



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

In cotutela con l'Université René Descartes – Paris V

Dipartimento di Pediatria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO  
SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE  
INDIRIZZO IN EMATOONCOLOGIA E IMMUNOLOGIA  
CICLO XX

**APPROCCIO DI TERAPIA CELLULARE MEDIANTE  
L'UTILIZZO DI CELLULE FETALI ISOLATE DAL LIQUIDO  
AMNIOTICO PER MALATTIE DEL SISTEMA  
EMATOPOIETICO**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Basso Giuseppe

**Supervisori:** Ch.mo Prof. Zanesco Luigi

Ch.ma Prof.ssa Cavazzana-Calvo Marina

**Dottorando :** Dott. Ditadi Andrea





# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

In cotutela con l'Université René Descartes – Paris V

Dipartimento di Pediatria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO  
SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE  
INDIRIZZO IN EMATOONCOLOGIA E IMMUNOLOGIA  
CICLO XX

**APPROCCIO DI TERAPIA CELLULARE MEDIANTE  
L'UTILIZZO DI CELLULE FETALI ISOLATE DAL LIQUIDO  
AMNIOTICO PER MALATTIE DEL SISTEMA  
EMATOPOIETICO**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Basso Giuseppe

**Supervisori:** Ch.mo Prof. Zanesco Luigi

Ch.ma Prof.ssa Cavazzana-Calvo Marina

**Dottorando :** Dott. Ditadi Andrea



# INDICE

<b>Riassunto</b>	<b>7</b>
<b>Résumé</b>	<b>11</b>
<b>Summary</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>19</b>
<b>I Cellule Staminali</b>	<b>19</b>
<b>1. Definizione</b>	<b>19</b>
<b>2. Fonti di cellule staminali</b>	<b>20</b>
Cellule Staminali Embrionali	20
Cellule Staminali Adulte	27
Cellule Staminali Fetali	31
Cellule Staminali del Liquido Amniotico	33
<b>II Ematopoiesi</b>	<b>38</b>
1. Definizione	38
2. La cellula Staminali Ematopoietica	39
3. Saggi per l'identificazione di HSC	41
4. Insorgenza dell'ematopoiesi	46
5. Ematopoiesi e cellule ES: Stato dell'Arte	53
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>59</b>
I. Campioni e selezione cellulare	59
Marcatura con BrdU	61
II. Culture	62
Espansione delle cellule AFS	62
Protocolli di differenziazione in vitro	62

III. Trapianti	66
IV. Analisi espressione genica	67
V. Analisi stato cromatinico	70
<b>RISULTATI</b>	<b>73</b>
Cellule AFS umane mostrano differenziazione ematopoietica ristretta al compartimento eritroide	73
Analisi ChIP delle cellule AFS umane	77
Cellule cKit+ Lin- sono presenti nel liquido amniotico murino ed umano	78
Caratterizzazione fenotipica delle cellule KL	82
Cellule KL murine ed umane mostrano un elevato potenziale ematopoietico in vitro	84
Il potenziale linfoide T è molto forte nella sottopopolazione CD34+ delle mAFKL	88
Cellule KL murine esibiscono un forte potenziale ematopoietico in vivo	89
Capacità di auto-rinnovamento delle HSC derivate dalle mAFKL	91
Potenziale ematopoietico in vivo di cellule hAFKL	93
Profilo di espressione genica di cellule KL murine	94
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>111</b>

## RIASSUNTO

La terapia cellulare è un'attraente prospettiva per il trattamento di numerose patologie umane, anche mortali. In questo contesto, i tessuti fetali suscitano un crescente interesse come fonti di cellule per l'auto- e l'allo-trapianto, data la loro pluripotenza, capacità proliferativa e la loro bassa immunogenicità. Recentemente una popolazione di cellule staminali è stata isolata dal liquido amniotico umano (human Amniotic Fluid, hAF). Questa popolazione ottenuta selezionando le cellule esprimenti il marcatore di superficie cKit, è in grado di proliferare per più di 18 mesi, mantenendo inalterate le proprie capacità differenziative, le dimensioni del telomero ed un cariotipo normale. Il loro potenziale differenziativo in vitro è tale da permettere una loro differenziazione in senso mesenchimale, endotermico ed ectodermico. Inoltre, una popolazione molto simile è stata isolata dal liquido amniotico murino (murine Amniotic Fluid, mAF) che, una volta iniettata in blastocisti, partecipa alla formazione non solo di diversi organi fetali ma anche degli annessi extraembrionali come la placenta ed il cordone.

In questo studio abbiamo verificato la possibilità di indirizzare il differenziamento di cellule staminali del liquido amniotico (Amniotic Fluid Stem, AFS) verso la via ematopoietica.

Le cellule AFS sono state isolate con il consenso informato delle madri da campioni di liquido amniotico umano, raccolti durante la procedura di diagnosi prenatale dell'amniocentesi. Abbiamo ottenuto in forma riproducibile una differenziazione eritroide coltivando le cellule AFS sotto forma di corpi embrioidi (Embryoid Bodies, EB) in condizioni di coltura prive di siero. Circa il 70% delle cellule che formano gli EB coesprimevano

marcatori eritroidi, Gly A, CD36 e CD71. Inoltre eritrociti umani (Gly A+) sono stati isolati dal midollo osseo e dalla milza di topi NOD/SCID irradiati subletalmente 3 mesi dopo l'iniezione di cellule AFS umane.

Per determinare se le condizioni di espansione avessero portato ad una restrizione del potenziale ematopoietico in senso eritroide, abbiamo comparato le cellule AFS espanse e cellule cKit<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> isolate dal liquido amniotico a fresco (Amniotic Fluid-derived cKit<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>, AFKL). Abbiamo isolato cellule cKit<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> (KL) anche dalla membrana che circonda il liquido amniotico, l'Amnion (Am), la ricerca di una possibile origine. Abbiamo comparato il potenziale ematopoietico di cellule AFKL e AmKL murine con cellule KL isolate dal fegato fetale (Fetal Liver, FL), la fonte per eccellenza di cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cell, HSC) fetali. Quando coltivate immediatamente dopo la selezione, AFKL e AmKL hanno dato origine a tutti i differenti lignaggi ematopoietici, sia in vitro che in vivo. Infatti, in cocoltura con cellule stromali OP9 esprimenti il ligando Notch Delta1, sia le cellule AFKL che le cellule AmKL si sono differenziate in linfociti T nel giro di 2 settimane. E possono generare colonie mieloidi, eritroidi e miste in coltura su terreno semisolido.

In vivo, nel sangue periferico di topi immunodeficienti RAG1<sup>-/-</sup>, abbiamo osservato cellule appartenenti a tutti e tre i lignaggi ematopoietici (linfoide, mieloide, eritroide) 4 settimane dopo l'iniezione di cellule AFKL ed AmKL murine. Quattro mesi più tardi, l'analisi degli organi ematopoietici dei topi trapiantati ha dimostrato la presenza di cellule linfoidi, eritroidi e mieloidi derivanti dalle cellule AFKL ed AmKL iniettate. I trapianti secondari effettuati con successo hanno confermato la presenza di progenitori multipotenti ematopoietici capaci di auto-rinnovamento, che corrisponde alla definizione di HSC, tra le cellule

AFKL ed AmKL murine. I risultati ottenuti sono molto simili a quelli osservati con le cellule FLKL, confermando così il forte potenziale ematopoietico insito nelle cellule AFKL ed AmKL.

Esperimenti condotti con cellule AFKL umane hanno dato ottimi risultati in vitro, dando origine ai lignaggi eritroide, mieloide e linfoide, tuttavia non siamo ancora stati in grado di ricostituire il sistema ematopoietico di topi NOD/SCID irradiati, probabilmente a causa dello scarso numero di cellule iniettate.

Abbiamo dimostrato per la prima volta il potenziale ematopoietico delle cellule KL del liquido amniotico e dell'amnion, supportando l'idea che entrambi possano essere fonti importanti di cellule per applicazioni terapeutiche.



## RESUME

La thérapie cellulaire représente une alternative thérapeutique majeure pour de nombreuses pathologies humaines. Dans ce contexte, les tissus fœtaux constituent une source de cellules souches intéressante, compte-tenu de leur pluripotence, de leur capacité proliférative élevée et de leur faible immunogénicité. Récemment, une population de cellules souches pluripotentes a été isolée à partir de liquide amniotique humain (hAF). Cette population cellulaire sélectionnée sur la base du marqueur de surface ckit est capable de proliférer pendant plus de 18 mois, tout en maintenant à la fois son potentiel de différenciation, la longueur de ses télomères et un caryotype normal. Son potentiel de différenciation in vitro couvre les voies mésenchymateuses, endodermique et ectodermique. En outre, une population similaire a été retrouvée dans le liquide amniotique de souris (mAF) et, une fois injectée dans des blastocytes, participe à la formation non seulement de différents organes du fœtus mais également du placenta et du cordon ombilical. Dans la présente étude, nous avons étudié la possibilité de différencier les cellules souches du liquide amniotique humain (hAFSC) et murin (mAFSC) vers la voie hématopoïétique à la fois in vitro et in vivo.

Les cellules hAFSC sont isolées avec le consentement de la mère à partir de liquide amniotique humain recueilli au cours d'une procédure de diagnostic anténatal. Nous avons de manière reproductible réalisé une différenciation érythroïde par culture des hAFSCs en corps embryoides (EB). Plus de 70% des cellules constituant les EB coexprimaient des marqueurs érythroïdes comme la Glycophorine A, CD36 et CD71. De plus, 3 mois après l'injection de hAFSC à des souris NOD/SCID irradiées, nous avons pu détecter dans la rate et la moelle osseuse des receveurs des érythrocytes humains.

Pour déterminer si la procédure d'expansion était responsable de cette restriction du potentiel hématopoïétique à la voie érythroïde, nous avons comparé les cellules AFSC à des cellules cKit+Lin- (AFKL) fraîchement isolées et non préalablement expansées en culture, chez la souris, puis chez l'homme. Dans l'optique d'identifier l'origine des AFKL, nous avons également isolé des cellules cKit+Lin- de la membrane entourant le liquide amniotique, l'amnios. Nous avons ainsi comparé le potentiel hématopoïétique des mAFKL, des mAmKL aux KL issues du foie foetal (mFLKL), qui constituent la source principale de cellules souches hématopoïétiques à ce stade de développement. Toutes les expériences ont donné des résultats très similaires pour les trois sources de KL (AF, Am et FL). Sans expansion préalable, les AFKL et AmKL sont capables de se différencier selon toutes les voies hématopoïétiques à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, les mAFKL et mAmKL se différencient en lymphocytes T en moins de 2 semaines en présence d'un stroma OP9 exprimant le ligand de Notch Delta1. Par ailleurs, en milieu semi-solide, elles génèrent des colonies érythroïdes, myéloïdes et mixtes. *In vivo*, nous avons retrouvé dans le sang de souris déficientes pour RAG1, des cellules appartenant aux trois lignées hématopoïétiques (lymphoïde, érythroïdes et myéloïdes) 4 semaines seulement après la greffe de mAFKL et mAmKL. Analysées quatre mois plus tard, les souris greffées présentent des lymphocytes, des érythrocytes et des cellules myéloïdes provenant des mAFKL et mAmKL dans tous les organes hématopoïétiques. Le succès de transplantations secondaires a confirmé que les mAFKL et mAmKL comprennent des progéniteurs hématopoïétiques capables d'auto-renouvellement, ce qui correspond à la définition d'une cellule souche hématopoïétique.

Nous avons obtenu des résultats similaires à partir de cellules humaines AFKL, avec une différenciation hématopoïétique *in vitro* selon les trois voies érythroïde, myéloïde et lymphoïde. Le potentiel restreint érythroïde des cellules humaines AFS expansées est donc sans doute lié à la

procédure d'expansion in vitro. Probablement en raison du faible nombre de hAFKL greffées, nous n'avons pas encore réussi à reconstituer le système hématopoïétique de souris NOD/SCID irradiées. L'injection de ces cellules directement dans la moelle osseuse pourrait permettre de résoudre ce problème.

Nous démontrons ainsi pour la première fois le potentiel hématopoïétique de cellules KL présentes dans le liquide amniotique humain et murin, avec une possible origine de ces cellules dans l'amnios. Les applications d'une telle découverte incluent la possibilité chez un patient atteint d'une maladie auto-immune ou dégénérative de générer par allogreffe de cellules hAFKL un système hématopoïétique tolérant vis-à-vis d'une seconde greffe à partir des mêmes cellules expansées et différenciées dans la voie du tissu lésé.



## SUMMARY

Cell therapy is an attractive perspective for the treatment of life threatening disorders. In this context, foetal tissues are gaining interest as sources of cells for auto- and allo-transplantation, because of their pluripotency, proliferative capability and their low, if any, immunogenicity. Recently a pluripotent stem cell population has been isolated from Amniotic Fluid (AF). It is able to proliferate for more than 18 months, maintaining their differentiative ability as well as a normal karyotype. In term of differentiation potential, we succeeded in obtaining *in vitro* mesenchymal-, ectodermal- and endodermal-derived tissues from human Amniotic Fluid Stem (AFS) cells. Furthermore, murine AFS cells injected in blastocytes took part to the formation not only of several different foetal organs, but also of the placenta and the umbilical cord. In the present study we investigated the possibility of differentiating AFS cells towards the hematopoietic pathway.

AFS cells isolated from human amniotic fluid, collected during routine diagnostic procedures and obtained under informed consent, were firstly expanded *in vitro* and selected on the basis of their ckit expression. We achieved a reproducible erythroid differentiation by culturing hAFSCs as embryoid bodies (EBs) under serum free conditions with haematopoietic cytokines. Erythroid cells expressing CD235a constituted 70% of the total hAFSCs forming EBs showing also a co-expression of CD36 and CD71. Furthermore, human erythrocytes (human CD235a) were isolated from bone marrow and spleen of sublethally irradiated NOD/SCID mice at 3 months after the injection of hAFSCs.

To determine if the expansion procedure had led to a restriction of the hematopoietic potential towards the erythroid pathway, we compared expanded AFSCs and freshly isolated cKit<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> (AFKL) cells. We also harvested cKit<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> KL cells from the membrane surrounding the AF, the Amnion, in search for a possible origin. We compared the hematopoietic potential of mAFKL and mAmKL to Fetal Liver KL, the main source of fetal HSC. When cultivated immediately after their sorting, freshly isolated murine AFKL and AmKL cells gave rise to all the different hematopoietic lineages both *in vitro* and *in vivo*. Actually, when cocultivated with OP9(d)1 cells, AFKL and AmKL undergo complete T cell differentiation within 2 weeks. They also generate myeloid and erythroid colonies when cultivated in methylcellulose for clonogenic assay. The erythroid restricted potential of human AFS cells was thus probably linked to the *in vitro* expansion procedure.

Moreover, cells belonging to all the three hematopoietic lineages (lymphoid, myeloid and erythroid) and arising from freshly isolated mAFKL and mAmKL are found in the peripheral blood of sublethally irradiated RAG1 deficient mice only 4 weeks after transplantation. Four months later, transplanted mice showed mAFKL-derived lymphoid, myeloid and erythroid cells, in all the hematopoietic organs. Successful secondary transplantation strongly suggests that mAFKL and mAmKL comprise HSC, with self-renewal ability. Those results were very similar to those obtained with mFLKL, confirming the strong hematopoietic potential of mAFKL and mAmKL. Experiments with freshly isolated hAFKL gave good results in the *in vitro* assays being able to give rise to erythroid, myeloid and lymphoid lineages, but failed to reconstitute the

hematopoietic system in irradiated NOD/SCID mice, probably due to the poor amount of cells injected.

This is the first report demonstrating that AFKL and AmKL do have an haematopoietic potential, supporting the idea that AF and Am may be an excellent source for therapeutic application.



# INTRODUZIONE

## I. CELLULE STAMINALI

La ricerca nel campo delle cellule staminali sta compiendo veri e propri passi da gigante per quel che riguarda la conoscenza di come si sviluppi un organismo a partire da una singola cellula e di come e quando cellule sane sostituiscano le cellule danneggiate in un individuo adulto. Questo settore molto promettente della scienza vede anche i ricercatori impegnati a capire le reali possibilità e prospettive della terapia cellulare contro malattie genetiche o congenite, un campo a cui ci si riferisce con il termine di medicina rigenerativa o riparativa.

### 1. Definizione

La cellula staminale è una cellula primitiva che viene definita sulla base delle sue due caratteristiche principali che la differenzia dalle altre cellule:

- 1) il potenziale differenziativo, intesa come la capacità di una singola cellula di dare origine a una progenie che comprende differenti tipi cellulari
- 2) l'auto-rinnovamento, la proprietà per la quale le cellule sono in grado di riprodurre se stesse, molto probabilmente grazie a divisioni cellulari asimmetriche.

Il grado di plasticità permette di classificare le cellule staminali: esse possono essere 1) totipotenti, quando sono in grado di dare origine ad un embrione completo e/o a tutti i suoi tipi cellulari (per esempio lo zigote e le cellule staminali embrionali); 2) pluripotenti, che non possono differenziare in un organismo completo ma che tuttavia mantengono il potenziale per generare cellule di molti tipi differenti (per esempio cellule

staminali mesenchimali); 3) multipotenti, molte delle quali sono collocate all'interno di specifici tessuti e sono in grado di differenziare solo nei diversi tipi cellulari del tessuto di provenienza (per esempio la cellula staminale ematopoietica) (O'Donoghue and Fisk, 2004)

## **2. Fonti di cellule staminali**

### **2.1 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI**

Le cellule staminali si trovano lungo tutto il corso dello sviluppo di un individuo, a partire dallo zigote, la cellula staminale per antonomasia, sino alla morte; tuttavia le cellule staminali posseggono caratteristiche diverse a seconda della loro collocazione temporale.

Le origini del settore della biologia delle cellule staminali risalgono al lavoro di Leroy Stevens, un biologo dello sviluppo che presso i laboratori della ditta Jackson identificò con una certa frequenza tumori testicolari spontanei nel ceppo di topo 129 (Stevens, 1958). Questo lavoro venne pubblicato senza grossa enfasi nel 1958. La curiosità dei due scienziati Mintz e Illmensee portò ad un'osservazione clamorosa. Quando cellule isolate da teratocarcinomi maligni venivano aggiunte ad embrioni di topo, l'ambiente degli embrioni in sviluppo influenzava la crescita delle cellule tumorali e le indirizzava verso programmi differenziativi (Mintz and Illmensee, 1975). Il risultato finale era la nascita di topi chimerici in cui una parte significativa del corpo derivava da cellule dei teratocarcinomi. Linee di cellule staminali embrionali (Embryonic Stem, ES) vennero successivamente isolate dalla massa cellulare interna (Inner Cell Mass, ICM) di blastocisti murine (Evans and Kaufman, 1981). La blastocisti

(Figura 1) è una cista di forma sferoidale, che si forma a partire dallo stadio di 32 cellule (3,5 giorni post-coitum, dpc, nel topo) ed è composta da un monostrato di cellule epiteliali polarizzate, il trofoectoderma, all'esterno, e da un ammasso di cellule non polarizzate, l'ICM, all'interno, che è circondata dalla cavità del blastocele. La morfologia, il profilo di espressione delle proteine, la funzione e il destino dei due tipi cellulari sono totalmente differenti. Il trofoectoderma è il progenitore delle cellule giganti trofoblastiche che si sviluppano dopo l'impianto dell'embrione nella cavità uterina, del cono ectoplacentale, dell'ectoderma extraembrionico e della parte corionica della placenta. Non partecipa in nessun modo alla formazione di tessuti fetali (Wild and Fleming, 2001). L'ICM dà origine all'ipoblasto ed all'epiblasto: da quest'ultimo si svilupperà in seguito l'intero feto. L'ipoblasto (endoderma primitivo) è composto da uno strato di una ventina di cellule e comincia a differenziarsi dalle cellule dell'ICM poste a ridosso del blastocele poco prima dell'impianto dell'embrione, all'incirca 4-4,5 dpc (Downs, 2001). Le restanti cellule dell'ICM a questo stadio formano l'epiblasto (ectoderma primitivo). Successivamente all'impianto ed alla formazione del "cilindro a uovo" (Figura 2), l'ipoblasto si differenzia ulteriormente in endoderma viscerale e parietale (rispettivamente endoderma prossimale e distale). Questi sono i lignaggi extraembrionali, che provvedono al supporto nutritivo in quanto facenti parte delle membrane del sacco vitellino viscerale e parietale. La loro origine è differente da quella dell'endoderma definitivo, il quale, come il mesoderma, origina solamente più tardi, al momento della formazione della striscia primitiva (Wild and Fleming, 2001).

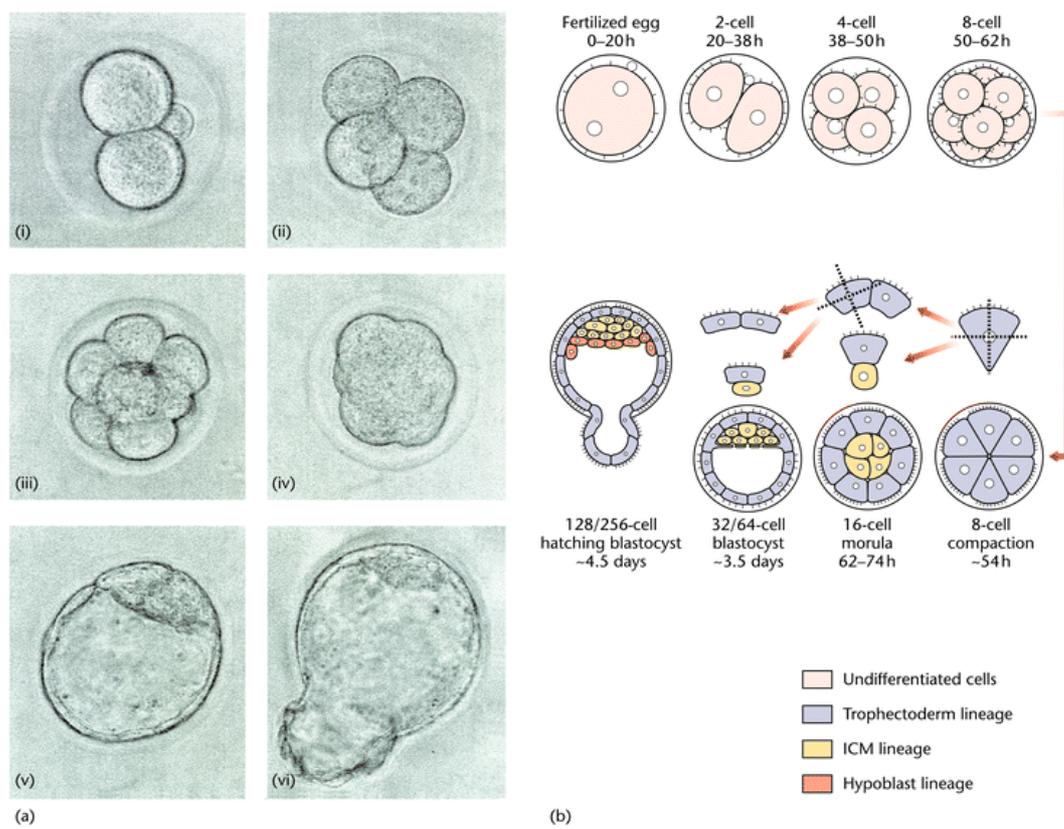


Figura 1 (tratta da Wild and Fleming, 2001): (a) microfotografie a contrasto di fase degli stadi dello sviluppo dell'embrione murino preimpianto che mostrano: (i) stadio di 2 cellule, (ii) stadio di 4 cellule, (iii) stadio di 8 cellule precompattazione, (iv) stadio di 8 cellule compatto, (v) blastocisti semiespanse e (vi) blastocisti tardive. Barra 20  $\mu$ m. (b) Stadi di impianto, che mostrano la posizione cellulare, l'origine dei differenti lignaggi cellulari e l'orientamento delle divisioni cellulari che danno poi origine al trofoectoderma e all'ICM.

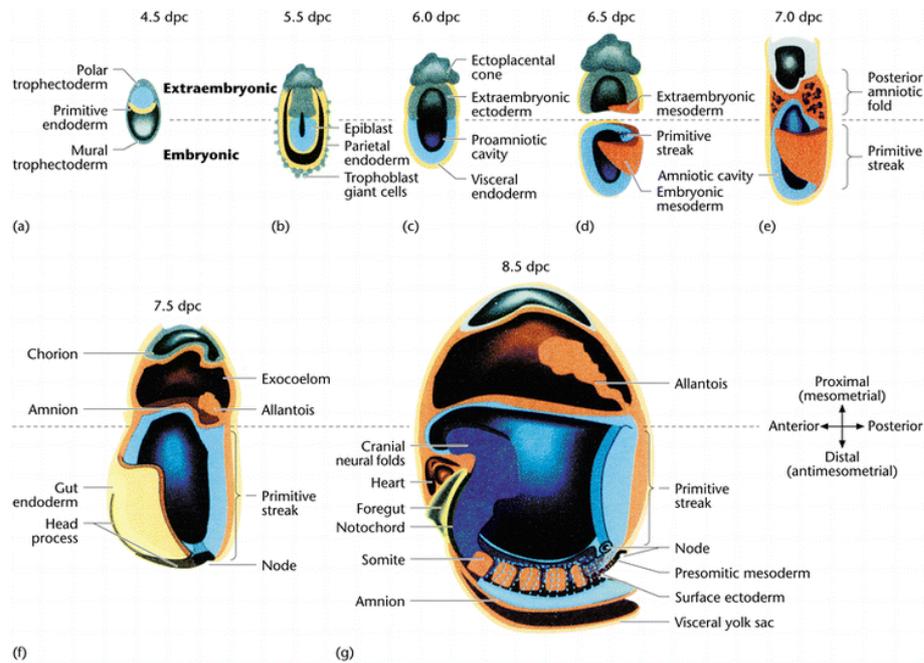


Figura 2 (tratta da Downs, 2001): Sviluppo di embrione murino postimpianto (4,5 – 8,5 dpc). Disegno schematico tridimensionale dello sviluppo embrionale di topo dal momento dell’impianto sino agli stadi precoci di neurulazione. La linea tratteggiata indica il confine tra i tessuti extraembrionali (sezione superiore) ed i tessuti embrionali (sezione inferiore). Al momento dell’impianto (a), l’embrione è composto da tre distinti lignaggi tissutali: il trofoectoderma (in grigio), endoderma primitivo (in giallo) ed epiblasto (in blu). (b) L’endoderma primitivo è diffuso nel trofoectoderma murale dove diviene “endoderma parietale”, mentre l’endoderma primitivo che rimane in contatto con l’ectoderma primitivo viene definito come “endoderma viscerale”. Il trofoectoderma polare in (a) nel frattempo prolifera e spinge l’ectodermaprimitivo (chiamato anche epiblasto) e l’endoderma viscerale che lo circonda all’interno del blastocoele. La struttura embrionale viene ora definita “cilindro a uovo”. Nella regione extraembrionale, l’ectoderma extraembrionale viene coperto dall’endoderma viscerale extraembrionale, mentre la porzione embrionale del “cilindro a uovo” viene circondata dall’endoderma viscerale embrionale, che verrà poi sostituito dall’endoderma definitivo, mentre l’endoderma viscerale extraembrionale formerà una parte del sacco vitellino. (c) La cavità proamniotica si è espansa. Per esigenza di maggiore chiarezza, l’endoderma parietale ed il trofoblasto ad esso associato sono stati omessi. (d) La comparsa della striscia primitiva indica l’inizio della gastrulazione. Contemporaneamente si formano il mesoderma (in rosso) embrionale ed extraembrionale. (e) Attorno al giorno 7,0 dpc, dall’unione delle lacune del mesoderma extraembrionale comincia a formarsi la cavità esocelomica che porta alla separazione dell’ectoderma extraembrionale (futuro corion) dall’ectoderma primitivo, la cui parte superiore formerà la componente mesodermica dell’amnion. Nell’embrione il mesoderma si espande anteriormente, mentre la striscia primitiva si allunga in direzione distale. (f) Attorno al giorno 7,5 dpc, la striscia primitiva ha raggiunto il polo distale del “cilindro a uovo”, dove si è condensata a formare il nodo (in nero). Anteriormente il nodo si allunga a formare i rudimenti della testa (in marrone). L’endoderma viscerale embrionale viene sostituito dall’endoderma definitivo (in giallo) e l’embrione si prepara allo sviluppo cardiovascolare e neurale. Posteriormente, l’allantoide si è formata e si espande nella cavità esocelomica, la cui formazione è ora completa e comprende il corion (parte apicale), il sacco vitellino (parti laterali) e l’amnion (parte basale). Le cellule germinali primitive (non indicate) si formano alla base dell’allantoide. (g) All’incirca al giorno 8,5 dpc, l’embrione contiene 5 paia di somiti, uno per ciascun lato della notocorda; la loro formazione comincia anteriormente. Anteriormente, le pieghe neurali si dividono nelle tre regioni principali del futuro cervello (in viola), e sono presenti il nascente cuore e l’intestino primitivo anteriore. Non appena si forma l’intestino primitivo posteriore, le cellule germinali primitive migreranno verso le gonadi attraverso il mesonefro dorsale (non indicato).

Le cellule ES sono cellule isolate dalle ICM di embrioni preimpianto che sono state adattate per crescere in cultura senza differenziarsi, ma che ad ogni modo possono differenziarsi in mesoderma, endoderma ed ectoderma in vitro, qualora stimolate opportunamente. Una volta reintrodotte in embrioni primitivi per formare chimere e iniettate in topi femmine rese pseudopregne, le cellule ES partecipano attivamente alla formazione di un embrione, dimostrando un'abilità a differenziare anche in vivo in cellule provenienti da tutti e tre i foglietti germinali. La loro capacità di originare chimere viene sfruttata come prova dimostrativa per la reale staminalità di una popolazione cellulare (Spangrude, 2003). Ma le cellule ES murine contribuiscono poco o nulla ai tessuti extraembrionali come la parte trofoblastica della placenta. Questo ha portato alla convinzione diffusa che le cellule ES murine siano commesse irreversibilmente ai soli lignaggi di origine epiblastica e che raramente esse possano differenziare spontaneamente in derivati trofodermici. Invece recentemente è stato dimostrato che le cellule ES murine mantengono il loro potenziale differenziativo trofodermico quando sono sottoposte ad appropriati stimoli extracellulari, come il collagene IV (Schenke-Layland et al., 2007). Un'altra caratteristica peculiare delle cellule ES murine è la loro capacità di formare, una volta iniettate in topi immunodeficienti, teratomi, tumori che contengono svariati tipi di cellule, alcune altamente differenziate, altre parzialmente indifferenziate, provenienti da differenti foglietti germinali. Dato che le cellule iniettate non possono essere eliminate dal sistema immunitario del ricevente, esse sopravvivono e formano tumori multistratificati, indicazione del loro molteplice potenziale differenziativo. La formazione di teratomi in vivo è così strettamente associata alle cellule ES che la loro formazione dopo

iniezione di cellule viene anch'essa comunemente usata per provare il grado di staminalità di popolazioni cellulari (Chambers and Smith, 2004).

La derivazione di linee di cellule ES è stata subito sfruttata nel campo della mutagenesi sito-diretta come nuovo approccio per indagare numerosi aspetti biologici complessi. Oggi è difficile immaginare la ricerca senza la possibilità di mutare un genoma in maniera specifica. Per questo Smithies e Capecchi sono stati premiati giusto quest'anno con il premio Nobel assieme ad Evans (Doetschman et al., 1987; Thomas and Capecchi, 1987).

Numerosi studiosi hanno anche utilizzato queste linee cellulari per modellare lo sviluppo di embrioni precoci in sistemi di cultura ed hanno ricapitolato con successo numerosi aspetti dell'embriogenesi.

Quando la tecnica della fecondazione in vitro venne introdotta in campo clinico per affrontare il problema dell'infertilità, giungendo alla nascita della prima bambina fecondata in vitro (Steptoe and Edwards, 1978), lo scenario era pronto per la derivazione di cellule ES umane isolate dagli embrioni fecondati ma non impiantati in vivo (Thomson et al., 1998).

Alcuni degli embrioni fecondati in eccesso rispetto al fabbisogno clinico sono stati coltivati in vitro per derivarne linee cellulari staminali embrionali. Tuttavia, la derivazione di altre linee di ES umane diversa da quelle già esistenti continua ad alimentare un grosso dibattito etico

Come la loro controparte murina, le cellule ES umane hanno il potenziale di differenziare in quasi tutti i tipi cellulari del corpo umano. Le cellule ES umane sono state differenziate in cellule neuronali, epidermiche, adrenali e cheratinociti (Green et al., 2003; Reubinoff et al., 2000; Zhang et al., 2001), cellule dell'endotelio, del rene, dell'osso, del muscolo e del cuore (He et al., 2003; Kehat et al., 2003; Kehat et al., 2002; Levenberg et al., 2002; Xu et al., 2002), del pancreas e del fegato (Assady et al., 2001; Eiges and

Benvenisty, 2002; Schuldiner et al., 2000). E' stata anche riportata la differenziazione di cellule ES umane in cardiomiociti elettrofisiologicamente comparabili con cardiomiociti umani normali o miociti ventricolari fetali (Mummery et al., 2003) ed in anche in neuroni funzionali mediante l'utilizzo di acido retinoico e Nerve Growth Factor (Schuldiner et al., 2001). Studi in modelli animali hanno dimostrato che il trapianto di cellule derivate da cellule ES umane può trattare con successo una varietà di malattie congenite, incluse malattie cardiovascolari e diabete, o danni da traumi a carico del midollo spinale (Gerecht-Nir and Itskovitz-Eldor, 2004; Odorico et al., 2001; Shablott and Clark, 2004), il che sottolinea ancora una volta la grande potenzialità di un utilizzo delle cellule ES nella rigenerazione tissutale e nella medicina moderna, anche se viene spesso riportata una mortalità dovuta all'insorgenza di teratomi (Fujikawa et al., 2005; Nussbaum et al., 2007).

Recentemente è stata pubblicata una nuova scoperta che ha destato molto scalpore. Due gruppi differenti hanno dimostrato di essere in grado di de-differenziare totalmente fibroblasti adulti, regredendole sino allo stadio di cellule simili alle cellule ES. La trasduzione di fibroblasti adulti con un cocktail di fattori contenente 4 diversi transgeni induce uno stato pluripotente in queste cellule (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). I fattori contenuti in questo cocktail sono leggermente diversi nei due gruppi, ma entrambi contengono Oct-4 e Sox2, che sono noti per essere importantissime nel mantenimento del carattere staminale (Boyer et al., 2005). La riprogrammazione è stata già ottenuta anche a partire da biopsie di paziente, mostrando l'importanza di questo approccio in previsione di applicazioni terapeutiche (Park et al., 2008)

Le cellule germinali, che non vengono commesse al differenziamento sessuale sino al periodo medio-gestazionale, mantengono la loro pluripotenzialità sino a quel momento (Hayashi et al., 2007). Ed infatti un altro approccio per l'ottenimento di cellule staminali embrionali usa tessuti derivati dalle creste genitali di topo al giorno 10,5 dpc (Matsui et al., 1992) o di feti umani abortiti nel primo trimestre di gestazione (Shamblott et al., 1998). Queste cellule che normalmente si sviluppano in gameti maturi, possono essere coltivate in condizioni specifiche per la produzione di linee cellulari che possiedono tutte le caratteristiche note delle cellule ES derivate dalle blastocisti, ma che sembrano mancare del potenziale tumorigenico (Thomson and Odorico, 2000). Sebbene le cellule germinali fetali e neonatali possano solo differenziare in gameti, oociti maturi possono dare origine a tutti i lignaggi cellulari. Sia molecole materne accumulate negli oociti che molecole specifiche della linea germinale espresse durante lo sviluppo possono essere necessarie per il mantenimento della pluripotenza. In vitro, cellule germinali primordiali (Primordial Germ Cell, PGC) possono andare incontro a dedifferenziazione in cellule germinali embrionali (Embryonic Germ, EG) pluripotenti quando vengono coltivate con basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Stem Cell Factor (SCF) e, nel caso di cellule murine, Leucemia Inhibitory Factor (LIF) (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992; Shamblott et al., 1998).

## **2.2 CELLULE STAMINALI ADULTE**

L'esistenza nel corpo degli organismi di tessuti che si riparano e rigenerano lungo tutto l'arco della vita è un argomento a favore della

presenza di cellule staminali di lunga durata in tessuti adulti che servono come fonte di cellule per il processo rinnovativo.

Ci sono due tipi differenti di cellule staminali adulte. Il primo, che è quello meglio caratterizzato, comprende tutte le cellule isolabili "a fresco", cioè cellule residenti. Queste cellule staminali sono facilmente individuabili nei tessuti dove c'è un alto ricambio, come il midollo osseo, pelle ed intestino (Bjerknes and Cheng, 2006; Gambardella and Barrandon, 2003; Phinney and Prockop, 2007). Altri compartimenti di cellule staminali sono meno ovvi, dove esse possono esistere in piccole quantità in nicchie nascoste in condizioni normali, ma diventano attivate dopo danno tissutale o altre condizioni patologiche; un esempio di queste sono le cellule staminali del fegato o del cervello (Dorrell and Grompe, 2005; Lindvall et al., 2004), che per anni è stato classificato come organo incapaci di ripararsi.

Alcune cellule staminali adulte sono molto plastiche, in grado di differenziarsi in tipi cellulari di tutti e tre i foglietti germinali, mentre altre cellule staminali sono capaci di differenziarsi solo in un unico tipo cellulare dello stesso foglietto germinali (come le cellule satelliti del muscolo scheletrico). Anche se i fattori ed i processi che governano il potenziale differenziativo delle cellule staminali derivate da tessuto non sono ancora ben noti, c'è un crescente interesse attorno all'isolamento, caratterizzazione e potenziale terapeutico di cellule staminali residenti in tessuti adulti all'uopo di ripararli e rigenerarli.

Un esempio di queste cellule sono le cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cell, HSC, si veda oltre), probabilmente le cellule staminali adulte meglio conosciute, che sono state oggetto di profonde ricerche per capirne la plasticità.

Le HSC possono essere utilizzate sia in trapianti di tipo autologo che allo genico per il trattamento di pazienti con immunodeficienze ereditarie, malattie autoimmuni o altre malattie a carico del sistema ematopoietico per ricostituire i diversi lignaggi di cellule ematiche e le difese del sistema immunitario. In particolare, l'uso di HSC può aumentare la risposta immunitaria dei pazienti e può quindi essere d'aiuto nel riparare tessuti danneggiati in siti distali in svariate situazioni patologiche o evitare malattie infettive dopo il trapianto di tessuto od organo. Il trapianto di HSC può inoltre ricostituire il sistema immunitario dopo gli effetti mieloablativi di alte dosi di chemioterapia o radioterapia in pazienti colpiti da cancro (Mimeault et al., 2007)

E' stata documentata inoltre l'integrazione di HSC in differenti tessuti danneggiati in modelli animali (Ferrari et al., 1998; Theise et al., 2000; Wagers et al., 2002), tuttavia il fatto che queste cellule effettivamente transdifferenzino o si fondano solamente con cellule tessuto-specifiche preesistenti è ancora in discussione (Wang et al., 2003).

Il secondo tipo di cellule staminali adulte comprende le cellule staminali che si ottengono in coltura. C'è maggiore evidenza sperimentale del mantenimento di una sufficiente plasticità fenotipica da parte delle cellule di un determinato tessuto una volta messe in coltura, e questa plasticità sembrerebbe tale da poter utilizzare queste cellule come cellule staminali per tessuti danneggiati che a prima vista potrebbero non sembrare relazionati a quello di origine (Almeida-Porada et al., 2001). Tra queste cellule si trovano le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cell, MSC) che hanno raccolto interesse come potenziali cellule per applicazioni terapeutiche grazie principalmente alla loro capacità di auto-rinnovarsi e differenziarsi in tessuti come quello osseo, cartilagineo,

adiposo e muscolare (Figura 3) (Deans and Moseley, 2000). E' già stato dimostrata l'efficacia in applicazioni terapeutiche preliminari, inclusi osteogenesi imperfetta, trapianto ematopoietico e rigenerazione ossea (Horwitz et al., 2002; Koc et al., 2000; Petite et al., 2000). Tuttavia, molte questioni rimangono aperte soprattutto a riguardo della loro caratterizzazione fenotipica ed il loro comportamento in coltura. Sebbene nuovi marker come SSEA-4 siano stati proposti per l'identificazione delle MSC (Gang et al., 2007), non esiste un unico protocollo per isolare queste cellule comune a differenti laboratori e questo rappresenta un problema da risolvere per applicazioni cliniche standardizzate. Si collocano su un terreno differente cellule isolate dal midollo osseo come le MIAMI (D'Ippolito et al., 2004) o le MAPC (Jiang et al., 2002), che sono state descritte come cellule pluripotenti in grado di differenziare in vitro in lignaggi cellulari derivanti da tutti e tre i foglietti germinali e, per quel che riguarda le MAPC murine, di integrarsi anche in vivo (Serafini et al., 2007). Per questa ragione queste cellule potrebbero rappresentare un concreto passo in avanti verso la terapia cellulare rispetto alle MSC. Tuttavia, le MAPC si sono dimostrate molto difficili da isolare e da mantenere in coltura e con risultati contraddittori in differenti laboratori (Check, 2007), per cui nonostante rappresentino un buon modello di plasticità cellulare, risulta difficile pensare ad una loro applicazione clinica.

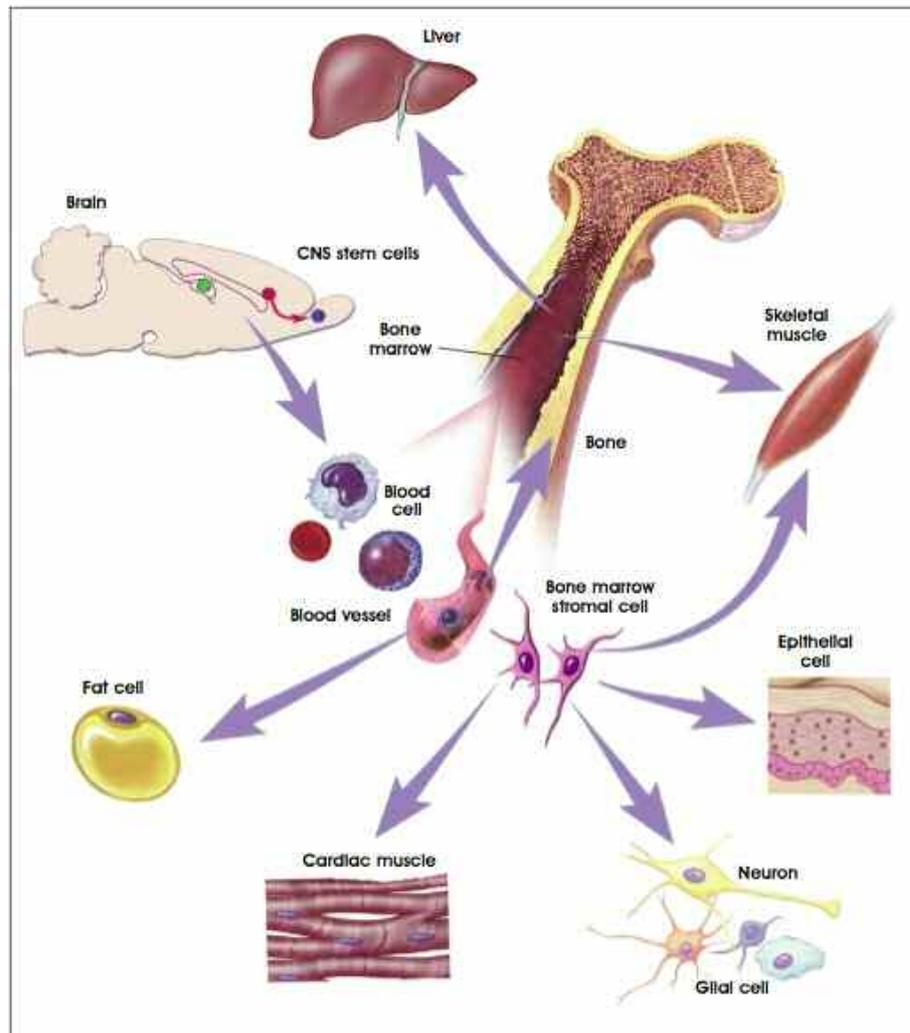


Figura 3 (tratta da <http://stemcells.nih.gov>): Plasticità delle cellule staminali adulte. Diagramma schematico che indica la capacità differenziativa, sin qui dimostrata, delle cellule staminali adulte. In particolare cellule stromali del midollo osseo sembrano essere in grado di differenziarsi in differenti tessuti derivanti da tutti e 3 i diversi foglietti germinali.

### 2.3 CELLULE STAMINALI FETALI

Tra le cellule embrionali e quelle adulte si collocano le cellule staminali fetali. Pur essendo le cellule che godono di minore pubblicità, queste cellule non sono del tutto sconosciute. Le HSC da sangue di cordone ombelicale per esempio sono state estensivamente studiate e sono

ampiamente utilizzate negli ultimi decenni. Recentemente, l'interesse per la biologia delle cellule staminali e il loro potenziale terapeutico ha portato alla ricerca di cellule staminali in organi fetali ottenuti al termine della gravidanza così come in siti accessibili da usarsi come fonte di cellule staminali autologhe durante la gravidanza: per esempio tessuto neurale fetale è stato già utilizzato in ambito terapeutico contro il morbo di Parkinson, con evidenze di miglioramenti clinici (Lindvall, 2003).

Si pensa che le cellule staminali ottenute da sangue e tessuti fetali abbiano proprietà ed immunofenotipo simili a quelli delle cellule staminali isolate da tessuto adulto, mentre il loro potenziale differenziativo sia più ristretto rispetto alle cellule ES pluripotenti (Verfaillie et al., 2002). Le cellule staminali fetali sono descritte come multipotenti. Tuttavia, la questione se le cellule staminali residenti nei tessuti adulti siano le stesse che sono presenti durante la vita fetale attende ancora una risposta.

Le ricerche finora condotte suggeriscono che le cellule staminali fetali siano più plastiche delle cellule staminali adulte e quindi abbiano un potenziale terapeutico maggiore (O'Donoghue and Fisk, 2004). Il gruppo di Fisk ha riportato per primo l'isolamento di MSC umane da sangue, fegato e midollo osseo fetali del primo trimestre di gestazione (Campagnoli et al., 2001). In questo lavoro hanno anche dimostrato come MSC co-circolano in numero relativamente abbondante nel sangue fetale nell'uomo, rappresentando 0,4% delle cellule mononucleate circolanti. Inoltre, cellule staminali multipotenti sono state isolate dal cordone (Secco et al., 2007)

Anche il tessuto placentare attira l'interesse come sito alternativo di cellule da impiegarsi nella medicina rigenerativa data la plasticità di molte delle proprie cellule isolate da differenti regioni placentari (Parolini et al., 2007).

Inoltre, la placenta, che è coinvolta nel processo di mediazione della tolleranza fetale, contiene cellule che possiedono proprietà immunomodulatorie (Mellor and Munn, 2000). Queste due caratteristiche possono dimostrarsi fondamentali per la loro prossima applicazione clinica. Il tessuto placentare è facilmente recuperabile e manipolabile senza procedure invasive e non solleva questioni etiche.

## **2.4 CELLULE STAMINALI DEL LIQUIDO AMNIOTICO**

Il nostro interesse si è concentrato su di un'altra fonte di cellule staminali fetali: il liquido amniotico. Il liquido amniotico umano viene usato per la diagnosi prenatale da più di 70 anni. E' stato dimostrato essere sicuro, affidabile e semplice strumento di screening per una larga varietà di malattie genetiche e dello sviluppo.

Dal punto di vista dello sviluppo, il liquido amniotico viene secreto alle cellule derivanti dal mesoderma extraembrionale. Le cellule del mesoderma extraembrionale sono responsabili della formazione del sacco vitellino, amnion ed allantoide (Kinder et al., 1999; Lawson et al., 1991). Quest'ultima poi forma il cordone ombelicale e la parte mesenchimale del labirinto nella parte corionica nella placenta matura (Downs and Harmann, 1997). La posizione finale delle membrane fetali è il risultato del processo di avvvitamento dell'embrione, che avviene attorno al giorno 8,5 dpc nel topo e che porta all'arrotolamento dell'amnion e del sacco vitellino attorno all'embrione (Kinder et al., 1999). La specificazione dei lignaggi tissutali avviene con la restrizione del potenziale differenziativi e con l'attivazione di un'espressione genica lignaggio-specifica (Parameswaran and Tam, 1995; Rathjen et al., 1999). Questo processo è fortemente

influenzato da interazioni cellulari e da trasmissioni di segnale (Dang et al., 2002; Li et al., 2004).

Il sacco amniotico (Figura 4) è composto da un paio di membrane resistenti ma sottili membrane che avvolge l'embrione (e successivamente il feto) in sviluppo sino a poco prima della nascita. La membrana più esterna, il corion, contiene l'amnion e fa parte della placenta (Kaviani et al., 2001; Kinder et al., 1999). L'amnion deriva dall'ectoderma e dal mesoderma, che cresce e riempie la cavità amniotica soprattutto con acqua (Robinson et al., 2002). All'inizio il liquido amniotico è isotonico e contiene proteine, carboidrati, lipidi e fosfolipidi, urea ed elettroliti. Successivamente, l'urina escreta dal feto ne aumenta il volume e cambia le concentrazioni dei soluti (Bartha et al., 2000). Il feto può respirare nell'acqua, il che permette la corretta crescita e sviluppo dei polmoni e del tratto gastrointestinale. Il liquido deglutito dal feto passa attraverso il sangue fetale alla circolazione materna. Le funzioni del liquido amniotico sono quelle di assicurare una crescita ed uno sviluppo simmetrico; avvolge e protegge l'embrione attutendone eventuali colpi; mantiene costante la temperatura e la pressione; permette la libertà del movimento fetale, importante per lo sviluppo del sistema muscolo-scheletrico e del flusso sanguigno (Baschat and Hecher, 2004).

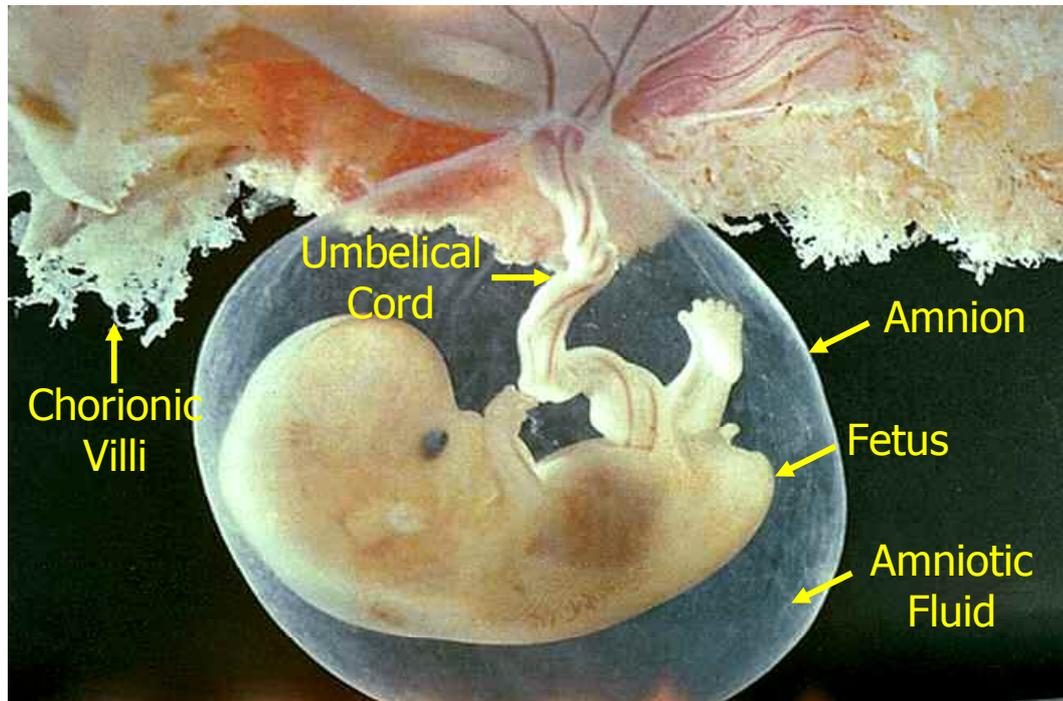


Figura 4 (modificata da <http://zoology.okstate.edu>): Fotografia di un feto umano di circa 10 settimane di gestazione. Come indicato dalle frecce, il feto è circondato dall'amnion ed immerso nel liquido amniotico. E' connesso alla placenta tramite il cordone ombelicale. I villi coriali, un'altra fonte di cellule per tessuti fetali sfruttata per la diagnosi prenatale, non sono direttamente in contatto con il feto.

Una gran varietà di origini differenti per le cellule presenti nel liquido amniotico sono state sin qui suggerite (Medina-Gomez and del Valle, 1988). E' noto come siano presenti cellule provenienti da ciascuno dei tre foglietti (In 't Anker et al., 2003; Prusa et al., 2003). Si pensa che queste cellule provengano dall'amnion, dalla pelle o dai tratti respiratori, alimentari, urogenitali. Inoltre, è stato riportato come cellule isolate dal liquido amniotico così come dalla placenta poste in coltura possano costituire una riserva di cellule staminali, dato che mantengono la capacità

di differenziare in diversi tipi cellulari (Prusa and Hengstschlager, 2002). E' interessante notare che è stato osservato che una subpopolazione di cellule del liquido amniotico esprime l'mRNA di Oct-4, un fattore di trascrizione il cui ruolo è quello di mantenere la pluripotenza (Prusa et al., 2003).

Le cellule del liquido amniotico possono essere ottenute da un piccolo campione di liquido durante la procedura di amniocentesi, una procedura che viene spesso praticata in gravidanze durante il secondo trimestre per diagnosi prenatale o per la determinazione del sesso del nascituro (Hoehn et al., 1975). Mentre i ricercatori sono stati in grado sinora di isolare e differenziare MSCs in media solo dal 30% dei cordone, i dati in letteratura parlano di come questa percentuale salga a quasi il 100% per quel che riguarda le MSC da liquido amniotico (In 't Anker et al., 2003; Tsai et al., 2004).

Una subpopolazione di cellule pluripotenti del liquido amniotico può essere isolata attraverso la selezione delle cellule positive per il marker c-kit, un recettore di membrana (De Coppi et al., 2007). Queste cellule, una volta adese, acquisiscono una morfologia allungata e proliferano molto velocemente. Non sono necessario alcun stroma per la loro espansione. Queste cellule mostrano un alta capacità di auto-rinnovamento e possono essere mantenute in coltura per oltre 300 passaggi, oltrepassando in tal modo il limite di Hayflick di senescenza. Il tempo di divisione cellulare si attesta attorno alle 36 ore, con scarsa variazione con il progredire dei passaggi. Studi condotti sul loro cariotipo han rivelato che questo è normale anche in cellule che rimangono in coltura per molto tempo, così come normali sono anche i punti di controllo del ciclo cellulare in fase G1 e G2. Inoltre esse conservano inalterata la lunghezza del telomero qualora

vengano mantenute nello stadio indifferenziato (Bryan et al., 1998). L'analisi del loro profilo fenotipico dimostra come le cellule ckit+ isolate dal liquido amniotico siano positive per un marcatore di superficie specifico delle cellule embrionali, Stage-Specific Embryonic Antigen (SSEA)-4, per il fattore di trascrizione principe delle cellule staminali Oct-4, e non esprimono altri marcatori come SSEA3, CD4, CD8, CD34, CD133, C-MET, ABCG2, NCAM, BMP4, TRA-1-60 e TRA-1-81 per citarne alcuni. Questo profilo di espressione è di particolare interesse in quanto dimostra la presenza tra le cellule del liquido amniotico di progenitori che condividono alcuni marcatori chiave espressi dalle cellule ES. Questo può indurre a concludere che nonostante le cellule staminali del liquido amniotico (Amniotic Fluid Stem, AFS) non siano così primitive come le cellule ES, tuttavia mantengono un potenziale differenziativo più ampio rispetto alle cellule staminali adulte. Altre due caratteristiche peculiari sono la loro capacità di formare in vitro corpi embrioidi (Embryoid Bodies, EB), ammassi cellulari tri-dimensionali che risultano essere poi positivi per marcatori specifici dei tutti e 3 i foglietti germinali, e la totale assenza di teratomi nei topi immunodeficienti iniettati con le cellule AFS. Quest'ultima le rende particolarmente interessanti per un'eventuale approccio di tipo clinico.

Nel paper pubblicato da De Coppi e colleghi (De Coppi et al., 2007), è stata dimostrata la capacità delle cellule AFS di differenziare in senso adipogenico, osteogenico, miogenico, endoteliale, neurogenico ed epatico. La multipotenza è una caratteristica mantenuta dalle cellule AFS clonate per diluizione limite. Per dimostrare in maniera rigorosa che sono effettivamente cellule staminali a livello clonale (cioè che cloni, insieme cellule derivanti da una singola cellula, sono pluripotenti ed in grado di

auto-rinnovarsi), le cellule AFS sono state marcate con un vettore retrovirale. Dato che il DNA virale può integrarsi casualmente in qualsiasi regione cromosomica (Wu and Burgess, 2004), la presenza di un provirus in un unico sito genomico può identificare una popolazione clonale discende da una cellula in cui quella particolare integrazione è avvenuta. Differenti subcloni di cellule AFS hanno dimostrato uguale capacità differenziativa rispetto alla linea cellulare di partenza.

Nonostante la pluripotenza di queste cellule sia stata ampiamente dimostrata, la capacità delle AFSC di differenziare in senso ematopoietico non è ancora stata investigata. Pertanto il nostro lavoro si è concentrato sulle cellule AFS ed il loro potenziale ematopoietico.

## **II EMATOPOIESI**

### **1. Definizione**

Le cellule del sangue (granulociti, monociti, linfociti, piastrine e globuli rossi) vengono prodotte lungo tutto l'arco della vita. In mammiferi adulti, l'ematopoiesi, definita come espansione e differenziazione di progenitori ematopoietici, avviene nel midollo osseo, nella zona abluminale dei sinusoidi che invadono le cavità ossee create dagli osteoclasti subito dopo la deposizione del calcio nella matrice cartilaginea (Cumano and Godin, 2007).

Le cellule sanguigne comprendono differenti tipi cellulari e questi hanno differente emivita, che varia da alcuni giorni a svariati anni. Le cellule ematopoietiche subiscono un intenso rinnovamento e conseguentemente

esiste un compartimento rigenerativo molto attivo. Solo a metà del ventesimo secolo i lavori di Metcalf e Moore (Metcalf, 1970; Moore and Metcalf, 1970) e di Till e McCullough (Till and Mc, 1961) hanno introdotto il concetto che progenitori multipotenti possano trovarsi nel midollo osseo adulto e che queste siano le cellule responsabili per la produzione costante di sangue. Progressi nella caratterizzazione fenotipica e funzionale di questi progenitori ha permesso l'isolamento delle HSC ed ha posto il sistema ematopoietico come paradigma nel campo della biologia delle cellule staminali. Infatti le HSC soddisfano a pieno i criteri che definiscono le cellule staminali, la multipotenza e l'auto-rinnovamento, come sopraccitato.

## **2. La cellula staminale ematopoietica**

Le HSC sono state ben studiate e caratterizzate al punto che ora possono essere isolate sulla base del loro fenotipo, Lin- Sca-1+ cKit+ Cd150+ CD48- (Ema et al., 2006). Al contrario sembra che non esista un marcatore specifico od un gruppo di marcatori che identifichino univocamente o almeno non è stato scoperto sinora. Molte HSC umane esprimono l'antigene CD34 (sebbene alcune HSC sono presenti anche nella frazione CD34-) che è espresso anche su progenitori commessi ematopoietici ed anche non-ematopoietici. Le HSC sono Lin-, non esprimono CD38 ma esprimono cKit+. Le HSC umane esprimono anche CD133 ed il trasportatore Bcrp1 (noto anche con il nome di ABCG2), che pompa verso l'esterno un certo numero di molecole, tra cui l'Hoescht-33342. Questo permette di selezionare le HSC anche sulla base dell'assenza di colorazione per

Hoescht, una situazione che viene visualizzata all'analisi con il citofluorimetro come "side-population" (Verfaillie, 2002).

L'iniziale differenziazione di HSC pluripotenti avviene nel midollo osseo e si divide in due vie principali, linfoide e mieloide. D'ora in poi le cellule staminali diventano cellule progenitrici che hanno perso la capacità di auto-rinnovarsi e sono commesse a generare un determinato tipo cellulare. Due differenti progenitori multipotenti sono stati identificati, con grande accuratezza nel topo, mentre la conoscenza nell'uomo è molto meno sviluppata, nonostante siano comunque stati osservati: CLP (Common Lymphoid Progenitor) che dà origine al lignaggio linfoide (Six et al., 2007) e CMP (Common Myeloid Progenitor) che è responsabile della generazione delle cellule progenitrici degli eritrociti, neutrofili, eosinofili, basofili, monociti, mastociti e piastrine (Manz et al., 2002). La differenziazione che si sviluppa a partire da CMP avviene nel midollo osseo dove le cellule giungono a completa maturazione. Anche lo sviluppo di linfociti B maturi avviene nel midollo osseo. La successiva differenziazione in plasmacellule o cellule B della memoria non avviene fino all'incontro con un antigene specifico da parte di un linfocita B maturo (ma sempre naive). Lo sviluppo delle cellule T inizia nel midollo osseo dove prosegue fino allo stadio di precursori T. Queste cellule (note anche come pre-T) migrano poi verso il timo dove completano il loro sviluppo. Uscendo dal timo, i linfociti T maturi (ma naive) si dividono in linfociti T citotossici e linfociti T helper. L'ulteriore differenziazione avviene solo in caso di incontro con un antigene specifico, presentato alle cellule T mediante proteine MHC.

### 3. Saggi per l'identificazione di HSC

Nel lungo cammino che ha portato all'identificazione ed alla determinazione di tutte le fasi dell'ematopoiesi, la messa a punto di saggi utili allo scopo è stata una delle sfide più grandi. Questo ha portato alla fine all'identificazione in modo graduale dei progenitori ematopoietici che vengono generati sequenzialmente durante la progressione da cellula staminale a cellula differenziata funzionale.

Molti saggi sono stati sviluppati e messi a punto in vitro ed in vivo, e questi sono stati raccolti in una review da Laure Coulombel (Coulombel, 2004). Qui di seguito vengono elencati i più utilizzati.

I prototipi di saggi in vitro a corto termine sono i saggi clonogenici in terreno semisolido, che identificano e quantificano progenitori ristretti a determinati lignaggi in condizioni ben standardizzate. Dato che la loro progenie, essendo immobilizzata nel terreno, si accumula in colonie ben raccolte con specifiche caratteristiche (composizione, dimensione, colore, disposizione), alcuni tipi di progenitori (eritroidi, granulocitici, macrofagici e megacariocitici) possono differenziarsi contemporaneamente in una determinata coltura senza l'esigenza di purificare precedentemente le cellule iniziali. All'interno di un dato lignaggio, progenitori a differente stadio di maturazione possono essere identificati sulla base della loro sensibilità alle citochine, del tempo impiegato a generare cellule differenziate, della dimensione delle colonie: questi tre parametri sono stati utilizzati per differenziare le cellule formanti colonia eritroide matura (CFU-E) dalle cellule formanti colonia eritroide immatura (BFU-E). Con una certa sorpresa, i saggi clonogenici per progenitori linfoidi non sono ben definiti, a parte per i progenitori pre-B murini.

I saggi clonogenici a corto termine non sono adeguati per l'osservazione di progenitori più immaturi: la durata del terreno viscoso (metilcellulosa, agar o plasma clot) non supera le 3 settimane, un periodo troppo breve perché le cellule staminali possano produrre una progenie differenziata, e non può essere rinnovato. In passato comunque, molte classi di progenitori multipotenti, cellule formanti colonia granulocitica-eritroide-macrofagica-megacariocitica (CFU-GEMM) sono state identificate basandosi sulla presenza in una singola colonia di cellule differenziate e/o progenitori appartenenti a più di un lignaggio.

Qualsiasi sistema sviluppato per identificare progenitori molto immaturi oltrepassa le 3-5 settimane di coltura. Questo tempo permette ai progenitori di completare la propria differenziazione. Una caratteristica comune di questi sistemi a lungo termine è la presenza di una linea stromale che fornisce un substrato ed agisce come fonte di fattori regolatori nel tentativo di ricostituire la complessità della struttura midollare in vivo. Con questi saggi sono stati individuati due tipi differenti di cellule, che probabilmente coincidono, sia nel topo che nell'uomo: le cellule iniziatrici cultura a lungo termine (LongTerm Culture-Initiating Cell, LTC-IC) e le cellule formanti "aree a ciottolato" (Cobblestone Area-Forming Cell, CAFC). Le cellule LTC-IC vengono definite per mezzo della loro capacità di dare origine a cellule figlie che sono poi identificabili mediante test clonogenici standard, una volta coltivate su supporto stromale. Una cellula CAFC invece si integra nello stroma stesso dove forma queste caratteristiche "aree di ciottolato", definite come gruppo di cellule appiattite, in stretta connessione con lo stroma circostante e dense otticamente parlando. E' interessante notare come le stesse cellule stromali siano ugualmente competenti nel sostegno

della differenziazione mieloide e linfoide T di LTC-IC. Cellule T non sono mai prodotte in questi tipi di saggi, sebbene i loro progenitori vengano mantenuti in coltura e alcune LTC-IC in altri saggi sono in grado di generarle.

Le condizioni sperimentali che permettono la differenziazione linfoide di progenitori primitivi umani sono state messe a punto nel 1990, 15 anni dopo rispetto alle cellule murine. Questo spiega la differenza esistente nel controllo della differenziazione linfoide murina ed umana, che contrasta con la capacità simile di modulare la differenziazione mieloide nelle due specie. Una seconda difficoltà con la differenziazione di cellule umane è evidente se si pensa che la linfopoiesi viene valutata in un ambiente xenogenico, che spiega perché cellule B e T mature e funzionali sono ottenute in vitro con scarsa frequenza.

Per quel che riguarda i saggi per le cellule B, cellule pre-B e precursori NK murini, ma non umani, sono stati identificati in saggi clonogenici. La discriminazione ad occhio nudo di colonie di cellule B dalle cellule non B non è comunque abbastanza accurata da evitare l'analisi citofluorimetrica dei marcatori superficiale delle cellule che compongono le colonie. Questo problema è stato risolto quando sono state introdotte le cellule stromali murine (Sys-1, S17, MS5, OP9) che sono rapidamente diventate la procedura standard per identificare il potenziale B delle cellule di interesse; l'osservazione di cellule CD19+ dopo 5-6 settimane di coltura in condizioni di bassa percentuale di siero identifica la presenza di cellule progenitrici B nell'inoculo.

Parlando dei saggi per le cellule T, la progressione dallo stadio di timociti triplo negativi a cellule T mature dipende dalla ricostituzione della architettura timica tridimensionale come quello realizzato nelle colture

organotipiche in timo fetale (Fetal Thymus Organ Culture, FTOC). I lobi di timo da qualsiasi ceppo murino possono essere utilizzati previa deplezione dei linfociti T endogeni, cosa che non si rende necessaria se si prelevano timo da topi immunodeficienti SCID o NOD/SCID. Una piccola frazione di cellule entra per prima nel timo, un processo di riconoscimento specifico/migrazione che non è ancora del tutto chiaro, e si differenzia secondo la sequenza di differenziamento descritta in vivo attraverso lo stadio di cellule doppio positive (DP) CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> sino allo stadio di singolo positivo CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Il monostrato di cellule stromali di timo normalmente non riesce a sostituire un ambiente timico intatto come nelle FTOC. Tuttavia recentemente è stata messa a punto l'induzione di una differenziazione extratimica coltivando progenitori primitivi sulla linea stromale OP9 esprimente il ligando di Notch Delta-1. La cascata di segnali dipendente da Notch è stato scoperto essere determinate nel commissionamento in senso linfoide T ed i ligandi Notch sono noti essere potenti determinanti del destino cellulare.

Per quel che riguarda i saggi in vivo, i topi deficienti per i geni Rag, che non sviluppano le convenzionali popolazioni di cellule B e T, sono un ottimo strumento per lo studio i meccanismi molecolari e cellulari di tutte le fasi dell'ematopoiesi murina, compresa la linfopoiesi.

Una vera e propria gerarchia di HSC trapiantabili è stata definita per il sistema murino e, anche se con minor precisione, per quello umano. In vivo vengono misurate sia la longevità che la multipotenza delle cellule staminali e dei progenitori. Mentre la longevità nei saggi in vitro si misura in settimane, in vivo ci si può spingere sino a diversi mesi, permettendo l'identificazione di "vere" cellule staminali, quelle la cui attività linfomieloide è misurabile anche a lungo termine.

L'utilizzo di topi wild-type o Rag<sup>-/-</sup> irradiati come riceventi non è un il migliore metodo per lo studio dell'attività ematopoietica di cellule umane, analisi per la quale si devono utilizzare modelli animali modificati geneticamente con mutazioni particolari i danni del sistema immunitario che li rendono permissivi allo xeno-trapianto. A partire dalla sua prima descrizione da parte di John Dick (Kamel-Reid and Dick, 1988), molti test sono stati condotti trapiantando cellule umane in topi bg/nu/xid. E' interessante notare che l'immunodeficienza in sé non garantisce il successo del trapianto e quindi è necessario prendere in considerazione il background genetico del ricevente: così le cellule umane non sviluppano l'ematopoiesi quando sono iniettate per via endovenosa in topi Rag<sup>-/-</sup> o Rag<sup>-/-</sup>  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> adulti, invece attecchiscono e si differenziano quando sono iniettate nel fegato di questi topi neonati. I topi adulti SCID o NOD/SCID invece sono permissivi allo xeno-trapianto di celluleumane. Tuttavia la stragrande maggioranza di cellule umane osservate (più dell'80%) e la mancanza di differenziazione in senso T e NK ha sollevato dubbi sulla capacità delle cellule umane di ricapitolare un'ematopoiesi normale in un ambiente murino. La riduzione o l'eliminazione dell'attività delle cellule NK murine endogene attraverso la manipolazione genetica dei topi riceventi come nel caso dei topi NOD/SCID  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> o attraverso l'iniezione di anticorpi contro IL2R $\alpha$  in topi NOD/SCID normali ha enormemente migliorato i risultati in termini di differenziazione in cellule T e NK: Questo sottolinea l'enorme ruolo svolto dalle cellule NK e da altri fattori proprio dell'immunità innata nello studio in vivo dell'attività delle cellule umane, non solo nell'ematopoiesi.

Nonostante la loro immunodeficienza e l'ipersensibilità alle radiazioni ionizzanti, i topi NOD(SCID devono essere irradiati leggermente (3.5-4

Gy) per permettere l'attecchimento di cellule umane nei tessuti murini e la dose di irradiazione correla linearmente con la proporzione di cellule iniettate.

I trapianti secondari sono il test più importante per valutare l'attività di auto-rinnovamento delle cellule ematopoietiche di interesse, sia umane che murine. Le cellule derivanti dal donatore vengono isolate dal midollo osseo di riceventi primari e quindi ri-iniettate in riceventi secondari pre-irradiati. Se si osserva una nuova ricostituzione ematopoietica, questa diventa una prova inequivocabile dell'attività di auto-rinnovamento e del carattere staminale delle cellule analizzate.

#### **4. Insorgenza dell'ematopoiesi**

L'auto-rinnovamento delle cellule staminali garantisce l'integrità di un compartimento per tutta la vita. Il contributo aggiuntivo ad un distinto tessuto adulto da parte di progenitori meno differenziati (e quindi con un potenziale differenziativo più ampio) o da parte di cellule inizialmente indirizzate ad altri programmi di sviluppo è una possibilità di rilevanza fisiologica limitata e, soprattutto, è stata di assai difficile dimostrazione (Orkin and Zon, 2002; Wagers et al., 2002). Ne consegue che è assai probabile che i compartimenti di cellule staminali adulte nei vari tessuti siano stati verosimilmente formati solo una volta per tutta la vita, nella maggior parte dei casi durante la vita embrionale o perinatale. Per questo, i ricercatori hanno concentrato gli sforzi nell'identificazione la localizzazione anatomica e temporale della generazione delle cellule staminali in modo da chiarire i meccanismi molecolari che stanno alla base della loro costituzione.

Nel caso delle HSC, la discussione è stata per lungo tempo dominata dall'osservazione diretta di embrioni di mammiferi e di uccelli, nei quali un'intensa attività eritropoietica è osservabile nel sacco vitellino. Nell'embrione di topo aggregati cellulari omogenei appaiono attorno al giorno 7-7,5 dpc all'interno del mesoderma laterale del sacco vitellino e rapidamente formano strutture definite circondate da cellule che evolvendo assumono una morfologia di tipo endoteliale, mentre la parte centrale degli aggregati comprendono eritrociti. Questa conformazione della struttura cellulare è stata chiamata isola sanguigna (Metcalf and Moore, 1971).

Gli eritrociti nelle isole sanguigne sono cellule larghe e nucleate che assomigliano i precursori eritroidi nel midollo osseo o gli eritrociti della classe dei vertebrati inferiori (nel senso di più primitivi) come uccelli, pesci ed anfibi. Questi eritrociti non raggiungono mai *in situ* lo stadio finale di maturazione con l'enucleazione, e per questo motivo vengono chiamati eritrociti primitivi. Essi sono le prime cellule ematopoietiche di origine embrionale osservabili.

Come logica conseguenza, l'idea che le HSC originino nel sacco vitellino e che da esso (attraverso la rete circolatoria che si forma successivamente) poi migrino per raggiungere il fegato fetale, l'organo ematopoietico embrionale per eccellenza, e da questo poi il timo ed il midollo osseo è stata la teoria prevalente negli anni '70 (Figura 5). Numerosi esperimenti supportarono questa ipotesi. Cellule embrionali originanti dal sacco vitellino isolate subito dopo la formazione delle isole sanguigne vennero iniettate in embrioni murini (Weissman, 1978). Analisi istologiche postnatali, indicarono che quantità variabili, comunque apprezzabili, di cellule derivanti dai donatori, appartenenti al lignaggio ematopoietico,

erano presenti nel timo e nel midollo osseo dei topi riceventi. Il gruppo di Auerbach rafforzò questi risultati (Liu and Auerbach, 1991) mostrando che cellule del sacco vitellino posseggono potenziale di differenziazione in cellule T dopo coltura organitipica in timi fetali.

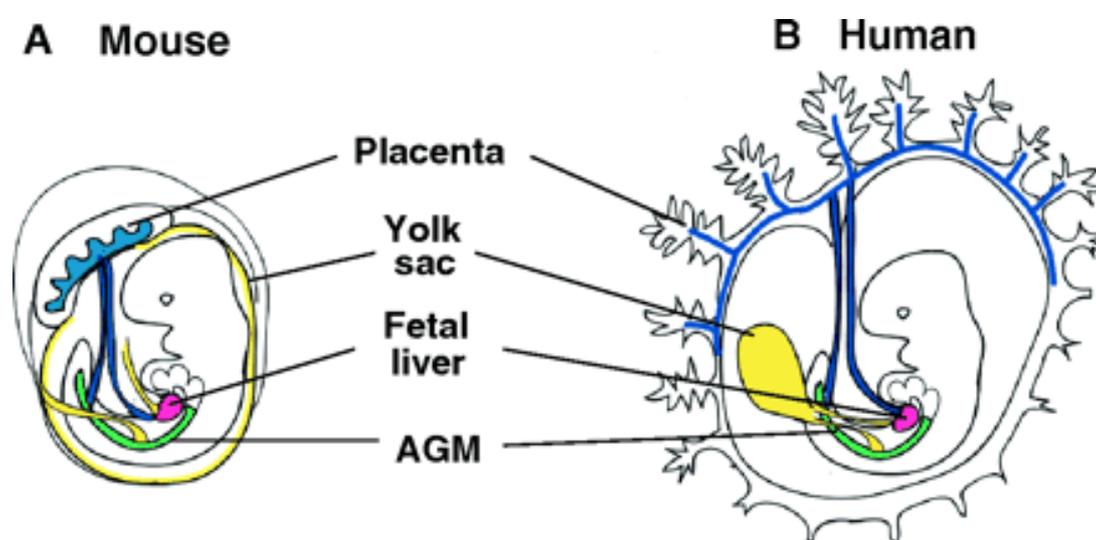


Figura 5 (tratta da Mikkola and Orkin, 2006) Organi ematopoietici in embrioni murini ed umani. Un disegno schematico di un embrione murino (A) e di uno umano (B) che illustra gli organi ematopoietici al giorno 11 dpc e alla quinta settimana di gestazione rispettivamente. (in giallo, sacco vitellino; in verde, l'aorta dorsale; in rosso, fegato fetale; in blu, vasi ombelicali e vascolatura fetale nella placenta). La funzione ematopoietica della placenta umana non è ancora stata provata. AGM, Regione Aorta-Gonadi-Mesonefro.

Le cellule del sacco vitellino da sole però non erano in grado di ricostituire il compartimento linfocitario in questa situazione sperimentale (Godin et al., 1993). Allo stesso tempo, Medvinsky e collaboratori hanno dimostrato che cellule isolate dalla regione che comprende Aorta, Gonadi e Mesonefro (AGM) possiedono un potenziale di formare colonie ematopoietiche,

indicando l'esistenza di progenitori ematopoietici multipotenti in questa regione di embrioni in cui il fegato non si è ancora sviluppato (Medvinsky et al., 1993). La capacità dei precursori ematopoietici dell'AGM di generare sia cellule mieloidi che linfoidi, una caratteristica che correla con l'attività LTR delle HSC, venne successivamente dimostrata in vitro a livello clonale (Godin et al., 1995). Muller e collaboratori successivamente hanno riportato che la capacità LTR è presente nei precursori AGM al giorno 10,5 dpc (Muller et al., 1994). Quindi L'AGM contiene HSC ma non sembra essere un sito per l'ematopoiesi attiva (Figura 6).

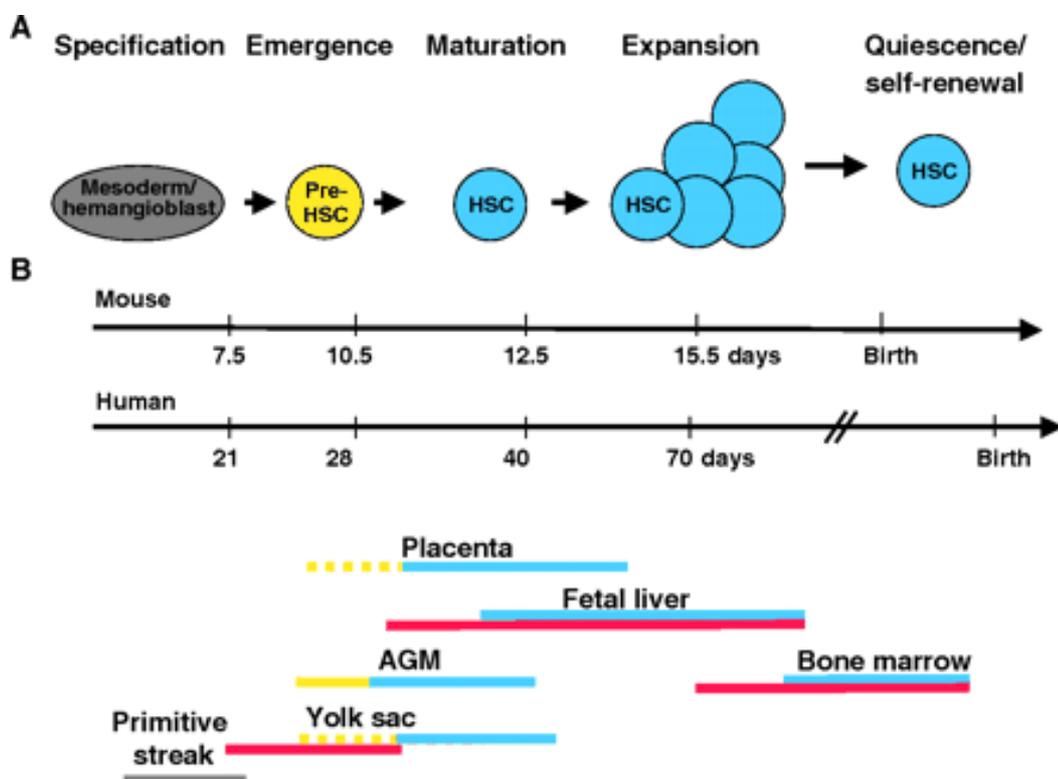


Figura 6, pagina precedente (tratta da Mikkola and Orkin, 2006): Formazione del pool di HSC definitive in embrioni murini ed umani. (A) Lo sviluppo del sistema ematopoietico comincia con la specificazione del mesoderma della striscia primitiva (in grigio) dei destini ematopoietico e vascolare. Le nascenti HSC vanno incontro al processo di maturazione (in blu) che consente loro di attecchire, sopravvivere ed auto-rinnovarsi nelle future nicchie ematopoietiche. Successivamente, le cellule HSC fetali si moltiplicano rapidamente dopo del quale si incontra una fase stazionaria nella quale le HSC risiedono relativamente quiescenti nel midollo osseo. (B) Cinetica di attivazione dei siti ematopoietici murini ed umani. Linea grigia, fase mesoderma; linea rossa, fase di attiva differenziazione ematopoietica; linea gialla, fase di genesi di HSC; in blu, presenza di HSC funzionali di tipo adulto. La linea gialla spezzata per il sacco vitellino e la placenta indica che una fase di genesi di HSC definitive non è ancora stata provata.

Sebbene la placenta non sia stata storicamente considerata un organo ematopoietico, le prime indicazioni suggerivano che la placenta murina potesse possedere un potenziale ematopoietico (Dancis et al., 1977; Dancis et al., 1968; Melchers, 1979; Till and Mc, 1961). Studi in embrioni di uccelli hanno evidenziato che l'allantoide, un'appendice mesendodermica che funge da sbocco respiratorio ed escretorio, è in grado di generare HSC, le quali, in studi di xenotrapianto pollo-quaglia, possono attecchire nel midollo osseo (Caprioli et al., 1998; Caprioli et al., 2001). Nel topo, l'allantoide forma i vasi ombelicali e le parti mesodermiche della placenta fetale (Downs and Harmann, 1997). L'ematopoiesi nella placenta murina è osservabile a partire dal giorno 9 dpc, quando appaiono i primi progenitori multipotenti (Alvarez-Silva et al., 2003), mentre le prime HSC mature si trovano 1,5-2,0 dpc dopo (Gekas et al., 2005; Ottersbach and Dzierzak, 2005). Le HSC placentari derivano da cellule fetali e non materne e soddisfano i più stringenti criteri funzionali per la definizione di HSC mature. L'emergenza precoce di HSC nella placenta, che avviene prima dell'apparizione di HSC circolanti o nel fegato fetale, suggerisce che le HSC placentari possano essere generate *in situ*. Se la placenta producesse effettivamente HSC, una possibile origine potrebbe essere il

mesoderma dell'allantoide, che, come successivamente riportato, possiede potenziale ematopoietico (Zeigler et al., 2006).

Il timo (nel quale avviene la differenziazione in linfociti T) ed il fegato fetali diventano attivi come siti linfopoietico ed ematopoietico rispettivamente dal giorno 10-11 dpc. Le cellule eritroidi che originano dal fegato fetale appartengono al lignaggio definitivo, dato che sono enucleate e sintetizzano isoforme di globina di tipo adulto. Anche macrofagi e megacariociti derivati dal fegato fetale si sviluppano seguendo la via descritta per le cellule adulte. Al termine della gestazione, l'ematopoiesi nel fegato fetale regredisce e la milza prima ed il midollo osseo poi prendono il sopravvento nella produzione di cellule ematopoietiche (Metcalf and Moore, 1971).

Questi rudimenti ematopoietici (il fegato ed il timo fetale) forniscono un ambiente dove precursori ematopoietici estrinseci possano attecchire e dare origine ad una progenie matura e differenziata. Il fegato fetale, che non produce HSC *de novo* ma produce cellule ematiche durante la seconda metà della gestazione, è il primo rudimento colonizzato al giorno 10 dpc (Houssaint, 1981) e da quel momento diventa il principale organo ematopoietico dell'epoca fetale. Il numero di HSC raggiunge un massimo di circa 1000 HSC attorno al giorno 15,5-16,5 dpc, dopodiché si raggiunge una fase stazionaria a cui segue una diminuzione. Il momento della colonizzazione del timo in epoca fetale non è stata determinata così precisamente come per il fegato fetale. Si pensa che l'arrivo dei primi progenitori si collochi attorno al giorno 11 dpc (Fontaine-Perus et al., 1981). La colonizzazione della milza da parte delle HSC comincia attorno al giorno 12 dpc (Godin et al., 1999). Da ultimo, si pensa che le HSC

raggiungano il midollo osseo attorno al giorno 15-16 dpc (Metcalf and Moore, 1971).

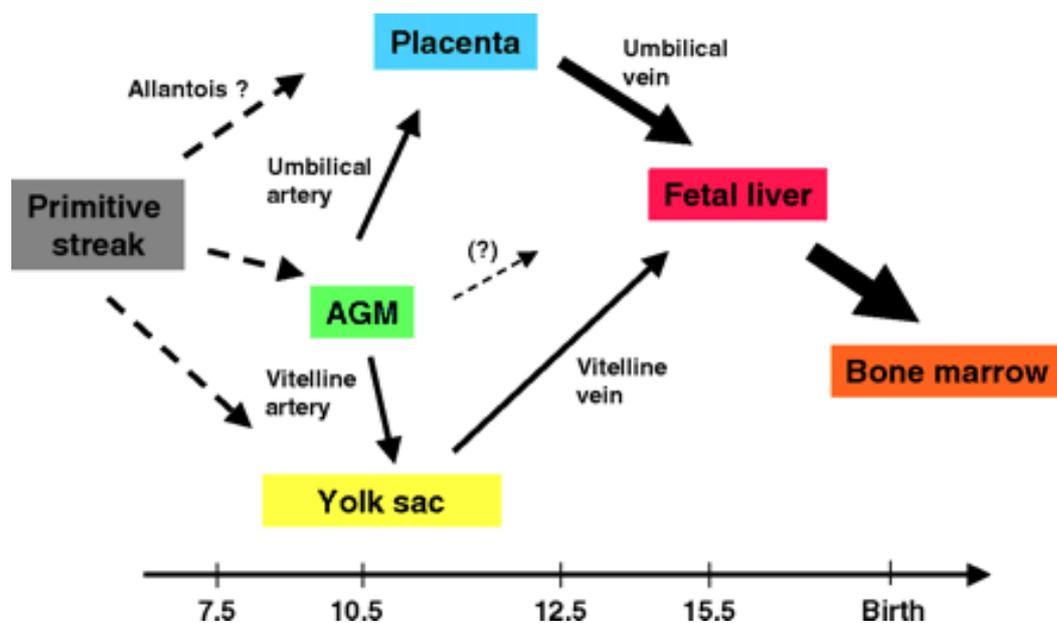


Figura 7 (tratta da Mikkola and Orkin, 2006): rotte circolatorie migratorie che connettono i differenti siti ematopoietici fetali murini. La striscia primitiva (in grigio) dà origine al mesoderma emogenico/emangioblasto che migra nel sacco vitellino (in giallo), nell'AGM (in verde) e probabilmente nella placenta (in blu), attraverso l'allantoide. Le due rotte circolatorie principali che connettono i diversi siti ematopoietici durante la gestazione sono i circuiti vitellini ed ombelicali. L'arteria vitellina connette l'aorta dorsale superiore al sacco vitellino, che a sua volta è comunicata con il fegato fetale (in rosso) attraverso la vena vitellina. L'arteria ombelicale connette la parte inferiore dell'aorta dorsale alla placenta, che comunica con il fegato via la vena ombelicale. Sebbene la gemmazione verso il lume vascolare e la migrazione attraverso il torrente circolatorio sia stato proposto come modello per la via principale di colonizzazione del fegato fetale, la migrazione diretta delle HSC dall'AGM al fegato fetale non è stata ancora formalmente scartata come ipotesi (come indicato dal punto di domanda). Le frecce spezzettate indicano la migrazione dei precursori ematopoietici mentre le frecce intere indicano la circolazione delle HSC attraverso la vascolatura. Il midollo osseo (in arancione) è colonizzato dalle HSC prima della nascita. Le frecce più larghe indicano i punti di maggior traffico di HSC. La cinetica di questi eventi è sottolineata dalla scala temporale sottostante, in cui l'unità temporale è costituita dai giorni dpc.

Il sistema scheletrico si sviluppa nel topo durante la terza settimana di gestazione, ed in contemporanea crea appositi micro-ambienti per le HSC nel midollo osseo. Lo sviluppo scheletrico comincia attorno al giorno 12,5

dpc con le condensazioni di mesenchima, nelle quali cellule mesenchimali danno dapprincipio origine ai condrociti che creano una struttura cartilaginea per lo scheletro (Olsen et al., 2000). I condrociti vengono sostituiti dagli osteoblasti che generano tessuto osseo calcificato attraverso l'ossificazione endocondrale. L'invasione vascolare nelle ossa in formazione promuove lo svilupparsi della circolazione nel tessuto osseo e l'attaccamento di progenitori ematopoietici e di HSC. L'attività clonogenica dei progenitori nelle ossa lunghe comincia al giorno 15,5 dpc, mentre HSC funzionali a partire dal giorno 17,5 dpc in poi (Christensen et al., 2004; Gekas et al., 2005).

### **5. Ematopoiesi e cellule ES: Stato dell'Arte**

Rispetto al lignaggio ematopoietico, un primo vantaggio scientifico delle cellule ES riguarda l'accessibilità del materiale cellulare per lo studio. Le piccole dimensioni dell'embrione murino ed il numero limitato di progenitori ematopoietici allo stadio embrionale rendono di difficile esecuzione tutte le analisi biochimiche, molecolari e cellulari. Invece le cellule ES con la loro crescita esponenziale e la loro differenziazione sincronizzabile possono fornire materiale in abbondanza per gli stessi esperimenti.

L'abilità delle cellule ES di generare cellule ematiche in vitro è stata notata inizialmente da Doetschman e colleghi (Doetschman et al., 1987). Questi ricercatori differenziarono cellule ES in sospensione e notarono che le strutture sferoidali multistrato che venivano a formarsi in queste condizioni di coltura, gli EB, avevano una conformazione superficiale

molto simile alla struttura di “cilindro a uovo” dell’embrione in sviluppo e che gran parte di questi EB sviluppavano isole sanguigne emoglobinizzate. La capacità degli EB di generare cellule formanti colonie eritroidi primitive (EryP-CFC) e la cinetica della produzione di CFC suggerisce che gli EB ricapitolano l’ematopoiesi primitiva del sacco vitellino (Keller et al., 1993; Palis et al., 1999). L’incapacità delle HSC derivanti dal sacco vitellino di contribuire al pool di HSC definitive potrebbe quindi avere implicazioni negative per l’uso di cellule ES come fonte di HSC per il trapianto ematopoietico, almeno con i metodi di differenziazione noti sinora.

In alternativa alla differenziazione in aggregati in sospensione, le cellule ES potrebbero essere differenziate direttamente in piastre per coltura cellulare, sebbene in queste condizioni esse non riescono a sostenere l’ematopoiesi (Dang et al., 2002). Tuttavia, l’aggiunta di cellule stromali, per quanto non rappresentino un elemento standardizzabile e quindi clinicamente accettato, promuove e sostiene un’efficiente differenziazione ematopoietica. Mentre la maggior parte delle cellule stromali spingano verso una differenziazione di tipo macrofagico, la linea cellulare stromale (OP) ottenuta da midollo osseo di topi deficienti per la citochina M-CSF (op/op) (Kodama et al., 1994) supporta anche la differenziazione linfoide di cellule ES murine in vitro (Nakano et al., 1994).

Recenti studi condotti presso il laboratorio di Bhatia (Wang et al., 2005) hanno dimostrato come progenitori derivati da cellule ES umane possiedono almeno un limitato potenziale ematopoietico una volta iniettati direttamente nel midollo osseo di topi NOD-SCID immunodeficienti permissivi lo xeno-trapianto. Tuttavia il potenziale di attecchimento è comunque estremamente basso ed è stata osservata scarsa

migrazione delle cellule iniettate. E' importante notare come sia stato osservato un potenziale di differenziazione in cellule T molto limitato con il trapianto sia di cellule ES murine che umane (Muller and Dzierzak, 1993; Potocnik et al., 1997).

L'assenza di differenziazione in lignaggio T da parte delle HSC derivate da cellule ES potrebbe derivare dall'incapacità delle condizioni di cultura correntemente utilizzate di conferire la capacità di attecchimento dei precursori del lignaggio T nelle nicchie nel timo. Tuttavia solo recentemente si è confutata la tesi che le ES non possedessero un grosso potenziale per il lignaggio T. Questa tesi è stata smentita da alcuni importanti lavori prodotti dal laboratorio di Zuniga-Pflucker, in cui le cellule ES murine sono state co-coltivate nelle medesime condizioni usate per generare cellule T a partire da precursori ematopoietici somatici. Le cellule ES sono state precoltivate in contatto con la linea stromale OP9 e le cellule non aderenti raccolte sono state trasferite su una variante dello stesso supporto stromale OP9, modificata per l'espressione del ligando Notch Delta-like1. Non solo si è ottenuta produzione di cellule T, simili dal punto di vista fenotipico e funzionale alle cellule T di derivazione somatica, a partire dalle cellule ES, ma questa popolazione di cellule T può essere trapiantata in topi riceventi (all'interno di porzioni di timo fetale) risultando funzionale, in quanto in grado di conferire protezione contro virus patogeni (Schmitt et al., 2004). L'osservazione che qualora vengano coltivate in maniera corretta, le cellule ES murine siano in grado di generare grosse quantità di cellule T funzionali supporta l'idea che lo stesso sia possibile per le cellule ES umane.

Galic ed i suoi collaboratori (Galic et al., 2006) hanno pubblicato una serie di passaggi in vitro ed in vivo che permette di ottenere cellule T a partire

di cellule ES umane (Figura 8). Anch'essi hanno utilizzato un passaggio in cocoltura con la linea stromale OP9 a cui segue una coltura secondaria in porzioni di timo o fegato fetale iniettate in topi immunodeficienti. Il trapianto di progenitori derivati da cellule ES umane direttamente in frammenti di timo-fegato umani risulta nei topi riceventi in una discreta quantità cellule T che si sviluppano all'interno del frammento trapiantato. Queste cellule T una volta isolate dimostrano di essere funzionali, rispondendo positivamente ai test in vitro.

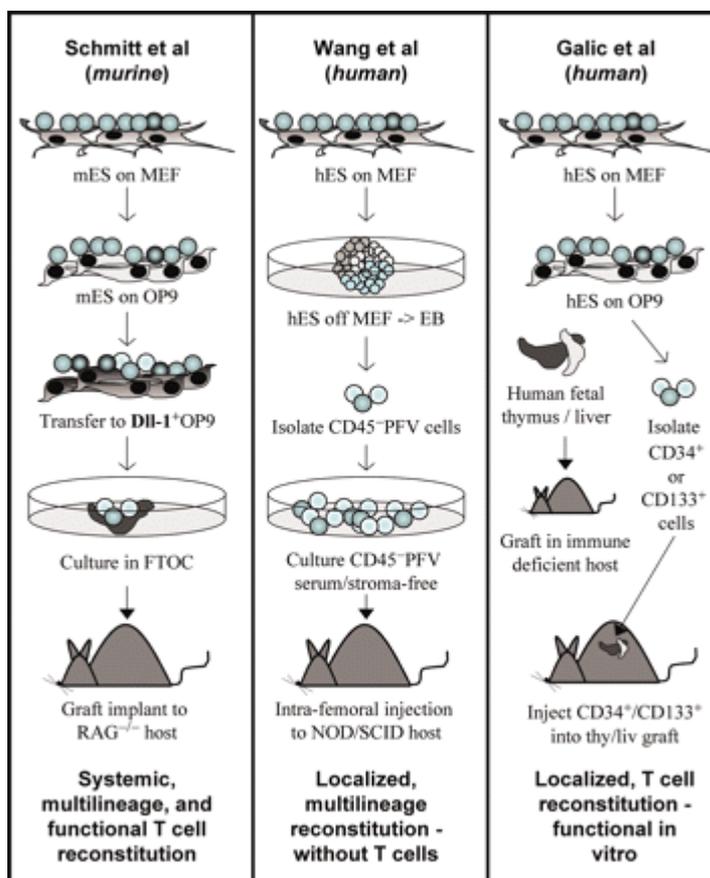


Figura 8, pagina precedente (Fleming and Scadden, 2006): Generazione di cellule ematiche da cellule ES. A sinistra: Cellule ES murine sono state coltivate su uno stroma di cellule OP9 esprimenti il ligando Notch Delta-like1 e successivamente trasferite in colture organotipiche di timo fetale (Fetal Thymus Organ Culture, FTOC). Il trapianto di FTOC seminate con cellule ES murine in topi riceventi Recombination-Activating Gene 1 (RAG1)  $-/-$  ha portato alla generazione di cellule T responsive a cariche virali in vivo (Schmitt et al., 2004). Al centro, cellule ES umane sono state differenziate come EB per 10 giorni. Cellule CD45+ PECAM-1+ Flk-1+ e VE-caderina sono state isolate dagli EB e coltivate in condizioni di coltura priva di siero e successivamente iniettate intrafemoralmente per prevenire l'aggregazione delle cellule umane causata dal siero murino. Attecchimento multilignaggio ematopoietico localizzato al sito di iniezione (con scarsa migrazione nella parte controlaterale) è stato osservato, ma nessuna differenziazione in cellule T (Wang et al., 2005). A destra, cellule ES umane sono state cocoltivate con stroma OP9 per 10-14 giorni e le cellule CD34+ o CD133 + sono state isolate. Topi NOD/SCID o RAG $-/-$  in cui sono stati integrati frammenti di fegato o timo fetali umani a livello della capsula renale sono stati irradiati subletalmente ed i progenitori ematopoietici derivati dalle cellule ES sono stati iniettati all'interno dei frammenti inseriti nei topi. L'analisi delle biopsie di questi frammenti dimostrano la presenza di cellule T mature (Galic et al., 2006).

# MATERIALI E METODI

## I. Campioni e selezione cellulare

Topi maschi C57BL/6J (Ly5.2) GFP+/- e topi femmina C57BL/6J (Ly5.2) GFP+/+ sono stati incrociati per ottenere una generazione di embrioni F1 che statisticamente fossero 50% Ly5.2 GFP+/- e 50% Ly5.2 GFP+/+ in modo tale di poter identificare con certezza le cellule di origine fetale (GFP+) da quelle di origine materna. Campioni di liquido amniotico di questi embrioni F1 sono stati prelevati ai giorni 9,5, 10,5, 11,5, 12,5, 13,5, 14,5, 15,5 e 19,5 dpc. L'età embrionale è stata determinata ponendo come giorno 0,5 dpc il mattino del ritrovamento del tappo vaginale. Ad ogni time-point è stato prelevato anche l'amnion, che è stato delicatamente separato dal corion e dalla placenta e risciacquato tre volte in PBS per evitare ogni contaminazione ematica. L'amnion è stato successivamente dissociato meccanicamente attraverso un ago 19 G, trattato con una soluzione di collagenasi di tipo I (Sigma) 0,12% p/V in PBS con 10% FBS (Gibco) per 1,5 ore a 37°C, a cui è seguito un nuovo trattamento meccanico di passaggi seriali attraverso aghi da 20 a 25 G. La sospensione di singole cellule è stata filtrata attraverso dei filtri a canestro con pori di 40 µm (BD Bioscience). Nei giorni 11,5, 12,5 e 13,5 dpc è stato isolato anche il fegato fetale dopo dissezione embrionale, in DMEM (Gibco) supplementato con 5% FBS. Una sospensione cellulare omogenea di singole cellule è stata ottenuta con digestione meccanica e filtrazione su filtri a canestro con pori di 40 µm. Tutte le dissezioni sono state effettuate con l'ausilio di uno stereomicroscopio (Leika).

Le cellule ckit+ derivate dal liquido amniotico murino sono state isolate con due differenti metodiche: a) usando EasySep Mouse CD117 Selection

Cocktail (StemCell Technologies) come anticorpo primario con successiva selezione della frazione positiva mediante l'EasySep PhycoErytrin (PE) selection kit (StemCell Technologies) secondo le indicazioni fornite dal produttore. In tutti gli esperimenti solo le cellule GFP+ sono state prese in considerazione. b) usando un sorter FACS Aria ed un software di acquisizione FACS Diva (entrambi BD) per isolare la popolazione cellulare ckit+/GFP+/Lin- marcata con un anticorpo monoclonale CD117 coniugato con AlloPhycoCyanin (APC) ed usando un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati con PE (contenente CD3, CD4, CD8, CD19, B220, Gr1, Mac1, Ter119 e NK1.1, tutti BD). Quando indicato, è stata isolata la popolazione cellulare ckit+/CD34+ usando un anticorpo monoclonale CD34 coniugato con Fluorescein IsoThyoCyanate (FITC, BD). Le cellule morte sono state escluse per mezzo della marcatura con Viaprobe (7AAD, BD). Le stesse procedure sono state escluse per isolare le cellule dal fegato fetale e dall'amnion.

Il fenotipo di superficie è stato analizzato con citofluorimetria a flusso (Flow Cytometric Analysis, FACS). Gli eventi sono stati raccolti usando un citemetro a flusso FACS-Calibur (BD) con software di acquisizione CellQuest (BD). L'analisi è stata condotta con i software CellQuest e FlowJo. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali coniugati con FITC: CD34, CD44, CD25, Sca-1, Thy1.2, H2Kb (BD) e prominin-1 (Miltenyi).

Cellule ckit+ derivate da liquido amniotico umano, raccolto durante i prelievi diagnostici di routine (amniocentesi) ed ottenuto sotto consenso informato, sono state isolate in 3 modi differenti: a) usando un anticorpo monoclonale CD117 coniugato con PE (BD Pharmingen) con la frazione positiva separata con EasySep PE selection kit (StemCell Technologies)

secondo le indicazioni fornite dal produttore. b) usando un kit di CD117 direttamente accoppiato con microbiglie ed un separatore VarioMACS (entrambi Miltenyi) seguendo le istruzioni del produttore. c) usando un sorter FACS Aria ed un software di acquisizione FACS Diva per isolare la popolazione cellulare ckit+ o ckit+/ Lin- marcata con un anticorpo monoclonale CD117 coniugato con PE ed APC ed usando un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati con PE (contenente CD3, CD4, CD8, CD13, CD16, CD19, CD20, CD33, CD56 e GlyA (CD235a), tutti BD Pharmingen). Le cellule morte sono state escluse per mezzo della marcatura con Viaprobe (7AAD, BD). Il fenotipo di superficie è stato analizzato con FACS, come per le cellule murine. L'analisi è stata condotta con i software CellQuest e FlowJo. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: CD31 FITC, CD34 FITC, CD44 FITC, CD90 PE (BD), CD105 PE (eBioscience), CD133 PE o APC (Miltenyi), KDR PE (R&D System), HLA-ABC FITC e HLA-DR PE (Immunobiotech).

#### Marcatore con BrdU

In topi femmine C57BL/6J (Ly5.2) GFP<sup>-/-</sup> a 12 giorni di gestazione è stato iniettato 1 mg di Bromodesossitridina (BrdU) intraperitonealmente due volte, a distanza di due ore. Le cellule sono state prelevate come descritto sopra 30 min dopo la seconda iniezione. La marcatura con BrdU è stata anche prolungata sino a 24 ore iniettando prima del sacrificio 1 mg di BrdU altre due volte ancora, 6 e 16 ore dopo l'iniezione precedente.

Le sospensioni cellulari prelevate sono state marcate con anticorpi cKit APC e Lin cocktail PE, come descritto prima. Le cellule marcate in superficie sono state fissate e permeabilizzate con PBS contenente 1% paraformaldeide, 0,01% Tween 20 per 48 ore a 4°C. La sospensione

cellulare, risciacquate due volte, è stata quindi incubata con DnaseI (Amersham) a 37°C in una camera umidificata, risciacquata e quindi incubata con anticorpo BrdU FITC (BD). L'analisi è stata condotta successivamente al FACS.

## II. Colture cellulari

### 1. Espansione di cellule AFS

Dove indicato, cellule ckit+ derivate dal liquido amniotico umano sono state coltivate come cellule staminali del liquido amniotico (Amniotic Fluid Stem, AFS) descritte in De Coppi et al, 2007. Brevemente, il mezzo di coltura era costituito da alpha-MEM (Gibco) supplementato con 20% Chang B e 2% Chang C (entrambi Irvine Scientific), 15% FBS e antibiotici (penicillina e streptomina, Sigma). Le cellule sono state coltivate in piastre Petri, senza alcuno stroma, al 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Ogni qualvolta raggiungevano all'incirca il 70% di confluenza, le cellule sono state subcoltivate di routine dopo digestione con 0,25% Tripsina + 1 mM EDTA (Sigma) in PBS per 5 minuti a 37°C.

### 2. Protocolli di differenziazione in vitro

Il potenziale mieloide ed eritroide delle cellule murine è stato studiato in un mezzo di coltura semisolido. Tra le 200 e le 500 cellule sono state cautamente mescolate in 2 ml di MethoCult H4230 (StemCell Technologies), un terreno di coltura a base di metilcellulosa per il saggio delle colonie. Ad esso sono state aggiunte le citochine hSCF (50 ng/ml),

granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, 20 ng/ml), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, 20 ng/ml), interleuchina (IL)-3 (20 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) (tutte R&D System) ed EritroPOietina (EPO, Epoietin alpha, Eprexm Janssen-Cilag) (20 U/ml) e coltivate sino ad un massimo di 3 settimane in placche da 6 pozzetti in incubatore a 37°C umidificato a 5% CO<sub>2</sub>. Colonie di almeno 50 cellule sono state numerate e classificate secondo la loro morfologia e colore usando un microscopio invertito Leica DM1RB (ingrandimento 10x). Le colonie sono state fotografate con una fotocamera Leica DC350F ed acquisite con il software LeicaQFluoro. Le colonie sono state raccolte e risciacquate due volte risospendendole in PBS in tubi conici Falcon da 50 ml. Il pellet di colonie sono state centrifugate su vetrini da microscopio (Menzel-Glaser) con l'apparecchiatura per Cytospin "Cytospin3" (Shandon). Le cellule su vetrino sono state fissate e colorate con i reagenti per colorazione Wright-Giemsa (Reactifs Ral).

Il potenziale linfoide T delle cellule murine è stato studiato piastrando le cellule ed una densità di  $5 \times 10^4/4$  ml per pozzetto in una placca a 6 pozzetti,  $1 \times 10^4/$  ml per pozzetto in una placca a 24 pozzetti, da 1 a  $1 \times 10^4$  / ml per pozzetto in una placca da 96 pozzetti in alpha-MEM supplementato con 20% FBS (HyClone), 10 ng/ml mSCF, 5 ng/ml mFlt3-ligand, 20 ng/ml hIL-7 e tamponato con 0,22% NaHCO<sub>3</sub> (Gibco) su uno stroma della linea cellulare OP9 (ATCC, CRL-2749, LGC Promochem) tradotte con un retrovirus difettivo contenente una doppia cassetta esprime la forma murina del ligando Notch Delta1 (mD1) e GFP. Lo stroma è stato sostituito ogni 5 giorni. Tra il giorno 7 ed il giorno 20 di coltura, una frazione delle cellule è stata analizzata al FACS usando 4 combinazioni differenti di anticorpi monoclonali: i) CD25 PE e CD44 APC,

ii) CD8 PE e CD4 APC, iii) TCR $\gamma\delta$  PE e CD3 APC, iv) CD3 PE e TCR $\alpha\beta$  APC (tutti anticorpi BD). Viaprobe è stato aggiunto in tutti le marcature per poter escludere le cellule morte.

Per le colture in diluizione limite, cellule ckit+CD34- e ckit+CD34+ sono state seminate ad 1, 10, 30, 100, 300 cellule per pozzetto in 24 pozzetti per ciascuna concentrazione di placche a 96 pozzetti con stroma OP9-mD1 e coltivate come descritto sopra. La presenza di cellule CD4+CD8+ e CD3+TCR $\gamma\delta$ + è stata analizzata al FACS per ogni pozzetto sempre come descritto sopra. La proporzione di precursori linfoidi è stata calcolata con il metodo della regressione lineare (basata sulla distribuzione di Poisson) come il reciproco della concentrazione delle cellule analizzate che dava il 37% di colture negative (Taswell, 1981).

La differenziazione in cellule B è stata studiata seminando le cellule murine su di uno stroma di cellule OP9 (ACC441, DSMZ, Braunschweig) non transdotta nello stesso terreno di coltura descritto per la differenziazione T a cui è stato aggiunto 50 $\mu$ M di  $\beta$ -mercaptoetanololo.

Terreno e stroma sono stati cambiati ogni 7 giorni. Le colture sono state analizzate al FACS usando una combinazioni di anticorpi contenente CD19 FITC, IgM PE, B220 APC (BD) e Viaprobe. Un gate SSC/FSC ed un gate 7AAD- sono stati disegnati per escludere contaminazioni stremali e cellule morte nell'analisi.

Il potenziale ematopoietico delle cellule umane espanse è stato studiato con le seguenti metodiche:

Coltura in terreno semisolido, come descritto per le cellule murine

**Coltura liquida** in IMDM con HEPES 25 nM supplementato con un sostitutivo del siero, BIT (Bovine serum albumin, Insulin, Transferrin,

StemCell Technologies), SCF 100 ng/ml, IL-6 100 ng/ml, IL-3 10 ng/ml ed EPO 2 U/ml, cambiando terreno ogni 3 giorni.

**Formazione di EB**, come indicato in Ng et al. (Ng et al., 2005), in un terreno privo di siero (Serum Free Medium, SFM) costituito da una base 1:1 di IMDM e Ham's F12 (Gibco), 5 mg/ml di Albumina Serica Bovina (BSA, Sigma), 1:100 lipidi sintetici (Gibco), 450  $\mu$ M  $\alpha$ -monotioglicerolo, 1:100 insulina-transferrina-selenio (ITS-X, Gibco), 5% mix di ibridoma privo di proteine (PFHM-II, Gibco), 50  $\mu$ g/ml acido ascorbico-2-fosfato (Sigma). La formazione di EB è stata indotta seminando 1000-3000 cellule AFS umane in 100  $\mu$ l di SFM supplementato con Bone Morphogenic Protein (BMP)-4 10 ng/ml, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 5 ng/ml, SCF 20 ng/ml, hFlt3-ligand 5 ng/ml, Il-6 5 ng/ml, Insuline-like Growth Factor (IGF)-II 5 ng/ml (tutte citochine di R&D Systems) in ciascun dei pozzetti di una placca da 96 pozzetti a fondo tondo, a bassa adesione (NUNC) e centrifugando le placche a 1500 rpm (478 g) per 5 minuti a 4°C per l'aggregazione cellulare.

Dai 7 ai 25 giorni di coltura, cellule raccolte dalla coltura liquida o EB dissociati in tripsina 0,05% sono state prelevate ed il loro fenotipo è stato analizzato al FACS come descritto sopra, utilizzando gli anticorpi monoclonali CD36 FITC (BD), CD71 FITC (Immunotech), Gly A PE.

La presenza di emoglobina è stata verificata mediante la colorazione con la benzidina (Hanks et al., 1960). Le cellule da cellule raccolte dalla coltura liquida o EB dissociati in tripsina 0,05% una volta pellettate sono state incubate in una soluzione di 1% Benzadrine (Sigma) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e successivamente osservate al miscroscopio invertito con una camera di Burker per controllare la presenza della colorazione bluastra tipica della reazione della benzidina con il gruppo dell'eme dell'emoglobina.

### III. Trapianti

Topi RAG1-/- Ly5.1 dai due ai quattro mesi sono stati irradiati subletalmente con una dose di 800 rad di radiazioni gamma e sono stati successivamente trapiantati con una quantità di cellule mAFDC, mAmDC, mFLDC tra 0,02 e  $1 \times 10^6$ . Le cellule sono state iniettate nella vena retroorbitale in 150  $\mu$ l di soluzione salina normale (Normal Salt Solution, NSS, 0,9% NaCl). L'analisi del sangue periferico degli animali iniettati e di controllo sono state effettuate ogni 4 settimane, mentre gli animali sono stati sacrificati a 8, 12 e 18 settimane dopo il trapianto e gli organi ematopoietici (midollo osseo, milza, timo, linfonodi) sono stati prelevati per l'analisi. Per gli esperimenti di trapianto secondario, i midolli ossei degli arti inferiori di animali primariamente trapiantati sono stati prelevati 18 mesi post-trapianto, e le cellule Ly5.2+, marcate con un anticorpo monoclonale coniugato con PE (BD) sono state isolate con un sorter FACS Aria. Una quantità di cellule tra 0,1 e  $0,5 \times 10^6$  sono state ri-iniettate in topi RAG1-/- Ly5.1 precedentemente subletalmente irradiati con 800 rad di radiazioni gamma via la vena retroorbitale in 150  $\mu$ l di NSS. L'analisi del sangue periferico degli animali iniettati e di controllo sono state effettuate ogni 4 settimane, mentre gli animali sono stati sacrificati a 10 e 13 settimane dopo il trapianto e gli organi ematopoietici (midollo osseo, milza, timo, linfonodi) sono stati prelevati per l'analisi.

La ricostituzione in vivo del sistema ematopoietico da parte delle cellule murine è stata analizzata tramite FACS. Quando possibile le cellule morte sono state escluse grazie al Viaprobe. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: B220 APC, IgM PE, CD4 PE/APC/FITC, CD3 PE/APC, CD8 PE/FITC, Gr1 APC, Mac1 PE, CD44 APC, CD25 PE, NK1.1 APC, Sca1 PE, cKit APC, Ter119 PE, Ly5.2 e Ly5.1 coniugati con Peridinin-

Chlorophyll-Protein Complex (PerCP). Tutti gli anticorpi e gli isotipi sono stati acquistati dalla ditta BD.

Per il trapianto di cellule umane, topi NOD/SCID dai due ai quattro mesi sono stati irradiati subletalmente con una dose di 300 rad di radiazioni gamma e trattati con un'iniezione di 250 mg di anticorpo anti-cellule NK per debellare la risposta immunitaria innata. Entro le 24 ore successive sono stati trapiantati con una quantità di cellule hAFDC, hAFS, tra 0,02 e  $2 \times 10^6$ : le cellule sono state iniettate nella vena retroorbitale in 150  $\mu$ l di soluzione salina normale (Normal Salt Solution, NSS, 0,9% NaCl). L'analisi del sangue periferico degli animali iniettati e di controllo sono state effettuate ogni 4 settimane, mentre gli animali sono stati sacrificati a 8, 12 e 18 settimane dopo il trapianto e gli organi ematopoietici (midollo osseo, milza, timo, linfonodi) sono stati prelevati per l'analisi. La ricostituzione in vivo del sistema ematopoietico da parte delle cellule umane è stata analizzata anch'essa tramite FACS. Quando possibile le cellule morte sono state escluse grazie al Viaprobe. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: CD10 FITC, IgM PE, CD19 FITC/APC, CD4 PE/APC/FITC, CD3 PE/APC, CD8 PE/FITC, CD13 APC, CD33 PE, CD44 APC, CD16 PE, CD56 PE, CD34 PE/APC, CD38 PE, Gly PE e CD45 PerCP. Tutti gli anticorpi e gli isotipi sono stati acquistati dalla ditta BD Pharmingen.

#### **IV. Analisi dell'espressione genica**

Come già pubblicato precedentemente (Peixoto et al., 2004) singole cellule selezionate direttamente in PBS trattato con dietilpirocarbonato (DEPC) sono state lisate con congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  seguito da un riscaldamento a  $65^{\circ}\text{C}$  per 2 minuti. Dopo aver raffreddato il tutto a  $4^{\circ}\text{C}$ , l'RNA delle cellule

è stato retrotrascritto in maniera specifica per 1 ora a 37°C aggiungendo 10 µl di una mix contenente 12 µM primer specifici 3' (indicati con A nella tabella 1), Buffer II 10x (Applied Biosystems), 1 mM dNTPs (Pharmacia Biotech), 39 unità di RNase block (Stratagene) e 11,5 unità di MuLV Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) in un volume di reazione di 15 µl. La reazione è stata fatta terminare con una fase di incubazione di 3 minuti a 95°C.

I dati delle sequenze geniche e dei confini esone/introne sono stati ottenuti dal database Ensembl Project (<http://www.ensembl.org>). I primer selezionati per le reazioni di PCR sono elencati nella tabella 1a. I primer sono stati disegnati manualmente con il software Primer3 ([http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) in modo da evitare amplificazione del genoma, scegliendo primer 3' e 5' che ibridano in esoni differenti. Per ottenere efficienze di amplificazioni simili, i primer sono stati disegnati di una lunghezza di 20 bp indirizzati in sequenze non ripetitive, con temperatura di appaiamento ( $T_m$ ) simile e simile lunghezza dei prodotti amplificati. Anche la composizione dei frammenti è stata scelta simile (50,61%  $\pm$  5,01% di contenuto di basi GC), e questo è un dato importante per poter mantenere un'efficienza di amplificazione omogenea per i differenti mRNA. Per evitare amplificazioni aspecifiche, ogni singolo primer è stato usato per una ricerca BLAST (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) del genoma murino al fine di controllare i potenziali accoppiamenti non specifici dei primer con geni che non fossero quelli di interesse. Nessuna ibridazione significativa con altri gene è stata osservata in via computazionale. Al fine di prevenire anche la competizione tra i diversi primer, sono stati scelti primer ed ampliconi che non cross-reagissero. La compatibilità tra i

diversi primer e le dimensioni degli ampliconi sono state controllate con un software ad accesso libero Amplify 3.1 (Engels, 1993) (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify>). Pure la formazione di dimeri di primer è stata esclusa, perché le energie dell'associazione tra i primer che potevano portare alla formazione di dimeri erano sensibilmente inferiori alle energie del legame al 3' dei primer ai loro target.

Inoltre l'uso di alte temperature di appaiamento nel nostro protocollo di PCR contribuisce anch'esso all'esclusione di amplificazione aspecifica. Questi sono aspetti di primaria importanza in questo protocollo perché durante la prima reazione di PCR tutti i geni di interesse vengono amplificati simultaneamente e non prenderli in considerazione potrebbe portare all'inibizione della reazione.

Il cDNA ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione sono stati successivamente amplificati. La prima reazione di PCR è consistita di una fase di denaturazione a 95°C per 10 minuti e di 15 cicli di amplificazione (45 secondi a 95°C, 1 minuto a 60°C ed 1 minuto e 30 secondo a 72°C) con Buffer II 10X (Applied Biosystems), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 0.2 mM GeneAmp dNTPs (Applied Biosystems), 3 unità di AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems), e 0.015 μM di primer specifici A e B (si veda Tabella 1) in un volume di reazione di 85-μl.

Ciascun prodotto della prima PCR è stato successivamente amplificato separatamente con 48 cicli di una seconda PCR (30 secondi a 94°C, 45 secondi at 60°C ed 1 minuto at 72°C) in un volume di reazione di 20 μl contenente Buffer II 10X (Applied Biosystems), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 0.25 mM GeneAmp dNTPs (Applied Biosystems), 0,5 unità di AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems), e 0.25 μM di primer specifici A e C (si veda Tabella 1). I prodotti della seconda PCR sono stati quindi depositati su gel al 2.5% di agarosio con bromuro di

etidio per la loro visualizzazione al transilluminatore e sono stato sequenziati per confermarne la specificità.

## **V. Analisi dello stato cromatinico**

L'immunoprecipitazione della cromatina è stata effettuata seguendo le indicazioni del fornitore (Upstate) usando  $2 \times 10^5$  cellule AFS fissate in 0,5% formaldeide per 10 minuti a 37°C. La cromatina solubilizzata è stata diluita 10 volte in tampone di diluizione per ChIP (Upstate) e, successivamente alla rimozione di un'aliquota (input), è stata immunoprecipitata overnight a 4°C con anticorpi anti-acetil histone H4, anti-acetil istone H3, anti-dimetil istone H3K9 e anti-trimetil istone H3K27 (tutti Upstate). L'analisi delle modificazione attivanti o reprimenti sono state condotte sugli stessi campioni cromatinici. E' stata effettuata una PCR quantitativa per determinare il relativo incremento di segmenti genici nella ChIp rispetto al DNA input. Le reazioni sono state effettuate in triplicato usando SYBR Green e il sistema ABI 7000 Detection System (Applied Biosystems). Il disegno dei primer (tabella 1b) è stato condotto secondo le modalità illustrate per il disegno dei primer per lo studio dell'espressione genica. Per comaparare le modificazioni degli istoni i risultati sono stati normalizzati secondo il gene espresso ubiquitariamente  $\beta$ 2-microglobulina

Tabella Ia: Primers e dimensioni dei prodotti amplificati per l'analisi dell'espressione genica

Gene	Primer A	Primer B	Primer C	1 <sup>st</sup> Prod.	2 <sup>nd</sup> Prod.
<i>PUI</i>	GCATGTAGGAAACCTGGTGA	CCAACGTCCAATGCATGACT	AGAACTTCCCTGAGAACCACT	265 bp	158 bp
<i>ETS</i>	GGAGTTCTTCCGAGCTGATA	GCTGTGAATGAGTTCAGCCT	GCATCTAGAGATCCTGCAGA	342 bp	211 bp
<i>E2A</i>	GTCGGCTACTGATGCGATTT	AGCGATCTCCATGGGCTTTT	GGCCAGTCTTTTGCATAACC	305 bp	177 bp
<i>IL7Ra</i>	GGTAGAACTTGGACTCCACT	CCCTCTGACCTGAAAGTCGT	GTAAAGCATGATGTGGCCTAC	287 bp	194 bp
<i>GMCSFR</i>	TCGGACACCTTGCCCTGAT	ACGGAGGTCACAAGGTCAA	GTAAAGCATGATGTGGCCTAC	240 bp	208 bp
<i>PAX5</i>	GTGAAGCCATGGCTGAATAC	GCTTCCAGTCACAGCATAGT	ACACCAACAAACGCAAGAGG	354 bp	233 bp
<i>IRF1</i>	AGGGCTGTCAATCTCTGGTT	GTGGCATATGCAGATGGACA	AACAGACGAGGATGAGGAAG	270 bp	180 bp
<i>GATA1</i>	ATGGCAGGCTTCCATGAAAC	CACTGGCCTACTACAGAGAA	TATGGCAAGACGGCACTCTA	413 bp	297 bp
<i>GATA2</i>	GGTTCGTGCCATTCATCTTG	ACCACCCGATACCCACCTAT	CTAAGCAGAGAAGCAAGGCT	263 bp	152 bp
<i>ID3</i>	AAGTTCAGTCTTCTCTCGG	AGGACAAGAGGAGCTTTTGC	AGAGGAGCTTTTGGCCACTGA	229 bp	223 bp
<i>AML1</i>	CTGCCGAGTAGTTTTTCATCG	GCAGCATGGTGGAGGTAATA	ACTTCTCTGCTCCGTGCTA	203 bp	143 bp
<i>LMO2</i>	GATAGTCTCTCCTGCACAAT	AATGTCTCTCGGCCATCGAAA	CGCTACTTCTGAAAGCCAT	253 bp	138 bp
<i>FOG</i>	AGGCAGATGAGGCACAGAA	CATGGCATCCATCCTTGCTA	GATCTGGTACCGTAGTGAGC	299 bp	236 bp
<i>CMYB</i>	GGTGGAAATCCAGTGGTTCTT	CAGAAAAGTGCTGAACCCTGA	ATTGAAAAGCAGTGTCGGA	320 bp	190 bp
<i>MPO</i>	AGGGGCACCTTGAAGCCATT	GGCCAAGGCCTTCAATGTT	AGTATCGCACCATCACTGGA	279 bp	165 bp
<i>Oct4</i>	AGCTGATTGGCGATGTGAGT	GCGTTCCTTTGGAAAGGTG	AGCCGACAACAATGAGAACC	286 bp	171 bp
<i>28S</i>	GTAGATCCTCCGGCATGTTT	TACCGGACCCTGAACAGAAT	TACCGGACCCTGAACAGAAT	128 bp	128 bp

Tabella Ib: Primers e dimensioni dei prodotti amplificati per l'analisi dello stato cromatinico

<i>H54</i>	GCACAGAGCCTCGCCTTT	GGAATCCTTCTGACCCATGC	213 bp
<i>H53</i>	GCAGCTCGGAAGGCAGAT	TGGATTTTTAAAGGCAGAGA	135 bp
<i>H52</i>	GAGTCTGCTGACCCTTCTG	ATTTTGCACCGTCCAGTCC	107 bp
<i>Eprom</i>	TGGACCGCGCTTTGCT	CCCTGGGTAGGTAACCTCTGGG	100 bp
<i>Gprom</i>	CATTTGGCTTTGCTTTCTG	TTCTCTTTCAAAGGTGCTTGC	167 bp
<i>Bprom</i>	CCAGCCAAGCTGTCTCAGT	CTGCATGTCAGGTTGCAAAG	272 bp
<i>Bxon2</i>	GACTIONAGATAGCGTACCACA	GAAACCGTCAGAATCCTCCTC	101 bp
<i>EPOR</i>	CCCGAAAGGCCAGGTGTA	AGCAAGCTTCCGGGGACT	288 bp
<i>c-fms</i>	GCAGCAGCAGGTGCTAACC	TTGCCACATATTCTCCTTTG	203 bp
<i>CD3d</i>	ATGAGATGGAGATTACTGTG	GCCCGTTACATTTCTGCTAAC	100 bp
<i>JB1.2</i>	AACTGGGCCCGAAGCTCT	CTTGAACATTCAGGTGATAA	143 bp
<i>IgB</i>	CGGACACACAGGATGACTC	GGGTGGTCTCAGACTTCAC	115 bp
<i>IgB 0,7</i>	CACAGCGAGTTCGAGAGCTT	GATGGGTACTGGAGGCACAT	194 bp
<i>JH1</i>	GGGATCACACTGAGCTTGC	ACCCCTGATTTCTGGTGTGG	176 bp
<i>MuO</i>	GCGTCTCCAGCCTCATCTT	GGAAGAGTCCGCTGCTGTAG	226 bp
<i>EBF</i>	GTCACAAAATTGACTGTTA	TTCTACTAGATGAGAGGGTG	212 bp
<i>TAL1</i>	CTGTGGGCGGTGGAACATA	AAACTACACGATACTTTTCT	186 bp
<i>GATA3</i>	GCACGGTAAACCCCAATTA	GGCAACTTGTGGTCTTTTTT	220 bp
<i>THP</i>	AAGACACAGCACCTGGAA	GCCTTCTCATAACGTGCAT	151 bp
<i>B2m</i>	CGTGACATACATTAGTAG	CTTCCACGAATCTTGCTTGCA	304 bp



## RISULTATI

### **Cellule AFS umane mostrano un potenziale di differenziazione ematopoietica limitata al compartimento eritroide**

Abbiamo voluto studiare il potenziale ematopoietico delle cellule AFS umane, la nuova popolazione di cellule staminali recentemente descritta (De Coppi et al., 2007). Abbiamo isolato con successo le cellule AFS sulla base della loro espressione del marker ckit da tutti (n=12) i campioni di liquido amniotico umano ottenuti con consenso informato dall'ospedale "Antoine Béclère" di Clamart in Francia (Figura 9a). Abbiamo anche clonato le cellule per diluizione limite dopo averle isolate. Come già dimostrato in letteratura, queste cellule (sia i singoli cloni che le cellule non clonate) esprimono marcatori specifici delle cellule ES, come Oct-4 ed SSEA4 (Draper et al., 2002). Abbiamo quindi investigato la loro capacità di differenziamento ematopoietico sia in vitro che in vivo.

Come primo passo, abbiamo cercato di differenziare le cellule in coltura liquida, seguendo i protocolli già pubblicati, che prevedono l'utilizzo di citochine ematopoietiche. Dopo 25 giorni di coltura, abbiamo ottenuto una differenziazione in pre-eritrociti, cioè cellule ancora nucleate co-esprimenti i marcatori specifici della linea eritroide CD36, CD71 e Gly A, ma che non esprimono ancora emoglobina dato che non reagiscono ai test con la benzamina, nel 65% delle cellule totali vive. Non è stata osservata alcuna differenza tra le cellule clonate e le cellule non clonate.

Abbiamo quindi pensato che le cellule AFS e le cellule ES condividessero lo stesso problema di differenziazione ematopoietica diretta, dato che

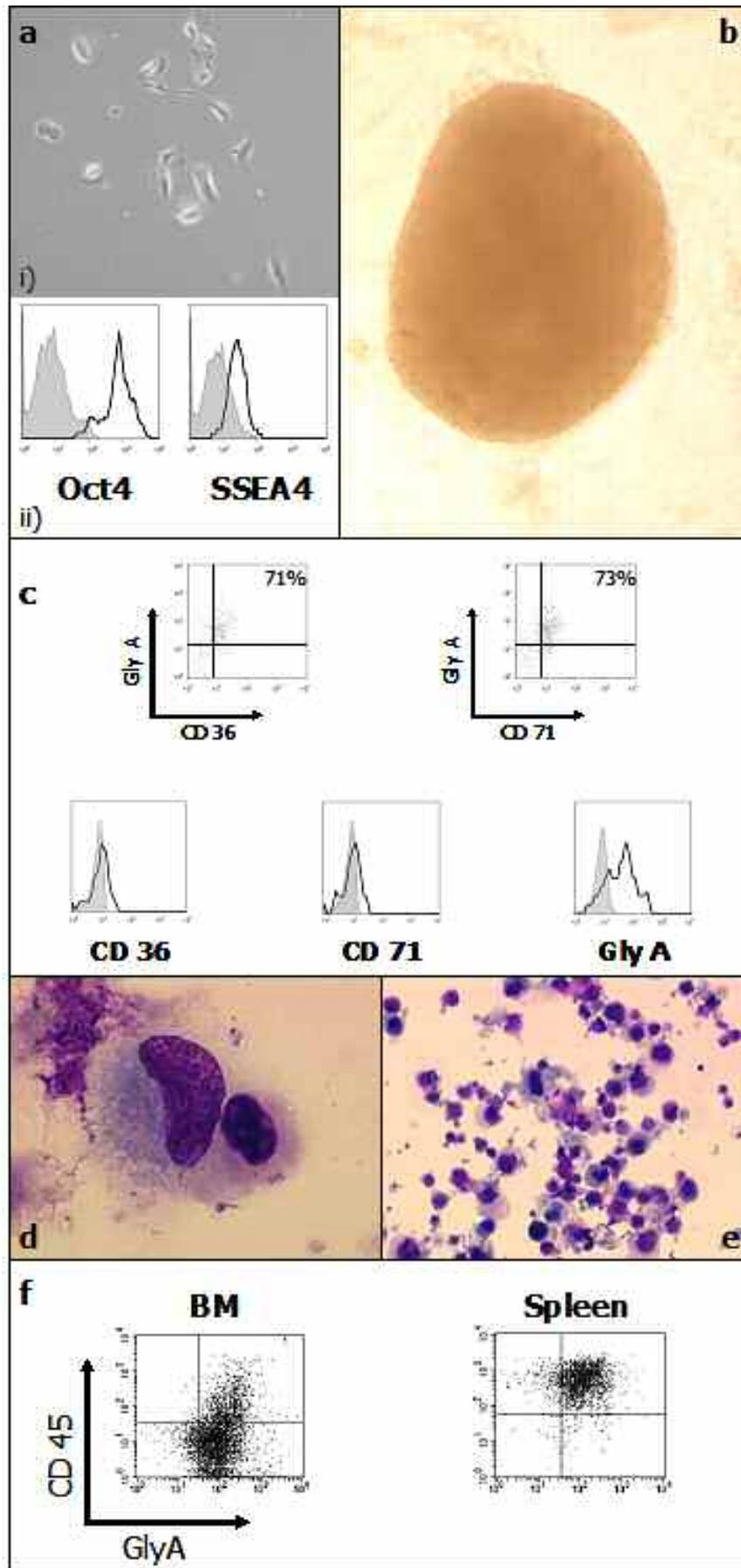
nemmeno con le cellule ES nessuna colonia o cellula ematopoietica è stata osservata con le colture semisolide o con le coculture su stroma OP9 se coltivate in maniera bidimensionale (Dang et al., 2002).

Noi abbiamo quindi utilizzato lo stesso protocollo che viene normalmente sfruttato per differenziare le cellule ES umane, la coltura attraverso EB, una struttura tridimensionale che mima lo sviluppo in vivo di un embrione, rendendo possibili i contatti in 3D cellula-cellula con conseguente formazione di un gradiente di segnali, che sembra essere più importante che i segnali stessi (Kennedy et al., 2007; Ng et al., 2005; Wang et al., 2005). Molti protocolli sono stati messi a punto per la formazione degli EB; noi abbiamo scelto di utilizzare quello sviluppato dal laboratorio del Dr. Elefanty, che prevede l'utilizzazione di un terreno privo di siero ed in cui le cellule sono forzate ad aggregarsi con una centrifugazione (Figura 9b). Con questa tecnica abbiamo replicato i medesimi risultati ottenuti con le colture liquide. Dopo 22 giorni, il 66% delle cellule vive co-esprimevano CD36/CD71/GlyA (Figura 9c), tuttavia nemmeno in questo caso non è stata osservata alcuna positività al saggio della benzidina, segno che non era stata prodotto alcuna emoglobina. Ancora una volta le cellule clonate e le cellule non clonate non hanno evidenziato nessuna differenza. Paragonata alla metodica della coltura liquida, quella della formazione di EB mostra una maggiore mortalità cellulare, un risultato per certi versi atteso, dato che le cellule all'interno hanno minor accesso al terreno di coltura ed ai suoi componenti nutritivi. Colorando le cellule secondo il protocollo May-Grunwald Giemsa, è stato possibile individuare cellule con morfologia propria dei reticolociti (Figura 9d) in un quadro di necrosi diffusa dovuta alle cellule del cuori degli EB (Figura 9e).

In parallelo abbiamo studiato la differenziazione delle cellule AFS in vivo. Come ricevente è stato usato il modello murino NOD/SCID, una variante del modello di immunodeficienza severa combinata (*scid*), che data la sua mutazione genetica è permissivo allo xenotrapianto, e risulta particolarmente utile per le analisi in vivo delle cellule ematopoietiche umane normali e maligne. L'iniezione in topi *scid* irradiati di cellule mononucleate umane isolate dal midollo osseo, sangue di cordone ombelicale o sangue periferico mobilizzato con G-CSF, tutte fonti ricche di HSC, ha come risultato l'instaurarsi di un sistema ematopoietico umano nel ricevente murino (Greiner et al., 1998)

Topi NOD/SCID irradiati e trattati intra-peritonealmente con anti-NK sono stati trapiantati con un massimo di  $2 \times 10^6$  di cellule AFS espanse. Dodici settimane dopo il trapianto, cellule umane CD45+ sono state ritrovate nella milza e nel midollo osseo dei due animali trapiantati con la più alta dose di cellule (Figura 9f): queste cellule CD45+ Gly A+ erano eritroblasti, indicando che anche in vivo il potenziale ematopoietico delle cellule AFS è limitato al solo compartimento eritroide.

**Figura 9 (pagina successiva):** Differenziazione ematopoietica delle cellule AFS umane. a) i) Morfologia di cellule AFS umane a passaggio 5 dopo la selezione. Microscopia a contrasto di fase, ingrandimento 400x. ii) Analisi citofluorimetrica di marcatori di carattere staminale in cellule AFS umane a passaggio 5, Oct4 (marcatore intracellulare, fattore di trascrizione) e SSEA4 (glicolipide di superficie). L'isotipo è in grigio chiaro. b) Morfologia di EB, derivato da cellule AFS umane a passaggio 5, a 4 giorni dall'aggregazione. Microscopia a contrasto di fase, ingrandimento 100x. c) Analisi citofluorimetrica di marcatori eritroidi di superficie in cellule isolate da EB derivato da cellule AFS umane a 22 giorni di aggregazione. Negli istogrammi l'isotipo è in grigio chiaro. d) reticolocita derivato da EB di 22 giorni dopo colorazione MGG. Microscopia a contrasto di fase, ingrandimento 1000x. e) cellule derivate da EB a 22 giorni di aggregazione dopo colorazione MGG. Si notano molte cellule con classico nucleo necrotico. Microscopia a contrasto di fase, ingrandimento. f) Analisi citofluorimetrica di midollo osseo e milza di un topo NOD/SCID trapiantato con  $2 \times 10^6$  cellule AFS. Sono presenti cellule derivanti dal donatore esprimenti i marcatori umani CD45 e Glycophorin A (GlyA). Cellule GlyA+ CD45- sono eritrociti maturi, mentre le cellule GlyA+ CD45+ corrispondono ad eritroblasti.



## **Analisi cromatinica delle cellule AFS umane**

Per spiegare la perdita della pluripotenza ematopoietica durante la fase di espansione in vitro, abbiamo analizzato lo stato cromatinico delle cellule espanse. E' stato dimostrato che i meccanismi epigenetici giocano un ruolo chiave per la multipotenza delle cellule staminali e la commissione ai lignaggi (Georgopoulos, 2002). Abbiamo quindi analizzato le modificazioni degli istoni associate ad una conformazione della cromatina di tipo attivo o repressivo a livello di un pannello di geni implicati nella differenziazione linfoide mieloide. E' già stato riportato in letteratura che questi loci nelle HSC sono associati ad una combinazione di modificazioni degli istoni attivanti, compresa l'acetilazione dell'istone H4, ma non con una mutilazione inibitoria dell'istone H3 (Maes et al., 2006; Maes et al., 2001). Come nelle HSC, nelle cellule AFS abbiamo osservato livelli apprezzabili di acetilazione dell'istone H4 in tutti i loci ematopoietici analizzati ed il gene espresso ubiquitariamente  $\beta$ 2-microglobulina, ma non nel gene non-ematopoietico THP (Figura 10). Alti livelli di acetilazione dell'istone H3 sono stati osservati solo per il gene Gata3 e per il gene della  $\beta$ 2-microglobulina. Invece geni linfoidi e mieloidi, compresi CD79b, CD3, c-fms, IgH e il segmento dei geni TCR  $\beta$  sono associati ad alti livelli di mutilazione repressiva a livello della lisina 9 o lisina 27 dell'istone H3. Nel gene eritroide-specifico EPOR e nel locus dei geni delle globine sono tuttavia assenti le mutilazioni dell'istone H3, fatto che correla bene con l'apprezzabile potenziale eritroide ma non linfoide o mieloide delle cellule AFS. Questi risultati rafforzano la nostra tesi secondo la quale le condizioni di espansione hanno modificato il potenziale ematopoietico delle cellule AFS, mantenendo inalterata il resto della loro plasticità.

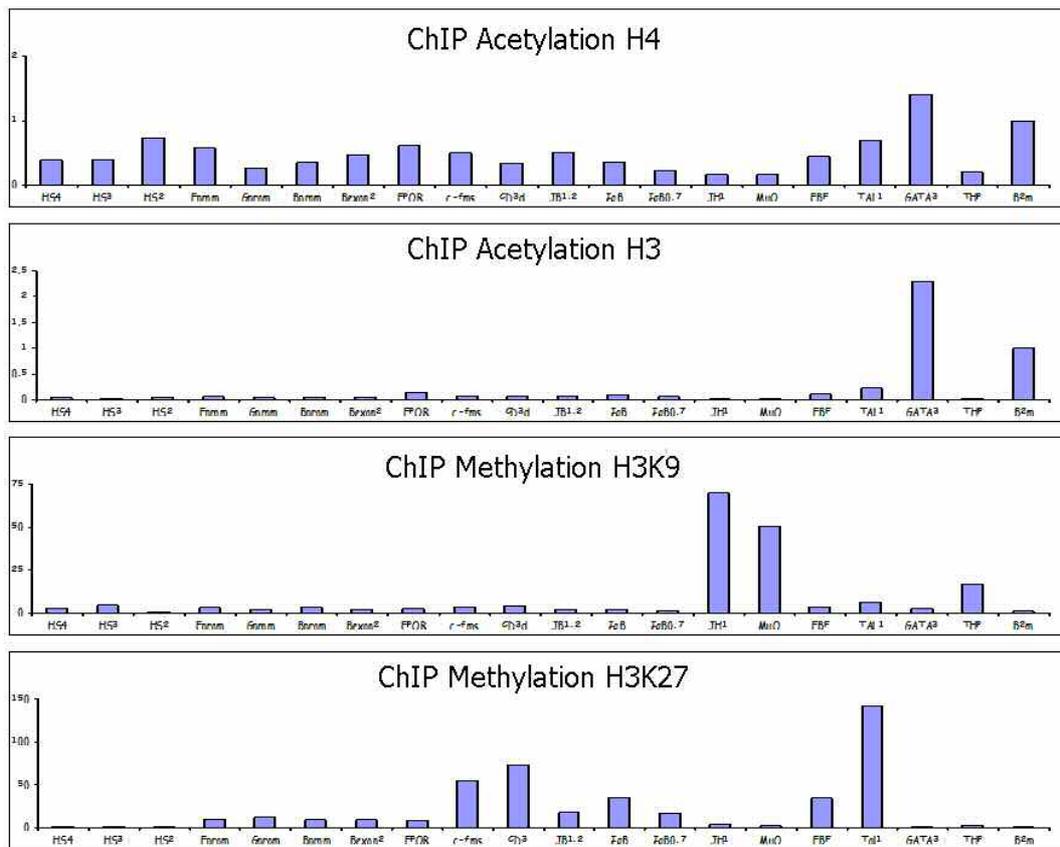


Figura 10: Analisi dello stato cromatinico delle cellule AFS. Stato di acetilazione degli istoni H4 ed H4 e di trimetilazione degli istoni H3 in posizione K9 e K27 rilevato con ChIP su cellule AFS umane.

### Cellule cKit+ Lin- (KL) sono presenti nel liquido amniotico murino ed umano

Tenendo in considerazione la nostra ipotesi, abbiamo deciso di spostare la nostra attenzione su cellule isolate “a fresco” dal liquido amniotico. Ci siamo concentrati inoltre sul modello murino per avere una maggiore

riproducibilità: infatti, è così possibile prelevare tutto il liquido amniotico contenuto nella sacca amniotica.

Abbiamo contemporaneamente cercato una possibile origine per le cellule AFS. La nostra attenzione si è soffermata sulla membrana che circonda il feto ed il liquido amniotico e che è responsabile della secrezione di quest'ultimo durante la gestazione. E' noto che l'amnion è formato da cellule che originano dal mesoderma extraembrionale, la stessa origine del sacco vitellino e dei suoi progenitori ematopoietici (Robinson et al., 2002). Inoltre, recenti pubblicazioni hanno riportato la presenza di cellule con caratteristiche del tutto simili alle cellule AFS proprio nell'amnion (Ilancheran et al., 2007; Marcus et al., 2007; Miki et al., 2005; Miki et al., 2007; Miki and Strom, 2006). Un'origine comune potrebbe riflettere un plasticità simile, cosa che abbiamo voluto indagare. Abbiamo pensato che se avessimo trovato delle cellule cKit+ nell'amnion con le stesse caratteristiche delle cellule AFS in termini di espressione genica e potenziale differenziativo, questo avrebbe potuto indicarci il compartimento di cellule staminali dal quale le cellule AFS hanno origine. Il liquido amniotico murino è stato prelevato da topi femmina GFP-fecondate da maschi GFP+ tra i giorni 9,5 e 19,5 dpc e successivamente analizzato con il FACS. La maggior parte delle cellule GFP+ del liquido amniotico viventi (7AAD-) prelevate esprimeva marcatori ematopoietici della linea eritroide o mieloide (Figura 11). All'interno della frazione Lin-, alcune cellule cKit+ sono state osservate (Amniotic Fluid-derived cKit+ Lin-, AFKL). La loro frequenza variava dallo 0,1% di tutte le cellule vive al giorno 9,5 dpc al 2,7% al giorno 12,5 dpc, per poi diminuire di nuovo allo 0,1% al giorno 19,5 dpc (Figura 11 a i). La quantità assoluta di AFKL per embrione equivalente aumentava da 1 al giorno 9,5 dpc a 10000 cellule

circa al giorno 12,5 dpc, per poi ridiminuire lentamente sino a raggiungere le 1000 cellule ritrovabili al giorno 19,5 dpc (Figura 10 a i). Una popolazione di cellule cKit+ Lin- (KL) è stata ritrovata anche nell'amnion e nel fegato fetale. Nell'amnion la sua frequenza diminuiva costantemente dal 3,5% delle cellule vive totali al giorno 9,5 dpc allo 0,5% prima della gravidanza (figura 10 a iii)

Nell'uomo, il liquido amniotico conteneva un'alta percentuale di cellule Lin+, una parte delle quali esprimeva cKit. Queste ckit+ Lin+ avevano per la maggior parte la morfologia dei mastociti ed esprimevano marcatori che si ritrovano proprio anche su mastociti, come CD9 e CD13 (Guo et al., 1992). Le cellule cKit- Lin+ erano per la maggior parte granulociti. Oltre a questa larga maggioranza di cellule Lin+, una popolazione di cellule KL è stata osservata. La sua frequenza era molto bassa nei liquidi amniotici delle prime settimane di gestazione (0,1% in media tra la settima e la decima settimana di amenorrea), quindi si alzava raggiungendo un picco di 1% tra la quindicesima e la diciannovesima settimana di amenorrea, per poi ridiscendere allo 0,2% oltre la ventesima settimana di gestazione. Facendo una stima che tiene conto del volume di liquido amniotico e della sua cellularità (Queenan et al., 1972), il numero totale di cellule hAFKL sembrerebbe aumentare continuamente sino a 900000 cellule circa dopo la ventesima settimana di amenorrea (Figura 11 b). Tutti questi risultati dimostrano che cellule KL sono presenti nei liquidi amniotici murini ed umani molto precocemente e che possono essere ritrovate lungo tutto l'arco della gestazione. Nell'embrione murino cellule Kl si ritrovano anche nell'amnion e nel fegato fetale.

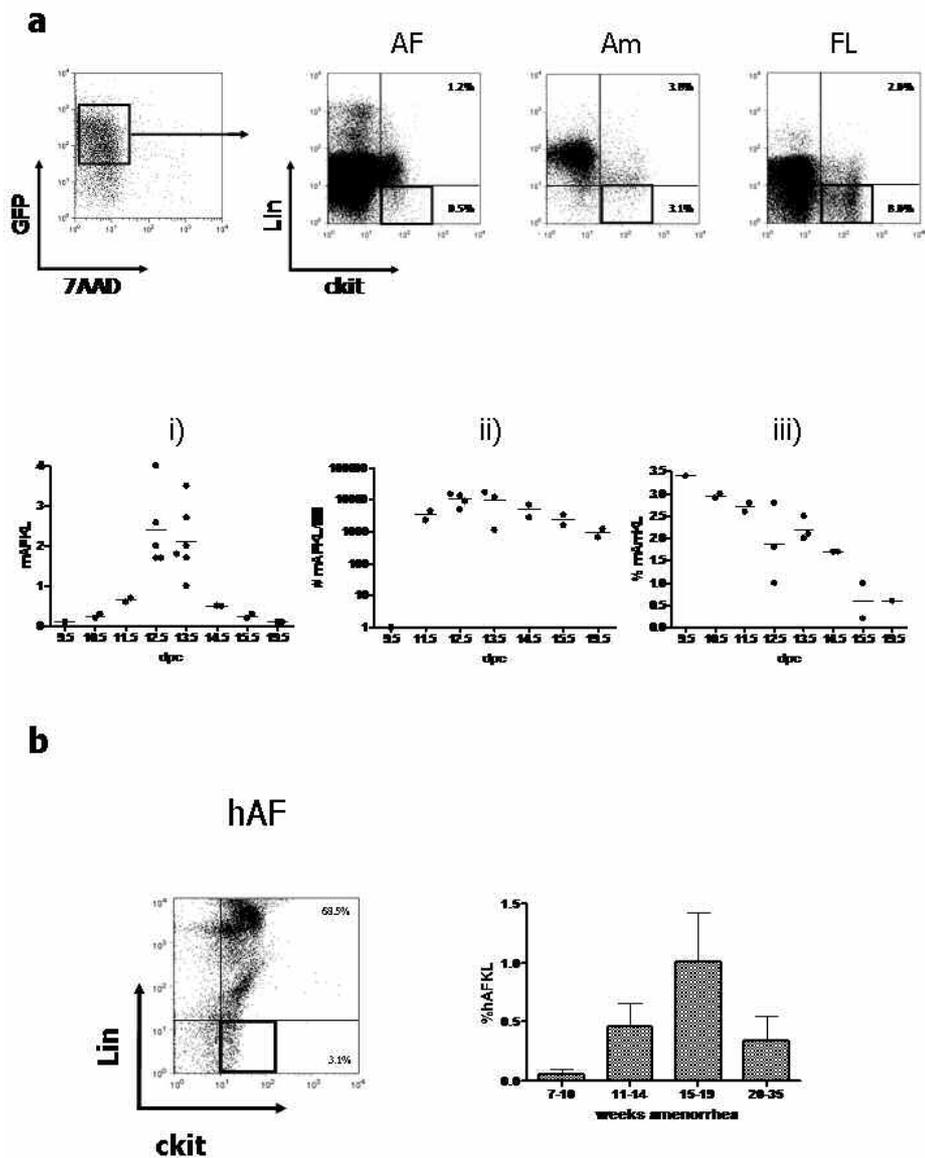


Figura 11: presenza di cellule KL nei liquidi amniotici (AF) murino ed umano, nell'amnion (Am) e nel fegato fetale (FL) murini. a) Analisi al FACS del fenotipo di superficie per i marcatori cKit e Lin delle cellule presenti nel liquido amniotico, amnion e fegato fetale murini al giorno 12,5 dpc; Cinetica durante lo sviluppo delle cellule mAFKL ed mAmKL in funzione dell'età gestazionale. i) Percentuale di mAFKL in rapporto alle cellule totali vive del liquido amniotico, ii) Numero assoluto di mAFKL per embrione equivalente (EE), iii) Percentuale di mAmKL in rapporto alle cellule totali vive dell'amnion. b) Analisi al FACS del fenotipo di superficie per i marcatori cKit e Lin delle cellule presenti nel liquido amniotico umano; Percentuale di hAFKL in rapporto alle cellule totali vive del liquido amniotico in funzione delle settimane di amenorrea

### **Caratterizzazione fenotipica delle cellule KL murine ed umane.**

Al di là dei cambiamenti in termini di frequenza delle cellule AFKL murine ed umane durante la gestazione, il loro fenotipo di superficie non variava. L'analisi del profilo di espressione di marcatori superficiali ha portato all'osservazione di alcune similitudini ed alcune differenze tra le cellule AFKL nella specie murina ed umana. In entrambi i casi l'espressione di marker CD34 e CD133 od il suo ortologo murino Prominin-1 era scarsa se non nulla. Sono stati trovati anche bassi livelli di espressione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC) di classe I (Figura 12a). Al contrario, CD44 era espresso su tutte le cellule AFKL umane, mentre era presente su meno della metà delle cellule AFKL murine. Anche la molecola CD90 era costantemente espressa sulla superficie di tutte le cellule AFKL umane, mentre non vi era praticamente traccia su quella delle corrispondenti cellule murine. E' interessante notare come le cellule KL isolate dall'amion e dal fegato fetale murini mostravano un fenotipo simile alle cellule AFKL murine, con due sottili differenze, come la presenza di CD44 su tutte le cellule AmKL e FLKL, e l'espressione di Sca-1 ristretta solamente a metà delle cellule AFKL, ma assente negli altri compartimenti.

Per determinare lo stato proliferativi delle cellule KL murine, in topi femmina in gestazione sono state iniettate dosi di BrdU come descritto nella sezione dei materiali e metodi. Due e 24 ore dopo la prima iniezione, è stata analizzata la frequenza delle cellule che avevano incorporato la BrdU nel proprio materiale genetico. Come mostrato nella Figura 12 b, la

frazione di cellule AFKL murine in divisione aumenta dal 4% al 16 % tra le 2 e le 24 ore post-iniezione. Nell'amnion e nel fegato fetale, la frequenza di cellule in divisione è molto maggiore (45% e 75% a 2 ore, 75% e 99% a 24 ore rispettivamente). Questi risultati indicano che le cellule KL del liquido amniotico proliferano meno e/o meno velocemente di quelle dell'amnion e del fegato fetale.

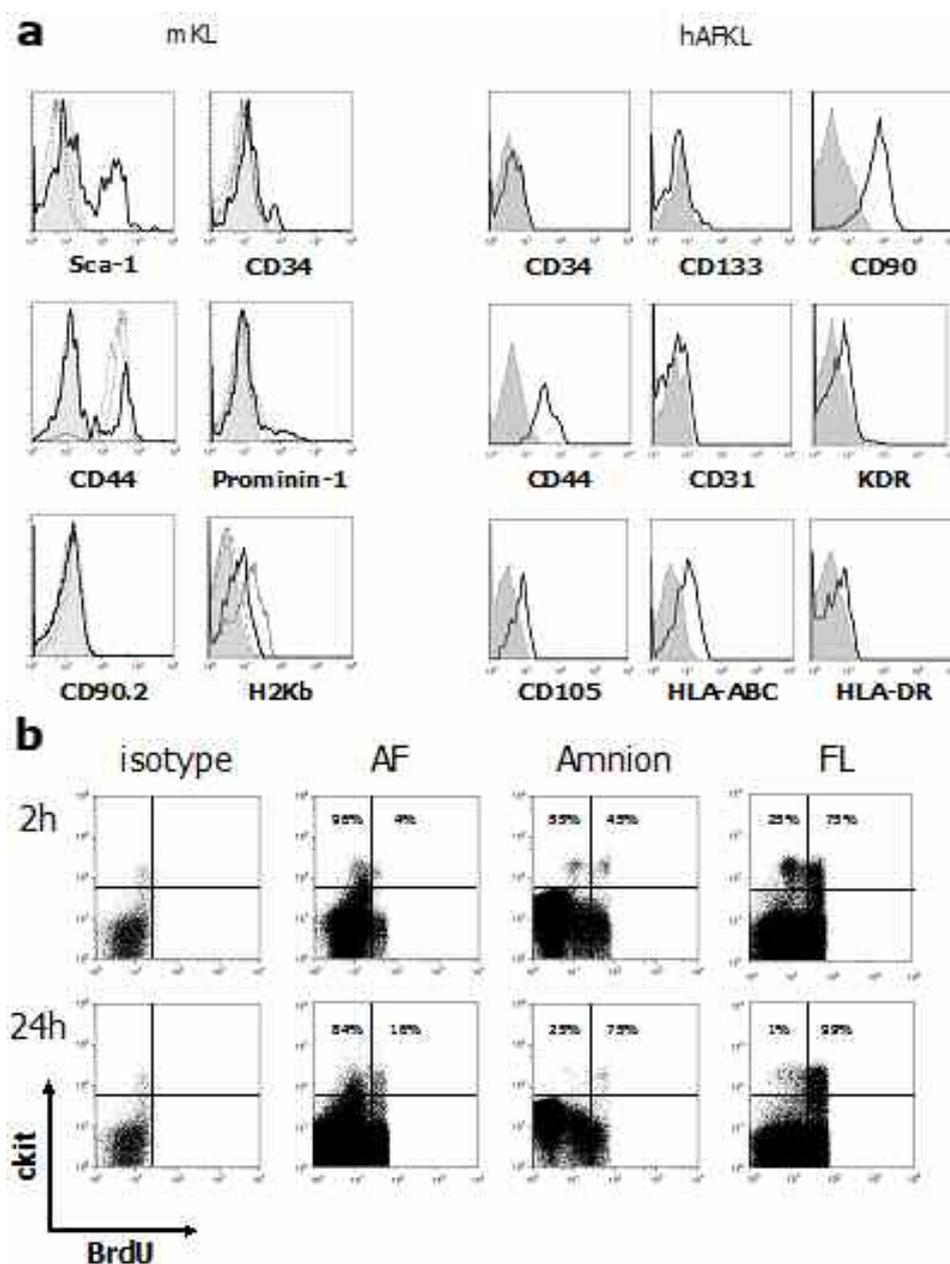


Figura 12 (pagina precedente): Caratterizzazione delle cellule AFKL murine ed umane, AmKL e FLKL murine. a) Espressione dei marcatori ematopoietici di superficie sulle cellule murine (a sinistra) al giorno 13,5 dpc. AFKL linea ingrossata, AmKL linea a puntini, FLKL linea tratteggiata. A destra, espressione di marcatori di superficie, ematopoietici e non, sulle cellule AFKL umane. Il fenotipo non varia al variare dell'età gestazionale, sia nelle cellule murine che nelle cellule umane. Gli isotipi sono indicati in grigio tenue. Istogrammi rappresentativi di una popolazione cellulare 7AAD-

b) Analisi dell'incorporazione di BrdU di cellule isolate dal liquido amniotico (AF), amnion (Am) o fegato fetale (FL) murini. Le cellule sono state isolate 2 o 24 ore dopo la prima iniezione intraperitoneale di BrdU, e l'incorporazione è stata rivelata con un anticorpo anti BrdU-FITC dopo fissazione e permeabilizzazione delle cellule. Sono mostrate cellule Lin- di due esperimenti rappresentativi.

### **Cellule KL murine ed umane mostrano un elevato potenziale ematopoietico in vitro**

Cellule AFKL ed AmKL murine sono state isolate al giorno 12,5 dpc e coltivate in terreno semi-solido per stabilire il loro potenziale clonogenico eritroide e mieloide (Figura 13 a i sinistra). Paragonate alla loro controparte isolata dal fegato fetale, sia le AFKL che le AmKL mostrano un forte potenziale clonogenico con un'alta proporzione (rispettivamente 22% e 27% delle colonie totali) di cellule formanti colonia di granulociti, eritrociti, monociti, megacariociti (CFU-GEMM), attestando la presenza di progenitori ematopoietici multipotenti tra le KL derivate da liquido amniotico ed amnion.

Tra le altre colonie, sono state osservate sia colonie mieloidi che eritroidi. Con le cellule umane sono stati ottenuti risultati simili, dato che è stata verificata la presenza sia di colonie mieloidi e eritroidi sia di colonie miste (CFU-GEMM) (Figura 13 a i destra). Il potenziale differenziativo mieloide è stato ulteriormente confermato con colture liquide (Figura 13 a ii). Le cellule KL sia murine che umane generano rispettivamente cellule Gr1+ o

CD13+CD33+ in tali condizioni. In particolare la resa di cellule Gr1+ dalle cellule AFKL murine è stata più elevata rispetto alle AmKL e FLKL.

Il potenziale linfoide delle cellule KL murine ed umane è stato studiato coltivando le cellule isolate su linee stromali, OP9 per la differenziazione in cellule B ed NK, OP9 trasdotte rispettivamente con la forma murina ed umana del ligando Notch Delta1 per la differenziazione in cellule T. A partire dal giorno 5, sia cellule AFKL che AmKL murine sono state in grado di generare cellule CD44+ CD25+, appartenenti cioè alla popolazione double negative step 2 (DN2), mentre una piccola quantità rimaneva CD44+ CD25-, cioè DN1 sino al giorno 20 (Figura 13 b pannello di sinistra). Cellule doppie positive CD4+ CD8+ e cellule più mature come cellule TCR $\alpha\beta$ + o TCR $\gamma\delta$ + sono state ritrovate dopo 15 giorni di coltura delle cellule AFKL. Un simile potenziale di differenziazione T è stato evidenziato dalle cellule AmKL e FLKL (Figura 13 b pannello centrale e di destra). Parallelamente al loro potenziale T, le cellule AFKL murine hanno mostrato un'altissima efficienza nel generare cellule CD19+, una piccola parte delle quali esprimeva anche IgM sulla loro superficie. Cellule AmKL e FLKL hanno esibito un simile potenziale B per la generazione CD19+ IgM+, ma il numero di cellule CD19+ totali era di gran lunga inferiore rispetto alle AFKL murine.

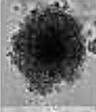
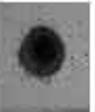
Le cellule umane AFKL seminate su stroma OP9hD1 ha dato origine in una settimana a precursori delle cellule T CD7+ CD5+. La settimana successiva la maggioranza delle cellule in coltura mostrava un fenotipo doppio positivo CD4+ CD8+ (Figura 13 b pannello di estrema destra). Tuttavia nessuna cellula matura TCR $\alpha\beta$ + o TCR $\gamma\delta$ + è mai stata osservata. In condizioni NK, cellule CD16+CD56+ sono state riprodotte con facilità.

Tutti questi risultati indicano che le cellule AFKL murine ed umane esibiscono un forte potenziale ematopoietico in vitro che, nel caso delle cellule di origine murina, è comparabile con quello mostrato dalle cellule isolate dall'amnion e dall'organo ematopoietico per eccellenza in questa fase dello sviluppo, il fegato fetale. Inoltre, la presenza di CFU-GEMM in colture semi-solidi suggerisce una marcata pluripotenza delle AFKL.

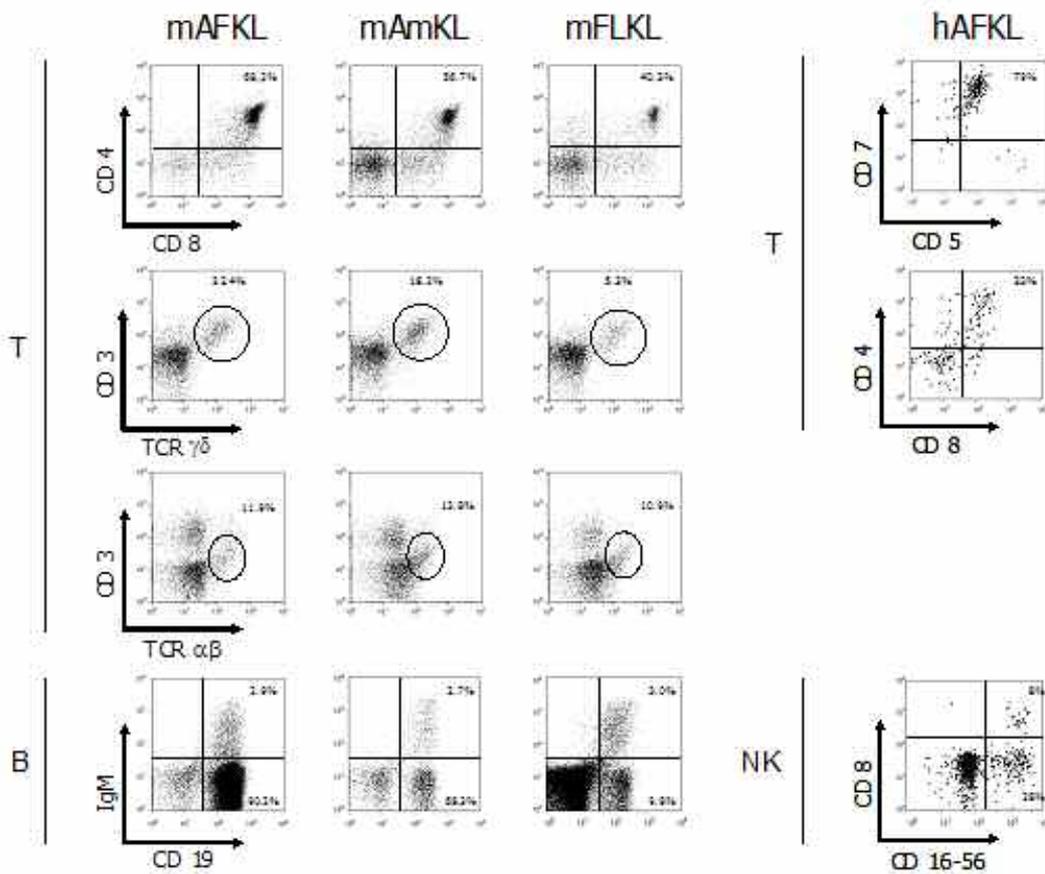
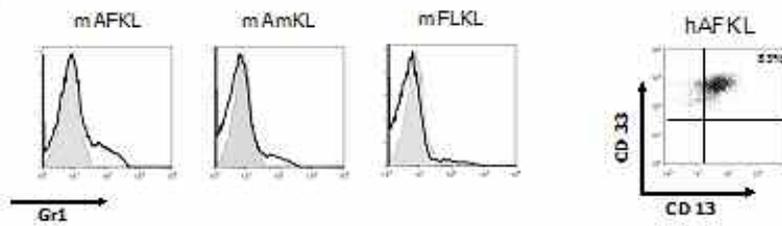
Figura 13 (pagina successiva): Differenziazione ematopoietica in vitro. a) i) Tabella che indica le frequenze delle colonie eritroidi (BFU-E/CFU-E) mieloidi (CFU-G/M/GM) e miste (CFU-GEMM) e le percentuali di ciascun tipo di colonia rispetto al totale delle colonie osservate a 14 giorni di coltura in terreno semisolido con citochine ematopoietiche di cellule mAFKL, mAmKL, mFLKL e hAFKL. A lato è riportata una fotografia rappresentativa per ciascun tipo di colonia (n=5). ii) Istogrammi e diagramma rappresentativo ottenuti al FACS indicanti la differenziazione mieloidi ottenuta con cellule KL murine ed umane in cocoltura con stroma OP9D1 (n=6). b) Analisi fenotipica sequenziale del fenotipo di superficie di cellule mAFKL, mAmKL, mFLKL e hAFKL in differenziazione. Per le cellule murine una sospensione di singole cellule da una cocoltura di 5000 cellule candidate con stroma OP9mD1 è stata ottenuta al giorno 7 (per la marcatura CD44/CD25), giorno 10 (CD4/CD8), giorno 15 (CD3+ TCR $\gamma\delta$ +) e giorno 20 (CD3+ TCR $\alpha\beta$ +) nel caso della differenziazione T; in caso di differenziazione B una sospensione di singole cellule da una cocoltura di 5000 cellule candidate con stroma OP9 è stata ottenuta al giorno 10 (CD19 IgM). Per le cellule umane una sospensione di singole cellule da una cocoltura di 2000 cellule AFKL con stroma OP9hD1 è stata ottenuta al giorno 7 (CD5/CD7), giorno 14 (CD4/CD8) nel caso della differenziazione T; giorno 20 per la differenziazione NK (CD8/CD16-CD56). Un gate FSC/SSC è stato sempre disegnato per eliminare le cellule stromali dall'analisi. Solo cellule GFP+ 7AAD- murine e 7AAD- umane sono state prese in considerazione. Sono mostrati esperimenti rappresentativi tra 6 con le cellule murine e 5 con le cellule umane.

a

i)

	mAFKL	mAmKL	mFLKL		hAFKL	
BFU/CFU-E	10/80,000 (37%)	14/40,000 (27%)	14/100,000 (43%)		3/50,000 (19%)	
CFU-G/M/GM	11/80,000 (41%)	24/40,000 (46%)	15/100,000 (45%)		9/50,000 (56%)	
CFU-GEMM	6/80,000 (22%)	14/40,000 (27%)	4/100,000 (12%)		4/50,000 (25%)	
Total	27/30000	52/40,000	33/100,000		16/50,000	

ii)



## Il potenziale linfoide T è molto forte nella sottopopolazione CD34+ delle mAFKL

Come descritto in precedenza, una parte di cellule AFKL murine è CD34+ come le HSC derivate dalla placenta (Gekas et al., 2005). Gekas e colleghi, divisero le cellule placentari cKit+ in due sottopopolazioni sulla base della loro espressione o meno dell'antigene CD34, dimostrando che la diversa espressione di CD34 riflette un potenziale ematopoietico leggermente diverso, in particolare la sottopopolazione CD34+ risulta arricchita di HSC. Abbiamo deciso di studiare più a fondo questo punto con le cellule AFKL murine. Il potenziale T delle sottopopolazioni CD34+ e CD34- è stato investigato e quantificato in saggi di diluizione limite delle cellule in condizioni di differenziamento T. L'analisi delle coculture dopo 14 giorni ha rivelato come tutte le cellule cKit+ CD34+ avessero donato cellule DP CD4+ CD8+, mentre 1/1050 circa tra le cellule cKit+/CD34- avesse differenziato in senso T (Figura 14). Questi risultati sono in favore di un forte potenziale di differenziamento T nelle cellule AFKL murine, concentrato nella sottopopolazione CD34+.

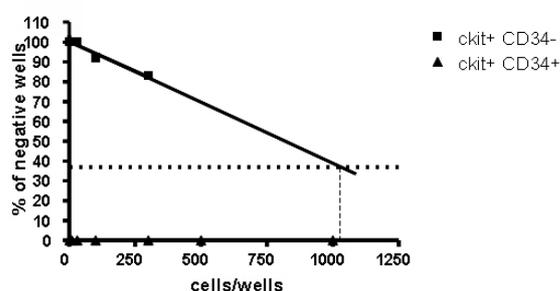


Figura 14: Analisi della differenziazione in diluizione limite delle mAFKL CD34+ e mAFKL CD34-. Cellule mAFKL CD34+ e CD34- sono state seminate in ragione di 1, 3, 10, 100, 300 cellule per pozzetto su stroma OP9mD1 (n=1). Dopo 2 settimane di cocoltura, la presenza di cellule DP CD4+ CD8+ o CD3+ TCR $\gamma\delta$ + originate dalle mAFKL è stata investigata. La proporzione di precursori linfoidi è stata calcolata con il metodo della regressione lineare (basata sulla distribuzione di Poisson) come il reciproco della concentrazione delle cellule analizzate che dava il 37% di colture negative.

## **Cellule KL murine esibiscono un forte potenziale ematopoietico in vivo**

Cellule KL sono state isolate dal liquido amniotico, amnion e fegato fetale di embrioni Ly5.2+/GFP+/C57BL-6J e trapiantate in topi riceventi Ly5.1+/RAG1ko/C57BL-6J. Sono state trapiantate una media di  $2 \times 10^4$  cellule AFKL murine, cioè due embrioni equivalenti, contro  $2 \times 10^4$  cellule FLKL ed in due esperimenti indipendenti  $2 \times 10^3$  e  $2 \times 10^4$  cellule AmKL. Come indicato nel riassunto della ricostituzione in vivo (Tabella 2), è stato osservato attecchimento, cioè presenza di cellule Ly5.2+/GFP+, a 4 mesi dal trapianto in tutti gli animali trapiantati, incluso il topo che ha ricevuto solo  $2 \times 10^3$  cellule AmKL. Per quel che riguarda la natura delle cellule originanti dal donatore, cellule Gr1+ e Mac1+ sono state trovate nel sangue, milza (dati non illustrati) e midollo osseo di tutti gli animali trattati (tabella 2 e Figura 15). Cellule NK sono state osservate in tutti riceventi di cellule AmKL e FLKL e nella maggioranza di topi trapiantati con cellule AFKL (tabella 2). Cellule B220+ IgM+ linfoidi B sono state osservate nelle milze di tutti i riceventi cellule AFKL e FLKL e nel topo trapiantato con la più alta dose di cellule AmKL (tabella 2 e figura 15). Cellule linfoidi T (sia CD4+ che CD8+ CD3+) sono state individuate nel sangue periferico (dato non illustrato) e nei linfonodi di tutti i riceventi cellule FLKL, ed in 5 riceventi cellule AFKL su 8, mentre erano assenti in tutti i topi trapiantati con cellule AmKL. Quest'ultime hanno quindi generato cellule NK in entrambi i topo trattati, cellule B in uno solo ma mai cellule T.

Questi esperimenti di trapianto indicano che le cellule KL isolate dal liquido amniotico ed amnion murini possiedono non solo un potenziale ematopoietico in vitro ma anche capacità di ricostituzione ematopoietica

in vivo a lungo termine, paragonabile a quella delle cellule KL del fegato fetale.

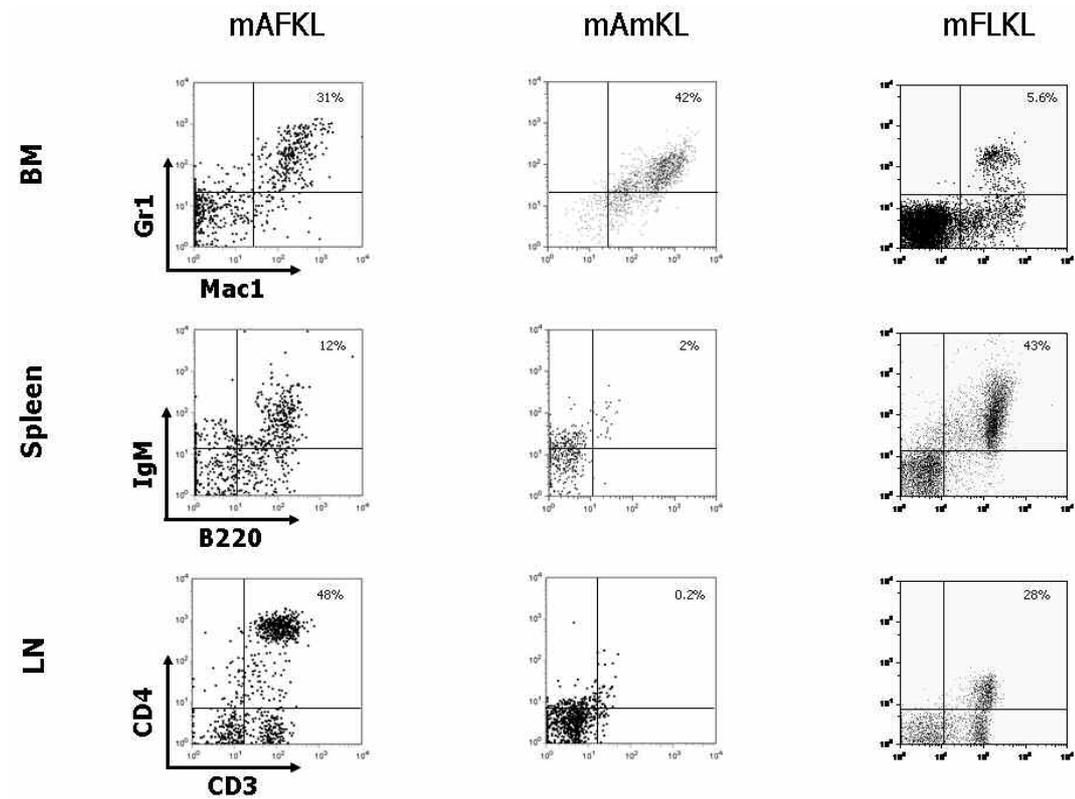


Figura 15: Ricostituzione ematopoietica ad opera di cellule KI trapiantate in topi RAG1<sup>-/-</sup>. Profili rappresentativi di analisi al FACS di midollo osseo (BM), milza (Spleen) e linfonodi (LN) di topi RAG1<sup>-/-</sup> Ly5.1<sup>+</sup> 16 settimane dopo il trapianto con cellule mAFKL, mAmKL, mFLKL che dimostrano ricostituzione ematopoietica multilignaggio (mieloide, linfoide B e linfoide T). Sono mostrate cellule appartenenti alla frazione GFP<sup>+</sup> Ly5.2<sup>+</sup>.

Tabella 2: riassunto degli esperimenti di ricostituzione ematopoietica

	<b>mAFKL</b>	<b>mAmKL</b>	<b>mFLKL</b>
<b>Engraftment</b>	8/8	2/2	3/3
<b>Granulocytes</b>	8/8	2/2	3/3
<b>T cells</b>	5/8	0/2	3/3
<b>B cells</b>	7/8	1/2	3/3
<b>NK cells</b>	5/7*	2/2	2/2*

\* 1 topo non analizzato per la presenza di cellule NK

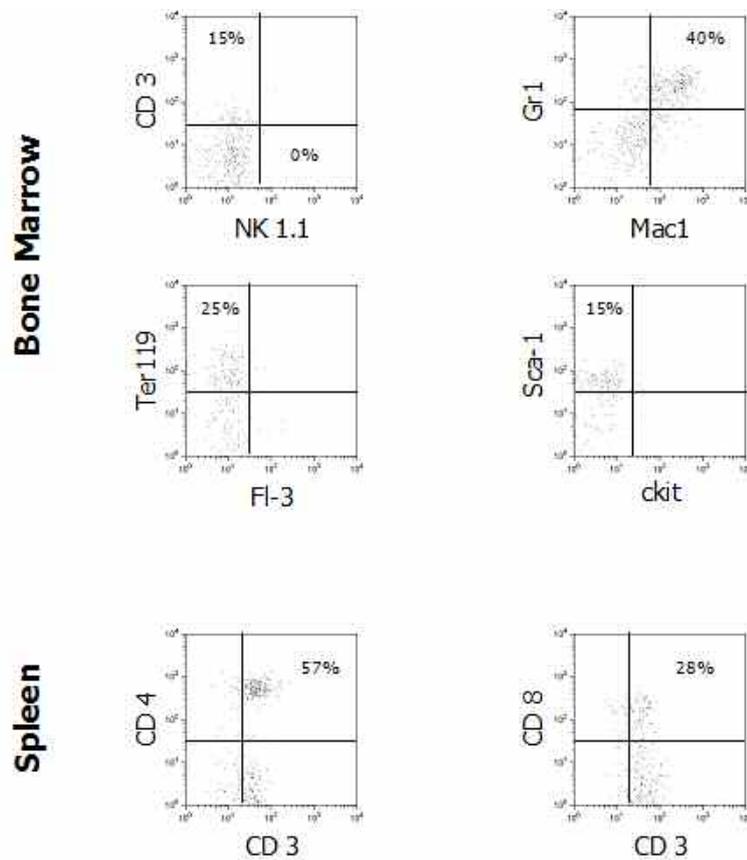
Tabella 2: Riassunto degli esperimento di trapianto primario. Ricostituzione a lungo termine (4 mesi) dopo il trapianto di mAFKL, mAmKL e mFLKL prelevati a 12,5-13,5 dpc in topi RAG1-/- pre-irradiati. E' stata considerata avvenuta la ricostituzione a lungo termine ogni qualvolta sono state trovate cellule derivanti dal donatore nel midollo osseo dei riceventi. E' indicato anche il lignaggio cellulare al quale appartenevano le cellule derivanti dal donatore ritrovate nel midollo osseo dei riceventi.

### Capacità di auto-rinnovamento delle HSC derivate dalle mAFKL

Tra le cellule GFP+ Ly5.2+ derivanti dal donatore ritrovate nei midolli ossei dei topi riceventi primari, abbiamo trovato discrete quantità (in un caso sino all'80%) di cellule Sca-1+ e tracce di cellule Sca-1+ cKit+. Questo suggerisce la generazione in vivo di cellule HSC a lungo termine (LT-HSC) a partire di cellule AFKL murine. Per dimostrare chiaramente se LT-HSC funzionali fossero generate dalle AFKL trapiantate, abbiamo valutato se le cellule derivanti dal donatore, una volta isolate dai midolli ossei dei riceventi primari, fossero in grado di attecchire in riceventi secondari

irradiati e di ricostituirli stabilmente. Questo ha avuto come risultato una ricostituzione ematopoietica persistita sino al sacrificio, 11 settimane dopo il trapianto di  $10^6$  cellule Ly5.2+ totali isolate da midolli ossei di riceventi mAFKL, in uno dei due animali trattati. Il topo trattato sopravvissuto aveva 1,5% di cellule GFP+ Ly5.2+ circolanti nel sangue periferico, molte delle quali mieloidi e linfoidi T (dati non illustrati). Cellule derivanti dal donatore sono state osservate anche nel midollo osseo e nella milza. Come mostrato in Figura 16, sebbene la maggioranza delle cellule del donatore presenti nel midollo osseo fossero Sca-1+, si sono osservate cellule esprimenti marcatori specifici per la linea linfoide B, linfoide T e mieloide. Anche nella milza sono state osservate cellule T, come mostrato dalla marcatura CD4+ CD3+ e CD8+ CD3+. Nessuna cellula del donatore è stata trovata nel timo o nei linfonodi. Considerando questi risultati si può concludere che cellule AFKL murine sono in grado di generare vere e proprie LT-HSC, sebbene queste cellule non sembrano in grado di migrare ulteriormente nel timo e nei linfonodi per generare linfociti *de novo*.

Figura 16 (pagina successiva): Cellule AFKL murine generano LT-HSC che attecchiscono in topi riceventi secondari. Profili di FACS rappresentativi del midollo osseo e della milza del topo ricevente secondario sopravvissuto, trapiantato con  $10^6$  cellule Ly5.2+ totali isolate dal midollo osseo di un ricevente primario, 11 settimane dopo il trapianto, che mostrano ricostituzione ematopoietica multilineare (linea linfoide T, eritroide, mieloide). Le cellule in figura sono GFP+ Ly5.2+.



### Potenziale ematopoietico in vivo di cellule AFKL umane

Contemporaneamente ai trapianti di cellule murine, abbiamo studiato il potenziale ematopoietico in vivo delle cellule AFKL umane trapiantandone  $2 \times 10^4$  in topi NOD/SCID irradiati e trattati con anticorpo anti-NK per prevenire il rigetto causato dalle cellule NK. Inoltre dato che parte delle cellule AFKL umane (ma non le cellule murine) esprimono

l'antigene CD26 (dato non illustrato), una molecola che è stata dimostrata in letteratura possedere attività inibitrice nei confronti dell'attecchimento delle HSC (Christopherson et al., 2004), in 3 dei 6 topi riceventi le cellule sono state trattate con Diprotina A, inibitore del CD26, come già riportato da altri gruppi (Christopherson et al., 2004; Peranteau et al., 2006), giusto prima dell'iniezione. Nonostante i trattamenti, in nessuno dei 6 animali trapiantati abbiamo osservato segni di attecchimento 12 settimane dopo il trapianto. Abbiamo ipotizzato che il basso numero di cellule trapiantate possa essere la causa del fallimento di questi trapianti, dato che attecchimento ematopoietico si osserva con l'iniezione di più di  $5 \times 10^4$  cellule CD34+ isolate dal sangue del cordone ombelicale.

### **Profilo di espressione genica di cellule KL murine**

Per meglio caratterizzare le popolazioni cellulari AFKL, AmKL e FLKL murine, abbiamo studiato l'espressione di diversi geni coinvolti nell'ematopoiesi usando un protocollo di Multiplex RT-PCR già pubblicato (Peixoto et al., 2004), che permette l'analisi simultanea di una ventina di geni in una singola cellula. Venticinque cellule AFKL, 16 AmKL e 28 FLKL sono state analizzate indipendentemente per l'espressione di gene 28S come gene endogeno controllo interno e di altri 19 geni ematopoiesi-specifici (Figure 17 e 18). E' interessante notare che il profilo di espressione genica delle cellule AFKL e AmKL è risultato molto simile a quello delle cellule FLKL. Infatti, GMCSFR, Il7R $\alpha$  e Pax5, la cui espressione correla con un indirizzamento del differenziamento verso la linea mieloide, linfoide T e linfoide B, non sono espressi nei tre tipi

cellulari. L'espressione del gene Fog è stata osservata nella maggioranza di cellule KL isolata da tutte e tre le diverse fonti. PU1, Ets1, Id3, c-Myb e MPO sono raramente, se non del tutto assenti, espressi nelle cellule AmKL e FLKL, mentre la loro espressione è stata osservata in parte delle cellule AFKL murine. La coespressione dei geni Gata2 e LMO2 è stata dimostrata essere correlata con la capacità di LTR nelle cellule della regione AGM dal gruppo della Dr. Cumano (Bertrand et al., 2005), mentre cellule esprimenti solamente Gata2 hanno un potenziale ematopoietico più ristretto al lignaggio eritreo-mieloide. Cellule Gata2+ Lmo2-, cioè progenitori eritreo-mieloidi sono stati osservati solamente tra le cellule AFKL murine. E' interessante notare come il 24% delle cellule AFKL sia Gata2+ LMO2+, in confronto al 18,7% ed il 14,3% delle cellule AmKL e FLKL. In tutti i casi, a parte una sola cellula AFKL, Gata1 è espresso nelle cellule Gata2+ LMO2+. La presenza di queste ultime cellule correla fortemente con i risultati dei trapianti descritti in precedenza, confermando la presenza di cellule con forte potenziale ematopoietico tra le cellule AFKL e AmKL murine.

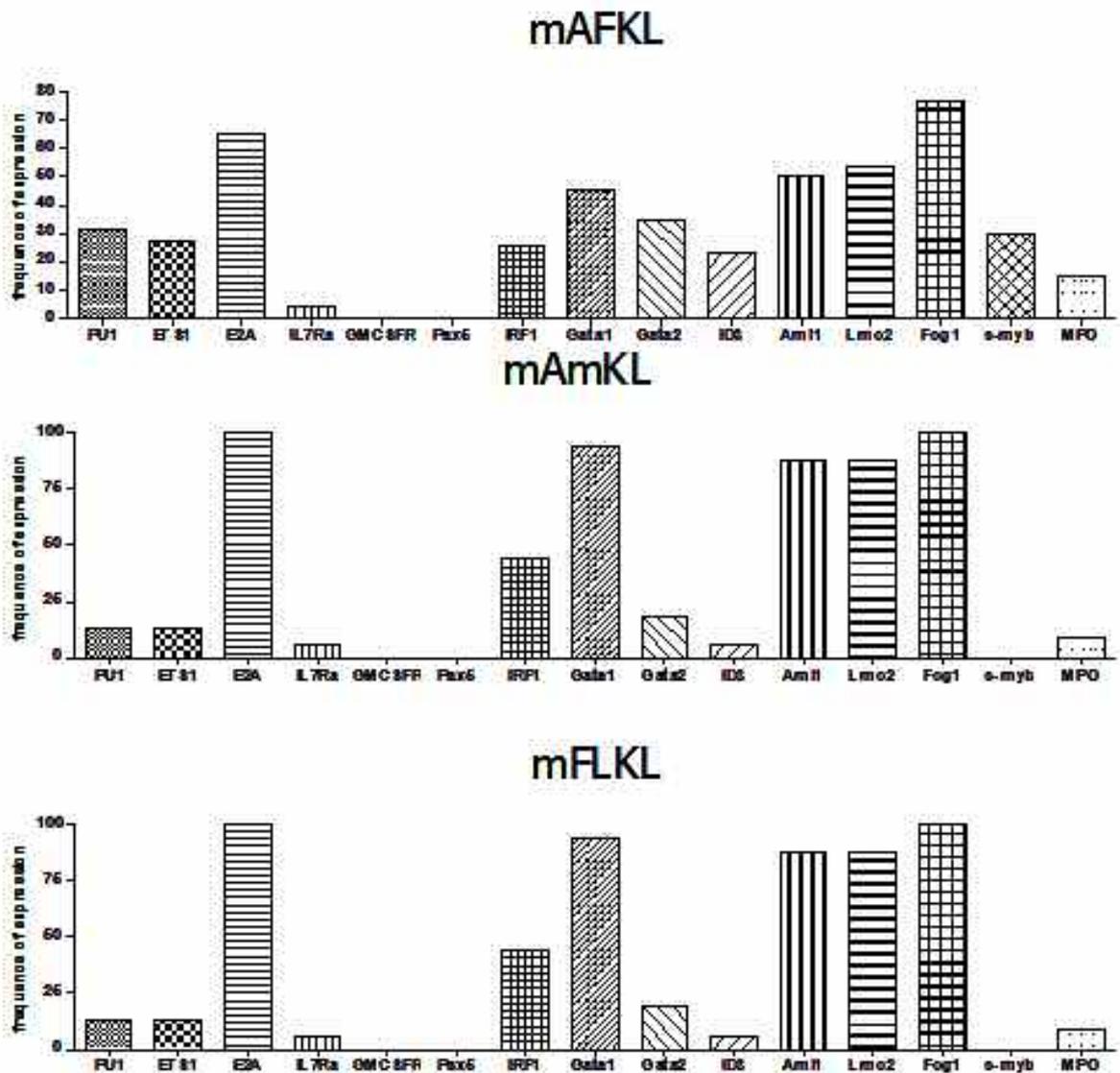


Figura 17: Frequenza di espressione di geni ematopoietici in cellule AFKL, AmKLe FLKL murine. Analisi di multiplex RT-PCR su singola cellula sono state condotte per studiare la frequenza di espressione di geni ematopoietici nelle tre popolazioni. Per ogni singola cellula abbiamo identificato la presenza di mRNA di un insieme di geni che è noto abbiano un ruolo chiave durante l'ematopoiesi, senza quantificarne l'espressione. E' stato usato il gene 28S come controllo interno in ciascuna popolazione. I risultati sono indicati sotto forma di istogrammi.

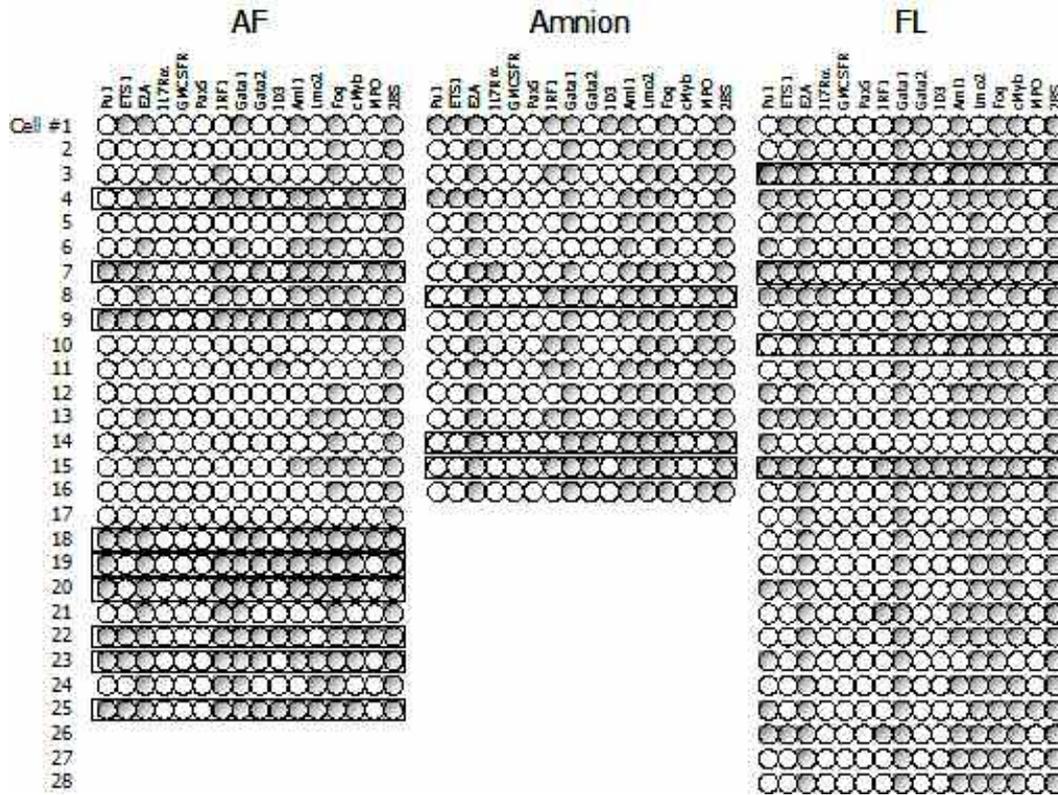


Figura 18: Co-espressione di geni ematopoietici in cellule AFKL, AmKLe FLKL murine. Analisi di multiplex RT-PCR su singola cellula sono state condotte per studiare la co-espressione di geni ematopoietici nelle tre popolazioni. Per ogni singola cellula abbiamo identificato la presenza di mRNA di un insieme di geni che è noto abbiano un ruolo chiave durante l’ematopoiesi, senza quantificarne l’espressione. E’ stato usato il gene 28S come controllo interno in ciascuna popolazione. Ogni riga rappresenta la stessa singola cellula, ogni colonna indica un gene differente. Il pallino pieno rappresenta positività per quel gene, il pallino vuoto indica negatività. Nei riquadri sono indicate le cellule Gata2+ Lmo2+.



## DISCUSSIONE

Nel nostro studio, abbiamo dimostrato che cellule staminali isolate a partire dal liquido amniotico mantengono un potenziale ematopoietico. L'espansione o la generazione in vitro delle HSC è una grossa sfida e sarebbe naturalmente molto interessante dal punto di vista terapeutico. La disponibilità di HSC è un fattore limitante nello sviluppo di terapie per i disordini di origine ematopoietica e sebbene l'espansione delle HSC o la loro derivazione a partire dalle cellule ES sia una prospettiva molto attraente, tuttavia lo stato dell'arte è ben lontano da una applicazione pratica (Serafini et al., 2007).

Abbiamo quindi concentrato i nostri sforzi sulle cellule AFS, che sono state recentemente descritte e caratterizzate (De Coppi et al., 2007): sino ad oggi non è stata però dimostrata una loro plasticità in senso ematopoietico.

I nostri risultati mostrano come le cellule AFS siano ancora capaci di differenziarsi in cellule ematopoietico, ma questa potenzialità è ristretta al compartimento eritroide, sia in vitro che in vivo. Questa restrizione nel programma differenziativo ematopoietico può essere dovuta alle condizioni di coltura per l'espansione delle cellule, che le porta ad aderire alla plastica durante la loro crescita. E' ben noto che l'adesione ex vivo alle piastre di coltura costituisca un grosso problema ogni qualvolta si voglia ricapitolare il programma dell'ematopoiesi (Dang et al., 2002), visto che le condizioni di coltura sono ben lontane dall'essere quelle che le cellule affrontano in situazione fisiologica in vivo. Infatti nelle colture in vitro è ben difficile ripristinare le condizioni di una nicchia di cellule staminali. Abbiamo analizzato più dettagliatamente lo stato cromatinico delle cellule AFS, studiando le due modificazioni degli istoni più conosciute, la

metilazione e l'acetilazione a carico degli istoni H3 ed H4. E' stato ben evidenziato che l'epigenetica gioca un ruolo chiave nel controllo del destino di una cellula staminale, anche delle HSC (Georgopoulos, 2002). Per quel che riguarda la situazione dei loci ematopoietici nelle cellule AFS, abbiamo dimostrato come solo i loci dove sono localizzati il gene EPOR ed i geni delle globine sono in uno stato neutrale essendo acetitati in H4 ma mutilati in H3, quindi rendendo possibile una differenziazione eritroide delle cellule AFS quando vengono loro forniti gli stimoli appropriati. Tutti gli altri loci ematopoietici risultano essere fortemente repressi, essendo altamente metilati. Purtroppo, a causa dei limiti tecnici della metodica di indagine dovuti alla scarsa quantità ed alla eterogeneità delle cellule KL isolabili "a fresco" non è stato possibile indagare lo stato cromatinico di quest'ultime per confrontarlo con le cellule AFS. Questo mancato confronto non ci permette di stabilire con certezza se la repressione di una parte del potenziale ematopoietico è uno stato insito nella natura delle cellule AFS o se invece sia piuttosto uno stato acquisito in coltura, come nella nostra ipotesi.

Ad ogni modo, dato che l'espansione è davvero molto importante da un punto di vista terapeutico, le condizioni di coltura delle cellule AFS adottate sinora dovrebbero essere modificate per poter affrontare un approccio clinico. Ci sono diverse strategie che possono essere prese in considerazione per il mantenimento del carattere staminale delle cellule AFS. Attualmente stiamo considerando l'idea di coltivare le cellule AFS come le cellule ES, quindi con uno stroma di fibroblasti embrionali murini con l'aggiunta nel terreno di coltura di LIF per le cellule murine e bFGF per le cellule umane. Inoltre, stiamo anche valutando la possibilità di affrontare il problema con un approccio che sta guadagnando crescente

interesse nel campo dell'ingegneria tissutale, l'utilizzo di un bioreattore, che permette di monitorare nel tempo alcuni parametri come l'adesione, la tensione dell'ossigeno, l'acidificazione del terreno di coltura, la concentrazione locale di citochine e di poterli controllare da un punto di vista spazio-temporale. Questo approccio è già stato utilizzato con un discreto successo per la coltura di cellule ES e HSC (Cabrita et al., 2003; Dang et al., 2004; Nielsen, 1999). Nel nostro caso il bioreattore potrebbe costituire un ausilio molto importante: le cellule AFS sono flottanti, quindi la mancanza di contatti cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare potrebbe essere un fattore chiave determinante per il mantenimento del loro stato indifferenziato. Questa pertanto potrebbe essere una delle possibili cause della perdita di parte del potenziale ematopoietico successivamente all'adesione delle cellule alle piastre di coltura in vitro.

Inoltre i protocolli di differenziazione eritroide da noi utilizzati non sono ottimali per le cellule AFS, dato che non siamo stati in grado di ottenere un differenziamento definitivo completo. La mancanza di emoglobina non ci ha permesso di studiare se le cellule AFS seguono un cammino di differenziamento eritropoietico di tipo primitivo o definitivo. La conoscenza del tipo di globina che verrebbe espresso dalle cellule AFS ci permetterebbe di comprendere se la restrizione della pluripotenza sia dovuta ad una possibile filiazione delle cellule AFS con le cellule del sacco vitellino, che sono in grado di generare solo eritrociti primitivi, come indicato in precedenza.

Per ovviare al problema dell'espansione e delle sue possibili ripercussioni, ci siamo concentrati successivamente sulle cellule AFKL murine. Dal punto di vista della nomenclatura, non possiamo affermare che le cellule AFKL siano le stesse cellule AFS, dato che non siamo in grado di

dimostrare la filiazione diretta dei due tipi cellulari, mantenendo inalterato il potenziale ematopoietico.

Non possiamo escludere una contaminazione delle AFKL con cellule circolanti nel sangue fetale, dove sono presenti HSC. Infatti durante la procedura sperimentale di rimozione delle membrane fetali per il prelievo del liquido amniotico qualche capillare presente nelle membrane può rompersi contaminando il liquido amniotico. Tuttavia la frequenza ed i numeri assoluti delle cellule AFKL sono di gran lunga superiori a ciò che è stato riportato in letteratura per il sangue fetale (Delassus and Cumano, 1996). Per quel che riguarda le cellule AmKL la contaminazione con sangue fetale è un evento molto raro e praticamente trascurabile, visto quando esso fosse presente verrebbe sciacquato via con i lavaggi in PBS che vengono effettuati prima di qualsiasi esperimento.

La presenza di cellule AFKL a partire dal giorno 9,5 dpc, cioè dopo la formazione dell'amnion e prima dell'apparizione delle HSC di origine intraembrionale, mantiene aperta la questione se esse siano di origine intra- o extra-embryonale. Il fenotipo superficiale non permette di trarre alcuna conclusione da questo punto di vista, infatti le cellule AFKL murine sono simili sia alle cellule AmKL (extraembrionali) che alle cellule FLKL (intraembrionali), con qualche piccola differenza. L'assenza dell'antigene CD44, il recettore dello ialuronano, in una parte delle cellule AFKL non sorprende, dato che questa molecola è un mediatore di adesione: dato che le AFKL sono cellule flottanti nel liquido amniotico, alcune cellule possono aver downregolato questo marcatore perché risulta inutile in quelle condizioni. Sca-1 potrebbe invece la loro origine mesodermica: infatti, cellule staminali e progenitori di origine mesenchimale, sebbene molto eterogenei, sono accomunati dall'espressione di Sca-1 e delle

molecole di adesione CD29 e CD44 e non mostrano segni di espressione di marcatori ematopoietici o endoteliali superficiali, come CD45 e CD31 (Holmes and Stanford, 2007). L'antigene Sca-1 è assente in progenitori molto precoci o in cellule già ampiamente commissionate, e questa potrebbe essere la ragione per la quale non troviamo traccia della sua espressione nelle cellule AmKL e FLKL. Una piccola frazione di cellule AFKL ma non di cellule AmKL o FLKL esprimono CD34. Queste cellule potrebbero rappresentare una sottopopolazione arricchita di progenitori ematopoietici, dato che ciascuna singola cellula AFKL CD34+ è in grado di differenziarsi in cellula T, come dimostrato con gli esperimenti di diluizione limite. In particolare, l'espressione di CD34 sembra essere una caratteristica delle HSC di origine fetale attivate, mentre le HSC nel midollo osseo adulto sono negative per CD34 (Osawa et al., 1996). Le nostre condizioni di espansione potrebbero per esempio risultare in una perdita di questo compartimento, dato che le cellule AFS non mostrano espressione di CD34 (De Coppi et al., 2007). Tuttavia parte delle cellule AFKL è in grado di differenziare in senso ematopoietico, anche se la frequenza di queste cellule è di tre ordini di grandezza inferiore.

I risultati degli esperimenti di incorporazione di BrdU correlano con l'assenza di una nicchia per le cellule AFKL che flottano nel liquido amniotico: infatti mentre le cellule del fegato fetale e dell'amnion sono in una fase di rapida divisione cellulare (attorno al giorno 12,5 dpc le HSC del fegato fetale sono in intensa fase di espansione e l'amnion sta crescendo seguendo le dimensioni crescenti del feto), sembra che le cellule AFKL non proliferino o proliferino molto lentamente. Sebbene molti mitogeni, fattori di crescita, citochine e segnali di proliferazione siano molto abbondanti nel liquido amniotico (Bartha et al., 2000), questi non

sono concentrati in zone precise, ma diffuse in tutto l'ambiente liquido; questo potrebbe portare alla quiescenza delle cellule AFKL, una condizione che le accomuna a quasi tutte le cellule staminali residenti nei tessuti adulti. Mentre flottano nel liquido, i gradienti di segnali incontrati dalle cellule AFKL cambia molto rapidamente, impedendo l'insaurirsi di un programma di proliferazione o di differenziamento. Sarebbe notevolmente importante determinare le dinamiche dei segnali incontrate dalle cellule AFKL, in modo da cercare di riprodurle all'interno del bioreattore. Per esempio, è noto che la citochina SCF sia una delle proteine maggiormente presente nel liquido amniotico umano (Bartha et al., 2000): questo fattore era noto in passato anche con il nome di mast cell factor, dato che gioca un ruolo chiave per la crescita dei mastociti (Galli et al., 1993); Le cellule AFKL sono responsive a questo fattore dato che esprimono cKit, il recettore dello SCF. Ma la semplice aggiunta di SCF al terreno di coltura risulta in una massiva espansione dei mastociti, senza alcun effetto sulle AFKL (dati non riportati)

Con tutti gli esperimenti descritti sin qui abbiamo dimostrato che le cellule AFKL e AmKL hanno un grande potenziale ematopoietico paragonabile a quello delle cellule FLKL, le HSC fetali meglio conosciute.

Mentre gli esperimenti in vitro mostrano un'ottima capacità differenziativa in senso ematopoietico, il trapianto di cellule KL murine in topi immunodeficienti irradiati ha come risultato un effettivo attecchimento ed una differenziazione completa in tutti i lignaggi ematopoietici, ma con un chimerismo molto ridotto, senza alcuna differenza rispetto alla fonte di isolamento delle cellule KL iniettate. Come già riportato in letteratura. anche per altri precursori ematopoietici, come quelli isolati dalla regione AGM, era stata riportata inizialmente una

mancanza di attività ricostituiva dell'ematopoiesi a lungo termine quando venivano trapiantati in riceventi adulti irradiati (Cumano et al., 1996). Una possibile spiegazione a questo fallimento può venire dal basso livello di espressione del MHC di classe I da parte delle cellule embrionali e fetali (Jaffe et al., 1991; Ozato et al., 1985) che le rende suscettibili all'eliminazione effettuata dalle cellule NK del ricevente resistenti alla radiazione. Quindi l'attecchimento di questi progenitori ematopoietici è stato osservato solo dopo trapianto in un altro modello murino, più appropriato, il modello Recombination-Activating Gene 2 (RAG2)  $-/-$  common cytokine receptor c-chain ( $\gamma_c$ )  $-/-$ , che sono deficienti per ogni cellula linfoide, comprese le cellule NK (Colucci et al., 1999).

Trapianti di cellule KL murine in questo modello animale sono in corso e contiamo di migliorare sensibilmente i risultati di attecchimento e di chimerismo, e con essi anche i risultati ottenuti nei trapianti secondari.

Cellule AFKL attecchite in un primo ricevente sono in grado di ricostituire il sistema ematopoietico come dimostra la robusta mielopoiesi osservata 11 settimane dopo il trapianto. Dato che i granulociti sopravvivono alcuni giorni e devono essere sempre prodotti dal midollo osseo, difficilmente le cellule Gr1+ Mac1+ derivanti dal donatore trovate nel midollo osseo sono cellule già differenziate nel ricevente primario e trapiantate nel ricevente secondario dove hanno attecchito e sopravvissuto un tempo così lungo, anche se questa possibilità non può essere esclusa con certezza. Invece i linfociti presenti nella milza del ricevente secondario sono molto probabilmente derivati da precursori linfoidei già differenziati nel ricevente primario e trapiantati in quello secondario dove sono migrati nella milza, dato che non è stata osservata alcuna colonizzazione del timo e dei linfonodi e non è stata riscontrata alcuna linfoiesi attiva.

Il numero di cellule iniettate nei riceventi secondari è di gran lunga minore rispetto a quello che è normalmente utilizzato a questo scopo, e questo può aver negativamente influenzato il risultato in termini di chimerismo e migrazione. Con una maggior quantità di cellule e con il modello animale privato delle cellule NK descritto in precedenza, siamo ottimisti di poter migliorare questi risultati.

Abbiamo utilizzato la metodica della multiplex PCR su singola cellula per analizzare l'espressione di 19 geni che sono stati scelti perché noti essere coinvolti nello sviluppo ematopoietico, sia nelle fasi precoci che in quelle di commissionamento del differenziamento verso i differenti lignaggi ematopoietici. Abbiamo potuto individuare nelle cellule AFKL murine un profilo generale di espressione di alcuni dei geni presi in considerazione che è risultato essere molto simile a quello espresso dalle cellule FLKL, che abbiamo considerato come un'impronta del commissionamento ematopoietico. Abbiamo considerato la presenza dei geni E2A, Gata1, Aml1, Lmo2, Fog1 tutti implicati nell'innescamento dell'ematopoiesi e l'assenza dei geni GMCSFR, IL7R $\alpha$  e Pax5, la cui espressione correla con l'indirizzamento del differenziamento in senso mieloide, linfoide T e B, come una marcatura genica di multipotenza ematopoietica.

Il gruppo della Dr. Cumano ha dimostrato che la coespressione dei geni Gata2 e LMO2 correla con il potenziale LTR (Bertrand et al., 2005). Tra le cellule KL isolate a partire dalle tre differenti fonti, abbiamo potuto osservare una buona proporzione di cellule Gata2<sup>+</sup> LMO2<sup>+</sup> che nella stragrande maggioranza dei casi sono anche Gata1<sup>+</sup>, un altro fattore chiave per la regolazione dell'ematopoiesi.

Per studiare se vi è un qualche legame tra le cellule AFS e le cellule AFKL e AmKL abbiamo usato lo stesso approccio di Multiplex PCR utilizzato

per l'identificazione della marcatura genica della multipotenza ematopoietica. Per mezzo della Multiplex PCR a livello di singola cellula, abbiamo cercato tra le cellule KL murine cellule che coesprimessero Oct4 e Aml1 per i motivi di cui sopra (cfr. sezione Risultati). Ad oggi non siamo riusciti ad identificarle, ma abbiamo potuto osservare come cellule Oct4+ sono presenti tra le cellule AFKL seppure in piccole quantità, esse sembrano essere ancor meno frequenti se non del tutto assenti tra le cellule AmKL e FLKL. Questo correla fortemente con quanto indicato in letteratura, dove piccoli ammassi ectopici di cellule Oct4+ e Fosfatasi alcalina (Alcaline Phosphatase, AP)+ sono stati riportati solo nell'amnion di topi mutati (Bosman et al., 2006). Ma non è possibile escludere la possibilità di cellule Oct4+ isolate nell'amnion e nel fegato fetale.

Stiamo tuttora cercando una possibile origine per le cellule AFKL e possibilmente per le cellule AFS. Noi abbiamo supportato l'ipotesi della presenza di cellule con un forte potenziale ematopoietico nell'amnion, e tenendo in considerazione anche le recenti pubblicazioni che indicano l'esistenza di cellule multipotenti (Ilancheran et al., 2007; Marcus et al., 2007; Miki et al., 2005; Miki et al., 2007; Miki and Strom, 2006) possiamo concludere l'amnion può effettivamente rappresentare un fonte importante di cellule con capacità rigenerativa. Tuttavia né noi con i nostri esperimenti né le pubblicazioni sovraccitate hanno dimostrato il carattere staminale di cellule presenti nell'amnion in maniera clonale: per ora possiamo solo concludere che in mezzo ad altre cellule nell'amnion vi sono anche dei progenitori.

Ciononostante, anche alla luce dei nostri risultati, possiamo fare alcune ipotesi sull'origine delle cellule AFKL/AFS.

Abbiamo già discusso in precedenza come in embrioni murini, le cellule del mesoderma extraembrionale che parteciperanno al sacco vitellino viscerale, al corion, all'allantoide ed all'amion sono tra le prime cellule mesodermiche che emergono durante la gastrulazione. Studi condotti nel decennio scorso in cui le cellule embrionali sono state marcate e seguito per capire la specificazione del loro destino secondo la loro posizione iniziale (fate-mapping) hanno evidenziato come una popolazione di cellule dell'epiblasto posteriore e postero-laterale che entra nella striscia primitiva in posizione prossimale dà successivamente origine alle cellule del mesoderma extraembrionale ed alle PGC (Kinder et al., 1999; Lawson and Hage, 1994; Parameswaran and Tam, 1995). Studi su marcatori genetici e colture ex vivo di epiblasto hanno dimostrato che la competenza germinale e la formazione dell'allantoide sono indotte nell'epiblasto prossimale poco prima dell'inizio della gastrulazione in risposta alle Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) prodotti e secreti dall'ectoderma extraembrionale, ma sono strettamente dipendenti dalla presenza dell'endoderma viscerale (de Sousa Lopes et al., 2004; Zhao, 2003).

E' stato dimostrato che *Blimp1*, un fattore di trascrizione regolativo indotto da BMP4, è un regolatore chiave della specificazione delle cellule germinali (Ohinata et al., 2005; Vincent et al., 2005) e dell'ematopoiesi (Nutt et al., 2007). Anche la susseguente localizzazione e sopravvivenza delle PGC, così come la differenziazione dell'allantoide, dipendono dalla presenza di BMP4 nel mesoderma extraembrionale (Fujiwara et al., 2001).

Possiamo quindi immaginare un modello in cui BMP4 guidi la specificazione del mesoderma extraembrionale proveniente dall'epiblasto, e che quindi contiene cellule pluripotenti (Brons et al., 2007), verso un precursore comune di allantoide, amnion e PGC, il cui sviluppo è molto

ravvicinato dal punto di vista spazio-temporale. A questo stadio, le cellule sono ancora multipotenti. La fase successiva prevede il commissionamento ulteriore verso l'allantoide, quindi con potenziale ematopoietico, verso le PGC, dalle quali vengono derivate cellule EG e che quindi mantengono la pluripotenza (Matsui et al., 1992), ed infine verso le cellule della membrana amniotica: una parte di quest'ultime potrebbe mantenere un'impronta genetica del carattere staminale, pluripotente e/o ematopoietico. Durante la crescita dell'amnion alcune cellule potrebbero "cadere" nel liquido amniotico, così come con i suoi movimenti il feto potrebbe desquamare cellule dalla membrana circostante. Questo potrebbe spiegare la presenza di progenitori ematopoietici nel liquido amniotico.

Inoltre, la migrazione delle PGC non è un processo del tipo "tutto-o-nulla" (Hayashi et al., 2007), e quindi alcune PGC potrebbero evitare la migrazione verso le creste genitali cadendo anch'esse nel liquido amniotico, o rimanere nella zona di confine tra amnion ed allantoide: questo spiegherebbe la potenzialità staminale multipotente delle cellule AFS, la cui frequenza sembra essere minore rispetto alle cellule AFKL con proprietà ematopoietiche.

Le cellule AFS e PGC hanno alcune caratteristiche in comune: la loro attività telomerasica è non è molto elevata, nonostante la lunghezza del telomero rimanga costante nonostante le divisioni cellulari (De Coppi et al., 2007; Hemann et al., 2001) e teratomi derivati dall'inieazione di cellule EG non sono ancora stati osservati (Thomson and Odorico, 2000). Per poter dimostrare con chiarezza la filiazione diretta delle cellule AFS dalle PGC stiamo conducendo delle analisi su geni specifici della linea germinale come *Blimp1*, *Stella*, *Vasa* and *fragilis* (Hayashi et al., 2007). Tuttavia, l'unica risposta univocamente soddisfacente potrebbe venire

solo da un modello animale, in cui un gene reporter come la GFP viene inserita nel genoma animale con una cassetta inibente la sua espressione che è fiancheggiata da due siti LoxP, riconosciuti dalla Cre-recombinase altro transgene inserito nel genoma animale sotto il controllo di un promotore di un gene specifico della linea germinale. Quando questo specifico gene viene attivato è attivata anche la Cre-ricombinasi, e questa taglierà via la cassetta inibente l'espressione del gene reporter che da quel momento in avanti marcherà la cellula in cui è espressa per tutta la vita. Così sarebbe possibile individuare eventuali cellule AFS o AFKL derivanti dalla linea germinale.

## BIBLIOGRAFIA

- Almeida-Porada, G., Porada, C., and Zanjani, E. D. (2001). Adult stem cell plasticity and methods of detection. *Rev Clin Exp Hematol* 5, 26-41.
- Alvarez-Silva, M., Belo-Diabangouaya, P., Salaun, J., and Dieterlen-Lievre, F. (2003). Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* 130, 5437-5444.
- Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L., and Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50, 1691-1697.
- Bartha, J. L., Romero-Carmona, R., Comino-Delgado, R., Arce, F., and Arrabal, J. (2000). Alpha-fetoprotein and hematopoietic growth factors in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 96, 588-592.
- Baschat, A. A., and Hecher, K. (2004). Fetal growth restriction due to placental disease. *Semin Perinatol* 28, 67-80.
- Bertrand, J. Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., and Cumano, A. (2005). Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 134-139.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2006). Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Methods Enzymol* 419, 337-383.
- Bosman, E. A., Lawson, K. A., Debruyne, J., Beek, L., Francis, A., Schoonjans, L., Huylebroeck, D., and Zwijsen, A. (2006). Smad5 determines murine amnion fate through the control of bone morphogenetic protein expression and signalling levels. *Development* 133, 3399-3409.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A., and Vallier, L. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191-195.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Dunham, M. A., and Reddel, R. R. (1998). Telomere length dynamics in telomerase-positive immortal human cell populations. *Exp Cell Res* 239, 370-378.
- Cabrita, G. J., Ferreira, B. S., da Silva, C. L., Goncalves, R., Almeida-Porada, G., and Cabral, J. M. (2003). Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. *Trends Biotechnol* 21, 233-240.
- Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I., and Fisk, N. M. (2001). Identification of

- mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-2402.
- Caprioli, A., Jaffredo, T., Gautier, R., Dubourg, C., and Dieterlen-Lievre, F. (1998). Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1641-1646.
  - Caprioli, A., Minko, K., Drevon, C., Eichmann, A., Dieterlen-Lievre, F., and Jaffredo, T. (2001). Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects. *Dev Biol* 238, 64-78.
  - Chambers, I., and Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23, 7150-7160.
  - Check, E. (2007). Stem cells: the hard copy. *Nature* 446, 485-486.
  - Christensen, J. L., Wright, D. E., Wagers, A. J., and Weissman, I. L. (2004). Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* 2, E75.
  - Christopherson, K. W., 2nd, Hangoc, G., Mantel, C. R., and Broxmeyer, H. E. (2004). Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* 305, 1000-1003.
  - Colucci, F., Soudais, C., Rosmaraki, E., Vanes, L., Tybulewicz, V. L., and Di Santo, J. P. (1999). Dissecting NK cell development using a novel alymphoid mouse model: investigating the role of the c-abl proto-oncogene in murine NK cell differentiation. *J Immunol* 162, 2761-2765.
  - Coulombel, L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23, 7210-7222.
  - Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.
  - Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 25, 745-785.
  - D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Menei, P., Roos, B. A., and Schiller, P. C. (2004). Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117, 2971-2981.
  - Dancis, J., Jansen, V., Brown, G. F., Gorstein, F., and Balis, M. E. (1977). Treatment of hypoplastic anemia in mice with placental transplants. *Blood* 50, 663-670.
  - Dancis, J., Jansen, V., Gorstein, F., and Douglas, G. W. (1968). Hematopoietic cells in mouse placenta. *Am J Obstet Gynecol* 100, 1110-1121.
  - Dang, S. M., Gerecht-Nir, S., Chen, J., Itskovitz-Eldor, J., and Zandstra, P. W. (2004). Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells* 22, 275-282.

- Dang, S. M., Kyba, M., Perlingeiro, R., Daley, G. Q., and Zandstra, P. W. (2002). Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng* 78, 442-453.
- De Coppi, P., Bartsch, G., Jr., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A. C., Snyder, E. Y., Yoo, J. J., *et al.* (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 25, 100-106.
- de Sousa Lopes, S. M., Roelen, B. A., Monteiro, R. M., Emmens, R., Lin, H. Y., Li, E., Lawson, K. A., and Mummery, C. L. (2004). BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 18, 1838-1849.
- Deans, R. J., and Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28, 875-884.
- Delassus, S., and Cumano, A. (1996). Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity* 4, 97-106.
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576-578.
- Dorrell, C., and Grompe, M. (2005). Liver repair by intra- and extrahepatic progenitors. *Stem Cell Rev* 1, 61-64.
- Downs, K. M., and Harmann, C. (1997). Developmental potency of the murine allantois. *Development* 124, 2769-2780.
- Downs, K.A. (2001). Mouse Early Development: Molecular Basis. *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley and Sons
- Draper, J. S., Pigott, C., Thomson, J. A., and Andrews, P. W. (2002). Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat* 200, 249-258.
- Eiges, R., and Benvenisty, N. (2002). A molecular view on pluripotent stem cells. *FEBS Lett* 529, 135-141.
- Ema, H., Morita, Y., Yamazaki, S., Matsubara, A., Seita, J., Tadokoro, Y., Kondo, H., Takano, H., and Nakauchi, H. (2006). Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat Protoc* 1, 2979-2987.
- Engels, W. R. (1993). Contributing software to the internet: the Amplify program. *Trends Biochem Sci* 18, 448-450.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.

- Fleming, H. E., and Scadden, D. T. (2006). Embryonic stem cells make human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12213-12214.
- Fontaine-Perus, J. C., Calman, F. M., Kaplan, C., and Le Douarin, N. M. (1981). Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro. *J Immunol* 126, 2310-2316.
- Fujikawa, T., Oh, S. H., Pi, L., Hatch, H. M., Shupe, T., and Petersen, B. E. (2005). Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am J Pathol* 166, 1781-1791.
- Fujiwara, T., Dunn, N. R., and Hogan, B. L. (2001). Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13739-13744.
- Galic, Z., Kitchen, S. G., Kacena, A., Subramanian, A., Burke, B., Cortado, R., and Zack, J. A. (2006). T lineage differentiation from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11742-11747.
- Galli, S. J., Tsai, M., and Wershil, B. K. (1993). The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am J Pathol* 142, 965-974.
- Gambardella, L., and Barrandon, Y. (2003). The multifaceted adult epidermal stem cell. *Curr Opin Cell Biol* 15, 771-777.
- Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W., and Perlingeiro, R. C. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109, 1743-1751.
- Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S. H., and Mikkola, H. K. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8, 365-375.
- Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2, 162-174.
- Gerecht-Nir, S., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Human embryonic stem cells: a potential source for cellular therapy. *Am J Transplant* 4 *Suppl* 6, 51-57.
- Godin, I., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1995). Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 773-777.
- Godin, I., Garcia-Porrero, J. A., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1999). Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* 190, 43-52.
- Godin, I. E., Garcia-Porrero, J. A., Coutinho, A., Dieterlen-Lievre, F., and Marcos, M. A. (1993). Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364, 67-70.

- Green, H., Easley, K., and Iuchi, S. (2003). Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15625-15630.
- Greiner, D. L., Hesselton, R. A., and Shultz, L. D. (1998). SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 16, 166-177.
- Guo, C. B., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L. M., and Bochner, B. S. (1992). Immunophenotyping and functional analysis of purified human uterine mast cells. *Blood* 79, 708-712.
- Hanks, G. E., Cassell, M., Ray, R. N., and Chaplin, H., Jr. (1960). Further modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma; definition of a new range of normal values. *J Lab Clin Med* 56, 486-498.
- Hayashi, K., de Sousa Lopes, S. M., and Surani, M. A. (2007). Germ cell specification in mice. *Science* 316, 394-396.
- He, J. Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J. A., and Kamp, T. J. (2003). Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93, 32-39.
- Hemann, M. T., Rudolph, K. L., Strong, M. A., DePinho, R. A., Chin, L., and Greider, C. W. (2001). Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Mol Biol Cell* 12, 2023-2030.
- Hoehn, H., Bryant, E. M., Fantel, A. G., and Martin, G. M. (1975). Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. III. The fetal urine as a potential source of clonable cells. *Humangenetik* 29, 285-290.
- Holmes, C., and Stanford, W. L. (2007). Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells* 25, 1339-1347.
- Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L., and Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8932-8937.
- Houssaint, E. (1981). Differentiation of the mouse hepatic primordium. II. Extrinsic origin of the haemopoietic cell line. *Cell Differ* 10, 243-252.
- Ilancheran, S., Michalska, A., Peh, G., Wallace, E. M., Pera, M., and Manuelpillai, U. (2007). Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 77, 577-588.
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H., Willemze, R., Fibbe, W. E., and Kanhai, H. H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548-1549.

- Jaffe, L., Robertson, E. J., and Bikoff, E. K. (1991). Distinct patterns of expression of MHC class I and beta 2-microglobulin transcripts at early stages of mouse development. *J Immunol* 147, 2740-2749.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., and Verfaillie, C. M. (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30, 896-904.
- Kamel-Reid, S., and Dick, J. E. (1988). Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242, 1706-1709.
- Kaviani, A., Perry, T. E., Dzakovic, A., Jennings, R. W., Ziegler, M. M., and Fauza, D. O. (2001). The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg* 36, 1662-1665.
- Kehat, I., Amit, M., Gepstein, A., Huber, I., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2003). Development of cardiomyocytes from human ES cells. *Methods Enzymol* 365, 461-473.
- Kehat, I., Gepstein, A., Spira, A., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2002). High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ Res* 91, 659-661.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T., and Wiles, M. V. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 13, 473-486.
- Kennedy, M., D'Souza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., and Keller, G. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 109, 2679-2687.
- Kinder, S. J., Tsang, T. E., Quinlan, G. A., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A., and Tam, P. P. (1999). The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* 126, 4691-4701.
- Koc, O. N., Gerson, S. L., Cooper, B. W., Dyhouse, S. M., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., and Lazarus, H. M. (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* 18, 307-316.
- Kodama, H., Nose, M., Niida, S., Nishikawa, S., and Nishikawa, S. (1994). Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol* 22, 979-984.
- Lawson, K. A., and Hage, W. J. (1994). Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182, 68-84; discussion 84-91.

- Lawson, K. A., Meneses, J. J., and Pedersen, R. A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113, 891-911.
- Levenberg, S., Golub, J. S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., and Langer, R. (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4391-4396.
- Li, L., Arman, E., Ekblom, P., Edgar, D., Murray, P., and Lonai, P. (2004). Distinct GATA6- and laminin-dependent mechanisms regulate endodermal and ectodermal embryonic stem cell fates. *Development* 131, 5277-5286.
- Lindvall, O. (2003). Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res* 47, 279-287.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., and Martinez-Serrano, A. (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 *Suppl*, S42-50.
- Liu, C. P., and Auerbach, R. (1991). In vitro development of murine T cells from prethymic and preliver embryonic yolk sac hematopoietic stem cells. *Development* 113, 1315-1323.
- Maes, J., Chappaz, S., Cavelier, P., O'Neill, L., Turner, B., Rougeon, F., and Goodhardt, M. (2006). Activation of V(D)J recombination at the IgH chain JH locus occurs within a 6-kilobase chromatin domain and is associated with nucleosomal remodeling. *J Immunol* 176, 5409-5417.
- Maes, J., O'Neill, L. P., Cavelier, P., Turner, B. M., Rougeon, F., and Goodhardt, M. (2001). Chromatin remodeling at the Ig loci prior to V(D)J recombination. *J Immunol* 167, 866-874.
- Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K., and Weissman, I. L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11872-11877.
- Marcus, A. J., Coyne, T. M., Rauch, J., Woodbury, D., and Black, I. B. (2007). Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.
- Medina-Gomez, P., and del Valle, M. (1988). [The culture of amniotic fluid cells. An analysis of the colonies, metaphase and mitotic index for the purpose of ruling out maternal cell contamination]. *Ginecol Obstet Mex* 56, 122-126.
- Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-67.
- Melchers, F. (1979). Murine embryonic B lymphocyte development in the placenta. *Nature* 277, 219-221.

- Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2000). Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol* 18, 367-391.
- Metcalf, D. (1970). Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II. Action of colony stimulating factor. *J Cell Physiol* 76, 89-99.
- Metcalf, D. and Moore, M. A. S (1971). in *Haematopoietic Cells*, eds Neuberger, A. & Tatum, E. L, pp 173–271. Amsterdam: North Holland Publishing
- Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B., and Strom, S. C. (2005). Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 23, 1549-1559.
- Miki, T., Mitamura, K., Ross, M. A., Stolz, D. B., and Strom, S. C. (2007). Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol* 75, 91-96.
- Miki, T., and Strom, S. C. (2006). Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2, 133-142.
- Mimeault, M., Hauke, R., and Batra, S. K. (2007). Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 82, 252-264.
- Mintz, B., and Illmensee, K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3585-3589.
- Moore, M. A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279-296.
- Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993). ES cells have only a limited lymphopoietic potential after adoptive transfer into mouse recipients. *Development* 118, 1343-1351.
- Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.
- Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Brink, S., Hassink, R., van der Heyden, M., Opthof, T., Pera, M., de la Riviere, A. B., *et al.* (2003). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107, 2733-2740.
- Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-1101.
- Ng, E. S., Davis, R. P., Azzola, L., Stanley, E. G., and Elefanty, A. G. (2005). Forced aggregation of defined numbers of human

- embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* 106, 1601-1603.
- Nielsen, L. K. (1999). Bioreactors for hematopoietic cell culture. *Annu Rev Biomed Eng* 1, 129-152.
  - Nussbaum, J., Minami, E., Laflamme, M. A., Virag, J. A., Ware, C. B., Masino, A., Muskheli, V., Pabon, L., Reinecke, H., and Murry, C. E. (2007). Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *Faseb J* 21, 1345-1357.
  - Nutt, S. L., Fairfax, K. A., and Kallies, A. (2007). BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 923-927.
  - O'Donoghue, K., and Fisk, N. M. (2004). Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18, 853-875.
  - Odorico, J. S., Kaufman, D. S., and Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19, 193-204.
  - Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., *et al.* (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436, 207-213.
  - Olsen, B. R., Reginato, A. M., and Wang, W. (2000). Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 191-220.
  - Orkin, S. H., and Zon, L. I. (2002). Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 3, 323-328.
  - Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.
  - Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2005). The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8, 377-387.
  - Ozato, K., Wan, Y. J., and Orrison, B. M. (1985). Mouse major histocompatibility class I gene expression begins at midsomite stage and is inducible in earlier-stage embryos by interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2427-2431.
  - Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073-5084.
  - Parameswaran, M., and Tam, P. P. (1995). Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation. *Dev Genet* 17, 16-28.
  - Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., and Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-146.

- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Buhring, H. J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., *et al.* (2007). CONCISE REVIEW: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*.
- Peixoto, A., Monteiro, M., Rocha, B., and Veiga-Fernandes, H. (2004). Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome Res* 14, 1938-1947.
- Peranteau, W. H., Endo, M., Adibe, O. O., Merchant, A., Zoltick, P. W., and Flake, A. W. (2006). CD26 inhibition enhances allogeneic donor-cell homing and engraftment after in utero hematopoietic-cell transplantation. *Blood* 108, 4268-4274.
- Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., and Guillemain, G. (2000). Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18, 959-963.
- Phinney, D. G., and Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25, 2896-2902.
- Potocnik, A. J., Kohler, H., and Eichmann, K. (1997). Hematolymphoid in vivo reconstitution potential of subpopulations derived from in vitro differentiated embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10295-10300.
- Prusa, A. R., and Hengstschlager, M. (2002). Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit* 8, RA253-257.
- Prusa, A. R., Marton, E., Rosner, M., Bernaschek, G., and Hengstschlager, M. (2003). Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod* 18, 1489-1493.
- Queenan, J. T., Thompson, W., Whitfield, C. R., and Shah, S. I. (1972). Amniotic fluid volumes in normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 114, 34-38.
- Rathjen, J., Lake, J. A., Bettess, M. D., Washington, J. M., Chapman, G., and Rathjen, P. D. (1999). Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. *J Cell Sci* 112 ( Pt 5), 601-612.
- Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L., and Donovan, P. J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550-551.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.

- Robinson, W. P., McFadden, D. E., Barrett, I. J., Kuchinka, B., Penaherrera, M. S., Bruyere, H., Best, R. G., Pedreira, D. A., Langlois, S., and Kalousek, D. K. (2002). Origin of amnion and implications for evaluation of the fetal genotype in cases of mosaicism. *Prenat Diagn* 22, 1076-1085.
- Schenke-Layland, K., Angelis, E., Rhodes, K. E., Heydarkhan-Hagvall, S., Mikkola, H. K., and Maclellan, W. R. (2007). Collagen IV induces trophoectoderm differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 1529-1538.
- Schmitt, T. M., de Pooter, R. F., Gronski, M. A., Cho, S. K., Ohashi, P. S., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2004). Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nat Immunol* 5, 410-417.
- Schuldiner, M., Eiges, R., Eden, A., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Goldstein, R. S., and Benvenisty, N. (2001). Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 913, 201-205.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11307-11312.
- Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N. M., Fogaca, L. L., Cerqueira, A., Carvalho, M. D., Jazedje, T., Okamoto, O. K., Muotri, A. R., and Zatz, M. (2007). Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord is Richer than Blood! *Stem Cells*.
- Serafini, M., Dylla, S. J., Oki, M., Heremans, Y., Tolar, J., Jiang, Y., Buckley, S. M., Pelacho, B., Burns, T. C., Frommer, S., *et al.* (2007). Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 204, 129-139.
- Shambloott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., and Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13726-13731.
- Shambloott, M. J., and Clark, G. O. (2004). Cell therapies for type 1 diabetes mellitus. *Expert Opin Biol Ther* 4, 269-277.
- Six, E. M., Bonhomme, D., Monteiro, M., Beldjord, K., Jurkowska, M., Cordier-Garcia, C., Garrigue, A., Dal Cortivo, L., Rocha, B., Fischer, A., *et al.* (2007). A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. *J Exp Med* 204, 3085-3093.
- Spangrude, G. J. (2003). When is a stem cell really a stem cell? *Bone Marrow Transplant* 32 *Suppl 1*, S7-11.

- Steptoe, P. C., and Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2, 366.
- Stevens, L. C. (1958). Studies on transplantable testicular teratomas of strain 129 mice. *J Natl Cancer Inst* 20, 1257-1275.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Taswell, C. (1981). Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *J Immunol* 126, 1614-1619.
- Theise, N. D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P. B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., and Krause, D. S. (2000). Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32, 11-16.
- Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thomson, J. A., and Odorico, J. S. (2000). Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* 18, 53-57.
- Till, J. E., and Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J., and Hwang, S. M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 19, 1450-1456.
- Verfaillie, C. M. (2002). Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol* 3, 314-317.
- Verfaillie, C. M., Pera, M. F., and Lansdorp, P. M. (2002). Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 369-391.
- Vincent, S. D., Dunn, N. R., Sciammas, R., Shapiro-Shalef, M., Davis, M. M., Calame, K., Bikoff, E. K., and Robertson, E. J. (2005). The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development* 132, 1315-1325.
- Wagers, A. J., Sherwood, R. I., Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259.
- Wang, L., Menendez, P., Shojaei, F., Li, L., Mazurier, F., Dick, J. E., Cerdan, C., Levac, K., and Bhatia, M. (2005). Generation of

- hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med* 201, 1603-1614.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897-901.
  - Weissman I., Papaioannou V., Gardner R. (1978). Fetal hematopoietic origins of the adult hemolymphoid system. In *Differentiation of Normal and Neoplastic Cells*, ed. B Clarkson, P Mark, J Till, pp. 33–47. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press
  - Wild A. E., and Fleming T. P. (2001). Cleavage and Gastrulation in Mouse Embryos. *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley and Sons
  - Wu, X., and Burgess, S. M. (2004). Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cell Mol Life Sci* 61, 2588-2596.
  - Xu, C., Police, S., Rao, N., and Carpenter, M. K. (2002). Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91, 501-508.
  - Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
  - Zeigler, B. M., Sugiyama, D., Chen, M., Guo, Y., Downs, K. M., and Speck, N. A. (2006). The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential. *Development* 133, 4183-4192.
  - Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., and Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1129-1133.
  - Zhao, G. Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35, 43-56.