.* ha identificato geni differenzialmente espressi durante le fasi precoci della riparazione ossea confrontando il profilo di espressione genica in femori di ratto non fratturati ed in seguito a frattura.³⁵ Più recentemente gli stessi autori hanno effettuato l'analisi del proteoma per caratterizzare proteine differenzialmente espresse durante la riparazione.³⁶

I geni implicati in attività metaboliche o con funzione di trasporto e legame, risultano sovraespressi un giorno dopo la frattura, momento in cui si osserva un aumento della divisione cellulare. L'analisi proteomica funzionale ha dimostrato che la fase di preparazione alla guarigione della frattura coinvolge la regolazione del ciclo cellulare e la segnalazione cellula-cellula, confermando il ruolo essenziale della comunicazione cellulare nella riparazione tissutale.³⁷

I pathway di segnalazione di IGF-I, PDGF e *mitogen-activated protein kinase* (ERK/MAPK) hanno un ruolo chiave durante la fase dell'inflammatione.

Quattro giorni dopo la frattura l'ematoma è invaso da cellule indifferenziate e tessuto connettivo vascolarizzato, mentre i macrofagi rimuovono i detriti ed il numero di neutrofili diminuisce. Il profilo dell'espressione genica mostra che l'espressione di alcuni geni aumenta progressivamente dal primo al quarto giorno, mentre altri geni sono costantemente sovraespressi. Al primo gruppo appartengono geni funzionalmente associati al processo riparativo: geni coinvolti nella formazione dell'osso o geni correlati alla matrice cellulare, come IGF-I, PDGF, *fibroblast growth factor receptor* (FGFR), fibronectina, metalloproteasi di matrice, glicani, biglicani, osteomodulina, osteonectina, tenascina C, collagene cartilagineo (tipo VI e XI), e collagene osseo (tipo I, V, VI e XII). Al contrario, la maggior parte dei geni costantemente sovraespressi controlla la crescita cellulare e la sopravvivenza e ha funzioni di legame, trasporto ed attività catalitica.

L'analisi proteomica ha rivelato che le proteine differenzialmente espresse durante la fase di ossificazione diretta, che ha inizio il quarto giorno, sono associate alla regolazione della morte cellulare, alla risposta immunitaria ed al signaling cellulare. Inoltre IL-6 risulta fortemente espresso e svolge un ruolo chiave nel coordinare i tre gruppi funzionali.

Il settimo giorno diversi eventi molecolari testimoniano l'inizio dell'ossificazione encondrale, che è osservabile a livello istologico in un momento successivo.³⁸ I pathway di PDGF, VEGF, *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR) e, a valle, PI3K/AKT (coinvolto nella sopravvivenza cellulare) sono i più attivi.

Il quattordicesimo giorno i condrociti ipertrofici rappresentano il tipo cellulare predominante e cellule a morfologia osteoclastica rimuovono la cartilagine. In tale fase almeno sei pathway risultano significativamente attivi; tra di essi, PPAR è coinvolto anche nella condrogenesi, mentre il signaling apoptotico e di p38/MAPK risultano rilevanti unicamente durante l'ossificazione encondrale.

Al termine dell'ossificazione encondrale (ventottesimo giorno) inizia la fase del rimodellamento, che vede coinvolti i pathway PI3K/AKT, IGF-I, MAPK/ERK e delle integrine.

Diversi sistemi di segnalazione sono implicati nel differenziamento delle hMSC in senso osteogenetico.³⁹

Wnt signaling pathway. Le proteine Wnt appartengono ad una famiglia di glicoproteine secrete, che legano i recettori transmembrana Frizzled (FZD) attivando due distinte vie di trasduzione del segnale: il pathway canonico ed il pathway non canonico di Wnt. Il primo coinvolge la formazione di un complesso tra le proteine Wnt, FZD, ed il corecettore *low density lipoprotein receptor related protein* (LRP) 5 o 6. Nel pathway non canonico, Wnt5a lega il recettore FZD ed attiva le proteine G eterotrimeriche, determinando un incremento del calcio intracellulare tramite meccanismi proteina C-dipendenti o inducendo cambiamenti Rho- o c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dipendenti nell'actina citoscheletrica.⁴⁰

Le proteine Wnt regolano crescita, differenziamento, funzione e morte cellulare, ed hanno un ruolo fondamentale nella biologia del tessuto osseo.⁴¹ Il legame delle proteine Wnt con il complesso FZD/LRP5/6 nel pathway canonico, scatena una cascata di trasduzione del segnale, che vede implicate le proteine Dishevelled, Axin e Frat-1 e ha come risultato l'inibizione della glicogeno sintetasi 3 β chinasi (GSK3). In tal modo la fosforilazione della β -catenina e la conseguente degradazione mediata da ubiquitina vengono inibite e la β -catenina trasloca nel nucleo dove coopera con i fattori di trascrizione T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) nella regolazione dell'espressione dei geni bersaglio.⁴² Il Wnt signaling può essere inibito da antagonisti extracellulari, quali *secreted FZD related protein* (sFRP) e *Wnt inhibitory factor 1* (WIF-1) o da membri delle famiglie SOST (Sclerosteosis) e Dickkopf (Dkk), che compromettono l'attività del corecettore LRP5/6.

Evidenze sperimentali affermano il ruolo importante del pathway canonico di Wnt nella formazione del tessuto osseo e nell'espressione di marcatori specifici degli osteoblasti *in vitro*.⁴³ È probabile che l'attività della β -catenina sia necessaria per l'attivazione di fattori di trascrizione specifici, come Runx2, la cui assenza nell'osteochondroprogenitore, ossia il precursore bipotenziabile del lineage osteoblastico, determina inevitabilmente il differenziamento in senso condrogenico.⁴⁴

TGF β Signaling. Diversi membri della superfamiglia del TGF β , come le *bone morphogenetic proteins* (BMP), hanno potenti effetti osteogenetici. L'attività delle BMP fu identificata negli anni '60,⁴⁵ ma le proteine responsabili dell'osteogenesi rimasero sconosciute fino al momento della purificazione e del sequenziamento della BMP3 (osteogenina) bovina e del clonaggio delle BMP2 e 4 umane negli anni '80.⁴⁶ Il

signaling della superfamiglia BMP/TGF β è trasdotto da due differenti tipi di recettori serina/treonina chinasi. Sono stati descritti:

- tre recettori di tipo I: recettore delle BMP di tipo IA e IB (BMPR-IA o ALK-3, e BMPR-IB o ALK-6) e recettore dell'activina tipo IA (ActR-IA o ALK-2);
- tre recettori di tipo II: recettore delle BMP di tipo II (BMPR-II) e recettore dell'activina tipo II e IIB (ActR-II e ActR-IIB).

Mentre BMPR-IA, IB e II sono specifici per le BMP, ActR-IA, II e IIB legano anche le activine.⁴⁷ L'attività di BMPR-IB è necessaria per gli stadi iniziali della condrogenesi, mentre BMPR-IA regola l'induzione dell'ipertrofia condrocitica.

Le BMP trasmettono segnali tramite pathway Smad-dipendenti e Smad-indipendenti, che includono le vie di trasduzione ERK, JNK e p38/MAPK. Esistono tre classi di proteine Smad: 1) Smad regolate da recettore (R-Smad), che possono essere attivate da BMP (BMPR-Smad), come Smad 1, 5 e 8, o TGF β (TGFR-Smad), come Smad 2 e 3; 2) *common mediator* Smad (Co-Smads), proteine mediatrici comuni di BMP e TGF β , come Smad 4; 3) Smad inibitorie, come Smad 6 e 7.⁴⁸ Le R-Smad fosforilate legano il partner comune Smad-4. Tali complessi traslocano nel nucleo e regolano la trascrizione dei geni bersaglio interagendo con vari fattori di trascrizione e co-attivatori o co-repressori trascrizionali. Le BMPR-Smad attivano l'espressione di *Distal-less homeobox 5* (Dlx5), che a sua volta induce l'espressione di Runx2 e Osterix (Osx) nelle cellule osteoprogenitrici. Le Smad inibitorie regolano negativamente il segnale trasdotto a monte da R-Smads e Co-Smads.⁴⁹ Sebbene le proteine Smad siano regolatori critici nel TGF β signaling pathway, la BMP-2 può anche attivare risposte Smad-indipendenti, che coinvolgono la via delle MAP chinasi (ERK, JNK e p38) e determinano la regolazione dell'espressione della fosfatasi alcalina e dell'osteocalcina nelle cellule osteoblastiche.⁵⁰

Hedgehog (Hh) signaling. La proteina Indian hedgehog (Ihh) è prodotta dai condrociti ipertrofici ed ha un effetto diretto sui progenitori osteoblastici del pericondrio.^{51,52} Il signaling mediato da Ihh signaling regola il programma temporale e spaziale del commissionamento osteoblastico precoce, ma la sua azione è limitata a tale stadio. Infatti, quando l'attività della proteina Smo (smoothed homolog), che codifica per un componente essenziale del pathway, è inibita in precursori osteoblastici Osx+, vengono generati osteoblasti normali, e alla nascita lo scheletro encondrale del topo knock-out è indistinguibile dal wild type.⁵³

FGF signaling. I polipeptidi della famiglia FGF regolano l'ossificazione endondrale e membranosa attraverso quattro recettori tirosin-chinasici correlati (Fgfr1-Fgfr4). Fgfr1 è espresso nei condrociti ipertrofici ed ha effetti stadio-specifici sulla maturazione degli osteoblasti: stimola il differenziamento dei precursori, ma arresta la maturazione degli osteoblasti differenziati.⁵⁴

FGF 2, 9 e 18 interagiscono probabilmente con Fgfr1 espresso dagli osteoblasti. Sebbene FGF 9 e 18 rappresentino i mediatori predominanti durante lo sviluppo embrionale, FGF2 sembra essere il più rilevante nel periodo postnatale. Negli osteoblasti differenziati FGF2 attiva Runx2 attraverso il MAPK pathway e ha un ruolo importante nella regolazione della mineralizzazione e della formazione di osso. L'espressione di Fgfr2 è indotta nei condrociti quiescenti ed inibita nei proliferanti. Il recettore è soggetto a splicing alternativo tessuto-specifico, che genera una variante epiteliale (forma b) ed una mesenchimale (forma c) con diverse specificità di legame. FGF18 è il ligando fisiologico di Fgfr3, che regola la crescita ed il differenziamento dei condrociti proliferanti e la densità e lo spessore corticale dell'osso.⁵⁵

Notch signaling. Dal momento che i recettori Notch e i loro ligandi (Delta 1, 3, 4 e Jagged 1, 2) sono proteine transmembrana, la cascata di trasduzione del segnale viene attivata in seguito all'interazione cellula-cellula.⁵⁶ Notch 1 e Notch 2 sono espressi dagli osteoblasti, mentre Notch 3 e Notch 4 sono stati identificati in sottogruppi del *lineage* osteogenico.⁵⁷ Dati sperimentali sostengono la funzione dimorfica del Notch signaling, che sembra essere in grado di regolare positivamente l'espressione dei geni del differenziamento osteoblastico ed indurre osteosclerosi, ma anche di reprimere la maturazione degli osteoblasti indotta dalla BMP, inibendo l'azione transattivatrice di Runx2.⁵⁸

Ephrin signaling. Le Efrine sono caratterizzate dalla capacità di trasdurre il segnale in maniera bidirezionale. Quando una cellula che esprime un recettore efrinico interagisce con una cellula che possiede il ligando, i segnali sono trasdotti in entrambe le cellule, tramite signaling 'reverse' e 'forward' rispettivamente. Le efrine di classe B (B1-B3) sono i ligandi dei recettori tirosin-chinasici EphB1-6, mentre le efrine di classe A (A1-A5) legano i recettori EphA1-10, ancorati alla membrana tramite un dominio glicosil-fosfatidil-inositolico (GPI). L'efrina B ed il suo recettore sono implicati nello sviluppo dello scheletro.⁵⁹ Un signaling bidirezionale è inoltre implicato nella comunicazione tra osteoblasti ed osteoclasti: il ligando efrina B2 presente sugli osteoclasti interagisce con il recettore EphB4 degli osteoblasti determinando

l'inibizione del differenziamento osteoclastico tramite *signaling reverse* e l'induzione di fattori osteogenici quali Dlx5, Osx e Runx2 tramite *signaling forward*.⁶⁰

MAPK signaling. Le MAPK sono proteine serina/treonina chinasiche coinvolte in diversi aspetti della regolazione cellulare. Il pathway MAPK è attivato da una varietà di fattori di crescita implicati nell'osteogenesi quali FGF, PDGF, TGFβ e IGF. Gli stimoli extracellulari determinano l'attivazione di una cascata di traduzione del segnale composta da MAP chinasi, MAP chinasi chinasi (MKK o MAP2K) e MAP chinasi chinasi chinasi (MKKK o MAP3K). Studi recenti hanno messo in luce la funzione fisiologica della cascata nel controllo dell'espressione genica, della proliferazione cellulare e della morte cellulare programmata. La cascata MAPK comprende gruppi distinti di proteine chinasi, che sono state caratterizzate nei mammiferi.⁶¹ (Tabella 1)

Tabella 1. Famiglie delle MAPK

| Famiglia | Nome | Funzione |
|---|---|---|
| <i>Extracellular signal-regulated kinases (ERK)</i> | ERK1, ERK2 | Le ERK (note anche come MAPK classiche) sono attivate in risposta a fattori di crescita e regolano proliferazione e differenziamento cellulare. |
| | ERK5 (MAPK7) | Attivate sia da fattori di crescita che da condizioni di stress, sono implicate nella proliferazione cellulare. |
| | ERK3 (MAPK6) ERK4 (MAPK4) | MAPK atipiche. ERK3/4 sono per lo più proteine citoplasmatiche che legano, traslocano e attivano MK5 (PRAK, MAP2K5). ERK3 è noto come fattore instabile, mentre ERK4 è relativamente stabile. |
| | ERK7/8 (MAPK15) | Nuovi membri delle MAPK, strutturalmente correlati ad ERK3/4. |
| <i>c-Jun N-terminal kinases (JNKs)</i> | MAPK8, MAPK9, MAPK10 | Proteine chinasi attivate da stress (Stress-activated protein kinases-SAPK). |
| <i>Isoforme p38</i> | MAPK11, MAPK12 (ERK6), MAPK13, MAPK14 | I pathway JNK e p38 rispondono a condizioni di stress quali citochine, irradiazione UV e shock termico ed osmotico, e sono coinvolti nel differenziamento cellulare e nell'apoptosi. |

Fattori di trascrizione (TF). I TF guidano il commissionamento tessuto-specifico delle hMSC. *Runx2*, membro della famiglia dei fattori *Runx-related*, è considerato l'interruttore molecolare chiave del differenziamento osteoblastico, media infatti l'attivazione temporale e/o la repressione di geni essenziali nel processo.⁶² I membri *Runx1* e *Runx3* della stessa famiglia sono codificati da geni distinti che hanno in comune un motivo per il riconoscimento del DNA, e legano stabilmente le sequenze target in seguito ad eterodimerizzazione con la subunità ubiquitaria *Cbfb*. *Runx2* è abbondantemente espresso nella cartilagine calcificata e nell'osso. Possiede un dominio di transattivazione, ricco in residui di glutamina e alanina, che attiva i promotori di osteocalcina e collagene di tipo 1 (*COL1A1*); la sua inattivazione determina l'inibizione della formazione di osso, rivelando il ruolo essenziale del TF nell'ossificazione endondrale e diretta. Oltre ad essere espresso negli osteoprogenitori ad uno stadio precoce del differenziamento, *Runx2* è essenziale per la funzionalità degli osteoblasti. Molti TF coinvolti nella regolazione del differenziamento osteoblastico esercitano la loro funzione interagendo con *Runx2*, alcuni forniscono segnali costimolatori, altri reprimono direttamente l'attività del TF compromettendone il legame al DNA e/o la funzione di transattivazione (Tabella 2).

Tabella 2. Fattori di trascrizione che regolano la funzione di *Runx2*

| | |
|--|--|
| Proteine a monte | <i>Msh homeobox 2 (Msx2)</i> , <i>NK3 homeobox 2 (Bapx1)</i> , <i>homeobox A2 (Hoxa 2)</i> , <i>p53</i> , <i>twist homologs (Twist 1-2)</i> , <i>DNA binding / transcription factor Shn3</i> |
| Co-attivatori | <i>Core-binding factor beta (Cbfb)</i> , <i>Cbp/p300-interacting transactivator (Cited2)</i> , <i>monocytic leukemia zinc finger protein (MOZ,MYST3)</i> , <i>MOZ related factor (MORF,MYST4)</i> , <i>retinoblastoma protein (pRb)</i> , <i>transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ)</i> |
| Co-repressori | <i>Histone deacetylases (HDACs)</i> , <i>Groucho related genes/transducin-like enhancer of split (Grg/TLE)</i> , <i>yes-associated protein (YAP)</i> , <i>SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 (Smurf1)</i> |
| Fattori di trascrizione partner con effetto positivo | <i>Activator-Protein 1 (AP-1) (c-Fos and c-Jun)</i> , <i>BMP responsive Smads (Smad1 and Smad5)</i> , <i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 avian (Ets1)</i> , <i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β & δ</i> , <i>distal-less homeobox 5 (Dlx5)</i> , <i>hairy and enhancer of split 1 (Hes1)</i> , <i>product of the tumor suppressor gene Men1 (Menin)</i> |
| Fattori di trascrizione partner con effetto inibitorio | <i>Distal-less homeobox 3 (Dlx3)</i> , <i>lymphoid enhancer-binding factor 1 (Lef1)</i> , <i>Msh homeobox 2 (Msx2)</i> , <i>peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)</i> , <i>Smad3</i> , <i>hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1 (Hey1)</i> , <i>signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1)</i> |

La progressione del programma differenziativo delle cellule osteoprogenitrici vede implicati altri geni chiave, come Osterix, che codifica per un TF geneticamente ‘a valle’ rispetto a Runx2.⁶³ Osterix contiene tre domini ‘zinc finger’ C2H2 responsabili del legame al DNA ed un dominio di transattivazione ricco in proline e serine che determina l’attivazione dei geni Osteocalcina e COL1A1. Le hMSC di topi *Osx*-null esprimono livelli normali di Runx2, ma non sono in grado di differenziare in osteoblasti e depositare matrice ossea, pertanto non si assiste alla formazione di osso (encondrale o membranosa). È interessante notare che precursori osteoblastici del periostio in cui *Osx* viene inattivato esprimono marcatori condrocitici come Sox9 e COL2A1, ciò suggerisce che i preosteoblasti che esprimono Runx2 siano ancora cellule bipotenziali e che *Osx* agisca a valle di Runx2 nell’indurre il differenziamento osteoblastico dell’osteocondroprogenitore. È possibile che *Osx* induca una via di trasduzione del segnale che agisca parallelamente a Runx2 o in maniera Runx2-indipendente. È stato inoltre dimostrato che il TF Runx2 è necessario ma non sufficiente per l’induzione di *Osx* dipendente da BMP2, il pathway di MAPK e altri fattori trascrizionali agiscono infatti da punti di convergenza mediando l’effetto della BMP-2 sull’espressione di *Osx*. Infine, la cooperazione tra NFAT ed *Osx* determina l’attivazione dei promotori di COL1A1 ed osteocalcina ed accelera il differenziamento osteoblastico e la formazione di osso in maniera Runx2-indipendente.⁶⁴

Ruolo dei fattori di crescita

I fattori di crescita (GF) sono polipeptidi che modulano le funzioni cellulari in maniera autocrina, paracrina o endocrina.⁶⁵ Un singolo GF può avere effetti su tipi cellulari multipli e può indurre risposte differenti in base al tipo cellulare sul quale agisce; tuttavia una caratteristica fondamentale del sistema di segnalazione è la ridondanza, per cui un fattore di crescita può legare recettori differenti trasducendo il medesimo segnale.

I GF più rilevanti nella biologia del tessuto osseo sono BMP, TGFβ, FGF, PDGF, VEGF e IGF. (Tabella 3)

Come esposto precedentemente, i GF vengono prodotti e secreti durante tutte le fasi della riparazione ossea dalle cellule del microambiente, come le cellule infiammatorie, i fibroblasti, le cellule endoteliali, le hMSC e gli osteoblasti. Nella fase infiammatoria il contributo maggiore proviene dai GF contenuti negli α-granuli delle piastrine (TGFβ,

PDGF, VEGF e IGF), mentre i macrofagi e le altre cellule infiammatorie secernono FGF, PDGF e TGF β . La migrazione degli osteoprogenitori è stimolata da BMP, PDGF, FGF e VEGF, e inoltre PDGF e FGF stimolano la proliferazione delle cellule periostali, contribuendo alla risposta mitogenica del periostio nelle fasi iniziali della riparazione.⁶⁶ La proliferazione ed il differenziamento dei progenitori sono modulati da TGF β , IGF, BMP6, BMP2 e BMP7, mentre VEGF e FGF2 regolano la crescita vascolare. Lo studio della risposta temporale dei GF nei topi durante la riparazione della frattura ha messo in luce una forte correlazione tra VEGF, TGF β e IGF-I, suggerendo che essi agiscano in maniera coordinata nella crescita degli osteoprogenitori. Una simile correlazione è stata riscontrata anche tra BMP2, PDGF e FGF2, e tra TGF β e PDGF.⁶⁷

Tabella 3. Fattori di crescita e ruolo nella riparazione ossea

| <i>Fattore di crescita</i> | <i>Sorgente fisiologica</i> | <i>Tipo di recettore</i> | <i>Funzione</i> | <i>Azione sul tessuto osseo</i> |
|---|--|--------------------------|---|---|
| <i>Bone morphogenetic proteins (BMP)</i> | Cellula osteoprogenitrice, osteoblasto, condrocita, cellula endoteliale (BMP2) | Serina treonina solfato | Oteocondrogenesi. BMP2-7 e BMP9 sono osteoinduttive | Induzione di chemiotassi, proliferazione, differenziamento e sintesi della ECM; contributo all'angiogenesi |
| <i>Transforming growth factor β (TGF β)</i> | Piastrine, cellula stromale midollare, condrocita, cellula endoteliale, fibroblasto, macrofago | Serina treonina solfato | Immunosoppressore proangiogenetico; induttore della crescita cellulare, del differenziamento e della sintesi della matrice | Induzione della proliferazione di cellule mesenchimali indifferenziate; reclutamento dei precursori osteoblastici; induzione del differenziamento osteoblastico e condroblastico precoce (ma inibizione del differenziamento terminale); produzione della ECM; reclutamento dei precursori osteoclastici. |
| <i>Fibroblast growth factor (FGF)</i> | Macrofago, monocita, cellula stromale midollare, condrocita, osteoblasto, cellula endoteliale | Tirosin chinasi | Proangiogenetico; mitogeno per fibroblasti e cellule muscolari lisce della parete vascolare | FGF1 induce la maturazione dei condrociti; FGF2 induce proliferazione e differenziamento osteoblastico, inibisce l'apoptosi degli osteoblasti immaturi mentre stimola l'apoptosi degli osteociti, stimola il riassorbimento osseo |
| <i>Platelet-derived growth factor (PDGF)</i> | Piastrine, osteoblasto, cellula endoteliale, monocita, macrofago | Tirosin chinasi | Mitogeno per le cellule del tessuto connettivo, chemiotattico per monociti, macrofagi e cellule muscolari lisce; proangiogenetico | Stimola proliferazione e differenziamento degli osteoprogenitori |
| <i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</i> | Cellula endoteliale, osteoblasto, piastrine | Tirosin chinasi | Proangiogenetico; chemiotattico per le cellule endoteliali | Conversione della cartilagine in osso; proliferazione e differenziamento osteoblastico; induzione dell'espressione di RANK nei precursori osteoclastici |
| <i>Insulin-like growth factor (IGF)</i> | Osteoblasto, condrocita, epatocita, cellula endoteliale | Tirosin chinasi | Regolazione dell'attività biologica dell'ormone della crescita | Stimola la proliferazione degli osteoblasti e la sintesi della ECM; riassorbimento osseo |

Le BMP (ad eccezione della BMP1) appartengono alla superfamiglia del TGF β , che include anche TGF β , growth differentiation factors (GDF), activine, inibine e *anti-Müllerian hormone* (AMH). Le BMP sono immagazzinate nella ECM e vengono sintetizzate principalmente da cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e condrociti.⁶⁸ Anche altri tipi cellulari possono produrre tali proteine, come le cellule endoteliali che esprimono BMP2.⁶⁹ Gli osteoblasti ed i condrociti maturi non producono livelli significativi di BMP, ma la loro espressione aumenta considerevolmente durante il processo di riparazione della frattura⁷⁰ ed è indotta da diversi stimoli, tra cui lo stress meccanico generato a livello dei siti di formazione di nuovo tessuto osseo.⁷¹ Sebbene le BMP siano funzionalmente e strutturalmente correlate, ogni isoforma ha un ruolo unico e un distinto quadro di espressione temporale durante il processo di riparazione ossea.⁷² Le BMP inducono la cascata di eventi che determina l'ostecondrogenesi e che coinvolge chemotassi, proliferazione, differenziamento, sintesi della matrice extracellulare ed angiogenesi. BMP2 e 4 vengono espresse sin dalle fasi precoci del differenziamento delle hMSC e, avendo un'azione chemioattraente, richiamano i precursori mesenchimali durante lo sviluppo osseo, il rimodellamento e la riparazione delle fratture. VEGF coopera con BMP4 nel reclutare i precursori osteoblastici.⁷³ BMP2, 6 e 9 stimolano il differenziamento delle hMSC pluripotenti in cellule osteoprogenitrici, e BMP2, 4, 6, 7 (osteogenic protein-1, OP-1) e 9 ne inducono la maturazione terminale in osteoblasti. BMP2 determina la sovraespressione di Runx2 e Osterix nelle fasi precoci del differenziamento,⁷⁴ ed aumenta l'espressione di fosfatasi alcalina (ALP) ed osteocalcina e la deposizione del calcio nelle fasi successive (come BMP4, 7 e 9). La maggior parte delle BMP sono inoltre capaci di indurre il differenziamento degli osteoblasti in osteociti. BMP13 e 14 stimolano il differenziamento condrocitico.^{75,76} BMP2-BMP7 e BMP9 sono capaci di indurre la formazione ossea *de novo* in seguito ad impianti ectopici.⁷⁷ L'attività osteoinduttiva di BMP3 dipende dalle condizioni sperimentali e dallo stadio differenziativo, essa può avere infatti un effetto inibitorio in presenza di BMP2 e BMP7.⁷⁸ Inoltre le BMP sono in grado di stimolare la sintesi di altri GF quali IGF e VEGF,⁷⁹ e di indurre il rilascio di fattori che promuovono l'osteoclastogenesi.⁸⁰

Fino ad oggi sono state identificate 5 isoforme del TGF β (TGF β 1-TGF β 5). TGF β 1 e TGF β 2 vengono immagazzinati nella ECM e nel sangue in una forma inattiva complessata alla proteina di legame *TGF β -binding protein-1*. TGF β 1 è stato rilevato in osso, cartilagine e α -granuli piastrinici, ma è prodotto da diversi tipi cellulari, come i

fibroblasti, i macrofagi e le cellule endoteliali; mentre TGF β 2 è prodotto essenzialmente da osteoblasti e cellule endoteliali. Durante il processo di guarigione ossea TGF β ha un ruolo rilevante nella condrogenesi e nell'ossificazione encondrale.⁸¹ TGF β 1 induce la sintesi di BMP nelle cellule osteoprogenitrici, recluta i precursori osteoblastici, stimola il differenziamento ed induce la produzione di osteoide e proteine extracellulari quali collagene, proteoglicani, osteopontina, osteonectina e ALP.⁸² L'effetto sul differenziamento terminale e sulla mineralizzazione è tuttavia inibitorio⁸³ ed il potenziale osteoinduttivo risulta limitato.⁸⁴ TGF β 1 è un importante fattore di *coupling* tra osteoblasti ed osteoclasti:⁸⁵ da un lato favorisce il reclutamento dei precursori ematopoietici degli osteoclasti,⁸⁶ dall'altro ha un effetto inibitorio sul riassorbimento osseo e stimola la produzione di osteoprotegerina.⁸⁷

Gli FGF sono una famiglia di 24 polipeptidi strutturalmente correlati, che stimolano la proliferazione di osteoblasti, condrociti, miociti e cellule endoteliali. FGF1 e FGF2, i più abbondanti, sono stati identificati nelle fasi precoci del processo di guarigione ossea. Il primo ha un ruolo rilevante nella maturazione dei condrociti,⁸⁸ il secondo è sintetizzato dagli osteoblasti, viene immagazzinato nella ECM e stimola la proliferazione ed il differenziamento osteoblastico. FGF2 induce Runx2⁸⁹ e osteocalcina⁹⁰ e favorisce la formazione di noduli minerali;⁹¹ inibisce l'apoptosi degli osteoblasti immaturi, mentre stimola l'apoptosi degli osteociti,^{92,93} regola l'osteoclastogenesi in maniera indiretta, tramite meccanismi mediati dagli osteoblasti, ed in maniera diretta, agendo sui pathway di segnalazione di RANKL, cicloossigenasi-2 e p42/p44 MAPK.⁹⁴ Esso possiede inoltre un effetto proangiogenetico che si accompagna ad un'induzione dell'osteoclastogenesi e quindi, ad una maggiore attività di riassorbimento.⁹⁵

Il PDGF è secreto come dimero composto da diverse combinazioni delle catene A, B, C e D. È presente negli α -granuli delle piastrine, nei macrofagi, nelle cellule endoteliali e negli osteoblasti.⁹⁶ Durante le fasi precoci della guarigione della frattura è rilasciato dagli α -granuli,⁹⁷ mentre in seguito viene secreto dalle cellule presenti nel sito di riparazione, ed agisce in un primo momento sulla proliferazione e successivamente sul differenziamento degli osteoprogenitori. PDGF-BB è generalmente considerato più efficace di PDGF-AA nello stimolare l'attività mitogena nel tessuto osseo.⁹⁸

Il VEGF è prodotto dalle cellule endoteliali e dagli osteoblasti e, nelle fasi precoci della rigenerazione ossea, è anche rilasciato dagli α -granuli piastrinici. Sebbene l'induzione dell'angiogenesi sia l'effetto più conosciuto del VEGF, esso ha un ruolo

importante anche nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule ossee.⁹⁹ È coinvolto nella conversione della cartilagine in callo osseo durante la fase riparativa¹⁰⁰ e determina un aumento del numero degli osteoblasti.¹⁰¹ VEGF inoltre favorisce l'osteoclastogenesi inducendo l'espressione di RANK nei precursori degli osteoclasti.¹⁰²

Sono stati identificati due *insulin-like Growth Factor* (IGF-I o somatomedina C e IGF-II). La concentrazione sierica di IGF-I è regolata principalmente dall'ormone della crescita, mentre le sue azioni biologiche sono modulate in maniera cellulo-specifica dal legame con le *IGF-binding protein*.

IGF-I è prodotto principalmente dalle cellule del fegato in risposta all'ormone della crescita, ma viene anche sintetizzato da cellule endoteliali, osteoblasti e condrociti e viene immagazzinato nella matrice cellulare. I tessuti bersaglio del fattore di crescita sono muscolo, cartilagine, osso, fegato, reni, nervi, pelle e polmoni. Sebbene IGF-II sia più abbondante nel tessuto osseo rispetto a IGF-I, quest'ultimo ha un effetto più potente e la sua presenza è stata rilevata in fratture in fase di guarigione.¹⁰³ Nelle prime fasi della riparazione ossea IGF-I stimola la proliferazione cellulare¹⁰⁴ e promuove la formazione della matrice ossea da parte degli osteoblasti differenziati.¹⁰⁵ IGF-II agisce negli stadi tardivi dell'ossificazione endondrale e stimola la produzione di collagene di tipo I, la sintesi della matrice cartilaginea e la proliferazione cellulare.¹⁰⁶ IGF ha un ruolo rilevante nell'equilibrio tra formazione e riassorbimento osseo.¹⁰⁷

Terapia proteica con fattori di crescita ricombinanti (rhGF). Il razionale dell'uso terapeutico dei fattori di crescita (GF) per stimolare la guarigione ossea è basato sull'ipotesi che l'impiego di un mediatore del segnale appropriato sia sufficiente ad indurre o accelerare l'intero processo di guarigione.¹⁰⁸ Le applicazioni cliniche potenziali comprendono il trattamento di fratture, pseudoartrosi e in generale di tutti i difetti ossei caratterizzati da una vasta perdita di tessuto. Gli approcci più interessanti prevedono la terapia proteica, in cui il rhGF viene direttamente rilasciato al sito di rigenerazione in presenza o in assenza di un carrier; e la terapia genica, in cui il GF viene prodotto dalle stesse cellule dell'ospite in seguito a trasfezione del gene che lo codifica. Particolari tipi di terapia proteica sono inoltre l'uso di plasma ricco di piastrine (PRP) autologo o omologo, come risorsa di GF, e l'utilizzo della matrice ossea demineralizzata (DBM).

BMP2 e BMP7 possono essere somministrate tramite l'uso di un '*buffer delivery system*', che prevede però una ritenzione del fattore al sito target minore del 5%. L'alternativa è costituita dalla complessazione con un carrier, che permette di prevenire

una diffusione rapida del rhGF al di fuori del sito di riparazione, di assicurarne il rilascio controllato e di aumentare la ritenzione al sito fino al 55%.¹⁰⁹ Il carrier utilizzato per il rilascio delle rhBMP può anche essere rappresentato dallo stesso *scaffold* utilizzato per la rigenerazione tissutale ossea (pag.56). Studi preclinici hanno messo in luce l'efficacia di BMP ricombinanti (rhBMP) nel trattamento di difetti ossei di misura critica,¹¹⁰ e sono stati condotti molteplici studi clinici finalizzati alla comprensione degli effetti di rhBMP7 e rhBMP2 sulla riparazione ossea, in condizioni di ritardo di consolidamento o pseudoartrosi.^{111,112,113,114,115} Il trattamento con rhBMP sembra inoltre stimolare l'angiogenesi e riduce la possibilità di infezioni. Tuttavia, dal momento che tali fattori di crescita sono necessari non solo per stimolare la proliferazione ed il differenziamento delle hMSC, ma anche per il mantenimento del fenotipo osteoblastico, un trattamento efficace richiede dosi elevate ed un tempo di esposizione prolungato.¹¹⁶ Il TGF β è stato utilizzato per stimolare la crescita ossea in modelli animali,¹¹⁷ ma il suo potenziale terapeutico sembra essere limitato ad effetti collaterali non previsti.¹¹⁸ Il rhFGF2 sembra accelerare la riparazione ossea nell'animale,¹¹⁹ ma risulta efficace solo se somministrato entro le 24 ore dal momento della frattura,¹²⁰ evidenziando come la finestra temporale in cui si verificano gli effetti anabolici dell'FGF esogeno sia limitata alle fasi precoci del processo di guarigione. Il potenziale terapeutico di PDGF nel trattamento dei difetti ossei è tutt'ora incerto,¹¹⁸ mentre studi *in vivo* hanno mostrato che la somministrazione sistemica di IGF è in grado di potenziare l'osteoformazione. Nella tibia di ratto, IGF-I somministrato a livello locale ha un effetto maggiore sulla riparazione ossea rispetto al TGF β , mentre l'utilizzo di entrambi i GF determina una rigidità torsionale ed una capacità massima di carico maggiori.¹²¹

Sebbene i rhGF possano essere utilizzati per applicazioni cliniche specifiche, è possibile che una singola dose di proteina esogena non sia sufficiente a indurre un'appropriata risposta biologica nei pazienti, specialmente quando la vitalità dell'osso e dei tessuti molli circostanti è compromessa. Una strategia promettente per aumentare i livelli dei rhGF potrebbe essere rappresentata dalla terapia genica, mediante tecniche di trasduzione *in vivo* o trasduzione *in vitro* e successivo impianto delle cellule al sito di rigenerazione. In generale il trattamento dei difetti dei meccanismi di riparazione ossea richiede un'induzione dell'espressione proteica a breve termine, mentre in presenza di malattie croniche come l'osteoporosi è necessaria una produzione a lungo termine. Prima che applicazioni cliniche di terapia genica vengano messe in atto è comunque

necessario che vengano affrontate questioni primarie riguardanti la sicurezza del vettore virale e le reazioni immunologiche generate dalle proteine virali.

I possibili effetti avversi, l'induzione di reazioni immunologiche, le alterazioni genetiche ed altri effetti a lungo termine dei rhGF rimangono ancora sconosciuti e limitano le applicazioni terapeutiche. La frequenza di somministrazione ideale ed il dosaggio ottimale per la guarigione del difetto osseo¹²² non sono ancora stati studiati in dettaglio. Inoltre in alcuni casi, e soltanto in seguito a dosi massive, è stata osservata un'eccessiva formazione di tessuto osseo, per cui l'uso dei rhGF deve essere considerato con estrema prudenza, soprattutto nei bambini.

In conclusione, si rendono necessari ulteriori studi per comprendere le differenze tra i meccanismi di riparazione ossea nelle diverse condizioni patologiche e per fornire linee guida, basate su evidenze sperimentali, per un appropriato utilizzo terapeutico dei fattori di crescita.¹²³

Evoluzione temporale del profilo di espressione genica durante il differenziamento osteoblastico di cellule mesenchimali staminali (hMSC)¹²⁴

Obiettivo dello studio

L'aspirato midollare è una risorsa facilmente accessibile di hMSC.^{18,125} Tale popolazione cellulare ha recentemente riscosso grande interesse, in quanto rappresenta una fonte di precursori osteogenici utilizzabili sia in applicazioni di terapia cellulare che di ingegneria tissutale per la riparazione e la rigenerazione ossea.^{126, 127}

In tutti i casi in cui l'omeostasi ossea, e quindi la capacità riparativa, risultino compromesse (malattie genetiche e degenerative, traumi) è possibile trarre vantaggio dall'utilizzo di hMSC come terapia cellulare.¹²⁶

Un'efficace rigenerazione del tessuto osseo dipende principalmente dalle proprietà osteogenetiche delle hMSC, poichè esse influenzano l'omeostasi sia generando precursori ossei sia producendo fattori che influenzano l'equilibrio tra formazione e riassorbimento di osso.¹²⁶ Oltre alle proprietà funzionali delle cellule, un requisito essenziale per la riparazione di grandi difetti ossei è la disponibilità di scaffold che permettano e possibilmente inducano la crescita di nuovo tessuto osseo. Il sistema cellula-scaffold viene quindi saggiato *in vitro* per valutare se gli osteoprogenitori siano in grado di crescere e sopravvivere all'interno dell'impalcatura, per poi differenziarsi e depositare matrice mineralizzata.¹²⁷

Le proprietà osteogenetiche delle hMSC sono definite da una combinazione di saggi sperimentali,¹²⁸ ma le possibilità di caratterizzare le cellule all'interno di una struttura tridimensionale sono fortemente limitate, in quanto i saggi biochimici, citochimici e morfologici non possono essere eseguiti. In tale contesto l'analisi dell'espressione genica rappresenta strumento estremamente utile per valutare lo stato e l'attività cellulare: l'RNA totale ottenuto da un numero limitato di cellule permette di analizzare simultaneamente l'espressione di un gran numero di geni e di esplorare in maniera sistematica una varietà di funzioni biologiche. Negli ultimi anni è stato identificato un numero consistente di marcatori molecolari di malattie ossee e di geni con un ruolo rilevante nel differenziamento osteogenetico delle hMSC.^{129,130,131,132} Diversi studi

molecolari sono stati volti ad una comprensione più approfondita del controllo genetico del differenziamento osteoblastico e all'identificazione di nuovi pathway potenzialmente coinvolti nella regolazione di tale processo; tuttavia l'associazione tra espressione genica e marcatori di proliferazione, differenziamento e mineralizzazione delle hMSC *in vitro* non è ancora stata descritta in maniera completa ed esaustiva.

Il presente progetto di ricerca è finalizzato all'identificazione di geni che abbiano un ruolo chiave nei processi di differenziamento osteogenico e maturazione delle hMSC, e alla caratterizzazione temporale della loro espressione, in relazione all'acquisizione di caratteristiche fenotipiche proprie delle cellule ossee, valutata come deposizione di noduli minerali *in vitro*.

Materiale e Metodo

Coltura e caratterizzazione delle hMSC

Colture cellulari

La raccolta del tessuto è stata approvata dal comitato etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli. I donatori sono 5 uomini (range di età 40-61 anni) ed una donna (50 anni), sottoposti ad intervento di artroprotesi d'anca. I campioni di midollo osseo sono stati ottenuti dalla fresatura del canale femorale. Il midollo osseo è stato raccolto in terreno di coltura addizionato di eparina 100 U/ml, stratificato direttamente su Ficoll Istopaque 1077 (Sigma Aldrich, Milano) e centrifugato per 20' a 2000 rpm. L'anello di cellule mononucleate (hMNC) contenente le hMSC è stato raccolto e lavato 2 volte con PBS; le cellule sono state seminate e mantenute in incubatore (atmosfera umidificata, 37°C, 5% CO₂) in *alpha modification of Eagle's medium* (a-MEM; Sigma-Aldrich) addizionato di FCS al 10%, penicillina 100U/mL, streptomina 0.1mg/mL e acido ascorbico 2-fosfato 100 mM (Sigma Aldrich). Dopo quattro giorni le cellule non aderenti sono state rimosse e le cellule aderenti (hMSC) sono state mantenute in terreno fresco addizionato di desametasone 10⁻⁸ M (terreno differenziante). Dopo la seconda confluenza è stato aggiunto alla coltura β-glicerofosfato (Sigma Aldrich) 10mM (terreno mineralizzante) per indurre la formazione di noduli minerali. Sulla base dell'osservazione quotidiana delle colture, sono stati scelti dei tempi di osservazione corrispondenti agli eventi principali del differenziamento (MD) e della mineralizzazione (MM) delle hMSC, fra cui adesione cellulare precoce, semiconfluenza, confluenza, formazione delle Colony

Forming Units (CFU) e deposizione dei noduli minerali. Ad ogni tempo sono stati eseguiti saggi morfologici e biochimici ed è stato raccolto l'RNA totale delle colture, in modo tale da poter correlare l'acquisizione progressiva del fenotipo osteogenico con il profilo di espressione genica.

Caratterizzazione delle colture

I tempi scelti per la valutazione del differenziamento osteogenico delle hMSC sono i seguenti:

- *hMSC Differentiation 1* (MD1), espressione genica basale delle cellule aderenti alla plastica dopo 4 giorni dalla semina delle cellule monucleate del midollo;
- *hMSC Differentiation 2* (MD2), modulazione genica precoce, analizzata 24 ore dopo l'utilizzo del terreno differenziante contenente desametasone ed acido ascorbico 2-fosfato;
- *hMSC Differentiation 3* (MD3), tempo intermedio corrispondente alla semiconfluenza delle colture;
- *hMSC Differentiation 4* (MD4), confluenza delle hMSC;
- *hMSC Differentiation 5* (MD5), formazione di CFU a partire dalla semina a bassa densità di cellule in MD4;
- *hMSC Mineralization 1* (MM1), cambiamenti precoci osservabili 24 ore dopo l'aggiunta del mezzo mineralizzante contenente β -glicerofosfato;
- *hMSC Mineralization 2* (MM2), tempo intermedio nel corso della mineralizzazione, 7 giorni dopo l'aggiunta del terreno mineralizzante;
- *hMSC Mineralization 3* (MM3), mineralizzazione completa, provata dalla deposizione di noduli minerali.

Il protocollo per la caratterizzazione delle colture cellulari ai diversi tempi (Figura 5) include saggi di:

- Analisi dell'espressione genica, tramite tecnologia microarray, eseguita a tutti i tempi elencati;
- Proliferazione cellulare, in tutte le fasi;
- Vitalità cellulare (AlamarBlue test), in MD4, MM1, MM2 e MM3;
- Immunofenotipizzazione (citometria a flusso), in MD1 e MD4 ;
- Rivelazione immunoenzimatica dell'osteoprotegerina (OPG) nei lisati cellulari, in MD4, MM2 e MM3;
- Attività dell'ALP, in MD4, MD5, MM2 e MM3;

- Formazione di CFU, in MD5;
- Deposizione dei noduli minerali (von Kossa staining), in MM2 e MM3;
- Contenuto di calcio, in MM2 e MM3.

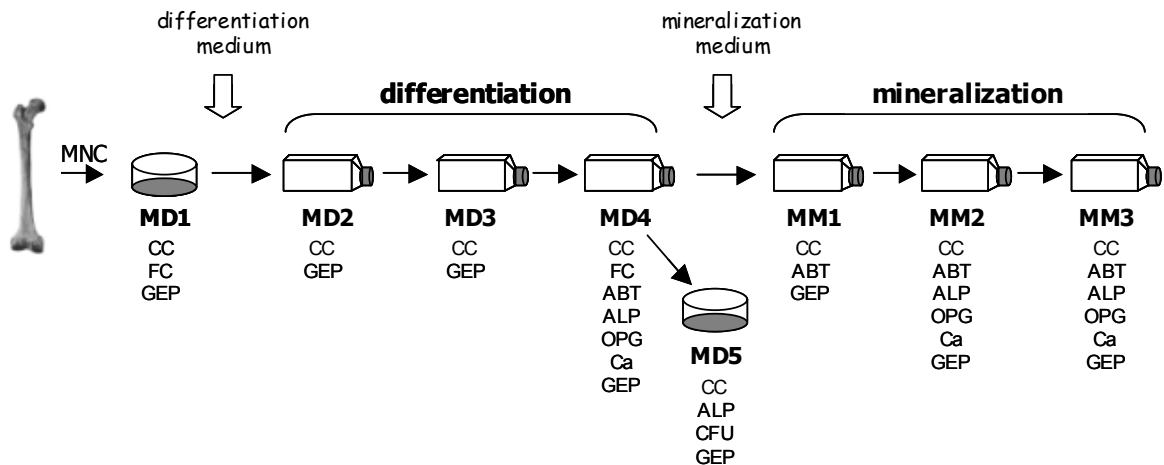


Figura 5. Diagramma di flusso per la valutazione del differenziamento osteogenetico delle hMSC. MD#: MSC differentiation, tempo di coltura; MM#: MSC mineralization, tempo di coltura. Saggi eseguiti ai diversi tempi: CC, conta cellulare; FC, citometria a flusso; ABT, AlamarBlue test; ALP, fosfatasi alcalina; OPG, osteoprotegerina; CFU, formazione di colony-forming units; Ca, saggio del calcio; GEP, profilo di espressione genica.

La proliferazione cellulare è stata valutata contando le cellule destinate all'estrazione dell'RNA ed il tasso di crescita cellulare è stato espresso come numero di cellule per cm² della superficie di coltura.

La vitalità cellulare è stata analizzata tramite l'AlamarBlue test (Serotec, Oxford, United Kingdom), secondo le istruzioni fornite dal produttore. L'Alamar blue è un indicatore redox fluorimetrico/colorimetrico che viene internalizzato dalle cellule e convertito dalla forma ossidata non fluorescente/blu a quella ridotta fluorescente/rossa. L'indicatore non ha alcun effetto tossico sulle cellule e la sua riduzione è indice dell'attività metabolica e si correla con il numero di cellule vitali. Il mezzo di coltura delle hMSC è stato rimosso dai pozzetti e sostituito, in condizioni di sterilità, con terreno fresco contenente un volume di Alamar blue pari al 10%. Un pozzetto privo di cellule, contenente terreno di coltura e Alamar blue al 10%, è stato utilizzato per la correzione dei valori di fluorescenza rilevati nei campioni (bianco). Le piastre sono state incubate a 37°C, a livelli di CO₂ pari al 5% per 3 ore e 30 minuti. Al termine dell'incubazione il medium è stato trasferito in una nuova piastra; la fluorescenza è stata rilevata con un lettore per micropiastre (CytofluorTM 2350, Millipore, Bedford, MA)

utilizzando una lunghezza d'onda (λ) di eccitazione di 540 nm e emissione di 590 nm. I risultati del saggio sono stati espressi come media delle unità di fluorescenza relativa (RFU) rilevate in 3 pozzetti.

L'immunofenotipo delle hMSC è stato studiato usando un citometro a flusso EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Hialeah, FL) ed anticorpi monoclonali coniugati a fluorescina isotiocianato (FITC), R-ficoeritrina (RD1) o RD1-cianina 5.1 (PC5) (Instrumentation Laboratory, Milano). I marcatori analizzati comprendono CD45-FITC (antigene leucocitario comune), CD44-FITC (recettore dell'acido ialuronico), CD90-PC5 (Thy 1), CD166-RD1 (*activated leukocyte cell adhesion molecule*), CD105-RD1 (*endoglin, tissue growth factor β 1 receptor*) e CD117-PC5 (*c-kit, stem cell factor receptor*). I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule positive su 10.000 eventi.

La fosfatasi alcalina (ALP) e l'osteoprotegerina (OPG) sono state valutate come marcatori del differenziamento osteogenetico.¹³³ L'attività dell'ALP è stata misurata con un metodo biochimico basato sulla conversione *del p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate* (Sigma-Aldrich) in p-nitrofenolo. Le cellule sono state lisate con SDS allo 0,01% ed il substrato della reazione (p-nitrofenilfosfato) è stato aggiunto in proporzione 1:1 ai lisati cellulari. Dopo un'incubazione di 15 minuti a 37°C, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dei campioni a 405 nm, utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre (Spectra III, Tecan, Austria). L'attività della ALP è stata calcolata per interpolazione dei valori di assorbanza su una curva standard costituita da diluizioni seriali di una soluzione di p-nitrofenolo (range di concentrazione 0-40 mmoli). I risultati sono stati espressi come nmoli di p-nitrofenolo formato in 1 min e normalizzati per il quantitativo totale di proteine (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL).

L'analisi citochimica della ALP è stata effettuata sulle cellule utilizzando un kit commerciale (Sigma-Aldrich). Per il saggio di quantificazione immunoenzimatica di OPG sono stati utilizzati i seguenti reagenti: anticorpo *mouse anti-human OPG* (2 mg/mL); anticorpo *goat biotinylated anti-human OPG* (100 ng/mL); *recombinant human OPG*, come riferimento standard, in un range di concentrazione di 0-2000 pg/mL (R&D, Minneapolis, MN).

Il test delle CFU è stato utilizzato per stimare l'abilità clonogenica dei precursori osteogenici. In breve, le cellule confluenti (MD4) sono state sottoposte a digestione con tripsina e seminate alla densità di 140 cellule/cm² in piastre da 6 pozzetti, utilizzando terreno differenziante. Dopo 14 giorni (MD5), i pozzetti sono stati trattati con cristal

violetto (0,25% in metanolo al 20% per 10 min a temperatura ambiente) e gli aggregati di almeno 50 cellule, visualizzati al microscopio, sono stati contati.¹³³

La capacità di depositare noduli minerali è stata valutata tramite l'osservazione delle colture dopo colorazione di von Kossa. Le hMSC sono state fissate per 5 minuti con metanolo freddo ed incubate con nitrato d'argento al 2% sotto luce ultravioletta per 15 min. Infine, le cellule sono state fissate con sodio tiosolfato al 2.5% (Sigma-Aldrich) per 5 min e contrastate con safranina all'1%.

Il contenuto di calcio è stato quantificato tramite un saggio colorimetrico (Roche Diagnostics SpA, Milano) basato sul metodo dell'ortocresolftaleina complessone. Le cellule e la matrice sono state rimosse dalle piastre di coltura ed incubate overnight con HCl 0.5M per dissolvere il calcio. I riferimenti standard (range 0-1000 µg/ mL) sono stati preparati a partire da una soluzione di CaCl₂ ed i risultati sono stati espressi come rapporto tra il contenuto di calcio (mg) ed il quantitativo totale di proteine (BCA Protein Assay kit, Pierce). Il limite di rivelazione del saggio è di 2 µg/mL.

Per lo studio dell'espressione genica l'RNA totale di ciascun paziente, in ciascuna delle 8 condizioni, è stato analizzato in triplicato. Il pellet cellulare da cui estrarre l'RNA è stato risospeso in RNAlater (Qiagen, Hilden, Germania) e posto a -80°C fino al momento dell'utilizzo. L'analisi microarray è stata effettuata dal gruppo Progenika Biopharma (Derio, Spagna).

Profilo di espressione genica su larga scala

L'analisi microarray è stata eseguita su campioni ottenuti da 4 pazienti (#1, maschio, 48 anni; #2, maschio, 46 anni; #3, maschio, 61 anni; #4, maschio, 51 anni). Sono state valutate soltanto le colture di hMSC capaci di formare noduli minerali nella fase finale. L'RNA totale è stato isolato utilizzando RNeasy micro- o mini-kit (Qiagen), trattato con DNasi (Qiagen) e conservato a -80°C; per il procedimento sperimentale sono state seguite le istruzioni fornite dal produttore. L'integrità dell'RNA è stata accertata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio o tramite Bioanalyzer (Agilent Technologies, Wilmington, DE); la concentrazione e la purezza sono state determinate spettrofotometricamente (NanoDrop ND-1000, NanoDrop technologies LLC; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

Il profiling di espressione genica è stato effettuato tramite *Gene-Chip Human Genome U133 Plus 2.0 microarrays* (Affymetrix), secondo i protocolli standard per

amplificazione, marcatura ed ibridizzazione dell'RNA. In seguito alla scansione del microarray, la quantificazione della fluorescenza e la generazione dei dati grezzi di espressione genica sono state eseguite tramite il software Affimetrix.

Validazione dei dati microarray

I microarray rappresentano uno strumento molto potente per misurare simultaneamente i livelli di migliaia di mRNA. Dato l'elevato numero di misurazioni coinvolte, tale tecnologia può fornire un numero, comunque ridotto, di falsi negativi o falsi positivi. È richiesta, pertanto, la validazione dei risultati ottenuti tramite tecniche indipendenti di quantificazione dell'mRNA. In questo studio la validazione dei dati microarray è stata eseguita tramite *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) su *Low Density Arrays* (LDA) format 96b (7900HT System, TaqMan Low Density Arrays Upgrade, Applied Biosystems, Oster City, CA).

Gli LDA sono sistemi microfluidici che si basano sull'uso di sonde TaqMan per la rivelazione dei prodotti di amplificazione (<http://www.appliedbiosystems.com>). Ogni LDA possiede otto porte di *loading* separate suddivise in 48 pozzetti, per un totale di 384 pozzetti (Figura 6). Un array permette l'analisi di 95 geni ed un controllo (gene housekeeping GAPDH) in duplicato e per due campioni indipendenti.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Port | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | A | 1 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | B | 1 |
| 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | C | 2 |
| 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | D | 2 |
| 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | E | 3 |
| 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | F | 3 |
| 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | G | 4 |
| 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | H | 4 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | I | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | J | 5 |
| 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | K | 6 |
| 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | L | 6 |
| 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | M | 7 |
| 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | N | 7 |
| 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | O | 8 |
| 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | P | 8 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | | |

Figura 6. LDA, analisi di 95 geni ed 1 controllo (CTL, in grigio).

Ogni pozzetto da 2 μ l contiene una sonda TaqMan ed un set di primer specifico per il gene bersaglio. I primer set sono pre-validati e possono essere selezionati sul catalogo elettronico (www.appliedbiosystems.com).

Sulla base dei risultati dell'analisi microarray sono stati selezionati 88 geni target e 7 geni controllo addizionali (KDELRL1, ANXA11, GSTO1, NDUFS5, DDOST, C11orf10 e VAPA). In caso di disponibilità di primer set multipli, è stata selezionata la coppia che amplificasse la sequenza genica più vicina al sito di legame della sonda Affimetrix utilizzata per l'analisi microarray.

La preparazione degli LDA è stata eseguita presso il centro di quantificazione e genotipizzazione dell'Università Autonoma di Madrid. Ad ogni campione di cDNA (50 ng/porta) è stato aggiunto un volume uguale di *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems). Dopo agitazione e centrifugazione la soluzione (100 μ l) è stata trasferita sulla porta di *loading* del LDA. L'array è stato quindi centrifugato per caricare la mix di reazione nei singoli pozzetti del sistema microfluidico, sigillato e caricato sul sistema di qRT-PCR 7900HT.

La validazione è stata effettuata su un sottogruppo di geni differenzialmente espressi secondo i risultati dell'analisi microarray. L'RNA è stato isolato da colture provenienti da due individui diversi da quelli precedentemente studiati (#5, femmina, 50 anni; #6, maschio, 40 anni) e da un paziente già sottoposto all'analisi microarray (#2, maschio, 46 anni). I valori di espressione genica sono stati calcolati tramite il metodo del ciclo soglia (Ct).

Analisi statistica

I dati relativi alla caratterizzazione delle hMSC sono stati espressi come media \pm errore standard. Il confronto delle variabili indipendenti è stato effettuato tramite il test U di Mann–Whitney. Per processare i dati microarray ed ottenere una lista di *probe set* differenzialmente espressi ($p < 0.05$, t-test per dati appaiati e test di correzione multipla Benjamini–Hochberg) è stato utilizzato il programma GeneSpring (www.chem.agilent.com). Sono stati effettuati i seguenti confronti:

- *hMSC Differentiation*: MD2 versus MD1; MD3 versus MD1; MD4 versus MD1; MD5 versus MD1.
- *hMSC Mineralization*: MM1 versus MD4; MM2 versus MD4; MM3 versus MD4.

L'analisi dei dati è stata eseguita integrando il valore statistico dei risultati e le conoscenze biologiche sul tessuto osseo e sui meccanismi coinvolti nel differenziamento degli osteoprogenitori.¹³⁴

I risultati della qRT-PCR sono stati normalizzati tramite i programmi Genorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) e Normfinder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>),^{135,136} ed i cambiamenti significativi nell'espressione genica sono stati rilevati tramite il t-test per dati appaiati. Allo scopo di confermare la relazione tra genotipo e fenotipo delle hMSC, è stato calcolato il coefficiente di correlazione R (ed il corrispondente p-value, test di Fisher) tra il *fold change* (FC) dei geni correlati alla biologia ossea (*bone-related*) ed i parametri biochimici valutati (attività dell'ALP, rilascio di calcio); valori di p inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi.

Risultati

Caratterizzazione delle colture

Le cellule aderenti alle fiasche mostravano una morfologia *fibroblast-like*.¹²⁸ Nel corso degli esperimenti la forma e le dimensioni cellulari non hanno subito variazioni e nella fase di mineralizzazione è stata osservata la tipica distribuzione cellulare multistratificata. Nonostante la variabilità biologica interindividuale, la durata delle diverse fasi nei processi di differenziamento e mineralizzazione era simile nelle colture provenienti dai diversi soggetti (MD3, 5.5±1.1 giorni; MD4, 10.5±1.7; MD5, 24.2±2.5; MM1, 17.5±3.4; MM2, 23.6±3.3; MM3, 30.7±3.5).

La proliferazione cellulare era comparabile in tutti gli individui, come si deduce dalla ridotta variabilità osservata in ciascun tempo (Figura 7a). In seguito all'aggiunta di terreno mineralizzante la proliferazione diminuiva ed il numero di hMSC nelle fasi intermedia e finale della mineralizzazione era approssimativamente costante (Figura 7a).

L'analisi citometrica (Figura 7b) della colture in MD1 ha mostrato che CD90, CD105 e CD166 erano assenti, mentre CD44 era presente nel 26±9% della popolazione cellulare. Le cellule confluenti presentavano elevati livelli dei quattro antigeni di superficie (>90%), mentre, come atteso, la percentuale di cellule CD45- e CD117-positive era <5% in tutte le colture.

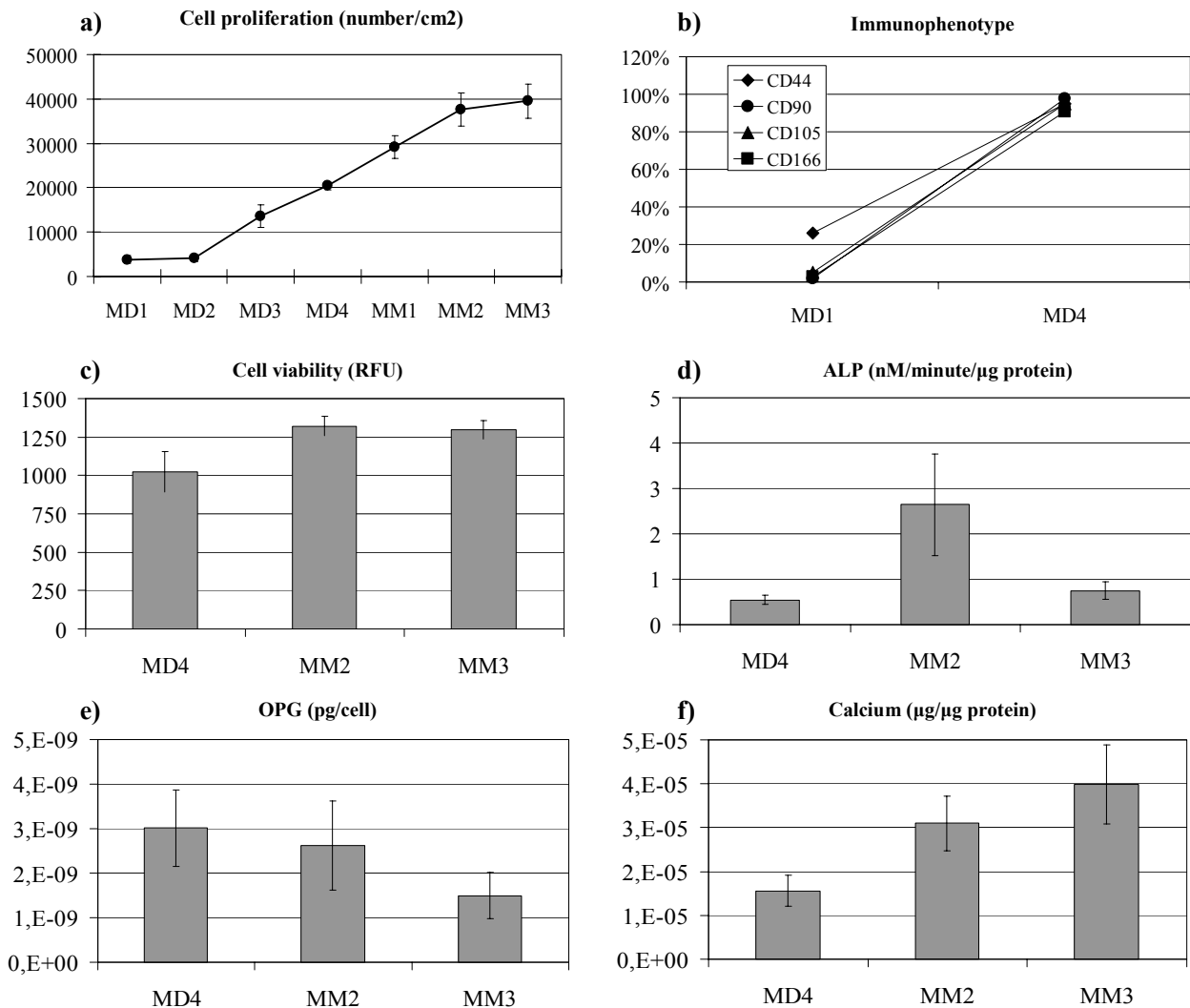


Figura 7. Caratterizzazione delle colture cellulari. (a) Proliferazione cellulare: il grafico riporta la media \pm l'errore standard del numero di cellule/cm² di superficie. (b) Immunofenotipo delle colture di hMSC: CD90, CD105 e CD166 erano assenti in MD1, mentre CD44 era rilevabile nel 26 \pm 9% della popolazione; tutti gli antigeni erano espressi in MD4. (c-f) Caratterizzazione biochimica delle hMSC indotte alla mineralizzazione. Gli istogrammi rappresentano: la media \pm l'errore standard delle unità di fluorescenza relativa (RFU) emesse dall'AlamarBlue (c); il rapporto tra le nmoli di substrato convertito dall'ALP in 1 min e i μ g di proteine nei lisati cellulari (d); il rapporto tra la concentrazione di OPG nel sovranatante ed il numero di hMSC in coltura (e); il rapporto tra il contenuto di calcio ed i mg di proteine negli estratti proteici (f).

La vitalità cellulare è stata analizzata nel corso dell'intero periodo di coltura, dal momento che è presente un elevato rischio di stress metabolico in cellule iperconfluenti indotte alla mineralizzazione. La Figura 7c mostra che il segnale fluorescente emesso dall'AlamarBlue tendeva ad aumentare da MD4 ad MM2 ($p=0.03$), ma non andava incontro ad alcuna variazione nella fase successiva.

Nella fase MM2 è stato osservato un aumento transiente dell'attività dell'ALP (Figura 7d) , ma non sono state osservate differenze significative tra i tempi MD4 ed MM3.

Il rilascio di OPG tendeva a diminuire progressivamente durante la mineralizzazione delle hMSC (Figura 7e), mentre il contenuto di calcio aveva un andamento opposto (Figura 7f). In entrambi i casi le differenze osservate non erano statisticamente significative.

L'elevata variabilità nel numero di CFU osservata (83.2 ± 15.2 ; range 28.8–115.2) suggerisce che le hMSC dei sei individui avessero un potenziale osteogenetico diverso; comunque, l'intensa attività citochimica dell'ALP ed i noduli minerali depositi, rappresentati nella Figura 8, costituiscono la prova del raggiungimento delle fasi finali di differenziamento e mineralizzazione.

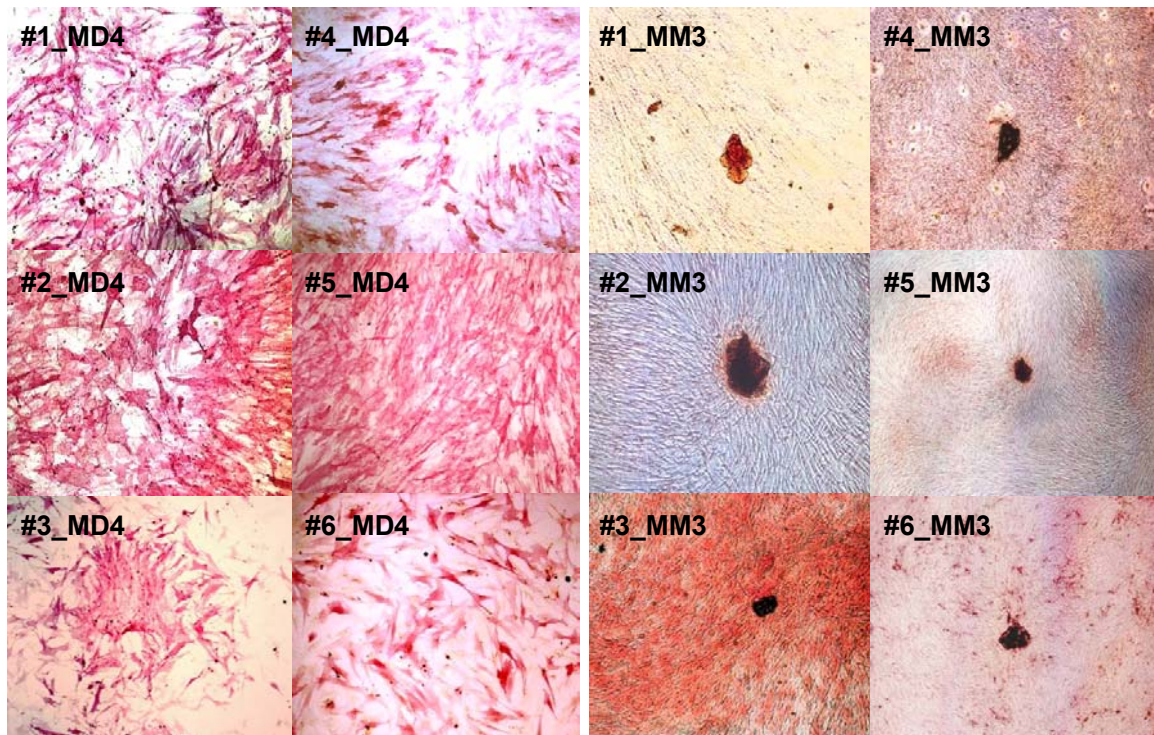


Figura 8. Attività citochimica dell'ALP e formazione dei noduli minerali nelle colture di hMSC. Le immagini rappresentano alcune fasi critiche delle colture quali la prima confluenza (colonna MD4) e la completa mineralizzazione (colonna MM3). Nonostante la variabilità interindividuale, l'acquisizione del fenotipo osteoblastico è stata confermata in tutte le colture dall'intensa colorazione citochimica dell'ALP in MD4 e dalla deposizione di noduli di calcio-fosfato in MM3.

Analisi su larga scala del profilo di espressione genica delle hMSC

Tutti i dati presentati in questo studio sono disponibili nel database GEO (Gene Expression Omnibus, www.ncbi.nlm.nih.gov=geo=query), accession number GSE12267. L'analisi GeneSpring ha messo in luce un gran numero di variazioni nel profilo di espressione genica durante il differenziamento delle hMSC, la maggior parte delle quali si verificavano nei tempi MD4 e MD5 (Tabella 4). Durante la mineralizzazione, il numero maggiore di variazioni si osservava in MM2, sebbene un numero complessivamente inferiore di geni fosse modulato in maniera significativa in tale processo.

Tabella 4. Numero e percentuale dei probe-set differenzialmente espressi

| Confronti | Probe-set differenzialmente espressi | Probe-set regolati negativamente ¹ | Probe-set regolati positivamente ¹ | Probe-set regolati positivamente con $FC \geq 2$ ³ | Probe-set con $FC \geq 2$ e pathways e/o annotazione Gene Ontology inclusi in Tabella 3 ⁴ |
|----------------------------|--------------------------------------|---|---|---|--|
| <i>MSC differentiation</i> | | | | | |
| MD2 vs MD1 | 1,405 | 121 (8.6%) ² | 1,284 (91.4%) ² | 301 (23.4%) | 47 (15.6%) |
| MD3 vs MD1 | 3,255 | 307 (9.4%) | 2,948 (90.6%) | 105 (3.6%) | 77 (73.3%) |
| MD4 vs MD1 | 4,009 | 1,205 (30.1%) | 2,804 (69.9%) | 1,085 (38.7%) | 198 (18.2%) |
| MD5 vs MD1 | 4,498 | 438 (9.7%) | 4,060 (90.3%) | 1,861 (45.8%) | 151 (8.1%) |
| <i>MSC mineralization</i> | | | | | |
| MM1 vs MD4 | 784 | 128 (16.3%) | 656 (83.7%) | 42 (6.4%) | 13 (31.0%) |
| MM2 vs MD4 | 1,260 | 109 (8.7%) | 1,151 (91.3%) | 256 (22.2%) | 49 (19.1%) |
| MM3 vs MD4 | 697 | 78 (11.2%) | 619 (88.8%) | 115 (18.6%) | 22 (19.1%) |

¹ geni regolati positivamente (>1) e negativamente (<1) con p value ≤ 0.05 .

² la percentuale è stata calcolata sul numero totale di probe-set differenzialmente espressi (prima colonna) in ogni step del differenziamento e mineralizzazione delle hMSC.

³ percentuale calcolata sul numero totale di probe-set regolati positivamente.

⁴ percentuale calcolata sul numero di probe-set con Fold Change ≥ 2

L'elenco dei geni differenzialmente espressi durante il differenziamento e la mineralizzazione è stato analizzato e sottoposto ad attenta selezione, al fine di ottenere una lista di geni utile per il monitoraggio delle colture di hMSC. I criteri adottati sono riportati di seguito:

1. Sono stati considerati i *probe set* con un Fold Change (FC) >2, poiché rappresentavano il 70–91% di tutti i geni differenzialmente espressi. Inoltre, la maggior parte dei geni regolati negativamente erano correlati a pathway e processi biologici coinvolti nel differenziamento di cellule ematopoietiche.
2. L'attenzione è stata focalizzata su geni correlati a proliferazione, differenziamento ed altre funzioni biologiche delle cellule ossee, sulla base dei database Gene Ontology (GO)¹³⁷ e GeneMapp¹³⁸ o KEGG¹³⁹. Quattordici pathway e dieci processi biologici sono stati selezionati ed accorpati in otto gruppi (*cluster*) sulla base della loro affinità (Tabella 5).

Tabella 5. *Cluster* dei geni sovraespressi. Gli otto gruppi sono stati ottenuti dalla combinazione di pathway e processi biologici specifici. Tra parentesi il numero di geni appartenenti ad ogni sottogruppo.

| Gruppi | Pathway (<i>GeneMapp/KEGG</i>) 97 geni | Processi biologici (<i>Gene ontology</i>) 116 geni |
|---------------------------------------|--|--|
| Angiogenesis (n= 13) | VEGF signaling pathway (n= 3) | Angiogenesis (n= 10) |
| Apoptosis (n=5) | Apoptosis (n= 4) | Apoptosis (n=1) |
| Bone-related genes (n= 32) | ----- | Bone mineralization (n= 1) Ossification (n= 8) Skeletal development (n= 23) |
| Cell communication (n= 93) | Adherens junction (n=8) Cytokine-cytokine receptor interaction (n= 2) ECM-receptor interaction (n=5) Focal adhesion (n=2) Integrin-mediated cell adhesion (n=15) MAPK signaling pathway (n=6) Matrix metalloproteinases (n=4) Tight junction (n=1) | Cell adhesion (n= 40) ECM remodeling (n= 1) Growth factors and receptors (n= 2) Phosphate transport (n= 7) |
| Cell cycle (n= 21) | Cell cycle (n= 21) | ----- |
| Development (n= 22) | ----- | Development (n= 22) |
| TGF-β signaling (n= 14) | TGF-β signaling pathway (n=13) | TGF-β signaling (n= 1) |
| Wnt signaling (n= 13) | Wnt signaling pathway (n= 13) | ----- |

Sulla base dei criteri sopra riportati sono stati selezionati 557 *probe set* di interesse (Tabella 4), corrispondenti a 213 geni. Tra essi, 97 geni appartenevano a pathway ben caratterizzati e 116 avevano un'annotazione GO potenzialmente correlata alla biologia della cellula ossea.

Come mostrato nella Tabella 6, il picco di sovraespressione è stato osservato in MD4 e MD5. La maggior parte dei geni sovraespressi apparteneva al gruppo *Cell communication* (51.1% e 46.1%, rispettivamente), che include molecole di adesione, fattori di crescita e recettori di fattori di crescita. Il maggior numero dei geni *Bone related* è stato osservato in MD3 (27.3%) e MD4 (19.4%). La percentuale di geni coinvolti nell'angiogenesi tendeva ad aumentare durante la fase precoce del processo di mineralizzazione (MM1, 33.3%), mentre la proporzione di geni appartenenti al gruppo *Development/morphogenesis* aumentava durante le fasi intermedia e tardiva (MM2, 25%; MM3, 31%).

Table 6. Numero e percentuale (tra parentesi) dei 213 geni sovraespressi, suddivisi negli 8 gruppi, nei diversi stadi del differenziamento e della mineralizzazione delle hMSC.

| | MD2 | MD3 | MD4 | MD5 | MM1 | MM2 | MM3 |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Angiogenesis | 4 (11.4) | 4 (7.3) | 5 (3.7) | 3 (2.9) | 3 (33.3) | 4 (12.5) | 1 (6.3) |
| Apoptosis | 2 (5.7) | 1 (1.8) | 2 (1.5) | 2 (2.0) | 0 (0.0) | 2 (6.3) | 1 (6.3) |
| Bone related genes | 3 (8.6) | 15 (27.3) | 26 (19.3) | 15 (14.7) | 1 (11.1) | 4 (12.5) | 3 (18.8) |
| Cell communication | 7 (20.0) | 21 (38.2) | 69 (51.1) | 47 (46.1) | 3 (33.3) | 8 (25.0) | 4 (25.0) |
| Cell Cycle | 14 (40.0) | 2 (3.6) | 8 (5.9) | 11 (10.8) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (6.3) |
| Development | 2 (5.7) | 3 (5.5) | 10 (7.4) | 6 (5.9) | 1 (11.1) | 8 (25.0) | 5 (31.0) |
| TGFβ signaling | 1 (2.9) | 5 (9.1) | 10 (7.4) | 8 (7.8) | 0 (0.0) | 4 (12.5) | 0 (0.0) |
| Wnt signaling | 2 (5.7) | 4 (7.3) | 5 (3.7) | 10 (9.8) | 1 (11.1) | 2 (6.3) | 1 (6.3) |
| Totale | 35 (100) | 55 (100) | 135 (100) | 102 (100) | 9 (100) | 32 (100) | 16 (100) |

Allo scopo di verificare il ruolo dei 116 geni con annotazione GO potenzialmente correlata alla biologia della cellula ossea, è stata eseguita un'accurata ricerca bibliografica (PubMed). Sono stati selezionati abstract in cui la voce 'gene title' o 'gene symbol' fosse correlata a MeSH (*Medical subject Headings*) appropriati, quali hMSC, osteoblasto, osso, osteogenesi e scheletro. Dalla ricerca è emerso che 74 geni (63.8%) avevano un ruolo ben riconosciuto nella biologia dell'osso, mentre non è stato possibile ottenere informazioni esaustive sulla funzione dei rimanenti 42 geni (36.2%) nelle cellule ossee.

Validazione dei risultati microarray tramite qRT-PCR

La validazione è stata eseguita su colture provenienti da tre individui: uno di essi era già stato sottoposto all'analisi microarray, due non erano stati precedentemente esaminati. I risultati della caratterizzazione delle colture cellulari sono state precedentemente mostrati (Figure 7 e 8).

La selezione dei geni da validare tramite qRT-PCR è stata effettuata utilizzando diversi criteri:¹⁴⁰

- Per i 97 geni appartenenti a pathway ben conosciuti, sono stati selezionati non più di 3 geni per pathway, prediligendo quelli che avessero un ruolo chiave nella trasduzione del segnale.
- Per quanto riguarda i 116 geni associati a processi biologici potenzialmente coinvolti nell'osteogenesi, sono stati selezionati i geni per i quali non fosse disponibile una 'validazione' bibliografica e quelli con un FC basso (>2 e <3).
- I geni universalmente accettati come marcatori per la caratterizzazione della cellula ossea, come la fosfatasi alcalina o i componenti del BMP signaling, non sono stati sottoposti all'analisi qRT-PCR.^{141,142132}

In seguito all'analisi, sessantuno geni (68.5%) sono stati classificati come 'validati', dal momento che le differenze nell'espressione genica osservate utilizzando la tecnologia microarray sono state confermate tramite qRT-PCR; talvolta inoltre gli LDA hanno identificato step aggiuntivi di modulazione dell'espressione genica nel corso di differenziamento e mineralizzazione. Ventotto geni (31.5%) hanno fornito risultati difficilmente interpretabili o non sono stati analizzati per motivi tecnici, come l'assenza di primer specifici.

L'analisi microarray e la validazione tramite qRT-PCR hanno permesso di generare un archivio (Figura 9) contenente tutte le informazioni relative ai 213 geni selezionati, i.e. probe set utilizzati, dati statistici, posizione cromosomica del gene, riferimenti alle più importanti banche dati bioinformatiche, link 'Entrez Gene', annotazione Gene Ontology, pathway di appartenenza e risultati della validazione.

| | A | C | D | K | L | M | N | O | P | Q | R |
|----|-------------------------------------|-----------------------|-------------|--------------------|--|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| | Gene Title | Entrez Gene Link | Gene Symbol | Family | Annotation | Correlation with osteogenesis | Q-RT-PCR step validation | Q-RT-PCR additional results | Doubtful results | Validation results | Specificity |
| 1 | | | | | | | | | | | |
| 19 | calpain 7 | 23473 | CAPN7 | Cell communication | | | | | md5 | doubtful result | Differentiation |
| 20 | caveolin 1, caveolae protein, 22kDa | 857 | CAV1 | Cell communication | | | MD4, MD5 | MD3 | md2 | validated | Differentiation |
| 21 | caveolin 2 | 858 | CAV2 | Cell communication | | | MD3, MD5 | | md2,md4 | validated | Differentiation |
| 22 | chemokine (C-C motif) ligand 2 | 8347 | CCL2 | Cell communication | The protein encoded by this gene is structurally related to the CXC subfamily of cytokines. This cytokine displays chemotactic activity for monocytes and basophils but not for neutrophils or eosinophils. It has been implicated in the pathogenesis of diseases characterized by monocyte infiltrates, like psoriasis, rheumatoid arthritis and atherosclerosis. It binds to chemokine receptors CCR2 and CCR4. CCL2 is secreted from bone marrow stromal cells and osteoblast. | | MM2, HM2 | MM3, HM3 | | validated | Mineralization |
| 23 | Cxcln A2 | 930 | CCNA2 | Cell cycle | | | MD2 | | md3, mm2 | partially validated | Differentiation |
| 24 | cxcln B1 | 931 | CCNB1 | Cell cycle | | | | | | | Differentiation |
| 25 | cxcln D1 | 935 | CCND1 | Cell cycle | | | MD2, MD4, MD5 | MD3 | | validated | Differentiation |
| 26 | cxcln E2 | 934 | CCNE2 | Cell cycle | | | | | | | Differentiation |
| 27 | CD44 molecule (Indian blood group) | 960 | CD44 | Cell communication | The protein encoded by this gene is a cell-surface glycoprotein involved in cell-cell interactions, cell adhesion and migration. It is a receptor for hyaluronic acid and can also interact with other ligands, such as osteopontin, collagens, and matrix metalloproteinases. CD44 was found significantly increased in human MSC undergoing osteoblast differentiation. | | | MD2 | md4, mm2, mm3 | involved | Differentiation |

Figura 9. Archivio dei 213 geni selezionati.

Lista di geni per il monitoraggio delle colture di hMSC

I risultati dell'analisi microarray e della validazione sono stati utilizzati per generare una lista di geni utile per il monitoraggio dello stato funzionale e dell'attività delle hMSC *ex vivo* (Tabella 7). I geni appartenenti al gruppo *Cell cycle* sono stati esclusi, in quanto prevalentemente sovraespressi in MD2, ossia 24 ore dopo l'induzione del differenziamento, e quindi scarsamente utili per il monitoraggio delle colture. In caso di sovraespressione di due o più isoforme dello stesso gene, è stata selezionata quella che presentava una maggiore differenza tra FC minimo e massimo nel corso dei processi studiati. Dal momento che soltanto pochi geni erano differenzialmente modulati durante le fasi di mineralizzazione, tutti i geni sovraespressi unicamente in tale processo sono stati inclusi nella lista.

Tra i 65 geni utili per il monitoraggio del differenziamento osteoblastico delle hMSC, 11 (16.9%) erano sovraespressi in ogni fase; mentre durante il processo di mineralizzazione solo l'espressione FZD8 aumentava costantemente da MM1 ad MM3. La maggior parte dei geni *bone related* erano sovraespressi durante le fasi intermedia e tardiva del differenziamento. Infine, nove geni, ANKH, COMP, DKK1, DKK3, FGF2, ICAM1, SOX9, SPOCK1 e TIMP3, erano differenzialmente modulati in entrambi i processi di differenziamento e mineralizzazione.

Table 7. Lista di geni per il monitoraggio delle hMSC.

| Famiglia | Gene | Gene Symbol | GeneId number* |
|--|--|-------------|----------------|
| <i>hMSC differentiation</i> | | | |
| Sovraespressione costante (MD2, MD3, MD4, MD5) | | | |
| Angiogenesis | phospholipase C, beta 4 | PLCB4 | 5332 |
| Cell-communication | v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma) | AKT3 | 10000 |
| “ | activated leukocyte cell adhesion molecule | ALCAM | 214 |
| “ | cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) | CDH2 | 1000 |
| “ | collagen, type I, alpha 1 | COL1A1 | 1277 |
| “ | met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) | MET | 4233 |
| “ | protein tyrosine phosphatase, receptor type, F | PTPRF | 5792 |
| “ | tensin 1 | TNS1 | 7145 |
| Development | gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis) | GREM1 | 26585 |
| TGF beta pathway | serpin peptidase inhibitor, clade E (plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 | SERPINE1 | 5054 |
| Wnt signaling pathway | wingless-type MMTV integration site family | WNT5B | 81029 |
| Sovraespressione precoce e intermedia (MD2,MD3,MD4) | | | |
| Bone related genes | collagen, type X, alpha 1 (Schmid metaphyseal chondrodysplasia) | COL10A1 | 1300 |
| Sovraespressione intermedia (MD3,MD4) | | | |
| Bone related genes | bone morphogenetic protein 1 | BMP1 | 649 |
| “ | fibrillin 1 | FBN1 | 2200 |
| “ | integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II) | IBSP | 3381 |
| “ | insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) | IGF2 | 3481 |
| “ | PDZ and LIM domain 7 (enigma) | PDLIM7 | 9260 |
| Cell communication | Collagen, type XIV, alpha 1 (undulin) | COL14A1 | 7373 |
| TGF beta pathway | runt-related transcription factor 2 | RUNX2 | 860 |
| Sovraespressione intermedia e tardiva (MD3, MD4, MD5) | | | |
| Angiogenesis | Thy-1 cell surface antigen | THY1 | 7070 |
| Bone related genes | cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast) | CDH11 | 1009 |
| “ | collagen, type XII, alpha 1 | COL12A1 | 1303 |
| “ | cartilage oligomeric matrix protein | COMP | 1311 |
| “ | periostin, osteoblast specific factor | POSTN | 10631 |
| “ | secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) | SPARC | 6678 |
| Cell communication | caveolin 2 | CAV2 | 858 |
| “ | Collagen, type V, alpha 1 | COL5A1 | 1289 |
| “ | Collagen, type VIII, alpha 1 | COL8A1 | 1295 |
| “ | fibronectin 1 | FN1 | 2335 |

| | | | |
|-----------------------|---|-------|-------|
| “ | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor | ICAM1 | 3383 |
| “ | integrin, alpha 7 | ITGA7 | 3679 |
| “ | PTK2 protein tyrosine kinase 2 | PTK2 | 5747 |
| Development | dickkopf homolog 3 (<i>Xenopus laevis</i>) | DKK3 | 27122 |
| TGF beta pathway | endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1) | ENG | 2022 |
| “ | SMAD, mothers against DPP homolog 4 (<i>Drosophila</i>) | SMAD4 | 4092 |
| “ | thrombospondin 1 | THBS1 | 7057 |
| Wnt signaling pathway | frizzled homolog 6 (<i>Drosophila</i>) | FZD6 | 8323 |

Sovraespressione tardiva (MD4, MD5)

| | | | |
|-----------------------|---|----------|-------|
| Angiogenesis | jagged 1 (Alagille syndrome) | JAG1 | 182 |
| Bone related genes | ankylosis, progressive homolog (mouse) | ANKH | 56172 |
| “ | C-type lectin domain family 3, member B (tetranectin) | CLEC3B | 7123 |
| “ | Epidermal growth factor receptor (v-erb-b oncogene homolog, avian) | EGFR | 1956 |
| “ | proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein | PRELP | 5549 |
| “ | SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal) | SOX9 | 6662 |
| Cell communication | collagen, type IV, alpha 1 | COL4A1 | 1282 |
| “ | collagen, type VI, alpha 1 | COL6A1 | 1291 |
| “ | integrin, alpha 11 | ITGA11 | 22801 |
| “ | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14 | PTPN14 | 5784 |
| “ | thrombospondin 3 | THBS3 | 7059 |
| Development | brain-derived neurotrophic factor | BDNF | 627 |
| Wnt signaling pathway | platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, alpha subunit 45kDa | PAFAH1B1 | 5048 |
| “ | ras homolog gene family, member A | RHOA | 387 |

Sovraespressione in MD4

| | | | |
|--------------------|--|---------|------|
| Bone related genes | alkaline phosphatase, liver/bone/kidney | ALPL | 249 |
| Cell communication | CD99 molecule | CD99 | 4267 |
| “ | collagen, type XI, alpha 1 | COL11A1 | 1301 |
| “ | chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican) | CSPG2 | 1462 |
| Development | biglycan | BGN | 633 |
| “ | leptin receptor | LEPR | 3953 |
| “ | procollagen C-endopeptidase enhancer | PCOLCE | 5118 |
| “ | paired related homeobox 1 | PRRX1 | 5396 |
| “ | spare/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1 | SPOCK1 | 6695 |
| TGF beta pathway | SMAD, mothers against DPP homolog 1 (<i>Drosophila</i>) | SMAD1 | 4089 |

Sovraespressione in MD5

| | | | |
|--------------------|--|-----------|------|
| Angiogenesis | fibroblast growth factor 2 (basic) | FGF2 | 2247 |
| Bone related genes | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin) | TNFRSF11B | 4982 |

| | | | |
|--------------------|---|-------|-------|
| Cell communication | TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudo-inflammatory) | TIMP3 | 7078 |
| Development | dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>) | DKK1 | 22943 |

hMSC mineralization

Sovraespressione costante (MM1, MM2, MM3)

| | | | |
|-----------------------|--|------|------|
| Wnt signaling pathway | frizzled homolog 8 (<i>Drosophila</i>) | FZD8 | 8325 |
|-----------------------|--|------|------|

Sovraespressione precoce (MM1)

| | | | |
|--------------|---|--------|-------|
| Angiogenesis | fibroblast growth factor receptor-like 1 | FGFRL1 | 53834 |
| “ | placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein | PGF | 5228 |
| “ | TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudo-inflammatory) | TIMP3 | 7078 |

Sovraespressione precoce e intermedia (MM1, MM2)

| | | | |
|--------------------|--|-------|-------|
| Angiogenesis | fibroblast growth factor 2 (basic) | FGF2 | 2247 |
| “ | vascular endothelial growth factor | VEGFA | 7422 |
| Bone related genes | T-box 3 (ulnar mammary syndrome) | TBX3 | 6926 |
| Development | dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>) | DKK1 | 22943 |

Sovraespressione intermedia (MM2)

| | | | |
|--------------------|--|-------|------|
| Angiogenesis | interleukin 8 | IL8 | 3576 |
| Cell communication | chemokine (C-C motif) ligand 2 | CCL2 | 6347 |
| “ | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor | ICAM1 | 3383 |
| Development | T-box 2 | TBX2 | 6909 |
| “ | transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, <i>Drosophila</i>) | TLE1 | 7088 |

Sovraespressione tardiva (MM3)

| | | | |
|--------------------|---|---------|-------|
| Angiogenesis | collagen, type XV, alpha 1 | COL15A1 | 1306 |
| Bone related genes | ankylosis, progressive homolog (mouse) | ANKH | 56172 |
| “ | cartilage oligomeric matrix protein | COMP | 1311 |
| “ | SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal) | SOX9 | 6662 |
| Cell communication | insulin-like growth factor binding protein 2, 3kDa | IGFBP2 | 3485 |
| Development | dickkopf homolog 3 (<i>Xenopus laevis</i>) | DKK3 | 27122 |
| “ | ephrin-B2 | EFNB2 | 1948 |
| “ | sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1 | SPOCK1 | 6695 |

* Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>)

La lista dei geni sovraespressi è inoltre utile per delineare i quadri di espressione genica, associati ad ogni fase del differenziamento e della mineralizzazione durante l'espansione *ex vivo* delle hMSC (Figura 10).

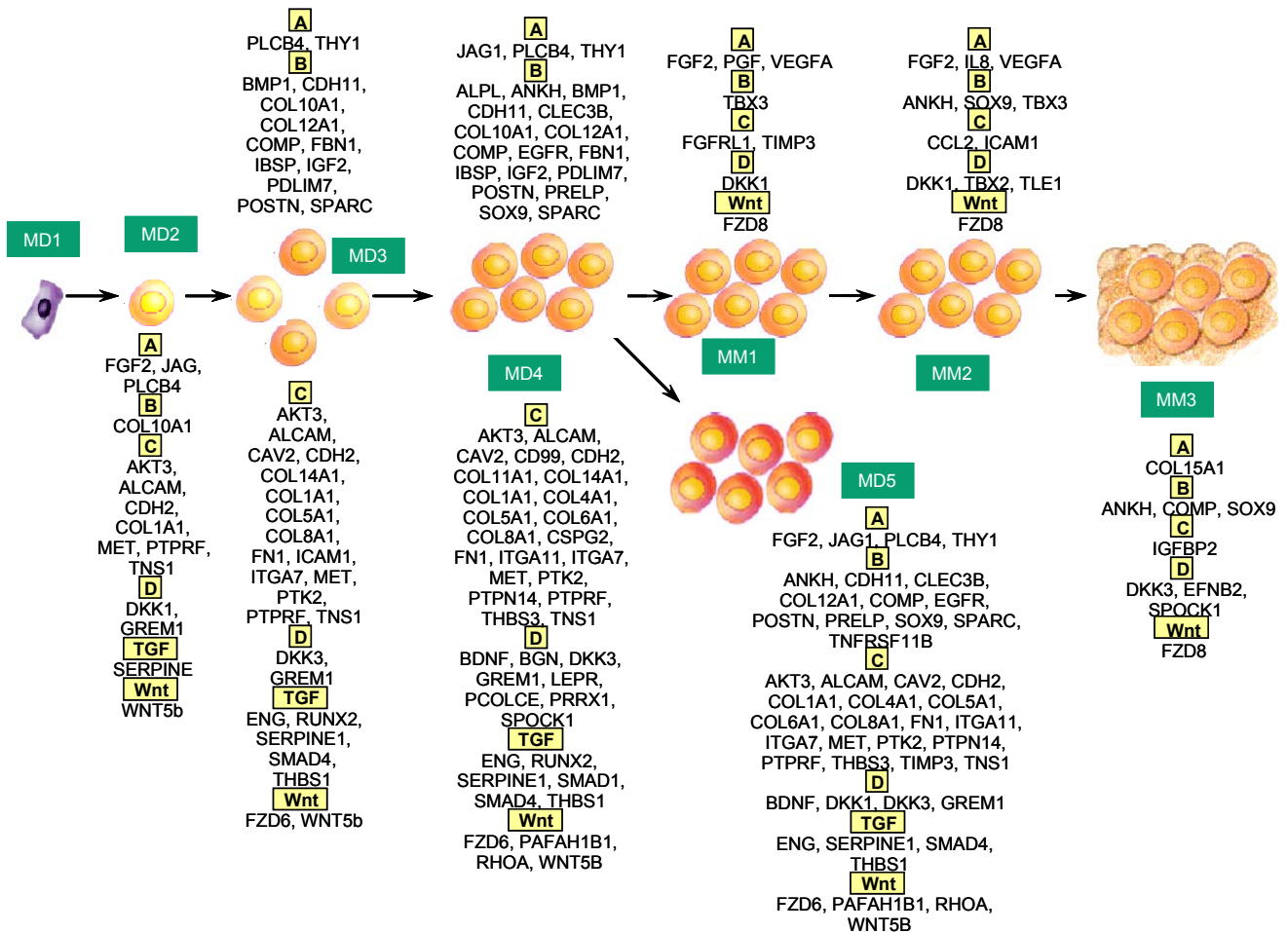


Figura 10. Quadri molecolari correlati alle diverse fasi dei processi di differenziamento e mineralizzazione. A, *angiogenesis*; B, *bone related genes*; C, *cell communication*; D, *development*; TGF, *transforming growth factor-beta signaling*; Wnt, *Wnt signaling pathway*.

I 29 geni validati privi di una chiara correlazione con l'osteogenesi sono stati raggruppati separatamente (Tabella 8). Nonostante di grande interesse scientifico, non sono infatti, al momento, utilizzabili per il monitoraggio dell'attività delle cellule ossee.

Tabella 8. Lista di geni con funzione non ancora conosciuta nelle cellule ossee

| Famiglia | Gene | Gene Symbol | GeneID number* | Fase |
|---------------------------|--|-------------|----------------|------------------------------|
| <i>Angiogenesis</i> | angiopoietin-like 4 | ANGPTL4 | 51129 | MD3, MM2, MM3, |
| “ | chondroitin sulfate proteoglycan 4 (melanoma-associated) | CSPG4 | 1464 | MD2, MD3, MD4, MD5 |
| “ | discs, large homolog 1 (Drosophila) | DLG1 | 1739 | MD2, MD4 |
| “ | ras homolog gene family, member B | RHOB | 388 | MD2, MD4, MD5 |
| <i>Apoptosis</i> | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8 | TNFAIP8 | 25816 | MM2, MM3 |
| <i>Bone related genes</i> | tuftelin 1 | TUFT1 | 7286 | MD2, MD3, MD4, MD5 |
| <i>Cell communication</i> | adhesion molecule with Ig-like domain 2 | AMIGO2 | 347902 | MD2, MD3, MM1 |
| “ | cadherin 13, H-cadherin (heart) | CDH13 | 1012 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | discoidin, CUB and LCCL domain containing 1 | DCBLD1 | 285761 | MD2, MD4 |
| “ | EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 | EDIL3 | 10085 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I) | FEZ1 | 9638 | MD4, MD5, MM2 |
| “ | FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila) | FAT | 2195 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | fibronectin leucine rich transmembrane protein 2 | FLRT2 | 23768 | MD4 |
| “ | fibulin 5 | FBLN5 | 10516 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) | ITGBL1 | 9358 | MD3, MD4, MD5, MM3 |
| “ | microfibrillar-associated protein 4 | MFAP4 | 4239 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | milk fat globule-EGF factor 8 protein | MFGE8 | 4240 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | neurofascin homolog (chicken) | NFASC | 23114 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | neurotrimin | HNT | 50863 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | plakophilin 4 | PKP4 | 8502 | MD2, MD4 |
| “ | pleckstrin homology domain containing, family C (with FERM domain) member 1 | PLEKHC1 | 10979 | MD4 |
| “ | Rho GTPase activating protein 5 | ARHGAP5 | 394 | MD4, MD5, MM2 |
| <i>Development</i> | sema domain, seven thrombospondin repeats), (semaphorin) 5A | SEMA5A | 9037 | MD2, MD3, MD4, MD5, MM2, MM3 |
| “ | H2.0-like homeobox 1 (Drosophila) | HLX1 | 3142 | MM2 |
| “ | Jumonji, AT rich interactive domain 2 | JARID2 | 3720 | MM2, MM3 |
| “ | mab-21-like 2 (C. elegans) | MAB21L2 | 10586 | MD3, MD4, MD5, MM2 |
| “ | scrapie responsive protein 1 | SCRG1 | 11341 | MD4, MD5 |
| “ | sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F | SEMA3F | 6405 | MD3, MD4, MD5 |
| “ | Sine oculis homeobox homolog 1 (Drosophila) | SIX1 | 6495 | MM2, MM3 |

* Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>)

L'attenzione è stata quindi rivolta ai geni *bone related* che presentassero un $FC > 5$ in almeno una fase del differenziamento delle hMSC: è stato verificato se tali geni fossero sovraespressi, regolati negativamente o costantemente espressi nel corso del processo di mineralizzazione rispetto allo stadio basale MD4 (Figura 11). L'analisi ha messo in luce che ALPL, COL12A1 e POSTN subivano una riduzione dell'espressione durante la mineralizzazione, mentre COMP, che risultava progressivamente sovraespresso durante il differenziamento, mostrava un ulteriore picco di espressione in MM3. CLEC3B, COL10A1, FBN1, IBSP, SPARC e TNFRSF11B non mostravano alcun cambiamento, mentre l'espressione di TBX3 aumentava progressivamente in MM1 ed MM2.

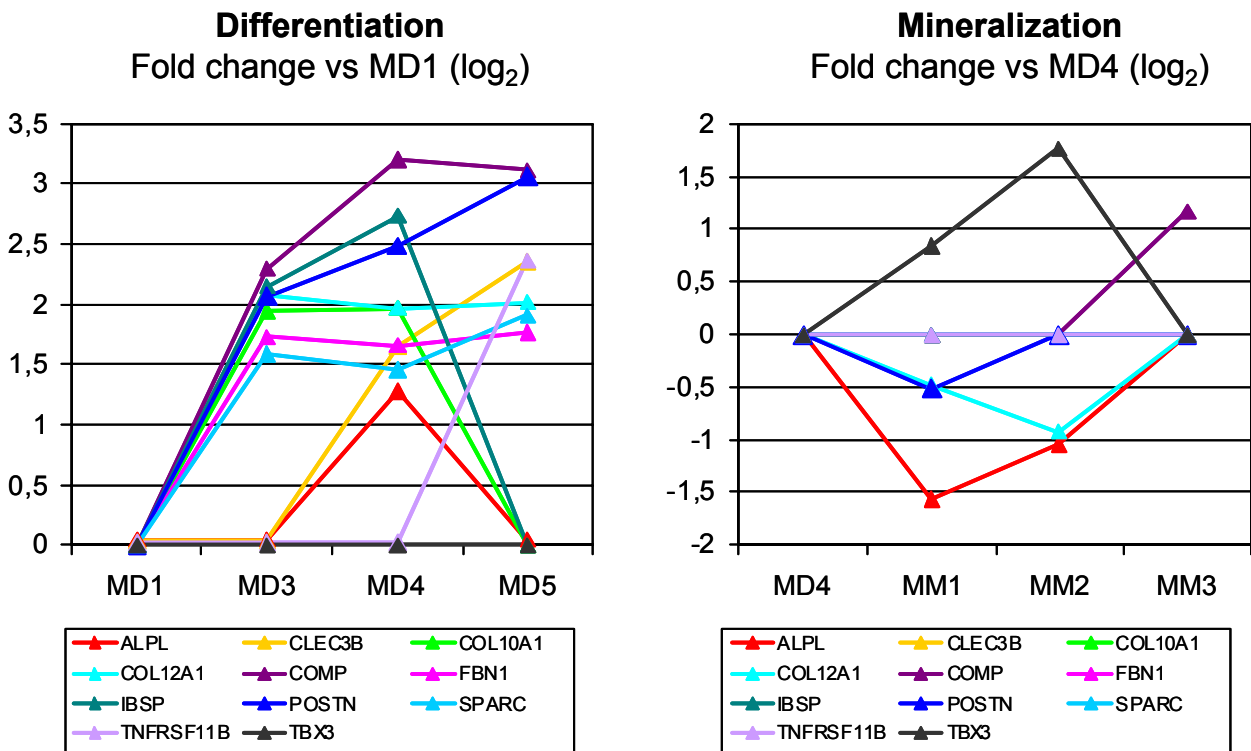


Figura 11. Geni *bone related* con $FC > 5$ in almeno una fase del differenziamento. Modulazione dell'espressione dei geni durante il processo di differenziamento (a sinistra) e mineralizzazione (a destra). I dati sono espressi come media dei FC (trasformazione log₂).

Discussione

Lo scopo del progetto è stato quello di identificare il profilo di espressione genica caratterizzante il differenziamento delle hMSC durante l'espansione *ex vivo*. L'obiettivo finale è quello di sfruttare l'analisi molecolare dell'espressione genica per esplorare una varietà di funzioni delle cellule ossee, che, in diverse circostanze, non possono essere valutate tramite test morfologici, citochimici e biochimici.

Il profilo di espressione genica correlato alle diverse fasi del differenziamento osteogenico delle hMSC è stato analizzato tramite la tecnologia microarray. Allo scopo di confermare la validità dei dati ottenuti nel fornire informazioni sullo stato differenziativo e funzionale delle cellule, i geni selezionati sono stati sottoposti a validazione tramite Real Time PCR quantitativa; inoltre l'acquisizione delle caratteristiche proprie delle cellule ossee, in seguito all'induzione del differenziamento, è stata confermata tramite la caratterizzazione fenotipica delle colture.

Per minimizzare la variabilità dei risultati che si osserva quando colture primarie vengono sottoposte ad analisi microarray, l'espressione genica non è stata analizzata a tempi prestabiliti dello schema sperimentale. L'RNA è stato infatti isolato a tempi corrispondenti agli eventi principali che caratterizzano la maturazione della cellula ossea, sulla base della verifica quotidiana dello stato delle colture.

L'attenzione è stata pertanto focalizzata sui cambiamenti trascrizionali che si verificano nelle cellule mononucleari (hMNC) del midollo osseo, a partire dalla loro adesione alla superficie di coltura (tissue culture polystyrene, TCPS), sino all'acquisizione dei marcatori tipici delle hMSC (immunofenotipo, attività dell'ALP, CFU) e sulle variazioni nell'espressione genica delle hMSC, dalla prima confluenza alla formazione dei noduli di calcio fosfato. Quest'ultimo evento è stato ritenuto l'elemento chiave che ha permesso di associare, con certezza, il profilo trascrizionale ottenuto all'effettivo commissionamento e differenziamento osteogenico delle colture in analisi. Per tale motivo soltanto le colture in grado di depositare noduli minerali nella fase finale sono state incluse nello studio.

Dal momento che le sequenze sovraespresse rappresentavano la maggioranza di tutte le sequenze differenzialmente modulate, sono stati presi in considerazione soltanto i geni da esse rappresentati; in particolare, abbiamo prestato particolare attenzione ai geni appartenenti a pathway o processi biologici che potessero avere un ruolo chiave nella biologia della cellula ossea.^{141,142,143}

I geni coinvolti nei pathway di adesione cellulare sono stati inclusi al fine di analizzare gli eventi molecolari che regolano le comunicazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare (ECM). I pathway delle metalloproteasi forniscono informazioni sull'attività delle cellule ossee nel rimodellamento della ECM. I pathway di interazione citochine-recettori includono appunto tutti i geni modulati da tali molecole di segnalazione. Come ampiamente descritto nell'introduzione (pag 13), i geni del *mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling* sono attivati da una serie di fattori di crescita strettamente connessi all'osteogenesi. Il pathway del *transforming growth factor β (TGF β)* fornisce informazioni sull'azione di diversi membri della superfamiglia del TGF β , incluse le BMP. La segnalazione del *vascular endothelial growth factor (VEGF)* definisce la connessione tra cellule ossee ed angiogenesi. Il Wnt signaling è stato selezionato in quanto ha un ruolo cruciale nel differenziamento delle cellule ossee. Infine, i pathway *cell cycle* e *apoptosis* sono stati analizzati per controllare, rispettivamente, la capacità proliferativa e la sopravvivenza cellulare.

I processi biologici selezionati sono noti per il ruolo centrale nello sviluppo delle cellule ossee e sono, secondo la classificazione Gene Ontology, *skeletal development, ossification, bone mineralization, angiogenesis, cell adhesion, ECM remodeling, TGF- β signaling* e *development/morphogenesis*.^{141,142,143}

I pathway ed i processi biologici di interesse sono stati accorpatisi in funzione dell'affinità biologica in 8 gruppi (o cluster): *angiogenesis, apoptosis, bone related genes, cell communication, cell cycle, development, TGF- β signaling* e *Wnt signaling*.

Per la validazione dei dati microarray è stato analizzato il materiale biologico proveniente da un paziente già esaminato tramite tecnologia microarray ed il materiale di due nuovi individui. Tale approccio è stato intrapreso per superare il limite costituito dalle differenze interindividuali, massimizzando la rilevazione di geni che avessero una reale rilevanza biologica e minimizzando la rilevazione di falsi positivi.

Inoltre è stata eseguita una ricerca bibliografica per verificare il ruolo dei geni selezionati sulla base dell'annotazione GO. La conferma dei risultati dell'analisi microarray ha rappresentato l'ultima fase della generazione di una lista di geni da utilizzare per il monitoraggio ordinario del differenziamento delle hMSC coltivate *in vitro*.

Le informazioni presenti nell'archivio (Figura 9) permettono:

- di scegliere un pannello di geni da esaminare quando si è interessati allo studio di una specifica funzione biologica.

- di ricavare indicazioni sullo stato differenziativo delle colture cellulari, analizzando geni espressi specificamente in determinate fasi del processo di maturazione: alcuni geni sono infatti costantemente sovraespressi, altri vengono modulati positivamente in più di una fase ed altri sono sovraespressi unicamente a tempi specifici.

La maggior parte dei geni selezionati vengono sovraespressi nelle fasi finali del differenziamento delle hMSC ed appartenengono al gruppo *Cell communication*. Tale risultato è piuttosto prevedibile, se si considera che il differenziamento delle hMSC è accompagnato da cambiamenti sostanziali nell'espressione di proteine implicate nella deposizione e nel rimodellamento della ECM.^{141,142,143}

I geni appartenenti al gruppo *Bone related genes* sono prevalentemente sovraespressi durante le fasi intermedia e tardiva del differenziamento e nella fase tardiva della mineralizzazione. Tra di essi, ALPL, COL12A1 e POSTN risultano regolati negativamente durante il processo di mineralizzazione, mentre COMP mostra un ulteriore picco di espressione nella fase in cui si osserva la formazione di noduli minerali (MM3). L'espressione di TBX3 subiva un incremento nelle fasi MM1 e MM2. È importante evidenziare che, ad eccezione di ALPL e nonostante l'importanza biologica e la modulazione dei geni menzionati nel corso della maturazione dei precursori osteogenici, nessuno di essi è ad oggi utilizzato per il monitoraggio e la caratterizzazione delle cellule ossee.

COL12A1 codifica per la catena alfa del collagene di tipo XII, che ha la funzione di modificare le interazioni tra le fibrille di collagene di tipo I e la matrice circostante.¹⁴⁴ POSTN è stato originariamente classificato come fattore osteoblasto-specifico, ma successivamente la sua espressione, anche ad elevati livelli, è stata dimostrata in molti altri tessuti, normali e tumorali.¹⁴⁵ COMP codifica per una proteina non collagenica della ECM che gioca un ruolo fondamentale nell'ossificazione endocrale; è infatti prevalentemente espresso nei condrociti ipertrofici e nell'osso spugnoso che circonda il tessuto in via di sviluppo.¹⁴⁶ L'espressione di TBX3 negli osteoblasti è indotta da BMP7, Wnt3a e dall'ormone della crescita, e la mutazione di tale gene nell'uomo è responsabile della sindrome ulnare-mammaria.¹⁴⁷

La sovraespressione dei geni coinvolti nell'angiogenesi suggerisce che i precursori osteogenici possano avere un ruolo nella vascolarizzazione, ed è in linea con il principio che lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni sia un requisito essenziale per una guarigione ottimale del tessuto osseo.^{148,149,150} L'angiogenesi è regolata da due pathway principali,

una via VEGF-dipendente ed una angiopoietina-dipendente,¹⁵⁰ entrambe rappresentate nella lista di geni generata.

Il gene VEGFA è espresso nelle fasi tardive della mineralizzazione. Inoltre diversi studi hanno dimostrato che le BMP sono in grado di stimolare l'espressione di VEGFA e dei loro recettori, mettendo in luce un'intima interazione tra le due famiglie nel promuovere la formazione di nuovo tessuto osseo.¹⁵¹

Il gene *Angiopoietin-like 4*, membro della famiglia genica angiopoietin/angiopoietin-like, è espresso durante la mineralizzazione, ma il suo ruolo nello sviluppo della cellula ossea non è ancora stato descritto (Tabella 8). La proteina codificata regola i processi di apoptosi/sopravvivenza delle cellule endoteliali ed è indotta dal TGF β attraverso il *signaling* di Smad.¹⁵²

La famiglia del *platelet-derived growth factor* (PDGF) è un membro più marginale del sistema di segnalazione angiogenetico. Come descritto in precedenza, PDGF ha un ruolo nella biologia degli osteoblasti, induce la migrazione e la proliferazione ed è stato descritto come un fattore chiave nel metabolismo osseo.¹⁵³ L'analisi microarray ha mostrato una sovraespressione di PDGF nella fase MM2.

Alla luce di recenti studi sulle analogie e sull'interazione tra sistema nervoso e tessuto osseo, è interessante notare che un elevato numero di geni correlati allo sviluppo del sistema nervoso risulta sovraespresso nelle hMSC; è stato ipotizzato quindi che essi possano essere coinvolti nella formazione di strutture *neuronal-like*.

Il *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), membro della famiglia dei *nerve growth factors*, è necessario per la sopravvivenza dei neuroni nel cervello. Nei nostri esperimenti il gene subiva una sovraespressione nelle fasi terminali del differenziamento. Altri autori hanno descritto un aumento graduale dell'espressione del gene durante la guarigione di ossa fratturate nei topi, suggerendo che la neurotrofina sia coinvolta nella regolazione della formazione dell'osso.¹⁵⁴ Inoltre, l'espressione dei geni coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso potrebbe anche essere correlata alla maturazione degli osteoblasti in osteociti, come mostrato in un recente studio.¹⁵⁵

I geni appartenenti al *signaling* del TGF β sono scarsamente coinvolti nel processo di mineralizzazione, da tale osservazione si deduce che TGF β e BMP siano essenziali per il differenziamento osteoblastico delle hMSC, ma abbiano un effetto trascurabile sulla funzione di precursori ad uno stadio di maturazione più avanzato.

Come ulteriore conferma, mentre i geni correlati all'attivazione del BMP signaling (SMAD1, SMAD4, RUNX2, SERPINE1, FST e THBS1) risultano sovraespressi durante il differenziamento, nelle fasi finali della mineralizzazione si assiste alla sovraespressione di fattori che inibiscono il TGF β signaling, come INHBA e SMAD7.^{132,156} Per di più, Gremlin 1, gene codificante per un antagonista delle BMP, ha presentato il FC più elevato rilevato nella nostra analisi.¹⁵⁷ Nella fase finale del differenziamento la sua espressione era infatti 132 volte maggiore rispetto alle cellule non indotte selezionate per aderenza (MD1).

Tre geni appartenenti al Wnt signaling pathway, WNT5b, FZD6 e FZD8, risultavano modulati in diverse fasi della maturazione delle hMSC, a conferma del coinvolgimento di tale via di segnalazione nel processo di differenziamento.

WNT5b era sovraespresso durante l'intero processo di differenziamento. La proteina da esso codificata è espressa nel pericondrio e dai condrociti pre-ipertrofici e sembra avere un ruolo determinante nell'ossificazione endocrale; alcuni autori hanno inoltre identificato WNT5b negli osteoblasti.^{158,159,160} I recettori Frizzled FZD6 e FZD8 caratterizzano diverse fasi e diversi processi delle colture di hMSC: l'espressione di FZD6 aumenta progressivamente durante il differenziamento, mentre FZD8 è modulato positivamente nel corso della mineralizzazione. I dati in letteratura confermano la sovraespressione di FZD6 nelle hMSC nel corso dell'osteogenesi,¹⁶¹ mentre non sono ancora presenti in letteratura dati relativi all'espressione di FZD8.

L'analisi condotta nel corso di questo studio ha messo in luce un risultato interessante che pone le basi per nuovi progetti futuri: il ruolo di 29 geni significativamente implicati nel differenziamento delle colture analizzate non è ad oggi conosciuto. La ricerca bibliografica, infatti, non ha fornito alcuna informazione relativa alla funzione e/o espressione di tali geni nelle cellule ossee ed inoltre essi non sono rappresentati in alcun pathway correlato al differenziamento osteogenico. L'espressione dei nuovi candidati è stata ampiamente confermata, la validazione tramite qRT-PCR ne ha infatti rilevato la sovraespressione in campioni diversi da quelli sottoposti ad analisi microarray. Pertanto, uno studio più dettagliato, assieme ad un'analisi funzionale di tali geni, darebbe un importante contributo alla comprensione dei meccanismi molecolari che regolano il processo di osteogenesi.

Un esempio interessante è rappresentato dal gene *tuftelin 1* (TUFT1), costantemente espresso durante il differenziamento osteogenico delle colture analizzate. Il database Gene Ontology attribuisce al gene un ruolo nella mineralizzazione, sebbene il

coinvolgimento di TUFT1 sia stato descritto soltanto nell'odontogenesi, in particolare nella mineralizzazione dello smalto dentale. Inoltre dati recenti mostrano che TUFT1 è espresso in diversi tessuti molli non mineralizzati, a conferma della molteplicità dei ruoli, solo parzialmente noti, della proteina.¹⁶² Anche altri geni, correlati alla morfogenesi del dente ed appartenenti alla famiglia delle semaforine, i.e. SEMA3AF, sono differenzialmente espressi durante il differenziamento delle hMSC.¹⁶³

Conclusioni

In questo studio sono state utilizzate hMSC isolate dal canale femorale ed indotte al differenziamento e alla mineralizzazione con l'impiego di modulatori chimici. Pertanto, i risultati dello studio non sono sufficienti a spiegare i meccanismi molecolari che si innescano durante il differenziamento *in vivo*. Nonostante ciò, le hMSC isolate dal midollo osseo ed i metodi descritti sono largamente utilizzati a fini di ricerca.

Lo studio dettagliato dell'evoluzione temporale del profilo di espressione genica ha permesso di definire quali geni sono modulati durante le fasi precoci, intermedie e tardive della maturazione delle hMSC. I risultati ottenuti permettono di monitorare nel tempo il differenziamento cellulare *in vitro* ed analizzare un ampio spettro di funzioni.

Tali opportunità risultano estremamente utili:

- quando le hMSC sono coltivate su scaffold tridimensionali, che limitano le possibilità di eseguire saggi morfologici, biochimici e citochimici, ed in particolare quando lo scaffold è concepito per il rilascio controllato di fattori di crescita che favoriscono la rigenerazione ossea;
- quando si è interessati allo studio del comportamento cellulare in condizioni fisiologiche o in presenza di malattie che coinvolgono il tessuto osseo.

Nei prossimi capitoli sono riportati due progetti indipendenti in cui questo studio ha trovato applicazione: l'analisi di biomateriali per applicazioni protesiche, opportunamente modificati per favorire il differenziamento cellulare e la rigenerazione del tessuto osseo e la valutazione del potenziale osteogenetico di hMSC di pazienti affetti da pseudoartrosi congenita della tibia. Tali studi hanno dimostrato la validità e l'utilità della lista di geni elaborata nell'individuare lo stato differenziativo cellulare, in quanto esiste una correlazione tra l'espressione dei geni selezionati e le caratteristiche fenotipiche rilevate.

Analisi dell'espressione genica di hMSC coltivate su biomateriali per applicazioni protesiche

Obiettivo dello studio

L'analisi dell'espressione genica rappresenta uno strumento utile per monitorare le colture di hMSC e riconoscerne lo stadio differenziativo. Tale opportunità può essere ampiamente sfruttata nell'ambito dell'ingegneria tissutale, quando i precursori osteogenici vengono manipolati ed espansi su *scaffold* concepiti per applicazioni protesiche. Esistono infatti diverse limitazioni alla caratterizzazione cellulare su supporti 3D, poiché le analisi morfologiche, citochimiche e biochimiche generalmente effettuate non possono essere eseguite o possono fornire risultati non attendibili.

Gli *scaffold* per l'ingegneria tissutale dell'osso sono strutture concepite per favorire inizialmente l'attacco, l'adesione e la distensione cellulare, ed in seguito la deposizione di nuovo tessuto osseo, che possa, nel tempo, rimpiazzare l'impianto artificiale. Sebbene il fine ultimo nella progettazione dei biomateriali per gli impianti ortopedici fosse, inizialmente, la caratterizzazione di materiali biologicamente inerti, che non stimolassero la risposta immunitaria dell'ospite, negli ultimi venti anni l'interesse si è spostato dal materiale bioinerte al materiale bioattivo. Un materiale bioattivo ideale come sostituto osseo, deve essere in grado di richiamare gli elementi osteogenici (osteoinduttività) e sostenere la rigenerazione del tessuto (osteconduttività).¹⁶⁴

La bioattività è una proprietà conferita da modifiche strutturali che attivano gli osteoprogenitori, inducendo l'espressione di specifici geni, e promuovono la crescita del tessuto adiacente all'impianto e la formazione di un forte legame tra impianto e tessuto stesso (osteointegrazione).

Tra i diversi polimeri utilizzati per l'ingegneria ossea, l'acido polilattico (PLLA) risulta facilmente modellabile, è soggetto a degradazione controllata e possiede buone caratteristiche di biocompatibilità.¹⁶⁵ L'utilizzo di micro- e nano-paricelle o fibre migliora le caratteristiche meccaniche del polimero e trattamenti che rendono la superficie biomimetica promuovono l'adesione cellulare.

Nel capitolo precedente è stato descritto il metodo applicato per l'elaborazione di un numero consistente di dati di espressione genica, generati tramite analisi microarray. Lo

studio ha portato alla generazione di un archivio contenente tutte le informazioni relative a 213 geni coinvolti nel differenziamento osteoblastico; tale strumento è stato concepito per selezionare un sottogruppo di geni da analizzare quando si è interessati ad un aspetto funzionale specifico della cellula ossea.

La lista di geni utili per il monitoraggio delle hMSC *in vitro* (pag 43), ottenuta selezionando i geni di interesse contenuti nel database, descrive i quadri molecolari correlati al differenziamento, quali attivazione o repressione di pathway osteogenici e non osteogenici, rimodellamento dell'architettura cellulare, adesione, comunicazione cellulare ed assemblaggio della ECM. L'analisi dell'espressione genica è uno strumento molto utile per la caratterizzazione dello stadio differenziativo su supporti 3D anche perchè limitate quantità di cellule sono sufficienti per studiare un ampio spettro di funzioni e proprietà cellulari.

Nel presente capitolo è descritta l'analisi dell'espressione genica di hMSC coltivate su nanocompositi tridimensionali basati su acido polilattico (PLLA) e carbonanotubi¹⁶⁶ con o senza particelle idrossiapatite. È stato inoltre valutato il ruolo della BMP2¹⁶⁷ e del 'plasma treatment'¹⁶⁸ nel promuovere la proliferazione ed il differenziamento delle cellule sui compositi.

Material e metodo

Scaffold tridimensionali (3D)

Gli *scaffold* 3D utilizzati sono compositi costituiti da una matrice porosa di PLLA all'8% e *Single Walled Carbon Nanotubes* all'1% (CNT), addizionati o meno con microidrossiapatite (HA) all'1%. Ad una parte degli scaffold generati contenuti HA, è stata aggiunta BMP2 (100 ng/*scaffold*), ed alcuni sono stati sottoposti a 'plasma treatment' (*plasma enhanced oxygen vapours deposition*).¹⁶⁹

I compositi 3D utilizzati sono elencati di seguito:

PLLA+CNT

PLLA+CNT+ idrossiapatite = PLLA+CNT+HA

PLLA+CNT+HA+BMP2

PLLA+CNT+HA+ 'plasma treatment' = PLLA+CNT+HA+PT

Colture cellulari

I campioni di midollo osseo utilizzati nel presente lavoro provengono da tre pazienti: due uomini (46 e 49 anni), già analizzati nel precedente studio tramite tecnologia microarray (pag. 29), ed una donna (75 anni). I prelievi di midollo sono stati manipolati allo scopo di ottenere colture primarie di hMSC come descritto in precedenza (pag. 29); le cellule mononucleate (hMNC) sono state isolate e congelate fino al momento dell'utilizzo.

Quattro giorni dopo lo scongelamento e la semina, le cellule aderenti (hMSC) sono state sottoposte a digestione con tripsina e seminate sui diversi *scaffold* o su TCPS (Tissue Culture Plastic Surface), in terreno differenziante (desametasone 10^{-8} M), e mantenute in coltura per 14 giorni.

Per analizzare la capacità delle hMSC di deporre noduli minerali, le cellule alla seconda confluenza sono state sottoposte a digestione con tripsina, seminate su supporti di PLLA e coltivate per 7 giorni in terreno mineralizzante contenente β -glicerofosfato.

Estrazione dell'RNA

Al fine di monitorare nel tempo l'espressione genica delle hMSC seminate sui nanocompositi, sono stati scelti i seguenti tempi:

- T0, espressione genica basale delle hMSC aderenti alla superficie di TCPS;
- il quattordicesimo giorno dall'utilizzo del terreno differenziante;
- il settimo giorno dall'utilizzo del terreno mineralizzante (pag. 29).

L'RNA totale è stato isolato a ciascun tempo sperimentale con RNeasy micro- o mini-kit (Qiagen) secondo le istruzioni fornite dal produttore e conservato a -80° . Prima dell'eluizione è stato effettuato un trattamento con DNasi (Qiagen). L'integrità dell'RNA è stata accertata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio; la concentrazione e la purezza sono state determinate spettrofotometricamente (NanoDrop ND-1000).

La retrotrascrizione è stata eseguita utilizzando l'enzima MuLV Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ed i reagenti contenuti nel 'Advantage for RT-PCR Kit' (Clontech, Palo Alto, CA). I cDNA sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

Real Time PCR

La reazione Real time PCR è stata eseguita utilizzando lo strumento Light Cycler ed il sistema Universal ProbeLibrary (Roche Applied Science, Monza, Italy).¹⁷⁰ Nello schema di rilevazione, una sonda 'dual labeled' e sequenza-specifica lega il DNA tra i siti di legame dei primer e genera il segnale solo quando viene prodotto l'amplicone corretto. Nonostante l'utilizzo di sonde sequenza-specifiche, il metodo presenta una buona flessibilità e permette di quantificare il 99% dell'intero trascrittoma. Ciascuna sonda (8-9 nucleotidi) è infatti capace di riconoscere circa 7000 trascritti, la specificità nella rilevazione del messaggero di interesse è garantita dalla scelta dei primer ed è pertanto funzione di tre diversi elementi (coppia di primer e sonda).

Le sonde contengono il fluoroforo reporter FAM all'estremità 5' ed un quencher all'estremità 3' e sono costituite da *locked nucleic acids* (LNA), che garantiscono una maggiore sensibilità e specificità di legame. Il quencher sopprime il segnale fluorescente quando la sonda è intatta. Quando la Taq polimerasi, dotata di attività 5'→3' esonucleasica, idrolizza la sonda ibridata alla sequenza target, il reporter subisce l'*'unquenching'* e si verifica l'emissione di fluorescenza.

Per il design del saggio ottimale è stato utilizzato il software ProbeFinder (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html>), che ha la funzione di: a) individuare le giunzioni esone-esone, in modo da evitare che le quantificazioni vengano alterate dalla presenza di contaminazioni da DNA genomico; b) selezionare la sonda ed i primer adeguati; c) effettuare una PCR in silico; d) classificare i saggi disponibili in funzione della loro qualità.

Il cDNA è stato amplificato in un volume finale di 20 µl, contenenti 4 µl di Master Mix (LightCycler Taqman Master; Roche Applied Science) e concentrazioni variabili di sonda e primer. Prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando i primer selezionati in PCR convenzionale (DNA thermal cycler, GeneAmp 9600, Perkin Elmer, Norwalk, CT) sono stati caricati su gel di agarosio e sottoposti a separazione elettroforetica; le bande corrispondenti all'amplicone specifico sono state purificate tramite QIAEX II Gel extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) e quantificate spettrofotometricamente per creare delle curve standard. Le curve sono state costruite secondo un modello di regressione lineare in cui la variabile indipendente è la concentrazione nota di standard (range di diluizioni log₁₀) e la variabile dipendente è il valore corrispondente del ciclo soglia. In caso di assenza del ciclo soglia, la concentrazione del template è stata considerata uguale a zero. Quando il valore soglia era superiore a 41 (su 45 cicli totali di

amplificazione), la concentrazione di cDNA è stata considerata arbitrariamente un'unità logaritmica inferiore alla più elevata diluizione nella curva standard (*detection limit*).

I *detection limit* dei geni calcolati su 1 µg di cDNA sono indicati in tabella 9.

Il gene housekeeping GAPDH è usato come controllo dell'efficacia della retrotrascrizione e come riferimento di normalizzazione per la quantificazione relativa del gene di interesse. Pertanto, il dato di quantificazione relativa è espresso come ratio tra la concentrazione del gene di interesse e concentrazione di GAPDH.

Tabella 9. Geni analizzati tramite qRT-PCR e *detection limit* del saggio.

| <i>Gene Symbol</i> | <i>Gene</i> | <i>Detection Limit</i> |
|--------------------|--|--------------------------|
| Smad4 | Mothers against decapentaplegic homolog 4 | 6.3×10^{-12} µg |
| Runx2 | Runt-related transcription factor 2 | 2.7×10^{-11} µg |
| Osx | Osterix | 2.7×10^{-11} µg |
| THBS1 | Thrombospondin 1 | 1.5×10^{-12} µg |
| ALPL | Alkaline phosphatase liver/bone/kidney | 2.1×10^{-11} µg |
| IBSP | Bone sialoprotein | 2.7×10^{-13} µg |
| COMP | Cartilage oligomeric matrix protein | 4.2×10^{-12} µg |
| POSTN | Periostin | 2.4×10^{-13} µg |
| SPARC | Osteonectin | 5.6×10^{-13} µg |
| CLEC3B | Tetranectin | 5.7×10^{-13} µg |
| BGLAP | Bone gamma-carboxyglutamate protein (Osteocalcin) | 4×10^{-12} µg |
| COL1a1 | Type 1 collagen, alpha 1 chain | 3.7×10^{-13} µg |
| COL12a1 | Type 12 collagen, alpha 1 chain | 5.6×10^{-12} µg |
| TNFRSF11B | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin) | 3.8×10^{-12} µg |
| FZD8 | frizzled homolog 8 | 4.3×10^{-13} µg |

Analisi dei dati

A causa del numero ridotto dei campioni testati, l'analisi statistica non permette di trarre conclusioni decisive sugli effetti degli scaffold. Al fine di quantificare oggettivamente i risultati ottenuti, è stato utilizzato un sistema di valutazione che prevede l'assegnazione di un punteggio (*score*) ai nanocompositi sulla base delle differenze riscontrate rispetto al controllo (TCPS). Il TCPS rappresenta infatti la condizione standard di coltura, nella quale la capacità delle cellule di generare nuovo osso può essere confermata dall'osservazione dei noduli minerali depositi.

Alle differenze tra i rapporti 'gene di interesse/GAPDH' sono stati attribuiti specifici punteggi secondo i seguenti criteri:

$$3 = \ln(\text{scaffold} - \text{TCPS}) \geq 1.1$$

$$2 = \ln(\text{scaffold} - \text{TCPS}) > 0.9 \text{ e } < 1.1$$

$$1 = \ln(\text{scaffold} - \text{TCPS}) > 0.1 \text{ e } < 0.9$$

$$0 = \ln(\text{scaffold} - \text{TCPS}) < 0.1 \text{ e } > -0.1$$

$$-1 = \ln(\text{scaffold} - \text{TCPS}) < -0.1 \text{ e } > -0.9$$

$$-2 = \ln(\text{scaffold} - \text{TCPS}) < -0.9 \text{ e } > -1.1$$

$$-3 = \ln(\text{scaffold} - \text{TCPS}) \leq -1.1$$

I calcoli effettuati tramite il software 'Microsoft® Excel 2002' hanno permesso di generare una tabella 'pivot' contenente i valori medi del punteggio di ciascun gene (valore medio dei 3 esperimenti con diverse colture), e la somma totale dei punteggi di ciascun materiale durante il differenziamento e la mineralizzazione (somma dei punteggi ottenuti nei singoli esperimenti).

Risultati e discussione

Analisi di espressione genica delle hMSC coltivate su nanocompositi

Il basso numero di cellule ricavate dai nanocompositi non ha permesso di analizzare tramite qRT-PCR tutti i geni selezionati. Per tale ragione, sono stati quantificati soltanto 15 trascritti (Tabella 9), le cui caratteristiche sono state descritte nel capitolo precedente.

Geni correlati al TGF β signaling

I geni appartenenti al TGF β signaling sono stati analizzati soltanto durante le fasi del differenziamento, in quanto la loro sovraespressione è attesa negli stati precoci della maturazione delle hMSC (Figura 12). I livelli di espressione di Smad4 erano simili nelle cellule coltivate sui compositi e su TCPS, ma in alcuni campioni esposti a PLLA+CNT+HA+PT essi erano significativamente maggiori. L'espressione di Runx2 non mostrava differenze nel confronto tra cellule coltivate su TCPS e PLLA+CNT+HA, mentre diminuiva rispetto al controllo quando le cellule erano seminate sugli altri *scaffold*. L'espressione di Osx era fortemente influenzata dalla presenza di BMP, sebbene sia stata riscontrata un'elevata variabilità tra colture provenienti da individui diversi. I livelli di espressione di THBS1, regolatore negativo del TGF β signaling, non erano influenzati dai diversi compositi, sebbene fosse evidente una riduzione del livello dei trascritti in presenza di BMP. La ridotta espressione dell'antagonista del TGF β signaling potrebbe essere interpretata come un segnale osteogenico.

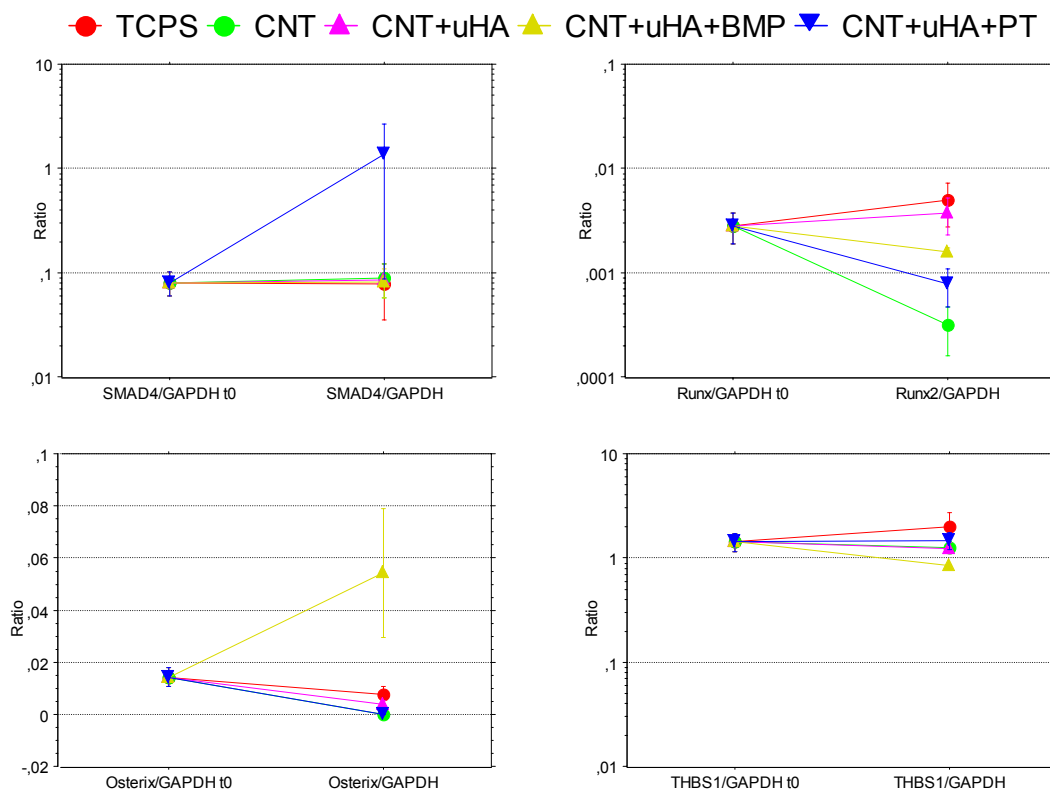


Figura 12. Espressione dei geni appartenenti al TGF β signaling durante il differenziamento di hMSC su compositi basati su PLLA.

Geni bone related

Nelle prime 2 settimane l'espressione di ALPL era simile in colture seminate su TCPS e PLLA+CNT+HA, mentre sugli altri compositi è stata rilevata una riduzione variabile dei trascritti, più evidente in campioni coltivati su PLLA+CNT. Durante la mineralizzazione, tutti gli *scaffold* influivano negativamente sull'espressione di ALPL rispetto al TCPS (Figura 13a).

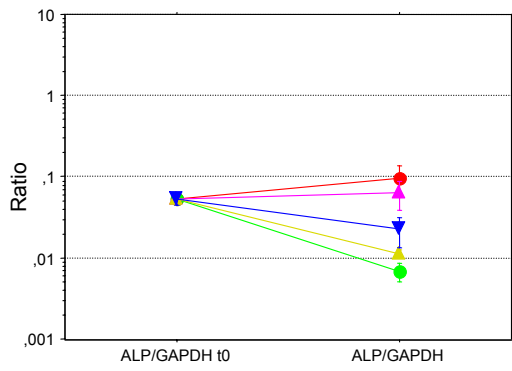
I nanocompositi alteravano l'espressione delle proteine non collageniche (Figura 13b, c, d, e, f, g) durante il processo di differenziamento. Rispetto al TCPS, gli *scaffold* favorivano l'espressione di BGLAP e COMP, mentre inibivano l'espressione di IBSP; SPARC, CLEC3B e POSTN non variavano in maniera significativa. Durante la fase di mineralizzazione, gli effetti dei materiali sulle hMSC erano più facilmente interpretabili. In generale, la presenza di HA aumentava le proprietà pro-osteogenetiche del composito PLLA+CNT, anche se l'espressione delle proteine non collageniche in presenza di PLLA+CNT+HA+BMP era simile a quella delle cellule coltivate su TCPS.

L'espressione di COL1A1 e COL12A1 (Figura 13h, i) diminuiva nelle hMSC coltivate sui nanocompositi sia durante il differenziamento che durante la mineralizzazione, ma l'effetto negativo era meno evidente in presenza di BMP.

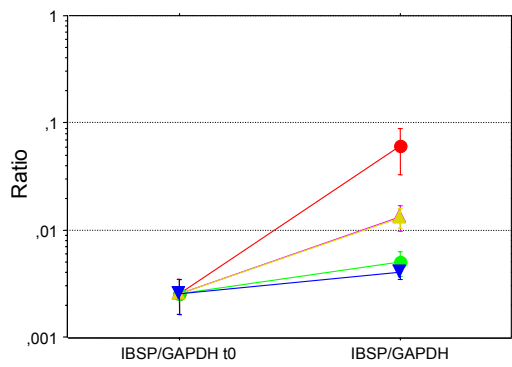
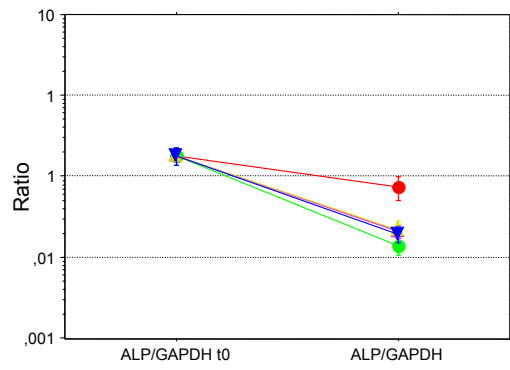
Infine, è stato osservato un lieve aumento dei livelli di TNFRS11B (osteoprotegerina) nelle cellule seminate sugli *scaffold* dopo 14 giorni di coltura, mentre si assisteva ad un decremento durante la fase di mineralizzazione, specialmente in presenza di BMP. In condizioni fisiologiche, TNFRS11B aumenta durante il differenziamento osteoblastico, promuovendo l'azione inibitoria degli osteoblasti maturi sull'osteoclastogenesi.¹⁷¹ Al contrario, durante la mineralizzazione ha inizio il processo inverso, in cui TNFRS11B diminuisce in favore del riassorbimento osseo.

Differenziamento (14giorni)

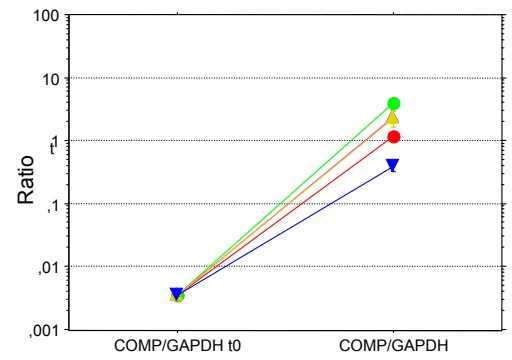
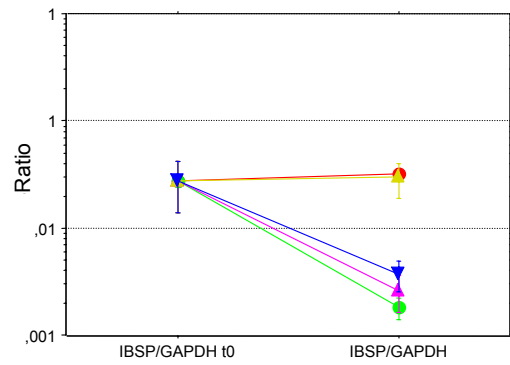
Mineralizzazione (7 giorni)



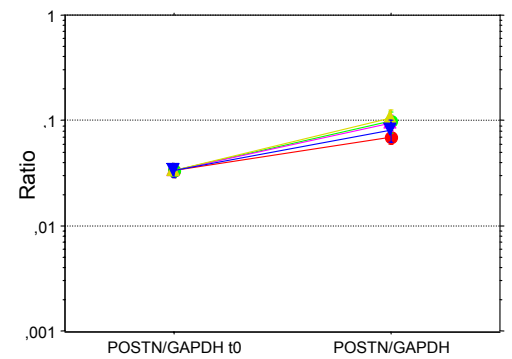
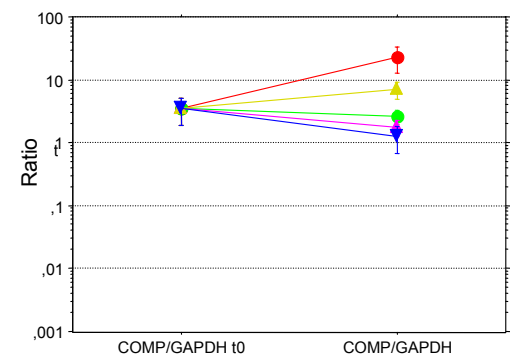
a)



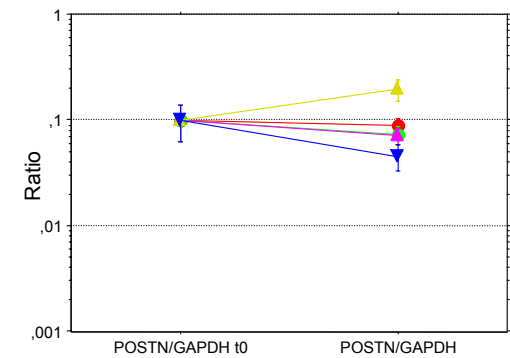
b)



c)



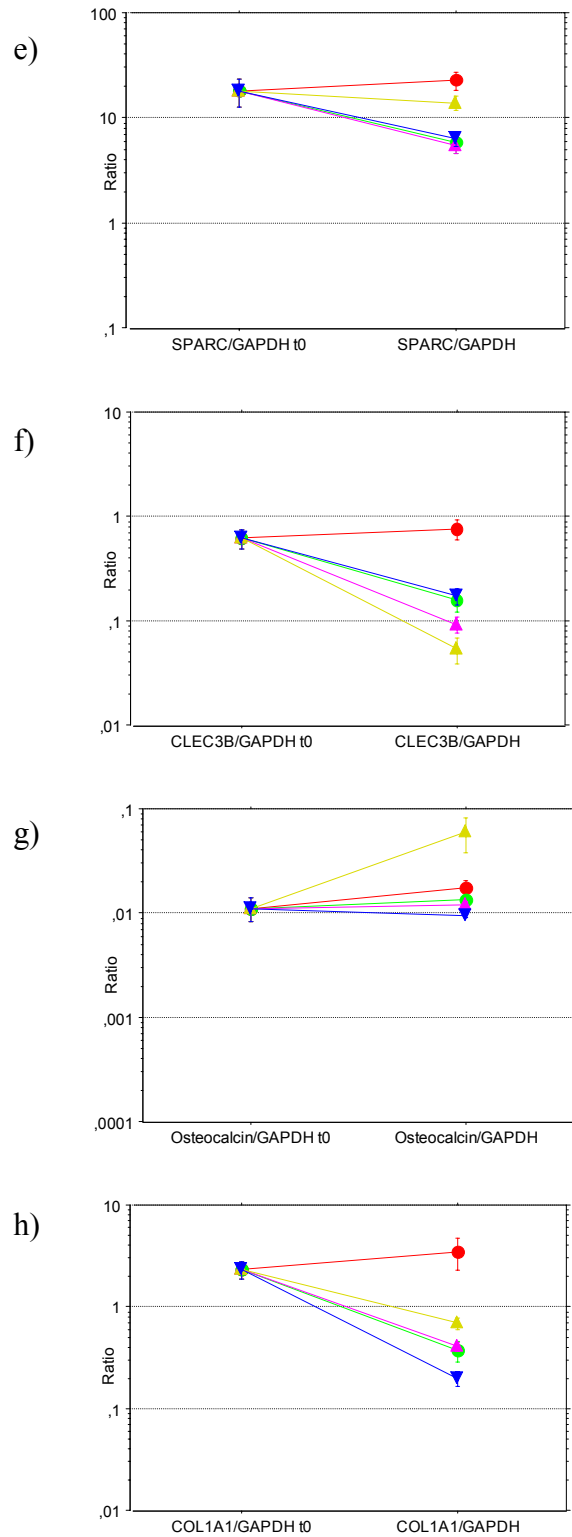
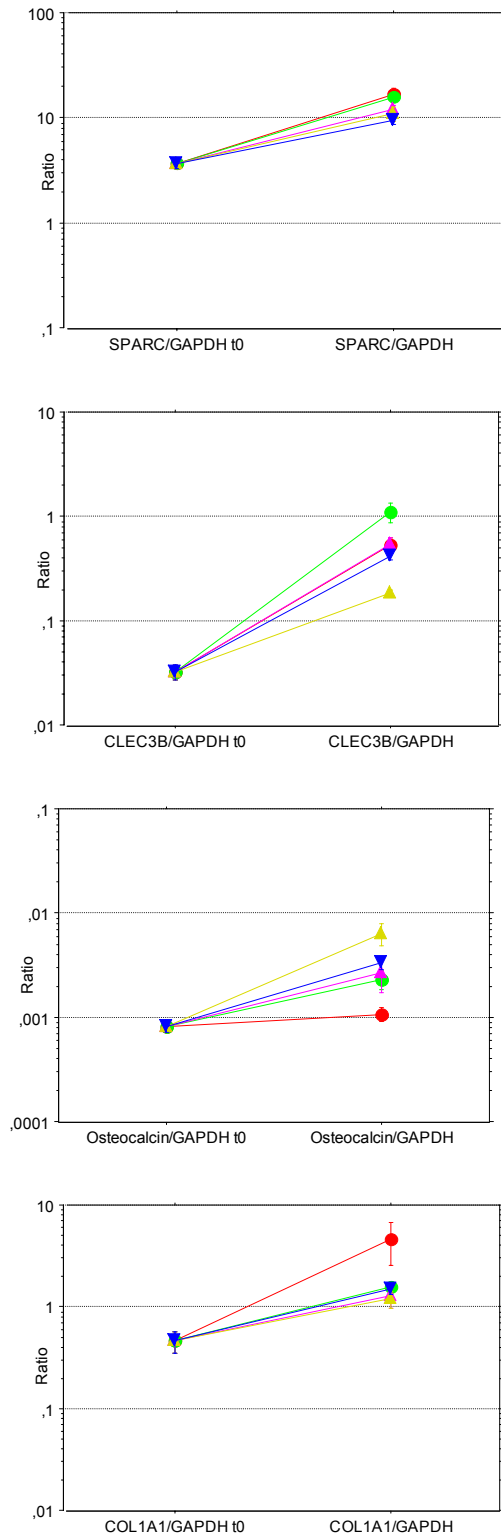
d)



● TCPS ● CNT ▲ CNT+uHA ▲ CNT+uHA+BMP ▼ CNT+uHA+PT

Differenziamento (14giorni)

Mineralizzazione (7 giorni)



● TCPS ● CNT ▲ CNT+uHA ▲ CNT+uHA+BMP ▼ CNT+uHA+PT

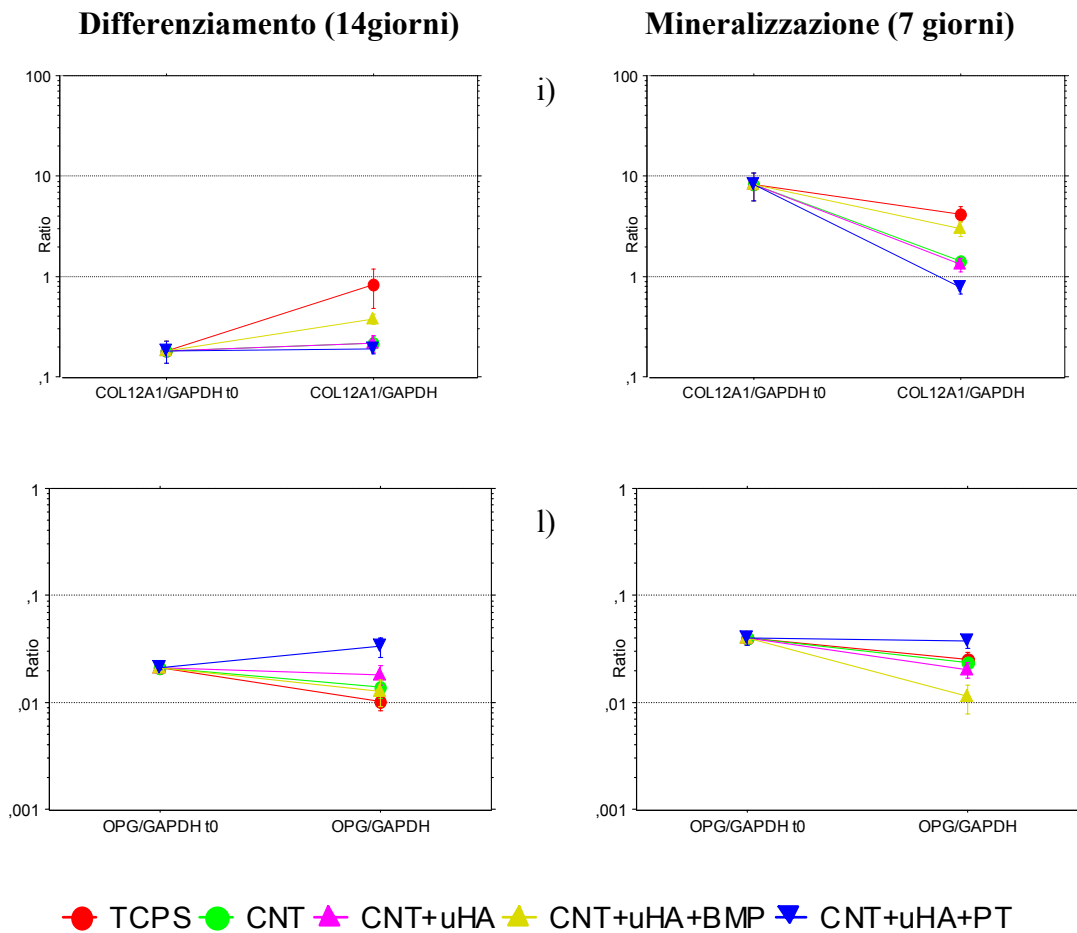


Figura 13. Espressione dei geni *bone related*.

Geni correlati al Wnt signaling

Il pathway canonico di Wnt regola le interazioni cellula-cellula durante l'embriogenesi e ha un ruolo critico nello sviluppo scheletrico e nell'osteogenesi. Esso promuove infatti il differenziamento osteoblastico delle hMSC e ne inibisce il differenziamento in senso condrocitico ed adipocitico.¹⁷² La segnalazione è trasmessa attraverso recettori transmembrana codificati dai geni Frizzled (FZD). Nel capitolo precedente è stato descritto come FZD8 fosse sovraespresso selettivamente nella fase di mineralizzazione, pertanto il gene è stato testato soltanto su cellule esposte ad agenti mineralizzanti. La sovraespressione di FZD8 è stata confermata (Figura 14), e i diversi *scaffold* utilizzati non determinano cambiamenti nell'espressione genica.

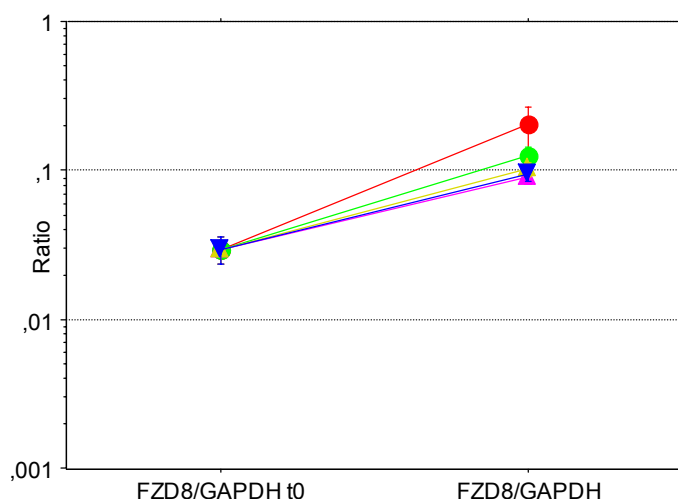


Figura 14. Espressione di FZD8 su hMSC indotte alla mineralizzazione.

Analisi della performance dei nanocompositi

Il valore medio del punteggio di ciascun gene, la somma totale dei valori medi ed i punteggi ottenuti durante il differenziamento e la mineralizzazione sono mostrati nella tabella 10.

Lo *scaffold* PLLA+CNT+HA+BMP presentava il punteggio totale migliore, seguito da PLLA+CNT+HA e PLLA+CNT+HA+PT, con valori simili, ed infine da PLLA+CNT. Sebbene non siano state osservate differenze rilevanti dopo 14 giorni di coltura, la condizione PLLA+CNT+HA+BMP in mineralizzazione mostrava il punteggio totale maggiore.

Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti quando lo ‘score di differenziamento’ e lo ‘score di mineralizzazione’ sono stati calcolati sommando i valori ottenuti nei singoli esperimenti con ciascun campione di hMSC (Figura 15). Lo scaffold PLLA+CNT+HA+BMP presentava in mineralizzazione un punteggio totale significativamente maggiore rispetto a PLLA+CNT e PLLA+CNT+HA (Wilcoxon test, $p= 0.005$ e $p= 0.017$, rispettivamente), mentre non sono state riscontrate differenze significative rispetto a PLLA+CNT+HA+PT ($p= 0.17$).

Tabella 10. Punteggio ottenuto per ciascun gene nei processi di differenziamento e mineralizzazione. Valore medio di 3 esperimenti con diverse colture di hMSC.

| Process | Gene | PLLA+CNT | PLLA+CNT+HA | PLLA+CNT+HA+BMP | PLLA+CNT+HA+PT |
|------------------------------|----------|---------------|---------------|-----------------|----------------|
| Differentiation | | | | | |
| | ALP | -2,00 | 0,00 | -1,33 | -1,33 |
| | BGLAP | 0,67 | 0,33 | 1,33 | 1,00 |
| | CLEC3B | 0,33 | -0,33 | -0,33 | -0,33 |
| | COL12A1 | -0,33 | -0,33 | 0,33 | -0,67 |
| | COL1A1 | 0,33 | 0,33 | -0,33 | 0,33 |
| | COMP | 1,33 | 0,33 | 0,00 | -0,33 |
| | IBSP | -0,33 | -0,33 | 0,00 | -0,67 |
| | Osx | -2,00 | -0,67 | -0,33 | -2,00 |
| | POSTN | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,00 |
| | RUNX2 | -2,67 | 0,33 | 0,67 | -0,67 |
| | Smad4 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 1,00 |
| | SPARC | 0,00 | -0,33 | -0,33 | -0,33 |
| | THS1 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,33 |
| | TNFRS11B | 0,33 | 0,33 | -0,33 | 1,00 |
| Differentiation Score | | -3,67 | 0,67 | 0,33 | -2,67 |
| Mineralization | | | | | |
| | ALP | -1,67 | -0,67 | -1,67 | -1,00 |
| | BGLAP | -0,33 | -0,33 | 0,67 | -0,33 |
| | CLEC3B | -1,00 | -1,33 | -1,67 | -0,67 |
| | COL12A1 | -1,00 | -1,00 | -0,33 | -1,00 |
| | COL1A1 | -1,67 | -1,33 | -1,00 | -1,33 |
| | COMP | -2,00 | -1,67 | -0,33 | -2,00 |
| | FZD8 | 0,33 | -0,67 | -0,33 | -0,33 |
| | IBSP | -2,00 | -2,00 | -0,33 | -1,67 |
| | POSTN | -0,33 | -0,67 | 1,00 | -1,00 |
| | SPARC | -1,33 | -1,00 | -0,33 | -1,00 |
| | TNFRS11B | -0,33 | -1,00 | -1,00 | 1,00 |
| Mineralization Score | | -11,33 | -11,67 | -5,33 | -9,33 |
| Total score | | -15,00 | -11,00 | -5,00 | -12,00 |

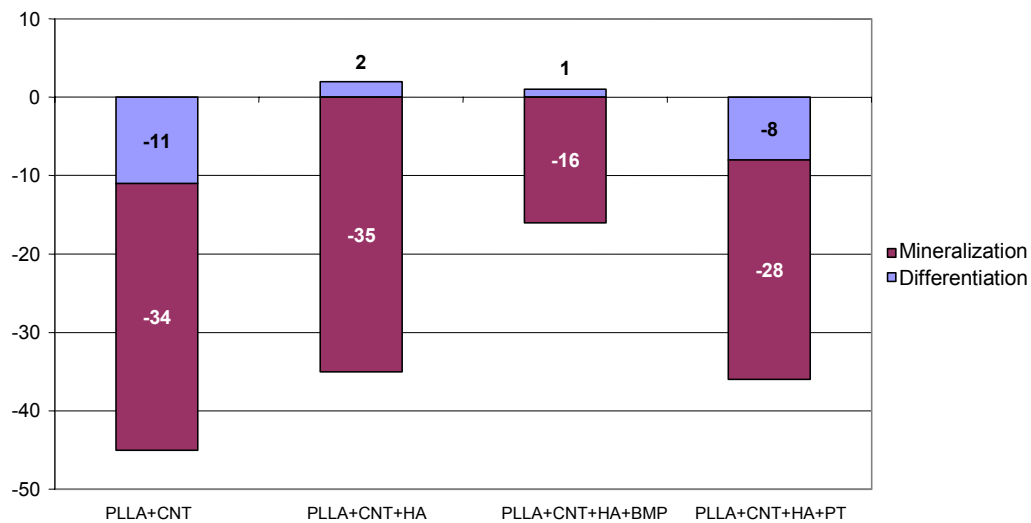


Figura 15. Somma totale dei punteggi di ciascun materiale durante il differenziamento e la mineralizzazione (somma dei punteggi ottenuti nei singoli esperimenti).

Conclusioni

Nello studio descritto è stata valutata l'espressione dei geni coinvolti nell'osteogenesi in hMSC coltivate su *scaffold* concepiti per applicazioni protesiche.

La presenza di HA migliora le proprietà dei compositi PLLA+CNT, sebbene, in termini di capacità di formazione ossea *in vitro*, la presenza della BMP2 fornisca i risultati più incoraggianti, in quanto favorisce la deposizione di matrice extracellulare e promuove il processo di mineralizzazione.

Attraverso l'analisi dell'espressione genica è stato possibile ottenere informazioni rilevanti circa le proprietà osteoinduttive di questi *scaffold*, superando i limiti che potevano emergere applicando metodi di *screening* più convenzionali.

Valutazione del potenziale osteogenetico di hMSC in pazienti affetti da pseudoartrosi congenita della tibia¹⁷³

Introduzione

La pseudoartrosi congenita della tibia (CPT) è una malattia rara, caratterizzata da fratture spontanee che consolidano con difficoltà o non consolidano affatto. I trattamenti chirurgici sono mirati ad ottenere e mantenere l'unione ossea, minimizzandone la deformazione, ed includono la fissazione con mezzi di sintesi endomidollari, l'uso di innesti ossei o, più recentemente, la somministrazione locale di fattori pro-osteogenetici, come BMP.¹⁷⁴

Nonostante ciò, questi trattamenti non sono sufficienti a guarire la lesione e a causa di ripetute recidive si rende necessaria l'amputazione della zona interessata.

I sintomi della CPT sono evidenti già nei primi anni di vita e, in più del 50% dei casi, la malattia si associa alla neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), uno dei disordini ereditari più comuni. Nell'infanzia, la neurofibromatosi si manifesta con diverse anomalie dello sviluppo osseo e circa il 5% dei bambini affetti presenta fratture delle ossa lunghe e conseguente CPT.^{175,176} Attualmente sono in fase di sviluppo nuove strategie di terapia cellulare basate sull'utilizzo delle hMSC,¹⁷⁷ che rappresentano una risorsa accessibile di precursori osteogenici e sembrano avere un ruolo determinante nella riparazione e rigenerazione ossea. Sebbene le hMSC possano essere ottenute dal midollo osseo della cresta iliaca di ogni paziente, e tale approccio sia già utilizzato come adiuvante nei trapianti ossei,^{178,179} il loro utilizzo in pazienti affetti da CPT è stato riportato in casi isolati.^{180,181,182} Recentemente Leskelä et al.¹⁸³ hanno caratterizzato colture di hMSC derivate dalla cresta iliaca e dal sito della lesione di tre pazienti affetti da CPT associata a NF1. Il loro studio ha mostrato che il potenziale osteogenetico delle hMSC della cresta iliaca era maggiore rispetto a quello della lesione, suggerendo che il trapianto autologo di tali cellule potrebbe essere un mezzo efficace per il trattamento di CPT refrattarie. Nonostante ciò, è molto importante verificare l'effetto del microambiente sul potenziale osteogenetico delle cellule trapiantate, poiché esso potrebbe influenzare l'impianto ed il differenziamento cellulare, limitando l'utilità della strategia. In tale contesto si inserisce lo studio descritto in questo capitolo, nel quale ci si è proposti di

stabilire le basi biologiche per l'utilizzo delle hMSC del midollo osseo nel trattamento della CPT.

La ricerca è stata impostata tenendo in considerazione che la guarigione del tessuto osseo dipende principalmente dal potenziale osteogenetico delle cellule residenti, sebbene diversi fattori possano avere un ruolo determinante nel ripristinare la normale struttura ossea. Sono state analizzate hMSC ottenute da aspirati midollari di pazienti affetti da CPT, associata o meno a NF1, e di individui che non presentavano la malattia. Le caratteristiche biochimiche, funzionali e molecolari delle colture, nelle fasi precoci e tardive del differenziamento,^{128,184} sono state esaminate al fine di comprendere se il sito di origine (lesione o cresta iliaca) e la presenza di NF1 potessero influenzare le proprietà osteogenetiche delle hMSC. Inoltre, si è valutato se il differenziamento osteoblastico delle hMSC trapiantate fosse condizionato dall'utilizzo del siero autologo o dal microambiente circostante.

Pazienti e metodo

Pazienti

Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli, ed i genitori dei 17 pazienti arruolati hanno autorizzato l'utilizzo del materiale biologico per fini di ricerca.

Sono stati reclutati 13 pazienti affetti da CPT, di cui 7 presentavano anche NF1 (CPT_NF1+; 6 maschi ed 1 femmina, età 7 mesi-18 anni), mentre 6 non manifestavano NF1 (CPT_NF1-; 4 maschi e 2 femmine, età 2,5-18 anni). La diagnosi di CPT è stata stabilita su basi cliniche e radiografiche. In tutti i pazienti la malattia si era instaurata in seguito a frattura.¹⁷⁴

La diagnosi di NF1 è stata effettuata sulla base dei criteri della 'Health Consensus Development Conference on Neurofibromatosis'.¹⁸⁵

Nove pazienti (5NF1+, 4 NF1-) erano stati sottoposti ad un precedente intervento chirurgico finalizzato ad ottenere il consolidamento definitivo, 4 pazienti (2 NF1+, 2 NF1-) avevano subito due operazioni.

L'analisi istologica delle lesioni ha evidenziato la presenza di tessuto fibrosclerotico in 7 pazienti (5 NF1+, 3 NF1-) e di aree atrofiche in 6 pazienti (2 NF1+, 4 NF1-).

Il gruppo di controllo comprendeva bambini sottoposti a chirurgia elettiva per displasia congenita dell'anca in assenza di malattie coesistenti (No CPT; 4 pazienti, 3 maschi ed una femmina, età 3,3-10 anni).

Colture cellulari

Colture di hMSC

Gli aspirati midollari sono stati ottenuti dalla porzione della tibia adiacente al sito della lesione (P) e dalla cresta iliaca (IC). Inoltre è stato effettuato un prelievo di sangue venoso periferico (7 ml) su ciascun paziente, per ricavare il siero autologo (AUT) utilizzato per le colture cellulari.

Il midollo è stato processato come descritto in precedenza (pag. 29). Un'aliquota di hMNC è stata conservata in azoto liquido per poi essere utilizzata negli esperimenti di co-cultura. Le hMNC sono state mantenute in α -MEM (Sigma Aldrich) addizionato di FCS o siero autologo al 10%, penicillina 100 U/mL, streptomicina 0,1 mg/mL e acido ascorbico 2-fosfato 100 mM (Sigma Aldrich). Dopo quattro giorni è stato aggiunto terreno differenziante (pag. 29) alle colture di hMSC, e i successivi cambi di terreno sono stati effettuati 2 volte a settimana sino alla prima confluenza (T1). La citometria a flusso ha confermato che le cellule confluenti analizzate presentavano il fenotipo proprio delle hMSC (pag. 30).¹⁸ Dopo la seconda confluenza (M1) è stato aggiunto alla coltura il terreno mineralizzante (pag. 29) e la presenza di noduli minerali è stata valutata dopo 14 giorni (M2).

Colture di osteoblasti (OB)

I frammenti ossei sono stati prelevati dal tessuto adiacente al sito dell'intervento nei pazienti e nel gruppo controllo. I tessuti molli sono stati rimossi utilizzando uno scalpello sterile e l'osso trabecolare è stato frammentato e lavato diverse volte con PBS. I frammenti sono stati posti in fiasche contenenti D-MEM (Sigma Aldrich) addizionato di FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/mL e streptomicina 0,1 mg/mL. Le fiasche sono state mantenute in incubatore (atmosfera umidificata, 37°C, 5% CO₂) ed il terreno è stato cambiato due volte alla settimana a partire dal quarto giorno dopo la semina.

Gli osteoblasti (OB) diffondevano dai frammenti alla superficie di TCPS dopo 7-10 giorni e raggiungevano la confluenza in 3-4 settimane. Il fenotipo osteoblastico è stato

confermato dall'osservazione dei noduli minerali in seguito all'aggiunta del terreno mineralizzante.

Alla prima confluenza il sovrinatante è stato rimosso dalle fiasche e conservato a -20°C fino all'esecuzione degli esperimenti di co-cultura.

Co-culture

Le MNC della cresta iliaca sono state scongelate, lavate con PBS e seminate alla densità di $250.000/\text{cm}^2$ utilizzando terreno differenziante. Allo scopo di analizzare l'attività paracrina degli OB sulle hMSC della cresta iliaca (IC-MS), dopo 4 giorni di coltura (T0) il terreno è stato sostituito con il *conditioned medium* (OB-CM), contenente un volume pari al 50% del sovrinatante degli OB autologhi (ossia costituito da terreno differenziante e sovrinatante degli OB autologhi in proporzione 1:1).

Sono state utilizzate due colture di controllo:

1. DM100%: IC-MS mantenute in terreno differenziante (DM) per controllare il potenziale osteogenico delle cellule in seguito allo scongelamento.
2. DM50%: IC-MS mantenute in un medium costituito per il 50% da terreno D-MEM invecchiato, ossia posto in incubatore per 72 ore e conservato a -20°C fino al momento dell'uso. Tale condizione è utile per il controllo dell'effetto del terreno parzialmente esausto derivante dalle colture di OB.

Il terreno (OB-CM, DM100%, DM50%) è stato cambiato due volte alla settimana, al raggiungimento della seconda confluenza è stato aggiunto β -glicerofosfato 10mM per indurre la formazione di noduli minerali.

Caratterizzazione delle proprietà osteogeniche delle cellule

La proliferazione e la vitalità cellulare sono state valutate alla prima confluenza (T1) tramite AlamarBlue test (pag. 30).

L'abilità clonogenica dei precursori osteogenici è stata analizzata tramite il test delle CFU in seguito a colorazione con cristal violetto (0,25% in metanolo 20% per 10 min a temperatura ambiente) e l'analisi citochimica della fosfatasi alcalina è stata effettuata direttamente sui pozzetti delle CFU utilizzando il kit commerciale menzionato in precedenza (pag. 30). I pozzetti sono stati osservati al microscopio e le CFU (aggregati di almeno 50 cellule) ALP-positive e ALP-negative sono state contate utilizzando una griglia di conta specifica. È stato calcolato il numero medio di CFU in

quattro campi non sovrapposti della zona centrale del pozzetto, ed il numero totale di colonie è stato ottenuto moltiplicando il valore medio di CFU/cm² per l'area del pozzetto.¹³³

La valutazione funzionale delle proprietà osteogeniche delle hMSC e degli OB è stata completata 14 giorni dopo l'esposizione al terreno mineralizzante (M1). Per la visualizzazione delle aree di mineralizzazione della matrice, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3,7% per 15 min e sottoposte a colorazione con Alizarin Red dye (30 min a temperatura ambiente); la deposizione dei noduli minerali è stata valutata in duplicato contando il numero totale di aggregati di calcio fosfato.

Per la caratterizzazione delle IC-MSC coltivate in presenza di OB-CM nel sistema di co-coltura sono stati eseguiti saggi aggiuntivi: sono stati valutati i cambiamenti nell'attività dell'ALP dallo stato di semiconfluenza (T^{1/2}) allo stato di confluenza (T1) ed è stato quantificato il contenuto di calcio ai tempi M1 ed M2 (pag. 30).

L'espressione dei geni utili per il monitoraggio delle hMSC indotte al differenziamento osteoblastico è stata studiata ai time point T0 e T1 (Tabella 11). L'RNA è stato estratto tramite RNeasy mini kit (Qiagen) e la retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando l'enzima MuLV Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). La reazione Real time PCR è stata eseguita su 1 µg di cDNA totale con lo strumento Light Cycler ed il sistema Universal ProbeLibrary (pag 59).

I *detection limit* dei geni coinvolti nel differenziamento osteoblastico ed i primer utilizzati sono elencati in tabella 11. Il gene housekeeping GAPDH è usato come controllo dell'efficacia della trascrizione inversa e come riferimento di normalizzazione per la quantificazione relativa del gene di interesse.

Tabella 11 . Primer impiegati per la valutazione dell'espressione genica e *detection limit* dei geni analizzati.

| <i>Gene, Gene Symbol, reference number NCBI</i> | | <i>Sequenza dei primer (5'-3')</i> | <i>Sonda</i> | <i>Detection limit (μg)</i> |
|---|--------------------|---|--------------|-----------------------------|
| Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (NM_002046.3) | Senso Antisenso | agccacatcgctcagacac gccaatacagaccaaacc | #60 | 3e-12 |
| Alkaline phosphatase (ALPL) (NM_000478.3) | Senso Antisenso | gggtcagctccaccacaa gcattggtgtgtacgtcttg | #52 | 2.1e-11 |
| Osteocalcin (BGLAP) (NM_199173.2) | Senso Antisenso | ggcgctacctgtatcaatgg tcagccaactcgtcacagtc | #1 | 4e-12 |
| Type 1 collagen, alpha 1 chain (COL1A1) (NM_000088.3) | Senso Antisenso | cccctggaaagaatggagat aatcctcgagcaccctga | #60 | 3.7e-13 |
| Bone sialoprotein (IBSP) (NM_004967.2) | Senso Antisenso | cgaagaaaatggagatgacagtt cttcattgttttctccttcatttg | #35 | 2.7e-13 |
| Runt-related transcription factor 2 (Runx2) (NM_001024630.2, NM_004348.3) | Senso Antisenso | gtgcctaggcgcatttca cacctgcctggcttcttctta | #87 | 2.7e-11 |
| Osteonectin (SPARC) (NM_003118.2) | Senso Antisenso | accgcgttttcgagacc caagatcctgtcgatccttet | #85 | 5.6e-13 |

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata tramite il software StatView 5.01 per Windows (SAS Institute Inc, Cary, NC). I dati relativi a sette pazienti CPT-NF1+, cinque CPT-NF1- e quattro No CPT, sono stati espressi come media \pm errore standard (SEM).

Abbiamo ipotizzato che le proprietà osteogeniche delle hMSC potessero essere influenzate da variabili indipendenti multiple quali la condizione dei bambini (NoCPT, CPT_NF1-, CPT_NF1+), il sito di origine delle cellule (IC-MSC, P-MSC) ed il siero utilizzato (AUT, FBS). Per rilevare gli effetti delle variabili indipendenti sui dati quantitativi è stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA); le differenze tra i gruppi sono state analizzate tramite il test *post hoc* di Bonferroni-Dunn.

Per confrontare gli effetti di DM100%, DM50% e OB-CM nel sistema di co-cultura è stata eseguita un'analisi per dati appaiati.

Risultati

Potenziale osteogenetico delle hMSC in pazienti affetti da pseudoartrosi congenita della tibia

Le hMSC ottenute dalla cresta iliaca (IC-MSC) dei pazienti affetti da pseudoartrosi congenita avevano un potenziale osteogenetico maggiore rispetto alle hMSC ottenute dalla lesione (P-MSC), ma mostravano comunque proprietà osteogenetiche ridotte rispetto alle IC-MSC del gruppo di controllo.

È stato possibile ottenere colture di osteoblasti (OB) e di hMSC da 16 su 17 pazienti arruolati nello studio; un paziente CPT_NF1- è stato escluso a causa della ridotta quantità di aspirato midollare, che non ha permesso di ottenere un numero sufficiente di cellule per eseguire i test pianificati.

Gli elevati livelli di CD44, CD90, CD105, CD166 (>90%, dati non mostrati) hanno confermato che la popolazione cellulare era arricchita di hMSC multipotenti.

Il sito di origine delle cellule condizionava le proprietà osteogenetiche delle hMSC (p value ANOVA: AlamarBlue test 0.0001; CFU 0.008; CFU ALP-positive 0.05; noduli minerali 0.01). In entrambi i gruppi CPT (NF1+ e NF1-) le IC-MSC, coltivate in presenza di FBS, presentavano un'attività metabolica (AlamarBlue test) ed una capacità di deporre noduli minerali significativamente maggiori rispetto alle P-MSC (Figura 16a, d). Per di più, le IC-MSC hanno generato un numero maggiore di CFU e di CFU ALP-positive, sebbene differenze significative siano state osservate soltanto in pazienti NF1- (Figure 16b, c).

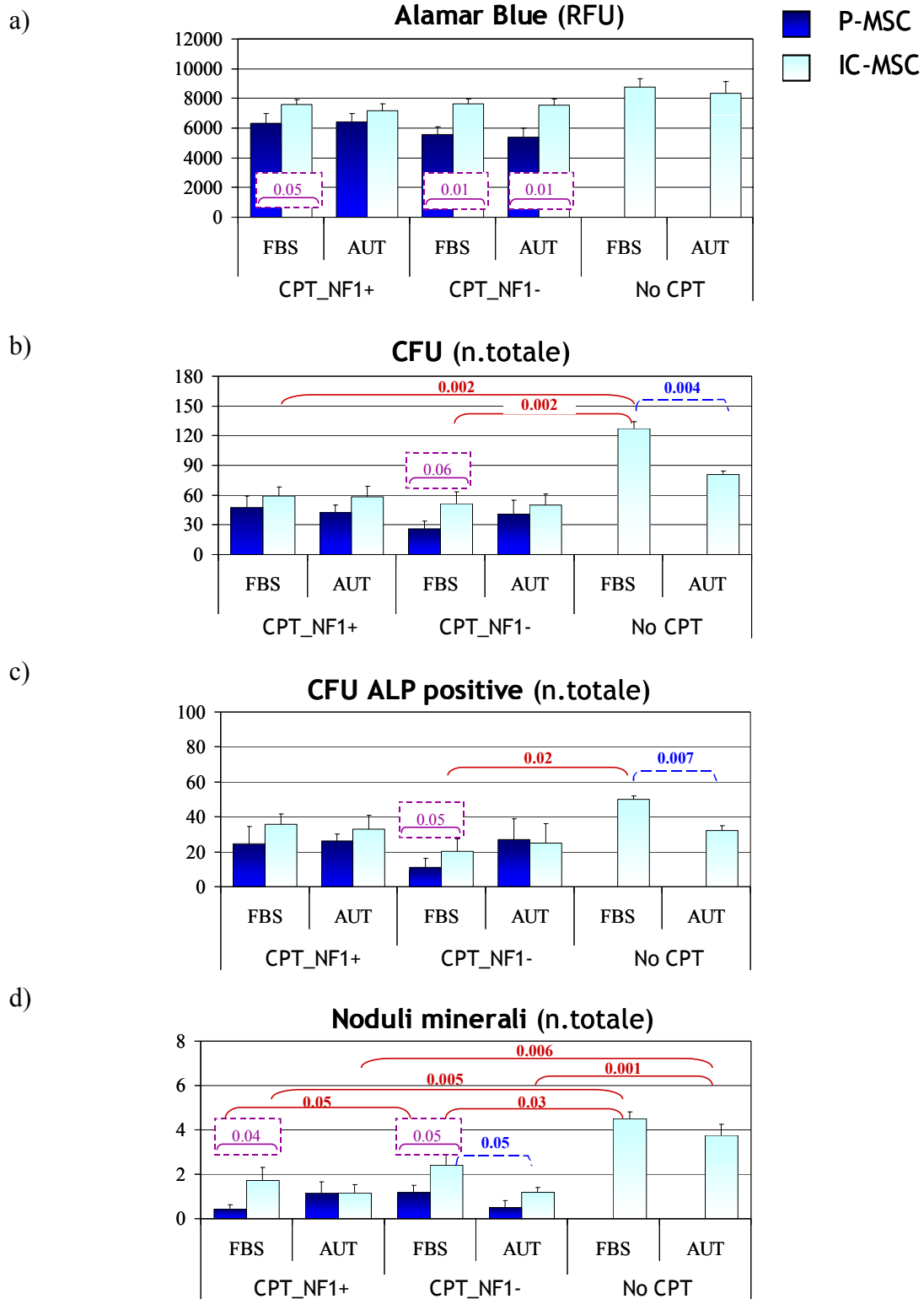


Figura 16. Proprietà osteogenetiche di P-MSC e IC-MSC, provenienti da pazienti No CPT, CPT_NF1+ e CPT_NF1-, mantenute in siero autologo (AUT) o FBS: AlamarBlue test (a), CFU colorate con cristal violetto (b) o ALP citochimica (c), numero totale di noduli minerali (d). Le differenze significative dovute alla condizione dei pazienti sono evidenziate da una linea, quelle dovute al sito di origine delle hMSC da una casella tratteggiata e quelle dovute al siero utilizzato da una linea tratteggiata.

Sono emerse alcune differenze significative in funzione della presenza della neurofibromatosi: il numero di noduli minerali osservabili nelle colture di P-MSC era significativamente maggiore nel gruppo NF1- rispetto al gruppo NF1+.

Il potenziale osteogenico delle hMSC prelevate in prossimità del sito della lesione non era influenzato nè dall'istologia della pseudoartrosi nè dall'età dei pazienti (dati non mostrati).

La variabile che influenzava maggiormente le proprietà osteogenetiche delle IC-MSC era la condizione dei bambini (p value: CFU 0.002; CFU ALP-positive 0.06; noduli minerali <0.0001). Nonostante non vi fossero differenze consistenti nella vitalità e nella proliferazione cellulare (Figura 16a), il gruppo di controllo presentava capacità differenziative maggiori dei gruppi CPT (Figure 16 b-d). In particolare, il numero di CFU e di noduli minerali era significativamente minore in entrambi i gruppi CPT, mentre si osservava una riduzione significativa nel numero di CFU ALP-positive soltanto nel gruppo CPT_NF1-. Le immagini in Figura 17 illustrano le differenze morfologiche esistenti tra i gruppi con pseudoartrosi congenita della tibia e gli individui non affetti.

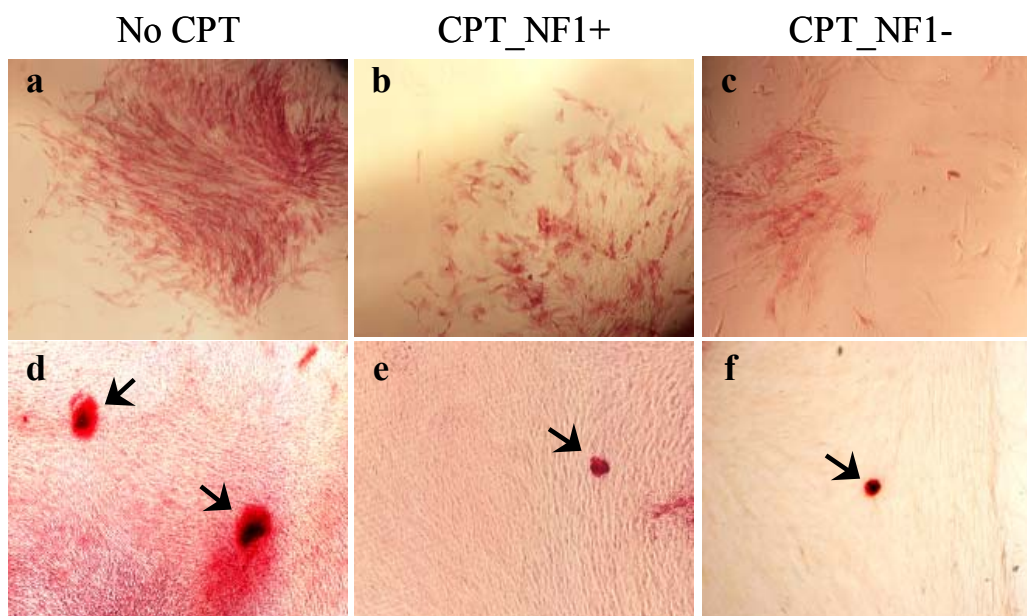
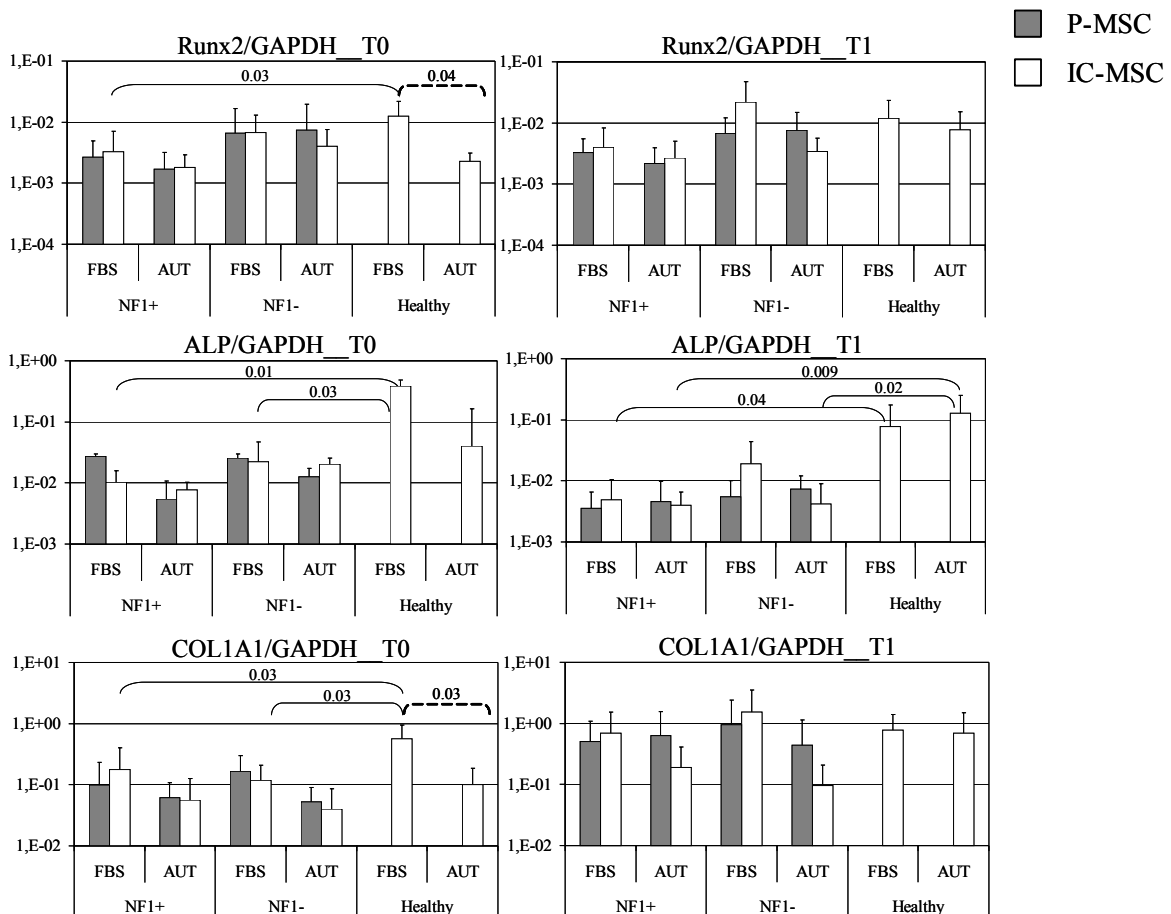


Figura 17. Differenze morfologiche tra le IC-MSC dei gruppi CPT e del gruppo di controllo. Le CFU ottenute dalle IC-MSC del gruppo No CPT si presentavano come aggregati di cellule confluenti in multistrato (a), mentre le CFU ottenute dai pazienti CPT (b, c) apparivano più rade. La struttura tridimensionale dei noduli di calcio fosfato e la matrice mineralizzata erano più evidenti nel gruppo di controllo (d) rispetto ai gruppi CPT (e,f). Obiettivo 4×.

Come mostrato nella Figura 18, l'espressione dei geni *bone related* è stata eseguita al T0, ossia al momento dell'adesione delle cellule alla superficie di coltura (4 giorni dopo la semina) e al T1 (prima confluenza delle colture). Al tempo T0, i livelli di espressione genica nelle IC-MSc coltivate in presenza di FBS erano influenzati dalla condizione dei bambini. L'analisi della varianza (ANOVA) ha messo in luce differenze significative nell'espressione di ALPL (p value: 0.0009 al T0; 0.001 al T1) e di COL1A1 (p value=0.01 al T0) e l'analisi *post hoc* ha evidenziato livelli di Runx2 significativamente maggiori nei controlli rispetto ai pazienti NF1+. La presenza della neurofibromatosi non aveva alcun effetto sull'espressione genica, infatti sono stati rilevati livelli di espressione simili nelle IC-MSc dei pazienti NF1+ e NF1-. Al T0 le IC-MSc presentavano livelli dei geni *bone related* maggiori delle P-MSc, sebbene le differenze nei livelli dei trascritti non fossero tanto evidenti quanto quelle morfologiche, biochimiche e funzionali. Al T1 tale andamento si osservava soltanto per il gene l'ALPL nel gruppo NF1+. Nel gruppo NF1-, le P-MSc esprimevano, al T0, livelli di BGLAP maggiori rispetto alle IC-MSc. Inoltre l'espressione di BGLAP era maggiore in pazienti NF1+ (P-MSc e IC-MSc) rispetto al gruppo di controllo.



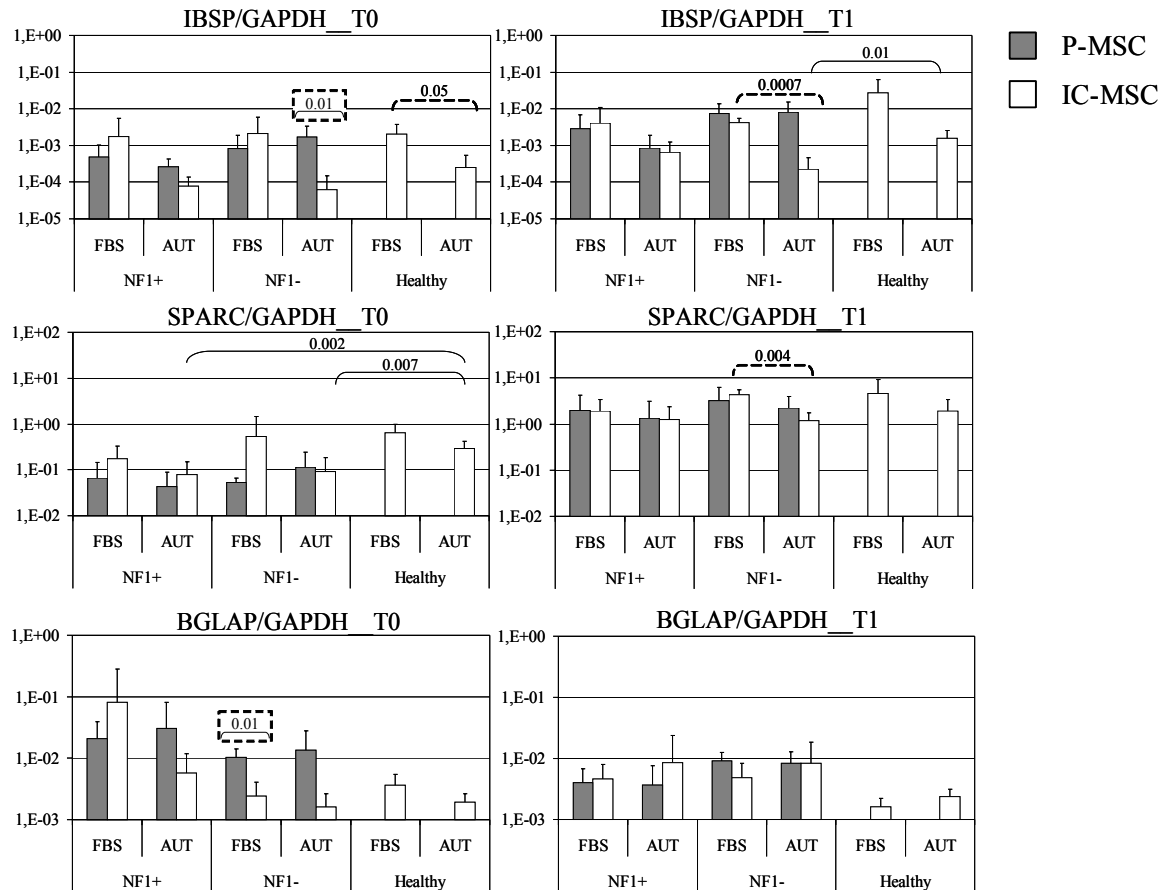


Figura 18. Espressione dei geni *bone related* in IC-MSC e P-MSC provenienti da pazienti NF1+, NF1- e non affetti, mantenute in siero autologo (AUT) o FBS: L'analisi quantitativa dei trascritti è stata effettuata 4 giorni dopo la semina (T0) e alla prima confluenza (T1). Le differenze significative dovute alla presenza di NF1 sono evidenziate da una linea, quelle dovute al sito di origine delle hMSC da una casella tratteggiata e quelle dovute al siero utilizzato da una linea tratteggiata.

Effetto del siero autologo sulle proprietà osteogenetiche delle IC-MSC e delle P-MSC

Il siero autologo aveva un effetto negativo su:

- formazione di CFU e attività dell'ALP nel gruppo di controllo (Figure 16b, c);
- numero di noduli minerali osservati nel gruppo CPT_NF1- (Figura 16d).

Nessuna differenza significativa si osservava nei pazienti CPT_NF1+.

In alcuni casi le proprietà funzionali delle colture di P-MSC erano migliori in presenza di siero autologo, sebbene non siano state evidenziate differenze significative rispetto all'uso del FBS. Le P-MSC del gruppo NF1+ erano in grado di formare un numero maggiore di noduli minerali (AUT 1.14 ± 0.4 ; FBS 0.43 ± 0.3), mentre si osservava un

numero più elevato di CFU (AUT 40.8±19; FBS 26±11) e CFU ALP-positive (AUT 27±17; FBS 11.2±10) nelle colture di P-MSC dei pazienti NF1-.

La riduzione del potenziale osteogenetico delle IC-MSC ha minimizzato le differenze rilevate tra cellule derivanti da siti di origine diversi (IC e P), che erano invece osservabili quando le colture erano coltivate in presenza di FBS. Soltanto l'attività metabolica (AlamarBlue test, Figura 16a) presentava differenze significative tra P-MSC ed IC-MSC in presenza di siero autologo.

In presenza di siero autologo si assisteva ad una riduzione dell'espressione dei geni *bone related* nelle IC-MSC, mentre non si osservavano variazioni significative indotte dall'uso del siero nelle P-MSC. L'effetto era evidente al tempo zero (p value ANOVA: Runx2 0.01; ALPL 0.04; COL1A1 0.004; SPARC 0.03; IBSP 0.03) e alla prima confluenza (p value ANOVA: Runx2 0.04; COL1A1 0.04; SPARC 0.01; IBSP 0.05):

- al T0 il siero utilizzato e la condizione dei bambini erano cofattori capaci di influenzare l'espressione di ALPL (ANOVA p value=0.02); le analisi *post-hoc* (Figura 17) hanno evidenziato una riduzione significativa dell'espressione di Runx2, ALPL, COL1A1 e IBSP indotta dall'uso del siero autologo nel gruppo di controllo;
- alla prima confluenza l'espressione di COL1A1, IBSP e SPARC era inibita nelle IC-MSC dei pazienti CPT_NF1-, mentre non sono state osservate differenze significative nel gruppo NF1+.

La riduzione dell'espressione genica indotta dall'uso del siero autologo nelle IC-MSC ha determinato la rilevazione di livelli di IBSP significativamente maggiori nelle P-MSC al T0 (Figura 18).

Effetto del sovrinatante degli osteoblasti sul differenziamento delle IC-MSC

È stato possibile ottenere colture di OB da tutti i soggetti arruolati nello studio ed in tutti i casi le cellule hanno raggiunto la fase di mineralizzazione in seguito all'aggiunta di β -glicerofosfato, come dimostrato dalla deposizione dei noduli di calcio fosfato (dati non mostrati).

Il confronto tra le figure 16 e 19 mostra che le proprietà osteogeniche delle IC-MSC non sono state compromesse dai passaggi di congelamento/scongelamento (confronto tra barre celesti).

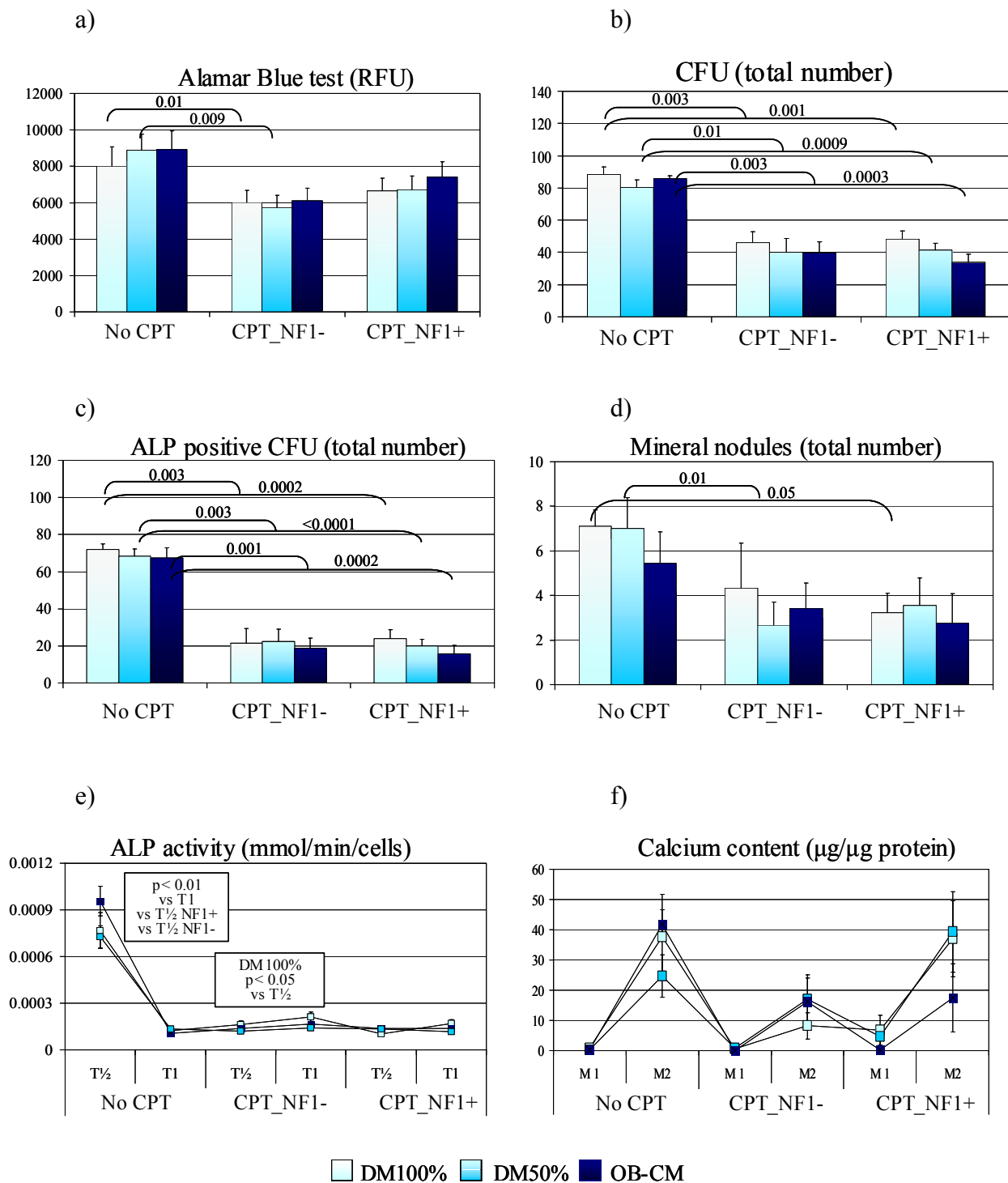


Figura 19. Proprietà osteogenetiche delle IC-MSC coltivate con terreno differenziante (DM100%), con medium costituito per il 50% da terreno di coltura invecchiato (DM50%) o con sovranatante degli OB autologhi prelevati nella parte adiacente al sito della lesione (OB-CM). Gli istogrammi rappresentano la media \pm l'errore standard di: RFU emesse dall'AlamarBlue (a), numero di CFU colorate con cristal violetto (b) o ALP citochimica (c), numero totale di noduli minerali rilevati tramite Alizarin Red (d), attività biochimica dell'ALP (e), contenuto di calcio (f).

I saggi effettuati sulla condizione DM100% hanno confermato che l'attività metabolica delle IC-MSc e la loro capacità di formare CFU ALP-positive e noduli minerali fossero inferiori nei gruppi CPT rispetto al gruppo di controllo (Figure 19a-d).

Le condizioni colturali DM50% e OB-CM non hanno modificato le proprietà osteogenetiche delle IC-MSc e le differenze tra pazienti CPT e No CPT si sono complessivamente mantenute (Figure 19a-f). Le IC-MSc semiconfluenti (T^{1/2}) del gruppo di controllo presentavano un'attività della fosfatasi alcalina molto maggiore rispetto alle colture dei pazienti CPT. Inoltre, mentre l'attività biochimica dell'ALP diminuiva da T^{1/2} al T1 nel gruppo di controllo, le colture dei pazienti affetti da pseudoartrosi congenita mostravano un andamento opposto (Figura 19e).

Nonostante l'elevata variabilità tra i campioni, il contenuto di calcio tendeva ad aumentare durante la fase di mineralizzazione, da M1 ad M2, andamento evidente soprattutto nei soggetti no-CPT e CPT_NF1+.

Analogamente a quanto mostrato dall'analisi morfologica e biochimica, l'espressione dei geni *bone related* non risultava compromessa dai passaggi di congelamento/scongelo cellulare. I risultati generati dalla condizione sperimentale DM100% hanno confermato che i livelli di espressione genica erano influenzati dalla condizione dei bambini. Rispetto al gruppo di controllo, ALPL e SPARC erano espressi a livelli inferiori in tutti i pazienti CPT (NF1+ e NF1-), BGLAP e COL1A1 nei pazienti CPT_NF1+, IBSP nel gruppo CPT_NF1- (Figura 20). L'espressione dei geni *bone related* era indotta dal *conditioned medium* degli osteoblasti (OB-CM) sia nel gruppo di controllo che nei pazienti NF1-, ed è stato rilevato un aumento significativo nei livelli dei geni Runx2, COL1A1 e BGLAP.

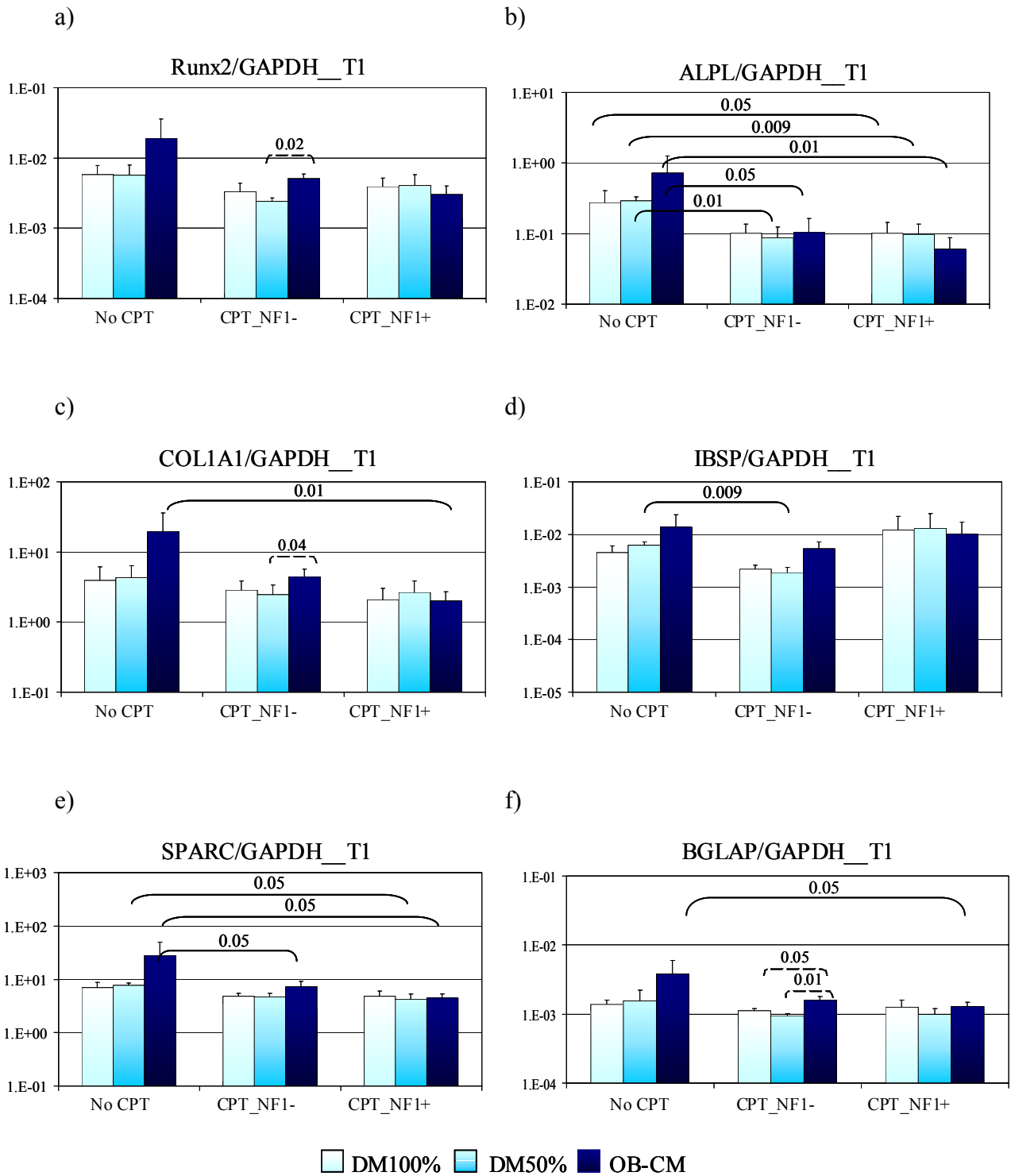


Figura 20 L'espressione dei geni *bone related* nelle IC-MSC trattate come descritto in Figura 19. L'analisi quantitativa dei trascritti è stata effettuata alla prima confluenza delle colture (T1). Le differenze significative dovute al trattamento sono evidenziate da una linea tratteggiata, quelle determinate dalla presenza di NF1 da una linea piena.

Discussione

Lo scopo dello studio descritto in questo capitolo è stato quello di stabilire le basi biologiche per l'utilizzo delle hMSC autologhe per il trattamento della pseudoartrosi congenita della tibia.

Le hMSC derivanti dal midollo osseo della cresta iliaca avevano una maggiore capacità di differenziarsi in senso osteoblastico rispetto alle cellule residenti in prossimità del sito della pseudoartrosi, sebbene, dal punto di vista biochimico e funzionale, fossero difettive rispetto alle hMSC ottenute da individui non affetti da CPT. In particolare, le P-MSC dei pazienti NF1+ apparivano maggiormente compromesse dal punto di vista funzionale durante la fase di mineralizzazione.

Una riduzione delle proprietà osteogenetiche delle cellule prelevate in prossimità del sito della lesione è stata descritta in pazienti affetti da pseudoartrosi non congenita.^{186,187,188} Inoltre, Leskelä et al.¹⁸³ hanno dimostrato che le IC-MSC di tre pazienti affetti da CPT e neurofibromatosi avevano proprietà osteogeniche maggiori delle P-MSC, ma inferiori rispetto alle IC-MSC di pazienti non affetti da CPT.

La perdita della funzione della neurofibromina, dovuta a mutazioni nel gene NF1, determina una riduzione del numero, oltre che una deficienza funzionale, degli osteoprogenitori; tali condizioni, a loro volta, potrebbero essere responsabili del mancato consolidamento della frattura caratterizzante la pseudoartrosi.¹⁸⁹

La neurofibromina è un regolatore positivo dell'attività GTPasica della proteina Ras, la quale trasduce un gran numero di segnali di crescita, giocando ruoli multipli nello sviluppo dello scheletro.^{190,191} La doppia inattivazione localizzata del locus NF1, che determina la perdita totale della funzionalità della proteina, potrebbe essere la causa primaria di CPT nei pazienti NF1+.¹⁹² Nonostante ciò, Leskelä et al.¹⁸³ hanno mostrato che la patogenesi della CPT nei pazienti NF1 non è interamente spiegata dalla perdita di funzione della neurofibromina, dal momento che non si verificava perdita di eterozigosi (Loss of heterozygosity, LOH) del gene NF1 nelle cellule della lesione pseudoartrosica.

I risultati del nostro studio sono in linea con quanto emerso nel lavoro sopra citato, in quanto, indipendentemente dalla presenza di neurofibromatosi, le P-MSC da noi analizzate avevano proprietà osteogenetiche inferiori rispetto alle cellule dei controlli. A conferma dei dati biochimici e funzionali, i livelli di espressione dei geni *bone related* nelle IC-MSC del gruppo CPT erano inferiori rispetto a quelli del gruppo No CPT. I trascritti Runx2, ALPL, SPARC e COL1A1 erano significativamente minori al T0,

mentre al T1 non si rilevava alcuna differenza ad eccezione dell'espressione di ALPL nei pazienti NF1+. Dal momento che la fosfatasi alcalina è necessaria per generare le molecole di pirofosfato necessario per la cristallizzazione dell'idrossiapatite, la diminuzione dei livelli di ALPL potrebbe spiegare la ragione per cui il processo di mineralizzazione risultava maggiormente compromesso nei pazienti NF1+.¹⁹³ Inoltre l'espressione di Runx2 era significativamente inferiore soltanto nel gruppo NF1+, suggerendo che il difetto funzionale della neurofibromina potrebbe ulteriormente peggiorare l'attività osteogenica delle IC-MSc. A conferma di ciò, diversi studi hanno dimostrato che la compromissione funzionale della neurofibromina implica la deregolazione dell'attività di Ras e MAPK, le quali, a loro volta, sono coinvolte nell'attivazione di Runx2.^{189,194,195} Altri autori sostengono invece che l'incremento dell'attività di Ras e MAPK nei pazienti NF1+ potrebbe essere responsabile del decremento di Runx2 e dell'aumento dei livelli di osteocalcina. Nel nostro studio l'espressione di BGLAP (osteocalcina) era più elevata in tutti i pazienti CPT rispetto agli individui non affetti.¹⁹⁶

Ulteriori ricerche sono necessarie per mettere in luce i meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi della CPT, soprattutto considerando che non sono state riscontrate differenze tra pazienti NF1+ e NF1-.

A differenza dei saggi fenotipici e funzionali, l'analisi dell'espressione genica non ha evidenziato differenze rilevanti tra IC-MSc e P-MSc del gruppo CPT. Pertanto, la patogenesi della CPT non sembra strettamente correlata a difetti molecolari degli osteoprogenitori residenti in prossimità della lesione, ma appare piuttosto dipendente da fattori locali che potrebbero intervenire nella compromissione del differenziamento delle hMSc.

Un ulteriore obiettivo dello studio è stato quello di valutare se il siero autologo ed il microambiente della lesione potessero inibire il potenziale osteogenico delle IC-MSc, limitandone l'utilizzo terapeutico mirato alla rigenerazione ossea *in vivo*. Lo studio ha dimostrato che l'utilizzo del siero autologo compromette parzialmente la capacità delle IC-MSc di differenziarsi in osteoblasti, ma non aveva alcun effetto sulle P-MSc.

L'effetto era maggiormente evidente sulle IC-MSc dei pazienti NF1-, che presentavano livelli di espressione di COL1A1, IBSP e SPARC inferiori.

Il modello di co-coltura utilizzato per studiare l'attività paracrina degli osteoblasti residenti in prossimità del sito della lesione, ha mostrato che il sovrantante degli OB non ha alcun effetto negativo sulle proprietà osteogeniche delle IC-MSc. Sono invece

emersi alcuni dati incoraggianti: l'espressione dei geni *bone related* nei gruppi No CPT e NF1- tendeva ad aumentare e nel gruppo NF1- l'incremento dei livelli di COL1A1 e BGLAP era significativo.

Complessivamente, i risultati biochimici, funzionali e molecolari hanno mostrato che le hMSC di individui affetti da CPT hanno un potenziale osteogenetico minore rispetto al gruppo di controllo, e che il difetto è più accentuato nei pazienti NF1+, probabilmente a causa dell'alterazione funzionale della neurofibromina. Nonostante ciò, quando le cellule vengono coltivate *ex vivo* in presenza di FBS, le IC-MSK presentano caratteristiche osteogeniche migliori rispetto alle P-MSK. Si può pertanto dedurre che le condizioni sperimentali siano in grado di promuovere il differenziamento delle IC-MSK, ma non abbiano un effetto analogo sulle P-MSK, evidenziando una diversità funzionale tra le due popolazioni.

Come ulteriore conferma della loro diversità, le IC-MSK e le P-MSK non rispondono allo stesso modo agli stimoli esterni, solo le prime infatti mostrano delle variazioni significative quando l'FBS è sostituito con siero autologo. Nei pazienti NF1- il siero autologo è meno efficiente nel promuovere il differenziamento delle IC-MSK. I pazienti NF1+ mostravano un lieve incremento di alcuni dei parametri analizzati quando l'FBS era sostituito con siero autologo; tale osservazione suggerisce che il rilascio di fattori di crescita potrebbe rappresentare un mezzo per compensare il difetto costitutivo delle cellule negli individui NF1+. Inoltre, il tessuto osseo circostante il sito della lesione sembra favorire il differenziamento delle hMSC trapiantate, ammesso che le cellule ossee non abbiano difetti intrinseci, come nel caso della neurofibromatosi di tipo 1.

In conclusione, l'uso di hMSC autologhe è uno strumento utile per il trattamento della CPT, poiché aumenta le probabilità di ottenere un'effettiva rigenerazione del tessuto osseo. Tuttavia sono necessari ulteriori studi clinici che confermino la reale efficacia della procedura rispetto alla terapia standard. Infine, ulteriori ricerche, finalizzate a comprendere la patogenesi della CPT, fornirebbero basi più solide per lo sviluppo e il miglioramento dell'approccio rigenerativo.

Bibliografia

- ¹ Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999;87:57-66.
- ² Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392-404.
- ³ Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355S:7-21.
- ⁴ Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultra-structural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg* 1991;73A:832-47.
- ⁵ Kon T, Cho T, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16:1004-14.
- ⁶ Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995;10:1272-81.
- ⁷ Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld L. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* 2003;90:1112-27.
- ⁸ Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, Sugioka Y. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair. Detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res* 1997;12:96-102.
- ⁹ Nakagawa Y, Shimizu K, Hamamoto T, Suzuki K, Ueda R, Yamamuro T. Calcium-dependent neutral protease (Calpain) in fracture healing in rats. *J Orthop Res* 1994;12: 58-69.
- ¹⁰ Deckers MM, Van Beek ER, Van Der Pluijm G, Wetterwald A, Van Der Wee-Pals L, Cecchini MG, Papapoulos SE, Löwik CW. Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *J Bone Miner Res* 2002;17:998-1007.
- ¹¹ Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res* 1998;16:144-50.
- ¹² Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M, Kayal R, Graves DT, Jepsen KJ, Einhorn TA. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem* 2006;54:1215-28.
- ¹³ Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res* 2007;22:1-6.
- ¹⁴ Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* 2001;16:1575-82.

-
- ¹⁵ Kraus K, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* 2006;35:232-42.
- ¹⁶ Friedenstein AY, Chailakhyan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinetics* 1970;3:392-403.
- ¹⁷ Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;5:393-5.
- ¹⁸ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
- ¹⁹ Giordano A, Galderisi U, Marino I. From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An update on Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Physiol* 2007;211:27-35.
- ²⁰ Zangrossi S, Marabese M, Brogгинi M, Giordano R, D'Erasmus M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebulli P, Lazzari L. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells* 2007;25:1675-82.
- ²¹ Gang EJ, Bosnakiovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Erlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007;109:1743-51.
- ²² Bielby R, Joens E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* 2007;3851:S26-S32.
- ²³ Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24:150-4.
- ²⁴ Roufousse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:585-97.
- ²⁵ Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *New Engl J Med* 2005;352:1959-66.
- ²⁶ Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007;137:491-502.
- ²⁷ Collett GDM, Calfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005;96:930-8.
- ²⁸ Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Mercon P, Rigo S, Puppato E, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A, Poz A, Baccarani U, Damiani D, Fanin R, Mariuzzi L, Finato N, Masolini P, Burelli S, Belluzzi O, Schneider C, Beltrami CA. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow) *Blood* 2007;110:3438-46.

-
- ²⁹ Jiang Y, Jahargidar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
- ³⁰ Popp FC, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. Therapeutic potential of bone marrow cells for liver diseases. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006; 1: 411-8.
- ³¹ Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006;126:677-89.
- ³² Caplan I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *J Cell Physiol* 2007;213: 341-7.
- ³³ Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: Ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Engin* 2006;12:3007-19.
- ³⁴ Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 2002;277:30177-82.
- ³⁵ Li X, Quigg RJ, Zhou J, Ryaby JT, Wang H. Early signals for fracture healing. *J Cell Biochem.* 2005;95:189-205.
- ³⁶ Li X, Wang H, Touma E, Rousseau E, Quigg RJ, Ryaby JT. Genetic network and pathway analysis of differentially expressed proteins during critical cellular events in fracture repair. *J Cell Biochem* 2007;100:527-43.
- ³⁷ Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 2001;10:E1.
- ³⁸ Jingushi S, Joyce ME, Bolander ME. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J Bone Miner Res.* 1992;7:1045-55.
- ³⁹ Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front. Biosci* 2007;12:3068-3092.
- ⁴⁰ Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin independent Wnt signaling. *Dev Cell* 2003;5:367-77.
- ⁴¹ Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004;341:19-39.
- ⁴² Fujita K, Janz S. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer* 2007; 6:71-83.
- ⁴³ Jackson A, Vayssiere B, Garcia T, Newell W, Baron R, Roman-Roman S, Rawadi G. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone* 2005;36:585-98.

-
- ⁴⁴ Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005;8:739-50.
- ⁴⁵ Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
- ⁴⁶ Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992;32:160-167.
- ⁴⁷ Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004;22:233-41.
- ⁴⁸ Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:651-7.
- ⁴⁹ Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:689-94.
- ⁵⁰ Lai CF, Cheng SL. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002;277:15514-22.
- ⁵¹ Chung UI, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 2001; 107:295-304.
- ⁵² Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 2004;131:1309-18.
- ⁵³ Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 2006;133:3231-44.
- ⁵⁴ Jacob AL, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteochondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol* 2006;296:315-28.
- ⁵⁵ Ornitz, D.M. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:205-13.
- ⁵⁶ Canalis E. Notch signaling in osteoblasts. *Sci Signal*. 2008; 1: pe17.
- ⁵⁷ Chau JF, Leong WF, Li B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol*. 2009; 24: 1593-606.
- ⁵⁸ Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, Chen Y, Wang L, Zheng H, Sutton RE, Boyce BF, Lee B. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med*. 2008; 14: 299-305.

-
- ⁵⁹ Mundy GR, Elefteriou F. Boning up on ephrin signaling. *Cell* 2006;126:441-3.
- ⁶⁰ Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki, Suda T, Matsuo K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 2006;4:111-21.
- ⁶¹ Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001;410: 37–40.
- ⁶² Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14:1-41.
- ⁶³ Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, R. R. Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108;7-29.
- ⁶⁴ Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 2005;11: 880-5.
- ⁶⁵ Lieberman JR, Dalulski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A: 1032-44.
- ⁶⁶ Malizos KM, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum. Molecular aspects. *Injury* 2005;36S: S13-S19.
- ⁶⁷ Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355S:S7-S21.
- ⁶⁸ Chubinskaya S, Merrihew C, Cs-Szabo G, Mollenhauer J, McCartney J, Rueger DC, Kuettner KE. Human articular chondrocytes express osteogenic protein-1. *J Histochem Cytochem* 2000;48: 239-50.
- ⁶⁹ Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 2002;109: 2384–97.
- ⁷⁰ Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop* 1998;335 (Suppl): S116-S123.
- ⁷¹ Nakase T, Yoshikawa H. Potential role of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab* 2006;24:425-33.
- ⁷² Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513-20.
- ⁷³ Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 2002;110:751-9.
- ⁷⁴ Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ, Ryoo HM. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the

BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of *Dlx5* expression. *J Biol Chem* 2003;278:34387-94.

⁷⁵ Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg* 2003, 85-A: 1544-52.

⁷⁶ Chhabra A, Zijerdi D, Zhang J, Kline A, Balian G, Hurwitz S. BMP-14 deficiency inhibits long bone fracture healing: a biochemical, histologic, and radiographic assessment. *J Orthop Trauma* 2005;19:629-34.

⁷⁷ Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2220-4.

⁷⁸ Kan L, Hu M, Gomes WA, Kessler JA. Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressive (FOP)-like phenotype. *Am J Pathol* 2004;165:1107-1015.

⁷⁹ Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002; 143:1545-53.

⁸⁰ Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Kobayashi T, Nishiyama K, Fukase M, Kumegawa M, Chihara K. Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoblast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J Bone Miner Res* 1995;10:1681-90.

⁸¹ Barnes GL, Kostenuik LC, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805-15.

⁸² Sandberg MM, Hannu TA, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 1993; 289:292-312.

⁸³ Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C, Dunn FW, Kawai S, Galléa S, Stiot V, Blanchet AM, Courtois B, Baron R, Rawadi G. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* 2001;29:323-30.

⁸⁴ Tsiroidis E, Upadhyay N, P Giannoudis. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules ? *Injury* 2007; 38S:S11-S25.

⁸⁵ Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derinck R. Osteoblastic responses to TGF- β during bone remodeling. *Mol Biol Cell* 1998;9:1903-18.

⁸⁶ Quinn J M W, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin T J, Gillespie MT. Transforming growth factor β affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res* 2001;16:1787-94.

-
- ⁸⁷ Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y. Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/ osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1998; 273:27091-6.
- ⁸⁸ Jingushi S, Heydemann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* 1990;8:364-71.
- ⁸⁹ Zhang X, Sobue T, Hurley MM. FGF-2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF-1 mRNA in mouse marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:526-31.
- ⁹⁰ Xiao G, Jiang D, Gopolkrishnan R, Franceschi RT. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem* 2002;277:36181-7.
- ⁹¹ Pitaru S, Kotev-Emeth S, Noff D, Kaffuler S, Savion N. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J Bone Miner Res* 1993;8:919-29.
- ⁹² Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 2003;316, 23-32.
- ⁹³ Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* 2000;149:1297-308.
- ⁹⁴ Chikazu D, Hakeda Y, Ogata N, Nemoto K, Itabashi A, Takato T, Kumegawa M, Nakamura K, Kawaguchi H. Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42 MAP kinase. *J Biol Chem* 2000;275:31444-50.
- ⁹⁵ Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 2002;17:1859-71.
- ⁹⁶ Canalis E, Rydziel S. Platelet-derived growth factor and the skeleton. In: JP Bilezikian, LG Raisz, GA Rodan eds. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA 1996, pp 619-26.
- ⁹⁷ Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:529-35.
- ⁹⁸ Mitlak B H, Finkelman R D, Hill E L, Li J, Martin B, Smith T, D'Andrea M, Antoniades H N, Lynch S E. The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. *J Bone Miner Res* 1996;11:238-47.

-
- ⁹⁹ Filvaroff EH. VEGF and bone. *J Musculoskel Neuron Interact* 2003;3:304-7.
- ¹⁰⁰ Gerber HP, Vu TH, Ryan AM et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5:623-8.
- ¹⁰¹ Hiltunen MO, Ruuskanen M, Huuskonen J, Mähönen AJ, Ahonen M, Rutanen J, Kosma VM, Mahonen A, Kröger H, Ylä-Herttuala S. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation in vivo. *FASEB J* 2003;17:1147-9.
- ¹⁰² Yao S, Dawen L, Pan F, Wise GE. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclasts precursors and on osteoclastogenesis. *Arch Oral Biol* 2006;51:596-602.
- ¹⁰³ Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D. Insulin-like growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int* 1993;53:97-102.
- ¹⁰⁴ Manduca P, Palermo C, Caruso C, Brizzolara A, Sanguineti C, Filanti C, Zicca A. Rat tibial osteoblasts III: propagation in vitro is accompanied by enhancement of osteoblast phenotype. *Bone* 1997;21:31-9.
- ¹⁰⁵ Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser U, Dony C, Lang K, Baylink DJ. Studies on the mechanism by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem* 1995;270:20424-31.
- ¹⁰⁶ Prisell PT, Edwall D, Lindblad JB et al. Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat. *Calcif Tissue Int* 1993;53:201-5.
- ¹⁰⁷ Rosen CJ. Insulin-like growth factor I and bone mineral density: experience from animal models and human observational studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004;18:423-35.
- ¹⁰⁸ Tshamala M, van Bree H. Osteoinductive properties of the bone marrow. Myth or reality. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006;3:133-41.
- ¹⁰⁹ Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJThM. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87:11367-78.
- ¹¹⁰ Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM. Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. *Clin Orthop* 1992; 277:229-37.
- ¹¹¹ Riedel GE, Valentin-Opran A. Clinical evaluation of rhBMP-2/ACS in orthopaedic trauma: a progress report. *Orthopaedics* 1999; 22: 663-5.
- ¹¹² Nordsletten L, Madsen JE. The effect of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Scand J Surg* 2006;95:91-4.
- ¹¹³ Giannoudis PV, Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7. The UK perspective. *Injury* 2005; 36S:S47-S50.

-
- ¹¹⁴ Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:710-8.
- ¹¹⁵ Burkus JK, Dorchak JD, Sanders DL. Radiographic assessment of interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *J Spinal Disord Tech* 2002;15:337-49.
- ¹¹⁶ ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Curr Med Res Opinions* 2006;22:S7-S11.
- ¹¹⁷ Lind M, S. Overgaard, B. Ongpipattanakul, T. Nguyen, C. Bunger and K. Soballe. Transforming growth factor- β 1 stimulates bone ongrowth to weight-loaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:377-82.
- ¹¹⁸ Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392-404.
- ¹¹⁹ Chen WJ, Jingushi S, Anzai J, Hirata G, Tamura M, Iwamoto Y. Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae. *J Bone Miner Metab* 2004;22:303-9.
- ¹²⁰ Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox WC, Spin RC, Poser JW. A novel formulation of FGF-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in non-human primates. *J Orthop Res* 1999;17:607-14.
- ¹²¹ Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP, Wildemann B. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants* 2006;16: 61-9.
- ¹²² Giannoudis P, Psarakis S, Kontakis G. Can we accelerate fracture healing ? A critical analysis of the literature. *Injury* 2007, 38S1: S81-S89.
- ¹²³ Veillette CJH, McKee MD. Growth factors – BMPs, DBMs, and buffy coat products: are there any proven differences amongs them? *Injury* 2007, 38S1, S38-S48.
- ¹²⁴ Granchi D, Ochoa G, Leonardi E, Devescovi V, Baglio SR, Osaba L, Baldini N, Ciapetti G. Gene expression patterns related to osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Aug 17. [Epub ahead of print]
- ¹²⁵ Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 2009; 4:206-16.
- ¹²⁶ Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, Kambouris M, Kollar K, McTaggart S, Pelekanos R, Rice A, Rossetti T, Atkinson K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:846-58.
- ¹²⁷ Dawson JJ, Oreffo RO. Bridging the regeneration gap: stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473:124-31.

-
- ¹²⁸ Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A. Human bone marrow stromal cells: in vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials* 2006; 27:6150-60.
- ¹²⁹ Ho NC, Jia L, Driscoll CC, Gutter EM, Francomano CA. A skeletal gene database. *J Bone Miner Res* 2000;15:2095-122.
- ¹³⁰ Qi H, Dean J, Aguiar DJ, Shelly M, Williams SM, La Pean A, Pan W, Verfaillie CM. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *PNAS* 2003; 100:3305-10.
- ¹³¹ Stains JP, Civitelli R. Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol* 2003; 4:222.
- ¹³² Huang W, Yang S, Shao J, Li, YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 2007; 12:3068-92.
- ¹³³ Granchi D, Baglio SR, Amato I, Giunti A, Baldini N. Paracrine inhibition of osteoblast differentiation induced by neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 2008; 123:1526-35.
- ¹³⁴ Lagreid A, Hvidsten TR, Midelfart H, Komorowski J, Sandvik AK. Predicting gene ontology biological process from temporal gene expression patterns. *Genome Res* 2003; 13:965-79.
- ¹³⁵ Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3:RESEARCH0034.
- ¹³⁶ Andersen CL, Ledet-Jensen J, Ørntoft T. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization—applied to bladder—and colon-cancer datasets. *Cancer Res* 2004; 64:5245-50.
- ¹³⁷ Barrell D, Dimmer E, Huntley RP, Binns D, O'Donovan C, Apweiler R. The GOA database in 2009—an integrated gene ontology annotation resource. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:D396-403.
- ¹³⁸ Salomonis N, Hanspers K, Zambon AC, Vranizan K, Lawlor SC, Dahlquist KD, Doniger SW, Stuart J, Conklin BR, Pico AR. GenMAPP 2: new features and resources for pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:217.
- ¹³⁹ Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:29-34.
- ¹⁴⁰ Rockett JC, Hellmann GM. Confirming microarray data—is it really necessary? *Genomics* 2004; 83:541-9.
- ¹⁴¹ Grundberg E, Brandstrom H, Lam KC, Gurd S, Ge B, Harmsen E, Kindmark A, Ljunggren O, Mallmin H, Nilsson O, Pastinen TM. Systematic assessment of the human osteoblast transcriptome in resting and induced primary cells. *Physiol Genomics* 2008; 33:301-11.
- ¹⁴² Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH, Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal

stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 2007; 8:70.

¹⁴³ Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Kassem M. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells* 2005; 23:1367-77.

¹⁴⁴ Wälchli C, Koch M, Chiquet M, Odermatt BF, Trueb B. Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 2):669-81.

¹⁴⁵ Kudo Y, Siriwardena BS, Hatano H, Ogawa I, Takata T. Periostin: novel diagnostic and therapeutic target for cancer. *Histol Histopathol* 2007; 22:1167-74.

¹⁴⁶ Di Cesare PE, Fang C, Leslie MP, Tulli H, Perris R, Carlson CS. Expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by embryonic and adult osteoblasts. *J Orthop Res* 2000; 18:713-20.

¹⁴⁷ Govoni KE, Lee SK, Chadwick RB, Yu H, Kasukawa Y, Baylink DJ, Mohan S. Whole genome microarray analysis of growth hormone-induced gene expression in bone: T-box3, a novel transcription factor, regulates osteoblast proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E128-36.

¹⁴⁸ Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25:2648-59.

¹⁴⁹ Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 2008; 87:107-18.

¹⁵⁰ Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 2008; 15:100-14.

¹⁵¹ Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002; 143:1545-53.

¹⁵² Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massagué J. TGF-beta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 2008; 133:66-77.

¹⁵³ Kim SJ, Kim SY, Kwon CH, Kim YK. Differential effect of FGF and PDGF on cell proliferation and migration in osteoblastic cells. *Growth Factors* 2007; 25:77-86.

¹⁵⁴ Asami K, Nakanishi T, Asahara H, Inoue H, Takigawa M. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing. *Bone* 2000; 26:625-33.

¹⁵⁵ Turner CH, Robling AG, Duncan RL, Burr DB. Do bone cells behave like a neuronal network? *Calcif Tissue Int* 2002; 70:435-42.

-
- ¹⁵⁶ Lai CF, Cheng SL. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002; 277:15514-22.
- ¹⁵⁷ Rosen V. BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1068:19-25.
- ¹⁵⁸ Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, Fazzalari NL. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signaling. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R100.
- ¹⁵⁹ Hurson CJ, Butler JS, Keating DT, Murray DW, Sadlier DM, O'Byrne JM, Doran PP. Gene expression analysis in human osteoblasts exposed to dexamethasone identifies altered developmental pathways as putative drivers of osteoporosis. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:12.
- ¹⁶⁰ Kronenberg HM. The role of the perichondrium in fetal bone development. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1116:59-64.
- ¹⁶¹ Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004; 93:1210-30.
- ¹⁶² Deutsch D, Leiser Y, Shay B, Fermon E, Taylor A, Rosenfeld E, Dafni L, Charuvi K, Cohen Y, Haze A, Fuks A, Mao Z. The human tuftelin gene and the expression of tuftelin in mineralizing and nonmineralizing tissues. *Connect Tissue* 2002; 43:425-34.
- ¹⁶³ Løes S, Kettunen P, Kvinnsland IH, Taniguchi M, Fujisawa H, Luukko K. Expression of class 3 semaphorins and neuropilin receptors in the developing mouse tooth. *Mech Dev* 2001; 101:191-4.
- ¹⁶⁴ Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *EMBO J* 2003, 20: 2254-72.
- ¹⁶⁵ Hou LT, Yan JJ, Tsai YM, Lao CS, Lin SJ, Liu CM. Polymer assisted regeneration therapy with Atrisorb® barriers in human periodontal intrabony defects. *J Clin Periodontol* 2004;31:68-74.
- ¹⁶⁶ Hasegawa S, Ishii S, Tamura J, Furukawa T, Neo M, Matsusue Y, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. A 5-7 year in vivo study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures. *Biomaterials*. 2006;27:1327-32.
- ¹⁶⁷ Chang PC, Liu BY, Liu CM, Chou HH, Ho MH, Liu HC, Wang DM, Hou LT. Bone tissue engineering with novel rhBMP2-PLLA composite scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81:771-80.
- ¹⁶⁸ Hanson AD, Wall ME, Pourdeyhimi B, Lobo EG. Effects of oxygen plasma treatment on adipose-derived human mesenchymal stem cell adherence to poly(L-lactic acid) scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18:1387-400.

-
- ¹⁶⁹ Armentano I, Ciapetti G, Pennacchi M, Dottori M, Devescovi V, Granchi D, Baldini N, Olalde B, Jurado MO, Alava IM, Kenny JM. Role of PLLA plasma surface modification in the interaction with human marrow stromal cells. *J Appl Pol Sci*, 2009, in press.
- ¹⁷⁰ Mouritzen P, Noerholm M, Nielsen PS, Jacobsen N, Lomholt C, Pfundheller HM, et al. ProbeLibrary: a new method for faster design and execution of quantitative real-time PCR. *Nat Methods* 2005;4:313–6.
- ¹⁷¹ Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal–osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000;41:4768–76.
- ¹⁷² Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Munoz J, Spees JL, Prockop DJ. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:97–106.
- ¹⁷³ Biological basis for the use of autologous bone marrow stromal cells in the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia. Granchi D, Devescovi V, Baglio SR, Leonardi E, Donzelli O, Magnani M, Stilli S, Giunti A, Baldini N. *Bone*. 2010 Mar;46(3):780-8.
- ¹⁷⁴ Vander Have KL, Hensinger RN, Caird M, Johnston C, Farley FA. Congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Am Acad Orthop Surg* 2008;16:228–36.
- ¹⁷⁵ Vitale MG, Guha A, Skaggs DL. Orthopaedic manifestations of neurofibromatosis in children. An update *Clin Orthop Relat Res* 2002;401:107–18.
- ¹⁷⁶ Crawford AH, Schorry EK. Neurofibromatosis update. *J Pediatr Orthop* 2006;26: 413–23.
- ¹⁷⁷ Tseng SS, Lee MA, Reddi AH. Nonunions and the potential of stem cells in fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(S1):92–8.
- ¹⁷⁸ Novicoff WM, Manaswi A, Hogan MV, Brubaker SM, Mihalko WM, Saleh KJ. Critical analysis of the evidence for current technologies in bone-healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(S1):85–91.
- ¹⁷⁹ Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(S1):322–7.
- ¹⁸⁰ Garg NK, Gaur S. Percutaneous autogenous bone-marrow grafting in congenital tibial pseudarthrosis. *J Bone Joint Surg Br* 1995;77:830–1.
- ¹⁸¹ Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis—a preliminary result of three cases. *Bone* 2004;35:892–8.
- ¹⁸² Cho TJ, Choi IH, Lee KS, Lee SM, Chung CY, Yoo WJ, et al. Proximal tibial lengthening by distraction osteogenesis in congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Pediatr Orthop* 2007; 27:915–20.

-
- ¹⁸³ Leskelä HV, Kuorilehto T, Risteli J, Koivunen J, Nissinen M, Peltonen S, et al. Congenital pseudarthrosis of neurofibromatosis type 1: Impaired osteoblast differentiation and function and altered NF1 gene expression. *Bone* 2009;44:243-50.
- ¹⁸⁴ Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2000;21:1095–102.
- ¹⁸⁵ Neurofibromatosis. NIH Consensus Statement Online 1987 Jul 13-15;6(12):1-19. [<http://consensus.nih.gov/1987/1987Neurofibromatosis064html.htm>].
- ¹⁸⁶ Hernigou P, Beaujean F. Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 1997;83:33–40.
- ¹⁸⁷ Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, Wilhelm K, Marzi I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int* 2007;80: 294–300.
- ¹⁸⁸ Hofmann A, Ritz U, Hessmann MH, Schmid C, Tresch A, Rompe JD, et al. Cell viability, osteoblast differentiation, and gene expression are altered in human osteoblasts from hypertrophic fracture non-unions. *Bone* 2008;42:894–906.
- ¹⁸⁹ Schindeler A, Little DG. Recent insights into bone development, homeostasis, and repair in type 1 neurofibromatosis (NF1). *Bone* 2008;42:616–22.
- ¹⁹⁰ Kuorilehto T, Nissinen M, Koivunen J, Benson MD, Peltonen J. NF1 tumor suppressor protein and mRNA in skeletal tissues of developing and adult normal mouse and NF1-deficient embryos. *J Bone Miner Res* 2004;19:983–9.
- ¹⁹¹ Kolanczyk M, Kossler N, Kuhnisch J, Lavitas L, Stricker S, Wilkening U, et al. Multiple roles for neurofibromin in skeletal development and growth. *Hum Mol Genet* 2007;16:874–86.
- ¹⁹² Stevenson DA, Zhou H, Ashrafi S, Messiaen LM, Carey JC, D'Astous JL, et al. Double inactivation of NF1 in tibial pseudarthrosis. *Am J Hum Genet* 2006;79:143–8.
- ¹⁹³ Mornet E. Hypophosphatasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22:113–27.
- ¹⁹⁴ Yu X, Chen S, Potter OL, Murthy SM, Li J, Pulcini JM, et al. Neurofibromin and its inactivation of Ras are prerequisites for osteoblast functioning. *Bone* 2005:793–802.
- ¹⁹⁵ Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa 1. *J Biol Chem* 2000;275:4453–9.
- ¹⁹⁶ Abdel-Wanis ME, Kawahara N. Bone development in neurofibromatosis 1. *Med Hypotheses* 2003;60:459–62.