

(I) PURIFICAZIONE, CARATTERIZZAZIONE ED AMPLIFICAZIONE IN VITRO DI CELLULE STAMINALI DI SANGUE PERIFERICO ADULTO E SANGUE CORDONALE. (II) ESPANSIONE E DIFFERENZIAZIONE MONOLINEA (ERITROIDE, MEGACARIOCITICA, GRANULOCITICA, MONOCITICA) IN COLTURA DI PROGENITORI PURIFICATI

Mauro Valtieri, Marco Gabbianelli, Elisabetta Montesoro, Elvira Pelosi, Paola Samoggia, Ugo Testa, Cesare Peschle

Laboratorio di Ematologia ed oncologia, Istituto Superiore di sanità, Roma

Introduzione

Le cellule staminali ematopoietiche possiedono tre importanti proprietà: (a) elevata capacità di auto-mantenimento; (b) largo potenziale differenziativo e (c) prolungato mantenimento nella fase G_0 - G_1 del ciclo cellulare (1). Queste caratteristiche si stemperano gradualmente nei progenitori ematopoietici differenzianti (2). Dopo induzione della proliferazione, le cellule staminali ed i progenitori primitivi vanno incontro a divisioni simmetriche (totale identità delle due cellule: automantenimento) oppure asimmetriche (progressiva deviazione del fenotipo iniziale: differenziamento) (3). La differenziazione ematopoietica è stata interpretata secondo il modello stocastico (4), il modello induttivo (5) o quello ibrido (6). Secondo l'ipotesi stocastica, eventi molecolari intrinseci preprogrammati (ad una frequenza fissa) danno origine al differenziamento, mentre i fattori ematopoietici permettono la sopravvivenza e la proliferazione di cellule già programmate. Secondo il modello induttivo, i fattori di crescita associati a meccanismi regolatori ambientali cellulo-mediati modulano il differenziamento cellulare. In via alternativa l'ipotesi ibrida prevede che gli eventi stocastici prevalgano negli stadi precoci dello sviluppo, mentre gli eventi deterministici abbiano un ruolo chiave nella vita adulta, dove è richiesta un'omeostasi puntuale in numerosi eventi di stress ematopoietico. A tal proposito i progenitori ematopoietici esprimono i recettori dei fattori di crescita multipotenti (IL-3 e GM-CSF) ma non dei fattori di crescita oligo o unipotenti (Epo, Tpo, G-CSF, M-CSF) (7). L'espressione di questi recettori per fattori di crescita tardivi è associata con la progressiva maturazione cellulare lungo linee differenziative mutualmente esclusive; ad esempio il recettore per Epo aumenta nei proeritroblasti e diminuisce nei mieloblasti (7). Inoltre, l'interazione del fattore di crescita alto con il proprio recettore stimola l'espressione del recettore per il fattore ematopoietico distale (8). A prescindere dal modello proposto e dagli eventi causali del differenziamento è generalmente accettato che la decisione differenziativa della cellula ematopoietica sia associata all'attivazione di un programma genetico specifico mediato da una rete di fattori trascrizionali che orchestrano i programmi genetici a livello trascrizionale (9-11).

L'enorme quantità di conoscenze accumulate recentemente sui meccanismi molecolari dell'ematopoiesi è stata basata su modelli cellulari patologici (linee cellulari leucemiche) o para-fisiologici (linee immortalizzate di progenitori murini dipendenti da fattori di crescita) oppure su animali transgenici dove la distruzione di geni selezionati ha generato fenotipi che ne hanno definito la funzione (9-12). Tuttavia questi studi presentano alcune limitazioni nel caso di ridondanza genica, interferenza della distruzione genica selettiva sui geni adiacenti, effetti letali durante l'ontogenesi, mancanza di specificità tessutale e differenze specie-specifiche (11).

Gli studi molecolari sull'ematopoiesi normale sono stati invalidati dalla scarsità di tessuto disponibile e dalla rarità di cellule staminali e progenitori ematopoietici. Il nostro contributo in tal senso è stato la purificazione di questi elementi cellulari dal sangue periferico adulto, associata ad elevato recupero e la messa a punto di sistemi differenziativi omogenei unilinea (13-20). In questi sistemi le cellule staminali e progenitrici vengono indotte a graduale differenziamento e maturazione lungo linee ematopoietiche specifiche, fornendo così lo strumento per valutare l'espressione e la funzione di geni regolatori durante l'ematopoiesi.

Materiali e metodi

Purificazione di progenitori e cellule staminali ematopoietiche (13-20). - Il sangue periferico adulto è stato ottenuto da donatori maschi consenzienti di 20-40 anni. Il sangue è stato separato mediante il gradiente di densità Ficoll-Hypaque (1.077 g/ml). Le cellule mononucleate raccolte sono state lavate, risospese in IMDM 20% FCS e trattate con tre cicli di aderenza su plastica. Le cellule sono state quindi sottoposte ad un'ulteriore separazione per gradiente di densità discontinuo, mediante Percoll, e le frazioni corrispondenti a densità di 1.052 e 1.056 g/ml. Sono state raccolte, lavate estensivamente, e quindi trattate con una miscela di anticorpi monoclonali anti-linfociti T, B, NK, monociti e granulociti (gli anticorpi anti CD-71, CD-45, CD11a sono stati anche inclusi). Sono quindi state aggiunte microsferi metalliche coperte da anticorpi anti IgG di topo (delle differenti sottoclassi) e anti IgM (Dynabeads M450) alla concentrazione di 4 microsferi per cellula e dopo opportuna incubazione le cellule positive sono state separate dalle negative mediante magnete. Altre microsferi, coperte da anticorpi purificati per affinità anti IgG1 (specifiche per Fc; Dynabeads 110.4), sono state aggiunte alla concentrazione di 10/cellula e di nuovo separate in campo magnetico. Il sangue cordonale è stato separato con la medesima metodologia con l'aggiunta dell'anticorpo anti-glycophorin-A allo scopo di eliminare l'eccesso di eritroblasti presenti in questo tessuto (21-23).

Coltura liquida dei progenitori e cellule staminali ematopoietiche. - 5×10^4 cellule staminali e progenitrici/ml sono state coltivate in IMDM FCS⁻ contenente BSA (10 mg/ml), transferrina umana saturata con ferro [500 µg/ml LDL umane (40 µg/ml),

insulina (10 µg/ml), nucleosidi (10 µg/ml di ciascuno)] e supplementato con differenti combinazioni di fattori di crescita; nella coltura eritroide IL-3 (0.01/ml), GM-CSF (0.001 ng/ml) Epo (3 U/ml). Nella coltura granulocitopoietica IL-3 (1 U/ml) GM-CSF (0.1 ng/ml), G-CSF (500 U/ml). Nella coltura megacariocitopoietica TPO (100 mg/ml). Nella coltura monocitopoietica, dove la presenza di FCS (40%) si è rivelata indispensabile, ligando di FLT3 (100 ng/ml) e M-CSF (500 U/ml).

Immunofluorescenza. - Le cellule in coltura liquida sono state contate ogni due giorni, diluite per non superare la concentrazione di 2.5×10^5 /ml e prelevate per analisi morfologica ed immunofluorescenza per fattori trascrizionali. Le cellule sono state citocentrifugate, fissate con metanolo per 5 minuti a 37°C, con acetone per 2 minuti a -10°C ed incubate con opportune diluizioni di anticorpi anti GATA-2, GATA-1, NF-E2, Tal-1, Lmo2 per 30 minuti a 4°C.

Dopo lavaggio, è stato aggiunto l'anticorpo secondario marcato con FITC per 30 minuti a 4°C. Dopo ulteriore lavaggio le cellule sono state osservate al microscopio con lampada UV per fluorescenza.

Risultati e discussione

La procedura di purificazione descritta permette di isolare una popolazione di cellule che esprimono il CD34 al 90-95% e soprattutto generano colonie in percentuale simile. Le colonie si sviluppano tutte fra il giorno 12 e 17 di coltura in mezzo semisolido e sono di grandi dimensioni. Il recupero dei progenitori è di circa il 70% del numero inizialmente presente nel sangue non trattato. La coltura liquida eritroide (E) è caratterizzata da una crescita di circa tre logaritmi del numero di cellule iniziali nell'arco di 17 giorni. Durante la prima settimana si osserva un progressivo calo di espressione di CD34 consensuale al decremento di blasti, mentre aumenta il numero assoluto di cellule clonogeniche che progressivamente differenziano da progenitori a precursori, come si evince dalla caduta delle dimensioni delle colonie da esse generate. Durante la seconda settimana cominciano a maturare progressivamente le cellule terminali con aumento progressivo dall'espressione di glicoforina-A e la comparsa di tutti gli elementi eritroblastici maturanti riconoscibili morfologicamente. Al termine della coltura oltre il 95% delle cellule è glicoforina A positiva e questi eritroblasti sono in grande maggioranza ortocromatici con alcuni policromatofili.

La coltura granulocitopoietica (G) è caratterizzata da una amplificazione cellulare di circa due logaritmi in relazione alla più scarsa capacità proliferativa della linea granulocitopoietica rispetto a quella eritroide.

Nuovamente, durante la prima settimana, si assiste ad un progressivo decremento delle cellule CD34⁺ e dei blasti, i quali, durante la seconda settimana maturano progressivamente acquisendo l'espressione di CD15 e la morfologia granulocitaria neutrofila.

La coltura megacariocitopoietica (MK) è caratterizzata da una crescita numerica globale piuttosto ridotta (circa 5 volte) con una maturazione completa a megacariociti con più di 20 nuclei in 12 giorni.

Infine la coltura monocitopoietica (M), con una crescita di circa 50 volte, è associata al consueto calo di cellule CD34⁺ durante la prima settimana ed al progressivo aumento di monociti maturi CD14⁺ e CD11b⁺ durante la seconda settimana di coltura.

La espressione di fattori trascrizionali eritroidi, come GATA-1, NF-E2, tal-1 e Lmo2 risulta elevata durante tutto l'arco maturativo della coltura E ed Mk mentre risulta soppressa, con differenze minori, nella coltura G ed M. In particolare, mentre GATA-1 ed NF-E2 sono virtualmente poco espressi o assenti nell'arco di tutto il differenziamento G ed M, tal-1 ed Lmo2 risultano espressi durante la prima settimana e soppressi successivamente sia nella coltura G ed M.

GATA-2 al contrario, risulta espresso e mantenuto nella prima settimana della coltura E, G ed Mk con progressivo successivo decremento, mentre cala precocemente nella coltura M.

Il precoce ruolo funzionale di GATA-2 è indicato dai gravi difetti ematopoietici nei topi GATA-2 (24) così come dalla inibizione della formazione di tutti i tipi di colonie dopo trattamento con oligomeri antisenso per mRNA di GATA-2 (15). Il ruolo di tal-1 e GATA-1 come fattori trascrizionali specifici per la differenziazione eritroide è stato osservato mediante trattamento con oligomeri antisenso (15-17) ed anche in modelli animali dopo knock-out (25-26).

I sistemi di coltura monolinea rappresentano quindi un importante strumento per lo studio degli eventi trascrizionali che sottendono l'ematopoiesi.

Bibliografia

1. MULLER-SIENBURG C., TOROK-STORB B., VISSER J., STORB E.: Hematopoietic stem cells. Heidelberg, Springer, 1992.
2. OGAWA M.: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993, 81,284-2853.
3. Holtzer, H., Weintraub, H., Mayne, R., Mochan, B. The cell cycle, cell lineages and cell differentiation. *Curr. Topics Dev. Biol.* 1972, 7: 229-256.
4. TILL J.E., MCCULLOCH E.A., SIMINOVITCH L.: A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1964, 51: 29-??
5. CURRY J.L., TRENTIN J.J.: Haemopoietic spleen colony-stimulating factors. *Science* 1967, 236: 1229-??.
6. JUST U., STOCKING C., SPOONER E., DEXTER T.M., OSTERTAG W.: Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* 1991, 64: 1163-1173.
7. TESTA U., FOSSATI C., SAMOGGIA P., MASCIULLI R., MARIANI G., HASSAN H.J., SPOSI N.M., GUERRIERO R., ROSATO V., GABBIANELLI M., PELOSI E., VALTIERI M., PESCHLE C.: Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood* 1996, 88: 3391-3406.
8. TESTA U., PELOSI E., GABBIANELLI M., FOSSATI C., CAMPISI S., ISACCHI G., PESCHLE C.: Cascade transactivation of growth factor receptors in early human hematopoiesis. *Blood* 1993, 81: 1442-1456.

9. ORKIN S.H.: Transcription factors and hematopoietic development. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 4955-4958.
10. KEHRL J.H.: Hematopoietic lineage commitment: role of transcription factors. *Stem Cells* 1995, 13: 223-241.
11. SHIVDASANI R.A., ORKIN S.H.: The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 1996, 87: 4025-4039.
12. GREENBERGER J.S., SAKAKEENY M.A., HUMPRIES R.K., EAVES C.J., ECKNER R.J.: Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983, 80: 2931-2935.
13. LABBAYE C., VALTIERI M., TESTA U., GIAMPAOLO A., MECCIA E., STERPETTI P., PAROLINI I., PELOSI E., BULGARINI D., CAYRE Y.E., PESCHLE C.: Retinoic acid downmodulates erythroid differentiation and GATA-1 expression in purified adult progenitor culture. *Blood* 1994, 83: 651-656.
14. GIAMPAOLO A., STERPETTI P., BULGARINI D., SAMOGGIA P., PELOSI E., VALTIERI M., PESCHLE C.: Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 1994, 84: 3637-3647.
15. LABBAYE C., VALTIERI M., BARBERI T., MECCIA E., MASELLA B., PELOSI E., CONDORELLI G., TESTA U., PESCHLE C.: Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2 and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J. Clin. Invest.* 1995, 95: 2346-2358.
16. CONDORELLI G.L., TESTA U., VALTIERI M., VITELLI L., DE LUCA A., BARBERI T., MONTESORO E., CAMPISI S., GIORDANO A., PESCHLE C.: Modulation of retinoblastoma gene in normal adult hematopoiesis: peak expression and functional role in advanced erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 4808-4812.
17. CONDORELLI G.L., VITELLI L., VALTIERI M., MARTA I., MONTESORO E., LULLI V., BAER R., PESCHLE C.: Coordinate expression and developmental role of Id2 protein and TAL1/E2A heterodimer in erythroid progenitor differentiation. *Blood* 1995, 86: 164-175.
18. SPOSI N.M., ZON L.I., CARÈ A., VALTIERI M., TESTA U., GABBIANELLI M., MARIANI G., BOTTERO L., MATHER C., ORKIN S.H., PESCHLE C.: Cell cycle-dependent initiation and lineage-dependent abrogation of GATA-1 expression in pure differentiating hematopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 6353-6357.
19. GUERRIERO R., TESTA U., GABBIANELLI M., MATTIA G., MONTESORO E., MACIOCE G., PACE A., ZIEGLER B., HASSAN H.J., PESCHLE C.: Unilineage megakaryocytic proliferation and differentiation of purified hematopoietic progenitors in serum-free liquid culture. *Blood* 1995, 86: 3725-3736.
20. GABBIANELLI M., PELOSI E., MONTESORO E., VALTIERI M., LUCHETTI L., SAMOGGIA P., VITELLI L., BARBERI T., TESTA U., LYMAN S., PESCHLE C.: Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood* 1995, 86: 1661-1670.
21. ZIEGLER B.L., THOMA S., LAMPING C.P., VALTIERI M., MULLER R., SAMOGGIA P., BUHRING H.J., PESCHLE C., FLIEDNER T.M.: Surface antigen expression on CD34+ cord blood cells: comparative analysis by flow cytometry and limiting dilution (LD) RT-PCR of chymopapain-treated or untreated cells. *Cytometry* 1996, 25: 46-57
22. ZIEGLER B.L., LAMPING C.P., THOMA S.J., FLIEDNER T.M.: Analysis of gene expression in small numbers of purified hemopoietic progenitor cells by RT-PCR. *Stem Cells* 1995, 13: 106-116.
23. ZIEGLER B.L., LAMPING C., THOMA S., THOMAS C.A., FLIEDNER T.M.: Single-cell cDNA-PCR. *Methods in Neurosciences* 1995, 26: 62-??
24. TSAI F.Y., KELLER G., KUO F.C., WEISS M., CHEN J., ROSENBLATT M., ALT F.W., ORKIN S.H.: An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994, 371: 221-226.

25. PEVNY L., SIMON M.C., ROBERTSON E., KLEIN W.H., TSAI S.F., D'AGATI V., ORKIN S.H., COSTANTINI F.: Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991, 349: 257-260.
26. SHIVDASANI R.A., MAYER E.L., ORKIN S.H.: Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 1995, 373: 432-434.