



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Dottorato di Ricerca in Immunologia

XXI Ciclo

**CELLULE STAMINALI: STUDIO DI BASE,
ESPANSIONE ED APPLICAZIONI IN
INGEGNERIA TISSUTALE**

Dottoranda: Dott.ssa Cristina Rofani

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Dott.ssa Anna C. Berardi

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

ABSTRACT

Le cellule staminali sono molto rare e per questo il loro impiego in campo clinico è problematico. L'utilizzo del cordone ombelicale, che risolverebbe il problema del donatore, ha purtroppo un'applicazione limitata a causa proprio del numero insufficiente di cellule staminali. Per questo motivo è di fondamentale importanza lo sviluppo di un sistema per l'espansione delle cellule staminali. Nello stesso tempo, per l'applicazione delle cellule staminali in ingegneria tissutale (ad esempio per la riparazione del tessuto osseo) risulta indispensabile l'individuazione di uno scaffold idoneo a tale scopo. Per questo motivo, da un lato è stato studiato un sistema per l'espansione delle cellule staminali emopoietiche di cordone ombelicale, dall'altro è stato fatto uno screening di scaffold diversi per l'applicazione in ingegneria del tessuto osseo.

In un precedente studio è stato dimostrato che l'interleuchina (IL)-16 è capace di indurre le cellule CD34⁺ a proliferare e differenziare in cellule dendritiche mature. In questo lavoro, è stato investigato il ruolo dell'IL-16 nell'espansione delle cellule CD34⁺ isolate da sangue di cordone ombelicale. E' stato osservato che l'IL-16 aggiunta al

cocktail di base costituito da *stem cell factor* (SCF), *Flt-3 ligand* (FL), *thrombopoietin* (TPO), IL-6 e IL-3, aumenta significativamente il numero delle cellule CD34⁺, della popolazione più primitiva CD34⁺CD38⁻, dei progenitori emopoietici e delle LTC-IC (long-term-culture-initiating-cells), non alterando la capacità delle cellule CD34⁺ di differenziare in linfociti-B e cellule natural killer (NK). L'aggiunta dell'IL-16 aumenta l'attività migratoria delle cellule CD34⁺ espanse e diminuisce la percentuale delle cellule CD34⁺CD4⁺. Questi risultati sembrano suggerire che l'IL-16 possa avere un ruolo importante nell'espansione delle cellule staminali emopoietiche e possa essere utilizzata in clinica per l'espansione delle cellule CD34⁺ (**Articolo I**).

Scaffold diversi di policaprolattone (PCL) sono stati analizzati al fine di individuare un nuovo biomateriale in grado di promuovere il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali di coniglio in osteoblasti. I risultati ottenuti dimostrano che lo scaffold PCL/TZ-HA, ottenuto mescolando PCL e proteina termoplastica zeina, sembra favorire l'adesione ed il differenziamento osteogenico, dimostrando un ottimo potenziale applicativo nell'ingegneria del tessuto osseo (**Articolo II**).

Recentemente è stato sviluppato un nuovo modello dello sviluppo tumorale basato sulle cellule staminali tumorali. Con l'introduzione di tale ipotesi si è fatta avanti la necessità di individuare nuovi marcatori molecolari e sviluppare nuove terapie. Studi precedenti hanno dimostrato che l'aumento dell'espressione dei recettori Eph e dei loro ligandi ephrin è in vari casi collegato con fenomeni di progressione tumorale ed angiogenesi. In questo lavoro, è stata valutata l'espressione dei ligandi ephrin-B1-B2 e dei recettori EphB1-B4 in linee cellulari di rhabdomyosarcomi e tumori primari. I risultati ottenuti evidenziano deregolazione sia dei ligandi sia dei recettori nelle linee cellulari, mentre un generale aumento dell'espressione delle proteine analizzate è stato registrato nei tumori primari. E' stata inoltre dimostrata anche una correlazione tra l'espressione di EphB2 ed EphB4 in entrambi i tipi tumorali. La generale deregolazione dell'espressione genica e le correlazioni registrate tra ligandi e recettori e tra EphB2 e EphB4 suggeriscono un ruolo di ephrin-B e EphB nello sviluppo dei RMS (**Articolo III**).

INDICE

LISTA DELLE PUBBLICAZIONI	1
LISTA ABBREVIAZIONI	2
INTRODUZIONE	4
1. La cellula staminale	4
2. Le cellule staminali adulte	7
3. Le cellule staminali emopoietiche	8
3.1. Isolamento e caratterizzazione delle cellule staminali emopoietiche	12
3.2. Sistemi di coltura di cellule staminali/progenitori emopoietici	14
3.3. Applicazioni cliniche e fonti delle cellule staminali emopoietiche	16
4. Cellule staminali emopoietiche da sangue di cordone ombelicale	18
4.1. Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo del cordone ombelicale	18
4.2. Espansione ex vivo delle cellule staminali emopoietiche da cordone ombelicale	19
4.3. Interleuchina-16	21
5. Le cellule staminali mesenchimali	22
5.1. Isolamento e caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali	24
5.2. Applicazioni delle cellule staminali mesenchimali	26
6. L'ingegneria tissutale	28
6.1. L'ingegneria del tessuto osseo	30

6.2. Composizione dello scaffold	32
7. Le cellule staminali tumorali	34
7.1. Rhabdomyosarcoma	37
7.2. Eph/ephrin	39
SCOPO DEL LAVORO	42
MATERIALI E METODI	44
Articolo I	44
• Preparazione delle cellule CD34 ⁺ da cordone ombelicale	44
• Espansione ex vivo delle cellule CD34 ⁺	45
• Analisi citofluorimetrica e sorting	45
• Analisi del rilascio dell'IL-16 da cellule CD34 ⁺	46
• Neutralizzazione dell'IL-16	47
• Sistema per la valutazione dei progenitori emopoietici (CFU-assay)	47
• LTC-IC	48
• Differenziamento in cellule B, NK e mieloidi in un unico sistema LTC	49
• Analisi della migrazione cellulare	49
• Analisi statistica	50
Articolo II	51
• Preparazione degli scaffold	51
• Caratterizzazione degli scaffold	51
• Isolamento e coltura delle cellule staminali mesenchimali di coniglio	52
• Preparazione dei costrutti cellule-scaffold	53
• Quantifica del DNA	54
• Analisi della fosfatasi alcalina	54
• Valutazione della mineralizzazione	55
• RT-PCR semiquantitativa	56

Articolo III	57
• Linee cellulari e tumori primari di Rbdomiosarcoma	57
• Estrazione di RNA e sintesi di cDNA	58
• Real-time PCR	58
• Analisi statistica	59
RISULTATI E DISCUSSIONE	60
Articolo I	60
• Espansione delle cellule CD34 ⁺ tramite IL-16	60
• Espressione del CD4	62
• Analisi dell'IL-16 endogena	62
• Ruolo dell'IL-16 nell'espansione delle cellule CD34 ⁺	64
• Analisi della capacità migratoria delle cellule CD34 ⁺ espanse	69
Articolo II	71
• Preparazione e caratterizzazione degli scaffold PCL, PCL-HA, PCL/TZ, PCL/TZ-HA	71
• Differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in osteoblasti	75
• Proliferazione e differenziamento delle CSM su scaffold	78
Articolo III	80
• Espressione di Eph/ephrin in linee cellulari di RMS	80
• Correlazione tra l'espressione dei ligandi ephrin-B e dei recettori EphB nei tumori di RMS	84
• Correlazione tra EphB2 ed EphB4 nei tumori di RMS	86
CONCLUSIONI	87
REFERENZE	89

RINGRAZIAMENTI

109

PUBBLICAZIONI

110

LISTA DELLE PUBBLICAZIONI

- I. **Rofani C**, Luchetti L, Testa G, Lasorella R, Isacchi G, Bottazzo GF, Berardi AC. IL-16 can synergize with early acting cytokine to expand *ex-vivo* CD34⁺ isolated from cord blood. *Stem Cells Dev.* 12 Nov 2008

- II. Salerno A, Oliviero M, Di Mario E, Iannace S, Pressato D, **Rofani C**, Colosimo A, Guida V, Dallapiccola B, Nataloni A, Procaccini E, Berardi AC, Velardi F. Novel multi-phase composite biomaterial to promote the osteogenic differentiation of bone marrow derived rabbit mesenchymal stem cells. *Sottomesso*

- III. Berardi AC, Marsilio S^{*}, **Rofani C**^{*}, Salvucci O, Altavista P, Perla FM, Diomedi-Camassei F, Uccini S, Kokai G, Landuzzi L, McDowell HP, Dominici C. Up-regulation of EphB and ephrin-B expression in rhabdomyosarcoma. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2A):763-9

*Gli autori hanno contribuito in ugual modo al lavoro

LISTA ABBREVIAZIONI

ALP	fosfatasi alcalina
ARMS	rabdomiosarcoma alveolare
ARS	alizarin Red S
BC	cocktail di base delle citochine
BFU-E	burst-forming unit-erythroid
CFU	unità formanti colonie (colony forming unit)
CFU-E	CFU-eritrocitarie
CFU-GEMM	o
CFU-Mix	CFU-granulocitiche-eritrocitarie-monocitarie-megacariocitiche
CFU-GM	CFU-granulocitiche-macrofagiche
CFU-MK	CFU-megacariocitiche
CO	cordone ombelicale
CS	cellula/e staminala/e
CSE	cellule staminali emopoietiche
CSM	cellule staminali mesenchimali
ERMS	rabdomiosarcoma embrionale
FL	Flt3-ligand
G-CSF	granulocytic-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocytic-macrophage-colony stimulating factor

HA	idrossiapatite
IL	interleuchina
LTC	colture a lungo termine
LTC-B-NK	LTC per differenziamento in senso mieloide e linfoide
LTC-IC	long-term culture-initiating cells
NSM	muscolo scheletrico normale
OB	osteoblasti
PCL	policaprolattone
PCL/TZ	scaffold di policaprolattone e zeina termoplastica
PCL/TZ-HA	scaffold di policaprolattone, zeina termoplastica ed idrossiapatite
PCL-HA	scaffold di policaprolattone ed idrossiapatite
RMS	rabdomiosarcoma
SCF	stem cell factor
SRC	SCID-repopulating cell
TPO	trombopoietina
TZ	zeina termoplastica

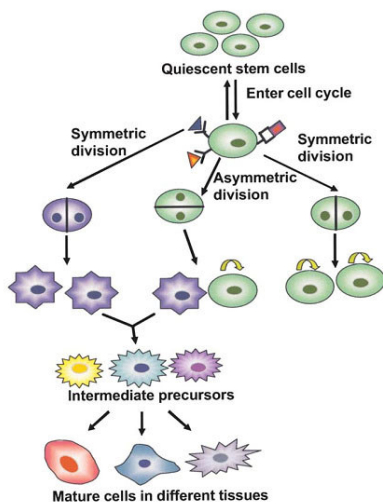
INTRODUZIONE

1. La cellula staminale

La cellula staminale (CS) è una cellula in grado di dividersi indefinite volte mantenendo invariate le proprie caratteristiche (auto-rinnovamento), a volte anche per tutta la vita dell'individuo. Sotto le opportune condizioni, la cellula staminale può differenziare in diversi tipi cellulari, dando così origine alle cellule mature e specializzate che costituiscono l'organismo [1].

Autorinnovamento e potenziale differenziativo rappresentano le caratteristiche essenziali delle cellule staminali ed il giusto equilibrio fra loro è fondamentale per l'individuo. A tal fine la CS è regolata attraverso meccanismi, che comprendono fattori esogeni ed interazioni cellula-cellula. Ruolo essenziale nella regolazione del comportamento della CS viene svolto dal microambiente che la circonda, la nicchia. Il concetto di nicchia fu introdotto nel 1978 [2], in riferimento al microambiente in cui si trovano le cellule staminali emopoietiche. La nicchia è fondamentale per il mantenimento della staminalità della cellula, ne controlla il differenziamento e l'apoptosi [3], ne preserva lo stato di quiescenza fino a

quando opportuni stimoli inducono la CS ad entrare in ciclo e dividersi. La divisione cellulare può avvenire in modo simmetrico, con formazione di due cellule figlie identiche fra loro, entrambe con proprietà di staminali o di cellule commissionate verso un particolare tipo cellulare, o asimmetrico, originando una cellula figlia che mantiene le caratteristiche di staminale mentre l'altra inizia il processo di differenziamento.



Cai J, Weiss ML, Rao MS. Exp Hematol 2004;32:585–598

Figura 1. Modello di divisione della cellula staminale

Questa capacità della cellula di dividersi in modo simmetrico o asimmetrico è strettamente collegata alle due proprietà fondamentali della cellula staminale (auto-rinnovamento e differenziamento) ed è pertanto fondamentale sia per l'ontogenesi dell'organismo che per l'omeostasi dei tessuti [4,5].

Le CS vengono classificate, in base al loro potenziale differenziativo, in totipotenti, pluripotenti, multipotenti o unipotenti. Le cellule staminali totipotenti (dal latino *totus*, che significa *intero*) sono in grado di differenziare in tutte le cellule che costituiscono l'embrione e le strutture accessorie che ne sostengono lo sviluppo. Sono definite pluripotenti (dal latino *plures*, che significa *molti*) le cellule in grado di differenziare in cellule appartenenti ai tre foglietti embrionali (mesoderma, ectoderma, endoderma). Le cellule staminali multipotenti sono in grado di differenziare in un numero limitato di cellule strettamente correlate fra di loro. Il termine unipotente (dal latino *unus*, che significa *uno*) viene utilizzato in riferimento ad una cellula staminale in grado di differenziare in un solo tipo cellulare.

CS embrionali sono state isolate dalla massa interna della blastocisti. Messe in coltura, possono dividersi indefinitamente mantenendo la loro capacità di autorinnovarsi. In base al loro

potenziale differenziativo, sono definite pluripotenti [6-8]. Le CS adulte, cellule rare presenti in diversi tessuti dell'individuo adulto (es. midollo osseo, sistema nervoso, pelle), hanno capacità differenziativa molto più ristretta.

2. Le cellule staminali adulte

Le CS adulte, come tutte le cellule staminali, hanno la capacità di autorinnovarsi e di originare cellule mature e specializzate. Il processo di differenziamento passa attraverso uno stadio intermedio, una cellula parzialmente differenziata, definita precursore o progenitore, commissionata a seguire una particolare linea differenziativa. La funzione principale delle CS adulte è quella di mantenere l'omeostasi dei tessuti in cui esse sono localizzate. Inizialmente si pensava che le CS adulte esistessero solo in tessuti soggetti ad un continuo rinnovamento cellulare, come il sangue o la pelle. Studi successivi hanno permesso di isolare CS adulte anche da tessuti caratterizzati da un turn-over cellulare molto più basso. Cellule staminali adulte sono state isolate da midollo osseo, pelle, sangue periferico, muscolo scheletrico, tessuto adiposo, tessuto nervoso, polpa dentale, tratto gastrointestinale, pancreas, fegato, limbo[9].

Nonostante le CS adulte siano ritenute cellule a limitato potenziale differenziativo, recentemente vari studi hanno

riportato la possibilità delle CS di differenziare in cellule di un tessuto diverso da quello di appartenenza (anche derivante da un altro foglietto embrionale), caratteristica definita con il termine di plasticità [10]. E' stato per esempio dimostrato che cellule staminali emopoietiche sono in grado di differenziare in cellule del muscolo scheletrico [11] o del tessuto nervoso [12]. Ad oggi in ogni modo non è stato ancora dimostrato se questo sia un fenomeno che avviene normalmente in natura o solo un "artifact" di laboratorio.

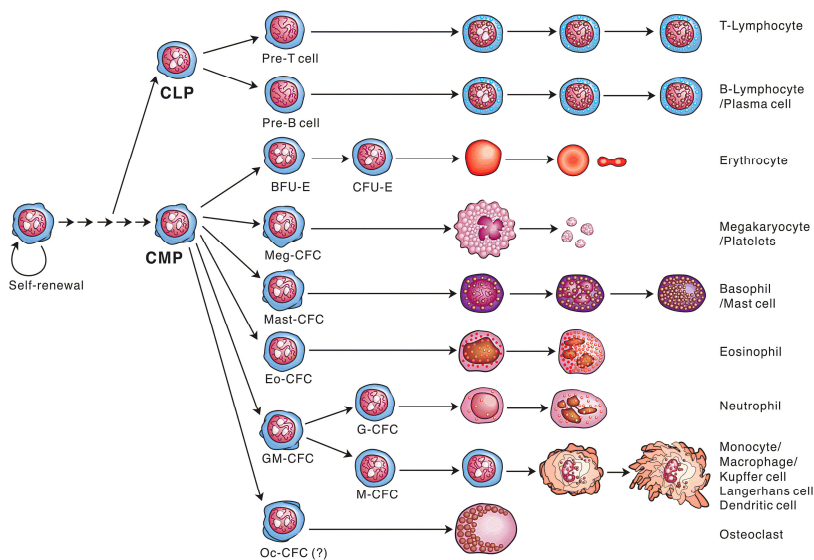
3. Le cellule staminali emopoietiche

Le cellule del sangue sono caratterizzate da un'emivita molto breve (gli eritrociti, ad esempio, sopravvivono in circolo circa 120 giorni) e per questo il sangue è soggetto ad un rinnovamento cellulare continuo. Responsabili della formazione di tutte le cellule del sangue (emopoiesi) sono le cellule staminali emopoietiche (CSE), che producono milioni di nuove cellule ogni giorno. Le CSE sono in grado di autorinnovarsi, differenziare in diversi tipi cellulari, migrare dal midollo osseo nel sangue periferico (e viceversa) e subire morte cellulare programmata (apoptosi) [13].

L'equilibrio, essenziale, tra autorinnovo e differenziamento della CSE è controllato da una combinazione di segnali intrinseci alla cellula e segnali esterni.

Grazie all'auto-rinnovo delle CSE, viene salvaguardato quel gruppo di cellule staminali che sostengono l'emopoiesi per tutta la vita dell'organismo.

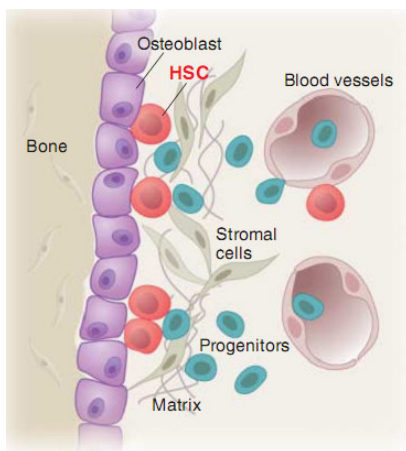
Il differenziamento della CSE vede la formazione di una cellula progenitrice linfoide, da cui si originano linfociti B, linfociti T e cellule natural killer (NK), ed una mieloide, da cui discendono eritrociti, megacariociti, monociti e granulociti (eosinofili, basofili e neutrofili) [14].



Metcalf D. Blood lines. AlphaMed Press 2007

Figura 2. Emopoiesi

Durante lo sviluppo embrionale, l'emopoiesi avviene prima nel sacco embrionale e poi in una regione intraembrionale, definita aorta-gonade mesonefro (AGM). Da qui l'emopoiesi si sposta nel fegato ed infine nel midollo osseo, che rappresenta la sede dell'emopoiesi nell'individuo adulto. Nel midollo osseo la CSE si trova localizzata nella nicchia, che, come già detto, è in grado di regolarne il comportamento. La nicchia è formata da diversi tipi cellulari (cellule stromali, osteoblasti, fibroblasti, cellule endoteliali) ed è normalmente distinta in due regioni, una definita osteoblastica e l'altra vascolare.



Moore KA, Lemischka IR. Science 2006;311:1880-1885

Figura 3. Nicchia

Gli osteoblasti (OB) sono particolarmente importanti per la localizzazione delle cellule staminali nella nicchia (è stato per esempio osservato che un aumento del numero di osteoblasti determina un aumento del numero delle CSE) e sono strettamente connessi con le cellule quiescenti o a bassa attività ciclica. La regione vascolare è invece caratterizzata da cellule proliferanti. L'interazione CSE-nicchia è regolata da molecole di adesione e chemochine. Ad esempio il complesso N-cadherin/ β -catenin è importante per l'interazione OB/CSE. Oltre alle cellule, anche la componente proteica della matrice extracellulare della nicchia ha una funzione regolatoria nei confronti delle CSE [15]. La nicchia ha un ruolo essenziale nel mantenimento della popolazione di CSE, regolandone sia la diminuzione sia l'aumento eccessivo del numero. Infatti, da una parte la nicchia protegge la CSE da stimoli apoptotici o differenziativi che ne determinerebbero una diminuzione in numero, dall'altra, controllando l'apoptosi cellulare, impedisce che vi sia un aumento eccessivo delle CSE, che potrebbe portare a tumori [3].

Le CSE sono in grado di migrare dal midollo osseo nel circolo sanguigno [16], ma anche di tornare nel midollo osseo (*homing*). Questo fenomeno di *homing* è particolarmente importante anche nei trapianti in quanto sembra regolare la

capacità delle cellule staminali di ripopolare il midollo osseo e quindi ricostituire l'emopoiesi a lungo termine. Proteine coinvolte sono le chemochine, in particolare il ligando CXCL12 o *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1 α) ed il suo recettore CXCR4 [17,18].

3.1. Isolamento e caratterizzazione delle cellule staminali emopoietiche

I primi studi sulle CSE risalgono al periodo successivo al bombardamento di Hiroshima e Nagasaki del 1945. Le osservazioni fatte su individui esposti alle radiazioni avevano evidenziato un danneggiamento del sistema emopoietico, incapace di generare nuove cellule. Studi successivi condotti su topi irradiati dimostrarono che era possibile ricostituire l'emopoiesi trapiantando cellule isolate da midollo osseo di topi sani [19,20]. L'identificazione della staminale si deve però a Till and McCulloch nei primi anni '60 [21], che ne definirono anche le caratteristiche principali (autorinnovamento e differenziamento). Dagli anni '60 in poi, uno dei temi centrali dello studio sulle staminali emopoietiche è stato quello dell'isolamento e della caratterizzazione della CSE.

Classicamente, il sistema sperimentale utilizzato per confermare che una cellula sia veramente una staminale emopoietica, è quello della ricostituzione dell'emopoiesi in modelli murini, utilizzando come riceventi topi irradiati letalmente. Questo tipo di studio ha permesso di identificare una popolazione di cellule staminali in grado di ricostituire l'emopoiesi a lungo termine, accanto ad una popolazione più matura, capace di produrre cellule del sangue nell'immediato ma non a lungo termine. Nell'uomo, CSE con capacità di ricostituire l'emopoiesi a lungo termine in topi immunodeficienti (SCID) sono state definite SRC, *SCID-repopulating cell* [22].

Le CSE vengono identificate ed isolate grazie ad antigeni di superficie che esse esprimono. I primi studi volti a tracciare un profilo fenotipico delle cellule staminali emopoietiche risalgono agli anni '80-'90, con l'identificazione di marcatori espressi da cellule staminali *long-term* sia murine [23] sia umane [24]. Nell'uomo i marcatori maggiormente utilizzati per l'identificazione delle CSE sono il CD34, CD38, CD90 (Thy-1) ed il CD133.

Tipicamente le cellule staminali emopoietiche sono considerate positive per il CD34 [25]: proteina monomerica di 115-120 KDa, altamente glicosilata, appartenente alla famiglia delle

sialomucine. La selezione delle cellule CD34⁺ viene utilizzata come metodica classica per l'isolamento delle CSE non solo nella ricerca ma anche nelle applicazioni cliniche, nonostante che la popolazione così ottenuta sia relativamente omogenea, comprendendo sia staminali che progenitori emopoietici. All'interno della popolazione delle cellule CD34⁺, è stata individuata una sottopopolazione di cellule molto alta negativa per il CD38. Studi in vivo hanno infatti dimostrato che le cellule con proprietà SRC sono tutte CD34⁺CD38⁻ [26,27]. Alcuni studi recenti descrivono l'esistenza di cellule CD34⁻, ritenute le CSE più primitive, in grado di ricostituire l'emopoiesi in topi NOD/SCID [28] e di generare CSE CD34⁺ sia in vivo [29] che in vitro [30].

3.2. Sistemi di coltura di cellule staminali/progenitori emopoietici

Lo studio in vitro di cellule staminali/progenitori emopoietici richiede sistemi di coltura specifici.

Sistema di coltura a breve termine

Si tratta di un sistema di coltura per lo studio qualitativo e quantitativo dei progenitori, in grado di proliferare e differenziare in un periodo breve, 1-2 settimane. Questo

sistema sfrutta la capacità delle cellule di formare colonie (CFU, *colony forming unit*) in un sistema di coltura semisolido, ogni colonia derivante da un progenitore. Le CFU che si formano sono diverse: CFU-E (eritrocitarie), -GM (granulocitiche-macrofagiche), -Mix (miste) o -GEMM (CFU-granulocitiche-eritrocitarie-monocitarie-megacariocitiche) e BFU-E (burst-forming unit-erythroid) [31].

Sistema di coltura a lungo termine (LTC, long-term culture)

I sistemi di coltura a lungo termine permettono lo studio delle CS più primitive (LTC-IC, *long-term culture-initiating cells*) [32,33]. In LTC, le cellule vengono coltivate per almeno 5 settimane (tempo stimato come necessario perché la cellula staminale esca dal suo stato di quiescenza ed inizi a proliferare e differenziare) su uno stroma cellulare che ha il compito di mimare il microambiente cellulare in vivo. La capacità clonogenica delle cellule viene successivamente valutata attraverso un saggio di coltura a breve termine. Dal momento che ogni colonia deriva da una cellula progenitrice, maturata a sua volta da una cellula staminale, questo sistema permette uno studio quantitativo indiretto della frequenza di cellule staminali emopoietiche nella popolazione di partenza.

3.3. Applicazioni cliniche e fonti delle cellule staminali emopoietiche

Le CSE sono utilizzate in campo clinico già dal 1959. Si ricorre al trapianto delle CSE principalmente in caso di tumori del sistema emopoietico (leucemie e linfomi), di tumori non-emopoietici, a seguito di un trattamento chemioterapico molto forte (che determina uno stato di ablazione del sistema emopoietico), o di altre patologie del sistema emopoietico, come le malattie autoimmuni o la talassemia. Il trapianto può essere autologo o allogenico. Nel trapianto autologo vengono utilizzate le cellule del paziente stesso, eliminando il rischio di rigetto. In questo modo è possibile preservare il sistema emopoietico qualora il paziente sia sottoposto ad un trattamento chemioterapico consistente. Nel trapianto allogenico, il donatore deve essere compatibile con il ricevente, in base all'omologia di espressione dei marker maggiori d'istocompatibilità (HLA). L'analisi viene fatta su 3 o più loci del gene HLA e la condizione ottimale richiede una completa omologia dei loci analizzati. Anche in caso di buona compatibilità, rimane lo stesso il rischio di rigetto per la presenza di altri antigeni non caratterizzati. Per limitare il rischio di una risposta immunitaria del ricevente verso le cellule trapiantate, si ricorre ad un pre-trattamento del paziente

con agenti chemioterapici per distruggere le cellule del sangue. La reazione immunologica può essere sviluppata, non solo dalle cellule dell'ospite, ma anche da quelle del donatore. Le cellule CD34⁺ utilizzate in clinica nei trapianti corrispondono ad una popolazione eterogenea, arricchita in cellule staminali e progenitori emopoietici, ma che contiene anche cellule che possono mediare una risposta immunitaria verso l'ospite, sindrome conosciuta come GvHD (*graft-versus-host disease*) [34]. Per abbassare il rischio di GvHD in alcuni casi si esegue la delezione dei linfociti T dalle cellule da trapiantare.

Per anni in clinica si sono usate cellule staminali emopoietiche isolate da midollo osseo per i trapianti. Tale pratica comporta però dei rischi per il donatore, legati alla metodica stessa di prelievo del midollo. Recentemente si è sviluppata l'idea di poter utilizzare come fonte di CSE il sangue periferico. In condizioni normali, le cellule staminali si trovano in numero maggiore nel midollo osseo (ca. 1/100000 cellule), con una frequenza molto bassa in circolo. Negli ultimi 10 anni è stato visto però che il trattamento con alcune citochine, quali per es. il G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), favorisce la mobilitazione delle CSE dal midollo osseo, determinando un forte aumento del numero di CSE nel sangue periferico (5-20% delle cellule raccolte).

Altra fonte alternativa di CSE è il cordone ombelicale (CO).

4. Cellule staminali emopoietiche da sangue di cordone ombelicale

Osservazioni condotte tra la fine degli anni '80 ed i primi anni '90 hanno evidenziato la presenza di CSE nel sangue preso dal cordone ombelicale e dalla placenta. Questi tessuti supportano la crescita del bambino durante la gravidanza e vengono normalmente buttati via come scarto al momento del parto. La scoperta di CSE nel sangue di CO ed il primo trapianto ad esito positivo in un bambino affetto da anemia di Fanconi hanno modificato questa pratica, portando alla nascita di banche del cordone ombelicale.

4.1. Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo del cordone ombelicale

Il sangue di CO rappresenta una buona fonte alternativa di CSE in quanto è facilmente reperibile, senza nessun rischio per il donatore, ed è arricchito in cellule staminali alte. Studi condotti su topi NOD/SCID hanno infatti dimostrato che il CO è arricchito in cellule SRC [35]. Inoltre, il trapianto di cellule staminali di CO è accompagnato da un minor rischio di GvHD,

anche in caso di non totale compatibilità per gli antigeni HLA. Nonostante questo, l'uso di cellule staminali emopoietiche isolate da CO è limitato, a causa della bassa cellularità. Visto che la dose cellulare richiesta per la buona riuscita del trapianto si aggira intorno a 2×10^5 cellule/Kg di peso corporeo del paziente, il trapianto di CO è possibile solo se il peso del ricevente non supera i 45 Kg.

Lo sviluppo di un sistema ex vivo per l'espansione delle cellule staminali rappresenterebbe una soluzione a tale problematica.

4.2. Espansione ex vivo delle cellule staminali emopoietiche da cordone ombelicale

L'espansione ex vivo delle cellule di CO consiste nell'aumento del numero sia di CSE, importanti per la ripopolazione a lungo termine del midollo osseo, sia dei progenitori, responsabili della ricostituzione dell'emopoiesi a breve termine. Un buon sistema per l'espansione delle CSE in vitro dovrebbe aumentare il numero di cellule staminali/progenitori emopoietici, mantenendo invariate le capacità di proliferare, autorinnovarsi, e migrare nel midollo osseo (*homing*).

Vari studi hanno dimostrato che è possibile espandere in vitro staminali/progenitori emopoietici. Gli esperimenti in vivo

mostrano però risultati contrastanti in quanto l'espansione delle cellule CD34⁺ risulta spesso accompagnata dalla perdita della popolazione più alta delle cellule staminali (SRC), che va incontro a differenziamento e quindi non è più in grado di sostenere l'emopoiesi a lungo termine [36-38]. Nonostante questo, è stato dimostrato che, utilizzando opportune citochine, è possibile preservare la capacità delle CSE di ripopolare il midollo osseo [39,40]. La ricostituzione dell'emopoiesi a lungo termine dopo trapianto dipende anche dalla capacità delle cellule staminali di migrare nel midollo osseo e localizzarsi nella nicchia. Alcuni studi hanno dimostrato che le CSE espanse ex vivo presentano un'alterata capacità di *homing* [41]. Per questi motivi, nonostante i vari studi, non esiste un protocollo riconosciuto come valido in assoluto per l'espansione in vitro delle cellule di CO.

La messa a punto di un sistema per l'espansione di staminali/progenitori emopoietici, in grado di preservarne tutte le funzioni fondamentali per la ripopolazione a breve e lungo termine del tessuto emopoietico, rappresenta ad oggi la problematica centrale dell'ematologia clinica e sperimentale.

4.3. Interleuchina-16

L'IL-16 è una citochina con funzione chemiotattica importante nei processi infiammatori, coinvolta nella migrazione di linfociti T CD4⁺, eosinofili, monociti e cellule dendritiche. La sua funzione biologica è svolta grazie all'interazione con il suo recettore, il CD4 [42].

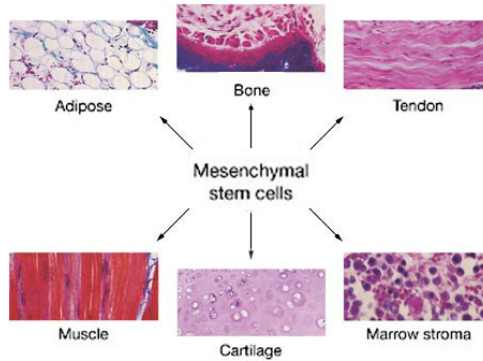
Dai primi anni '90, vari studi hanno evidenziato che il CD4 è espresso da una piccola popolazione di cellule staminali emopoietiche CD34⁺ isolate da midollo osseo di topo [43-45] e umano [46]: si tratta di una popolazione molto alta, arricchita in cellule con proprietà LTC-IC. Bassi livelli di CD4 sono stati osservati anche in cellule di midollo osseo fetale e cordone ombelicale [47].

Il fatto che il CD4 sia presente sulle cellule staminali emopoietiche fa pensare ad una funzione biologica del suo ligando sulla cellula staminale. Tale ipotesi è supportata anche dal fatto che le cellule staminali stesse sono in grado di produrre IL-16, che potrebbe agire in modo autocrino sulle CSE [48]. Inoltre, in uno studio precedente di Della Bella et al., viene dimostrato che l'IL-16, in combinazione con *granulocytic-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), IL-4, FL, *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α), induce

cellule CD34⁺ a proliferare in vitro e differenziare in cellule dendritiche maggiormente rispetto a SCF e TPO [49].

5. Le cellule staminali mesenchimali

Le prime evidenze dell'esistenza di cellule staminali non emopoietiche nel midollo osseo risalgono al lavoro pionieristico di Friedenstein del 1961 [50], in cui fu dimostrato che cellule derivate dal midollo osseo potevano differenziare in osteoblasti. Allo stesso autore si deve l'isolamento, mediante adesione alla plastica, di una popolazione di cellule morfologicamente simile ai fibroblasti, in grado di formare colonie (CFU-F, *colony forming unit-fibroblast*) [51,52]. Il sistema consisteva nel piastrare il midollo osseo totale su dischi di plastica per colture cellulari e rimuovere successivamente le cellule non aderenti. Le cellule aderenti così ottenute erano in maggioranza cellule fusiformi, morfologicamente simili a fibroblasti. Le osservazioni iniziali di Friedenstein furono confermate poi da altri gruppi intorno agli anni '80 [53,55]. Fu così dimostrata l'esistenza, nel midollo osseo, di cellule staminali non-emopoietiche definite cellule staminali mesenchimali (CSM), per la loro capacità di differenziare in cellule di origine mesodermica (osteoblasti, adipociti, condrociti, cellule del muscolo scheletrico e dei tendini).



Chen FH. Nature Clinical Practice Rheumatology 2006;2:373-382

Figura 4. Differenziamento delle cellule staminali mesenchimali

La fonte principale di CSM è il midollo osseo, dove le cellule formano anche lo stroma che costituisce la nicchia delle cellule staminali emopoietiche. Negli ultimi anni le CSM sono state isolate anche da tessuto adiposo, periosto, muscolo scheletrico, liquido amniotico, sangue periferico, cordone ombelicale, membrana sinoviale, polpa dentale, fegato, tessuti fetali [56,57]. Anche se riconosciute tutte come staminali mesenchimali, queste cellule presentano differenze nella loro capacità proliferativa e differenziativa a seconda dei tessuti di origine.

5.1. Isolamento e caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali

Dal punto di vista fenotipico, le CSM non esprimono CD34, CD45 e altri marcatori delle cellule emopoietiche (es. CD14 e CD11b). Sono invece positive per CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD90 (Thy-1) e Stro-1 [56,58]. Sfortunatamente, il fenotipo delle CSM non è stato ancora ben caratterizzato e differenze si osservano in funzione dei metodi di isolamento e di coltura, oltre che in base ai tessuti di origine delle cellule: ad esempio, le cellule derivate dal lipoaspirato sono positive per il CD49d e negative per il CD106, al contrario delle cellule isolate da midollo osseo. Vari studi descrivono metodi per l'isolamento delle CSM basati su selezione positiva o negativa. Nessuno di questi però fornisce una metodica ritenuta valida in assoluto a causa della mancanza di un marcatore specifico per le CSM. Il sistema classico utilizzato per isolare le CSM parte dalla frazione di cellule mononucleate di midollo osseo e sfrutta la loro capacità di aderire alla plastica. La frazione delle mononucleate contiene anche cellule emopoietiche in grado di aderire: si tratta di monociti-macrofagi che aderiscono normalmente più debolmente e che vengono perse durante i cambi di terreno. Si ottengono quindi cellule fusiformi, simili a fibroblasti, che iniziano a dividersi e proliferare rapidamente

dopo pochi giorni di coltura, con una velocità che dipende molto dal donatore e dalla densità in cui sono state piastrate. In vitro, le CSM possono essere espanse abbastanza facilmente per diversi passaggi, fino al raggiungimento di un blocco proliferativo dovuto a senescenza. Cellule derivate da donatore giovane possono essere espanse in coltura tipicamente fino a 40 passaggi, numero che si abbassa con l'aumentare dell'età del donatore.

Una delle caratteristiche funzionali fondamentali delle CSM è la capacità delle cellule di differenziare in osteoblasti, adipociti e condrociti, utilizzata molto spesso in saggi in vitro per l'identificazione delle CSM.

La metodica classica per il differenziamento in vitro delle CSM in osteoblasti prevede l'utilizzo dell'acido ascorbico, β -glicerofosfato e dexamethasone. Durante la coltura, si osservano cambiamenti dal punto di vista morfologico delle cellule, che si orientano a formare noduli. Il differenziamento in osteoblasti è accompagnato dall'aumento di espressione della fosfatasi alcalina, coinvolta nel processo di mineralizzazione. La formazione dei depositi di calcio può essere osservata tramite colorazione specifica con Alizarin Red S (ARS) e von Kossa. Il differenziamento in adipociti richiede dexamethasone, insulina, indometacina e isobutil-metil-

xantina. Si verifica un accumulo di vacuoli lipidici all'interno delle cellule, che possono essere osservati tramite colorazione con Oil Red. Per indurre il differenziamento in condrociti, le CSM vengono coltivate sotto forma di pellet in presenza di TGF- β (*tumor necrosis factor- β*) [58].

5.2. Applicazioni delle cellule staminali mesenchimali

Le CSM sono state descritte come cellule MHC I⁺, MHC II⁻, CD40⁻, CD80⁻ e CD86⁻, profilo definito non-immunogenico, che non richiede immunosoppressione in caso di trapianti allogenici. Infatti, le molecole MHC di classe I possono attivare linfociti T, che, in mancanza di molecole costimolatorie, restano però anergici. In molti studi le CSM sono state descritte come cellule immunosoppressive e immunomodulatorie, in quanto sono in grado di modulare la proliferazione, il differenziamento e l'attivazione di linfociti T, linfociti B e cellule dendritiche. Basandosi su questa proprietà immunosoppressiva, sembra che le CSM possano essere utilizzate nei trapianti allogenici di cellule staminali emopoietiche per favorire l'attecchimento e diminuire il rischio di GvHD [58].

In base al potenziale differenziativo, alle caratteristiche immunologiche e alla relativa facilità con cui possono essere espanse in vitro, le CSM sono ritenute ottime candidate per diversi tipi di applicazioni cliniche: trapianti localizzati per danni tissutali, trapianti sistemici per malattie diffuse, terapia genica ed ingegneria tissutale [59]. Vari studi su modelli animali e casi clinici hanno dimostrato l'efficacia dei trapianti di CSM per la cura di danni del tessuto osseo e cartilagineo e del miocardio. Trapianti sistemici di CSM allogeniche normali sono stati eseguiti in bambini con osteogenesi imperfetta. In questi studi è stata dimostrata la capacità delle cellule trapiantate di migrare nell'osso e produrre osteoblasti funzionanti, la cui presenza correla con miglioramenti della struttura ossea e delle funzioni. In modelli di infarto, trapianti sistemici suggeriscono che le CSM sono in grado di migrare e infiltrarsi nel tessuto danneggiato per ripararlo.

Nell'ambito della terapia genica, l'uso di CSM geneticamente modificate è accompagnato da vantaggi legati all'elevata sopravvivenza e capacità proliferativa delle cellule staminali confrontate con le cellule somatiche.

6. L'ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale è una materia interdisciplinare che unisce principi del trapianto di cellule, della scienza dei materiali e dell'ingegneria con il fine di sviluppare sostituti biologici per organi o tessuti danneggiati, che possano ristabilire e mantenere la normale funzione in vivo.

Le strategie dell'ingegneria tissutale prevedono l'utilizzo di matrici acellulari o cellulari. Le matrici acellulari sfruttano le capacità dell'organismo stesso di riparare il tessuto danneggiato. Si preparano con materiali sintetici o rimuovendo la componente cellulare dai tessuti attraverso manipolazioni chimiche o meccaniche, per ottenere matrici ricche in collagene. Trapiantate, si degradano lentamente e sono sostituite dalla matrice extracellulare prodotta dalle cellule in loco. Quando si utilizzano le cellule, si può ricorrere a tecniche diverse: le cellule possono essere espanse in vitro, trapiantate direttamente nel tessuto danneggiato insieme alla matrice o fatte aderire alla matrice e quindi impiantate come complesso matrice-cellule. Le matrici, o scaffold, utilizzate nell'ingegneria tissutale basata sulle cellule hanno il compito di mimare la matrice extracellulare in vivo, fornendo una struttura tridimensionale in cui si dispongono le cellule. Lo scaffold fornisce il substrato per l'adesione cellulare, protegge le cellule

dalle forze a cui sarebbero sottoposte in vivo e guida il giusto orientamento cellulare al fine di ottenere un sostituto biologico che sia strutturalmente e funzionalmente analogo al tessuto/organo da riparare [60]. I materiali utilizzati per la preparazione di queste matrici devono essere biodegradabili e biorisorbibili, in modo da non richiedere un intervento chirurgico per la loro rimozione e la loro degradazione non sia associata ad infiammazione. Sono normalmente distinti in due categorie: materiali naturali (es. collagene, alginato) e polimeri sintetici (es. policarbonato, polilattato, poliacrolattone).

La rigenerazione dei tessuti danneggiati richiede un numero elevato di cellule, solitamente difficile da avere con cellule differenziate. Una soluzione a questo problema è fornita dalle cellule staminali, per la loro capacità proliferativa e differenziativa.

L'ingegneria tissutale si sta sviluppando molto rapidamente e gli studi riguardano la rigenerazione di diversi tipi di organi e tessuti, tra cui uretra, organi riproduttivi maschili e femminili, rene, tessuto osseo e cartilagineo [60].

6.1. L'ingegneria del tessuto osseo

La risposta normale del nostro corpo ad una frattura ossea prevede una fase infiammatoria, la formazione del callo ed, in ultimo, il rimodellamento dell'osso. Quando questo processo non avviene naturalmente, ad esempio in caso di fratture molto estese, è necessario intervenire chirurgicamente. Un approccio terapeutico classico prevede l'utilizzo di piastre o viti metalliche. La soluzione è però solo parziale in quanto i materiali utilizzati non sono riassorbibili e non possono essere rimodellati, aspetto particolarmente importante soprattutto nel caso in cui i pazienti siano bambini, caratterizzati da una notevole crescita ossea.

Un'alternativa è fornita dall'ingegneria tissutale, che prevede l'utilizzo di costrutti formati da cellule e matrici.

Vari studi hanno evidenziato la possibilità di utilizzare cellule staminali mesenchimali. Le CSM sono delle ottime candidate per la rigenerazione del tessuto osseo in quanto hanno un elevato potenziale proliferativo e sono in grado di differenziare in osteoblasti.

Le strategie utilizzate sono differenti: 1) le cellule vengono seminate sulla matrice in vitro e, dopo una breve incubazione per favorire l'adesione, trapiantate in vivo; 2) le cellule, seminate su matrice, vengono coltivate in terreno per il

differenziamento delle CSM in osteoblasti e poi trapiantate come costruito cellule-scaffold; 3) scaffold e cellule vengono trapiantate direttamente.

Le matrici utilizzate nella rigenerazione del tessuto osseo devono avere particolari proprietà: *biocompatibilità*, perché non vi sia una risposta immunitaria; *osteoconduttività*, permettere lo scambio di sostanze nutritive e scarti con l'ambiente circostante e la migrazione, l'adesione e la proliferazione delle cellule; *osteoinduttività*, indurre il differenziamento in osteoblasti; *osteogenicità*, sostenere la formazione di nuovo tessuto osseo in corrispondenza del danno; *osteointegrazione*, permettere la fusione del nuovo tessuto osseo con quello già esistente [61]. I materiali utilizzati per la preparazione degli scaffold sono numerosi e comprendono sostanze naturali, come il collagene e l'acido ialuronico, ceramiche e polimeri sintetici, quali l'acido polilattico o il policaprolattone [62]. Polimeri differenti conferiscono proprietà fisiche e meccaniche diverse allo scaffold [61,63]. Una di queste è rappresentata dal tempo e modo di degradazione. In vivo, lo scaffold deve essere sufficientemente stabile da proteggere le cellule dalle forze esterne e guidare la formazione del nuovo tessuto. Nello stesso tempo, la matrice si deve degradare contemporaneamente alla

formazione del nuovo tessuto (1-2 anni). La degradazione dello scaffold può avvenire in modi diversi, digestione enzimatica, idrolisi, riassorbimento da osteoclasti, a seconda del materiale. La composizione dello scaffold influenza inoltre anche adesione, migrazione e differenziamento cellulare.

Un altro aspetto da considerare nella preparazione di uno scaffold è la sua porosità. Nella formazione di una struttura tridimensionale, i pori sono fondamentali per la migrazione e l'adesione delle cellule, per lo scambio delle sostanze con l'ambiente esterno e per la vascolarizzazione [61,63]. La dimensione ottimale dei pori è stata stabilita tra 100-400 μm per la rigenerazione del tessuto osseo e 200-350 μm per l'osteoconduzione.

Per tutti questi motivi la scelta del materiale e la preparazione dello scaffold rappresentano due aspetti fondamentali nell'ingegneria del tessuto osseo.

6.2. Composizione dello scaffold

Materiali ampiamente utilizzati nell'ingegneria biomedica e nella rigenerazione del tessuto osseo sono le ceramiche (es. idrossiapatite). Sono materiali inorganici, non metallici che possono avere struttura cristallina. Per la loro composizione,

sono molto simili alla componente inorganica della matrice ossea e quindi risultano osteoinduttivi ed osteoconduttivi [64,65].

Per aumentare la processabilità di questi materiali, sono stati proposti dei costrutti formati da ceramica e polimeri sintetici. Questi composti offrono molti vantaggi dal punto di vista preparativo, ma non sono in grado di guidare le cellule nella formazione del tessuto osseo. Inoltre, la degradazione di questi scaffold produce molto spesso detriti che inducono una risposta infiammatoria [66]. I polimeri naturali e sintetici offrono una buona alternativa in quanto la loro preparazione ed il processo di degradazione possono essere facilmente controllati. I polimeri naturali inoltre, a rispetto di quelli sintetici, interagiscono più facilmente con le cellule e quindi favoriscono adesione, proliferazione e differenziamento.

Tra i polimeri sintetici utilizzati in ingegneria tissutale troviamo il policaprolattone (PCL). Riconosciuto come biocompatibile, il PCL è già ampiamente utilizzato in clinica, ad esempio come materiale per le suture. Recentemente, vari studi hanno dimostrato che il PCL può essere utilizzato per la preparazione di scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo [67,68]. Dal punto di vista chimico, il PCL appartiene alla famiglia dei poliesteri. Scaffold di policaprolattone hanno un

tempo di degradazione abbastanza alto, superiore a 1 anno, e si degradano per idrolisi.

Uno dei polimeri naturali impiegati in ingegneria tissutale è la zeina, proteina del mais [69-71]. E' stato osservato che scaffold di zeina promuovono l'adesione delle CSM, la loro proliferazione ed il differenziamento in osteoblasti [69]. A differenza di altri biopolimeri, la zeina ha una maggiore componente idrofobica e quindi conferisce allo scaffold una buona stabilità in ambiente acquoso senza richiedere trattamenti aggiuntivi. La problematica principale associata alla zeina è la sua bassa processabilità, che rende difficile la preparazione di scaffold con una microstruttura simile a quella del tessuto osseo. Recentemente è stato proposto un particolare processo con lo scopo di ottenere zeina termoplastica (TZ), più facilmente processabile [72].

.

7. Le cellule staminali tumorali

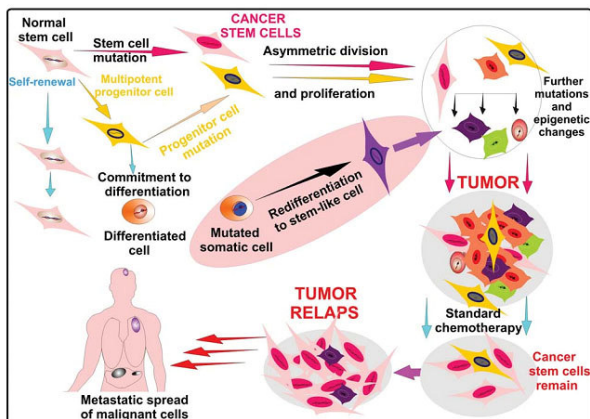
Negli ultimi anni sempre più studi hanno ipotizzato l'esistenza di una cellula staminale tumorale responsabile dello sviluppo del tumore: si tratterebbe di una cellula in grado di autorinnovarsi, con elevato potenziale proliferativo e resistente all'apoptosi. L'origine delle cellule staminali tumorali non è chiara. E' stato ipotizzato che le cellule staminali tumorali

derivano da cellule staminali normali a seguito di mutazioni genetiche e cambiamenti epigenetici. Alcuni studi sostengono però che anche progenitori che hanno riacquisito capacità autorinnovativa o cellule somatiche, a seguito di numerose mutazioni, possono dare origine a cellule staminali tumorali. In ogni caso, la deregolazione della capacità autorinnovativa delle cellule e del loro potenziale differenziativo risulta al centro del processo di trasformazione tumorale [73,74].

Secondo la teoria delle cellule staminali tumorali, queste cellule sarebbero in grado di dividersi, formando cellule tumorali che mantengono la capacità di autorinnovarsi e cellule tumorali che non possono generare un nuovo tumore. Questa ipotesi è in accordo con l'idea che la massa tumorale sia composta da una popolazione cellulare eterogenea, di cui solo una parte è in grado di sostenere la crescita tumorale. Le cellule staminali tumorali non sarebbero responsabili solo dello sviluppo tumorale ma anche dell'aumento dell'aggressività, della recidività e delle metastasi. Lo sviluppo tumorale è descritto normalmente come un processo a più tappe, caratterizzato dall'accumularsi di mutazioni. Dal momento che le cellule staminali tumorali giocherebbero un ruolo centrale nello sviluppo tumorale, è facile pensare che mutazioni a loro carico possano modificare rapidamente la velocità di crescita

del tumore, renderlo molto più aggressivo e favorire il processo di migrazione delle cellule e quindi le metastasi. Le cellule staminali tumorali sono inoltre considerate cellule resistenti ai normali trattamenti terapeutici, elemento considerato alla base della recidività di alcuni tumori. La ricomparsa del tumore anche diversi anni dopo i trattamenti terapeutici si spiega proprio con l'esistenza di una cellula staminale tumorale semiquiescente, "sopravvissuta" al trattamento e in grado di sviluppare un nuovo tumore [73-75].

L'esistenza di cellule staminali tumorali è stata prima di tutto dimostrata per la leucemia mieloide acuta. In un lavoro di Bonnet et al. [76] è dimostrato che cellule leucemiche, trapiantate in topi NOD/SCID sani, sono in grado di originare un nuovo tumore, con differenze che dipendono dalla popolazione cellulare utilizzata. Il lavoro sottolinea l'eterogeneità cellulare, evidenziando che le cellule staminali leucemiche rappresentano solo una parte delle cellule tumorali e sono le responsabili della crescita del tumore. Successivamente, cellule staminali tumorali sono state caratterizzate anche in altri tumori, ad esempio nel cancro alla mammella [77], al fegato [78], al pancreas [79], al cervello [80] e nel melanoma [81].



Wu XZ. Ann Surg Oncol. 2008;15:407–414

Figura 5. Origine delle cellule staminali tumorali ed implicazioni terapeutiche.

Con l’ipotesi sempre più consolidata dell’esistenza di cellule staminali tumorali, si fa largo la necessità di individuare nuovi marcatori diagnostici e nuove strategie terapeutiche [74,82,83].

7.1. Rbdomiosarcoma

Il rbdomiosarcoma (RMS) è il più comune tumore dei tessuti molli dell’infanzia e rappresenta circa il 7-8% di tutti i tumori maligni che colpiscono bambini e adolescenti [84]. Si sviluppa da cellule mesenchimali commissionate verso la formazione del tessuto muscolare scheletrico a seguito di una deregolazione del processo di differenziamento e crescita cellulare. In base alla sua origine, il rbdomiosarcoma può

svilupparsi in varie regioni del corpo, anche in siti dove normalmente non si osserva il muscolo scheletrico. Fenotipicamente, il RMS è formato da cellule non completamente differenziate in senso miogenico. Dal punto di vista morfologico, i rhabdomyosarcoma sono distinti in due tipi, embrionali ed alveolari. I RMS embrionali (ERMS) sono caratterizzati tipicamente da cellule allungate e colpiscono bambini e neonati; i RMS alveolari (ARMS), così definiti perché formati da piccole cellule tondeggianti organizzati a grappoli simili agli alveoli polmonari, compaiono più tardivamente, colpiscono prevalentemente le estremità del corpo e sono più aggressivi dal punto di vista clinico [85-87]. Mentre nei RMS di tipo embrionale non sono stati ancora identificati marcatori genetici, è stato osservato che circa il 75% dei RMS alveolari è caratterizzato dalla traslocazione $t(2;13)(q35;q14)$ (55% dei casi) o $t(1;13)(p36;q14)$ (20% dei casi). Le traslocazioni coinvolgono rispettivamente i geni PAX3 (cromosoma 2) e FOXO1 o FKHR (cromosoma 13), e PAX7 (cromosoma 1) e FOXO1 [88]. La conseguenza della traslocazione è la fusione del dominio di legame al DNA di PAX3 o PAX7 con il dominio di trans-attivazione di FOXO1: viene così prodotta una proteina chimerica con alterata attività biologica, che contribuisce alla trasformazione tumorale

agendo sui meccanismi della cellula che regolano differenziamento, crescita ed apoptosi [88].

Anche se le terapie ad oggi utilizzate sono efficaci in circa il 70% dei casi di RMS, una migliore caratterizzazione è importante per determinare i meccanismi biologici alla base dello sviluppo tumorale, identificare marcatori specifici e quindi sviluppare nuovi e più idonei approcci terapeutici.

7.2. Eph/ephrin

Nel 1987 Hirai e collaboratori [89] identificarono un nuovo recettore tirosin-chinasino, indicato con il termine di Eph, dalla linea cellulare *Erythropoietin-Producing human Hepatocellular* da cui era stato identificato. Ad oggi, i recettori Eph risultano la più grande famiglia di recettori tirosin-chinasici, costituita da 16 proteine [90]. Le Eph sono distinte in due categorie, A (10 membri, EphA1-A10) e B (6 membri, EphB1-B6), in base a omologie di sequenza ed ai corrispettivi ligandi (ephrins). Le ephrins (9 proteine) sono, infatti, distinte in due categorie, A e B, in base al loro sistema di ancoraggio alla membrana cellulare: le ephrin-A sono ancorate alla membrana tramite glicosilfosfatidilinositolo, mentre le ephrin-B sono proteine transmembrana. Nell'uomo sono stati

identificati 14 recettori Eph (EphA1-A8 e EphB1-B6) e 8 ligandi (ephrin-A1-A5 e B1-B3) [91]. In genere, l'interazione ligando-recettore avviene tra membri della stessa sottoclasse A o B, tranne alcune eccezioni rappresentate dai recettori EphB2 e EphA4, in grado di interagire entrambi sia con ephrin-A che ephrin-B. All'interno delle due sottoclassi, si osserva però una notevole promiscuità di legame: lo stesso recettore può legare più ligandi, lo stesso ligando più recettori.

Il legame ligando-recettore richiede un'interazione cellula-cellula e determina la nascita di un segnale bidirezionale, sia a valle del recettore eph (segnale "diretto") che del ligando ephrin (segnale "inverso") [92].

Eph/ephrin sono coinvolte nei processi di adesione/repulsione e migrazione cellulare; in particolare, sono molto importanti durante lo sviluppo embrionale per la migrazione ed il commissionamento delle cellule [90,93,94].

Durante lo sviluppo tumorale, alterazioni dei meccanismi che controllano l'adesione e la migrazione cellulare giocano un ruolo centrale nella progressione tumorale e la formazione delle metastasi [95,96]. In accordo con questo, Eph/ephrin potrebbero svolgere un ruolo fondamentale nello sviluppo tumorale. Vari studi hanno infatti dimostrato un'alterata espressione di Eph/ephrin in diversi tumori, tra cui il cancro

alla mammella, al colon, all'endometrio, alle ovaie, alla prostata, nel melanoma, nell'osteosarcoma e nel neuroblastoma [97,98]. Normalmente, l'up-regolazione di ligandi e recettori è associata ad un tumore più aggressivo [97,98], anche se è stato anche osservato che in alcuni casi l'over-espressione di Eph/ephrin è accompagnata a soppressione tumorale [99].

Studi precedenti hanno anche dimostrato che Eph/ephrin sono espresse durante il differenziamento delle cellule del muscolo scheletrico e, se pur presenti in modo maggiore durante lo sviluppo embrionale, la loro espressione è stata osservata anche dopo la nascita [98,100,101].

SCOPO DEL LAVORO

- La messa a punto di un sistema per l'espansione ex vivo delle cellule staminali emopoietiche rappresenta un aspetto fondamentale per le loro future applicazioni cliniche. Da studi precedenti è noto che cellule staminali emopoietiche esprimono il CD4 e che l'IL-16 favorisce la crescita ed il differenziamento delle cellule CD34⁺ in cellule dendritiche. Basandosi su questi studi, in questo lavoro è stato investigato l'effetto dell'IL-16 sull'espansione delle cellule CD34⁺ isolate da sangue di cordone ombelicale. (**Articolo I**)
- Uno delle problematiche centrali dell'ingegneria tissutale applicata alla rigenerazione dell'osso è la preparazione di uno scaffold idoneo a tale uso. In questo lavoro sono stati analizzati scaffold diversi di policaprolattone al fine di individuare quale biomateriale potesse essere utilizzato insieme alle cellule staminali mesenchimali per la rigenerazione dell'osso. (**Articolo II**)
- Il modello delle cellule staminali tumorali si accompagna alla necessità di individuare nuovi marcatori diagnostici e

sviluppare nuove terapie. Da studi precedenti è emerso che Eph/ephrin sono coinvolte nell'angiogenesi e nello sviluppo di diversi tipi tumorali. Qui, l'espressione dei recettori Eph-B e dei ligandi ephrin-B è stata analizzata in rabdomiosarcoma. **(Articolo III)**

MATERIALI E METODI

Articolo I

Preparazione delle cellule CD34⁺ da cordone ombelicale

Sangue di cordone ombelicale è stato ottenuto dall'Ospedale S. Eugenio (Roma, Italia) da madri sane al termine della gravidanza, dopo consenso scritto. I campioni sono stati raccolti in sacche sterili contenenti eparina e poi diluiti 1:3 in PBS senza Ca²⁺ e Mg²⁺ (Euroclone, Wetherby, UK). La frazione delle cellule mononucleate è stata ottenuta per separazione su gradiente di densità su Ficoll-Hystopaque-1077 (densità 1.077 g/ml; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Le cellule CD34⁺ sono state isolate attraverso selezione immunomagnetica con microbeads su colonne miniMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania). Una seconda colonna è stata utilizzata per ottenere una popolazione molto pura (arricchimento > 95%).

Espansione ex vivo delle cellule CD34⁺

Cellule CD34⁺ (2x10⁴ cellule/ml) sono state coltivate per 7 e 14 giorni in fiasche T12.5 in alpha MEM (Gibco, Carlsbad, California, USA) + 10% di siero bovino fetale (FBS) australiano (Cambrex, East Rutherford, New Jersey, USA), in presenza di un cocktail di base di citochine umane ricombinanti (PeproTech, London, UK): FL (50 ng/ml), SCF (50 ng/ml), TPO (50 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml) e IL-6 (10 ng/ml). Al cocktail di base è stata aggiunta IL-16 a diverse concentrazioni, 10-50-100 ng/ml. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C, 5% CO₂ per 7 e 14 giorni, con aggiunta di terreno fresco e citochine a giorni alterni. Alla fine della coltura, le cellule sono state raccolte ed analizzate. L'espansione cellulare è espressa come fold increase del numero di cellule totali, di progenitori e LTC-IC ottenuto dopo coltura rispetto al numero al giorno 0.

Analisi citofluorimetrica e sorting

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: phycoerythrin (PE)-CD34 (HPCA-2), PE-CD11b, PE-CD19, PE-CD56, PE-CXCR4, PE-CD4, fluorescein isothiocyanate (FITC)-CD34, FITC-CD38, FITC-CD14 (BD Biosciences, San

Josè, CA, USA). I campioni sono stati analizzati al citofluorimetro (*fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Scan*), utilizzando il software CellQuest (Becton-Dickinson). Cellule CD34⁺ sono state sortate con FACS-Vantage (Becton-Dickinson). Per i sistemi di LTC-IC, le cellule CD34⁺ sono state sortate direttamente su piastre da 96 pozzetti dove prima erano state piastrate le cellule murine stromali MS-5.

Analisi del rilascio dell'IL-16 da cellule CD34⁺

Per valutare la produzione di IL-16 da parte delle cellule CD34⁺, le cellule sono state coltivate per 6, 12 e 24 ore in presenza o meno del cocktail di base di citochine. Dopo coltura, le cellule sono state recuperate, centrifugate ed il sovrinatante analizzato tramite ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizzando un kit ad alta sensibilità (2.7-13.4 pg/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La quantità di IL-16 prodotta dalle cellule è stata valutata misurando l'assorbimento in lettore Bio-Rad 550 ad una lunghezza d'onda di 450 nm (correzione 540 nm). I livelli di IL-16 sono stati calcolati in riferimento ad una curva standard disegnata in precedenza ed espressi in pg/ml per 2×10^5 cellule.

Neutralizzazione dell'IL-16

Per determinare l'effetto dell'IL-16 sull'espansione, cellule CD34⁺ sono state coltivate per 7 e 14 giorni in presenza del cocktail di base, con l'aggiunta o meno dell'anticorpo neutralizzante anti-IL-16 (Abcam, Cambridge, UK) ad una concentrazione finale di 3 µg/ml. L'anticorpo è stato aggiunto ogni 72 ore. Dopo 7 e 14 giorni di coltura, le cellule sono state contate per valutare l'espansione.

Sistema per la valutazione dei progenitori emopoietici (CFU-assay)

La formazione di CFU-GM, BFU-E e CFU-Mix è stata valutata in un sistema di coltura semisolido di metilcellulosa (MethoCult GF H4434, StemCell Technologies, Vancouver, Canada) [102], in presenza di GM-CSF (10 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), eritropoietina (3 U/ml), SCF (50 ng/ml) e con l'aggiunta di G-CSF (20 ng/ml) e IL-6 (20 ng/ml) (PeproTech). Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 10² cellule CD34⁺/ml al giorno 0 e 2x10³ cellule espanse/ml al giorno 7 e 14. Dopo 14 giorni, le colture sono state osservate al microscopio per la conta e lo screening delle colonie. Colonie di tipo megacariocitico (CFU-MK, *colony-forming units-*

megakariocyte) sono state ottenute seminando le cellule (10^3 cellule $CD34^+$ al giorno 0 e 2.5×10^3 cellule espanse al giorno 7 e 14) in un sistema di coltura basato su collagene. Dopo 14 giorni, le colture sono state disidratate, fissate per 20 minuti in metanolo/acetone 1:3 e marcate con fosfatasi alcalina.

LTC-IC

Le colture a lungo termine LTC-IC sono state eseguite utilizzando il sistema di Sutherland modificato [33,102]. Le cellule, al giorno 0 e dopo 14 giorni di espansione, sono state seminate su stroma murino MS-5 su piastre da 96 pozzetti, in un volume di 100 μ l di myelocult H5100 (StemCell Technologies) e coltivate per 5 settimane. La frequenza delle LTC-IC è stata valutata realizzando delle diluizioni scalari (10-1000 cellule), facendo 60 pozzetti per ogni diluizione. Il calcolo della frequenza è stato fatto tramite analisi statistica, utilizzando il programma L-Calc (StemCell Technologies), grazie al quale è possibile determinare il numero assoluto di LTC-IC ed il rapporto CFU/LTC-IC.

In due esperimenti, cellule $CD34^+$ espanse per 14 giorni sono state seminate, tramite sorting, a diluizioni scalari 1-100 su

piastre da 96 pozzetti e coltivate secondo la metodica precedente per 5 settimane.

Differenziamento in cellule B, NK e mieloidi in un unico sistema LTC

Il sistema per il simultaneo differenziamento in cellule B e NK (LTC-B-NK) è stato realizzato coltivando le cellule su stroma murino MS-5 in piastre da 24 o 96 pozzetti [103,104]. Brevemente, cellule CD34⁺ (2x10³ cellule/pozzetto al giorno 0 e 5x10⁵ cellule/pozzetto al giorno 14) sono state coltivate in RPMI (Gibco) addizionato con: 10% siero umano AB (Sigma-Aldrich), 5% FBS, SCF (50 ng/ml), FL (50 ng/ml), TPO (10 ng/ml), IL-2 (5 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml) and IL-7 (20 ng/ml) (PeproTech). Dopo 6 settimane di coltura, le cellule aderenti e non aderenti, presenti nei pozzetti con evidente crescita cellulare (numero di cellule > 500), sono state recuperate e analizzate al FACS per l'espressione di marcatori linea-specifici.

Analisi della migrazione cellulare

Per valutare la capacità delle cellule espanse di migrare, sono state utilizzate delle piastre da 24 pozzetti con inserti di

policarbonato con fori da 5 μm (Millicell-24 cell culture insert plate; Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) [105]. Dopo 14 giorni di coltura, le cellule espanse sono state selezionate per l'espressione del CD34, secondo la metodica descritta in precedenza. Quindi, 0.5×10^6 cellule CD34⁺ sono state seminate nella camera superiore del pozzetto in 200 μl di RPMI + 1% FBS. Nella camera inferiore sono stati aggiunti 600 μl dello stesso terreno con o senza SDF-1 α ad una concentrazione di 100 ng/ml. In modo analogo, è stato valutato l'effetto migratorio dell'IL-16 (200 ng/ml). Dopo 4 ore d'incubazione a 37 °C, l'inserto è stato rimosso e le cellule presenti nel pozzetto inferiore sono state contate. La percentuale delle cellule espanse in grado di migrare è stata confrontata con quella delle cellule CD34⁺ al giorno 0.

Analisi statistica

I risultati sono espressi come valori medi \pm deviazione standard. Per valutare la significatività dei valori, è stato utilizzato il test-t, considerando significati valori $p \leq 0.05$.

Articolo II

Preparazione degli scaffold

Lo studio è stato condotto su scaffold di policaprolattone (Sigma-Aldrich), opportunamente modificati con l'aggiunta di zeina (Sigma-Aldrich) e idrossiapatite (HA) (ENGIpore, dimensione 250-355 μm ; Ficeramica, Faenza, Italia), ottenendo: PCL, PCL-HA, PCL/TZ e PCL/TZ-HA.

Per la preparazione della zeina termoplastica (TZ), la polvere di zeina è stata mescolata con il poli-etilene-glicolo (PEG) 400 (Fluka) in rapporto 3:1 in un mixer rotante (Rheomix 600 Haake, Germania) a 80°C, 50 rpm per 10 min [72]. Lo stesso strumento (programma: 70°C, 80 rpm per 6 min) è stato utilizzato per la preparazione degli scaffold di diversa composizione.

Caratterizzazione degli scaffold

La stabilità termica dei diversi biomateriali nell'intervallo 30-600°C è stata analizzata tramite TGA 2950 (TA Instrument, USA). Test per la valutazione delle proprietà dinamico-meccaniche sono stati condotti su Tritec 2000 (Triton technology, Ltd. UK). Per determinare la durezza degli

scaffold, sono stati registrati: carico di rottura (σ_B), tensione di snervamento (σ_Y), allungamento al punto di rottura (ϵ_B). L'idrofobicità dei biomateriali è stata valutata misurando l'angolo di contatto e l'assorbimento di acqua. Nel primo caso, una gocciolina di acqua è stata messa sulla superficie dello scaffold e l'angolo di contatto misurato tramite Contact angle System OCA20 (Dataphysics, Italia). Per valutare l'assorbimento dell'acqua, gli scaffold sono stati immersi in acqua per un periodo massimo di 60 giorni, durante i quali è stato valutato il rigonfiamento degli scaffold. A tempi stabiliti, la microstruttura degli scaffold è stata analizzata tramite microscopia elettronica a scansione (SEM LEICA S440).

Isolamento e coltura delle cellule staminali mesenchimali di coniglio

Cellule staminali mesenchimali adulte sono state isolate dal midollo osseo di coniglio (peso approssimativo 3-4.5 kg). Il midollo osseo è stato prelevato dalla porzione distale e prossimale del femore sinistro e raccolto in tubi contenenti eparina. Il sangue di midollo è stato diluito in PBS e la frazione delle mononucleate separate su gradiente di densità su Ficoll-Hystopaque 1077. Le cellule sono state coltivate in fiasche

T12.5 in un terreno specifico per le cellule staminali mesenchimali (mesencult medium + MSC stimulatory supplement; StemCell Technologies, Vancouver, Canada) ad una concentrazione di 10^5 cellule/ml ed incubate a 37°C , 5% CO_2 , 95% di umidità. Raggiunta la semiconfluenza, le cellule sono state tripsinizzate e ripiastrate alle medesime condizioni. Per indurre il differenziamento in osteoblasti, le cellule sono state coltivate per 3 settimane in un terreno per il differenziamento osteogenico (Differentiation Media Bullet Kits-Osteogenic; Cambrex, East Rutherford, New Jersey, USA), con cambi di terreno ogni 2-3 giorni.

Preparazione dei costrutti cellule-scaffold

Per la coltura delle cellule, sono stati preparati scaffold di 10 mm di diametro e 2 mm di spessore e sterilizzati con raggi γ . Le cellule staminali mesenchimali espanse in vitro sono state recuperate, risospese in 40 μl di mesencult e seminate su scaffold (2×10^4 cellule/scaffold). I costrutti sono stati incubati per 45 minuti a 37°C per favorire l'adesione delle cellule alla matrice e quindi sono stati aggiunti 1.5 ml di terreno. Dopo ulteriori 24 ore d'incubazione, il terreno mesencult è stato sostituito con terreno per il differenziamento in osteoblasti.

Quantifica del DNA

La crescita delle cellule è stata valutata tramite quantifica del DNA a 24 ore, 7 e 21 giorni di coltura. Dopo aver tolto il terreno, i costrutti sono stati lavati in PBS e congelati a -20°C in 1 ml di H₂O sterile. Al momento dell'analisi, i campioni sono stati scongelati e sonicati con sonicatore ad acqua per 6 min a freddo. La sospensione è stata recuperata ed il DNA marcato con Hoechst 33258 (DNA quantification Kit; Sigma-Aldrich). La quantità del DNA presente nei campioni è stata rilevata tramite spettrofotometro a luminescenza (LS50B; Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), a lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente di 360 e 460 nm. Partendo dalla fluorescenza emessa, la quantità di DNA è stata ricavata tramite interpolazione con la curva standard precedentemente disegnata.

Analisi della fosfatasi alcalina

Per valutare l'attività della fosfatasi alcalina (*alkaline phosphatase*, ALP), i costrutti sono stati sonicati per 6 min in un sonicatore ad acqua in 800 µl di 0.1% Triton-X100 + 0.01% NaCl. L'attività della fosfatasi alcalina è stata valutata sfruttando la capacità dell'enzima di convertire il p-nitrofenil-

fosfato in p-nitrofenolo, rilevato spettrometricamente a 405 nm.

Valutazione della mineralizzazione

Dopo 21 giorni di coltura in terreno differenziativo, le cellule coltivate in monostrato e su scaffold sono state lavate in PBS, fissate in formaldeide e colorate con Alizarin Red S (ARS; Sigma-Aldrich) per evidenziare i depositi di calcio [106]. In breve, i campioni sono stati incubati con 1 ml di ARS 40 mM, pH 4.1 per 8 min a temperatura ambiente in agitazione. Dopo aver eliminato il colorante in eccesso, le cellule sono state lavate 2 volte (in agitazione, 5 min ciascuna) con 1 ml di H₂O deionizzata. Prima di procedere all'estrazione del colorante, i campioni sono stati congelati a -20°C. Una volta scongelati, i campioni sono stati incubati in agitazione per 30 min in 800 µl di acido acetico al 10%. Per favorire il rilascio dei depositi di calcio, i costrutti cellule-scaffold sono stati anche sonicati per 3 volte, 2 min ogni volta, in un sonicatore ad acqua. La sospensione è stata quindi trasferita in un eppendorf da 1.5 ml e vortexata. Dopo aver aggiunto 500 µl di olio minerale, i campioni sono stati scaldati a 85°C per 15 min, lasciati in ghiaccio per 5 min e poi centrifugati per 15 min a 20000xg. I

sovrantanti sono stati trasferiti in tubi eppendorf puliti e, ad ognuno, sono stati aggiunti 200 µl di idrossido di ammonio al 10%. La quantifica del colorante è stata fatta tramite lettore ELISA Bio-Rad 550 ad una lunghezza d'onda di 405 nm (aliquote di 150 µl, in triplicato).

RT-PCR semiquantitativa

Per l'estrazione dell'RNA, 500 µl di TriReagent (Sigma-Aldrich) sono stati aggiunti ai costrutti cellule-scaffold per la lisi delle cellule, procedendo poi come prescritto dalle istruzioni. L'RNA (200 ng), quantificato tramite Standard Agilent 2100 bioanalyzer Agilent, è stato retrotrascritto in cDNA (Superscript RT; Gibco) ed utilizzato come template per la valutazione dell'espressione dell'osteopontina (OPN) tramite PCR semiquantitativa. La reazione, condotta su Gene Amp PCR System 9600 thermocycler (Perkin-Elmer), è stata realizzata come segue: 11 min a 94°C per la prima denaturazione; 30 sec a 94°C, 30 a 57°C, 45 sec a 72°C, 30 cicli; 7 min a 72°C per l'estensione finale. Primers: OPN sense 5'-GCTCAGCACCTGAATGTACC-3', antisense 5'-CTTCGGCTCGATGGCTAGC-3'(292-bp); GAPDH sense 5'-TCATTTGAAGGGCGGAGCCAA-3', antisense 5'-

ATGCCTGCTTCACCACCTTCT-3' (465-bp). I prodotti di PCR sono stati visualizzati tramite etidio bromuro su gel di agarosio al 2%. L'intensità della banda è stata misurata densitometricamente tramite il software Quantity One e per ogni campione il valore relativo all'OPN è stato normalizzato rispetto al GAPDH.

Articolo III

Linee cellulari e tumori primari di Rbdomiosarcoma

Lo studio è stato condotto su 3 linee cellulari di RMS embrionale, RD, RD18 e CCA, e 2 linee di RMS alveolare, RMZ-RC2 e RH30 [107-111], gentilmente fornite da P.L. Lollini. Le cellule sono state coltivate in DMEM + 10% FBS, 1% L-glutammina e 1% streptomicina.

Campioni di tumore primario (13 ERMS, 3 ARMS) sono stati ottenuti dall'Università la Sapienza di Roma - Dipartimento di Pediatria, dall'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma-Divisione di Oncologica e dal Royal Liverpool Children's NHS Trust Alder Hey - Dipartimento di Oncologia. I campioni, prelevati in fase chirurgica, sono stati direttamente congelati in azoto liquido e conservati a -80° fino all'analisi. Sono stati

presi anche campioni di muscolo scheletrico normale da utilizzare come controllo.

Estrazione di RNA e sintesi di cDNA

Cellule, tumori primari e muscolo scheletrico sono stati lisati in trizol (Gibco) per l'estrazione di RNA secondo la metodica classica di estrazione con fenol/cloroformio. Quindi, 2-5 µg di RNA totale sono stati utilizzati per la sintesi del cDNA tramite high-capacity cDNA archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), secondo le istruzioni fornite con il kit.

Real-time PCR

La real-time PCR è stata realizzata utilizzando il sistema TaqMan (TaqMan universal PCR master mix, Applied Biosystems). Le reazioni sono state preparate in un volume finale di 25 µl, in triplicato, utilizzando le seguenti coppie di primers/sonda: EphB1, Hs00174725 m1; EphB2, Hs00362096 m1; EphB3, Hs00177903 m1; EphB4, Hs00174752 m1; ephrin-B1, Hs00187950 m1; ephrin-B2, Hs00270004 m1; GAPDH, Hs99999905 m1. La reazione è stata fatta su ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems), secondo un ciclo di amplificazione standard (95°C per 15 sec, 60°C per 1 min, 40

cicli). L'espressione di ogni gene è stata normalizzata con quella del controllo endogeno GAPDH. L'analisi dei risultati è stata effettuata tramite metodo comparativo CT per i geni EphB2, EphB3, ephB4 e ephrin-B1, utilizzando invece la curva standard per EphB1 e ephrin-B2. Per ogni campione, il livello di espressione del gene d'interesse è stato rapportato a quello misurato nel muscolo scheletrico normale e riportato in grafico come fold increase in scala logaritmica.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei singoli risultati è stata fatta tramite test di Student per campioni indipendenti, considerando significativi valori di $p < 0.05$. Il test statistico di Pearson è stato utilizzato per valutare la correlazione tra il livello di espressione dei ligandi ephrin-B1-B2 e dei loro recettori (EphB1, B2 e B4 per ephrin-B2, ephB1, B2 e B3 per ephrin-B1).

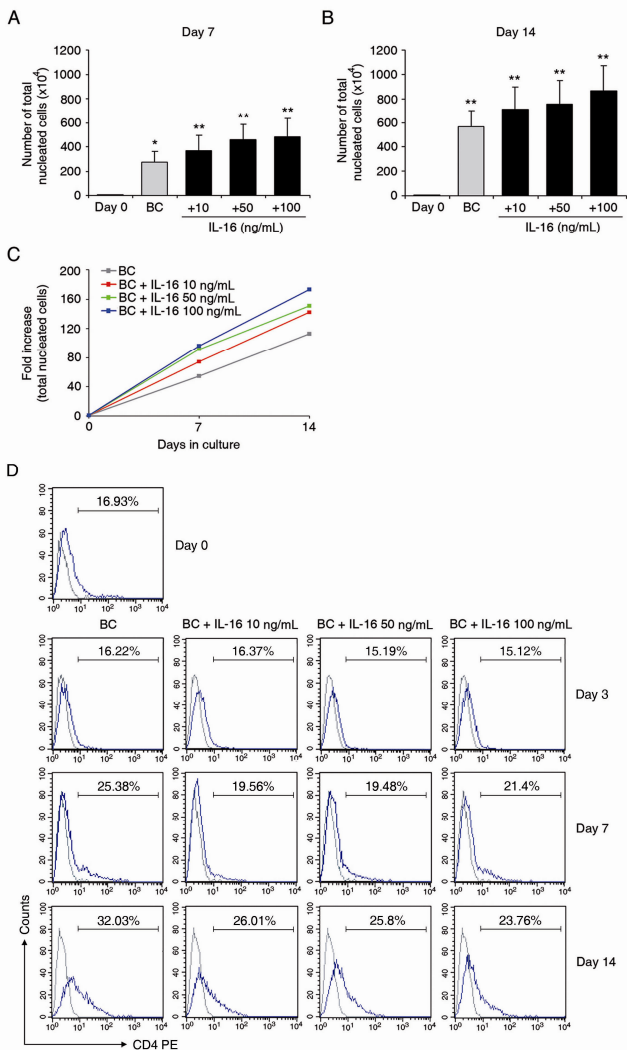
RISULTATI E DISCUSSIONE

Articolo I

Espansione delle cellule CD34⁺ tramite IL-16

Vari studi precedenti hanno dimostrato che cellule CD34⁺ isolate da sangue di CO possono essere espanse in vitro in presenza di SCF, FL, TPO, IL-3 e IL-6 [112-114]. In questo lavoro, accanto alle citochine sovra-mensionate, che rappresentano il cocktail di base (BC), è stata utilizzata l'IL-16 a diverse concentrazioni, 10-50-100 ng/ml.

Contando le cellule dopo 7 e 14 giorni di coltura, è emerso che la presenza dell'IL-16 aumenta in modo significativo il livello di espansione delle cellule rispetto al cocktail di base in modo direttamente proporzionale alla concentrazione utilizzata (Figura I.1A-B-C). Per le cellule coltivate con il solo cocktail di base si sono ottenuti fold increase rispetto al giorno 0 di 54.27 (giorno 7) e 113.05 (giorno 14); in presenza dell'IL-16, a 10-50-100 ng/ml, sono stati calcolati rispettivamente valori di 74.09, 91.55, 96.58 al giorno 7 e 142.58, 150.62, 172.87 al giorno 14 (Figura I.1C).



Copyright: Stem Cells Dev. 12 Nov 2008

Figura I.1. Effetti dell'IL-16 sull'espansione in vitro delle cellule CD34⁺, coltivate con il solo cocktail di base (BC) e con l'aggiunta dell'IL-16 a 10-50-100 ng/ml. (A e B) Numero delle cellule nucleate totali dopo 7 e 14 giorni di coltura. (C) Fold-increase. I risultati sono presentati come media \pm Dev St (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (D) Analisi citofluorimetrica dell'espressione del CD4 sulle cellule CD34⁺ al giorno 0 e dopo 3, 7 e 14 giorni di coltura

Espressione del CD4

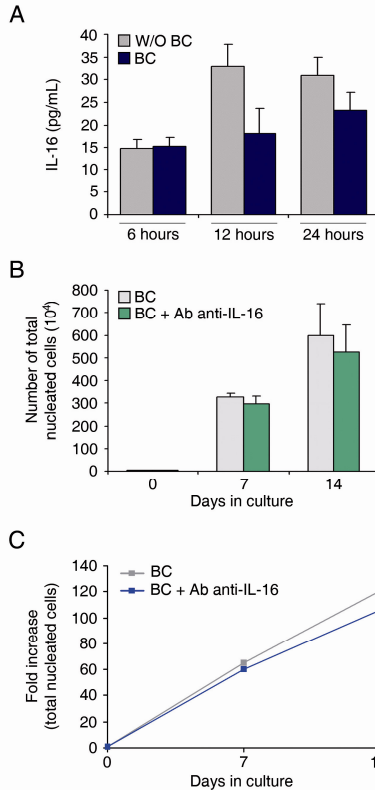
Poiché il recettore naturale dell'IL-16 è il CD4 [42], è stata valutata la sua espressione sulle cellule CD34⁺ a giorno 0 e dopo 3, 7 e 14 giorni di coltura.

Mentre al giorno 3 la percentuale delle cellule CD34⁺CD4⁺ è pressoché uguale al giorno 0, si osserva un aumento, in tutte le condizioni, sia al giorno 7 che al giorno 14, con valori però leggermente più bassi in presenza dell'IL-16 rispetto alla condizione basale (Figura I.1D).

Dai risultati sembra che l'IL-16 sia in grado di modulare in modo negativo l'espressione del CD4. Visto tale andamento e l'effetto dell'IL-16 durante l'intera fase di coltura, si può anche ipotizzare che l'IL-16 agisca sulle cellule CD34⁺ non solo attraverso il CD4 ma anche coinvolgendo altri co-recettori [115,116].

Analisi dell'IL-16 endogena

E' noto che le cellule CD34⁺ sono in grado di produrre IL-16 [48]. Per valutare la concentrazione totale di IL-16 a cui le cellule sono esposte, è stata misurata l'IL-16 endogena prodotta dalle cellule CD34⁺ coltivate in presenza o assenza del cocktail di base (Figura I.2A).



Copyright: Stem Cells Dev. 12 Nov 2008

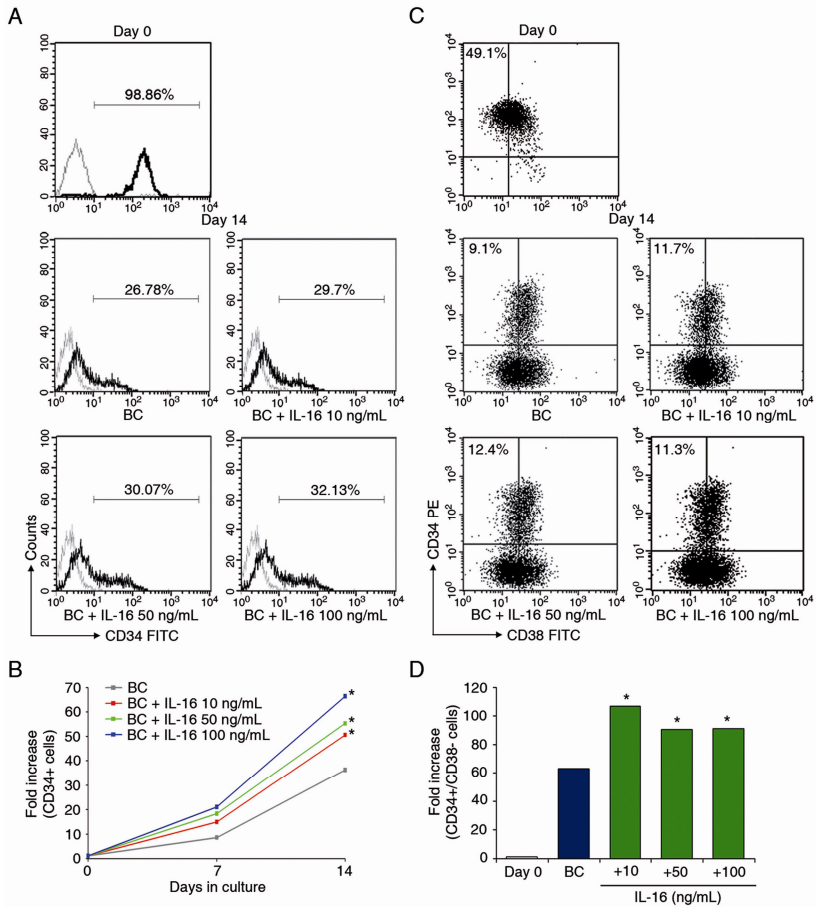
Figura I.2. IL-16 endogena. **(A)** Quantifica dell'IL-16 prodotta dalle cellule CD34⁺ coltivate in assenza di citochine (W/O BC) e con il cocktail di base (BC). **(B e C)** Effetto dell'anticorpo anti-IL-16 sull'espansione delle cellule CD34⁺ coltivate in presenza del cocktail di base (BC). **(B)** Numero di cellule totali (**p*<0.05). **(C)** Fold-increase

Dopo 6 ore di coltura, il livello di IL-16 prodotta dalle cellule è simile in entrambe le condizioni e aumenta dopo 12 e 24 ore, raggiungendo valori più alti in assenza del cocktail di base.

A questo punto è stato analizzato il possibile effetto dell'IL-16 endogena sull'espansione delle cellule CD34⁺. Le cellule CD34⁺ sono state coltivate in presenza del cocktail di base, con o senza anticorpo neutralizzante anti-IL-16. Il numero di cellule ottenuto dopo 7 e 14 giorni di coltura evidenzia un effetto inibitorio dell'anticorpo sull'espansione cellulare (298.75 ± 49.1 x10⁴ cellule a giorno 7, 526.5 ± 101.3 x10⁴ cellule a giorno 14; fold increase rispettivamente di 59.75 e 105.375) rispetto alla condizione di controllo (326.25 ± 33.98 x10⁴ cellule a giorno 7, 600 ± 94.3 x10⁴ cellule a giorno 14; fold increase di 65.25 e 120 rispettivamente) (Figura I.2B-C). Questi dati dimostrano che l'IL-16 endogena ha un effetto sulla proliferazione delle cellule CD34⁺.

Ruolo dell'IL-16 nell'espansione delle cellule CD34⁺

La buona riuscita di un trapianto è strettamente collegata al numero di cellule CD34⁺ trapiantate. Per questo la messa a punto di un sistema per l'espansione delle cellule CD34⁺ in vitro è fondamentale per le future applicazioni terapeutiche. Per vedere l'effetto dell'IL-16 nell'espansione delle cellule CD34⁺ di CO è stata valutata l'espressione del CD34 dopo 14 giorni di coltura. (Figura I.3A).



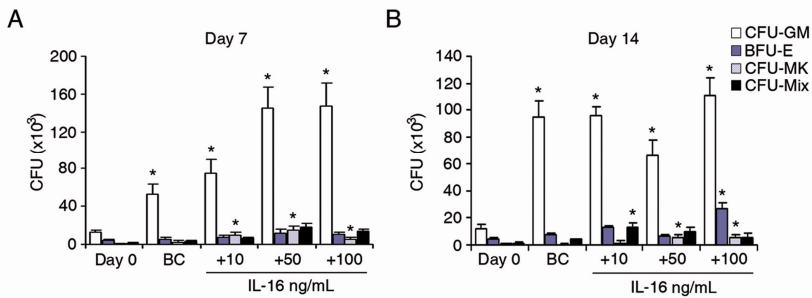
Copyright: Stem Cells Dev. 12 Nov 2008

Figure I.3. Analisi citofluorimetrica delle cellule CD34⁺ prima e dopo espansione in vitro. **(A)** Espressione del CD34. **(B)** Fold-increase del numero di cellule CD34⁺. **(C)** Espressione del CD34 e del CD38. **(D)** Fold-increase del numero di cellule CD34⁺CD38⁻ (**p* < 0.05).

I risultati ottenuti dimostrano che, anche se più bassa rispetto al giorno 0, la percentuale delle cellule CD34⁺ è più alta in presenza dell'IL-16 di quella registrata in condizione basale ed aumenta in funzione della concentrazione della citochina. Inoltre, si osserva un significativo aumento del numero delle cellule CD34⁺ (Figura I.3B).

L'effetto dell'IL-16 è stato valutato anche sulla popolazione delle CSE più primitive CD34⁺CD38⁻. Nonostante non si osservi una variazione significativa della percentuale di cellule CD34⁺CD38⁻ (Figura I.3C), il numero di cellule CD34⁺CD38⁻ che si ottiene con l'IL-16 è significativamente più alto rispetto a quello ottenuto con il solo cocktail di base (Figura I.3D). L'aggiunta dell'IL-16 aumenta in modo significativo il numero dei progenitori emopoietici, come dimostrato dai saggi di coltura a breve termine, sia dopo 7 (Figura I.4A) che 14 giorni di coltura (Figura I.4B).

I risultati ottenuti dimostrano che l'IL-16 favorisce l'espansione ed il differenziamento delle cellule, mantenendo però anche la sottopopolazione dei progenitori.



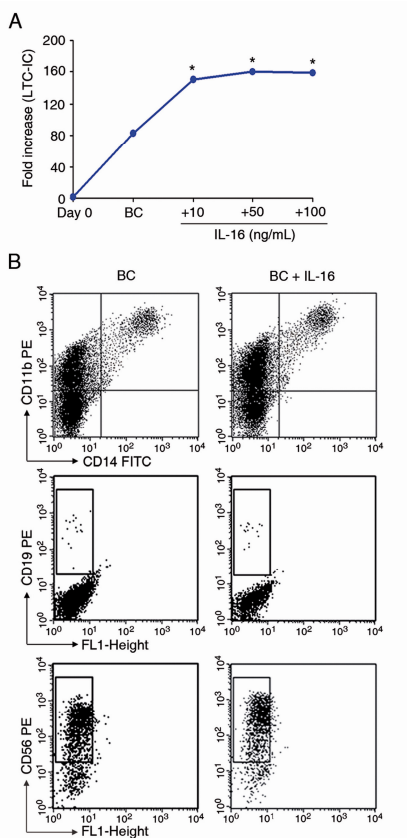
Copyright: Stem Cells Dev. 12 Nov 2008

Figura I.4. Effetto dell'IL-16 sulla popolazione dei progenitori emopoietici dopo 7 (A) e 14 (B) giorni di coltura (* $p < 0.05$).

Per valutare l'effetto dell'IL-16 sulle cellule staminali più alte, dopo 14 giorni di espansione le cellule sono state coltivate in LTC-IC, seguita poi da saggio CFU. La figura I.5A mostra che, aggiungendo IL-16 al cocktail di base, il numero di CFU per LTC-IC aumenta, con un fold-increase massimo di 160.8 ± 3.45 con 50 ng/ml di IL-16 (vs. 83 ± 2.89 BC). Questi risultati dimostrano che l'IL-16 preserva ed espande la popolazione più alta delle CSE.

Dal momento che la ricostituzione dell'emopoiesi richiede la presenza di progenitori mieloidi e linfoidi, è stata valutata la capacità delle cellule, espanso con o senza IL-16, di differenziare in cellule mieloidi e linfoidi. A questo scopo, cellule $CD34^+$ espanso per 14 giorni sono state coltivate in un

sistema LTC-IC modificato in grado di indurre il differenziamento in cellule mieloidi ($CD11b^+CD14^+$), linfociti B ($CD19^+$) e cellule NK ($CD56^+$).



Copyright: Stem Cells Dev. 12 Nov 2008

Figura I.5. Colture a lungo termine LTC-IC e LTC-B-NK. **(A)** LTC-IC. **(B)** LTC-B-NK. Differenziamento delle cellule $CD34^+$, coltivate in presenza del solo cocktail di base (BC) e con l'aggiunta dell'IL-16, in cellule mieloidi ($CD11b^+CD14^+$), linfociti B ($CD19^+$) e cellule NK ($CD56^+$).

Dopo 6 settimane in LTC-B-NK, si osserva l'espressione di marcatori linea-specifici, che indicano il differenziamento delle cellule sia in senso mieloide che linfoide (B e NK) (Figura I.5B). Si deduce quindi che il sistema utilizzato per l'espansione in vitro delle cellule CD34⁺ non altera la capacità differenziativa delle CSE.

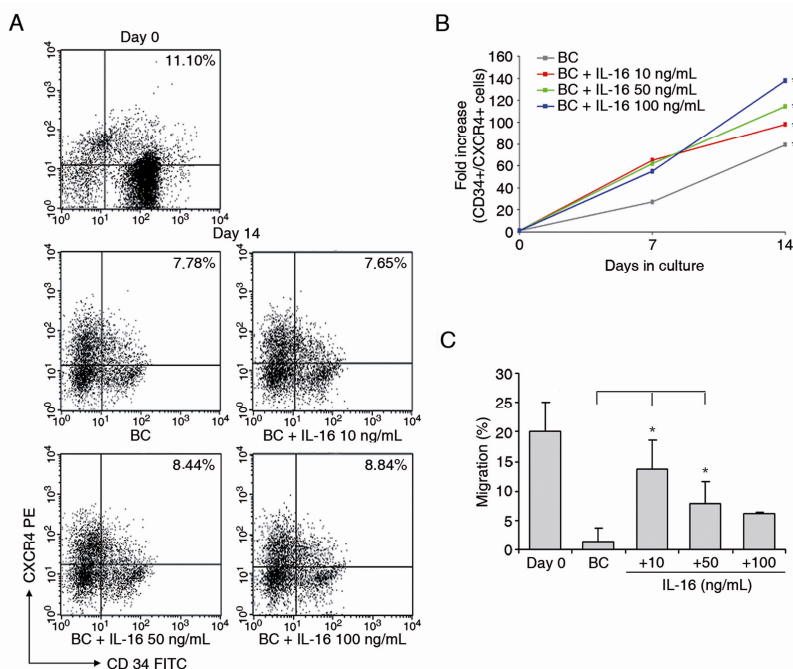
Analisi della capacità migratoria delle cellule CD34⁺ espanse

La ricostituzione dell'emopoiesi dopo trapianto dipende in parte dalla capacità delle cellule di raggiungere e ripopolare il midollo osseo. Uno dei segnali coinvolti in questo processo di *homing* è quello indotto dal CXCR4 e dal suo ligando SDF-1 α .

Per questo motivo, è stata valutata l'espressione del CXCR4 sulle cellule CD34⁺ espanse nelle varie condizioni. Come si osserva in figura I.6A, la percentuale delle cellule CD34⁺CXCR4⁺ dopo 14 giorni di coltura risulta simile in tutte le condizioni. Significativo è invece l'aumento del numero di cellule CD34⁺CXCR4⁺ ottenuto aggiungendo l'IL-16 al cocktail di base (Figura I.6B).

Oltre all'espressione del CXCR4, è stata anche valutata la capacità delle cellule espanse con e senza IL-16 di migrare in

risposta a SDF-1 α . In accordo con dati già pubblicati [41], l'espansione è accompagnata da una riduzione della capacità delle cellule di migrare (Figura I.6C).



Copyright: Stem Cells Dev. 12 Nov 2008

Figura I.6. (A) Analisi citofluorimetrica dell'espressione di CD34 e CXCR4 al giorno 0 e dopo 14 giorni di espansione. (B) Fold increase delle cellule CD34⁺CXCR4⁺ dopo 7 e 14 giorni di coltura. (C) Migrazione delle cellule CD34⁺ al giorno 0 e dopo 14 giorni di espansione in presenza del solo cocktail di base e con l'aggiunta dell'IL-16.

E' però importante sottolineare che la percentuale di cellule in grado di migrare risulta significativamente più alta per le cellule espanse in presenza dell'IL-16 in tutte le concentrazioni rispetto alla condizione basale (13.69% BC + IL-16 10 ng/ml vs. 1.39 BC). Questo aumento non può essere giustificato sulla base della variazione della % di cellule CD34⁺CXCR4⁺; si può invece supporre che l'IL-16 partecipi alla regolazione della migrazione cellulare attraverso altre molecole di adesione.

Articolo II

Preparazione e caratterizzazione degli scaffold PCL, PCL-HA, PCL/TZ, PCL/TZ-HA

Uno degli obiettivi dell'ingegneria del tessuto osseo è quello di produrre uno scaffold che mimi la matrice ossea e sia in grado sostenere e guidare la formazione di nuovo tessuto [65]. In questo lavoro, sono stati preparati scaffold diversi con lo scopo di valutare quale di questi, in base alle loro proprietà chimiche e strutturali, poteva essere utilizzato con risultati migliori nella rigenerazione del tessuto osseo. I biomateriali sono stati realizzati con policaprolattone (PCL), proteina termoplastica zeina (TZ) ed idrossiapatite (HA), ottenendo i

seguenti scaffold: PCL, PCL-HA, PCL/TZ, PCL/TZ-HA (Tabella II.1).

Tabella II.1 Composizione degli scaffold

Composizione scaffold	PCL (% del peso)	TZ (% del peso)	HA (% del peso)
PCL	100	-	-
PCL-HA	80	-	20
PCL/TZ	60	40	-
PCL/TZ-HA	48	32	20

PCL/TZ e PCL/TZ-HA sono stati preparati mescolando insieme due materiali immiscibili, ottenendo così biomateriali a microstruttura eterogenea, come si osserva dalla presenza di due picchi di degradazione a 330°C e 410°C, corrispondenti rispettivamente a TZ e PCL (Figura II.1).

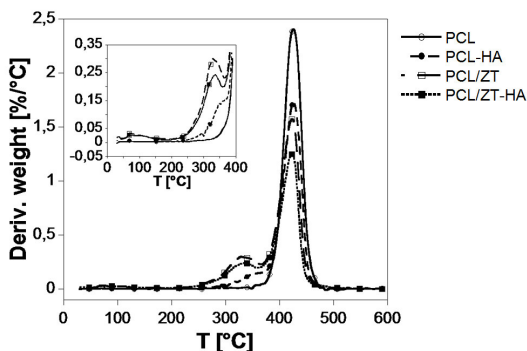


Figura II.1 Analisi della stabilità termica dei biomateriali

La presenza di HA non ha effetti significativi sulla miscibilità delle due sostanze, mentre determina una diminuzione della duttilità dello scaffold (Tabella II.2). I valori σ_Y , σ_B , ϵ_B registrati evidenziano anche una maggiore durezza degli scaffold contenenti TZ (Tabella II.2).

Tabella II.2 Durezza degli scaffold

Scaffold	σ_Y [MPa]	ϵ_B [mm/mm]	σ_B [MPa]
PCL	22.5±1.2	9.17±1.5	44.7±3.1
PCL-HA	17.28±0.65	1.02±0.09	16.25±0.86
PCL/TZ	10.87±0.085	0.095±0.03	9.01±0.182
PCL/TZ-HA	7.68±0.34	0.052±0.013	6.92±0.36

In presenza di TZ, l'angolo di contatto risulta inferiore a quello misurato per PCL e PCL-HA, mentre non si osservano variazioni, dovute all'aggiunta di HA, tra PCL e PCL-HA e tra PCL/TZ e PCL/TZ-HA, (Figura II.2).

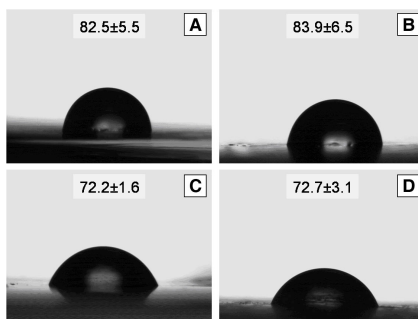


Figura II.2 Angolo di contatto (A) PCL. (B) PCL-HA. (C) PCL/TZ. (D) PCL/TZ-HA.

In figura II.3 è mostrato l'assorbimento dell'acqua da parte degli scaffold. Mentre PCL e PCL-HA mantengono il loro peso praticamente invariato, per PCL/TZ e PCL/TZ-HA è stato registrato, inizialmente, un consistente aumento di peso dovuto all'assorbimento dell'acqua e, poi, una drastica diminuzione, causata dalla degradazione di TZ.

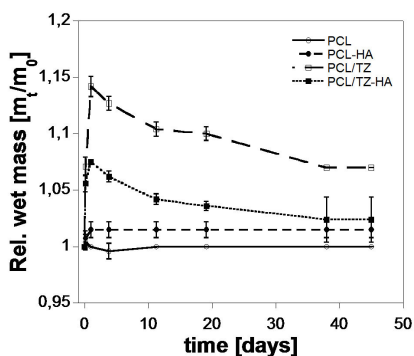


Figura II.3 Analisi dell'assorbimento dell'acqua

La microscopia elettronica a scansione di PCL/TZ e PCL/TZ-HA mostra la formazione di pori dovuta alla degradazione della componente TZ in acqua (Figura II.4).

I risultati ottenuti sottolineano la stretta correlazione esistente tra composizione chimica dello scaffold e idrofilicità. In particolare, è stato dimostrato che l'aggiunta di TZ a PCL determina un aumento dell'idrofilicità del biomateriale.

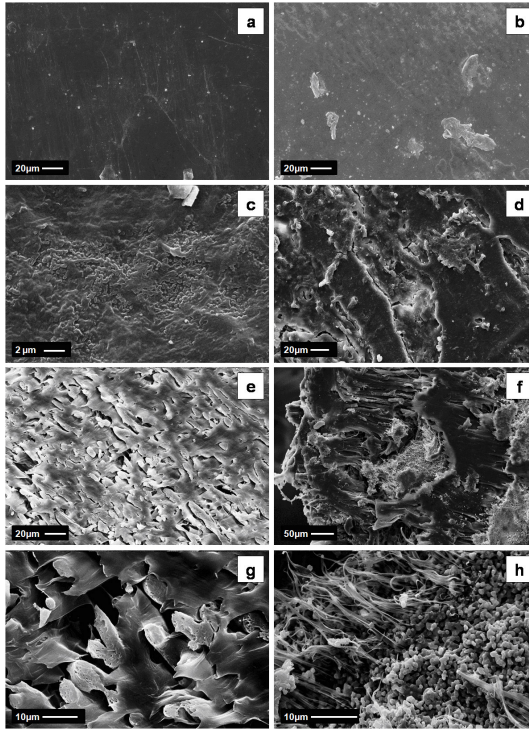


Figura II.4. Microscopia elettronica a scansione di PCL/TZ e PCL/TZ-HA. (A) PCL/TZ (B) PCL/TZ-HA. (C) superficie, (E) e (G) sezione trasversale di PCL/TZ dopo 19 giorni in acqua. (D) superficie, (F) e (H) sezione trasversale di PCL/TZ-HA dopo 19 giorni in acqua.

Differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in osteoblasti

Cellule staminali mesenchimali sono state isolate da midollo osseo di coniglio sfruttando l'adesione alla plastica in un sistema di coltura specifico per le CSM. Per valutare la loro

capacità di differenziare in osteoblasti, le CSM sono state coltivate per 3 settimane in un terreno che induce l'osteogenesi (Figura II.5).

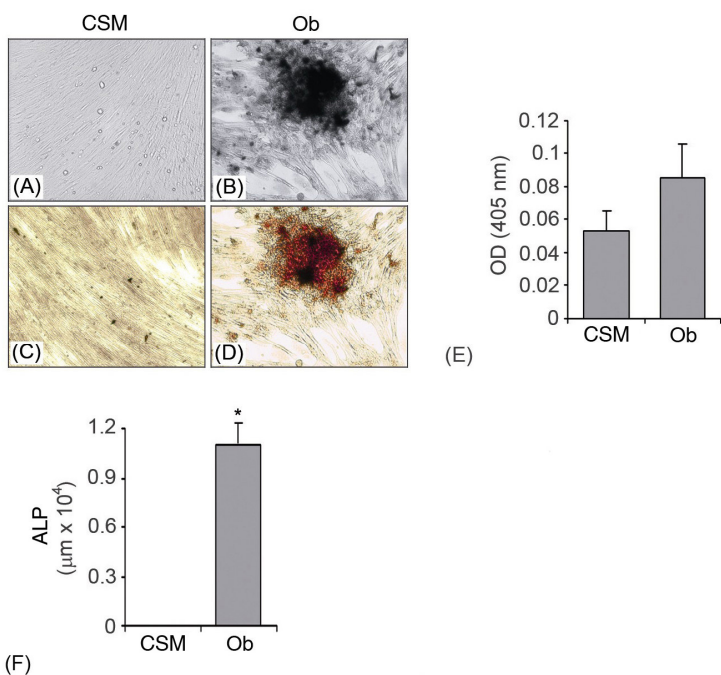


Figura II.5. Differenziamento in osteoblasti delle cellule staminali mesenchimali isolate da coniglio. **(A)** Cellule staminali mesenchimali isolate di coniglio coltivate in mesencult (CSM). **(B)** Cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo di coniglio coltivate in terreno per il differenziamento in osteoblasti (Ob). **(C)** Colorazione con Alizarin Red S delle CSM. **(D)** Colorazione con Alizarin Red S (ARS) delle cellule differenziate in osteoblasti (Ob). **(E)** Quantifica dell'ARS. **(F)** Quantifica dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP)

Già dopo la prima settimana di coltura, le cellule subiscono cambiamenti morfologici e tendono ad orientarsi a formare dei noduli. Inoltre le cellule producono depositi granulari amorfi, sempre più numerosi con l'avanzare della fase di coltura (Figura II.5A-B). Colorando le cellule con ARS, che colora in maniera specifica di rosso i depositi di calcio, è stato dimostrato che questi granuli sono proprio depositi minerali prodotti dalle cellule durante l'osteogenesi (Figura II.5C-D). Il contenuto totale di calcio è stato valutato attraverso quantificazione dell'ARS con metodo colorimetrico (Figura II.5E). Come controllo, sono state colorate e analizzate anche cellule coltivate in mesencult.

Un marcatore comunemente utilizzato per la valutazione del differenziamento degli osteoblasti è l'ALP. L'elevato livello di ALP delle cellule coltivate per 3 settimane in terreno differenziativo, rispetto a quelle mantenute in mesencult, dimostra il differenziamento in osteoblasti (Figura II.5F).

Questi risultati dimostrano il potenziale osteogenico delle cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo di coniglio, quando coltivate in un terreno osteo-induttivo.

Proliferazione e differenziamento delle CSM su scaffold

Per valutare la capacità degli scaffold di sostenere l'adesione, la proliferazione ed il differenziamento in osteoblasti, CSM di coniglio sono state coltivate su scaffold PCL, PCL-HA, PCL/TZ, PCL/TZ-HA per 3 settimane in terreno per il differenziamento osteogenico. La proliferazione cellulare è stata valutata tramite quantifica del DNA dopo 24 ore, 7 e 21 giorni di coltura. I risultati ottenuti dimostrano che le cellule sono in grado di proliferare su tutti gli scaffold, con differenze che dipendono dalla composizione chimica e dalle caratteristiche dello scaffold. Tra gli scaffold analizzati, PCL/TZ-HA risulta il migliore per l'adesione e la proliferazione delle cellule (Figura II.6A), probabilmente grazie alla sua maggiore idrofilicità (vedi Figure II.2 e II.3) ed alle proprietà della zeina. Il costrutto CSM-PCL/TZ-HA è anche quello caratterizzato da un maggior livello di ALP e ARS (Figura II.6B-C), valutate dopo 3 settimane di coltura.

Il differenziamento osteogenico è accompagnato dall'espressione di una serie di proteine specifiche tra cui l'osteopontina (OPN). Qui, l'espressione dell'OPN è stata valutata tramite PCR semiquantitativa su cellule coltivate su scaffold in terreno differenziativo per 3 settimane. La figura

II.6D mostra un livello più alto di trascritto per le cellule coltivate su PCL/TZ-HA.

Questi risultati insieme dimostrano che lo scaffold PCL/TZ-HA possiede una maggiore capacità, rispetto agli altri scaffold analizzati, di sostenere il differenziamento in osteoblasti, suggerendo un ruolo fondamentale della fase TZ nel favorire l'adesione, la proliferazione ed il differenziamento delle CSM.

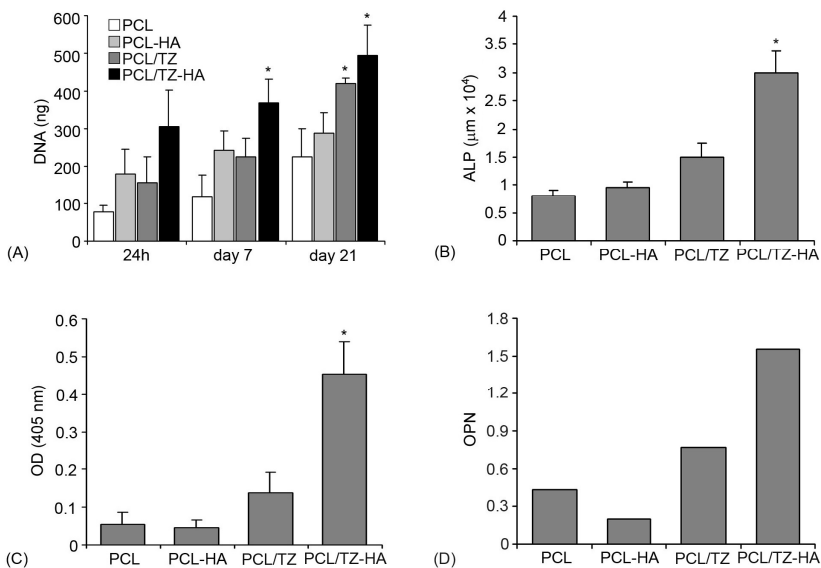


Figura II.6. Differenziamento in osteoblasti di cellule staminali mesenchimali coltivate su scaffold PCL, PCL-HA, PCL/TZ, PCL/TZ-HA. **(A)** Quantifica del DNA dopo 24 ore, 7 e 21 giorni di coltura. **(B)** Analisi dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP) dopo 21 giorni di coltura. **(C)** Quantifica dell'alizarin Red S dopo 21 giorni di coltura. **(D)** Espressione dell'osteopontina (OPN) dopo 21 giorni di coltura.

La presenza di TZ potrebbe anche determinare una maggiore esposizione dei granuli di HA, favorendo l'interazione cellule-idrossiapatite e quindi contribuendo ad aumentare il suo effetto osteogenico.

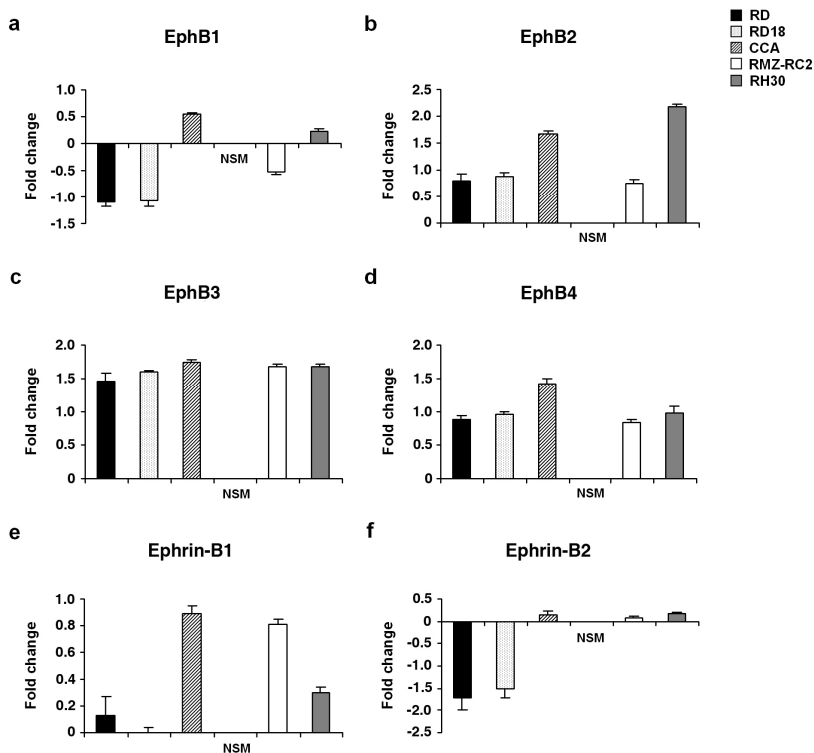
Articolo III

Espressione di Eph/ephrin in linee cellulari di RMS

L'espressione dei recettori EphB1-B4 e dei ligandi ephrin-B1-B2 è stata valutata su linee cellulari di RMS embrionale (RD, RD18 e CCA) ed alveolare (RMZ-RC2 e RH30) attraverso real-time PCR. Come mostrato in figura III.1, in tutte le linee cellulari, senza differenze correlabili tra RMS embrionali ed alveolari, è stata registrata una generale de-regolazione dell'espressione genica sia dei recettori sia dei ligandi rispetto al muscolo scheletrico normale.

Il livello di espressione di EphB1 è minore in RD, RD18 e RMZ-RC2, maggiore in CCA e RH30 rispetto al muscolo scheletrico normale (Figura III.1A). EphB2-B4 risultano sovra-espressi rispetto al tessuto normale in tutte le linee cellulari (Figura III.1B-D). Il ligando ephrin-B1 è espresso ad un livello

simile al muscolo scheletrico in RD18, mentre è de-regolato nelle altre linee cellulari (Figura III.1E).



Copyright: Anticancer Res. 2008;28(2A):763-9

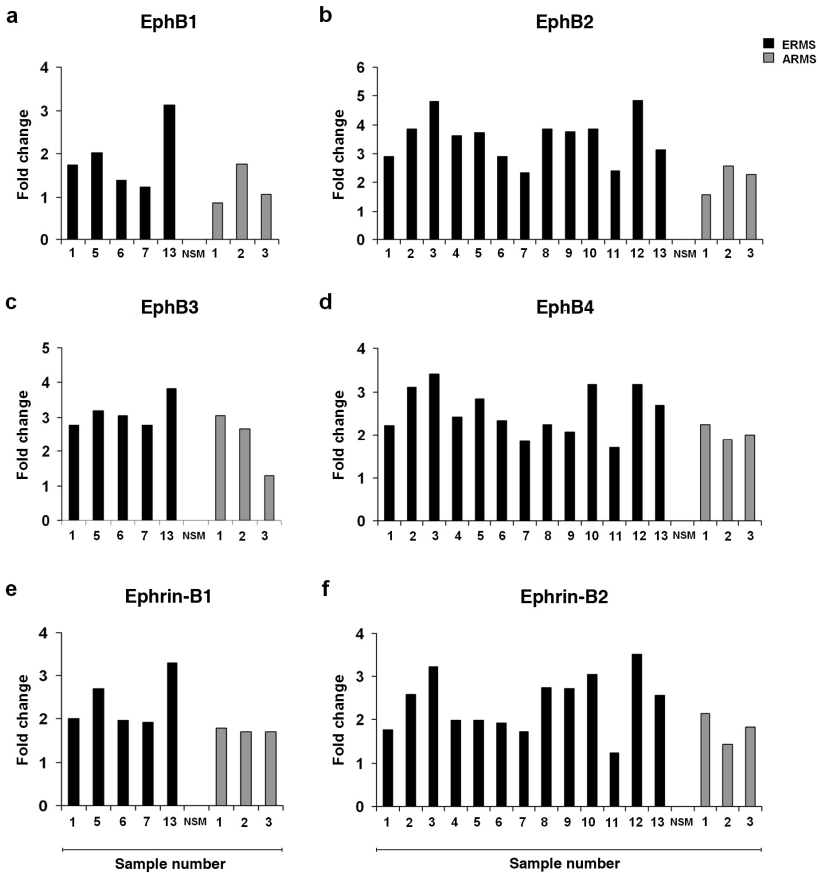
Figura III.1. Espressione di EphB1-B4 e di Ephrin-B1-B2 in linee cellulari di RMS. Le linee cellulari di RMS RD, RD18, CCA (embrionali), RMZ-RC2 e RH30 (alveolari) sono state analizzate tramite real-time PCR per l'espressione di EphB1 (A), EphB2 (B), EphB3 (C), EphB4 (D), Ephrin-B1 (E), Ephrin-B2 (F). Il livello di espressione genica per ogni campione è espresso come fold-increase in scala logaritmica rispetto al valore registrato nel muscolo scheletrico normale (NSM)

Infine, ephrin-B2 risulta leggermente sovra-espresso in CCA, RMZ-RC2 e RH30 mentre si osserva una significativa diminuzione in RD e RD18 (Figura III.1F).

Espressione di Eph/ephrin in tumori primari

Tumori primari di RMS embrionale ed alveolare sono stati analizzati tramite real time PCR per l'espressione di EphB1-B4 ed ephrin-B1-B2. In generale, ligandi e recettori risultano sovra-espressi in modo significativo in tutti i tumori (Figura III.2).

Per quanto riguarda i recettori, il livello di espressione di EphB1 è abbastanza simile in tutti i campioni, senza differenze sostanziali tra i RMS embrionali e quelli alveolari, con unica eccezione del campione 13 (fold 3.12 vs. muscolo scheletrico, Figura III.2A). EphB2 è il recettore maggiormente espresso, con valori anche più di 4 volte superiori rispetto al muscolo scheletrico nei RMS embrionali, intorno a 2 negli alveolari (Figura III.2B). EphB3 presenta un livello di espressione nei tumori embrionali di 2.76-3.82 volte maggiore del muscolo scheletrico, negli alveolari di 1.29-3.05 volte (Figura III.2C). EphB4 presenta un incremento intorno a 2 in tutti i tumori alveolari, variabile tra 2.76 e 3.82 in quelli embrionali (Figura III.2D).



Copyright: Anticancer Res. 2008;28(2A):763-9

Figura III.2. Espressione di EphB1-B4 e di Ephrin-B1-B2 in campioni di RMS embrionali (ERMS, 13 campioni) e RMS alveolari (ARMS, 3 campioni). (A) EphB1, (B) EphB2, (C) EphB3, (D) EphB4, (E) Ephrin-B1 e (F) Ephrin-B2. Il livello di espressione genica per ogni campione è espresso come fold-increase in scala logaritmica rispetto al valore registrato nel muscolo scheletrico normale (NSM).

I ligandi ephrin-B1-B2 sono sovra-espresi nei RMS embrionali rispettivamente di 1.91-3.30 e 1.22-3.52 volte; nei tumori alveolari, ephrin-B1 è sovra-espreso di circa 2 volte in tutti i campioni mentre il livello di espressione di ephrin-B2 è maggiore di 1.42-2.12 volte rispetto al muscolo scheletrico (Figura III.2E-F).

Nonostante non sia stato identificato un profilo specifico diverso per i RMS di tipo embrionale ed alveolare, i risultati ottenuti dimostrano che l'espressione di Eph/ephrin è significativamente alterata nei tumori primari analizzati, tanto da suggerire un loro ruolo biologico nei RMS.

Correlazione tra l'espressione dei ligandi ephrin-B e dei recettori EphB nei tumori di RMS

L'interazione Eph/ephrin induce un segnale bi-direzionale che può controllare l'interazione cellula-cellula, la motilità cellulare e l'invasività tumorale [117]. Per questo motivo, studiare la correlazione tra l'espressione dei ligandi e dei loro rispettivi recettori potrebbe essere importante per capire il ruolo svolto da Eph/ephrin nei RMS. La correlazione tra ephrin-B1 ed EphB1-B2-B4 e tra ephrin-B2 ed EphB1-B2-B3 è stata analizzata tramite il test di Pearson (Tabella III.1).

Tabella III.1 Correlazioni ephrin-B vs. EphB, EphB2 vs. EphB4

Rhabdomyosarcoma

	Embryonal type		Alveolar type	
	n	r (p-value)	n	r (p-value)
Ephrin-B1 vs.				
EphB1	5	0.97 (<0.01)	3	-0.67 (n.s.)
EphB2	5	0.58 (n.s.)	3	-0.96 (n.s.)
EphB3	5	0.94 (<0.05)	3	0.65 (n.s.)
Ephrin-B2 vs.				
EphB1	5	0.94 (<0.05)	3	-0.97 (n.s.)
EphB2	13	0.88 (<0.01)	3	-0.95 (n.s.)
EphB4	13	0.76 (<0.01)	3	0.95 (n.s.)
EphB2 vs.				
EphB4	13	0.81 (<0.01)	3	-1.00 (<0.01)

Abbreviazioni: n: numero campioni, r: coefficiente di correlazione di Pearson, n.s.: non significativo

Copyright: Anticancer Res. 2008;28(2A):763-9

Nei RMS embrionali, è stata registrata una correlazione positiva tra il ligando ephrin-B1 ed i ricettori EphB1 ($r = 0.97$,

$p < 0.01$) e EphB3 ($r = 0.94$, $p < 0.05$) e tra ephrin-B2 e EphB1 ($r = 0.94$, $p < 0.05$), EphB2 ($r = 0.88$, $p < 0.01$) e EphB4 ($r = 0.76$, $p < 0.01$). Nessuna correlazione è stata invece osservata nei tumori alveolari, forse a causa del limitato numero di campioni analizzati (Tabella III.1).

Correlazione tra EphB2 ed EphB4 nei tumori di RMS

Recentemente è stato dimostrato che l'aumento di espressione di EphB2 ed EphB4 è associata ad una maggiore aggressività del tumore alla mammella [118]. Nel tumore al colon, è stata dimostrata una correlazione positiva tra l'espressione di EphB2 e di EphB4, strettamente collegate anche con l'aggressività del tumore [119].

Per valutare se nei RMS l'espressione di EphB2 sia correlata con quella di EphB4 è stato utilizzato il test statistico di Pearson. Come mostrato in tabella III.1, EphB2 e EphB4 sono correlati in maniera positiva nei RMS embrionali ($r = 0.81$, $p < 0.01$), negativa in quelli alveolari ($r = -1.00$, $p < 0.01$). I risultati ottenuti supportano l'idea che Eph/ephrin svolgano un ruolo biologico nei RMS, con differenze tra i due tipi, alveolari ed embrionali.

CONCLUSIONI

- Un sistema per l'espansione ex vivo delle cellule staminali emopoietiche dovrebbe essere in grado di aumentare il numero delle cellule, mantenendone inalterate le capacità autorinnovative, proliferative e migratorie, indispensabili per la ricostituzione dell'emopoiesi a lungo termine. Questo lavoro evidenzia che l'IL-16, aggiunta a SCF, FL, TPO, IL-6 e IL-3, determina un aumento dell'espansione in vitro delle cellule staminali emopoietiche CD34⁺. La presenza dell'IL-16 determina un aumento del numero sia dei progenitori emopoietici che della popolazione più alta delle staminali e non altera la capacità delle cellule staminali di differenziare in cellule della linea mieloide e linfoide. Inoltre, in presenza dell'IL-16 la capacità migratoria delle cellule CD34⁺ espanse risulta maggiore di quella osservata nella condizione di coltura basale. I risultati, nel loro insieme, suggeriscono la possibilità di utilizzare l'IL-16 in future applicazioni cliniche. (**Articolo I**)
- Uno scaffold, per essere utilizzato in ingegneria clinica per la rigenerazione del tessuto osseo, deve essere in grado di sostenere e guidare la formazione del nuovo tessuto. In

questo lavoro, studi in vitro condotti su scaffold diversi di PCL hanno evidenziato che il costrutto PCL/TZ-HA è in grado di sostenere l'adesione e la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali di coniglio. In base ai risultati ottenuti, si deduce che lo scaffold PCL/TZ-HA è in grado non solo di supportare ma anche di promuovere il differenziamento delle cellule in osteoblasti (osteinduttività). Si può quindi supporre che lo scaffold PCL/TZ-HA possa essere utilizzato per la rigenerazione dell'osso in future applicazioni cliniche. **(Articolo II)**

- Vari studi precedenti hanno evidenziato una de-regolazione dell'espressione di recettori Eph e ligandi ephrin in diversi tumori. In questo studio è stato dimostrato che EphB1-B4 ed ephrin-B1-B2 sono sovra-espressi in tumori primari di rhabdomiosarcoma, sia di tipo alveolare che embrionale. Le correlazioni evidenziate tra l'espressione di ligandi e recettori e tra EphB2 ed EphB4 supportano l'ipotesi del ruolo biologico delle proteine analizzate nei RMS. **(Articolo III)**

REFERENZE

1. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the Crypt.. *Development* 1990;110: 1001-1020.
2. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4:7–25).
3. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niche. *Science* 2006;311:1880-1885.
4. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287–298.
5. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of “stemness”. *Exp Hematol* 2004;32:585–598.
6. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*.1981;292:154-156.
7. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:7634-7638.

8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147.
9. Young HE, Black AC Jr. Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;276:75-102.
10. Frisen J, Stem cell plasticity? *Neuron* 2002;35:415–418.
11. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.
12. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-1782.
13. Domen J, Weissman IL. Self-Renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today* 1999;5:201-208.
14. Metcalf D. *Blood lines*. AlphaMed Press 2007.
15. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol* 2005;26:426-433.
16. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzmán P. *Biology of human hematopoietic stem and progenitor*

- cells present in circulation. *Arch Med Res* 2003;34:476–488.
17. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defect of B-cell lymphopoiesis and bone-myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635–638.
 18. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004;20:707–718.
 19. Lorenz E, Uphoff ED, Reid TR, Shelton E. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection. *Radiology* 1951; 58:863-877.
 20. Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, Roan PL. Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer Res* 1956;16:258-261.
 21. Till JE, McCullough EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-222.
 22. Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick J. Cytokine stimulation of multilineage

- hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 1992;255:1137- 1141.
23. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58-62.
 24. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:2804-2808.
 25. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG- 1a cells. *J Immunol* 1984;133:157-165.
 26. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5320-5325.
 27. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID

- mouse bone marrow: Implications for gene therapy. *Nat Med* 1996;2:1329-1337.
28. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-245.
 29. Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, Hotta T, Kato S. Ex-vivo generation of CD34+ cells from CD34- hematopoietic stem cells. *Blood* 1999;94:4053-4059.
 30. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by adult bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2003;21:406-412.
 31. Broxmeyer HE. Colony assays of hematopoietic progenitor cells and correlations to clinical situations. *Crit Rev Oncol Hematol* 1984;1:227-257
 32. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 1989;74:1563-1570.
 33. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual

- human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3584-3588.
34. Ball LM, Egeler RM, EBMT Paediatric Working Party. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:S58-S64.
 35. Wang JC, Doedens M, Dick JE. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-Repopulating cell assay. *Blood* 1997;89:3919-3924.
 36. Bhatia M, Bonnet D, Kapp U, Wang JC, Murdoch B, Dick JE. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* 1997;186:619-624.
 37. Dorrell C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, JE Dick. Expansion of human cord blood CD34+CD38- cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* 2000;95:102-110.
 38. Herrera C, Sánchez J, Torres A, Bellido C, Rueda A, Alvarez MA. Early-acting cytokine-driven ex vivo

- expansion of mobilized peripheral blood CD34+ cells generates post-mitotic offspring with preserved engraftment ability in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Br J Haematol* 2001;114:920-930.
39. Levac K, Karanu F, Bhatia M. Identification of growth factor conditions that reduce ex vivo cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function in vivo. *Haematologica* 2005;90:166-172.
 40. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion *in vitro* of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9836-9841.
 41. Zhai QL, Qiu LG, Li Q, Meng HX, Han JL, Herzig RH, Han ZC. Short-term ex vivo expansion sustains the homing-related properties of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica* 2004;89:265-272.
 42. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 1996;17:476-481.

43. Onishi M, Nagayoshi K, Kitamura K, Hirai H, Takaku F, Nakauchi H. CD4^{dull+} hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow. *Blood* 1993;81:3217-3225.
44. Wineman JP, Gilmore GL, Gritzmacher C, Torbett BE, Muller-Sieburge CE. CD4 is expressed on murine pluripotent hematopoietic stem cells. *Blood* 1992;80:1717-1724.
45. Szilvassy SJ, Cory S. Phenotypic and functional characterization of competitive long-term repopulating hematopoietic stem cells enriched from 5-fluorouracil-treated murine marrow. *Blood* 1993;81:2310-2320.
46. Louache F, Debili N, Marandin A, Coulombel L, Vainchenker W. Expression of CD4 by human hematopoietic progenitors. *Blood* 1994;84:3344-3355.
47. Muench MO, Roncarolo MG, Namikawa R. Phenotypic and functional evidence for the expression of CD4 by hematopoietic stem cells isolated from human fetal liver. *Blood* 1997;89:1364-1375.
48. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and

- megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 2001;97:3075-3085.
49. Della Bella S, Nicola S, Timofeeva I, Villa ML, Santoro A, Berardi AC. Are interleukin-16 and thrombopoietin new tools for the in vitro generation of dendritic cells? *Blood* 2004;104:4020-4028.
 50. Friedenstein AJ. Osteogenic activity of transplanted transitional epithelium. *Acta Anat (Basel)* 1961;45:31-59.
 51. Friedenstein AJ, Chailakhajan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3:393-403.
 52. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267-274.
 53. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 1980;151:294-307.
 54. Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci* 1986;84:139-151.

55. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980;56:289–301.
56. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the intergrin system. *J Cell Mol Med* 2007;11:21-38.
57. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005;36S:S8-S12.
58. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739–2749.
59. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther* 2008;15:109-116.
60. Atala A. Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:83–96.
61. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:36-42.

62. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4:743–765.
63. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of art and future directions of scaffold-based bone engineering from biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:245-260.
64. Yang S, Leong K, Du Z, Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Eng* 2001;7:679-689.
65. Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA, Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1999;1:19–46.
66. Ignatius AA, Betz O, Augat P, Claes LE. *In Vivo* investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res* 2001;58:701–709.
67. Corden TJ, Jones IA, Rudd CD, Christian P, Downes S, McDougall KE. Physical and biocompatibility properties of poly-ε-caprolactone produced using in situ polymerisation: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. *Biomaterials* 2000;21:713-724.

68. Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* 2007;28:1664-1671.
69. Gong S, Wang H, Sun Q, Xue S, Wang J. Mechanical properties and in vitro biocompatibility of porous zein scaffolds. *Biomaterials* 2006;27:3793-3799.
70. Dong J, Sun Q, Wang J. Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility. *Biomaterials* 2004;25:4691-4697.
71. Sun Q, Dong J, Lin Z, Yang B, Wang J. Comparison of Cytocompatibility of Zein Film with Other Biomaterials and Its Degradability in Vitro. *Biopolymers* 2005;78:268-274.
72. Salerno A, Oliviero M, Di Maio E, Iannace S. Thermoplastic foams from zein and gelatin. *Int Polym Proc* 2007;22:480-488.
73. Soltysova A, Altanerova V, Altaner C. Cancer stem cells. *Neoplasma* 2005;52:435-440.
74. Wu XZ. Origin of Cancer Stem Cells: The Role of Self-Renewal and Differentiation. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:407-414.

75. Clarke MF. A self-renewal assay for cancer stem cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56:s64–s68.
76. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730–737.
77. Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983–3988.
78. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007;132:2542–2556.
79. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030–1037.
80. Fomchenko EI, Holland EC. Stem cells and brain cancer. *Exp Cell Res* 2005;306:323–329.
81. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2332–2336.

82. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004;23:7274–7282.
83. Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:43–47.
84. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program. 1999; NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD.
85. Qualman SJ, Coffin CM, Newton WA, Hojo H, Triche TJ, Parham DM et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study: update for pathologists. *Pediatr Dev Pathol* 1998;1:550-561.
86. McDowell HP. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child* 2003;88:354-357.
87. Breitfeld PP, Meyer WH. Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity. *The Oncologist* 2005;10:518-527.
88. Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2001;20:5736–5746.

89. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 1987;238:1717-1720.
90. Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:462-475.
91. Eph Nomenclature Committee. Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. *Cell* 1997;90:403-404.
92. Brückner K, Klein R. Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:375-382.
93. Coulthard MG, Duffy S, Down M, Evans B, Power M, Smith F, Stylianou C, Kleikamp S, Oates A, Lackmann M, Burns GF, Boyd AW. The role of the Eph-ephrin signalling system in the regulation of developmental patterning. *Int J Dev Biol* 2002;46:375-384.
94. Cheng N, Brantley DM, Chen J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:75-85.
95. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362-374.

96. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006;441:444-450.
97. Nakamoto M, Bergemann AD. Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microsc Res Tech* 2002;59:58-67.
98. Surawska H, Ma PC, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:419-433.
99. Tang XX, Zhao H, Robinson ME, Cnaan A, London W, Cohn SL, Cheung NK, Brodeur GM, Evans AE, Ikegaki N: Implications of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in human neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 200;97:10936-10941.
100. Lai KO, Ip FCF, Cheung J, Fu AKY, Ip NY. Expression of Eph receptors in skeletal muscle and their localization at the neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:1034-1047.
101. Swartz ME, Eberhart J, Pasquale EB, Krull CE. EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. *Development* 2001;128:4669-4680.
102. Kobari L, Giarratana MC, Poloni A, Firat H, Labopin M, Gorin NC, Douay L. Flt 3 ligand, MGDF, Epo and G-

- CSF enhance ex vivo expansion of hematopoietic cell compartments in the presence of SCF, IL-3 and IL-6. Bone Marrow Transplantat 1998;21:759-767.
103. Berardi AC, Meffre E, Pflumio F, Katz A, Vainchenker W, Schiff C, Coulombel L. Individual CD34⁺CD38^{low}CD19⁻CD10⁻ progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes. Blood 1997; 89:3554-3564.
104. Robin C, Pflumio F, Vainchenker W, Coulombel L. Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic–severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34⁺ cord blood cells. J Exp Med 1999;189:1601-1610.
105. Spiegel A, Kollet O, Peled A, Abel L, Nagler A, Bielorai B, Rechavi G, Vormoor J, Lapidot T. Unique SDF-1–induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signalling. Blood 2004;103:2900-2907.
106. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem 2004;329:77-84.

107. Houghton JA, Houghton PJ, Brodeur GM, Green AA. Development of resistance to vincristine in a childhood rhabdomyosarcoma growing in immune-deprived mice. *Int J Cancer* 1981;28:409-415.
108. Nanni P, Schiaffino S, De Giovanni C, Nicoletti G, Prodi G, Del Re B, Eusebi V, Ceccarelli C, Saggini L, Lollini PL. RMZ: a new cell line from a human alveolar rhabdomyosarcoma: *in vitro* expression of embryonic myosin. *Br J Cancer* 1986;54: 1009-1114.
109. Douglass EC, Valentine M, Etcubanas E, Parham D, Webber BL, Houghton PJ, Houghton JA, Green AA. A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet Cell Genet* 1987;45:148-155.
110. De Giovanni C, Nanni P, Nicoletti G, Ceccarelli C, Scotlandi K, Landuzzi L, Lollini PL. Metastatic ability and differentiative properties of a new cell line of human embryonal rhabdomyosarcoma (CCA). *Anticancer Res* 1989;9:1943-1949.
111. Lollini PL, De Giovanni C, Landuzzi L, Nicoletti G, Scotlandi K, Nanni P: Reduced metastatic ability of *in vitro* differentiated human rhabdomyosarcoma cells. *Invasion Metastasis* 1991;11:116-124.

112. Douay L. Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:341-346.
113. Haylock DN, Horsfall MJ, Dowse TL, Ramshaw HS, Niutta S, Protosaltis S, Peng L, Burrell C, Rappold I, Buhning HJ, Simmons PJ. Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood* 1997;90:2260-2272.
114. Hunnestad JA, Steen R, Tjønnfjord GE, Egeland T. Thrombopoietin combined with early-acting growth factors effectively expands human hematopoietic progenitor cells in vitro. *Stem Cells* 1999;17:31-38.
115. Lynch EA, Heijens CA, Horst NF, Center DM, Cruikshank WW. Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. *J Immunol* 2003;171:4965-4968.
116. Qi JC, Wang J, Mandadi S, Tanaka K, Roufogalis BD, Madigan MC, Lai K, Yan F, Chong BH, Stevens RL, Krilis SA. Human and mouse mast cells use the tetraspanin CD9 as an alternate interleukin-16 receptor. *Blood* 2006;107:135-142.

117. Wimmer-Kleikamp SH, Lackmann M. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* 2005;57:421-431.
118. Wu Q, Suo Z, Risberg B, Villman K, Nesland JM. Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004;10:26-33.
119. Batlle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H: EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 2005;435:1126-1130.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine e mi hanno aiutato a raggiungere questo obiettivo.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Anna C Berardi, che mi ha seguito ed aiutato in tutto questo periodo. Grazie a tutto il gruppo dei laboratori di ricerca dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, dove ho lavorato, agli amici e colleghi di lavoro, in particolare Elisa e Roberta, con le quali ho condiviso tanti momenti.

Un grazie immenso a Sandro, per essermi stato vicino. Il mio grazie più grande e sincero alla mia famiglia, per il sostegno e l'aiuto che mi hanno dato...è grazie anche a loro che sono arrivata fino a qui

PUBBLICAZIONI

IL-16 can synergize with early acting cytokine to expand *ex-vivo* CD34⁺ isolated from cord blood

Running head: IL-16 enhances *ex-vivo* expansion of CD34⁺ cord blood cells

Cristina Rofani¹, Luisella Luchetti¹, Giuseppe Testa¹, Rosa Lasorella², Giancarlo Isacchi^{3,4}, Gian Franco Bottazzo⁵, Anna C Berardi¹

¹Stem Cells Laboratory, Bambino Gesù Children's Hospital, Scientific Institute (IRCCS), Rome, Italy;

²Cord Blood Bank, S. Eugenio Hospital, Rome, Italy;

³Department of Pediatric Oncohematology and Transfusion Medicine, Bambino Gesù Children's Hospital, Scientific Institute (IRCCS), Rome, Italy;

⁴Chair of Immunohematology, Tor Vergata University, Rome, Italy;

⁵Scientific Directorate and Autoimmune and Organ Regeneration, Bambino Gesù Children's Hospital, Scientific Institute (IRCCS), Rome, Italy

This research was supported by a grant of the Italian Ministry of Health

Corresponding author:

Anna C Berardi PhD

Head of the Research Stem Cells Laboratory

Bambino Gesù Children's Hospital, Scientific Institute (IRCCS)

Piazza S. Onofrio 4, 00165 Rome, Italy

Telephone:+39-06-6859-2649

Fax:+39-06-6859-2604

E-mail: annacberardi@opbg.net; annacberardi@yahoo.it

ABSTRACT

We previously reported that interleukin (IL)-16 can induce CD34⁺ hematopoietic cells to proliferate and differentiate in-vitro into phenotypically and functionally mature DCs. In this study, we investigated the effects of IL-16 on the expansion of CD34⁺ cells from human cord blood. CD34⁺ cord blood cells were cultured for 14 days in medium containing a basal cocktail (BC) containing stem cell factor (SCF), Flt-3 ligand (FL), thrombopoietin (TPO), IL-6 and IL-3 with and without IL-16 as a control. IL-16 added to BC significantly enhanced the expansion of CD34⁺ cells (66.47 ± 1.46 vs. 36.23 ± 1.67 -fold), as well as CD34⁺CD38⁻ early stem cells (106.67 ± 2.34 vs. 63.42 ± 1.89 -fold) and progenitor cells (colony-forming unit [CFU-] -mixed [-GEMM]) and multilineage committed progenitors (burst-forming unit [BFU-E], CFU-granulocyte, macrophage [-GM], CFU-megakaryocyte [-MK]). IL-16 also significantly increased long-term-culture-initiating-cells (LTC-IC) (160.8 ± 3.45 -fold vs. 83 ± 2.89 -fold with BC alone). Moreover, CD34⁺ cells expanded with IL-16 maintained the capacity to differentiate into the lymphoid-B and -NK lineage. The addition of IL-16 to BC increased the migratory capacity of expanded CD34⁺ cells compared to BC alone, leaving the expression of CXCR4 unaffected, and decreased the percentage of CD34⁺CD4⁺ cells. We showed that IL-16 released endogenously affected the ex-vivo expansion of CD34⁺ cells. Overall, this study suggests that IL-16 may have a new role in promoting the expansion of hematopoietic stem cells and may represent a new tool for the expansion of CD34⁺ cells for clinical applications.

INTRODUCTION

For the past 50 years, research in the field of human stem cells (HSCs) has been motivated by a desire to exploit their future potential for both basic developmental biology and clinical applied medicine. However, the HSCs are still of poor therapeutic value for many diseases, mainly because of their scarce availability. Therefore, the expansion of HSCs in *ex-vivo* culture will be useful for overcoming existing limitations and, most relevantly, for developing new transplant strategies.

Human stem cell research has long expected that cord blood (CB) would be the ideal source of hematopoietic stem/progenitor cells for transplantation, since it is readily available, is enriched in hematopoietic stem/progenitor cells and has a lower than anticipated risk of severe acute graft-versus-host disease (GVHD) [1]. However, the use of CB is limited by the fact that it contains fewer transplantable cells, as compared to those of the bone marrow aspirate or mobilized from peripheral blood. This probably results in the delay of the engraftment observed in adult recipients, which in turn limits the direct transplantation of single CB units to patients who lack compatible donors [2]. The identification of conditions that favour the *ex-vivo* expansion of stem/progenitor cells of the CB, together with their repopulating potential, remains the major goal of experimental and clinical hematology. It has been shown that SCF, FL and TPO are crucial growth factors for promoting CB stem/progenitor cells expansion [3]. However, the data referring to *in-vivo* engraftment [4,5] of expanded CB or peripheral blood stem/progenitor [6] cells in mouse models are more controversial and several studies have demonstrated a dramatic loss of repopulating potential of the transplanted cells, after their *in-vitro* proliferation in the presence of growth factors and/or cytokines. Investigators have nevertheless reported that combinations of certain growth

factors and/or cytokines could, after expansion, preserve the repopulating properties of the transplanted cells.[7,8] Piacibello et al.[9] reported that CB CD34⁺ cells, expanded with a combination of several growth factors for up to 12 weeks, maintained their *in-vivo* repopulating potential. Moreover, Ueda et al. [10] observed that a combination of SCF + FL + TPO, with the addition of IL-6/sIL-6R, promoted the expansion of CB CD34⁺, capable of repopulating in NOD-SCID mice. Thus, the addition of cytokines, such as IL-6, to SCF, FL and TPO could represent a good strategy to improve the system, aimed at obtaining a larger number of CD34⁺ cells that can be used to better define stem/progenitor cells for biological purposes and therapeutic use.

In our previous study [11], we demonstrated that IL-16, in combination with growth factors, such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-4, FL and tumor necrosis factor- α (TNF- α), induced CD34⁺ cells to proliferate *in-vitro* and to differentiate into phenotypically and functionally mature DCs more efficiently than when SCF and TPO were used. The physiological *in-vivo* relevance of our previous results is supported by the notion that CD34⁺ cells are able to secrete IL-16 themselves, thus suggesting that IL-16 could play a key role, with other endogenously secreted factors, in the biology of early hematopoietic cells [11,12].

In its biologically active form, IL-16 is a cationic homotetramer of 14-kDa, which is unrelated to previously described chemokines or cytokines with chemotactic properties [13]. IL-16 is an activating and chemotactic factor for CD4⁺ T cells, monocytes, eosinophils and dendritic cells (DCs). The biological activities of IL-16 depend on the cell surface expression of the CD4 molecule [14,15], through which IL-16 conveys its functional signal [15-17]. Low levels of CD4 expression on murine bone marrow (BM) stem/progenitor cells have been detected and

these cells are capable of long-term BM reconstitution [18-20]. Louache et al. [21] documented a subpopulation of human CD34⁺ BM-derived hematopoietic cells that express low levels of CD4 on their surface; it has been suggested that this population, enriched for LTC-IC, may represent very early cells. Muench et al. [22] have detected low level of CD4 expression on CD34⁺ cells present in murine fetal BM and human umbilical CB cells. Furthermore, the same investigators [22] observed that cells isolated from the human fetal liver also expressed low levels of CD4 and appeared to be of the CD34⁺ hematopoietic stem cells lineage.

As a result of that, we were interested in exploring whether IL-16 may be a candidate cytokine able to induce the expansion of CD34⁺ cells from the CB.

In the present report, we provide evidence, for the first time, that IL-16, in combination with the BC constituted of SCF, FL, TPO, IL-6 and IL-3 [23-25] can induce CB CD34⁺ cells to expand *in-vitro* more efficiently than when cultured with the growth factors contained in the BC alone. After 7 and 14 days of *ex-vivo* expansion of CB CD34⁺ cells with BC plus IL-16, the total number of CB CD34⁺ cells, but also that of the colony-forming cells (CFC) and that of the LTC-IC increased at a higher rate than when CB CD34⁺ were cultured with BC alone. There is evidence of reduction in the homing of growth factor-expanded cells transplanted in animal models [26-28]. Our data demonstrate, for the first time that IL-16 induced a fold increase of the CD34⁺ cell populations without altering its migration capacity, suggesting its potential role in improving cell homing ability. We show that IL-16 was released by CD34⁺ cells, both treated and untreated with BC and it affected the expansion of CD34⁺ cells.

MATERIALS AND METHODS

Cord blood cell preparation

CB were obtained at S. Eugenio Hospital, Rome, Italy, at the end of full-term deliveries from healthy mothers, after obtaining their informed consent. Samples were collected into sterile bags containing citrate-phosphate dextrose anticoagulant and diluted 1:3 in phosphate-buffered saline (PBS) without Ca^{2+} or Mg^{2+} (Euroclone, Wetherby, UK) before separation on Ficoll-Histopaque-1077 (density 1.077 g/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Low-density mononucleated cells (MNC) were separated, washed, and resuspended in cold PBS without Ca^{2+} or Mg^{2+} . CD34^+ cells were isolated by magnetic microbead selection, using a high-gradient magnetic field and miniMACS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). A second column run was performed to obtain CD34^+ cells of higher purity, the CD34^+ cell purity was > 95%.

Cell expansion and culture assays

CD34^+ enriched cells were cultured in 12.5 cm² flasks at 2×10^4 cells/mL for 7 days and 14 days in alpha MEM (Gibco, Carlsbad, California, USA) with 10% Australian fetal bovine serum (FBS) (Cambrex, East Rutherford, New Jersey, USA) in the presence of the basal cocktail (BC), comprised of human recombinant (hr): FL (50 ng/mL), SCF (50 ng/mL), TPO (50 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL) and IL-6 (10 ng/mL), plus IL-16 at 10, 50, 100 ng/mL (PeproTech, London, UK). Every 2 days, half of the culture medium was replaced by fresh medium with the addition of the growth factors. At the end of the 7 days and 14 days culture, cells were collected and subsequently analysed. Cell expansion was expressed as the fold increase, which was calculated by dividing the output of the absolute number of total

nucleated cells, progenitors and LTC-IC after 7 and 14 days of expansion by the respective input number on day 0.

Flow cytometry and cell sorting

The mAbs used included the following monoclonal antibodies (mAbs): phycoerythrin (PE)-CD34 (HPCA-2), PE-CD11b, PE-CD19, PE-CD56, PE-CXCR4, PE-CD4, fluorescein isothiocyanate (FITC)-CD34, FITC-CD38, FITC-CD14 (BD Biosciences, San José, CA, USA). Background levels were measured with isotype-matched PE- and FITC-conjugated antibodies. When double labelling was performed, compensation was determined from single-stained samples. Cells were analysed on a FACS-Scan flow cytometer using CellQuest software (Becton-Dickinson). Low forward scatter elements (red cells or debris) were excluded by gating and 10,000 events were collected per analysis. The CD34⁺ cells were sorted with a FACS-Vantage (Becton-Dickinson). To initiate long-term cultures at limiting dilution, CD34⁺ cells were sorted directly into 96-well tissue culture plates pre-coated with MS-5 cells using an automatic cloning design unit.

Analysis of the release of IL-16 by CD34⁺ cells

CD34⁺ cells were cultured for 6, 12 and 24 hours, with and without BC. At each time, the content of the corresponding wells was harvested and centrifuged, and cell-free supernatants were frozen until assayed for IL-16 content. Human IL-16 was detected using a high sensitivity human-specific IL-16 ELISA kit (assay sensitivity 2.7-13.4 pg/mL; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), following the manufacture's instructions. Optical density (OD) measurements were read at 450 nm with a correction wavelength of 540 nm on a Bio-

Rad 550 plate reader. IL-16 values were interpolated from a standard curve using recombinant human IL-16 (R&D Systems). The amount of IL-16 produced in these different conditions was expressed in picograms per milliliter per 2×10^5 cells.

Neutralizing antibodies cultures.

To investigate the effects of neutralizing anti-IL-16 antibodies on the release of endogenous IL-16, human CB CD34⁺ cells were cultured in medium with BC added as described above, in the presence and absence of neutralizing rabbit polyclonal anti-human IL-16 antibody (Abcam, Cambridge, UK), at a final concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This concentration was chosen because it gave optimal inhibition of human IL-16 bioactivity in preliminary experiments. The antibody was added every 72h and the cells were assayed at 7 and 14 days for the output of the absolute number of total nucleated cells.

Progenitor cell assays

Colony-forming unit granulocyte-macrophages (CFU-GM) burst-forming unit erythroid cells (BFU-E) and multipotential (CFU-GEMM or CFU-Mix) progenitors were assayed in methylcellulose cultures (MethoCult GF H4434 StemCell Technologies, Vancouver, Canada) [29], in the presence of hr: GM-CSF (10 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL), erythropoietin (3 U/mL), SCF (50 ng/mL) and supplemented with G-CSF (20 ng/mL) and IL-6 (20 ng/mL) (PeproTech). Cell concentration was 10^2 CD34⁺ cells/ml on day 0 and 2×10^3 expanded cells/ml on day 7 and day 14. Colonies were scored on day 14 of culture.

Colony-forming units megakaryocyte (CFU-Mk) were assayed in a collagen-based culture system (MegaCult-C; StemCell Technologies). CD34⁺ cells (10^3 cells on day 0 and 2.5×10^3

CD34⁺ expanded cells on day 7 and 14) were added to the serum-free medium with cytokines and dispensed into double chamber slides. The chamber slides were incubated at 37°C for 14 days. At the end of this period, cultures were dehydrated, fixed for 20 min in 1:3 methanol/acetone and stained with an alkaline phosphatase detection system.

Limiting dilution assay for LTC-IC

LTC-IC were assayed as previously described [29], using a slight modification of the Sutherland's method [30] LTC-IC were maintained for 5 weeks in cultures on stroma layers established with a murine cell line MS-5. The LTC-IC frequencies were determined by scaling the cultures down to a volume of 100 μ L in 96-well microtiter plates and performing limiting dilution with 60 replicates per step. Dilution steps were 10 to 1000 cells/well for day 0 and day 14 expanded CD34⁺ cells. Frequencies were calculated by Poisson statistics (L- Calc software for limiting dilution analysis; Stem Cell Technologies) from which it was possible to deduce the absolute numbers of LTC-IC and the CFC/LTC-IC ratio.

In two experiments, 1 to 100 CD34⁺ cells sorted from cells *ex-vivo* expanded for 14 days were cultured at limiting dilution under LTC conditions in 96-well plates pre-coated with MS-5. The LTC-IC frequencies and CFC/LTC-IC ratios were determined as described earlier.

B, NK and myeloid differentiation potentials in a simultaneous LTC assay

LTC-B-NK were assayed in culture on murine MS-5 stroma layers in 24- or 96-well plates as previously described [31,32]. Briefly, CD34⁺ 2×10^3 cells/well from day 0 and 5×10^5 expanded cells/well from day 14 cultures were plated in RPMI (Gibco) supplemented with 10% human serum AB (Sigma-Aldrich), 5% FBS and the following six hr cytokines: SCF

(50 ng/mL), FL (50 ng/mL), TPO (10 ng/mL), IL-2 (5 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL) and IL-7 (20 ng/mL) (PeproTech). At the end of the 6-week culture period, nonadherent and adherent cells from each well were harvested and labeled with a panel of lineage-specific antibodies and analyzed by flow cytometry (see below). Cells were collected from wells with significant cell proliferation (usually > 500 cells after 6 weeks).

Transwell migration assay

To evaluate the capacity of CD34⁺ expanded cell to migrate, Millicell-24 Cell Culture Insert Plate, polycarbonate, 5.0 μ m (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) were used, as described [33]. Briefly, enriched CD34⁺ cells were isolated, as previously described, from the CB cells after 14 days of *ex-vivo* expansion in all cytokines combination. CD34⁺ expanded cells (0.5×10^6) were added to the upper chamber of the transwell in 200 μ L of RPMI + 1% FBS and 0.6 mL of the same medium with and without stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) (100 ng/mL) (PeproTech) was added to the lower wells. The chemotactic activity of soluble IL-16 (200 ng/mL) was analysed at the same time. The cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 4 hours. Inserts were then removed and cells present in the lower wells were counted. The migration rate was expressed as the percentage of input cells.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Analysis of statistical significance was determined by paired *t* test. A *p* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Effect of IL-16 on the total number of nucleated cells on the ex-vivo expansion of CD34⁺ cells

On the basis of previous data of CB cells expansion [23-25], we used the following experimental conditions in order to expand CB CD34⁺ cells. 2×10^4 CD34⁺ cell were cultured for 7 and 14 days in stroma-free in the BC medium, without and with IL-16 at concentration of 10, 50, 100 ng/mL. CB CD34⁺ cells cultured in BC alone, achieved, at 7 days, an average cell expansion of 271.4×10^4 nucleated cells and at 14 days of 565.3×10^4 average cell expansion. In contrast, cells cultured in BC plus IL-16 expanded in a dose dependent-manner (10, 50, 100 ng/mL), with an average cell expansion at 7 days of 370.4×10^4 , 457.7×10^4 , 482.9×10^4 respectively ($p < 0.01$) (Fig. 1A) and 712.9×10^4 , 753.1×10^4 , 864.4×10^4 ($p < 0.01$) at 14 days (Fig. 1B). On performing 40 separate experiments, the addition of IL-16 gave a significant increase ($p < 0.05$) in the number of the total nucleated cells both after 7 days and 14 days of expansion (Fig. 1C).

CD4 expression on CD34⁺ CB cells before and after ex-vivo expansion

CD4 is the receptor of IL-16, we evaluated The expression of CD4 on CD34⁺ cells at day 3, 7 and 14 of culture compared to the CD34⁺ at day 0 of culture is shown in Fig. 1D. There was an increase of expression in all culture conditions although with IL-16 the percentage of CD34⁺CD4⁺ slightly decreased at day 7 and 14 of culture.

IL-16 is released by Human Cord Blood CD34⁺

CD34⁺ cells both treated and untreated with BC released IL-16 in the culture medium (Fig. 2A.). At 6 hours, the concentrations of IL-16 were similar in both conditions. After 12 and 24 hours the concentration of IL-16 increased in both conditions. However, the increase was more evident in untreated CD34⁺ cells. (Fig. 2A)

The effect of neutralizing anti-IL-16 antibodies on the release of IL-16 by expanded CD34⁺ cells.

We next investigated whether endogenously produced IL-16 enhanced the expansion of human cord blood CD34⁺ cells. To this aim, we added anti-IL-16 antibodies to expanded CD34⁺ cells in the presence of BC and observed, indeed, that they inhibited cell expansion at both 7 and, significantly, 14 days of culture (cultures with vs without anti-IL-16 antibodies, mean \pm e.s. nucleated cells, 7 days: $298,75 \pm 49,1 \times 10^4$, vs $326,25 \pm 33,98 \times 10^4$ nucleated cells and at 14 days of $526,5 \pm 101,3 \times 10^4$ vs $600 \pm 94,3 \times 10^4$. [$p < 0.05$]) (Fig. 2B) On performing 4 separate experiments, the addition of anti-IL-16 antibodies gave a significant decrease ($p < 0,05$) in the fold of the total number of nucleated cells after 14 days of expansion (Fig. 2C)

Role of IL-16 on ex-vivo expansion of CD34⁺ cells from CB

IL-16 had a profound effect on the cultured CD34⁺ cells. This is demonstrated in Fig. 3A, which illustrates that, where IL-16 was present, a higher percentage of CD34⁺ cells was generated after 14 days of culture in a dose-dependent manner (29.7%, 30.07%, 32.13%). The total number of CB CD34⁺ cells was significantly increased, when IL-16 was present in the cultures, in a dose-dependent manner at 7 and 14 days of culture (due to 36.23 ± 1.67 to

66.47 ± 1.46-fold expansion [BC vs. IL-16 100 ng/mL, day 14th], $p < 0.05$) (Fig. 3B). Addition of IL-16 did not significantly increase the percentage of the more primitive stem cells CD34⁺CD38⁻, as compared to BC, (Fig 3C) but significantly enhanced the number of cells (106.67 ± 2.34-fold, 90.3 ± 1.23-fold and 91.27 ± 1.43-fold respectively vs. 63.42 ± 1.89-fold, $p < 0.05$, $n = 25$) (Fig. 3D).

In the presence of BC alone, efficient expansion was observed in all subsets of progenitor cells, as demonstrated by the CFU assay (Fig.4). The addition of IL-16 significantly enhanced the expansion of early progenitor cells (CFU-Mix/GEMM) and committed CFU of the myeloid (CFU-GM), erythroid (BFU-E) and megakaryocytic (CFU-MK) lineage ($p < 0.05$, $n = 15$), both at 7 (Fig. 4A) and 14 days of culture (Fig. 4B).

After 14 days the cloning efficiency in the CFU assay of the LTC-IC progenitors in expanded cells with IL-16 (BC + IL-16) and without (BC alone) was analysed. As shown in Fig. 5A, it was found that IL-16 greatly enhanced the fold number of CFU per LTC-IC, as compare when the cells were cultured with BC alone, the maximum fold being obtained with 50 ng/mL (160.8 ± 3.45 vs. 83 ± 2.89). To further compare the characteristics of the CD34⁺ populations before and after expansion, CD34⁺ cells, re-isolated from the total expanded cells, were analysed in the same manner. The expansion culture was initiated with 5 x 10⁴ CD34⁺ cells and 6-8 x 10⁶ CD34⁺ cells were re-isolated after 14 days. The cloning efficiency in the CFU assay was unchanged and LTC-IC frequencies were comparable (data not shown).

These results together indicate that the IL-16 amplified the myeloid progenitor compartment, because the absolute numbers of all tested progenitors increased during cytokine stimulation and their quality and rate of proliferation were conserved.

The presence of both lymphoid and myeloid progenitors is a prerequisite for long-term engraftment. To ensure that the expansion protocol did not increase myeloid progenitors, while altering the lymphoid compartment, it was crucial to test the lymphoid potential of the expanded cells. First, we determined the prevalence of lymphoid B- (CD19⁺) and NK- (CD56⁺) progenitors in the expanded products. After 14 days, neither CD19⁺ nor CD56⁺ cells were detected among the expanded cells. The expanded cells were then co-cultured on the murine MS-5 cell line, for 6 weeks, in the presence of cytokines that permit generation of either myeloid and lymphoid (-B and -NK) cells (as described in material and methods) [31,32]. Both CD19⁺ cells and CD56⁺ cells (Fig. 4B) were detected in all experiments ($n = 7$). Morphologic analysis of the cultured cells confirmed the presence of lymphocytes (data not shown). Hence, the B- and NK-cell potential was maintained in the expanded cells in the presence of IL-16.

CXCR4 expression on CB CD34⁺ cells before and after ex-vivo expansion with IL-16

The expression of CXCR4 on CD34⁺ cells may contribute to improving the engraftment of repopulating stem cells in clinical transplantation. Hence, we evaluated the expression of CXCR4 on CD34⁺ CB cells from day 0 and day 14 fractions of liquid expansion cultures (Fig. 6A). A similar percentage of CXCR4⁺ cells was found among fresh and expanded CD34⁺ cells. Moreover, IL-16 significantly increased the fold number of CD34⁺CXCR4⁺ population especially with 100 ng/mL (137.68 ± 4.87-fold by adding 100 ng/mL of IL-16) ($p < 0.05$) (Fig. 6B). These findings provide further evidence that the products amplified from CD34⁺ CB cells may maintain their homing proprieties.

IL-16 enhances migration of CD34⁺ expanded cells towards SDF-1

Spontaneous and SDF-1 α -induced migration were analysed. The ability of the expanded CD34⁺ cells to migrate was significantly reduced ($p < 0.01$), as compared to the migration of the fresh CD34⁺ cells. Notwithstanding this reduced migratory ability, the presence of IL-16 significantly improved the migration of expanded CD34⁺ cells with respect to BC alone ($p < 0.05$) (Fig6C).

DISCUSSION

Our results provided the first evidence that IL-16, added to a BC of cytokines composed of SCF, FL, TPO, IL-6 and IL-3, enhanced the *ex-vivo* expansion of CD34⁺ CB cells to early stem/progenitor cells and multilineage committed progenitors. Compared with BC alone, the presence of IL-16 made for more efficient expansion, as indicated by the observation that after 7 and 14 days of culture both the number and the fold increase of the total nucleated cells expanded *in-vitro* was significantly higher. IL-16 accomplishes this expansion in direct relationship to the dose. We investigated the effects of IL-16 on the CD34⁺CD4⁺ populations. [14–21]. Our results clearly indicate that IL-16 down-modulated the expression of CD4 compared with BC alone at both 7 and 14 days of cell expansion. This finding is surprising, since secreted IL-16 is known to be the natural soluble ligand of the CD4 molecule [18]. Because IL-16 exerts its effects throughout the 14 days of *ex-vivo* expansion, it is possible that some of IL-16 effects may be mediated not only by the CD4 receptor, but also by other co-activators, as already reported in our previous work and elsewhere [20, 34-36]. Recently, it has been shown that the tetraspanin CD9 can function as an alternative IL-16 receptor [37]. Because CD34⁺ cells heterogeneously express CD9, we can hypothesize that the IL-16 effect can be mediated also by this receptor. Further experiments may be required to clarify this point. It has already been demonstrated that CD34⁺ cells are able to secrete IL-16 themselves [11, 12]. To fully understand the exposure concentration of IL-16 to the cells, we determined the endogenous levels of IL-16 with and without the basal cocktail. The data presented here showed that human cord blood CD34⁺ cells release IL-16 not only spontaneously but also in the presence of the BC. In addition, the release of IL-16 was enhanced after 12 and 24 hours,

although the rate of this release was lower in the presence of the Basal Cocktail. We further investigated whether this endogenous IL-16 affected the magnitude of CD34⁺ cell expansion. Experiments performed with neutralizing antibodies seem to indicate that after 7 and 14 days of culture, both the number and the fold increase of the total nucleated cells expanded *in-vitro* were lower in the presence of the neutralizing IL-16 antibody. These data demonstrate for the first time that endogenous IL-16 plays a role in the expansion of hematopoietic CD34⁺ cells. Further investigation will be needed to better define this role.

A major limitation in using CB for transplantation, especially in adult patients, is the limited number of hematopoietic stem and progenitor cells in the graft. The CD34⁺ cell dose was significantly related to the engraftment rate and patient survival or risk of mortality [38]. IL-16 induced increased expression of CD34⁺ cells. More significant is the net increase in the quantity of CD34⁺ cells. We also observed a slight increase in the expression of CD34⁺CD38⁻ cells. Overall, IL-16 induced an high fold increase in cell numbers of this subset as compared with BC after 14 days of expansion. The addition of IL-16 enhanced the number of all progenitor cell subsets. The fold increase of the various CFU populations was significant, indicating that IL-16 stimulated differentiation and expansion, but also maintained early progenitor cells.

In addition, a combination of the BC with IL-16 supported LTC-IC expansion. Our data is the first to show such a high expansion in a limiting dilution assay, revealing a highly quiescent and primitive human haematopoietic population. Although they may not reflect primitive long-term repopulating cells, LTC-IC are, to date, the closest *in-vitro* to the NOD-SCID mouse model. Several studies have demonstrated that spleen repopulating cells (SRC) are biologically distinct from, and more primitive than, most CFC and LTC-IC. The SRC were

shown to be exclusively CD34⁺CD38⁻, in contrast to CFC and LTC-IC, which also were found in the CD34⁺CD38⁺ fraction [39]. Therefore, LTC-IC and SRC may not represent identical cell populations. However, in another report, both were found predominantly, if not exclusively, in the CD34⁺CD38⁻ subpopulation [8,39].

We explored the lymphoid potential of the expanded CB cells. Our results show that these cells retained NK and B potential. In previous work [31,40] it was observed that when expanded cells were later co-cultured under B and NK conditions, they produced CD19⁺CD10⁺ or CD56⁺CD3⁻ cells respectively. CD34⁺lin⁻ cells isolated from the day 14 fraction also gave rise to NK and B-cells [40]. Our present data suggests the persistence of myeloid and lymphoid -B and -NK progenitors. This is consistent with several other reports which show that CD34⁺CD38⁻/low cells re-isolated after expansion have the same ability to proliferate and differentiate into myeloid and lymphoid cells as freshly isolated CD34⁺CD38⁻ cells and exhibit the characteristics of primitive cells [41]. Finally, these findings suggest that the culture system preserves normal stem cell functions.

Hematopoietic reconstitution after stem cell transplantation is dependent on the successful homing and proliferation of sufficient primitive repopulating cells within the bone marrow. Therefore, we investigated the expression of CXCR4 on the expanded CD34⁺ cells. The chemokine SDF-1 α and its receptor, CXCR4, play key roles in human hematopoietic stem cell trafficking and repopulation. We found that IL-16 significantly enhanced the fold increase of the population CD34⁺CXCR4⁺. Furthermore, IL-16 enhanced the migratory capacity of the expanded CD34⁺ cells compared with BC alone. It should be noted, however, that, in accordance with other authors [42], the migratory properties of expanded CD34⁺ cells was decreased with respect to primary CD34⁺ cells. Because IL-16 induced increased

migration could not be ascribed to the enhancement of the proportion of CXCR4⁺ cells, it is possible that IL-16 participates in the regulation of stem cell migration by interacting with receptors other than CXCR4. Recent studies demonstrated the modulation of stem cell homing and engraftment by CD26 that co-localizes with CXCR4 at the cell surface [43,44]. Other cell-surface molecules, such as Very Late Antigen-4 (VLA-4), VLA-5, β 1-integrin and leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) were suggested to be associated with their homing capacity [45,46]. Further investigations may be required to clarify the possible involvement of these molecules in the regulation of the migration of CD34⁺ expanded cells. Our results partially disagree with Van Drenth et al., who reported that pre-treatment of CD4⁺ T cells with IL-16 results in cross-desensitization of SDF-1 α , thus leading to inhibition of the migratory response. (47.) We may argue that a higher concentration of IL-16 appears to have less of an effect on migration and may reflect the same effect seen in mature T cells. Moreover, recently it has been reported that several cytokine combinations are able to interfere considerably with SDF-1 α -stimulated migration, due to differential involvement of key intracellular signalling cascade. (48.) Taken together, these observations may suggest that the IL-16 enhanced SDF-1-induced migration may occur because IL-16, in combination with other cytokines, can have a differentiated influence on the signal processing downstream of CXCR4. Further investigations may be required to better clarify this point.

All together, these results seem to suggest that the addition of IL-16 to SCF, FL, TPO, IL-6 and IL-3 may represent an alternative tools to improve the efficiency of *ex-vivo* expansion of CD34⁺ CB cells. IL-16 could be used to explore new therapeutic strategies for clinical

expansion of hematopoietic stem cells for transplantation. Thus, further studies will be important to understand the mechanism of IL-16 on hematopoiesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ezio Giorda for the FACS sorter analysis. We would also like to thank Silvia Della Bella for critically reading the manuscript and Sr. Marie-Kolbe Zambra O.S.F. for the English revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Wang JC, M Doedens and JE Dick. (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-Repopulating cell assay. *Blood* 89:3919-3924.
2. Sanz MA and GF Sanz. (2002). Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults. *Leukemia* 16:1984-1991.
3. Bhatia M, D Bonnet, U Kapp, JC Wang, B Murdoch and JE Dick. (1997). Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* 186:619-624.
4. Dorrell C, OI Gan, DS Pereira, RG Hawley and JE Dick. (2000). Expansion of human cord blood CD34+CD38- cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* 95:102-110.
5. Herrera C, J Sánchez, A Torres, C Bellido, A Rueda and MA Alvarez. (2001). Early-acting cytokine-driven ex vivo expansion of mobilized peripheral blood CD34+ cells generates post-mitotic offspring with preserved engraftment ability in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Br J Haematol* 114:920-930.
6. Lyman SD and SE Jacobsen. (1998). c-kit ligand and Flt3 Ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91:1101-1134.
7. Levac K, F Karanu and M Bhatia. (2005). Identification of growth factor conditions that reduce ex vivo cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function in vivo. *Haematologica* 90:166-172.

8. Conneally E, J Cashman, A Petzer and C Eaves. (1997). Expansion *in vitro* of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic–scid/scid mice. Proc Natl Acad Sci USA 94:9836-9841.
9. Piacibello W, F Sanavio, A Severino, A Danè, L Gammaitoni, F Fagioli, E Perissinotto, G Cavalloni, O Kollet, T Lapidot and M Aglietta. (1999). Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34+ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. Blood 93:3736-3749.
10. Ueda T, K Tsuji, H Yoshino, Y Ebihara, H Yagasaki, H Hisakawa, T Mitsui, A Manabe, R Tanaka, K Kobayashi, M Ito, K Yasukawa and T Nakahata. (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. J Clin Invest 105:1013-1021.
11. Della Bella S, S Nicola, I Timofeeva, ML Villa, A Santoro and AC Berardi. (2004). Are interleukin-16 and thrombopoietin new tools for the in vitro generation of dendritic cells? Blood 104:4020-4028.
12. Majka M, A Janowska-Wieczorek, J Ratajczak, K Ehrenman, Z Pietrzkowski, MA Kowalska, AM Gewirtz, SG Emerson and MZ Ratajczak. (2001). Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. Blood 97:3075-3085.

13. Cruikshank W and DM Center. (1982). Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). *J Immunol* 128:2569-2574.
14. Cruikshank WW, DM Center, N Nisar, M Wu, B Natke, AC Theodore and H Kornfeld. (1994). Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5109-5113.
15. Rand TH, WW Cruikshank, DM Center and PF Weller. (1991). CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med* 173:1521-1528.
16. Center DM, H Kornfeld and WW Cruikshank. (1996). Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 17:476-481.
17. Cruikshank WW, JL Greenstein, AC Theodore and DM Center. (1991). Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes. *J Immunol* 146:2928-2934.
18. Onishi M, K Nagayoshi, K Kitamura, H Hirai, F Takaku and H Nakauchi. (1993). CD4^{dull+} hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow. *Blood* 81:3217-3225.
19. Wineman JP, GL Gilmore, C Gritzmacher, BE Torbett and CE Muller-Sieburge. (1992). CD4 is expressed on murine pluripotent hematopoietic stem cells. *Blood* 80:1717-1724.
20. Szilvassy SJ and S Cory. (1993). Phenotypic and functional characterization of competitive long-term repopulating hematopoietic stem cells enriched from 5-fluorouracil-treated murine marrow. *Blood* 81:2310-2320.

21. Louache F, N Debili, A Marandin, L Coulombel and W Vainchenker. (1994). Expression of CD4 by human hematopoietic progenitors. *Blood* 84:3344-3355.
22. Muench MO, MG Roncarolo and R Namikawa. (1997). Phenotypic and functional evidence for the expression of CD4 by hematopoietic stem cells isolated from human fetal liver. *Blood* 89:1364-1375.
23. Douay L. (2001). Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 10:341-346.
24. Haylock DN, MJ Horsfall, TL Dowse, HS Ramshaw, S Niutta, S Protopsaltis, L Peng, C Burrell, I Rappold, HJ Buhring and PJ Simmons. (1997). Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood* 90:2260-2272.
25. Hunnestad JA, R Steen, GE Tjønnfjord and T Egeland. (1999). Thrombopoietin combined with early-acting growth factors effectively expands human hematopoietic progenitor cells in vitro. *Stem Cells* 17:31-38.
26. Glimm H, M Schmidt, M Fischer, K Schwarwaelder, M Wissler, S Klingenberg, C Prinz, CF Waller, W Lange, CJ Eaves and C von Kalle. (2005). Efficient marking of human cells with rapid but transient repopulating activity in autografted recipients. *Blood* 106:893-898.
27. Güenechea G, JC Segovia, B Albella, M Lamana, M Ramírez, C Regidor, MN Fernández and JA Bueren. (1999). Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood* 93:1097-1105.

28. McNiece IK, G Almeida-Porada, EJ Shpall and E Zanjani. (2002). Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Exp Hematol* 30:612-616.
29. Kobari L, MC Giarratana, A Poloni, H Firat, M Labopin, NC Gorin and L Douay. (1998). Flt 3 ligand, MGDF, Epo and G-CSF enhance ex vivo expansion of hematopoietic cell compartments in the presence of SCF, IL-3 and IL-6. *Bone Marrow Transplantat* 21:759-767.
30. Sutherland HJ, PM Lansdorp, DH Henkelman, AC Eaves and CJ Eaves. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3584-3588.
31. Berardi AC, E Meffre, F Pflumio, A Katz, W Vainchenker, C Schiff and L Coulombel. (1997). Individual CD34⁺CD38^{low}CD19⁻CD10⁻ progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes. *Blood* 89:3554-3564.
32. Robin C, F Pflumio, W Vainchenker and L Coulombel. (1999). Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34⁺ cord blood cells. *J Exp Med* 189:1601-1610.
33. Spiegel A, O Kollet, A Peled, L Abel, A Nagler, B Bielorai, G Rechavi, J Vormoor and T Lapidot. (2004). Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signalling. *Blood* 103:2900-2907.
34. Zhang XM and YH Xu. (2002). The associated regulators and signal pathway in rIL-16/CD4 mediated growth regulation in Jurkat cells. *Cell Res* 12:363-372.

35. Mathy NL, N Bannert, SG Norley and R Kurth. (2000). Cutting edge: CD4 is not required for the functional activity of IL-16. *J Immunol* 164:4429-4432.
36. Lynch EA, CA Heijens, NF Horst, DM Center and WW Cruikshank. (2003). Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. *J Immunol* 171:4965-4968
37. Qi JC, J Wang, S Mandadi, K Tanaka, BD Roufogalis, MC Madigan, K Lai, F Yan, BH Chong, RL Stevens and SA Krilis. (2006). Human and mouse mast cells use the tetraspanin CD9 as an alternate interleukin-16 receptor. *Blood* 107:135-142.
38. Wagner JE, JN Barker, TE DeFor, KS Baker, BR Blazar, C Eide, A Goldman, J Kersey, W Krivit, ML MacMillan, PJ Orchard, C Peters, DJ Weisdorf, NK Ramsay and SM Davies. (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 100:1611-1618.
39. Coulombel L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23:7210-7222.
40. Kobari L, F Pflumio, MC Giarratana, X Li, M Titeux, B Izac, F Leteurtre, L Coulombel and L Douay. (2000). In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34⁺ cord blood cells. *Exp Hematol* 28:1470-1480.
41. Tsuji T, K Itoh, Y Nishimura-Morita, Y Watanabe, D Hirano, KJ Mori and K Yatsunami. (1999). CD34^{high}+ CD38^(low/-) cells generated in a xenogenic coculture system are capable of both long-term hematopoiesis and multiple differentiation. *Leukemia* 13:1409-1419.

42. Zhai QL, LG Qiu, Q Li, HX Meng, JL Han, RH Herzig and ZC Han. (2004). Short-term ex vivo expansion sustains the homing-related properties of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica* 89:265-272.
43. Campbell TB and HE Broxmeyer. (2008). CD26 inhibition and hematopoiesis: a novel approach to enhance transplantation. *Front Biosci* 13:1795-1805.
44. Sadir R, A Imberty, F Baleux and H Lortat-Jacob. (2004). Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 279:43854-43860.
45. Quesenberry PJ and PS Becker. (1998). Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15155-15157.
46. Verfaillie CM. (1998). Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood* 92:2609-2612.
47. Van Drenth C., A Jenkins, L Ledwich, TC Ryan, MV Mashikian, W Brazer, DM Center, WW Crikshank. (2000). Desensitization of CXC chemokine receptor 4, mediated by IL-16/CD4, is independent of p56lck enzymatic activity. *J Immunol.* 165:6356-6363
48. Kassmer SH, B Niggemann, M Punzel, C Mieck, KS Zanker, T Dittmar. (2008). Cytokine combinations differentially influence the SDF-1alpha-dependent migratory activity of cultivated murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Biol Chem.* 389:863-872

LEGEND

FIG 1. Effects of IL-16 on *ex-vivo* expansion of CD34⁺ cells. Enriched cord blood CD34⁺ cells at 2×10^4 per millilitre were cultured for 7 and 14 days in the presence of TPO, SCF, FL, IL-6 and IL-3 (BC) alone or with IL-16 at 10, 50, 100 ng/mL. (A) (B) IL-16 significantly enhanced expansion of the total number of nucleated cells at 7 and 14 days of culture. (C) IL-16 significantly increased the fold of the total number of cells. Results are presented as mean and SEM ($n = 40$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (D) Effect of IL-16 on expression of CD4 on CD34⁺ cells before and after expansion. Decreased percentage of CD34⁺CD4⁺ cells was observed in IL-16-expanded cells, as compared to BC expanded cells. Cells analysed after 3, 7 and 14 days of culture, single colour flow cytometric analysis showing phenotypic expression of cultured (day 14) CD34⁺ cells without (BC) and with IL-16 (at 10, 50, 100 ng/mL) ($n = 8$).

FIG 2. Release of IL-16 on CD34⁺ cells both treated and untreated with BC. (A) IL-16 levels were determined in the two supernatants by using a specific immunoassay kit. Results are presented as means and SEM ($n = 4$). (B)(C) Effect of anti-IL-16 neutralizing antibody on CD34⁺ cells *ex-vivo* expansion for 7 and 14 days in the presence of BC. (B) Anti-IL-16 antibodies decreased expansion of the total number of nucleated cells at 7 and, significantly, at 14 days of culture. (C) Anti-IL-16 antibodies significantly decreased the fold of the total number of cells after 14 days of culture. Results are presented as mean and SEM ($n = 4$, * $p < 0.05$).

FIG 3. Effect of IL-16 on progenitor cell population after 7 and 14 days of expansion.(A) (B) IL-16 significantly increased the concentrations of CFU of CFU-GM, BFU-E, CFU-MK and CFU-GEMM ($n = 15$, * $p < 0.05$) both at 7 and 14 days of expansion.

FIG 4. Flow cytometry analysis of surface antigen expression of CB CD34⁺ cells before and after *ex-vivo* expansion. **(A)** the addition of IL-16, at a dose of 10, 50, 100 ng/mL, change the percentage of CD34⁺ in a dose-dependent manner as compare with BC alone. **(B)** IL-16 significantly enhanced expansion of the total number of CD34⁺ cells **(C)** IL-16 doesn't change significantly the percentage of CD34⁺CD38⁻ subpopulation. **(D)** IL-16 significantly enhanced the total number of the very early stem subpopulations of CD34⁺CD38⁻. Results are presented as mean and SEM ($n = 25$, * $p < 0.05$).

FIG 5. LTC-IC and LTC-B-NK assay. **(A)** LTC-IC. The presence of IL-16 significantly increased LTC-IC. ($n = 7$, * $p < 0.05$) as compare to BC alone. **(B)** LTC-B-NK. Cells were collected after 6 weeks of culture and their phenotype assessed by flow cytometry after labelling the cells with the following mAbs: PE-CD11b, FITC-CD14, PE-CD19, PE-CD56. After expansion, both cells (with and without IL-16 in culture) demonstrate the ability to generate both myeloid (CD11b⁺CD14⁺) and lymphoid B (CD19⁺) and NK (CD56⁺) cells in the same assay ($n = 7$). Quadrants limits defining positivity and negativity were set up using cells labeled with isotype-matched FITC- and PE-labeled control antibodies.

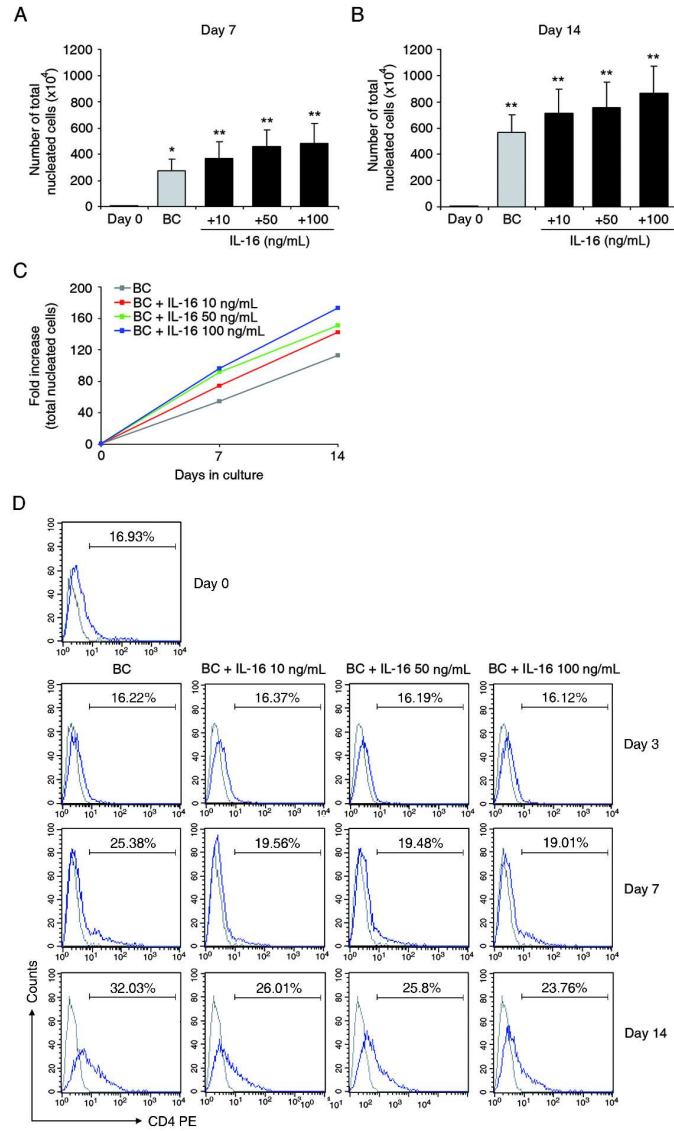
FIG 6. Effects of IL-16 on expression of CXCR4 on CD34⁺ cells before and after *ex-vivo* expansion. Enriched CD34⁺ cells at day 0 and after expansion for 14 days were stained with CD34-FITC and CXCR4-PE antibodies and also their isotypic controls. **(A)** The CD34⁺ cell population was gated by its CD34-FITC-positive and low side-scatter profile (not shown) and the expression of CXCR4 was quantified on the CD34-FITC/CXCR4-PE dot plots. **(B)** The fold increase for the absolute number of CD34⁺CXCR4⁺ cells after 7 and 14 days of culture (with and without IL-16 at 10, 50, 100 ng/mL) ($n = 15$, * $p < 0.05$). **(C)** Migration. Notwithstanding the decrease migratory capacity of CD34⁺ expanded cells, the migration

assay demonstrates a significant increase in the motility of CD34⁺ expanded cells in the presence of IL-16 at 10 and 50 ng/mL as compared when cells were cultured with BC alone ($n = 6$, * $p < 0.05$) .

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

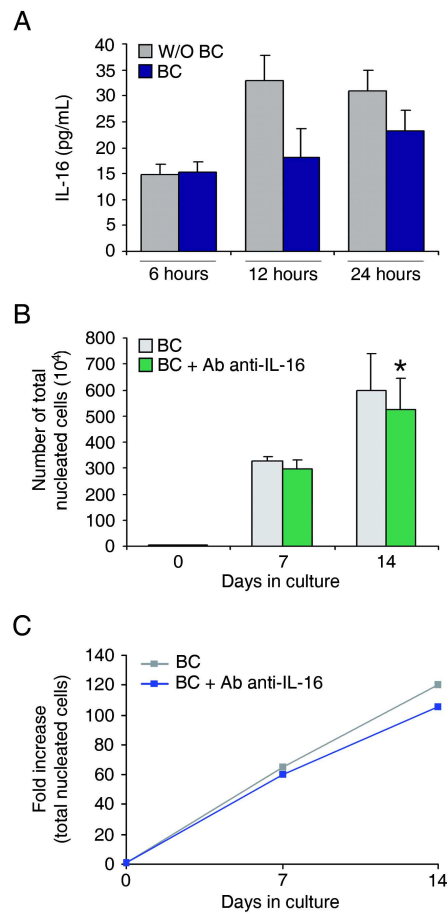
Cristina Rofani: conception and design; Luisella Luchetti: data analysis and interpretation; Giuseppe Testa: technical support; Rosa Lasorella and Giancarlo Isacchi: provision of study material; Gian Franco Bottazzo: final approval of manuscript; Anna C. Berardi: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing. The authors reported no potential conflicts on interest.

Figure 1



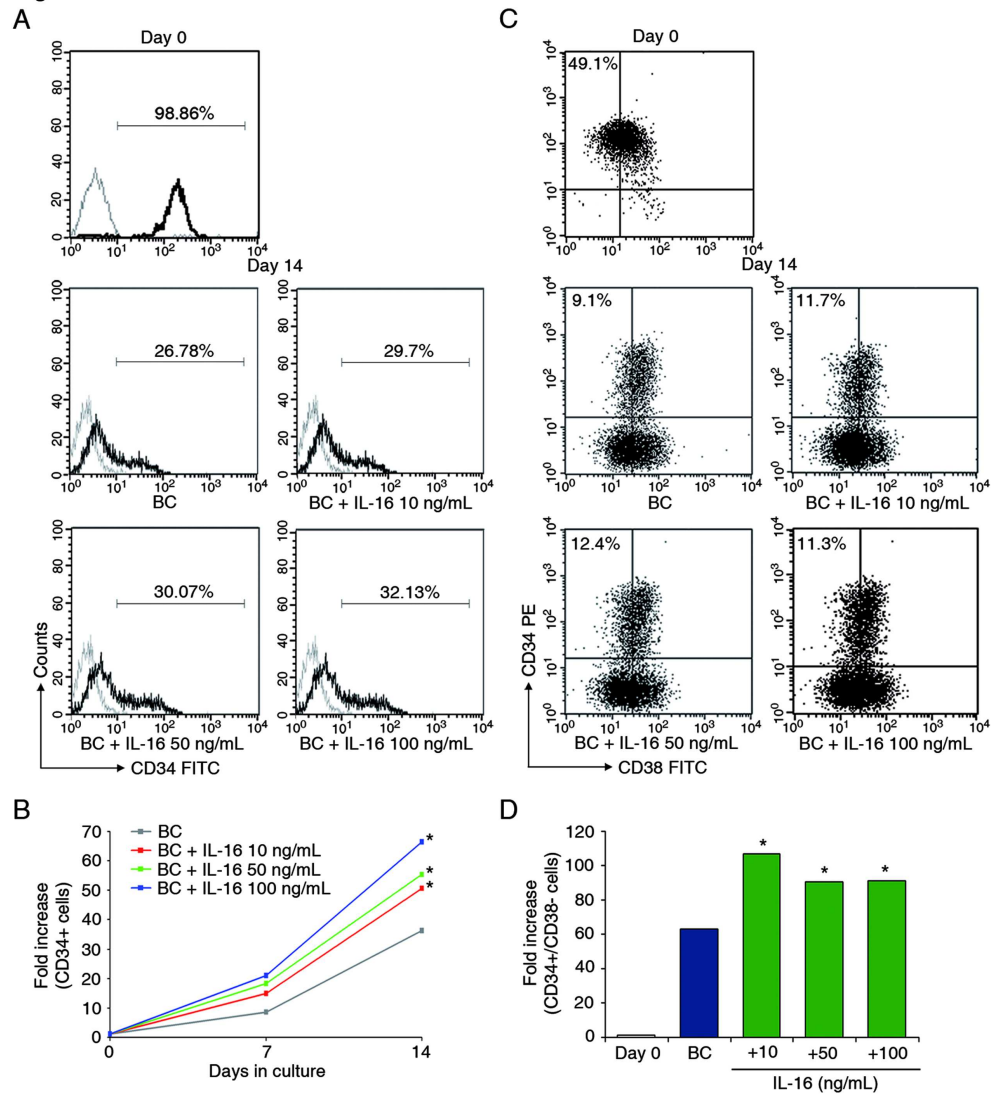
127x200mm (516 x 516 DPI)

Figure 2



76x149mm (600 x 600 DPI)

Figure 3



127x142mm (516 x 516 DPI)

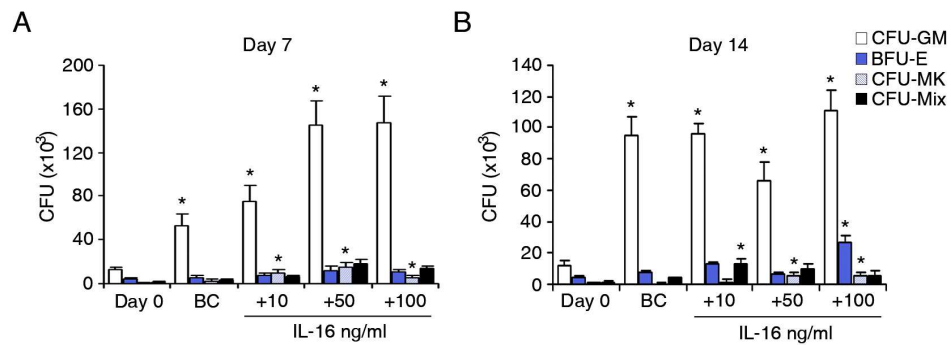


Figure 4

149x62mm (300 x 300 DPI)

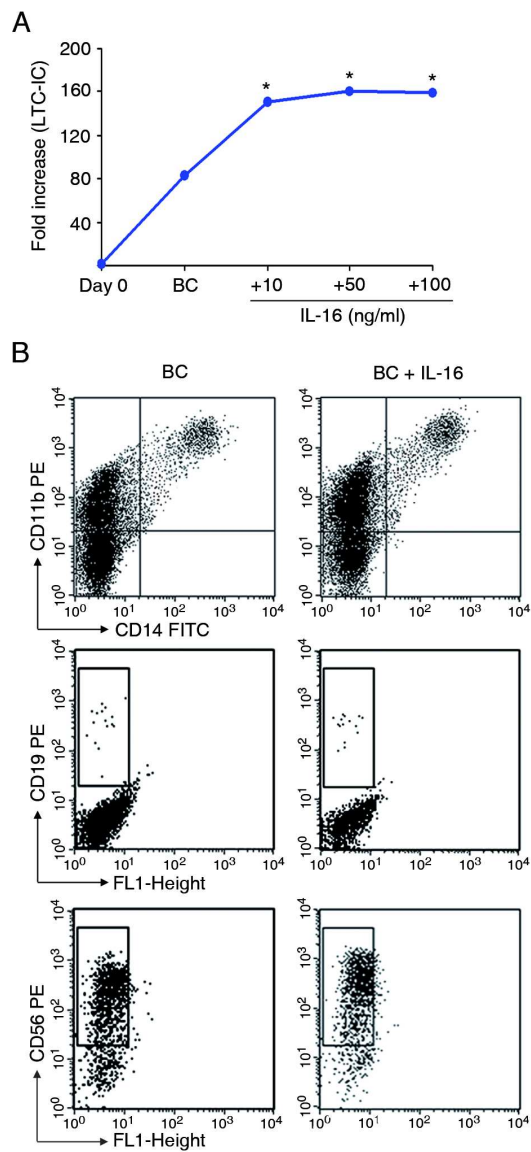
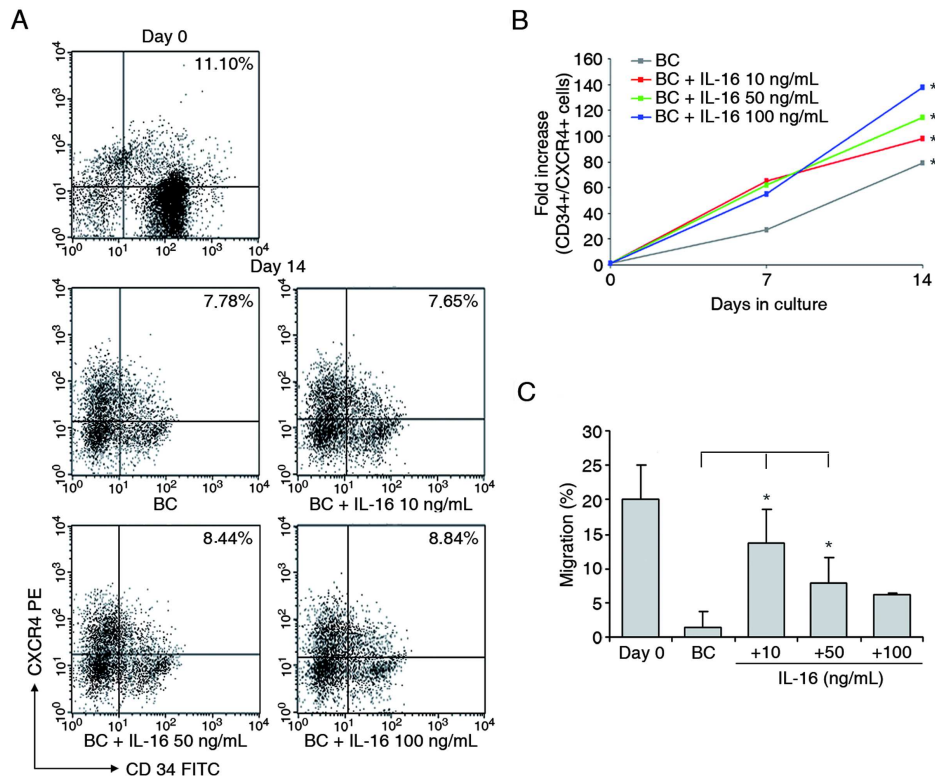


Figure 5

80x180mm (300 x 300 DPI)

Figure 6



127x112mm (516 x 516 DPI)

Up-regulation of EphB and Ephrin-B Expression in Rhabdomyosarcoma

ANNA C. BERARDI¹, SONIA MARSILIO^{2,3*}, CRISTINA ROFANI^{1*},
OMBRETTA SALVUCCI⁴, PIERLUIGI ALTAVISTA⁵, FRANCESCO M. PERLA²,
FRANCESCA DIOMEDI-CAMASSEI⁶, STEFANIA UCCINI⁷, GEORGE KOKAI⁸,
LORENA LANDUZZI⁹, HEATHER P. McDOWELL¹⁰ and CARLO DOMINICI^{2,3,11}

¹Laboratory of Stem Cells, ²Laboratory of Oncology,
⁶Division of Pathology, Bambino Gesù Children's Hospital, I-00165 Rome;
Departments of ²Paediatrics and ⁷Experimental Medicine & Pathology, La Sapienza University, I-00161 Rome;
⁴Department of Biomedical Sciences and Biotechnology, University of Brescia, I-25123 Brescia;
⁵Section of Toxicology and Biomedical Sciences, ENEA Research Center Casaccia, I-00060 Rome;
⁹Rizzoli Orthopaedic Institute, I-40136 Bologna, Italy;
Departments of ⁸Pathology and ¹⁰Oncology, Royal Liverpool Children's NHS Trust Alder Hey, L12 2AP Liverpool;
¹¹Division of Child Health, School of Reproductive and
Developmental Medicine, Liverpool University, L12 2AP Liverpool, U.K.

Abstract. Background: Increased expression of Eph receptors and their ephrin ligands has been implicated in promoting angiogenesis and tumour progression in several malignancies. Here the expression of mRNA for ephrin-B and EphB receptors in rhabdomyosarcoma (RMS) cell lines and primary tumours was investigated. Materials and Methods: Expression of mRNA for ephrin-B and EphB receptors in RMS cell lines and primary tumours was measured by real-time RT-PCR and compared with the expression in normal striated muscle. Results: A dysregulation of both ligands and receptors was found in all cell lines. In embryonal tumours, overexpression of ephrin-B1 correlated with overexpression of EphB1 ($r=0.97$, $p<0.01$) and EphB3 ($r=0.94$, $p<0.05$); overexpression of ephrin-B2 correlated with overexpression of EphB1 ($r=0.94$, $p<0.05$), EphB2 ($r=0.88$, $p<0.01$) and EphB4 ($r=0.76$, $p<0.01$). In alveolar tumours, no similar correlations were found. A correlation between EphB2 and EphB4 receptors was demonstrated in both tumour types, being positive in embryonal cases ($r=0.81$, $p<0.01$) and negative in alveolar ($r=-1.00$, $p<0.01$). Conclusion: A global up-regulation of

ephrin-B and EphB receptors in RMS tumours was found. The correlation between EphB2 and EphB4 receptors suggests a possible role for ephrin-B and EphB receptors in RMS development.

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common soft tissue sarcoma in children and adolescents, accounting for 7-8% of malignant tumours in patients younger than 20 years (1). RMS is a highly malignant embryonal tumour that arises from mesenchymal progenitor cells as a consequence of disruptions of the developmental program that would lead them to differentiate into striated muscle cells. There are two major RMS morphological types, embryonal (75% of all cases) and alveolar (2). Embryonal histology occurs more frequently at favourable sites in younger children, whilst alveolar presents more often in the extremities and in adolescents (3, 4). No consistent genetic marker has been identified in embryonal RMS, whilst approximately 75% of alveolar RMS are characterised by the translocation t(2;13)(q35;q14) (55% of cases) or t(1;13)(p36;q14) (20% of cases) (5). Although up to 70% of children and adolescents with RMS can be cured by modern intensive treatment, the outcome for the subset of patients with high-risk tumours remains very poor (3, 4). Improved molecular characterisation of this tumour would identify additional dysregulated pathways that could subsequently be exploited as potential therapeutic targets.

The largest family of receptor protein tyrosine kinases consists of proteins related to Eph, a receptor named for its expression in an erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma cell line, and comprises 16 Eph

*Both authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Carlo Dominici, MD, Department of Paediatrics, La Sapienza University, Viale Regina Elena 324, I-00161 Rome, Italy. Tel: +390649979212, Fax: +390649972580, e-mail: Carlo.Dominici@uniroma1.it

Key Words: Ephrin-B, EphB receptors, rhabdomyosarcoma.

receptors for which nine ligands, called ephrins, have been identified (6). Ephrins are divided into an ephrin-A subclass including six glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) anchored proteins, and an ephrin-B subclass including three type I trans-membrane proteins (7). Ephrins can also be divided on the basis of preferential binding to two corresponding receptor groups, EphA (comprising ten members, EphA1–EphA10) and EphB (comprising six members, EphB1–EphB6), identified in turn by structural similarities in the extracellular domain (7). Interactions between ephrins and Eph receptors require cell-to-cell contact and initialize bidirectional signalling downstream of the ligand–receptor complex in both the receptor- (forward signalling) and the ligand-bearing cell (reverse signalling) (8, 9). Depending on the degree of clustering of Eph–ephrin complexes, contacts between cells can be stabilized to mediate adhesion, or destabilize to mediate repulsion (6). These characteristics make ephrins and Eph receptors critical cues in regulating cell shape, adhesion/repulsion, migration and positioning during developmental processes that require spatially organized cell movement such as vascular development and tissue-border formation (6, 10-12).

Alterations of the mechanisms controlling cell adhesion and motility have a central role in promoting tumour invasion and angiogenesis (13-15). Altered expression of ephrins and/or Eph receptors has been implicated in tumour progression in a number of human malignancies, e.g. breast, colorectal, endometrial, oesophageal, gastric, small cell lung, ovarian and prostate cancer, glioblastoma, malignant melanoma, and neuroblastoma among others (16-18). Up-regulation of members of ephrins and/or Eph receptors in cancer cells has usually been described in association with more aggressive tumour behaviour (16-18). However, in other tumour types their up-regulation has been reported to suppress the malignant phenotype (19).

Previous studies have shown that members of ephrins and/or Eph receptors are expressed during striated muscle precursor cell development and that their expression, more prominent in early embryonal period, is still detectable in postnatal life (17, 20, 21). In this study, the expression of EphB/ephrin-B family members was investigated in human RMS cell lines and primary tumours by using quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Materials and Methods

RMS cell lines. RMS embryonal cell lines RD, RD18, CCA, and alveolar cell lines RH30 and RMZ-RC2 were kindly provided by P.L. Lollini and have previously been described (22-26). All cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagles medium containing 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma, Dorset, UK), 1% L-glutamine and 1% streptomycin/penicillin. CCA and RMZ-RC2 cell lines were incubated in 7% CO₂, whilst the remaining cell lines in 5% CO₂.

RMS primary tumours. Primary tumour samples were obtained from 16 children with newly diagnosed embryonal (n=13) or alveolar (n=3) RMS presenting to the Department of Paediatrics at La Sapienza University, the Division of Oncology at Bambino Gesù Children's Hospital and the Department of Oncology at the Royal Liverpool Children's NHS Trust Alder Hey. At surgery, tumour sample aliquots were immediately snap frozen and stored at -80°C until RNA extraction for molecular analysis. Institutional written informed consent was obtained from the patient's parents or legal guardians. Samples of normal striated muscle were obtained from five volunteer adult donors undergoing surgery because of non-oncological diseases, snap frozen and stored at -80°C until RNA extraction for molecular analysis. The study was reviewed and approved by the local Ethics Committee.

Real-time polymerase chain reaction. Total RNA from RMS cell lines, primary tumours and normal striated muscle was isolated by TRIzol (Gibco, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. First, strand cDNA synthesis from total RNA was performed by using High-capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2-5 µg of total RNA were used for cDNA synthesis using random primers in the presence of Multiscribe reverse transcriptase (Applied Biosystems). Real-time TaqMan PCR was performed using TaqMan universal PCR master mix according to the manufacturer's protocol. PCR amplification was performed in a final volume of 25 µl in triplicate wells, using standard temperature cycles (95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 40 cycles). TaqMan gene expression assay (Applied Biosystems) was used for the amplification of the following genes: *EphB1* (Hs00174725 m1); *EphB2* (Hs00362096 m1); *EphB3* (Hs00177903 m1); *EphB4* (Hs00174752 m1); *ephrin-B1* (Hs00187950 m1); *ephrin-B2* (Hs00270004 m1); *GAPDH* (Hs99999905 m1). PCR reactions were performed using ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). The expression of each target gene was normalised according to the expression of endogenous control GAPDH. The amount of gene-specific mRNA was displayed as the fold gene expression of each sample compared to normal striated muscle. The comparative CT method was used to determine EphB2, EphB3, EphB4 and ephrin-B1 expression. The standard curve method was used to measure EphB1 and ephrin-B2 expression. Gene expression levels for each sample were expressed as fold change on a logarithmic scale compared to the corresponding value in normal striated muscle.

Statistical analysis. Correlations between ephrin-B2 and EphB1, EphB2, EphB4; between ephrin-B1 and EphB1, EphB2, EphB3; and between EphB2 and EphB4 were analysed using Pearson's test and expressed as the correlation coefficient (r). Statistical comparisons between cell lines and normal striated muscle, primary tumours and normal striated muscle, embryonal and alveolar tumours were performed using Student's *t*-test for independent samples. A *p*-value <0.05 was taken as being statistically significant.

Results

Expression of EphB receptors and ephrin-B in RMS cell lines. The expression profile of EphB1–4 receptors and ephrin-B1 and ephrin-B2 was measured in cell lines. As

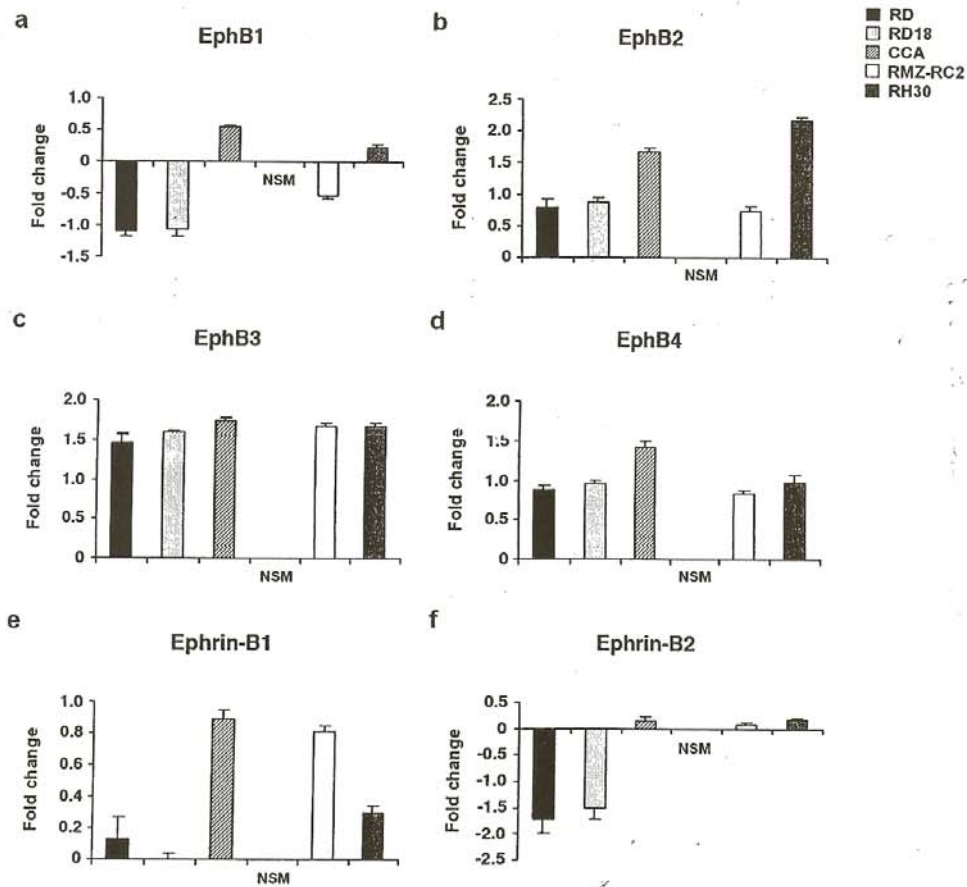


Figure 1. Expression for EphB1–B4 receptors and Ephrin-B1/B2 ligands in RMS cell lines. RD, RD18, CCA (embryonal type), RMZ-RC2 and RH30 (alveolar type) RMS cell lines were studied using real-time TaqMan PCR. The expression of each target gene was normalised according to the expression of endogenous control GAPDH. The comparative CT method was used to determine b) EphB2, c) EphB3, d) EphB4, and e) ephrin-B1 expression. The standard curve method was used to study a) EphB1 and f) ephrin-B2 expression. Gene expression levels for each sample are expressed as fold change on a logarithmic scale compared to the corresponding value in normal striated muscle (NSM). Results are representative of three independent experiments.

shown in Figure 1a, EphB1 mRNA expression was significantly down-regulated in RD and RD18 (embryonal type) and in RMZ-RC2 (alveolar type) as compared to normal striated muscle, whilst it was significantly up-regulated in CCA (embryonal type) and slightly up-regulated in RH30 (alveolar type). Regarding EphB2, all the cell lines showed an up-regulation, with the highest mRNA levels being found in RH30 and CCA (Figure 1b). EphB3 and EphB4 were significantly up-regulated in all the cell lines (Figure 1c, d). As far as the expression of the

ligands was concerned, ephrin-B1 was significantly up-regulated in CCA and to a marginal extent in RD embryonal cell lines, whilst in RD18 the level of expression was not different from the level detected in striated muscle; a significant up-regulation in RMZ-RC2 and a lower up-regulation in RH30 alveolar cell lines were shown (Figure 1e). Ephrin-B2 expression was significantly down-regulated in RD and RD18; on the contrary, only a marginal overexpression was demonstrated in CCA, RMZ-RC2 and RH30 (Figure 1f).

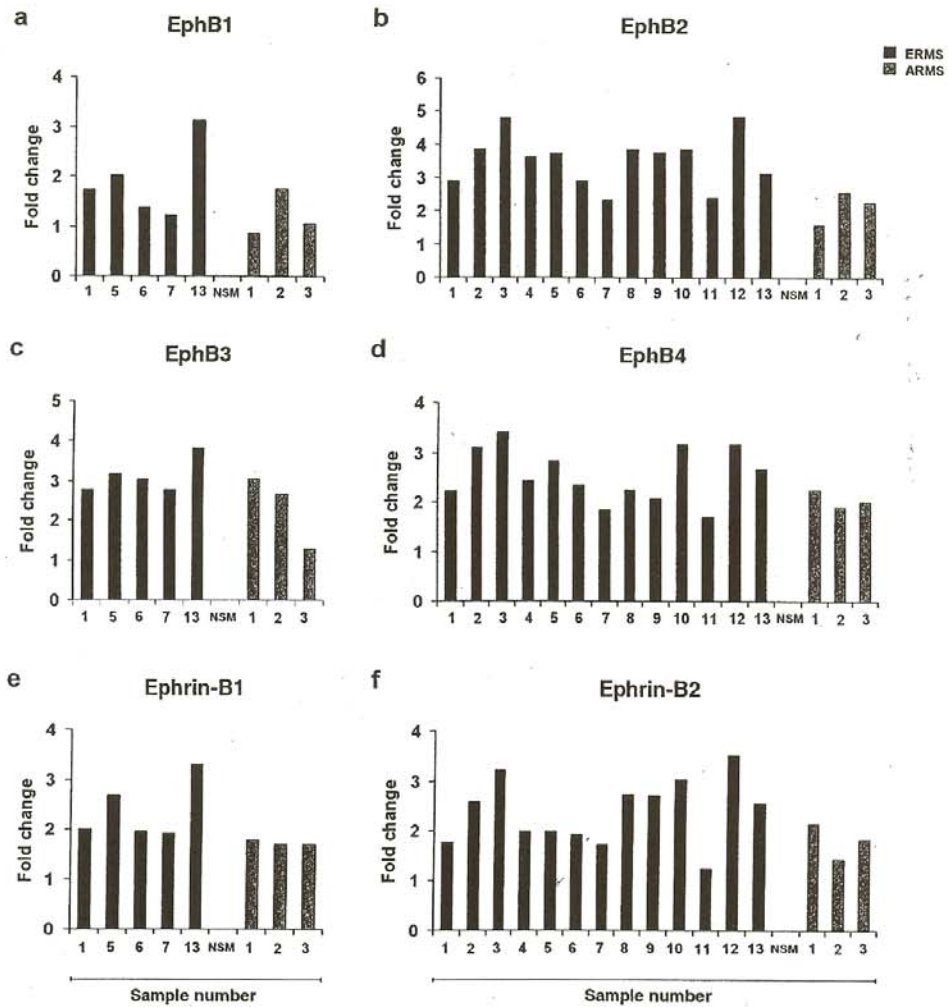


Figure 2. Expression for EphB1-4 receptors and ephrinB1/B2 ligands in RMS samples. Primary tumour samples were obtained from 13 embryonal and 3 alveolar RMS (ERMS and ARMS, respectively). Expression was analysed by quantitative real-time RT-PCR according to the protocol used for cell lines. a) EphB1; b) EphB2; c) EphB3; d) EphB4; e) ephrin-B1; f) ephrin-B2. Gene expression levels for each sample are expressed as fold change on a logarithmic scale compared to the corresponding value in normal striated muscle (NSM). Results are representative of three independent experiments.

Expression of EphB receptors and ephrin-B in primary RMS. The global dysregulation of EphB receptors and ephrin-B ligands in the cell lines prompted us to study the mRNA levels of the same molecules in a series of primary tumours. Both EphB receptors and ephrin-B were found to be significantly up-regulated in all samples, as shown in Figure 2. Overall, no significant differences in the expression of

EphB1-4 receptors were detected between embryonal and alveolar tumours. EphB1 was overexpressed to a similar extent in both types of RMS, with the only exception of an embryonal tumour (#13) whose expression was 3.12-fold compared to striated muscle (Figure 2a). EphB2 was the receptor with the highest levels of expression, showing in all but one case, more than a two-fold increase compared to

striated muscle, with a range of fold change from 2.34 to 4.83 in embryonal tumours, and from 1.57 to 2.56 in alveolar tumours (Figure 2b). EphB3 expression showed an increase from 2.76- to 3.82-fold in embryonal cases and from 1.29- to 3.05-fold in alveolar (Figure 2c). For EphB4, the highest level of expression was 3.39-fold; a 1.68- to 3.39-fold increase was demonstrated in embryonal cases, whilst in alveolar cases a rather homogeneous 2-fold increase was detected (Figure 2d). With regard to the ligands, ephrin-B1 showed a range of increase from 1.91- to 3.30-fold in embryonal tumours, and a quite stable 2-fold increase in alveolar tumours (Figure 2e). For ephrin-B2, a range of fold change from 1.22 to 3.52 in embryonal cases, and from 1.42 to 2.12 in alveolar cases was determined (Figure 2f).

Correlations between the ligands and their receptors in primary RMS. Correlations between ephrin-B1 and EphB1, EphB2, EphB3; between ephrin-B2 and EphB1, EphB2, EphB4; and between EphB2 and EphB4 were analysed (Table I). With regard to ephrin-B1, in embryonal tumours significant positive correlations with EphB1 ($r=0.97$, $p<0.01$) and EphB3 ($r=0.94$, $p<0.05$) were found, whilst in alveolar tumours no significant correlations were demonstrated. With regard to ephrin-B2, in embryonal tumours, significant positive correlations were shown with EphB1 ($r=0.94$, $p<0.05$), EphB2 ($r=0.88$, $p<0.01$) and EphB4 ($r=0.76$, $p<0.01$) receptors. Again, in alveolar tumours no significant correlations were found.

Correlations between EphB2 and EphB4 receptors in primary RMS. A significant correlation between EphB2 and EphB4 was found in this series of RMS (Table I). However, the levels of expression for the two genes were directly correlated in embryonal cases ($r=0.81$, $p<0.01$), whilst inversely (negatively) correlated in alveolar ($r=-1.00$, $p<0.01$).

Discussion

A dysregulation in the expression of ephrins and/or Eph receptors has been implicated in tumour progression in a number of human malignancies (16-18), with a trend for an up-regulation of ephrins and/or Eph receptors in cancer cells in association with a more aggressive tumour behaviour (16-18). Different ephrins and/or Eph receptors have been described as being expressed during early embryonal development of striated muscle precursor cells and being still detectable in postnatal life (17, 20, 21). However, no data are presently available on the expression of Eph receptors and ephrin ligands in RMS.

In the present study, the expression of EphB1-4 receptors and ephrin-B1-2 ligands was assessed in RMS cell lines and primary tumours. A global dysregulation of both receptors

Table I. Correlation analysis of ephrin-B ligands vs. EphB receptors, and of EphB2 vs. EphB4 receptors in RMS tumours.

		Rhabdomyosarcoma			
		Embryonal type		Alveolar type	
		n	r (p-value)	n	r (p-value)
Ephrin-B1 vs.					
EphB1	5	0.97 ($p<0.01$)	3	-0.67 (p: n.s.)	
EphB2	5	0.58 (p: n.s.)	3	-0.9 (p: n.s.)	
EphB3	5	0.94 ($p<0.05$)	3	0.65 (p: n.s.)	
Ephrin-B2 vs.					
EphB1	5	0.94 ($p<0.05$)	3	-0.97 (p: n.s.)	
EphB2	13	0.88 ($p<0.01$)	3	-0.95 (p: n.s.)	
EphB4	13	0.76 ($p<0.01$)	3	0.95 (p: n.s.)	
EphB2 vs.					
EphB4	13	0.81 ($p<0.01$)	3	-1.00 (<0.01)	

n: number of tumours; r: correlation coefficient according to Pearson; n.s.: not significant.

and ligands was demonstrated in cell lines, without a recognizable pattern of expression specifically associated with either the embryonal or alveolar type. These findings prompted us to study the mRNA levels of the same molecules in primary tumours. Both EphB receptors and ephrin-B were found to be significantly up-regulated in all samples, again with no recognizable pattern of expression specifically associated with either the embryonal or alveolar morphological type, possibly because of the very limited number of alveolar tumours analysed. Despite the fact that in this study we did not detect any obvious pattern of expression for EphB receptors and ephrin-B ligands specifically associated with the embryonal or alveolar type, the present findings clearly demonstrate the existence in RMS of a global dysregulation of the expression of ephrin-B and EphB receptors. This is in agreement with previous similar reports in other tumour histotypes (16-18).

A characteristic feature of ephrins and Eph receptors is their ability to mediate bidirectional signalling: an Eph receptor can act as a ligand in the same way that an ephrin can act as a receptor (8, 9). Thus, it has been reported that the increased ratio of receptors to ligands caused by Eph overexpression may result in an increased tumour sensitivity to the ligand-induced stimulation and, in turn, in a decreased cell-to-cell attachment, increased motility and eventually in a higher degree of tissue invasiveness (27).

Taking into account the possibilities of reverse and/or forward activation for the ligand-receptor complexes identified so far (8, 9), the Pearson test was utilised in order to identify possible correlations between the levels of expression for ephrin-B and EphB receptors in RMS. In embryonal tumours, significant positive correlations between ephrin-B1 and either EphB1 or EphB3 were demonstrated. Similarly, significant positive correlations between ephrin-B2 and either EphB1, or EphB2, or EphB4 were found. On the contrary, in alveolar tumours no significant correlations were demonstrated in this study, but the analysis of a higher number of such cases will be needed to demonstrate whether and to what extent ephrin-B subtypes are possibly correlated with EphB receptors in this type of tumour. Even so, the evidence that in embryonal tumours the levels of expression for several ligand-receptor complexes are correlated seems highly suggestive for a biological role of these pathways in RMS.

Previous studies showed that ephrin-B2 and its receptors EphB2 and EphB4 are critical for embryonic vascular development (28-30). Ephrins and Eph receptors are also major determinants of tumour angiogenesis in combination with vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins (18). Recently, increased levels of EphB2 and EphB4 were found to be associated in breast cancer with shorter overall survival and advanced stage, respectively (31). In colorectal cancer however, EphB2 and EphB4 were reported to be positively correlated with each other and inversely correlated with the degree of malignancy (32). In the present study, a significant correlation between EphB2 and EphB4 was found in RMS. However, the levels of expression for the two genes were directly correlated in embryonal cases, whilst inversely (negatively) correlated in alveolar. Taken together, these findings support the hypothesis of an active biological role for these molecules in RMS, and further confirm the complexity of the ephrins-Eph receptor network and their ability to exert opposing functions based on the individual cellular context.

In summary, in the present study a widespread dysregulation of the expression of ephrin-B and EphB receptors was demonstrated, with a significant global up-regulation in the tumours compared to the non-malignant controls. Significant correlations between ligands and receptors, and between receptors themselves were also shown in alveolar tumours. These preliminary findings suggest that ephrin-B and EphB receptors may have a biological activity in RMS cells.

Acknowledgements

The Authors thank Professor P.L. Lollini for kindly providing cell lines and Ms. O. Mannarino for skilful technical assistance. This study was partially supported by "Io...domani" Associazione per la Lotta contro i Tumori Infantili (ALTI).

References

- Gurney JG, Young Jr JL, Roffers SD, Smith MA and Bunin GR: Soft tissue sarcomas. *In: Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young Jr JL and Bunin GR (eds.). Bethesda, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. pp. 111-123, 1999.
- Qualman SJ, Coffin CM, Newton WA, Hojo H, Triche TJ, Parham DM and Crist WM: Intergroup Rhabdomyosarcoma Study: update for pathologists. *Pediatr Dev Pathol J*: 550-561, 1998.
- McDowell HP: Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child* 88: 354-357, 2003.
- Breitfeld PP and Meyer WH: Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity. *The Oncologist* 10: 518-527, 2005.
- Barr FG: Gene fusions involving *PAX* and *FOX* family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 20: 5736-5746, 2001.
- Pasquale EB: Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 462-475, 2005.
- Eph Nomenclature Committee: Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. *Cell* 90: 403-404, 1997.
- Brückner K and Klein R: Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. *Curr Opin Neurobiol* 8: 375-382, 1998.
- Kullander K and Klein R: Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 475-486, 2002.
- Pasquale EB: The Eph family of receptors. *Curr Opin Cell Biol* 9: 608-615, 1997.
- Coulthard MG, Duffy S, Down M, Evans B, Power M, Smith F, Stylianou C, Kleikamp S, Oates A, Lackmann M, Burns GF and Boyd AW: The role of the Eph-ephrin signalling system in the regulation of developmental patterning. *Int J Dev Biol* 46: 375-384, 2002.
- Cheng N, Brantley DM and Chen J: The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 75-85, 2002.
- Friedl P and Wolf K: Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362-374, 2003.
- Sahai E: Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 15: 87-96, 2005.
- Christofori G: New signals from the invasive front. *Nature* 441: 444-450, 2006.
- Nakamoto M and Bergemann AD: Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microsc Res Tech* 59: 58-67, 2002.
- Surawska H, Ma PC and Salgia R: The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 419-433, 2004.
- Heroult M, Schaffner F and Augustin HG: Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression. *Exp Cell Res* 312: 642-650, 2006.
- Tang XX, Zhao H, Robinson ME, Cnaan A, London W, Cohn SL, Cheung NK, Brodeur GM, Evans AE and Ikegaki N: Implications of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in human neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10936-10941, 2000.
- Lai KO, Ip FC, Cheung J, Fu AK and Ip NY: Expression of Eph receptors in skeletal muscle and their localization at the neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci* 17: 1034-1047, 2001.

- 21 Swartz ME, Eberhart J, Pasquale EB and Krull CE: EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. *Development* 128: 4669-4680, 2001.
- 22 Houghton JA, Houghton PJ, Brodeur GM and Green AA: Development of resistance to vincristine in a childhood rhabdomyosarcoma growing in immune-deprived mice. *Int J Cancer* 28: 409-415, 1981.
- 23 Nanni P, Schiaffino S, De Giovanni C, Nicoletti G, Prodi G, Del Re B, Eusebi V, Ceccarelli C, Saggini L and Lollini PL: RMZ: a new cell line from a human alveolar rhabdomyosarcoma: *in vitro* expression of embryonic myosin. *Br J Cancer* 54: 1009-1114, 1986.
- 24 Douglass EC, Valentine M, Eteubanas E, Parham D, Webber BL, Houghton PJ, Houghton JA and Green AA: A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet Cell Genet* 45: 148-155, 1987.
- 25 De Giovanni C, Nanni P, Nicoletti G, Ceccarelli C, Scotlandi K, Landuzzi L and Lollini PL: Metastatic ability and differentiative properties of a new cell line of human embryonal rhabdomyosarcoma (CCA). *Anticancer Res* 9: 1943-1949, 1989.
- 26 Lollini PL, De Giovanni C, Landuzzi L, Nicoletti G, Scotlandi K and Nanni P: Reduced metastatic ability of *in vitro* differentiated human rhabdomyosarcoma cells. *Invasion Metastasis* 11: 116-124, 1991.
- 27 Wimmer-Kleikamp SH and Lackmann M: Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* 57: 421-431, 2005.
- 28 Adams RH: Vascular patterning by Eph receptor tyrosine kinases and ephrins. *Semin Cell Dev Biol* 13: 55-60, 2002.
- 29 Zhang J and Hughes S: Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. *J Pathol* 208: 453-461, 2006.
- 30 Salvucci O, de la Luz Sierra M, Martina JA, McCormick PJ and Tosato G: EphB2 and EphB4 receptors forward signaling promotes SDF-1-induced endothelial cell chemotaxis and branching remodeling. *Blood* 108: 2914-2922, 2006.
- 31 Wu Q, Suo Z, Risberg B, Villman K and Nesland JM: Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol Oncol Res* 10: 26-33, 2004.
- 32 Battle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S and Clevers H: EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 435: 1126-1130, 2005.

Received October 17, 2007

Revised December 10, 2007

Accepted January 8, 2008