

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA**

FACOLTÀ DI FARMACIA

*Corso di Specializzazione in Biochimica Clinica*



**Tesi di Specializzazione**

Invadosomi e strutture di membrana sulle

*Mesodermal Progenitor Cells* (MPCs):

possibili implicazioni nella somministrazione di cellule multipotenti derivate da  
midollo osseo.

**Relatore**

Prof. Mario Petrini

**Candidato**

Dr.ssa Roberta Arici

Anno Accademico 2010-2011

# INDICE

## INTRODUZIONE

<b>1. La staminalità</b>	<b>5</b>
1.1 Caratteristiche fondamentali di una cellula staminale	7
<b>2. Le cellule mesenchimali stromali (MSC)</b>	<b>8</b>
2.1 Identificazione delle MSC	9
2.2 La nicchia emopoietica	11
2.3 Applicazioni terapeutiche delle MSC	12
<b>3. Le Cellule Progenitrici Mesodermali (MPC)</b>	<b>16</b>
3.1 Morfologia e plasticità differenziativa delle MPC	16
<b>4. Adesione cellulare</b>	<b>18</b>
4.1 Le integrine	18
4.2.Emidesmosomi ed adesioni focali	20
4.3 Il recettore di membrana CXCR4	21
4.4. Strutture cellulari di invasione: il podosoma e l'invadosoma	22
<b>5. Scopo della tesi</b>	<b>24</b>

# MATERIALI E METODI

<b>1. Raccolta Campioni</b>	<b>25</b>
1.1 Arricchimento della frazione di cellule mononucleate midollari	26
<b>2. Colture primarie di cellule midollari mononucleate</b>	<b>26</b>
2.1 Coltura selettiva di Cellule Mesenchimali Stromali (MSC)	27
2.2 Coltura selettiva di Cellule Progenitrici Mesodermali (MPC)	28
2.3 Allestimento di colture miste MSC/MPC	29
2.4 Validazione citofluorimetrica delle colture selettive	30
<b>3. RTq-PCR array per l'espressione di proteine della matrice e molecole di adesione</b>	<b>31</b>
3.1 estrazione di RNA totale	31
3.2 retrotrascrizione ed amplificazione del cDNA	32
3.3 Amplificazione dei geni codificanti per le molecole di adesione e proteine della EMC	32
3.4 Amplificazione del gene codificante per CXCR4	33
<b>4. Citofluorimetria</b>	<b>37</b>
4.1 Analisi citofluorimetrica delle integrine in colture miste	38
4.2 Analisi citofluorimetrica del recettore CXCR4 in colture miste	38
<b>5. Microscopia a fluorescenza</b>	<b>39</b>

5.1 Analisi microscopica in fluorescenza delle integrine in colture miste	40
---	----

## **RISULTATI**

<b>1. Coltura cellulare: Validazione citofluorimetrica</b>	<b>42</b>
<b>2. Analisi delle molecole di adesione</b>	<b>44</b>
2.1 RTq-PCR array	44
2.2 Analisi citofluorimetrica delle integrine	47
2.3 Analisi microscopica in fluorescenza delle molecole di adesione	48
<b>3. Analisi molecolare e citofluorimetrica del gene codificante per CXCR4</b>	<b>53</b>

<b>DISCUSSIONE</b>	<b>54</b>
--------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>63</b>
---------------------	-----------

# INTRODUZIONE

## 1. La staminalità

Il termine di cellula staminale è stato coniato per la prima volta nel diciannovesimo secolo da Edmund Beecher Wilson che utilizzò tale termine quale sinonimo di cellula germinale primordiale mitoticamente quiescente (Wilson 1896). Un secolo più tardi, alcuni autori hanno definito le cellule staminali quali cellule immature o non differenziate clonogeniche, ovvero in grado di auto-rinnovarsi (*self-renewal*) per un periodo di tempo infinito o limitato (Gehron, 2000; Weissman, 2000 Watt et al., 2000). Sulla base della loro capacità proliferativa, alcuni autori (Cedar et al.,2007) hanno

proposto che le cellule staminali originino da una divisione diseguale. Delle due cellule figlie, una sarà staminale e l'altra, perderà progressivamente la capacità di proliferare; quest'ultima potrà moltiplicarsi e originare una progenie con diminuito potenziale differenziativo, fino alla formazione di cellule differenziate mature (Baksh et al., 2004; Ryan et al., 2005; Weissman, 2000). Il potenziale proliferativo delle cellule staminali è tenuto sotto controllo dall'attività di citochine, fattori di trascrizione, interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, che avvengono in particolari microambienti. Si ritiene infatti che la presenza delle cellule staminali sia limitata a detti microambienti (*niche*), dove svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità dei tessuti con *turnover* cellulare molto elevato e nella riparazione di eventuali danni (Moore e Lemischka 2006). Al momento, si presume che la *niche* staminale sia presente in diversi tessuti tra cui il midollo osseo, il cervello, il fegato, l'epidermide, i muscoli scheletrici, il tratto gastrointestinale, il pancreas, gli occhi, il sangue e la polpa dentale (Hipp et al., 2008). Tale speculazione si basa sull'ipotesi che esistano cellule staminali in tutto il corpo e che il concetto di staminalità si debba incentrare, più che sulla loro capacità proliferativa, sulla capacità di produrre differenti *lineages* cellulari (plasticità differenziativa). Sulla base di questo criterio le cellule staminali possono essere classificate in totipotenti, multipotenti e pluripotenti. Lo zigote e i discendenti delle prime tre divisioni cellulari sono totipotenti, in quanto capaci di formare un intero individuo e i trofoblasti della placenta (Alison et al., 2002; Fortier, 2005; Lee et Hui, 2006). Le cellule da cui si svilupperà l'embrione e che compongono l'*inner cell mass* (ICM) sono pluripotenti, ovvero in grado di dare origine a quasi tutte le linee cellulari dei tre foglietti germinali, ma incapaci di formare un embrione in toto poiché incapaci di generare la placenta e i tessuti di supporto (Conley et al., 2004). Molti tessuti adulti hanno invece al loro interno cellule multipotenti, ovvero cellule in grado di produrre un

numero limitato di linee cellulari, appropriato alla specifico compartimento in cui risiedono (Lee et Hui, 2006).

Recentemente, alcuni autori ipotizzano che la staminalità rappresenti una funzione regolabile, adattabile a diversi stimoli e non riconducibile ad una singola entità cellulare discreta (Slack, 2008). Secondo tale congettura, qualsiasi cellula, se sottoposta ad opportuni stimoli ed in appropriate condizioni, potrebbe essere in grado di modificare il proprio livello di maturazione. In tal modo, una cellula differenziata potrebbe essere indotta a divenire indifferenziata ed essere “orientata” verso la differenziazione in una linea cellulare diversa. Tuttavia, sussistono ancora evidenti difficoltà causate dalla scarsa conoscenza della complessa rete di segnali chimico-fisici che possono dirigere la differenziazione verso tutti i fenotipi differenziati adulti.

### 1.1 Caratteristiche fondamentali di una cellula staminale

Come intuibile da quanto accennato sopra la definizione di cellula staminale è soggetta a interpretazione, così come il concetto di staminalità è in costante evoluzione. Nell’ottica suggerita dagli ultimi dati sperimentali le principali caratteristiche di una cellula “staminale” possono essere così riassunte:

- Le cellule staminali sono cellule in grado di auto-rinnovamento (*self-renewal*);
- Le cellule staminali sono cellule capaci di originare più linee cellulari.

Considerando quanto sopra detto in questa tesi si farà riferimento alle cellule trattate semplicemente come a cellule non differenziate.

## **2. Le cellule mesenchimali stromali (MSC)**

Denominate *Mesenchymal stem cells* da Caplan et al. (1991), nove anni più tardi sono state rinominate *mesenchymal/multipotent stromal cells* o cellule mesenchimali stromali (MSC) dall'*International Society of Cellular Therapy* (ISCT) (Horwitz, 2005). Le cellule stromali mesenchimali sono state descritte per la prima volta nel 1966 da Friedenstein et al. (1970), come una popolazione di cellule, isolate dallo stroma di midollo osseo di topo, clonogeniche, aderenti alle piastre e in grado di andare incontro *in vitro* a differenziazione in osso, tessuto adiposo e cartilagine. 14 anni più tardi le stesse cellule sono state isolate anche da midollo osseo umano (Castro-Malaspina et al., 1980). Benchè le MSC siano state scoperte nel midollo osseo, negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi sull'uomo che ne evidenziano la presenza all'interno di altri tessuti adulti (tessuto adiposo: Zuck et al. 2001; osso trabecolare: Sottile et al. 2002; muscolo scheletrico: Bosh et al. 2000; cordone ombelicale: Erices et al. 2000; Wang et al. 2004).

## 2.1 Identificazione delle MSC

Come ormai consolidato da tempo, il midollo osseo contiene due principali tipi di cellule multipotenti: le ematopoietiche, che differenziano nelle cellule mature del sangue e le cellule mesenchimali stromali, in grado di dare origine *in vitro* ad una certa varietà di tessuti mesenchimali adulti quali il tessuto osseo, cartilagineo, adiposo e muscolare (Serakinci, 2006).

Una volta associata la plasticità differenziativa delle MSC, gli studi successivi si sono focalizzati principalmente sulle tecniche di isolamento e purificazione di queste cellule. Bisogna tener presente che le cellule stromali mesenchimali sono una popolazione cellulare eterogenea. Inoltre, se da un lato le MSC isolate da tessuti differenti mostrano caratteristiche simili (stesso fenotipo morfologico, adesione al fondo della piastra di coltura, differenziamento in risposta a specifici fattori di crescita), al contempo non è chiaro se si tratti delle medesime cellule. In uno studio effettuato nel 2005 (Sakaguchi et al.), i risultati ottenuti dal confronto di MSC provenienti da midollo osseo, periostio, sinovia, muscolo scheletrico e tessuto adiposo hanno mostrato una diversa capacità di differenziazione condrogenica (Sakaguchi et al. 2005). Il successivo lavoro di Sotiropoulou (2006) ha dimostrato che l'espansione e la capacità differenziativa delle MSC provenienti da diversi tessuti è correlabile a molteplici fattori. Fra questi, la tecnica di isolamento, il terreno di coltura, i substrati di adesione, la concentrazione cellulare, i fattori di crescita, ma anche l'età del donatore e l'eventuale presenza di patologie.

Per quanto riguarda il midollo osseo, le MSC sono isolate da sangue midollare tramite stratificazione su un gradiente di densità discontinuo (Lymphoprep). Tale metodica di isolamento non è però altamente specifica per la presenza nella

componente mononucleata di svariate forme intermedie midollari. Ne consegue l'ottenimento di una popolazione cellulare eterogenea. Per questo motivo, l'isolamento è affiancato dalla separazione con *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) che si basa sulla reattività delle cellule a specifici anticorpi fluorescenti. Tutte le cellule di un organismo sono caratterizzate dalla presenza sulla loro superficie di recettori in grado di riconoscere e legare numerose molecole per comunicare con altre cellule adiacenti ed esplicare le loro proprie specifiche funzioni. Gli anticorpi in commercio sono numerosi e talvolta differiscono tra i vari gruppi di lavoro rendendo difficoltoso il confronto tra i risultati ottenuti. Inoltre, poiché non esiste un marcatore di elezione per l'identificazione delle MSC, la loro tipizzazione rimane un campo da indagare ulteriormente. Allo stadio attuale, tali cellule sono caratterizzate in base alla mancanza di espressione dei marcatori della linea ematopoietica (CD45 e CD34) e monocitaria (CD14) ed in base alla presenza di peculiari molecole di adesione (STRO-1, CD13, CD29, CD44, CD54, CD90, CD73, CD105, CD106). Secondo quanto riportato dall'*International Society of Cellular Therapy* (ISTC) (Horwitz, 2005), le cellule stromali mesenchimali non esprimono neppure CD19, CD11b (integrina $\alpha_M$ ), CD79a ed HLA-DR. Recentemente, alcuni autori (Kawanebe et al., 2009; Riekestina et al., 2009) hanno identificato il marcatore SSEA-4, storicamente considerata una glicoproteina espressa solamente in specifici stadi dello sviluppo embrionale, come *marker* per MSC poco mature e con maggiori capacità differenziative.

Benchè l'unico reale criterio di distinzione di queste cellule risieda nell'intrinseca capacità di differenziare in tessuto osseo, cartilagineo ed adiposo, come stabilito dall'*International Society for Cytotherapy*, l'uso combinato dei marcatori sopracitati può consentirne la certa identificazione *in vitro*.

## 2.2 La nicchia emopoietica

Per le cellule progenitrici emopoietiche (HPC) il concetto di nicchia è stato introdotto nel 1978 da Schofield e comprende l'ambiente regolativo delle HPC nel midollo osseo. Le HPC si trovano circondate da cellule stromali e a contatto con due tipi diversi di ambiente: l'endostio e i vasi sinusoidali. Entrambi gli ambienti influenzano in maniera specifica le HPC formando due nicchie distinte: la nicchia osteoblastica e la nicchia vascolare. Il modello attuale prevede che le HPC siano presenti sia nella nicchia a livello di vasi sinusoidali, che a livello di endostio e siano quindi regolate da segnali provenienti da cellule endoteliali, stromali e osteoblastiche (in particolare osteoblasti N-Caderina<sup>+</sup> CD45<sup>neg</sup>). In questo contesto è stato ipotizzato che il ruolo delle MSC consista nel supportare l'emopoiesi ed aumentare la mobilizzazione delle HPC nel midollo tramite interazioni cellula-cellula e la secrezione di citochine. Tra le molecole che contribuiscono a supportare l'emopoiesi e la mobilizzazione (*homing*) delle HPC alcune integrine (integrina $\beta_1$ ) e molecole antigeniche (CD34, CD40 e CD43) svolgono sicuramente un ruolo importante modulando l'adesione cellulare. Inoltre, Nillson et al. (2005) hanno osservato come il processo di *homing* sia correlato positivamente alla secrezione di determinati fattori di crescita (IL6, IL7, IL8, IL11, IL12, IL14, IL15, LIF, SCF, M-CSF e SDF-113), citochine (SDF-1) ed alti livelli della metalloproteina MMP9.

Secondo alcuni autori, anche le stesse MSC sembrerebbero giocare un ruolo fondamentale nell'omeostasi/*turnover* dei tessuti periferici e nel processo di *homing*. In caso di danno o stress tissutale, tali cellule sarebbero mobilizzate facilitando la rigenerazione dei tessuti danneggiati (Kucia et al. 2005). Per quanto alcuni fattori come lo *Stromal cell-derived factor* (SDF)-1 sembrano avere un ruolo cruciale nella

mobilitazione delle MSC (Zhang et al 2008) ed altri autori abbiano recentemente dimostrato l'importanza della glicoproteina CD44 nella migrazione di MSCs verso un determinato organo piuttosto che un altro (Sackstein et al 2008), i meccanismi molecolari alla base dell'*homing* per queste cellule non sono chiari e devono ancora essere ampiamente indagati.

### 2.3 Applicazioni terapeutiche delle MSC

Già il patologo tedesco Cohnheim circa 130 anni fa ipotizzò che il midollo osseo potesse essere una risorsa di fibroblasti implicati nella riparazione di numerosi tessuti periferici (Schipani e Kronenberg, 2009). Gli esperimenti condotti sui roditori da Friedenstein et al. (1974) dimostrarono *in vitro* la capacità delle MSC, una volta impiantate sotto cute, di formare tessuto osseo.

In questi ultimi anni, la plasticità differenziativa e la capacità proliferativa delle MSC, ne hanno fatto l'oggetto di ricerca della medicina rigenerativa, il cui obiettivo è portare al recupero permanente dei tessuti e degli organi danneggiati. Nel caso delle MSC, la possibilità di ottenere cellule multipotenti da ogni individuo e la relativa facilità di isolamento da diversi tessuti adulti ha permesso di ipotizzare applicazioni cliniche. La terapia cellulare, un trattamento clinico che prevede l'allestimento di colture *in vitro* con conseguente trapianto nei pazienti e la terapia genica, un trattamento clinico in cui le cellule in questione sarebbero anche modificate geneticamente, rappresentano le principali azioni possibili. In letteratura esistono studi su modelli animali a sostegno del ruolo delle MSC nella riparazione di

organi e tessuti danneggiati per traumi o malattie. Secondo tali studi, MSC espanse *in vitro* e trapiantate nel tessuto danneggiato sembrano riparare i danni tissutali ristabilendo la normale funzione tissutale. La conoscenza delle proprietà immunologiche delle MSC ha aumentato l'interesse per un loro possibile impiego in ematologia nel trapianto di midollo osseo. Recentemente sono stati ottenuti risultati incoraggianti per MSC coltivate *in vitro* nel ridurre l'incidenza e la gravità dell'aggressione, da parte delle cellule immunitarie trapiantate contro l'ospite (*graft-versus host disease*, GVHD) conseguente al trapianto allogenico (Le Blanc et al., 2004). Gli stessi autori (Le Blanc et al nel 2003) hanno dimostrato che le MSC sono prive delle proteine HLA (*Human Leukocyte Antigen*) di classe II anche una volta differenziate ed esprimono a bassi livelli proteine co-stimolatorie, evitando in questo modo di suscitare una reazione linfocitaria. Sulla base di questi dati, l'infusione delle MSC dopo un trapianto con procedure mieloblastiche convenzionali, è stata proposta come procedura clinica favorente l'attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche per ridurre l'incidenza della GVDH.

Diversi studi su modelli animali hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo delle MSC anche nel trattamento dei difetti ossei (Ohgushi et al., 1989; Bruder et al., 1994), dei difetti focali della cartilagine articolare (Ponticiello et al 2000) e nel danno tendineo (Pacini et al. 2007). Di notevole importanza sull'uomo, è lo studio condotto in bambini affetti da *Osteogenesis imperfecta*, trattati con trapianto allogenico di MSC ottenute da soggetti sani, con il risultato di un netto miglioramento della malattia (Horwitz et al, 2001). Alcuni *trials* clinici hanno mostrato il successo dell'iniezione locale di MSC autologhe espanse *in vitro* per il trattamento di difetti ossei in pazienti con fratture rivelando la capacità di attecchimento e riparazione dell'osso e della cartilagine nelle zone in cui queste

strutture avevano subito i maggiori danni (Murphy et al. 1999; Quarto et al., 2001). La terapia cellulare affiancata dall'ingegneria tissutale, una vera e propria disciplina introdotta nel 1993 (Langer et al., 1993), sembra costituire una promettente innovazione per rafforzare il successo del trapianto. A questo proposito, alcuni autori hanno proposto l'impiego di un substrato tridimensionale (*scaffolds*) che agisca da impalcatura di sostegno per la crescita cellulare, come alternativa al trapianto cellulare tradizionale. Gli *scaffolds* possono essere naturali (*clots*), come i polimeri derivati dalla matrice extracellulare (es. collagene di tipo I, fibronectina), dalle piante e dalle alghe, o sintetici (es. *poly-L-lactide*, PLA, *poly-L-lactide-co-glycolide*, PLGA). In ogni caso, per prevenire l'insorgenza di reazioni immuni o infiammatorie dopo l'impianto, lo *scaffold* ideale dovrebbe essere atossico, biocompatibile, poroso e biodegradabile. Come riportato da Trombi et al., (2007), il trapianto delle MSC in *clots* derivati da siero autologo direttamente nella sede della lesione ossea sembra favorire l'attecchimento, la migrazione e la proliferazione di queste cellule nella rigenerazione dell'osso *in vivo*. Inoltre, è stato dimostrato come il *clot* sia in grado di sostenere la proliferazione cellulare e la differenziazione in osteoblasti all'interno del *clot* stesso.

In cardiologia, fino a poco tempo fa si riteneva che i cardiomiociti fossero cellule terminalmente differenziate e che quindi il muscolo cardiaco da solo non possedesse i meccanismi necessari per la riparazione del danno. Tuttavia, alcuni studi hanno evidenziato la presenza di una piccola percentuale di cardiomiociti che mantiene la capacità di proliferare (Kajastura et al., 2000; Leri et al., 2000). Studi effettuati sul cuore umano *post-infartum*, immediatamente dopo la necrosi miocardica e durante le fasi conclamate della cardiopatia ischemica, hanno dimostrato la presenza nel tessuto cardiaco di miociti in mitosi (Beltrami et al.,

2001), suggerendo un loro ruolo sia nella riparazione del tessuto danneggiato sia nel controllo dell'omeostasi nel tessuto sano (Anversa et al., 2002; Wollert et al., 2005). L'origine di tali cellule nel miocardio non è ancora chiara, ma sono state suggerite due ipotesi: - le cellule riparatrici proverrebbero dal midollo osseo e da qui migrerebbero verso il cuore sia come processo di rinnovamento continuo, sia in risposta ad un danno (Orlic et al., 2001; Mathur et al., 2004); oppure - le cellule riparatrici potrebbero rappresentare una popolazione di cellule cardiache non differenziate residenti nel tessuto cardiaco e presenti fin dalla nascita (Oh et al., 2003; Messina et al., 2004). I lavori di alcuni autori hanno mostrato come le MSC inoculate nel miocardio sano abbiano la capacità di differenziare in cellule fenotipicamente simili a cardiomiociti (Pittenger et al., 2000, Toma et al., 2002). Nell'ultimo decennio sono stati messi a punto diversi protocolli terapeutici che prevedevano l'utilizzo di MSC in cuori danneggiati per la riparazione di infarti miocardici (Stamm et al., 2003). Tuttavia, gli studi clinici basati sull'utilizzo delle MSC per la terapia cellulare di un danno miocardico hanno portato a conclusioni contrastanti. Mentre alcuni autori hanno osservato dei benefici dopo l'infusione di MSC per via sistemica o l'iniezione nella sede della lesione (Schachinger et al., 2003), altri hanno invece interrotto la sperimentazione clinica per imprevisti effetti collaterali (Kang et al., 2004).

### 3. Le Cellule Progenitrici Mesodermali (MPC)

Considerata l'impossibilità di avere colture cellulari di MSC omogenee, la ricerca degli ultimi anni è volta all'identificazione di precursori mesenchimali meno eterogenei, con maggiori capacità differenziative ed isolabili *in vivo*.

In questo contesto, come recentemente dimostrato da Petrini et al. (2009), le *Mesodermal Progenitor Cells* (MPCs) rappresentano una nuova popolazione di cellule multipotenti identificata e isolata *in vitro* dal midollo osseo umano. Per cercare di inquadrare da un punto di vista cito-morfologico e molecolare la nuova popolazione cellulare di progenitori mesodermali, in questi ultimi anni gli studi di Petrini et al. (2009), Trombi et al. (2009) e Pacini et al. (2010), hanno stimato le correlazioni e le differenze con la ben più nota popolazione di MSC.

#### 3.1 Morfologia e plasticità differenziativa delle MPC

La prima osservazione di queste cellule è avvenuta *in vitro* nell'allestimento di colture di MSC in presenza di siero umano autologo (hAS). L'osservazione al microscopio in contrasto di fase ha rivelato caratteristiche morfologiche ben distinte fra le due popolazioni cellulari, quali una forma arrotondata con un ispessimento citoplasmatico centrale per le MPC ed una forma a fuso per le MSC.

Inoltre, è stato osservato che in presenza di *fetal bovine serum* (FBS) o *human cord serum* (hCS) le MPC mostrano le caratteristiche morfologiche e fenotipiche tipiche delle MSC sebbene sia stato dimostrato che le MPC rimangono in uno stato

di quiescenza per circa due mesi. L'equivalente capacità differenziativa mesenchimale (osteogenica, condrogenica e adipogenica) compare soltanto nel caso in cui sia stato indotto l'orientamento (*commitment*) con una prima pre-differenziazione *in vitro* in MSC. In aggiunta, come riportato da Petrini et al. (2009), a differenza delle MSC, le MPC sono in grado di differenziare in cellule endoteliali in opportune condizioni colturali. Tale affermazione è suffragata dall'espressione dei marcatori KDR e CD31 (e mancata espressione di CD90 e CD133) e dalla capacità di formare strutture simili a capillari.

Al fine di tipizzare le MSC attraverso l'esplorazione del profilo d'espressione dei marcatori di superficie, le cellule sono state analizzate da un punto di vista citofluorimetrico (FACS) e con microscopia in fluorescenza a tre colori. Le MPC compaiono come cellule CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>neg</sup>, CD45<sup>neg</sup>, CD90<sup>neg</sup> ed esprimono i marcatori tipici delle cellule embrionali: i fattori di trascrizione *Octamer-binding protein* (Oct-4), nanog e la glicoproteina SSEA-4<sup>+</sup>. La rilevazione di Oct-4 e nanog è interessante in quanto tali marcatori sono largamente riconosciuti come marcatori di pluripotenza. In particolare, è noto dalla letteratura che il dimero Oct-4-SOX2 ha un ruolo attivo nel mantenimento della pluripotenza e secondo alcuni autori è uno dei quattro fattori fondamentali necessari per la riprogrammazione delle cellule adulte in staminali indotte (Che et al., 2008; Yamanaka et al., 2006). Benchè sia stato dimostrato che le MPC non esprimono SOX2, è stato dimostrato che la variante espressa SOX15 sia capace di legare Oct4 ed agire in sinergia con esso (Maruyama et al., 2009). Inoltre, è stato proposto un modello secondo il quale Oct4 dimerizza con SOX15 e attiva percorsi alternativi a quelli regolati dall'eterodimero Oct4/SOX2 (Pacini et al., 2010).

## 4. Adesione cellulare

La matrice extracellulare (ECM), secreta dalle cellule stesse, conferisce ai tessuti molte delle loro caratteristiche fisiche, consente la diffusione di metaboliti ed anaboliti e veicola segnali cellulari. L'ECM subisce un *turnover* continuo delle proteine che la compongono ed in caso di danni tissutali può essere digerita da enzimi quali le metalloproteinasi e la serinproteasi per consentire la motilità cellulare attraverso la lamina basale. Più in generale, il ruolo di collegamento tra i segnali in entrata e uscita dalla cellula verso la matrice ed altre cellule è essenzialmente affidato alle integrine ed, in parte minore, ad alcuni proteoglicani transmembrana. Qui di seguito è riportata la struttura e la funzione delle integrine e del recettore di membrana CXCR4.

### 4.1 Le integrine

Le integrine sono una superfamiglia di recettori eterodimeri di almeno 24 glicoproteine transmembrana nell'uomo, costituite dalle subunità  $\alpha$  e  $\beta$  legate non covalentemente fra loro. Ogni subunità della glicoroteina è formata da un complesso dominio N-terminale extracellulare che contiene il sito di legame per il ligando e da una corta coda C-terminale citoplasmatica che si lega al citoscheletro tramite proteine adattatrici. Nell'uomo esistono 24 possibili combinazioni fra diversi tipi di subunità  $\alpha$  e  $\beta$  e le diverse integrine che ne derivano sono correlate con diverse funzioni e quindi espresse in maniera ubiquitaria o specifica. Ogni diverso

eterodimero è in grado di legare un tipico repertorio di cellule, ligandi citoplasmatici e proteine della matrice extracellulare (Calderwood et al., 2004). Le integrine ed i rispettivi ligandi sono riportati nella tabella 1. Fra i ligandi presenti nella matrice extracellulare si contano la fibronectina, laminina, collagene, vitronectina e membri della famiglia SIBLINGs (*Small Integrin Binding Ligand, N-linked Glycoproteins*). Fra i ligandi costituiti dai recettori di membrana si contano VCAM-1 e ICAM-1/3. Inoltre, alcune integrine facilitano la comunicazione fra cellule attraverso molecole mediatrici, come nel caso di  $\alpha 2\beta 3$  che media il legame fra piastrine-fibrinogeno e piastrine-fattore di von Willebrand (Ivaska et al., 2000). Esistono anche numerose proteine citoplasmatiche in grado di legarsi alla porzione transmembrana e citoplasmatica delle integrine per modularne il meccanismo d'azione o aumentarne l'affinità per il substrato. In questo modo l'integrina può agire trasportando informazioni nelle due direzioni: il legame di certe molecole all'esterno può attivare una trasduzione del segnale all'interno della cellula (*outside-in signalling*), allo stesso modo un certo segnale cellulare può essere comunicato all'esterno tramite l'attivazione delle integrine (*inside-out signalling*). Un esempio di via di segnale *inside-out* è dato dall'inositolo bisfosfato (PIP2) che promuove l'attivazione della talina nel rafforzare l'affinità per il substrato extracellulare. Questo dimostra come le integrine non siano delle mere strutture di ancoraggio ma siano soggette a regolazione. In particolare, alcune evidenze mostrano una regolazione allosterica con conseguente modifica conformazionale dell'eterodimero e modulazione del segnale.

In assenza del ligando l'integrina assume una conformazione ripiegata inattiva, soltanto la presenza del ligando è capace di attivare la glicoproteina promuovendo la formazione dell'eterodimero. La formazione del complesso ligando-recettore

promuove un cambiamento di conformazione tridimensionale che permette all'integrina di muoversi all'interno della membrana e formare siti di adesione focale. Tali siti assicurano l'adesione al substrato e rappresentano il sito di legame dei filamenti di actina. Inoltre, essi sono necessari per stabilire la polarità e la migrazione cellulare.

## 4.2 Emidesmosomi ed adesioni focali

Due delle principali strutture di adesione in cui sono coinvolte le integrine sono gli emidesmosomi e le adesioni focali.

Gli emidesmosomi sono il più comune sistema di ancoraggio delle cellule epiteliali alla matrice extracellulare. Qui l'integrina  $\alpha 6\beta 4$  è fortemente espressa e si lega assieme ad una proteina dell'ECM, il collagene XVII e alla laminina, il componente principale della lamina basale. Dal lato citoplasmatico invece l'integrina ed il collagene XVII legano due proteine: la distonina e la plectina le quali interagiscono non con l'actina come solitamente succede ma con dei filamenti intermedi di cheratina.

Le adesioni focali sono strutture che integrano il segnale di adesione dando il via ad una trasduzione del segnale verso il nucleo. Nel sito di adesione tra cellula e matrice, per opera di diverse integrine, le proteine talina o paxillina, che si legano alle subunità rispettivamente  $\alpha$  e  $\beta$ , reclutano la chinasi FAK, una tirosinchinasi. Le molecole di FAK si fosforilano tra loro una volta reclutate attivandosi e creando un sito di ancoraggio per SRC, un'altra tirosinchinasi. SRC fosforila a sua volta alcune

proteine tra cui FAK su un particolare residuo di tirosina (Tyr). Si crea così un punto di ancoraggio per diverse proteine attivando anche la via della MAP chinasi.

### 4.3 Il recettore di membrana CXCR4

Il recettore *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR-4), anche noto come proteina CD184, è un recettore transmembrana accoppiato a proteine G, specifico per una chemochina conosciuta come *stromal-derived-factor-1* (SDF-1 o CXCL12) (Moriuchi et al., 1997; Caroz et al., 1998). L'attività delle chemochine e dei loro recettori è coinvolta in numerosi processi fisiologici, che includono la mobilitazione cellulare e l'*homing* delle cellule progenitrici ematopoietiche (Gazitt et al., 2004; Kucia et al., 2005). In particolare, CXCL12 ha un ruolo importante nella mobilitazione delle cellule progenitrici ematopoietiche promuovendo l'inattivazione mediata da proteasi. Inoltre, il riconoscimento di CXCL12 da parte di CXCR4 e la conseguente formazione del complesso ligando-recettore genera una cascata di segnali intracellulari che portano all'attivazione di specifiche molecole di adesione come VLA-4 e LAF-1, (Christopherson et al., 2004). Tali molecole svolgono un ruolo importante nel promuovere l'*homing* delle cellule progenitrici ematopoietiche, come mostrato da studi di *engraftments* di cellule ematopoietiche non differenziate e cellule cancerogene della prostata e del seno (Muller et al., 2001; Wynn et al., 2004).

#### 4.4 Strutture cellulari di invasione: il podosoma e l'invadosoma

Oltre ad adesioni focali sono state descritte anche altre strutture cellulari che conferiscono alla cellula sia la capacità di aderire che quella di degradare la matrice.

Due strutture strettamente correlate tra loro ed analizzate in questo lavoro sono il podosoma e l'invadosoma (Petruzzelli 1999).

Il podosoma è una struttura originariamente descritta come di forma anulare o di punto ricca in actina ed identificata in fibroblasti trasformati dal virus del sarcoma di Rous. Ad oggi questa struttura è stata descritta in varie tipologie cellulari, vi sono stati quindi diversi cambiamenti nel formalismo della definizione, secondo i quali il podosoma è una struttura di adesione altamente dinamica, ricca in actina e ritrovata in cellule di derivazione monocitaria, cellule di carcinoma e alcuni fibroblasti trasformati (Ghrontos et al., 2001). Il podosoma è una struttura formata da un core actinico circondato da una serie di componenti che si possono ritrovare anche nelle adesioni focali. Negli ultimi anni i podosomi sono emersi come strutture con un'importanza fisiologica e non solo come dei semplici artefatti dovuti alla cultura *in vitro* (Linder et al., 2006). Nella formazione e regolazione del podosoma sono implicate diverse chinasi, in particolare SRC, FAK, GTPasi della famiglia Rho come Rac1, RhoA e Cdc42, ma anche strutture citoscheletriche come i microtubuli e i filamenti intermedi. Un particolare ruolo nella polimerizzazione dell'actina è assunto dal complesso Arp2/3 specifico per questo tipo di strutture. I podosomi appaiono localizzati nella periferia cellulare e sono piuttosto instabili e in continua formazione, la loro durata media è infatti di 2-10 minuti (Spinardi, 2006).

Gli invadosomi invece hanno un tempo di *turnover* molto più lungo (alcune ore), la loro collocazione è sia periferica che in concomitanza del nucleo e

condividono numerose componenti molecolari con i podosomi. Mentre i podosomi svolgono un ruolo sia in processi d'invasione che di adesione cellulare, lo stesso non si può dire per gli invadosomi, dove non vi sono evidenze certe che confermino una loro implicazione in fenomeni adesivi. Gli invadosomi inoltre appaiono più grandi (max 8 x 5um) rispetto ai podosomi (max 1 x 0,4um) (Spinardi et al., 2006). Mentre i podosomi sono stati descritti su monociti, cellule epiteliali e cellule muscolari lisce, gli invadosomi sono stati individuati con certezza su particolari cellule tumorali e fibroblasti trasformati, ma questo non esclude che essi possano trovarsi anche su cellule sane. Per l'identificazione sia di podosomi sia di invadosomi sono stati proposti diversi marcatori, ma non esistono molecole che possano da sole identificare in modo specifico la presenza di tali strutture. Un interessante indizio è però la presenza di *dot* actinici polimerizzati circondati da diverse molecole tra cui la gelsolina, la vinculina, alcune integrine tra cui la  $\beta 2$ . Da tenere in considerazione è anche la presenza di cortactina, fosfotirosina, WASp e del complesso Arp2/3 così come l'assenza di *Focal Adhesion Kinase* (FAK) e la sintesi di metalloproteinasi specifiche (MMP2/7/8/9/12) (Linder et al. 2006). Inoltre, l'espressione indotta di Cdc42 attiva la formazione di strutture podosomiali complete ma non funzionanti, per questo oltre ai *marker* molecolari sono necessari *test* funzionali di invasione e di digestione dell'ECM per poter identificare una struttura podosomiale (Linder et al. 2006).

## 5. Scopo della tesi

Le cellule progenitrici mesenchimali (MPC) sono una popolazione cellulare umana, recentemente isolata, di precursori mesenchimali poco differenziati.

Poiché le molecole di adesione giocano un ruolo fondamentale nei processi di mobilitazione e nel mantenimento dell'omeostasi della nicchia emopoietica abbiamo scelto di focalizzare l'attenzione di questo studio sulle integrine e le metalloproteinasi espresse dalle MPC. Il profilo di espressione di queste molecole è stato stimato in rapporto alle più studiate cellule mesenchimali stromali (MSC) tramite FACS, immunofluorescenza e RTq-PCR. A tal fine, sono state allestite colture selettive delle due popolazioni cellulari e sono stati individuati ed analizzati 85 geni che codificano per molecole implicate nel processo di adesione ed invasione cellulare. La stima della purezza delle due popolazioni cellulari in coltura mista, attraverso un'attenta analisi morfologica e citofluorimetrica, ha permesso di confrontare i dati ottenuti dall'indagine molecolare con quelli ottenuti tramite separazione al FACS. L'analisi statistica ha permesso di stimare l'espressione genica di molecole di adesione tra queste due popolazioni ponendo particolare attenzione a quelle significativamente espresse sulle MPC. Su questa base, è stato possibile effettuare un'analisi proteica ed ipotizzare un ruolo strutturale e funzionale dei prodotti d'espressione.

# **MATERIALI E METODI**

## **1. Raccolta Campioni**

Per questo studio sono stati raccolti campioni di sangue midollare di pazienti ortopedici, sottoposti ad interventi di installazione di protesi d'anca (Dipartimento di Ortopedia, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana - AOUP). Durante l'intervento sono stati aspirati da cinque a dieci millilitri di sangue midollare, proveniente dalla canalizzazione femorale, mediante siringhe contenenti almeno 2500 UI di eparina sodica (Roche, Basilea – Svizzera ) per prevenire la coagulazione.

Su un totale di 16 pazienti (nove uomini e sette donne tra i 66 e 71 anni) che hanno firmato il consenso informato secondo la convenzione di Helsinki, sei sono stati utilizzati per ottenere colture pure di MSC ed MPC mentre i restanti campioni sono stati utilizzati per ottenere colture miste come di seguito descritto

## 1.1 Arricchimento della frazione di cellule mononucleate midollari

I campioni di sangue midollare sono stati diluiti nel rapporto di 1:4 con tampone D-PBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*, Invitrogen - Carlsbad CA USA), successivamente stratificati su un gradiente di densità discontinuo (Lymphoprep 1.077g/ml, Axis-Shield - Oslo, Norway -) e centrifugati a 400 rcf per 20 minuti. Al termine della centrifuga la frazione costituita da cellule mononucleate risulta visibile come un anello biancastro all'interfaccia del gradiente (*Bone Marrow Mononuclear Cells* - BMMNCs). Questa popolazione è stata raccolta con pipette *pasteur* e lavata per due volte con tampone D-PBS a 400 rcf per 5 minuti.

Al fine di determinare la concentrazione e la vitalità cellulare, una piccola aliquota (10 µl) di sospensione cellulare è stata diluita nel rapporto di 1:2 con Trypan bleu e successivamente contata manualmente al microscopio ottico invertito mediante l'uso di emocitometro di Bürker.

## 2. Colture primarie di cellule midollari mononucleate

Principi del metodo: L'allestimento in coltura di cellule di organismi complessi è una metodologia che permette di far crescere le cellule al di fuori di un organismo ricreando in laboratorio condizioni il più possibile simili a quelle fisiologiche. Benchè la crescita *in vitro* non rispecchi fedelmente quella *in vivo*, alcuni vantaggi contano: l'elevato controllo delle condizioni sperimentali, la possibilità di sviluppare un solo clone cellulare e la possibilità di eludere problemi pratici ed etici legati all'impiego di

animali. La crescita delle cellule in coltura è assicurata dalla presenza di elementi nutritivi di base (glucosio, amminoacidi e sali minerali) e fattori di crescita (presenti nel siero) nel terreno di coltura. Per mantenere fisiologico il pH cellulare nella piastra di coltura, la produzione di anaboliti in seguito all'attività cellulare è tamponata all'interno di un incubatore con iniettore di CO<sub>2</sub> al 5%. Per ridurre il rischio di contaminazione da batteri e miceti il terreno è supplementato con antibiotici e antimicotici. Le colture si definiscono in sospensione, quando le cellule crescono senza aderire alla superficie della piastra di coltura ed in adesione nel caso opposto. Per mantenere la crescita delle cellule in sospensione è sufficiente effettuare l'aggiunta di terreno in tempi determinati. Il cambio parziale di terreno, nelle piastre adibite alla crescita delle cellule in adesione, permette di aumentare l'area della superficie della piastra disponibile all'adesione cellulare. L'utilizzo di enzimi proteolitici che facilitano il distacco delle cellule dalla piastra permette di ottenere colture secondarie, terziarie, ecc.

## 2.1 Coltura selettiva di Cellule Mesenchimali Stromali (MSC)

Le cellule della frazione arricchita in BMMNCs sono state piastrate alla densità di  $2 \cdot 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> in fiasche pretrattate per colture aderenti (Corning - New York, NY USA) e contenenti un terreno di coltura costituito da *Dulbecco's modified Eagle medium* a bassa concentrazione di glucosio (DMEM-LG), supplementato con L-glutamina 1mg/l (Invitrogen), gentamicina solfato 100 µg/ml (Invitrogen), e il 10% di siero bovino fetale (*fetal bovine serum*, FBS - Invitrogen).

Le cellule sono state mantenute in incubatore (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) ed il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 48 ore per rimuovere le cellule non aderenti; successivamente le colture sono state mantenute con due cambi settimanali di terreno.

Al raggiungimento della confluenza di almeno l'80% (10-15 giorni) la coltura è stata lavata con tampone D-PBS e sottoposta a distacco cellulare con l'impiego di un mix di proteasi commerciale (TrypLE Select, Invitrogen) in un volume sufficiente a coprire l'intera superficie della piastra. Dopo incubazione per 30 minuti (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) sono state raccolte le cellule distaccate. Talvolta si è presentata la necessità di completare il distacco ricorrendo all'azione meccanica di *cell-scraper* in presenza di tampone.

Le cellule recuperate e lavate in tampone D-PBS sono stata contate, sottoposte a validazione citofluorimetrica come di seguito descritto e eventualmente inviate ad analisi successive.

## 2.2 Coltura selettiva di Cellule Progenitrici Mesodermali (MPC)

Le cellule della frazione arricchita in BMMNCs sono state seminate alla densità di  $8 \cdot 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> in plastiche idrofobiche per colture in sospensione (Corning - New York, NY USA). In accordo con Trombi et al. (2009) le cellule sono state coltivate in un terreno di coltura costituito da *Dulbecco's modified Eagle medium* a bassa concentrazione di glucosio (DMEM-LG), L-glutamina 1mg/l (Invitrogen), gentamicina solfato 100 µg/ml (Invitrogen), ed il 10% di un *pool* di sieri umani

commerciale, preparato da donatori maschi di gruppo sanguigno AB (PhABS - Lonza - Walkersville, MD USA).

Le cellule sono state mantenute in incubatore (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) ed il mezzo di coltura è stato rimosso totalmente dopo 48 ore per eliminare le cellule non aderenti; successivamente la coltura primaria è stata mantenuta con due cambi di terreno alla settimana.

Dopo dieci-dodici giorni le cellule sono state lavate con tampone D-PBS e successivamente distaccate con TrypLE Select® (Invitrogen) come descritto sopra. Le cellule così recuperate e lavate in tampone D-PBS sono stata contate, sottoposte a validazione citofluorimetrica ed eventualmente inviate ad analisi successive.

### 2.3 Allestimento di colture miste MSC/MPC

Le cellule della frazione arricchita in BMMNCs sono state seminate alla densità di  $8 \cdot 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> in fiasche trattate per colture aderenti (Corning - New York, NY USA). Al mezzo di coltura, costituito da *Dulbecco's modified Eagle medium* a bassa concentrazione di glucosio (DMEM-LG) e supplementato con L-glutammina 1mg/l (Invitrogen) e gentamicina solfato 100 µg/ml (Invitrogen), è stato aggiunto sia il 5% di PhABS sia il 5% di FBS.

Le cellule sono state mantenute dai dieci ai quindici giorni in incubatore (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) e successivamente distaccate con TrypLE Select® (Invitrogen) per le analisi successive.

## 2.4 Validazione citofluorimetrica delle colture selettive

Per verificare la purezza delle colture selettive di MSC e MPC ottenute con i metodi colturali sopracitati, un'aliquota delle cellule è stata sottoposta a immunofenotipizzazione a tre colori. Approssimativamente  $2.5 \cdot 10^4$  cellule sono state lavate in D-PBS addizionato con lo 0.05% di *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma, St.Louis, - MO USA) e lo 0.1 % di  $\text{NaN}_3$  (Sigma). In accordo con Pacini et al. (2010) le cellule sono state incubate ( $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  per 30 minuti) con i seguenti anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi: CD90 PE-Cy5 (BectonDickinson, San Josè - CA USA), SSEA 4-AlexaFluor 488 (Biolegend, San Diego - CA USA), MSCA 1-PE (Miltenyi Biotec, Gladbach - GER).

Al termine dell'incubazione, le cellule così marcate sono state lavate in tampone D-PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$  e sono state analizzate al citofluorimetro (FACSCanto™ II *cytometer*, Becton Dickinson, San Jose - CA, USA) equipaggiato con il *software* FACSDiva™.

Per validare le colture di MPC ( $\text{SSEA4}^+ \text{MSCA-1}^{\text{neg}} \text{CD90}^{\text{neg}}$ ), la componente mesenchimale ( $\text{SSEA4}^{\text{neg}} \text{MSCA-1}^+ \text{CD90}^{\text{bright}}$ ) doveva risultare inferiore al 2% delle cellule totali. Similarmente, la componente MPC nelle colture delle MSC doveva anch'essa non superare il limite del 2% delle cellule totali.

### **3. RTq-PCR array per l'espressione di proteine della matrice e molecole di adesione**

Principio del metodo: Tra i metodi principali della biologia molecolare utilizzati negli ultimi anni, la tecnica della PCR quantitativa (q-PCR) è quella più utilizzata per applicabilità e versatilità. Si tratta di una reazione a Catena della DNA Polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) in presenza di molecole fluorescenti (Sybr Green) il cui andamento (fase di latenza, amplificazione logaritmica e *plateau*) può essere visualizzato tramite la fluorescenza espressa in funzione del numero di cicli effettuati. Per ogni coppia di *primers* utilizzati, il numero di cicli necessari perché i livelli di fluorescenza superino una data soglia sono inversamente proporzionali al numero di copie di cDNA presenti nel campione.

#### **3.1 estrazione di RNA totale**

Per le sospensioni cellulari ottenute da colture pure di MPC e MSC, l'RNA totale è stato estratto da un *pellet* cellulare di circa  $2.5 \cdot 10^5$  impiegando l'Rneasy Micro Kit (Quiagen, Hilden - Germany) secondo le indicazioni della ditta produttrice, che include un trattamento con DNasi su colonna.

Per determinare la concentrazione dei campioni ottenuti una piccola aliquota è stata letta allo spettrofluorimetro. La concentrazione dell'RNA totale è stata misurata come direttamente proporzionale al picco di maggiore intensità sullo spettro di fluorescenza. Per valutare lo stato di frammentazione dell'RNA totale estratto,

impossibile da verificare allo spettrofluorimetro, un'aliquota dei campioni è stata sottoposta ad elettroforesi capillare con lo strumento BioAnalyzer (Agilent).

### 3.2 retrotrascrizione ed amplificazione del cDNA

Una quantità di 100ng di RNA totale per ogni campione è stata retro-trascritta e arricchita in DNA complementare (cDNA) utilizzando il QuantiTect Whole Transcriptome kit (Quiagen) secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

### 3.3 Amplificazione dei geni codificanti per le molecole di adesione e proteine della EMC

L'analisi del profilo di espressione dei geni codificanti le molecole di adesione e della matrice extracellulare è stata eseguita con l'impiego dell'*Extracellular Matrix and Adhesion Molecules RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR array kit* (SA Bioscience, Quiagen). Le amplificazioni dei geni *target* sono state eseguite utilizzando 84 coppie di *primers* direttamente liofilizzate sul fondo di una piastra a 96 pozzetti. Il kit inoltre prevede ulteriori 12 pozzetti per allestire gli opportuni controlli. Il nome di ogni *primers*, unitamente alla regione *target* identificata, è riportato in tabella (Tabella 1). Ogni miscela di reazione è stata realizzata impiegando 102µl cDNA totale, 1350µl di miscela di reazione ed acqua q.b. a 2700µl. Il processo di amplificazione dopo una prima

denaturazione per 10 min a 95°C, prevede 40 cicli di amplificazione costituiti da una fase di denaturazione per 15 sec a 95°C ed, una di *annealing* ed estensione dell'amplicone per 1 minuto a 60°C. Per ogni amplificazione si è sempre avuto cura di preparare un campione di controllo (senza cDNA) per verificare eventuali falsi positivi, un campione per verificare l'efficienza di amplificazione ed un altro campione per verificare la contaminazione da DNA genomico. L'analisi computazionale è stata svolta tramite il *software* PCR Array Data Analysis (SA Biosciences). In accordo con Livak et al. (2001) è stata effettuata l'analisi quantitativa relativa secondo il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizzando i geni *housekeeping* di riferimento GAPDH e HPRT1 (RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR array kit, SA Bioscience, Quiagen). I geni sono considerati diversamente espressi nelle MSC e nelle MPC quando differiscono per almeno un logaritmo. L'espressione di un gene è considerata “consistente” quando il gene è espresso per valori uguali o maggiori a 0,01; “debole” quando il valore è compreso tra 0,01 e 0,001 e “non espresso” quando il valore è minore di 0,001.

### 3.4 Amplificazione del gene codificante per CXCR4

L'amplificazione del gene per il recettore di membrana CXCR4 è stata eseguita utilizzando due *sets* di *primers* disegnati con Beacon Designer (BioRad). I codici identificativi della Banca Dati GeneBank per la sequenza individuata da ogni *sets* di *primers* e la composizione in basi sono i seguenti: *forward*: (5'-GCT TGC TGA ATT GGA AGT GAA TG-3') e *reverse*: (5'-CCA CAA TGC CAG TTA AGA AGA TGA-3') con codice di accesso NM\_001008540 per l'amplificazione della variante 1 di

*spleacing*; forward (5'-CAG CAG GTA GCA AAG TGA-3') e reverse (5'-TCG GTG TAG TTA TCT GAA GTG-3') con codice di accesso NM\_003467 per la variante 2 di *spleacing*. Tutte le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel termociclatore iCycler-iQ5 Optical System (Bio-Rad, Hercules CA-USA). Il processo di amplificazione e l'analisi qualitativa e quantitativa del prodotto finale sono stati eseguiti come descritto sopra.

**Tabella 1** Sono riportati i codici identificativi della Banca Dati *GeneBank* per le sequenze geniche delle 84 molecole analizzate, unitamente alla nomenclatura HGNC (*The HUGO Gene Nomenclature Committee*). Nell'ultima colonna è riportato per esteso il nome della molecola corrispondente

GeneBank	Simbolo HGNC	Descrizione						
NM_006988	ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1						
NM_139025	ADAMTS13	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13						
NM_007037	ADAMTS8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8						
NM_000610	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)						
NM_004360	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)						
NM_001843	CNTN1	Contactin 1						
NM_080629	COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1						
NM_004370	COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1						
NM_021110	COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1						
NM_001855	COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1						
NM_001856	COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1						
NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1						
NM_001846	COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2						
NM_000093	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1						
NM_001848	COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1						
NM_001849	COL6A2	Collagen, type VI, alpha 2						
NM_000094	COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1						
NM_001850	COL8A1	Collagen, type VIII, alpha 1						
NM_004385	VCAN	Versican						
NM_001901	CTGF	Connective tissue growth factor						
NM_001903	CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa						
NM_001904	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa						
NM_001331	CTNND1	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1						
NM_001332	CTNND2	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)						
NM_004425	ECM1	Extracellular matrix protein 1						
NM_002026	FN1	Fibronectin 1						
NM_001523	HAS1	Hyaluronan synthase 1						
NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1						
NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1						
NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)						
NM_002204	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)						
NM_000885	ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)						
NM_002205	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)						
NM_000210	ITGA6	Integrin, alpha 6						
NM_002206	ITGA7	Integrin, alpha 7						
NM_003638	ITGA8	Integrin, alpha 8						
NM_002209	ITGAL	Integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)						
NM_000632	ITGAM	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)						
NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)						
NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)						
NM_000211	ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)						
NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)						
NM_000213	ITGB4	Integrin, beta 4						
NM_002213	ITGB5	Integrin, beta 5						

<b>GeneBank</b>	<b>Simbolo HGNC</b>	<b>Descrizione</b>				
NM_000216	KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence				
NM_005559	LAMA1	Laminin, alpha 1				
NM_000426	LAMA2	Laminin, alpha 2				
NM_000227	LAMA3	Laminin, alpha 3				
NM_002291	LAMB1	Laminin, beta 1				
NM_000228	LAMB3	Laminin, beta 3				
NM_002293	LAMC1	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)				
NM_002421	MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)				
NM_002425	MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)				
NM_005940	MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)				
NM_002426	MMP12	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)				
NM_002427	MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)				
NM_004995	MMP14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)				
NM_002428	MMP15	Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)				
NM_005941	MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)				
NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)				
NM_002422	MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)				
NM_002423	MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)				
NM_002424	MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)				
NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)				
NM_000615	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1				
NM_000442	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule				
NM_000450	SELE	Selectin E				
NM_000655	SELL	Selectin L				
NM_003005	SELP	Selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)				
NM_003919	SGCE	Sarcoglycan, epsilon				
NM_003118	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)				
NM_003119	SPG7	Spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)				
NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1				
NM_000358	TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa				
NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1				
NM_003247	THBS2	Thrombospondin 2				
NM_007112	THBS3	Thrombospondin 3				
NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1				
NM_003255	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2				
NM_000362	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3				
NM_003278	CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B				
NM_002160	TNC	Tenascin C				
NM_001078	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1				
NM_000638	VTN	Vitronectin				
NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin				
NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1				
NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a				
NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase				
NM_001101	ACTB	Actin, beta				
SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination				

## 4. Citofluorimetria

Principio del metodo: la citofluorimetria a flusso o *Fluorescece-Activated Cell Sorting* (FACS) nasce verso la fine degli anni '60 per analizzare dati multipli relativi sia alle caratteristiche fisiche di un campione cellulare sia alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali generati e raccolti dal sistema ottico del citofluorimetro, dotato di un laser ad ioni Argon con una potenza di 15mW che emette a 488nm, sono analizzati tramite specifici *software* interfacciati allo strumento. Tale lunghezza d'onda consente un efficace misura dei parametri fisici e può eccitare contemporaneamente almeno tre differenti fluorocromi che abbiano stessa  $\lambda_{\text{assorbimento}}$  ma diversa  $\lambda_{\text{emissione}}$  (FICT e Alexa Fluor 488 emettono nel verde, PE e Alexa Fluor 555 emettono nel rosso, PE/Cy5 emettono nel viola). Questa metodica consente la misurazione delle caratteristiche fisiche e chimiche di singole particelle microscopiche tramite focalizzazione idrodinamica. Secondo questo principio le cellule sono forzate ad allinearsi e passare singolarmente (eventi) in un punto di misura attraversato dal fascio di luce del sistema di eccitazione. Per ogni singolo evento una batteria di fotomoltiplicatori registra sia segnali di *scatter* (*forward scatter* FSC e *forward scatter*, SSC) che segnali di fluorescenza nei diversi canali di emissione. I valori riportati su un grafico bidimensionale (citogramma) permettono di identificare diverse popolazioni cellulari mediante la definizione di regioni che sono disegnate direttamente sul citogramma (*gate*). Questo rende possibile la definizione di regioni in relazione a parametri morfologici, basata sulla dimensione del diametro cellulare (FSC) e della complessità cellulare (SSC), nonché alla presenza di anticorpi marcati con fluorocromi differenti, attraverso la misura delle emissioni fluorescenti.

#### 4.1 Analisi citofluorimetrica delle integrine in colture miste

Al fine di confermare i dati molecolari riguardanti l'espressione di specifiche integrine nelle due popolazioni cellulari di MPC ed MSC, 6 campioni di coltura mista ottenuti secondo il procedimento descritto precedentemente, sono stati processati per l'analisi citofluorimetrica. In questo studio sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: CD90 PE-Cy5, CD105-FITC, CD49f-PE (integrina  $\alpha_6$ ), CD18-APC (integrina  $\beta_2$ ), CD11a-FITC (integrina  $\alpha_L$ ), CD11b-PE (integrina  $\alpha_M$ ), CD11c-PE (integrina  $\alpha_X$ ) (BectonDickinson, San Josè - CA USA).

Sulla base del segnale di *side scatter* (SSC) e dell'espressione di CD90 PE-Cy5 sono state discriminate le due popolazioni di MPC (SSC<sup>high</sup> CD90<sup>neg</sup>) e MSC (SSC<sup>low</sup> CD90<sup>bright</sup>). All'interno delle due popolazioni cellulari è stata successivamente analizzata l'espressione delle diverse integrine.

#### 4.2 Analisi citofluorimetrica del recettore CXCR4 in colture miste

Al fine di confermare i dati molecolari riguardanti l'espressione del recettore di membrana CXCR4 nelle due popolazioni cellulari di MPC ed MSC, gli stessi 6 campioni di coltura mista ottenuti secondo il procedimento descritto precedentemente, sono stati sottoposti ad indagine citofluorimetrica. Gli anticorpi utilizzati sono qui di seguito riportati: CD90 PE-Cy5, CD105-FITC, CD18-APC e CD184PE-Cy5 (BectonDickinson, San Josè - CA USA).

Le MSC e le MPC sono state discriminate come riportato sopra e all'interno delle due popolazioni cellulari è stata successivamente analizzata l'espressione di CXCR4.

## **5. Microscopia a fluorescenza**

Principio del metodo: L'immunofluorescenza è una tecnica di microscopia ottica che richiede l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza. Questo tipo di microscopio possiede un dispositivo che tramite un fascio di luce nell'ultravioletto eccita il campione opportunamente preparato e marcato con anticorpi coniugati a fluorocromi e filtra la luce emessa. La marcatura è definita diretta quando la reazione anticorpale avviene tra specifiche proteine eventualmente presenti nel campione ed anticorpi marcati (anticorpi primari). La marcatura è indiretta quando la reazione anticorpale avviene tra gli antigeni e gli anticorpi primari non marcati di seguito rilevati da anticorpi coniugati ad un fluorocromo (anticorpi secondari) e prodotti in specie differenti dall'anticorpo primario. Solitamente un microscopio a fluorescenza permette di visualizzare almeno tre tipi di fluorocromi con diversa lunghezza d'onda di emissione. Oltre a marcature con anticorpi si possono utilizzare fluorocromi capaci di legare strutture cellulari; un esempio è il 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI), un fluorocromo capace di attraversare la membrana cellulare e legarsi fortemente a regioni ricche in A-T rendendo così i nuclei fluorescenti.

## 5.1 Analisi microscopica in fluorescenza delle integrine in colture miste

Le colture miste sono state allestite in *double-chambers slides* (Lab-Tek, Nunc, Rochester – NY USA). I vetrini sono stati fissati per 15 minuti in *periodate-lysine-paraformaldheyde* (PLP) e successivamente permeabilizzati con Triton-X 100 0,05% per 30 minuti. Per la marcatura indiretta delle integrine sono stati utilizzati anticorpi primari prodotti nel topo e diretti contro le integrine  $\alpha_6$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_4$ , gelsolina (ABCam, Cambridge – UK) e paxillina (BectonDickinson). Per la marcatura indiretta di integrine  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$  (ABCam, Cambridge – UK), sono stati utilizzati anticorpi primari prodotti nel coniglio. Per la rilevazione anticorpale delle prime è stato utilizzato il *Goat anti mouse SFX kit* (Invitrogen), contenente anticorpi secondari coniugati con il fluorocromo Alexa Fluor 488 ( $\lambda_{\text{assorbimento}} = 499$ ;  $\lambda_{\text{emissione}}$  nel verde = 519) (Invitrogen). La rilevazione anticorpale delle integrine  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$ , è stata eseguita mediante l'utilizzo del *Goat anti rabbit IgG (H+L) kit* (Invitrogen) contenente anticorpi secondari coniugati con il fluorocromo DyLight 549 ( $\lambda_{\text{assorbimento}} = 562$ ;  $\lambda_{\text{emissione}}$  nel rosso = 576) (KPL, Gaithersburg - MD USA ).

Per la marcatura diretta della F-actina è stato utilizzato la tossina falloidina coniugata con il fluorocromo Alexa Fluor 555 ( $\lambda_{\text{assorbimento}} = 553$ ;  $\lambda_{\text{emissione}}$  nel rosso = 568) (Invitrogen), che lega direttamente i filamenti di F-actina.

Tutti i vetrini preparati come riportato sopra sono stati trattati con il montante *Prolong Gold antifade*, contenente il fluorocromo (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI ( $\lambda_{\text{assorbimento}} = 345$ ;  $\lambda_{\text{emissione}}$  nel blu = 455) per localizzare i nuclei cellulari (Invitrogen).

Tutte le immagini sono state acquisite ad un microscopio a fluorescenza DMR (Leica, Wetzlar Germany) ed elaborate con il *software* CW4000 (Leica, Wetzlar Germany).

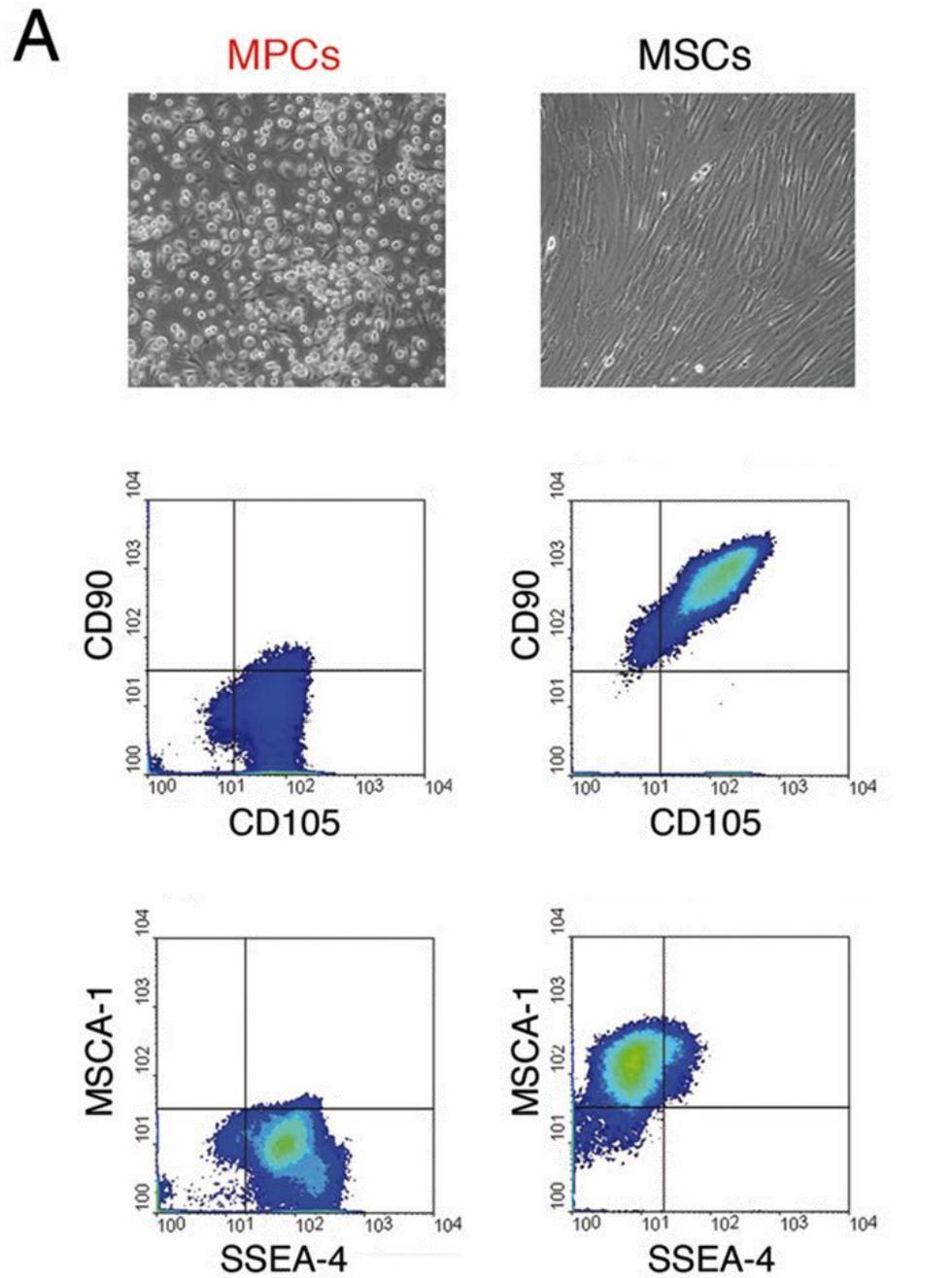
# RISULTATI

## 1. Coltura cellulare: Validazione citofluorimetrica

I campioni coltivati in condizioni selettive hanno prodotto culture altamente monomorfiche. Le cellule cresciute in terreno supplementato con FBS mostravano la tipica morfologia fusiforme delle MSC; le cellule cresciute in terreno supplementato con PhABS si presentavano invece di forma arrotondata, risultando altamente rifrangenti al microscopio a contrasto di fase (MPC). L'analisi citofluorimetrica delle cellule distaccate, ha confermato il fenotipo e la purezza delle colture selettive ottenute. In particolare, le colture PhABS erano costituite per la quasi totalità da cellule con elevato *scatter* laterale (SSC) e con fenotipo SSEA4<sup>+</sup> MSCA-1<sup>neg</sup> CD90<sup>neg</sup>. Al contrario, le cellule coltivate in FBS mostravano bassi valori di SSC e fenotipo tipicamente mesenchimale SSEA4<sup>neg</sup> MSCA-1<sup>+</sup> CD90<sup>bright</sup>. In due delle sei colture primarie allestite, la componente mesenchimale nelle colture PhABS era superiore al

*cut-off* del 2% (Figura 1). Di conseguenza, i corrispondenti campioni sono stati esclusi dalla successiva analisi molecolare.

**Figura 1** cellule progenitrici mesodermali (MPC) e cellule stromali mesenchimali (MSC). In alto sono riportate le immagini al microscopio ottico invertito che mostrano la diversa morfologia delle due popolazioni (rotondeggiante per le MPC e fusiforme per le MSC); in basso, la caratterizzazione citofluorimetrica delle due popolazioni:  $SSEA4^+ MSCA-1^{neg} CD90^{neg}$  (MPC) e  $SSEA4^{neg} MSCA-1^+ CD90^{bright}$  (MSC).



## 2. Analisi delle molecole di adesione

### 2.1 RTq-PCR array

L'analisi molecolare dei geni codificanti per le molecole di adesione e le proteine della matrice extracellulare, ha permesso di ottenere una loro quantificazione relativa all'interno delle due popolazioni cellulari. Tali geni codificano per proteine della matrice (Collagene, laminina, fibronectina, ecc.), integrine (ITG), metalloproteinasi (MMP), inibitori delle metalloproteinasi (TIMP) ed altre molecole di adesione (AM) (tabella 1, Materiali e Metodi).

I campioni di MSC esprimevano 50 degli 84 geni analizzati e tra questi, l'espressione di 44 geni è da considerarsi altamente espressa o consistente ( $2^{-\Delta\Delta C} > 0,01$ ). Inoltre, 26 geni erano espressi con almeno un logaritmo di differenza rispetto alle MPC. Più della metà dei geni espressi codifica per le proteine della matrice extracellulare (ECM) o sono correlati a proteine coinvolte nella sintesi/degradazione di componenti della matrice. Quattro geni codificano per le metalloproteinasi coinvolte nella degradazione della ECM (MMP-2, MMP-3, MMP-11, MMP-16), i rimanenti cinque geni codificano per citochine come CTGF e TGFB1 o altre molecole di adesione come VCAM1, ITGA1 e ITGA8 (Figura 2).

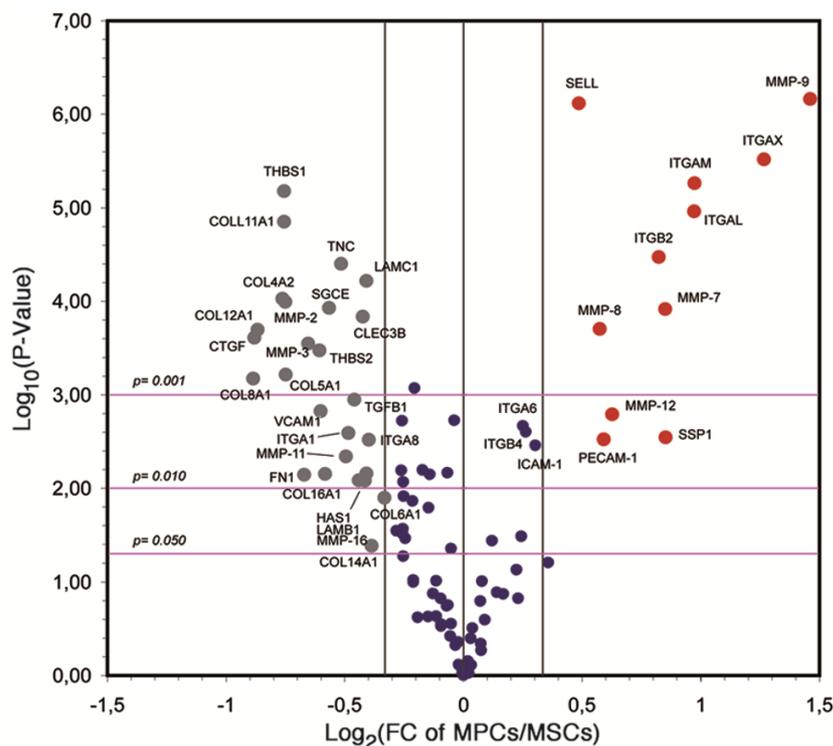
I campioni di MPC esprimevano 63 su 84 geni analizzati e tra questi, l'espressione di 37 geni risultava consistente. Solo 11 geni differivano per più di un logaritmo più alto rispetto alle MSC. Tra questi, si elencano i geni codificanti per specifiche integrine  $\alpha$  (ITGAL per  $\alpha_L$ ; ITGAM per  $\alpha_M$  e ITGAX per  $\alpha_X$ ). Questi stessi

geni non sono espressi nelle MSC ( $p < 0,001$ ). L'integrina  $\beta 2$  (ITGB2) è significativamente espressa nelle MPC con tre logaritmi in più rispetto alle MSC ( $p < 0,001$ ). Oltre a questa, anche l'espressione dei geni codificanti per specifiche integrine (ITGB4 per  $\beta 4$ , ITGA6 per  $\alpha 6$ ) e ICAM-1 è significativamente più alta nelle MPC rispetto alle MSC anche se non differiscono per più di un logaritmo ( $p < 0,01$ ).

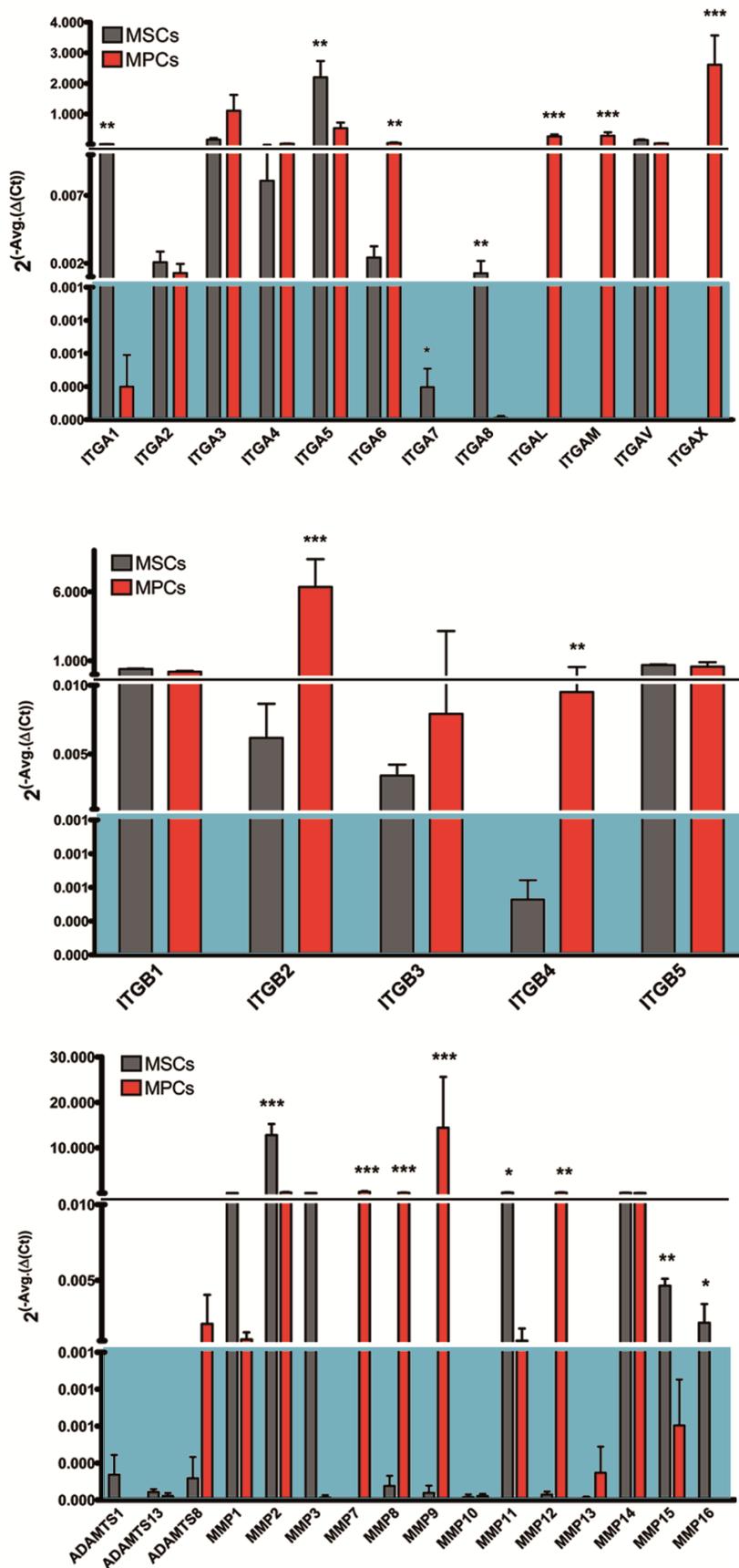
Per quanto riguarda l'espressione dei geni codificanti per le metalloproteinasi, le MPC rivelano l'espressione consistente di MMP-7, MMP-8, MMP-9 e MMP-12. Questi stessi geni non sono espressi nelle MSC. Ulteriori differenze significative nell'espressione genica sono state rivelate per molecole di adesione quali SELL e PECAM1 ( $p < 0,01$ ), ICAM1 ( $p < 0,05$ ) e SSP1 ( $p < 0,001$ ) (Figura 2).

Inoltre, sebbene le due popolazioni cellulari esprimano un diverso repertorio di metalloproteinasi, sono altamente espressi ( $p > 0,01$ ) gli stessi inibitori per le metalloproteinasi TIMP1 e TIMP2, ma non TIMP3.

**Figura 2** RTq-PCR array: in figura è riportata l'espressione degli 84 geni codificanti per le molecole di adesione tra le due popolazioni in funzione del logaritmo di differenza (MPC in rosso, MSC in grigio).  $p = \text{test } t \text{ di student}$



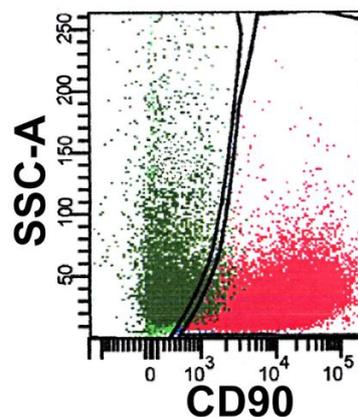
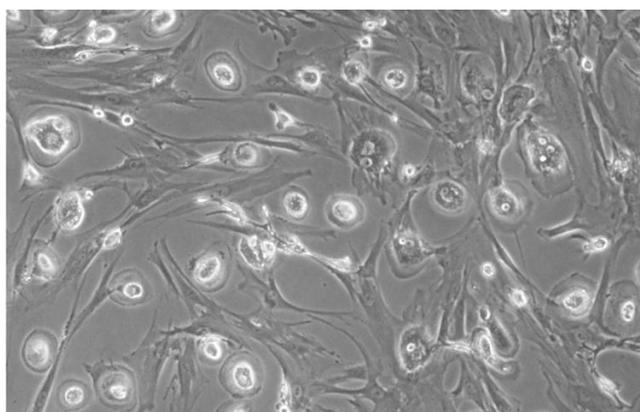
**Figura 3** RTq-PCR *array*: gli istogrammi mostrano il profilo di espressione delle integrine  $\alpha$  (in alto), integrine  $\beta$  (in mezzo) e delle MMP (in basso) nelle due popolazioni (MPC in rosso, MSC in grigio). I prodotti genici sono altamente espressi per valori uguali o superiori a 0,01 (analisi quantitativa relativa secondo il metodo di livak,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )



## 2.2 Analisi citofluorimetrica delle integrine

Le colture miste sono state utilizzate per analizzare e caratterizzare l'espressione sulla superficie cellulare delle integrine in ambedue le popolazioni, alle medesime condizioni di coltura. Dopo dieci-dodici giorni, le colture si mostravano costituite da elementi a morfologia fusiforme (MSC) e contemporaneamente da elementi rotondi e altamente rifrangenti (MPC) confermando la natura mista delle colture (Figura 4). L'analisi citofluorimetrica permetteva con facilità di distinguere le due popolazioni, sulla base del segnale di *scatter* laterale (SSC) e sull'espressione del CD90 (Figura 4). Nell'ambito delle due popolazioni cellulari, i dati citofluorimetrici confermano ciò che era emerso dall'analisi molecolare. Infatti, solo le MPC ( $SSC^{high} CD 90^{neg}$ ) mostravano l'espressione delle integrine  $\alpha_6$  (CD49f),  $\alpha_L$  (CD11a),  $\alpha_M$  (CD11b),  $\alpha_X$  (CD11c), e  $\beta_2$  (CD18). Al contrario, l'integrina  $\beta_4$  (CD104) non era espressa né dalle MPC né dalle MSC, non validando i risultati molecolari (dati non mostrati).

**Figura 4** Sono riportate: a sinistra la morfologia delle due popolazioni, MSC (fusiformi) ed MPC (rotondeggianti e rifrangenti) in colture miste; a destra la separazione citofluorimetrica delle due popolazioni, MPC ( $SSC^{high} CD 90^{neg}$ , dots verdi) ed MSC ( $SSC^{bright} CD 90^{+}$ , dots rossi).

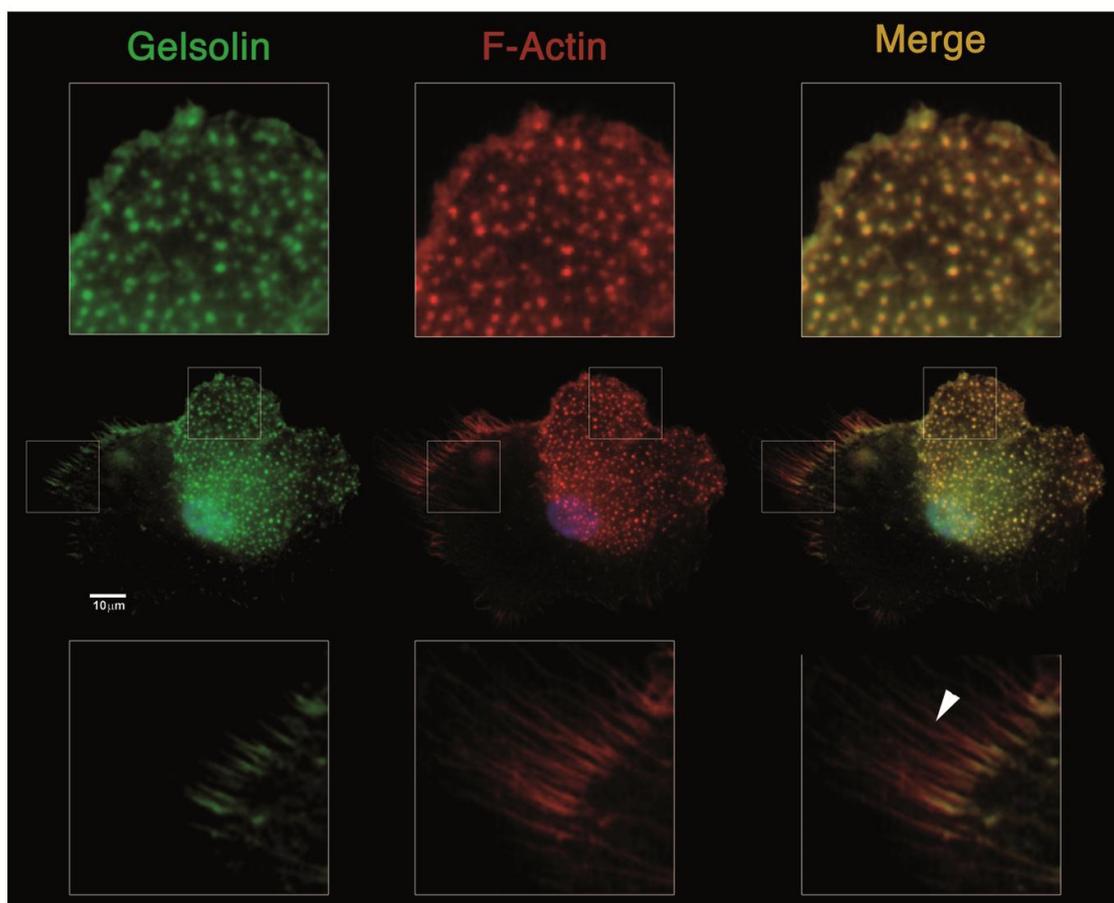
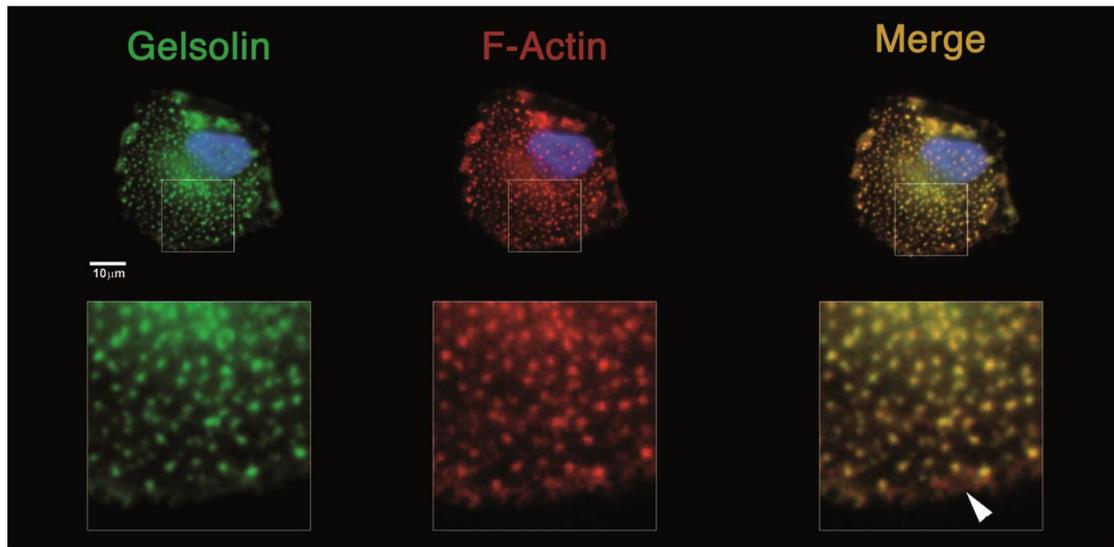


### 2.3 Analisi microscopica in fluorescenza delle molecole di adesione

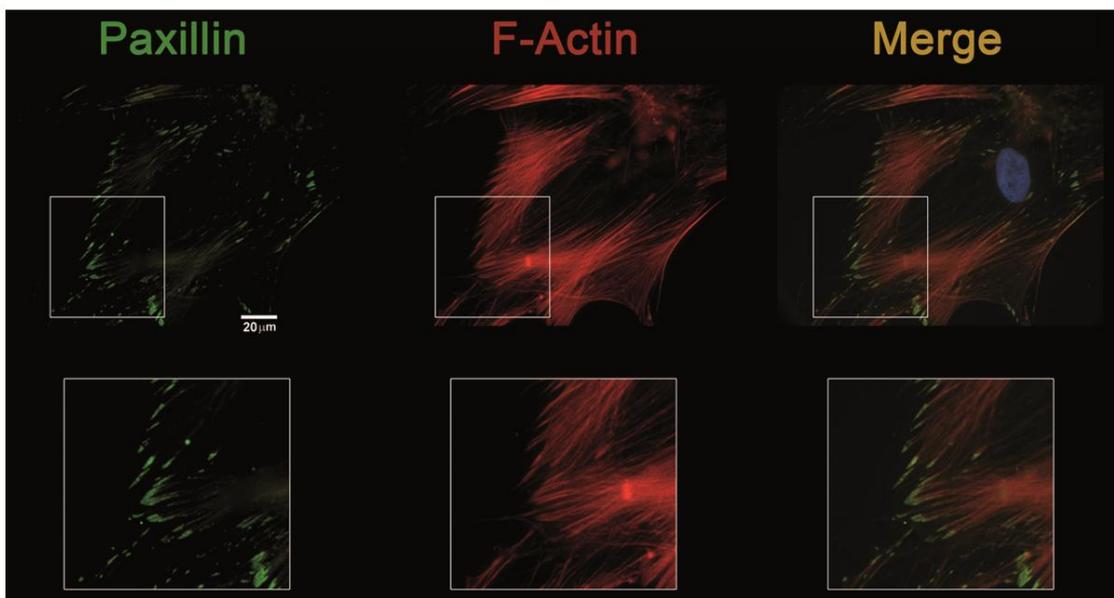
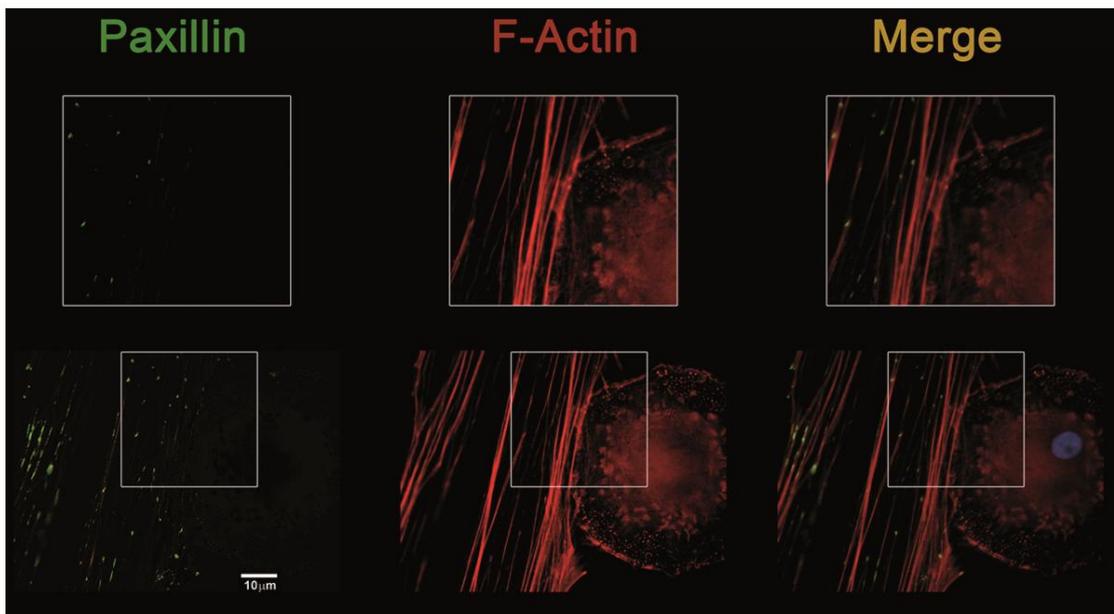
La tecnica dell'immunofluorescenza ha rivelato un diverso *pattern* di organizzazione della F-actina tra le due popolazioni cellulari. Nello specifico, le MPC sono caratterizzate dalla presenza di un alto numero di *dots* di F-actina, talvolta raggruppati in rosette, come rivelato dalla colorazione con falloidina. Questa tipica distribuzione suggerisce strutture simili a podosomi ed invadosomi. La positività alla gelsolina, colocalizzata con i *dots* di F-actina conferma l'ipotesi, essendo la gelsolina una proteina associata all'actina solamente all'interno di queste strutture (Figura 5). Al contrario, le MSC mostravano lunghi filamenti longitudinali di F-actina polimerizzata, i quali prendono origine da placche di adesione la cui presenza è confermata dall'alta fluorescenza verde della paxillina (Figura 6).

L'espressione dell'integrina  $\beta 2$ , a carico solo delle MPC risultava spazialmente associate soltanto ai *dots* di F-actina circondando gli stessi (Figura 7). L'assenza di positività associata a strutture actiniche non podosomiali (lamelipodi e filipodi) confermava l'esclusiva associazione dell'integrina  $\beta 2$  con le strutture podosomiali. Parallelamente la stessa esclusiva associazione ai podosomi era dimostrata per le integrine  $\alpha L$ ,  $\alpha M$  ed  $\alpha X$  (Figura 8-9) che, di conseguenza risultavano co-localizzate con l'espressione dell'integrina  $\beta 2$ . Contrariamente, nessuna associazione ai podosomi era riscontrabile per l'espressione dell'integrina  $\alpha 6$  (Figura 10).

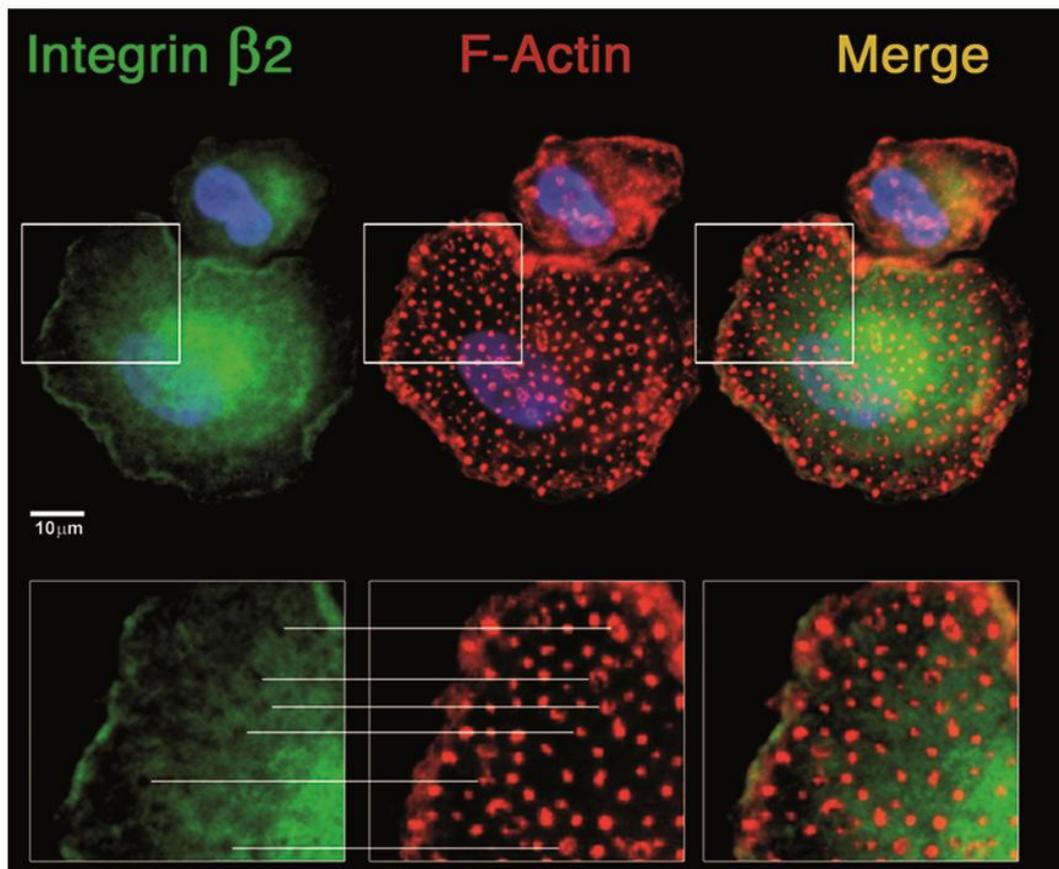
**Figura 5** immunofluorescenza a tre colori nelle MPC: il DAPI colora il nucleo cellulare di blu; la colocalizzazione della gelsolina con i *dots* di F-actina è evidenziata in giallo (Merge).



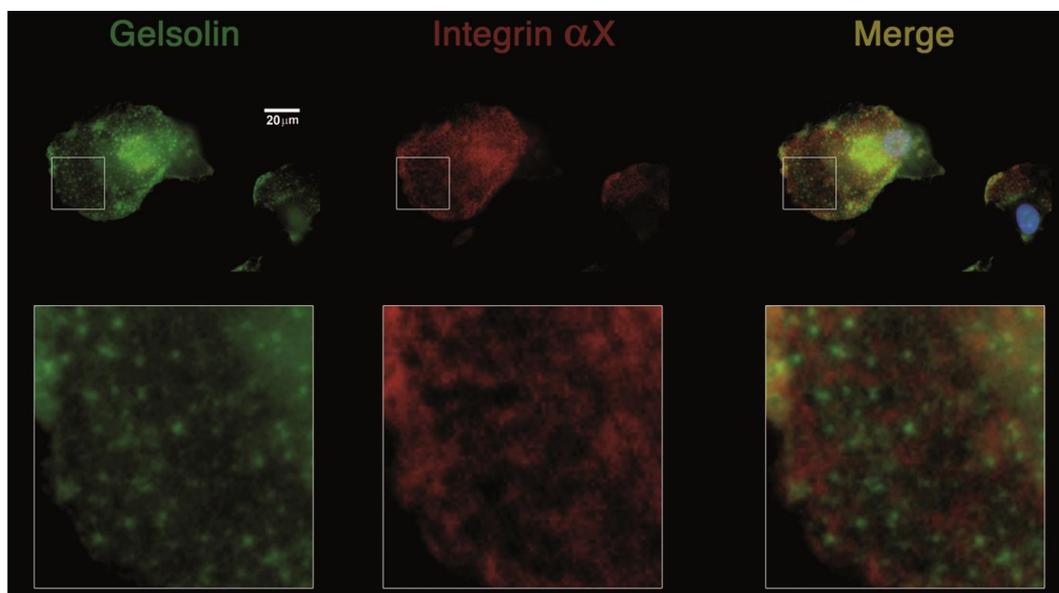
**Figura 6** immunofluorescenza a tre colori nelle MSC: a sinistra, la paxillina; al centro, i filamenti di F-actina; a destra, l'immagine mostra le placche di adesione evidenziate in verde dalla presenza della paxillina, da cui originano i filamenti di F-actina.



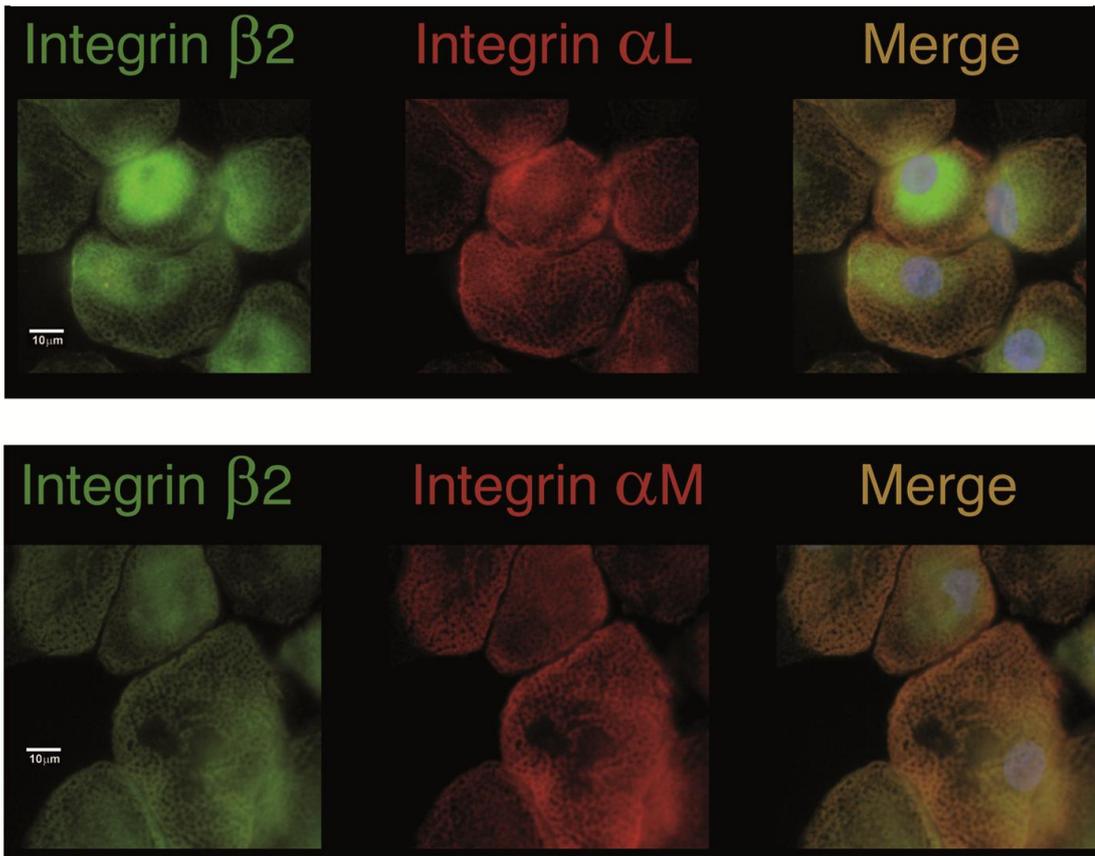
**Figura 7** immunofluorescenza a tre colori nelle MPC: a sinistra, integrina  $\beta 2$ ; al centro, i filamenti di F-actina; a destra, l'immagine mostra l'espressione dell'integrina  $\beta 2$  in associazione ai *dots* di F-actina. .



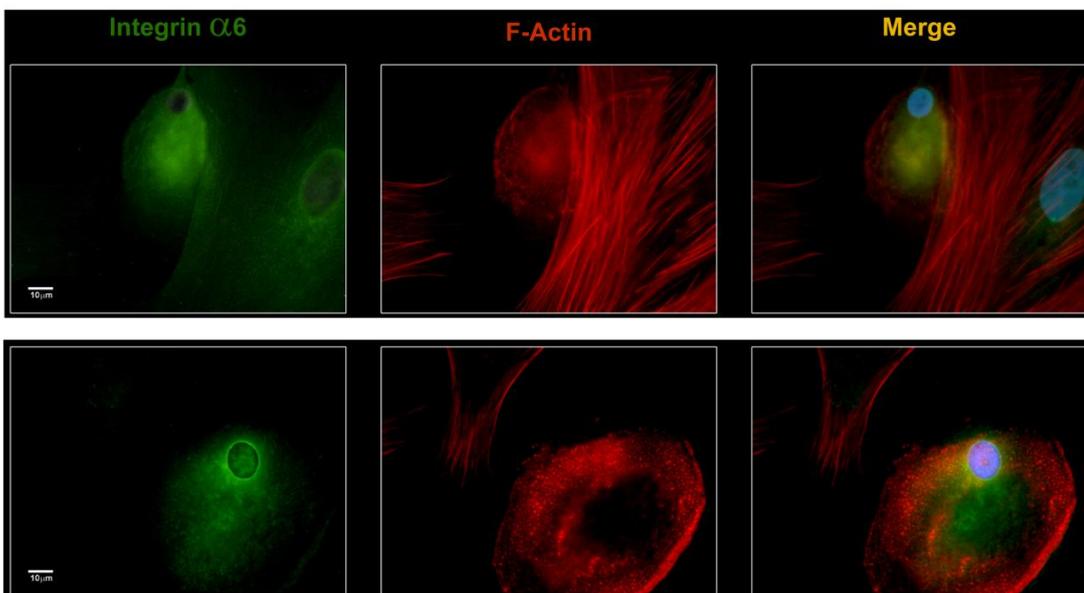
**Figura 8** immunofluorescenza a tre colori nelle MPC: a sinistra, gelsolina; al centro, l'integrina  $\alpha x$ ; a destra, l'immagine mostra la colocalizzazione dell'espressione dell'integrina  $\alpha x$  in associazione alla gelsolina.



**Figura 9** immunofluorescenza a tre colori nelle MPC: a sinistra, l'integrina $\beta$ 2; al centro in alto, l'integrina $\alpha$ L e al centro in basso, l'integrina $\alpha$ M; a destra, l'immagine mostra la colocalizzazione dell'espressione dell'integrina $\alpha$ L ed  $\alpha$ M in associazione all'integrina $\beta$ 2.



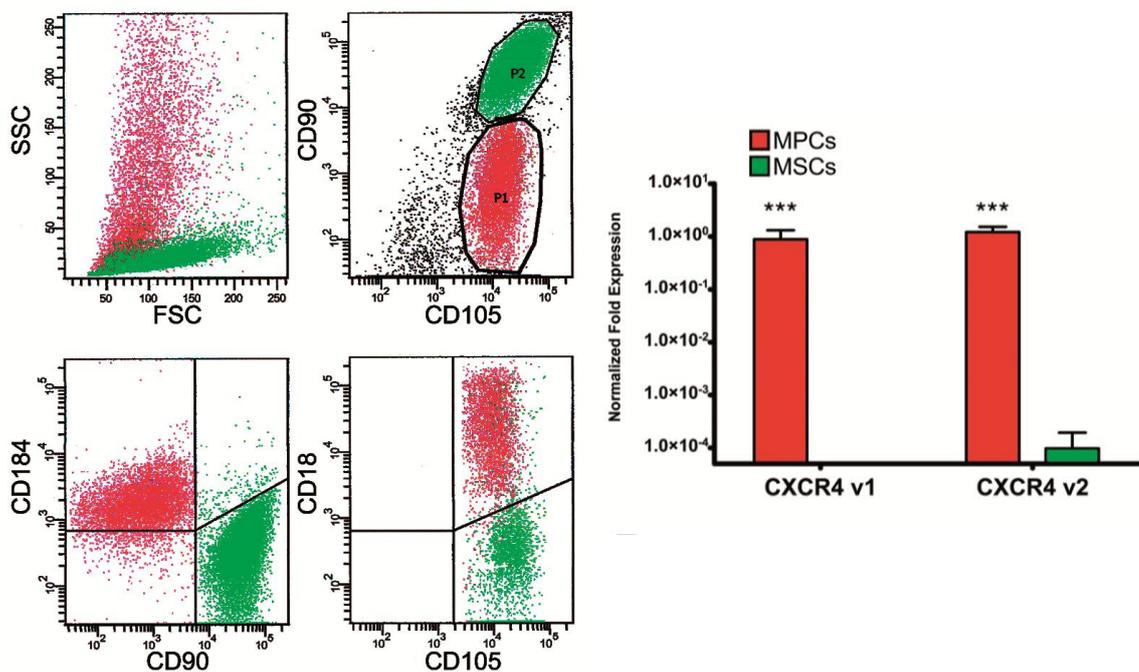
**Figura 10** immunofluorescenza a tre colori nelle MPC: a sinistra, l'integrina  $\alpha$ 6; al centro, i filamenti di F-actina; a destra, l'immagine non mostra colocalizzazione di espressione.



## 2.4 Analisi molecolare e citofluorimetrica del gene codificante per CXCR4

L'analisi molecolare dell'espressione dei geni codificanti per il recettore di membrana CXCR4, ha permesso di ottenere una sua quantificazione relativa all'interno delle due popolazioni cellulari. L'amplificazione delle due varianti di *spleacing* del gene codificante per CXCR4, dimostrava un'elevata espressione a carico delle cellule MPC e risultava assente nelle MSC. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi citofluorimetrica di colture miste, dove l'espressione del CD184 (recettore CXCR4) risultava significativa soltanto sulla popolazione MPC identificata da bassa espressione di CD90, alto segnale di *scatter* laterale (SSC) ed alta espressione di CD18 (integrina  $\beta 2$ ) (Figura 11).

**Figura 11** nell'immagine a sinistra è riportata l'analisi citofluorimetrica per l'espressione del recettore di membrana CXCR4 (CD184): riquadro in alto, separazione delle due popolazioni cellulari (MPC:  $SSC^{low/high}CD90^{neg}CD105$ , dots in rosso; MSC:  $SSC^{low}CD90^{+}CD105^{+}$ , dots in verde). riquadro in basso: espressione di CXCR4 esclusivamente sulle MPC. Nell'immagine a destra: rappresentazione grafica dell'analisi molecolare per CXCR4: presenza del recettore esclusivamente sulle MPC (in rosso), la presenza nelle MSC non è significativa,  $p < 0.001$ ).



## DISCUSSIONE

Un ostacolo fondamentale alla ricerca sulle cellule mesenchimali stromali è l'impossibilità di avere colture cellulari omogenee. Infatti, colture cellulari di MSC allestite partendo da tessuti diversi, o utilizzando diverse metodologie di isolamento, differiscono per capacità proliferative e per alcuni antigeni espressi. È plausibile che questo sia dovuto alla presenza di cellule a diversi livelli di differenziamento nella coltura. Alcuni gruppi di ricerca sono riusciti ad isolare dei progenitori delle cellule mesenchimali capaci di dare origine a colture omogenee (Vertfaille et al., 2002; D'Ippolito et al., 2004; Kucia et al., 2008). Fra queste, i progenitori mesodermali (MPC), recentemente isolati dal nostro gruppo di lavoro (Petrini et al., 2009, Trombi et al., 2009; Pacini et al., 2010) rappresentano una popolazione cellulare con caratteristiche peculiari.

In particolare, considerate le grandi capacità adesive delle MPC e l'importanza che le cellule mesenchimali ricoprono nella nicchia, dove i fenomeni di adesione sono

fondamentali, l'attenzione di questo studio si è focalizzata sulle molecole di adesione delle MPC, valutando le analogie e le differenze con le più studiate MSC.

I dati provenienti dall'indagine molecolare hanno evidenziato delle differenze significative nel *pattern* di espressione delle integrine, importanti proteine di membrana, nelle due popolazioni cellulari esaminate.

L'adesione delle MPC a plastiche idrofobiche è particolarmente interessante: abbiamo quindi effettuato una ricerca bibliografica su strutture di adesione particolari, individuando nel podosoma la struttura di adesione maggiormente compatibile con i dati a disposizione sulle MPC. La presenza di adesioni focali sembra invece essere esclusa dalla mancanza di espressione per la paxillina e per la particolare conformazione dell'actina (immunofluorescenza). I podosomi sono strutture di adesione descritte su alcune popolazioni cellulari, costituite da molecole di integrina disposte attorno ad un core puntiforme composto da actina ed altre proteine accessorie quali la gelsolina e distribuite uniformemente sulla cellula. Una prima analogia rispetto a strutture simil-podosomiali è la particolare conformazione dell'F-actina nelle cellule MPC dove, invece di formare i tipici filamenti elastici che compongono il citoscheletro, si trova disposta in maniera puntiforme.

Dati di qrt-PCR mostrano inoltre come le MPC trascrivano mRNA per l'integrina  $\beta 2$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha M$  e  $\alpha X$ . Queste integrine si trovano solitamente associate tra loro (integrine  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha X\beta 2$ ) e nella struttura podosomiale circondano i *dots* actinici. Gli esperimenti di microscopia a fluorescenza dimostrano che le integrine  $\alpha M$ ,  $\alpha L$  sulle MPC colocalizzano con la  $\beta 2$  attorno alle strutture actiniche puntiformi. Inoltre, la gelsolina nelle MPC è localizzata in corrispondenza degli *spot* di actina polimerizzati, come si evince ancora dagli esperimenti di immunofluorescenza. Questi dati sembrano

indicare una disposizione delle integrine, dell'actina e della gelsolina del tutto compatibile con quella che si ha nel podosoma.

I risultati di qrt-PCR evidenziano infine come vi sia una maggior trascrizione dei geni per la sintesi di metalloproteinasi MMP7, MMP8, MMP9, MMP12 che sono riportate in letteratura come i principali enzimi sintetizzati in prossimità di un podosoma. L'RNA messaggero per queste proteinasi inoltre è espresso a bassissimi livelli nelle cellule mesenchimali stromali, a indicare una loro minor capacità di aderire e di invadere certi tessuti. L'espressione dell'integrina  $\beta 2$  e delle altre integrine ad essa solitamente collegate ( $\alpha L$ ,  $\alpha M$  ed  $\alpha X$ ) è interessante non solo perché di solito sono presenti in strutture di tipo podosomiale, ma anche, e soprattutto, perché sono molecole di superficie implicate in fenomeni di invasione: ad esempio l'integrina  $\alpha L\beta 2$  è fondamentale per far raggiungere i tessuti infiammati ai leucociti presenti nella circolazione sistemica. Questa integrina è infatti capace di legare la molecola di superficie ICAM ed attivare con una segnalazione *outside-in*, i processi necessari a far attraversare alla cellula l'endotelio e la membrana basale. In letteratura l'espressione dell'integrina  $\beta 2$  è sempre associata a cellule che mostrano la capacità di muoversi attraverso i tessuti. A questo proposito, particolarmente interessante è un lavoro di Rombouts et al. (2003) il quale mostra come cellule mesenchimali di topo iniettate in modello animale irradiato siano in grado di fare *homing* nel midollo osseo ed in vari organi. Tale capacità è però persa *in vitro*. Questo potrebbe essere spiegato con la presenza iniziale di un numero rilevante di MPC, le quali, grazie anche alla presenza di integrina  $\beta 2$ , potrebbero essere in grado di colonizzare i vari tessuti. È ipotizzabile che le MPC agiscano come un *pool* di riserva di cellule non differenziate in grado di mobilizzarsi e di dare origine a vari tipi cellulari a seconda della necessità dell'organismo. Si è pertanto ritenuto necessario allestire studi sia *in vivo* che *in vitro* in

grado di evidenziare un'eventuale capacità delle cellule MPC di dare luogo a fenomeni di *intra/extra-vasation*. A supporto del possibile fenomeno di *intra/extra-vasation* delle MPC è interessante la presenza di mRNA per l'integrina  $\alpha 4$ . Cellule mesenchimali trnsfettate in modo da avere un'espressione transiente di integrina  $\alpha 4$ , mostrano un'alta capacità di dar luogo a fenomeni di *homing* e quindi di colonizzare i tessuti in modelli animali irradiati (Kumat et al., 2007). I livelli di espressione di mRNA dell'integrina  $\alpha 4$  non sono però significativamente diversi tra MSC e MPC a causa della variabilità dei vari campioni, nonostante in media risulti circa duecento volte più espressa nelle MPC. SI rende quindi necessario un ampliamento del numero di campioni, in modo da poter delineare meglio una possibile differenza a livello di trascrizione, nonché eventuali analisi proteiche per cercare possibili processi di regolazione post-trascrizionale.

Da un nostro precedente lavoro, volto a caratterizzare molecularmente le MPC, emerge che esse risultano positive riguardo all'espressione di Nestina, un filamento intermedio del citoscheletro, utilizzato come marcatore di cellule neuronali in fase di sviluppo. In un recente studio Frenette et al.(2010) hanno evidenziato come cellule che, *in vitro*, si comportano in maniera del tutto simile alle MSC e risultano essere Nestina+ siano presenti e funzionalmente attive nella nicchia ematopoietica. Queste cellule si trovano a stretto contatto con le HSC, ricevono *input* da fibre nervose adrenergiche e se eliminate, causano una diminuzione consistente nel numero delle HSC. Questo mostra come nella nicchia emopoietica le HSC e le MSC coesistano sia strutturalmente che funzionalmente. Inoltre, le cellule Nestina+ descritte potrebbero corrispondere alle MPC, oltre a poter generare MSC e ad esprimere Nestina, esprimono anche componenti di adesione implicate anche nella regolazione della nicchia ematopoietica. Le MPC infatti, a differenza delle MSC, esprimono la proteasi MMP9, nota per aumentare la proliferazione delle HSC (Kopp et al., 2005) in quanto capace di agire sulla molecola

associata a membrana Kit ligand (KitL), questa è così rilasciata in forma solubile (sKitL) e va ad attivare un complesso *pathway*, capace di favorire la proliferazione e lo spostamento verso la nicchia vasale delle HSC. Le MPC potrebbero quindi avere un ruolo attivo in questo processo o, vista la capacità di secernere diverse metalloproteinasi, essere implicate in eventi simili. Altre due molecole fondamentali nella nicchia il cui mRNA è trascritto dalle MPC sono l'Osteopontina (OPN) e le *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM1). L'Osteopontina nella nicchia è responsabile della mobilizzazione delle HSC verso l'endostio tramite il suo legame con le integrine  $\beta 1$ . Le MPC, che esprimono fortemente OPN, potrebbero quindi entrare in contatto con le HSC e regolarne la funzione svolgendo un ruolo simile a quello degli ostoblasti della nicchia emopoietica (Nilsson et al., 2005). PECAM è una molecola di adesione appartenente alla famiglia delle immunoglobine, il cui ruolo nella nicchia è emerso più di recente. Solitamente espresso sulle HSC, ne regola la risposta al gradiente di concentrazione di SDF-1 e regola i livelli di MMP9 (Ewans et al., 2008). La sua espressione sulle MPC potrebbe stare ad indicare un tipo di regolazione molto simile a quello delle HSC. Queste evidenze ci suggeriscono come la particolare espressione di integrine, nello specifico l'integrina  $\beta 2$  associata ad integrina  $\alpha L$ ,  $\alpha M$  o  $\alpha X$  possa essere implicata in processi di mobilizzazione o di *homing* delle MPC. Infatti questa è una proteina presente solitamente su cellule capaci di passare la barriera endoteliale. È inoltre noto il ruolo dell'integrina  $\beta 1$  nella mobilizzazione, essendo la stessa integrina espressa dalle MPC, è ipotizzabile una simile funzionalità anche in questa popolazione cellulare.

La complessa nicchia emopoietica, individuata inizialmente come ambiente regolatorio delle sole HSC, svolge in realtà anche un ruolo fondamentale per lo sviluppo dei vari *lineage* mesenchimali. Secondo il modello attualmente riconosciuto,

dalle MSC derivano osteoblasti condrociti, fibroblasti, adipociti e dalle HSC derivano invece tutte le cellule del sangue, mentre i precursori delle cellule endoteliali proverrebbe dal mesangioblasto, un precursore comune alle HSC. La possibilità delle MPC di generare sia cellule endoteliali che cellule mesenchimali stromali non si trova in completo accordo con questo modello, ma evidenzia piuttosto come la componente stromale della nicchia contenga vari tipi di progenitori più o meno indirizzati verso una determinata linea cellulare e la cui importanza è sempre più riconosciuta. Le implicazioni delle MPC nella nicchia emopoietica e quindi nell'omeostasi dell'intero organismo possono essere molto importanti e la presenza di particolari molecole di adesione ne è un fondamentale indizio. Sono però necessari studi più approfonditi *in vitro*, ad esempio esperimenti che confermino il supporto delle MPC alle HSC, ed *in vivo*, come l'analisi dell'andamento del numero di HSC in relazione a particolari modificazioni delle MPC. La differente espressione di certe sub unità integriniche potrebbe essere alla base anche della diversa capacità di adesione *in vitro* mostrata da MSC e MPC. Come accennato prima, dai dati di qtr-PCR ed immunofluorescenza, emerge come le MPC esprimano, maggiormente rispetto alle MSC, le integrine  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$ . Tali molecole sono in grado di agire come recettori per fibrinogeno, ICAM, laminina e fattore X. Le peculiarità nelle capacità adesive emerse possono essere dovute a questa differenza nel *pattern* di integrine espresse. A conferma di ciò sarà però necessario allestire esperimenti successivi che provochino il blocco delle integrine tramite anticorpi diretti verso i siti attivi di legame o che saturino le integrine stesse con una alta concentrazione di uno specifico ligando.

La presenza specifica di certi marcatori superficiali come le integrine, potrebbe essere utilizzata per isolare *ex vivo* queste cellule partendo dal sangue midollare. Questo è infatti un campo di ricerca molto interessante e potrebbe facilitare in seguito l'utilizzo

clinico di queste cellule. Attualmente le caratteristiche antigeniche delle MPC utilizzate per questo scopo sono CD105<sup>+</sup>, SSEA-4<sup>+</sup>, CD90<sup>neg</sup>, e MCSA-1<sup>neg</sup>. L'espressione di integrine può quindi essere utilizzata, assieme a quella dei marcatori appena elencati, per migliorare le metodologie di isolamento *ex vivo* delle MPC in fase di studio. In particolare, sulla base di esperimenti al FACS, le popolazioni MPC ed MSC appaiono ben distinte sulla base espressiva delle integrine  $\alpha_X$  (CD11c). In tal senso, tale marcatore potrebbe essere proposto come antigene adatto per l'individuazione dei MPC in esperimenti di isolamento *in vivo*.

In questo studio è stata inoltre evidenziata, tramite indagini molecolari ed analisi al FACS, la presenza del recettore di membrana CXCR4. Esso è risultato altamente espresso dalla totalità delle MPC e debolmente espresso nelle MSC. I dati ottenuti da un lavoro di Wynn et al. evidenziano una bassissima percentuale di questa molecola (1-3,9%) nelle MSC. Tenendo presente quanto emerge da tale studio e dai dati da noi ottenuti, è possibile ipotizzare una correlazione positiva di questo valore con la presenza di MPC in co-cultura. Inoltre, è stato dimostrato che tale percentuale varia in relazione al numero di passaggi subiti dalla coltura di MSC *in vitro* ed influenza negativamente l'efficienza dell'*homing*. Nel lavoro di Petrini et al., (2009) è stato dimostrato che nell'allestimento di colture miste la popolazione di MPC decresce all'aumentare dei passaggi. Questo dato supporta l'ipotesi che colture primarie di MSC siano eterogenee e ricche di MPC capaci di attecchimento tissutale ed *homing*. Viceversa, le colture più vecchie di MSC sono rappresentate da una popolazione monomorfica costituita da cellule incapaci di *extra-vasation* (per la mancanza di podosomi) e non responsiva agli stimoli chemotattici di CXCL12 (per la mancanza del recettore di membrana CXCR4). Queste evidenze riguardanti le MSC sono state riportate in letteratura su modelli animali. Rombouts et Ploemaker (2003) hanno

chiaramente dimostrato che colture di MSC murine espanse *in vitro* per diversi passaggi perdono rapidamente la propensione all'*homing* quando sono infuse *in vivo*. Inoltre, gli studi sui ratti condotti da Gao et al. (2001) hanno dimostrato una localizzazione passiva delle MSC nei polmoni dopo infusione sistemica, suggerendo che il diametro cellulare e l'adesività sono i fattori primari di ritenzione non specifica delle cellule infuse negli organi filtro quali i polmoni o il fegato. Similmente, studi effettuati sull'uomo (Devine et al., 2003; Bentzon et al., 2005) hanno mostrato come in seguito alla somministrazione sistemica di MSC, soltanto una minima parte arrivi fino al midollo osseo; la gran parte della popolazione MSC è stata invece rintracciata nei polmoni. Sebbene è stato dimostrato che una piccola quota di MSC è in grado di attecchire in tessuti non polmonari, l'entità di questo attecchimento ai limiti della rilevabilità e non giustifica un uso clinico. Per migliorare questo aspetto, i ricercatori focalizzano l'attenzione nell'incrementare la capacità di *homing* delle MSC aumentando semplicemente la concentrazione delle cellule infuse (Omori et al., 2008). Altri autori si concentrano sull'induzione dell'espressione di specifiche integrine (Kumar et al., 2007) e di CXCR4 (Kyriakou et al., 2008). In particolare, gli ultimi dati su modelli murini sono particolarmente interessanti in quanto mostrano come MSC, anche se transfettate per esprimere alti livelli funzionali di CXCR4, non manifestino un aumentato *homing* nel midollo dei topi trapiantati. I nostri dati suggeriscono che questo sia dovuto alla mancanza delle strutture cellulari, invadosomi, che permettano la migrazione trans-endoteliale. La presenza di questi ultimi e del recettore CXCR4 le rendono dei buoni candidati per la somministrazione periferica volta alla riparazione di danni tissutali e di *homing*.

Sulla base di quanto detto è possibile sostenere che le MPC forniscano uno strumento più efficace rispetto alle MSC per future applicazioni cliniche. Pensiamo che

una piccola quantità di MPC potrebbe essere somministrata sistematicamente e, una volta che le cellule hanno invaso il tessuto danneggiato, potrebbero differenziare e proliferare provvedendo alla rigenerazione tissutale (attraverso la differenziazione in mesenchimali) e/o alla neo-vascolarizzazione del tessuto di nuova formazione (attraverso la differenziazione endoteliale). In questa ipotesi, gli approcci terapeutici che utilizzassero le MPC non necessiterebbero di espansione *in vitro*, limitando la variabilità dei risultati e incrementando la disponibilità per l'uso clinico.

## **BIBLIOGRAFIA**

Wilson EB. (1896) The cell in development and inheritance. MacMillan, London,

Gehron Robey P. Stem cells near the century mark. J Clin Invest 2000; 105: 1489-1491.

Weissman IL. Stem Cells: Units of development, units of re generation and units in evolution. Cell 2000; 100: 157-168.

Watt FM e Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. Science 2000; 287: 1427- 1430.

Cedar SH, Cooke JA, Patel MR, Luo Z, Minger SL. The therapeutic potential of human embryonic stem cells. Indian J Med Res 2007; 125: 17-24.

Caplan AI, Bruder SP. (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol Med. Jun;7(6):259-64

Caplan AI. (1991) Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. Sep;9(5):641-50.

Prockop DJ. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. Apr 4;276(5309):71-74.

Bühring HJ, Treml S, Cerabona F, de Zwart P, Kanz L, Sobiesiak M. (2009) Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci.* Sep;1176:124-134

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7(5):393-395.

Chagastelles PC, Nardi NB, Camassola M. (2010) Biology and applications of mesenchymal stem cells. *Sci Prog;* 93(Pt 2):113-127.

Salem HK, Thiemermann C. (2010) Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells.* Mar 31;28(3):585-596.

Ho AD, Wagner W, Franke W. (2008) Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 10(4):320-330.

Wagner W, Ho AD. 2007 Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* Dec;3(4):239-248.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. (2002) Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* Jun;73(6):1919-1926

McCarty RC, Xian CJ, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK. (2010) Application of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells to an ovine model of growth plate cartilage injury. *Open Orthop J Jun* 23;4:204-210.

Feitosa ML, Fadel L, Beltrão-Braga PC, Wenceslau CV, Kerkis I, Kerkis A, Birgel Júnior EH, Martins JF, Martins Ddos S, Miglino MA, Ambrósio CE. (2010) Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results. *Acta Cir Bras. Oct*;25(5):416-422.

Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. (2007) Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng. Dec*;13(12):2949-2955.

Shabbir A, Zisa D, Leiker M, Johnston C, Lin H, Lee T. (2009) Muscular dystrophy therapy by nonautologous mesenchymal stem cells: muscle regeneration without immunosuppression and inflammation. *Transplantation. May* 15;87(9):1275-1282.

Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. (2000) Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol. Jan*;18(2):307-16.

Battiwalla M, Hematti P. (2009) Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy. 11*(5):503-515.

Henschler R, Deak E, Seifried E. (2008) Homing of mesenchymal stem cells. *Transfus Med Hemother* 2008;35:306–312

Karp JM, Leng Teo GS. (2009) Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. Mar 6;4(3):206-216.

Noort WA, Feye D, Van Den Akker F, Stecher D, Chamuleau SA, Sluijter JP, Doevendans PA. (2010) Mesenchymal stromal cells to treat cardiovascular disease: strategies to improve survival and therapeutic results. *Panminerva Med*. Mar;52(1):27-40

Kyriakou C, Rabin N, Pizzey A, Nathwani A, Yong K. (2008) Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. *Haematologica*. Oct;93(10):1457-1465

Deak E, Rüster B, Keller L, Eckert K, Fichtner I, Seifried E, Henschler R. (2010) Suspension medium influences interaction of mesenchymal stromal cells with endothelium and pulmonary toxicity after transplantation in mice. *Cytotherapy*. Apr;12(2):260-264.

Petrini M, Pacini S, Trombi L, Fazzi R, Montali M, Ikehara S, Abraham NG. (2009) Identification and purification of mesodermal progenitor cells from human adult bone marrow. *Stem Cells Dev*. Jul-Aug;18(6):857-66.

Trombi L, Pacini S, Montali M, Fazzi R, Chiellini F, Ikehara S, Petrini M. (2009) Selective culture of mesodermal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* Oct;18(8):1227-34.

Pacini S, Carnicelli V, Trombi L, Montali M, Fazzi R, Lazzarini E, Giannotti S, Petrini M. (2010) Constitutive expression of pluripotency-associated genes in Mesodermal Progenitor Cells (MPCs). *PLoS One* March; 5(3): e9861

Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Klüter H. (2009) Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells.* Sep;27(9):2331-2341.

Gimona M, Buccione R. (2006) Adhesions that mediate invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(11):1875-1892

Docheva D, Haasters F, Matthias Schieker M. (2008) Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors. *Curr Rheumatol Rev.* 4(3):1-6

Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 1 Nov 104(9):2643-2645

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* 25(4), 402-8

Marchisio PC, Bergui L, Corbascio GC, Cremona O, D'Urso N, Schena M, Tesio L, Caligaris-Cappio F. (1988) Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood*. Aug;72(2):830-833.

Saltel F, Daubon T, Juin A, Ganuza IE, Veillat V, Génot E. (2010) Invadosomes: Intriguing structures with promise. *Eur J Cell Biol*. Jul 3. [Epub ahead of print]

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. Sep;7(9):678-689

Stefanidakis M, Ruohtula T, Borregaard N, Gahmberg CG, Koivunen E. (2004) Intracellular and cell surface localization of a complex between alphaMbeta2 integrin and promatrix metalloproteinase-9 progelatinase in neutrophils. *J Immunol*. Jun 1;172(11):7060-7068.

Rombouts WJ, Ploemacher RE. (2003) Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*. Jan;17(1):160-170.

Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. 2001The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 169(1):12-20.

Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. (2003) *Blood*. Apr 15;101(8):2999-3001.

Bentzon JF, Stenderup K, Hansen FD, Schroder HD, Abdallah BM, Jensen TG, Kassem M. (2005) Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. May 13;330(3):633-640.

Omori Y, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Kocsis JD. (2008) Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res*. Oct 21;1236:30-38

Kumar S, Ponnazhagan S. (2007) Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. *FASEB J*. Dec;21(14):3917-3927

Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. (2008) Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. Aug;26(8):2173-2182.