

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISILOGIA  
SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09  
CICLO XXIII

Tesi di Dottorato di Ricerca

STUDIO DEL DIFFERENZIAMENTO CARDIACO DI CELLULE  
STAMINALI ISOLATE DA TESSUTI POST-NATALI

Dottorando: Dott.ssa Angela Scavone

Matricola: R07654

Tutor: Prof. Dario DiFrancesco

Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie

Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2009-2010

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>CELLULE STAMINALI</b>	<b>4</b>
Cellule staminali embrionali	5
Cellule staminali del cordone ombelicale	6
Cellule staminali adulte	6
Mesoangioblasti	8
Cellule staminali spermatogoniali (SSCs) o cellule staminali germinali (GSCs)	9
<b>CELLULE STAMINALI ED APPLICAZIONI CLINICHE</b>	<b>11</b>
<b>CUORE</b>	<b>13</b>
<b>POTENZIALI D'AZIONE CARDIACI</b>	<b>14</b>
Potenziale d'azione ventricolare	14
Potenziali d'azione "pacemaker"	15
<b>CORRENTE I<sub>f</sub></b>	<b>15</b>
Modulazione autonoma	17
<b>CANALI HCN</b>	<b>17</b>
<b>PATOLOGIE CARDIACHE E TERAPIA CELLULARE</b>	<b>21</b>
Cardiopatie ischemiche	21
Patologie del sistema di conduzione	23
<b>PACEMAKER BIOLOGICO</b>	<b>24</b>
Terapia genica	24
Overespressione dei recettori $\beta$ -adrenergici	25
Downregolazione della corrente I <sub>K1</sub>	25
Overespressione di canali HCN	26
Terapia cellulare	26
Cellule staminali embrionali	26
Cellule staminali mesenchimali ingegnerizzate	27
<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>28</b>
<b>COLTURE CELLULARI E PROTOCOLLI DI ISOLAMENTO</b>	<b>28</b>
Cellule staminali cd34+ del cordone ombelicale	29
Isolamento di miociti ventricolari neonatali di ratto	29
Co-coltura delle cellule cd34+ con miociti ventricolari neonatali di ratto	30

---

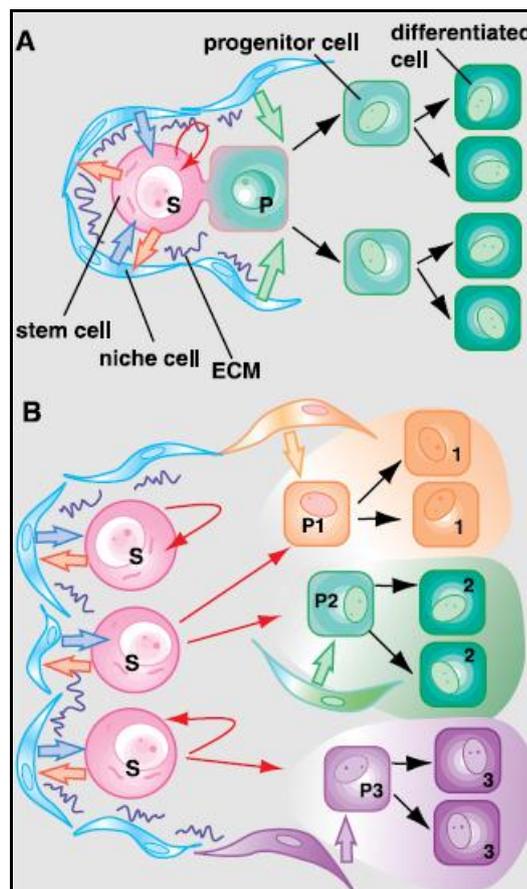
Mesoangioblasti	30
Isolamento di mesoangioblasti cardiaci	30
Isolamento di cellule staminali spermatogoniali	31
Protocollo di isolamento A, B, C e D	31
Protocollo di isolamento E	31
Protocolli di coltura di SSCs	32
Condizione A	32
Condizione B	33
Condizione C e D	33
Condizione E	33
Preparazione di fibroblasti embrionali murini	34
Infezione delle cellule con lentivirus-EGFP o RFP	35
Preparazione del plasmide gata-6/GFP e trasfezione delle Mabs	35
<b>BIOLOGIA MOLECOLARE</b>	<b>36</b>
Estrazione DNA	36
Estrazione RNA	36
RT-PCR	38
PCR (polymerase chain reaction)	39
Real-time PCR	40
<b>ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA</b>	<b>43</b>
Test della fosfatasi alcalina	45
<b>CITOFLUORIMETRIA</b>	<b>45</b>
<b>ANALISI ELETTROFISIOLOGICA</b>	<b>46</b>
Analisi dei dati	47
<b>RISULTATI</b>	<b>49</b>
Cellule staminali ematopoietiche CD34+ del cordone ombelicale	49
Mesoangioblasti	54
Cellule staminali spermatogoniali (SSCs) o cellule staminali germinali (GSCs)	66
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>84</b>

# INTRODUZIONE

## CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali sono per definizione cellule indifferenziate dotate di long-term self renewal cioè in grado di replicarsi per periodi indefiniti mantenendo lo stato indifferenziato ed, in seguito a particolari stimoli, in grado di originare uno o più tipi cellulari diversi. Le cellule staminali presentano due diversi meccanismi di divisione cellulare:

- Replicazione simmetrica: la cellula staminale origina due cellule figlie di cui una conserva le caratteristiche di staminalità mentre l'altra, chiamata progenitore cellulare, va incontro a differenziamento.
- Replicazione asimmetrica: la cellula staminali origina due cellule figlie identiche che possono essere due cellule staminali oppure due cellule progenitrici.



**Figura 1:** Rappresentazione del meccanismo di replicazione simmetrico e asimmetrico all'interno di una nicchia. (Watt *et al.*, 2000)

In base alla loro capacità differenziativa, le cellule staminali possono essere classificate in:

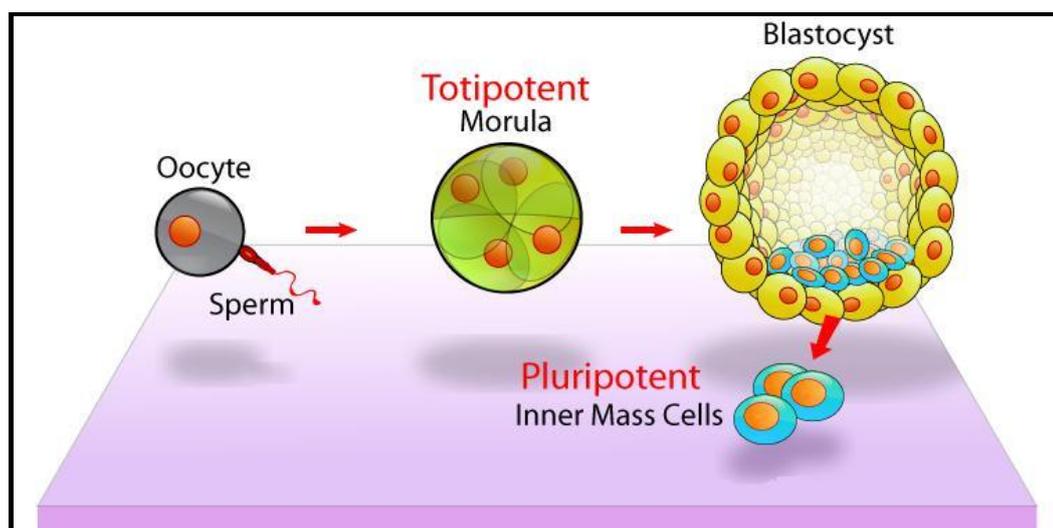
- *Totipotenti*, sono in grado di dare origine sia ai tessuti embrionali sia a quelli extraembrionali, come la placenta e il sacco vitellino. Solo lo zigote (uovo fecondato alla stadio di 2 cellule) possiede questa capacità.
- *Pluripotenti*, sono in grado di generare tutte le cellule derivate dai tre foglietti embrionali, endoderma, mesoderma ed ectoderma, ma non le cellule che compongono i tessuti extra-embrionali.
- *Multipotenti*, sono in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule.
- *Unipotenti*, possono generare solamente un tipo di cellula specializzata.

Le cellule staminali possono essere anche classificate in base alla loro provenienza in:

- *Embrionali*
- *Da cordone ombelicale o sangue placentare*
- *Adulte*

## CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali embrionali (ESCs, Embryonic Stem Cells) provengono da un embrione allo stadio di blastocisti, cioè a 4-5 giorni dalla fecondazione. La blastocisti è costituita da 3 strutture: il *trofoblasto*, strato cellulare esterno, circonda il *blastocelo*, ovvero la cavità all'interno della blastocisti in cui è contenuto, ad una estremità, un gruppo di cellule che darà origine all'embrione, detto *inner cell mass*.



**Figura 2:** Rappresentazione schematica della formazione di cellule staminali embrionali.

Le cellule staminali embrionali (ESC, Embryonic Stem Cells) derivano dalla inner cell mass della blastocisti in seguito a distruzione del trofoblasto. Le ESCs possono essere mantenute in coltura allo stadio indifferenziato per lunghi periodi di tempo e successivamente possono essere indotte a differenziare. Sono cellule pluripotenti, in grado di originare qualsiasi tipo cellulare proveniente dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma).

Proprio per le caratteristiche sopra elencate, le ESCs potrebbero essere utilizzate in campo terapeutico per la cura di patologie umane in cui le normali funzioni cellulari sono alterate o i tessuti vengono distrutti. Le ESCs potrebbero essere infatti una fonte rinnovabile per sostituire le cellule dei tessuti malati in un elevato numero di condizioni patologiche, come per esempio il diabete di tipo I, le malattie degenerative come la sclerosi multipla e il Parkinson, la distrofia di Duchenne e le malattie cardiache (Teo *et al.*, 2010).

## **CELLULE STAMINALI DEL CORDONE OMBELICALE**

Studi recenti hanno dimostrato che il sangue contenuto nel cordone ombelicale e nella placenta è ricco di cellule staminali e progenitori emopoietici immaturi. Sembra che le cellule staminali cordonali siano in grado di dare origine a diversi tipi cellulari e che le loro capacità differenziative possano essere paragonate a quelle delle cellule staminali ematopoietiche isolate dal midollo osseo (Gluckman *et al.*, 1997). Diversi studi indicano che sono in grado di generare cellule che compongono il sangue e vengono quindi utilizzati per curare diverse malattie come la leucemia, e gravi forme di anemie e immunodeficienze ereditarie (Tse & Laughlin, 2005).

## **CELLULE STAMINALI ADULTE**

Sono cellule indifferenziate localizzate nei tessuti di un organismo adulto con capacità di self-renewal anche se più limitato rispetto alle cellule staminali embrionali e rispetto ad esse hanno anche una capacità differenziativa ristretta infatti sono cellule unipotenti o multipotenti. Il ruolo primario di queste cellule è il mantenimento e la riparazione del tessuto in cui sono localizzate. Le cellule staminali adulte sono note fin dagli anni sessanta quando si scoprì la presenza di due diversi tipi di cellule staminali all'interno del midollo osseo:

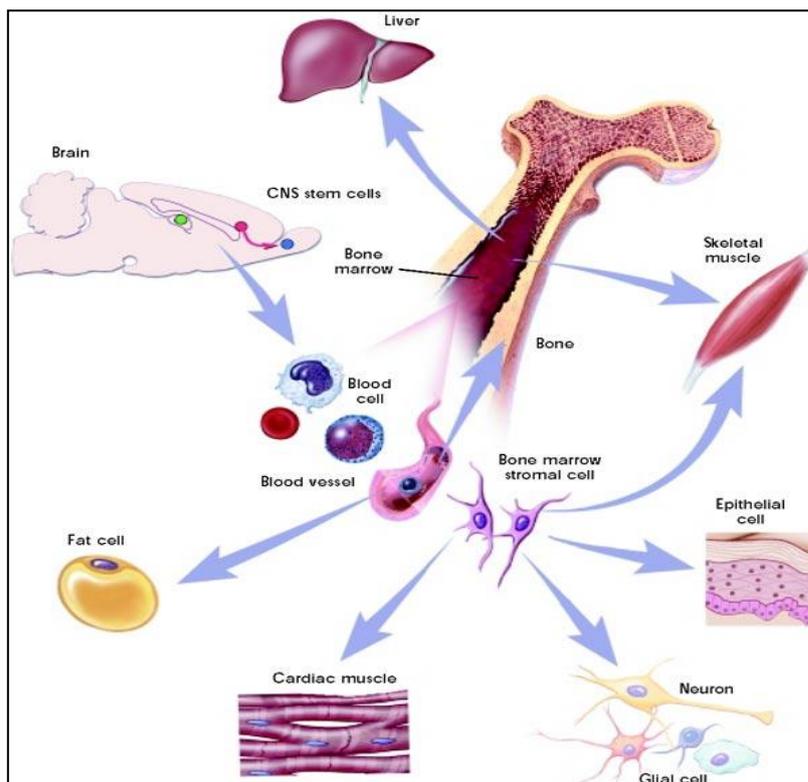
- cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che danno origine ai vari tipi di cellule del sangue.

➤ cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells o MSCs) o cellule stromali del midollo osseo che danno origine a osteociti, condrociti, adipociti e altre cellule del tessuto connettivo (Becker *et al.*, 1963; Till *et al.*, 1961; Owen, 1988).

È più recente invece la scoperta di cellule staminali in organi considerati da sempre privi di capacità rigenerativa come il cervello e il cuore (McKay, 1997; Beltrami *et al.*, 2003). Le cellule staminali cardiache (Cardiac Stem Cells, CSCs) sono cellule multipotenti, in grado di originare miociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce che quindi potrebbero essere impiegate nella rigenerazione del miocardio in caso di danno.

Le cellule staminali adulte sono state trovate in quasi tutti gli organi: cervello, midollo osseo, vasi sanguigni, scheletro, muscoli, pelle e fegato ma il numero di queste cellule è molto basso. All'interno di questi organi le cellule staminali risiedono in particolari micro-ambienti chiamati nicchie dove rimangono allo stato quiescente per molto tempo e quando vengono attivate in caso di malattia o danno iniziano a proliferare, migrano fuori dalla nicchia e vanno incontro al differenziamento (Fuchs *et al.*, 2004; Urbanek *et al.*, 2006). Queste nicchie protettive contengono anche diversi tipi di cellule specializzate che secernono particolari fattori e organizzano la matrice extra-cellulare in modo tale da permettere alle cellule staminali stesse di mantenere la capacità di self-renewal o di andare incontro ad un eventuale differenziamento. Inizialmente si credeva che la capacità differenziativa delle cellule staminali adulte fosse piuttosto limitata e che potessero dare origine solo a cellule con caratteristiche strutturali e funzionali specifiche del tessuto di appartenenza. Diversi esperimenti hanno dimostrato invece che alcuni tipi di cellule staminali adulte sono multipotenti cioè in grado di differenziare in diversi tipi cellulari. È stato dimostrato che le cellule staminali del midollo osseo possono differenziare anche in cellule del cervello, cellule muscolari scheletriche, cellule cardiache e cellule del fegato (**figura 3**) (Brazelton *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 1998; Orlic *et al.*, 2001; Lagasse *et al.*, 2000) mentre le cellule staminali del cervello possono originare anche cellule del sangue e cellule muscolari scheletriche (Bjorson *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2000).

Risulta quindi evidente che alcune cellule staminali adulte sono dotate di una certa plasticità e sono in grado di differenziare in tipi cellulari di derivazione embriologica diversa.

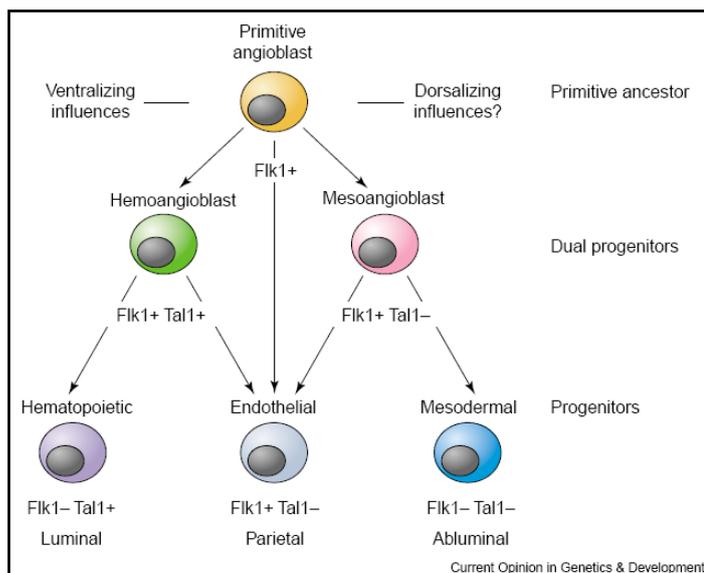


**Figura 3:** Plasticità di cellule staminali adulte del midollo osseo

## Mesoangioblasti

I mesoangioblasti, o Mabs, sono progenitori multipotenti associati ai vasi sanguigni in grado di differenziare in diversi tipi di cellule mesodermiche (Minasi *et al.*, 2002; Cossu *et al.*, 2003). Queste cellule sono caratterizzate dalla co-espressione di markers endoteliali precoci, tra cui Flk-1, Sca1, CD34 e VE-cadherin, e markers miogenici, tra cui  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$  smooth muscle actin), Myf5 e MyoD, ed, *in vitro*, sono in grado di andare incontro a differenziamento miogenico. Esperimenti condotti su mesoangioblasti derivati dall'aorta dorsale dimostrano che queste cellule sono in grado di generare fibre muscolari scheletriche ma anche cellule del tessuto connettivo (es: ossa e cartilagine) indicando che queste cellule non possiedono solo capacità miogenica.

Il termine mesoangioblasto è stato scelto per indicare un progenitore comune per derivati mesodermici vascolari ed extravascolari, e per sottolineare la somiglianza con gli emangioblasti, progenitori cellulari per derivati mesodermici vascolari ed intravascolari. Secondo alcuni lavori esiste un progenitore comune per emangioblasti ed mesoangioblasti esprime Flk1 che a seconda delle influenze ricevute viene indirizzato verso un destino differenziativo diverso (figura 4).



**Figura 4:** Schema del processo di formazione di emangioblasti e mesoangioblasti a partire da un progenitore comune. (Cossu & Bianco, 2003)

Per la loro capacità di differenziare spontaneamente in cellule muscolari si pensa possano essere impiegate nella cura della distrofia muscolare. In un recente lavoro è stato dimostrato che la somministrazione di mesoangioblasti di derivazione muscolo-scheletrica in topi e cani distrofici ha portato ad un parziale ma significativo recupero della struttura e funzionalità muscolare (Guttinger *et al.*, 2006; Sampaolesi *et al.*, 2006).

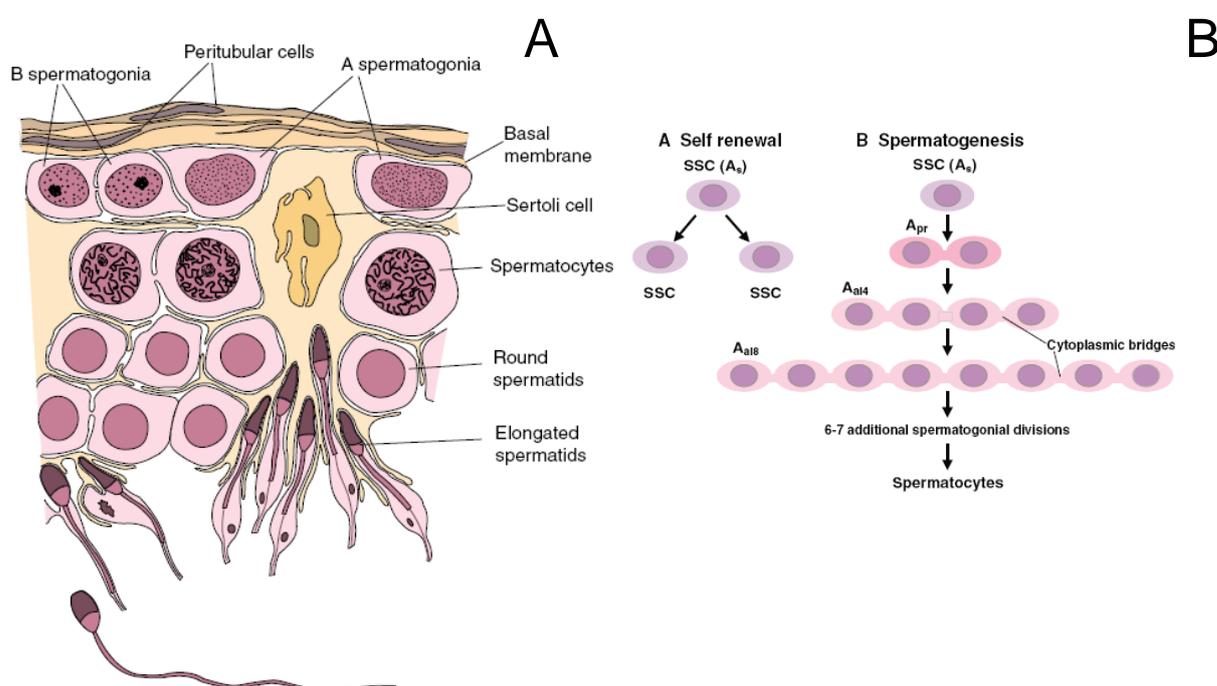
## Cellule staminali spermatogoniali (SSCs) o Cellule staminali germinali (GSCs)

Una popolazione di cellule staminali adulte, che di recente ha suscitato molto interesse per le loro particolari caratteristiche, sono le cellule staminali germinali (Germline Stem Cells o GSCs) dette anche cellule staminali spermatogoniali (Spermatogonial Stem Cells o SSCs). Sono localizzate sulla membrana basale dei tubuli seminiferi e sono responsabili del mantenimento della spermatogenesi. Nel topo esistono 7 varianti di spermatogoni di tipo A: A<sub>pair</sub>, A<sub>single</sub>, A<sub>aligned</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub> (DeRoosj & Mizrak, 2008; Dettin *et al.*, 2003). Tra questi, solo A<sub>single</sub> è considerata una cellula staminale adulta, in quanto è l'unica dotata di self-renewal. Quando lo spermatogonio A<sub>s</sub> si divide, le due cellule figlie possono avere due destini diversi:

- se la citodieresi è completa, vengono originate due nuove cellule staminali.
- se la citodieresi è incompleta, vengono originati gli spermatogoni A<sub>pr</sub>, cioè spermatogoni uniti da un ponte intercellulare. Gli spermatogoni A<sub>pr</sub> si dividono per dar luogo a catene di 4,

8, 16 (e a volte anche 32) spermatogoni Aal. Questi differenziano in spermatogoni A1, che sono la prima generazione degli spermatogoni differenziati, a cui fanno seguito 5 successive generazioni di spermatogoni, chiamati rispettivamente A2, A3, A4, Intermedi (In) e B, i quali, infine, differenziano in spermatociti primari.

La morfologia degli spermatogoni As è simile a quella degli altri spermatogoni indifferenziati, rendendo quindi difficile la loro identificazione in sezioni istologiche (Huckins *et al.*, 1978; Oakberg, 1971; Chiarini-Garcia *et al.*, 2002). Le cellule staminali germinali, note a partire dal 1994, sono molto rare, rappresentano infatti solo lo 0.03% delle cellule del testicolo di topo adulto (Tegelenbosch *et al.*, 1993).



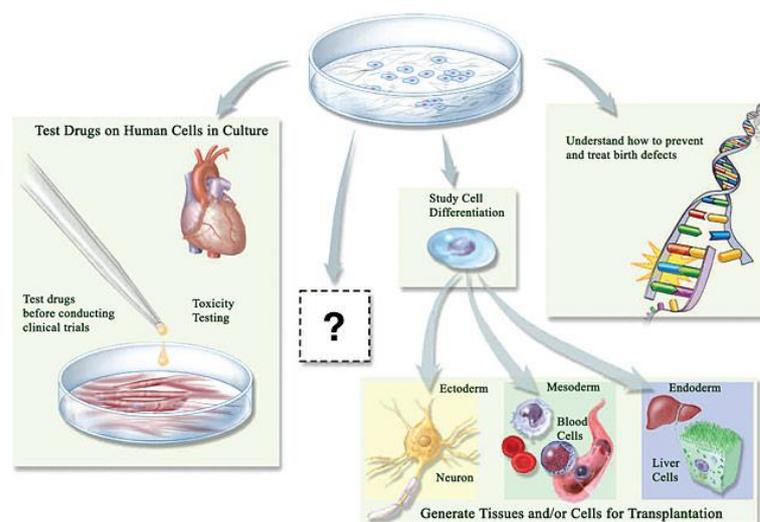
**Figura 5:** In A, rappresentazione schematica di una sezione di tubuli seminiferi che mostra la localizzazione di spermatogoni e spermatozoi. In B schema della replicazione delle cellule staminali spermatogoniali (SSC) e formazione di spermatozoi maturi. (DeRooij & Mizrak, 2008).

Inizialmente data l'assenza di criteri morfologici e di marcatori specifici per riconoscerle, le cellule staminali germinali isolate vennero trapiantate nei tubuli seminiferi di topi sterili in modo da dimostrarne l'attività staminale. Si ottenne il ripristino della spermatogenesi di questi topi e quindi la conferma della staminalità delle cellule isolate (Brinster *et al.*, 1994; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003). Più recente è invece la scoperta che queste cellule, *in vitro*, ed in particolari condizioni di coltura possono assumere un fenotipo simile a quello delle cellule staminali embrionali, diventando pluripotenti. Uno dei primi lavori è stato condotto da un gruppo di ricerca giapponese che ha mantenuto in coltura una popolazione di cellule staminali germinali isolate da

topi neonatali, in presenza di GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor), LIF (leukemia inhibitory factor), EGF (epidermal growth factor) e bFGF (basic fibroblast growth factor). Dopo un periodo di 4-7 settimane hanno osservato la comparsa di colonie con morfologia simile a quella delle cellule staminali embrionali. Le cellule ottenute, se trapiantate sotto cute o in tubuli seminiferi, erano in grado di generare teratomi, caratteristica tipica delle cellule pluripotenti (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004). Successivamente è stato dimostrato che l'ottenimento di cellule pluripotenti era possibile anche da GSCs derivanti da topi adulti (Guan *et al.*, 2006; Seandel *et al.*, 2007). Lavori preliminari hanno isolato e caratterizzato cellule staminali pluripotenti anche nell'uomo, partendo da biopsie testicolari ed ottenendo risultati simili a quelli condotti sul topo (Kossack *et al.*, 2008 e Conrad *et al.*, 2008). Gli studi condotti sulle cellule pluripotenti derivate dalle SSCs dimostrano che queste cellule potrebbero rappresentare una risorsa importante in campo terapeutico, in quanto pur provenendo da tessuti adulti, possiedono la plasticità delle cellule staminali embrionali. Sono quindi in grado di differenziare in tutte le cellule specializzate dell'organismo, offrendo l'opportunità di sostituire o riparare tessuti danneggiati, utilizzando una fonte cellulare autologa ed evitando sia problemi di tipo immunologico sia di tipo etico, legati all'uso delle cellule staminali embrionali umane (Mardanpour *et al.*, 2008).

## CELLULE STAMINALI ED APPLICAZIONI CLINICHE

I possibili utilizzi delle cellule staminali sono molteplici e la ricerca in questo campo è molto intensa.



**Figura 6:** Possibili applicazioni delle cellule staminali nella ricerca scientifica (<http://stemcells.nih.gov>).

I principali campi di applicazione sono:

✓ *Test farmacologici*

Le cellule staminali possono essere utilizzate come target nello studio di nuovi farmaci, al fine di valutarne la tossicità. Dopo averle indotte a differenziare nei tipi cellulari di interesse, possono essere paragonati gli effetti di due farmaci sullo stesso tipo cellulare oppure l'effetto di un solo farmaco su diversi tipi cellulari. Uno dei problemi principali, riguardo l'utilizzo delle cellule staminali in questo campo, è che le tecniche di differenziamento delle cellule staminali non sono ancora completamente efficienti e persiste la difficoltà di generare popolazioni pure (Thomson *et al.*, 1998; Scholz *et al.*, 1999; McNeish, 2004).

✓ *Patologie causate da divisioni cellulari anormali*

Alcune delle patologie più gravi, come il cancro e le malformazioni neonatali, sono provocate da divisioni cellulari o differenziamento cellulare anormali. Per cercare un rimedio a questo tipo di difetti è necessario essere a conoscenza dei meccanismi responsabili di questi processi. Le cellule staminali offrono l'opportunità di studiare i pathways genici coinvolti in questi processi, permettendo di sviluppare nuove terapie mirate (Gupta *et al.*, 2007).

✓ *Terapia cellulare*

La più importante prospettiva applicativa riguardante le staminali è costituita dalla generazione di cellule e tessuti da utilizzare nella terapia cellulare. Attualmente, in presenza di un organo non funzionale o irreversibilmente danneggiato, l'unica possibilità di guarigione è rappresentata dal trapianto di organi, che presenta però diversi limiti quali la disponibilità di organi, la compatibilità tra paziente e donatore ed il rischio di rigetto. Le cellule staminali possono essere indotte a differenziare in cellule e tessuti che possano sostituire quelli danneggiati, oppure possono essere impiegate nella cura delle malattie degenerative, in cui si ha una continua e progressiva perdita di cellule endogene con una mancata o insufficiente sostituzione ad opera del tessuto malato. Tra le principali patologie che potrebbero essere curate con le cellule staminali sono comprese diverse malattie croniche, tra cui il Parkinson, la sclerosi multipla, il diabete, i danni alla colonna vertebrale, alcune malattie cardiache ed epatiche (Odorico *et al.*, 2001). Il limite attuale è quello di riuscire ad ottenere cellule completamente differenziate nella linea cellulare di interesse senza la contaminazione di cellule indifferenziate o non completamente differenziate, per non correre il rischio di un eventuale sviluppo maligno in seguito al trapianto. Un esempio applicativo è rappresentato dall'utilizzo delle cellule staminali nella cura del diabete di tipo 1. Il diabete di tipo 1 è una patologia autoimmune caratterizzata da una perdita progressiva delle cellule  $\beta$ , ovvero le

cellule responsabili della produzione di insulina, con conseguente iperglicemia. Nel topo è stato possibile differenziare cellule staminali embrionali in cellule  $\beta$  ed in seguito trapiantarle all'interno del pancreas, riuscendo a ripristinare l'euglicemia (Lumelsky *et al.*, 2001).

## CUORE

Il cuore è un organo cavo, posizionato nel mediastino, ed è l'organo centrale dell'apparato circolatorio infatti genera la pressione sufficiente per permettere la circolazione del sangue. La caratteristica principale del cuore è la sua capacità di contrarsi spontaneamente e ritmicamente senza bisogno di uno stimolo da parte del sistema nervoso centrale. L'impulso elettrico viene originato in una regione specializzata del cuore e poi si propaga, attraverso il tessuto di conduzione, prima agli atri e successivamente ai ventricoli, grazie alla presenza di complessi giunzionali che assicurano la coesione elettrica e meccanica tra le fibre che compongono il miocardio rendendo l'organo un sincizio funzionale in modo da facilitare la propagazione dell'impulso.

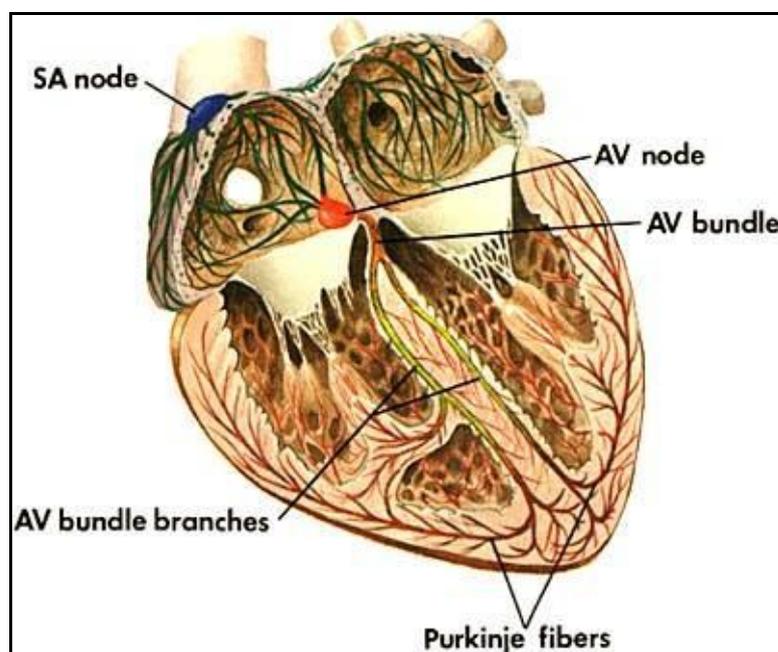


Figura 7: Rappresentazione schematica del cuore e del sistema di conduzione

L'impulso elettrico nasce a livello del nodo senoatriale (SAN), noto anche come pacemaker naturale del cuore, localizzato nella parete posteriore dell'atrio destro, sotto l'apertura della vena cava superiore e stimola il cuore ad una frequenza di circa 70 battiti/minuto in condizioni di

riposo. Le cellule di questa regione hanno la capacità di generare spontaneamente potenziali di azione che si propagano alle vie internodali che conducono il segnale dal SAN al nodo atrioventricolare (NAV) situato nella parte posteriore destra del setto interatriale. L'impulso elettrico in questo punto subisce un leggero ritardo (circa  $0,1 \text{ ms}^{-1}$ ) consentendo al cuore di svolgere in modo corretto la propria funzione. Infatti in questo modo gli atri hanno il tempo necessario per svuotare il loro contenuto nei ventricoli prima dell'inizio della contrazione ventricolare. L'impulso elettrico attraversa il fascio di His che si estende nel setto interatriale e successivamente si divide in due branche, destra e sinistra, fino alle fibre del Purkinje, che costituiscono la parte terminale del sistema di conduzione del cuore e che conducono l'impulso fino ai ventricoli.

La capacità di generare potenziali d'azione spontanei non è specifica solo del SAN ma anche di altre regioni cardiache, ad esempio le cellule atrio-ventricolari e le Fibre del Purkinje (chiamati pacemaker ectopici "ausiliari"), che possiedono però una frequenza di scarica tanto minore quanto maggiore è la distanza dal nodo SA quindi, in condizioni normali, l'attività autoritmica di queste zone viene soppressa dal pacemaker dominante (fenomeno noto come overdrive suppression) ma può emergere in condizioni patologiche.

## POTENZIALI D'AZIONE CARDIACI

Le cellule cardiache hanno caratteristiche elettriche diverse a seconda della loro funzione e localizzazione. In generale comunque la durata dei potenziali d'azione delle cellule cardiache è più lungo di altre cellule eccitabili come le cellule nervose e le cellule del muscolo liscio e scheletrico.

### POTENZIALE D'AZIONE VENTRICOLARE

Il potenziale d'azione di una cellula ventricolare è composto da diverse fasi:

- Fase 0 o fase di depolarizzazione rapida, causata dall'apertura dei canali del sodio che conducono rapidamente (circa 1-2 ms) il potenziale di membrana a valori positivi.
- Fase 1 è un breve periodo di ripolarizzazione parziale dovuta alla chiusura rapida dei canali di sodio ma anche all'attivazione di una corrente di potassio chiamata corrente transitoria in uscita,  $i_{TO}$ .
- Fase 2 è una fase di plateau in cui il potenziale di membrana rimane costante per un periodo variabile da 100 a 300 ms a seconda del tipo di cellula cardiaca. Durante questa fase le correnti

uscanti di potassio vengono controbilanciate dall'entrata di ioni calcio attraverso i canali del calcio di tipo L.

- Fase 3 è la fase di ripolarizzazione in cui il potenziale di membrana viene riportato a valori di riposo. In questa fase l'entrata di calcio diminuisce notevolmente per la chiusura dei canali di calcio di tipo L mentre aumenta l'ingresso di potassio per l'attivazione dei canali di potassio rettificatori ritardati,  $I_{K_r}$  e  $I_{K_s}$ , i quali conducono una corrente uscente che tende a riportare il potenziale verso valori negativi.
- Fase 4 è la fase di riposo ed è determinata dalla corrente di potassio  $I_{K_1}$  che stabilizza il potenziale di membrana a valori di circa  $-75$  mV. Questa corrente, di tipo rettificante entrante, a potenziali più positivi di  $-80$  mV (potenziale di inversione per il  $K^+$  a concentrazioni ioniche fisiologiche) conduce verso l'esterno ioni potassio iperpolarizzando la membrana e quindi riportandolo a valori di riposo (Hille, 1978).

## **POTENZIALI D'AZIONE “PACEMAKER”**

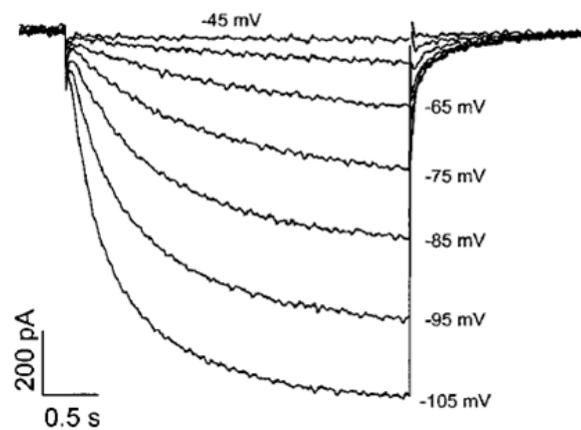
Le cellule autoritmiche del SAN sono caratterizzate dalla mancanza di una fase di riposo stabile tra un potenziale d'azione e quello successivo e presentano invece una fase di depolarizzazione diastolica lenta o depolarizzazione pacemaker, che conduce il potenziale di membrana verso il valore soglia per l'insorgenza di un nuovo potenziale d'azione. In questa fase un ruolo fondamentale viene svolto dalla corrente  $I_f$ , una corrente voltaggio e tempo dipendente che si attiva alla fine della ripolarizzazione del potenziale di azione (fase 3), con una soglia di circa  $-45$  mV e conduce il potenziale di membrana a valori di circa  $-50$  mV, potenziale soglia di attivazione dei canali di calcio di tipo T e L responsabili della fase 0 di depolarizzazione. La fase 4 delle cellule senoatriali è caratterizzata oltre che dalla presenza della corrente  $I_f$  anche dalla mancanza della corrente di potassio  $I_{K_1}$  che nelle cellule ventricolari mantiene stabile il potenziale di membrana. Altra particolarità del potenziale d'azione delle cellule senoatriali è la mancanza della fase 1 e 2.

## **CORRENTE $I_f$**

Nella fase di depolarizzazione diastolica lenta che caratterizza le cellule pacemaker il ruolo fondamentale è svolto dalla corrente  $I_f$  o corrente “funny” chiamata così perché presenta diverse caratteristiche insolite prima fra tutte l'attivazione in iperpolarizzazione a potenziali di circa  $-40$

mV (DiFrancesco *et al.*, 1986). Un'altra particolarità della  $I_f$  è la permeabilità a due diverse specie ioniche, sodio e potassio, con un rapporto di permeabilità  $P_{Na}/P_K$  che varia da 0.2 a 0.4 e ciò spiega il potenziale di inversione della corrente di circa -10/-20 mV (Gauss *et al.*, 1998, Ludwig *et al.*, 1998, Santoro *et al.*, 1998). La corrente  $I_f$  è bloccata da basse concentrazioni (0.01-3 mM) di  $Cs^+$  in modo concentrazione e voltaggio dipendente. Il  $Cs^+$  può avere due effetti, a potenziali negativi induce il blocco del canale mentre a potenziali positivi ha l'effetto opposto cioè induce un aumento della corrente (DiFrancesco 1982).

A potenziali diastolici la corrente risultante è entrante, prevalentemente data da ioni sodio, in grado di depolarizzare la cellula fino al valore soglia (DiFrancesco, 1993).



**Figura 8:** Tracce di corrente  $I_f$  registrate da cellule del nodo senoatriale di coniglio (Shi *et al.*, 1999)

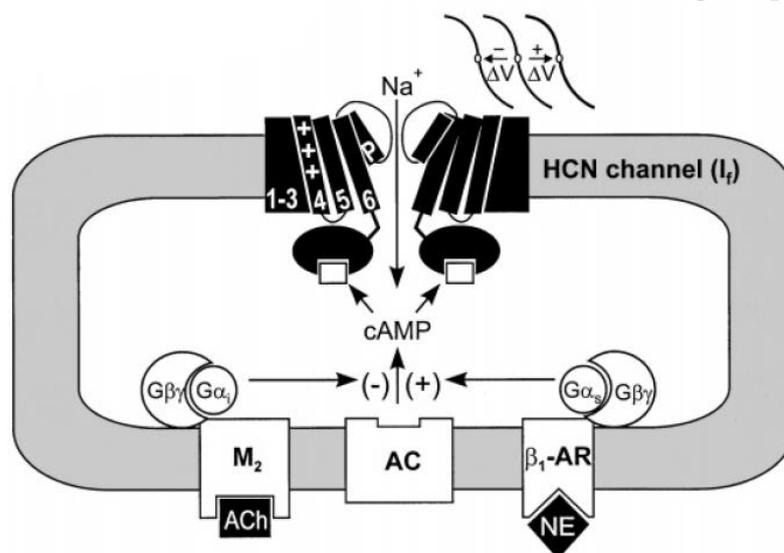
Un'ulteriore particolarità dei canali  $f$  è la duplice attivazione da parte del voltaggio e dei nucleotidi ciclici. La  $I_f$  è modulata, attraverso un meccanismo indipendente dalla fosforilazione, dall'adenosina mono fosfato ciclica (cAMP) che si lega direttamente ai canali pacemaker e aumenta la probabilità di apertura dei canali in iperpolarizzazione senza modificarne la conduttanza (DiFrancesco & Tortora, 1991; DiFrancesco & Mangoni, 1994).

La corrente  $I_f$  è presente non solo nelle cellule senoatriali ma anche in altre cellule del sistema di conduzione con attività autoritmica (cellule del nodo atrioventricolare e cellule delle fibre del Purkinje) e nei miociti ventricolari dove è stata dimostrata la presenza di questa corrente ma con un'attivazione a potenziali molto negativi (da -110 a -140 mV) quindi in condizioni fisiologiche la  $I_f$  non svolge un ruolo significativo (Yu *et al.*, 1995).

La  $I_f$  è stata trovata anche in diverse cellule neuronali del sistema nervoso centrale e periferico dove assolve il ruolo di regolatore dell'eccitabilità neuronale, contribuisce alla trasmissione sinaptica e all'integrazione dendritica (Pape, 1996; Robinson *et al.*, 2003).

## MODULAZIONE AUTONOMICA

L'attività cardiaca è regolata dal Sistema Nervoso Autonomo, Simpatico e Parasimpatico, che esercitano, rispettivamente, un effetto cronotropo positivo e negativo. Il sistema nervoso simpatico rilascia le catecolamine, adrenalina e noradrenalina, che stimolano i recettori  $\beta$ -adrenergici accoppiati alla proteina G stimolatoria trimerica la cui subunità  $\alpha$  interagisce direttamente con l'Adenilato Ciclasi, l'enzima responsabile della sintesi del cAMP, aumentandone l'attività. Il cAMP interagisce direttamente con il canale f attraverso un meccanismo indipendente da processi fosforilativi e provoca un aumento della probabilità di apertura del canale senza modificarne la conduttanza. (DiFrancesco & Tortora, 1991; DiFrancesco & Mangoni, 1994). Il risultato finale è un aumento del numero dei canali aperti ad un certo potenziale di membrana con un aumento della pendenza della fase di depolarizzazione pacemaker e di conseguenza un effetto cronotropo positivo cioè un aumento della frequenza cardiaca. Al contrario gli agonisti muscarinici, rilasciati dal sistema nervoso parasimpatico, agiscono su recettori accoppiati a proteine G inibitorie trimeriche che inibiscono l'attività dell'adenilato ciclasi con conseguente riduzione della concentrazione intracellulare di cAMP e effetto cronotropo negativo.

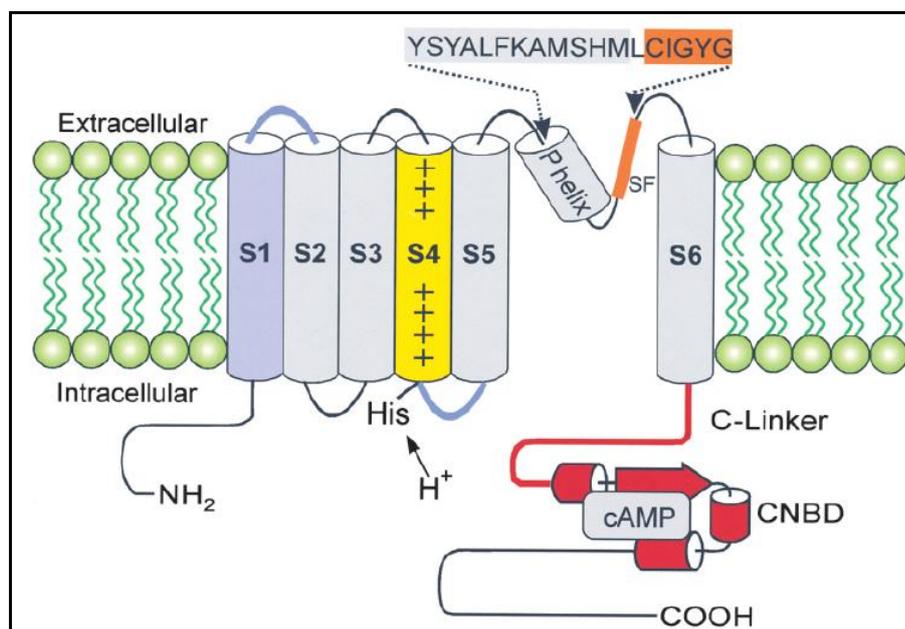


**Figura 9:** Meccanismo di modulazione da parte degli agonisti autonomi acetilcolina e norepinefrina che modulano la concentrazione di cAMP che a sua volta interagisce con i canali f direttamente senza modificarne la conduttanza (Biel *et al.*, 2002).

## CANALI HCN

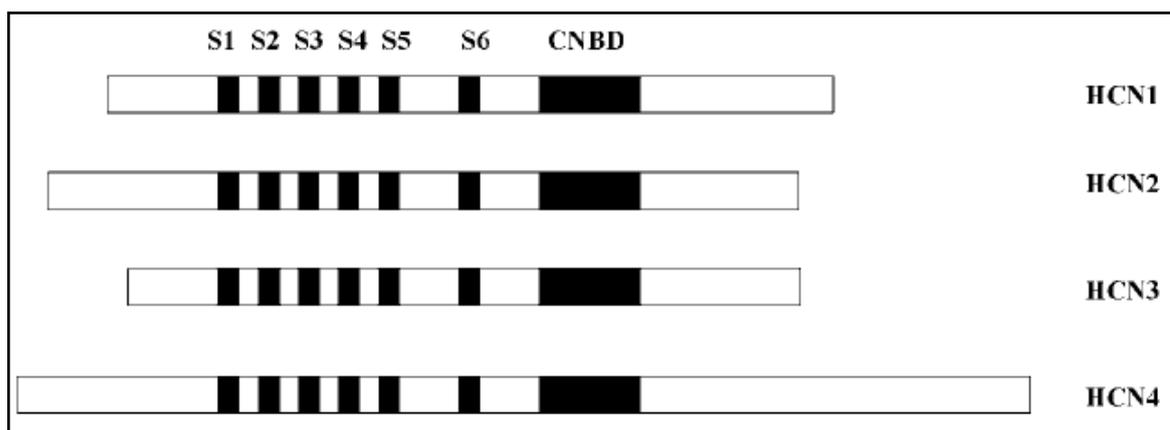
I costituenti molecolari della corrente I<sub>f</sub> sono chiamati canali Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated channels, HCN, appartenenti alla famiglia dei canali di K<sup>+</sup> voltaggio dipendenti

(Kv). I canali HCN si assemblano a formare dei complessi tetramericici di cui ogni subunità è costituita da sei segmenti transmembrana (S1-S6) di cui il dominio S4 è carico positivamente e costituisce il sensore del voltaggio e il loop tra il segmento S5 e S6 costituisce la regione del poro (Robinson & Siegelbaum, 2003). L'estremità N- e C-terminale sono intracellulari e nella porzione carbossi-terminale è presente un dominio di legame, di 120 amminoacidi, ai nucleotidi ciclici chiamato CNBD (Cyclic Nucleotide Binding Domain) che è di fondamentale importanza per la regolazione da parte del cAMP (Biel *et al.*, 2002).



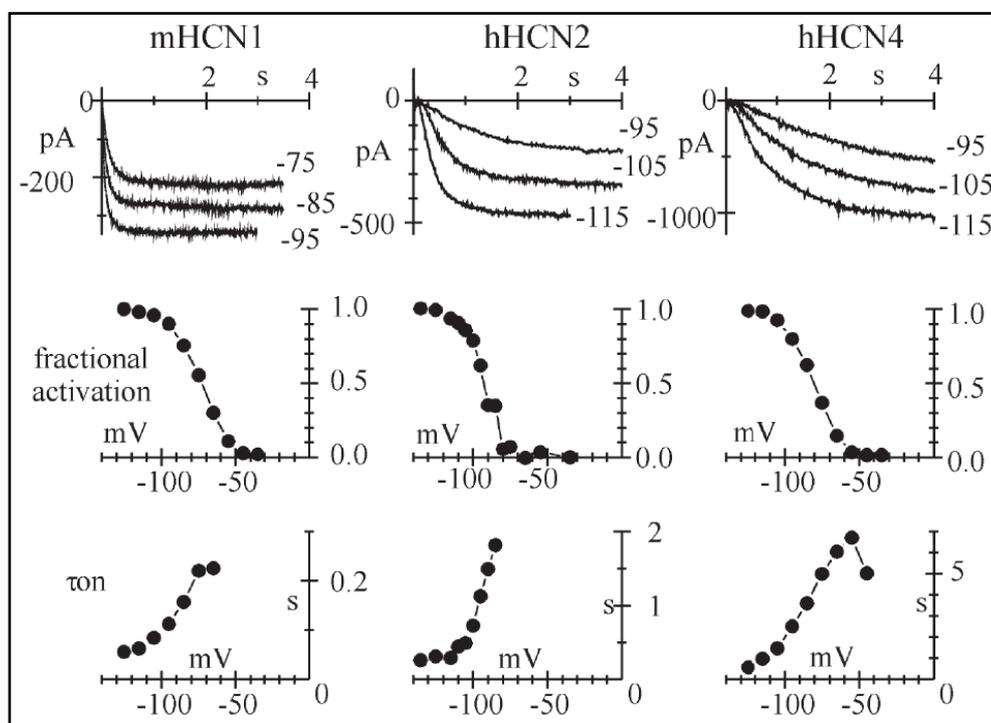
**Figura 10:** Struttura molecolare schematica dei canali HCN. Ogni subunità è costituita da 6 segmenti transmembrana di cui S4 costituisce il sensore del voltaggio e il loop tra S5 e S6 la regione del poro. All'estremità C-terminale è indicato il dominio di legame per il nucleotide ciclico (CNBD). Il canale funzionale è costituito dall'aggregazione di quattro subunità. (Biel *et al.*, 2002)

Nell'ultimo decennio sono state clonate quattro isoforme codificanti per i canali HCN, HCN1-HCN4, che presentano un'omologia dell'80-90% tra loro nei domini transmembrana e nel dominio CNBD ma presentano differenze all'estremità N- e C-terminale sia per lunghezza sia per composizione amminoacidica, dove si osserva un' omologia del 21-37% e 11-21%, rispettivamente (Viscomi *et al.*, 2001).



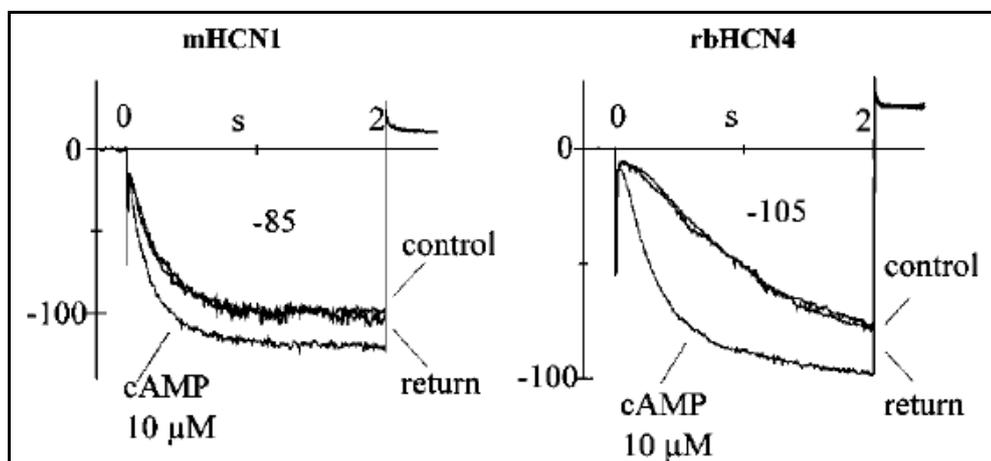
**Figura 11:** Struttura complessiva dei quattro membri della famiglia di canali HCN. I sei segmenti transmembrana sono numerati 1-6 e CNBD indica il dominio di legame ai nucleotidi ciclici (Ludwig *et al.*, 1999).

Le diverse isoforme dei canali HCN mostrano diversità nelle cinetiche di attivazione, nella modulazione da parte del nucleotide ciclico cAMP e presentano anche una diversa distribuzione tissutale. L'isoforma HCN1 è il canale con cinetiche più veloci, con una costante di tempo di attivazione di circa 25-300 ms (Santoro *et al.*, 1998; Moroni *et al.*, 2001), mentre il più lento è l'isoforma HCN4 con una costante di attivazione compresa tra poche centinaia di ms quando il potenziale di membrana è fortemente iperpolarizzato (es -140 mV) fino a diversi secondi a voltaggi più depolarizzati (-70 mV) (Ishii *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999; Altomare *et al.*, 2001; Viscomi *et al.*, 2001).



**Figura 12:** Differenze elettrofisiologiche delle isoforme HCN. Tracce di corrente  $I_f$  registrate in cellule HEK-293 per mHCN1, hHCN2 e hHCN4 e le rispettive curve di attivazione. In basso sono mostrate le costanti di tempo di attivazione per mHCN1 (mouse-HCN1), hHCN2 (human-HCN2), hHCN4 (human-HCN4) (Accili *et al.*, 2002)

Le diverse isoforme dei canali HCN mostrano diverse affinità per il cAMP, infatti l'isoforma HCN1 mostra bassa sensibilità a questo nucleotide ciclico rispetto alle isoforme HCN2 e HCN4. Il cAMP provoca uno spostamento della curva di attivazione verso voltaggi più positivi di 7,6 mV per l'isoforma HCN1 e di 17,4 mV per l'isoforma HCN4.



**Figura 13:** Azione indotta dalla somministrazione di 10  $\mu\text{M}$  di cAMP sulla corrente  $I_f$  registrata da HCN1 (mHCN1, mouse HCN1) e HCN4 (rbHCN4, rabbit HCN4) (Viscomi *et al.*, 2001).

Tecniche di RT-PCR, ibridazione in situ, Western blotting e immunolocalizzazione hanno permesso di verificare l'espressione dei canali HCN sia nelle cellule cardiache sia neuronali (Santoro *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1999; Moosmang *et al.*, 1999; Moroni *et al.*, 2001). Il SAN contiene alti livelli di HCN4 seguito da HCN1 e bassi livelli di HCN2 mentre nei ventricoli è presente soprattutto HCN2 (Accili *et al.*, 2002). L'espressione funzionale di questi canali in sistemi eterologhi (Ishii *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999; Moroni *et al.*, 2000; Moosmang *et al.*, 2001; Viscomi *et al.*, 2001) ed omologhi (Qu *et al.*, 2001), ha come risultato una corrente attivata in iperpolarizzazione, bloccata dal  $\text{Cs}^+$  in modo voltaggio-dipendente e modulato dal cAMP, caratteristiche tipiche della  $I_f$ , ma esibiscono differenze nelle cinetiche e nella sensibilità al cAMP (Santoro & Tibbs, 1999; Altomare *et al.*, 2001). Le proprietà elettrofisiologiche del canale HCN4 sono simili ma non identici alla corrente  $I_f$  nativa, ad esempio le cinetiche di attivazione del canale HCN4 sono più lente della corrente nativa. Considerato che le isoforme maggiormente espresse nel SAN sono HCN1 e 4 e che le caratteristiche elettrofisiologiche, tra cui cinetiche di attivazione e modulazione da parte del cAMP, della corrente  $I_f$  nativa mostra caratteristiche intermedie tra queste due isoforme si è ipotizzato che il canale  $I_f$  nativo è un canale eteromultimerico composto dall'assemblamento di HCN1 e HCN4 (Moroni *et al.*, 2001).

## **PATOLOGIE CARDIACHE E TERAPIA CELLULARE**

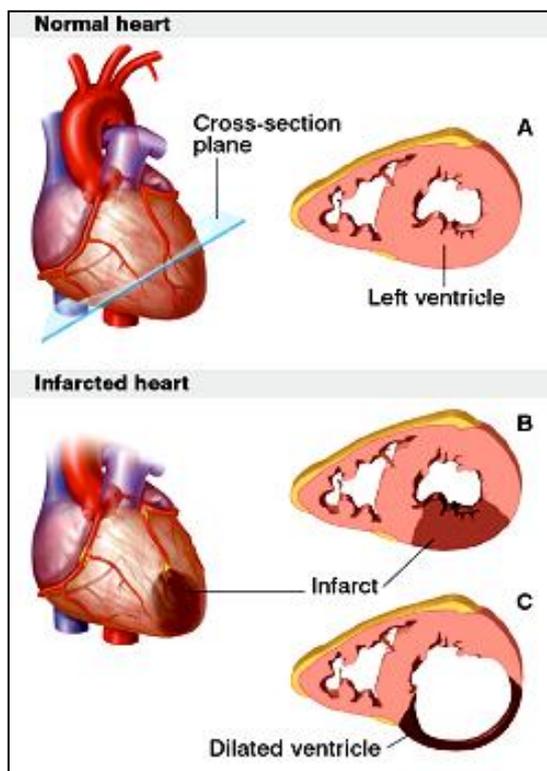
Le malattie cardiache rappresentano uno dei maggiori problemi sanitari a livello mondiale e costituiscono la prima causa di morte nella popolazione dei paesi occidentali compresa l'Italia dove il 44% di tutte le morti sono causate da malattie del sistema cardiocircolatorio.

Nella definizione di malattie cardiovascolari rientrano tutte le patologie a carico del cuore e dei vasi sanguigni tra cui la cardiopatia ischemica, la cardiopatia ipertensiva, la pericardite, il prollasso della valvola mitrale e le aritmie. Per tutte queste patologie non esistono cure efficaci in grado di ripristinare il normale funzionamento cardiaco ed è quindi necessario sviluppare terapie alternative.

### **CARDIOPATIE ISCHEMICHE**

Tra le malattie cardiovascolari, quella che si manifesta con maggiore incidenza è l'infarto del miocardio che costituisce la manifestazione più grave dell'ischemia cardiaca. Questa patologia è caratterizzata da una riduzione progressiva o improvvisa del flusso sanguigno dovuto ad un restringimento o ad una ostruzione completa delle arterie coronarie solitamente per la presenza di placche arteriosclerotiche. L'insufficiente apporto sanguigno ha come conseguenza la necrosi del tessuto miocardico che era prima irrorato dall'arteria ostruita e nei casi più gravi può portare al collasso cardiocircolatorio ed alla morte. L'entità dell'infarto dipende quindi dall'arteria occlusa e dalla presenza o meno di un apporto di sangue collaterale. Nel periodo successivo ad un infarto si assiste ad un progressivo assottigliamento del tessuto muscolare con alterazione della configurazione e della contrattilità del ventricolo sinistro. Il tessuto danneggiato viene sostituito con tessuto fibrotico non contrattile, provocando la riduzione della parete ventricolare con conseguente dilatazione del ventricolo e perdita della capacità contrattile del cuore nella regione interessata (**figura 14**).

In seguito ad un evento ischemico il meccanismo di riparazione endogeno del cuore conduce alla formazione di nuovi vasi, alla proliferazione dei cardiomiociti residenti ed alla migrazione di cellule staminali derivate dal midollo osseo verso la zona ischemica ma tale meccanismo è insufficiente a ripristinare la funzione del miocardio danneggiato (Rosenstrauch *et al.*, 2005).



**Figura 14:** Raffigurazione del cuore in condizioni normali (A) ed in condizioni patologiche (B,C); in seguito ad infarto si assiste ad assottigliamento della parete del ventricolo sinistro (da [www.stemcells.nih.gov](http://www.stemcells.nih.gov)).

Questo processo riparativo potrebbe essere potenziato attraverso l'utilizzo di specifici fattori di crescita che stimolano la proliferazione dei cardiomiociti ed il differenziamento delle cellule staminali residenti (Lee *et al.*, 2004). Attualmente per migliorare la condizione circolatoria dei pazienti che hanno avuto un infarto si utilizzano diversi approcci farmacologici sia per diminuire la pressione arteriosa (diuretici, ACE inibitori) che la frequenza cardiaca (beta bloccanti), e nei casi più gravi si ricorre ad interventi chirurgici come il by-pass o l'angioplastica, ma nessuna di queste terapie è in grado di sostituire il tessuto cardiaco danneggiato e nei pazienti sopravvissuti all'infarto la riduzione nel numero dei miociti e nella funzionalità della pompa cardiaca possono causare insufficienza cardiaca e condurre a morte per un nuovo infarto del miocardio. Considerata quindi la gravità di queste patologie risulta evidente la necessità di sviluppare trattamenti innovativi ed efficaci.

Una possibile terapia alternativa è l'utilizzo di cellule sane che trapiantate nella zona infartuata potrebbero sostituire il tessuto cardiaco danneggiato. Molti tipi cellulari sono stati trapiantati nel miocardio infartuato: cardiomiociti (embrionali, fetali e adulti), mioblasti scheletrici, cellule staminali del midollo osseo e cellule progenitrici endoteliali. L'approccio più promettente risulta essere l'uso di cellule staminali che, differenziando in cardiomiociti, potrebbero essere in grado di sostituire il tessuto cardiaco danneggiato. Le cellule staminali possono essere iniettate nella zona

d'interesse oppure, attraverso l'uso di citochine, si può promuovere la migrazione di queste cellule dal midollo osseo fino all'area infartuata. Inoltre si potrebbe potenziare il processo di riparazione endogeno con specifici fattori di crescita che stimolano la replicazione dei cardiomiociti e il differenziamento di cellule staminali residenti (Lee *et al.*, 2004).

## PATOLOGIE DEL SISTEMA DI CONDUZIONE

In diversi tipi di aritmie la genesi e la conduzione dell'impulso elettrico risulta alterato e la gravità di queste patologie può variare considerevolmente a seconda delle cause, dell'area di insorgenza e delle manifestazioni cliniche. Alterazioni del ritmo cardiaco possono essere causati da problemi a livello del nodo senoatriale come nel caso della malattia del nodo del seno (o *Sick Sinus Syndrome*) oppure da problemi che insorgono lungo il percorso di conduzione dello stimolo elettrico tra atri e ventricoli con ritardo o blocco dell'impulso, condizione definita come blocco atrio-ventricolare. La sindrome del seno malato, o SSS, non ha un'unica eziologia e patogenesi ma comprende una serie di condizioni provocate da un malfunzionamento del nodo senoatriale che ha come conseguenza un ritmo cardiaco inappropriato per le normali richieste fisiologiche. Le manifestazioni elettrocardiografiche più evidenti sono la tachiaritmia atriale e ventricolare, la bradiaritmia atriale o l'alternanza tra bradiaritmia e tachiaritmia (Adan *et al.*, 2003). In questa patologia la terapia farmacologica non costituisce la soluzione ottimale: l'uso di farmaci cardioattivi può causare il blocco senoatriale mentre l'uso di farmaci cronotropi negativi può provocare un peggioramento della patologia. L'unica soluzione è rappresentata quindi dall'impianto di un pacemaker elettronico che riduce fortemente l'incidenza di fibrillazione atriale, danno al miocardio e arresto cardiaco.

Un'altra patologia molto diffusa è il blocco atrioventricolare (BAV) in cui la conduzione dell'impulso elettrico attraverso il nodo AV risulta rallentato o, in alcuni casi, bloccato. Le manifestazioni possono essere di varia gravità e vengono classificate in:

- BAV di I grado (o blocco cardiaco incompleto) quando il passaggio dell'impulso elettrico dagli atri ai ventricoli è solo rallentato ma il ciclo cardiaco rimane essenzialmente normale.
- BAV di II grado quando si verifica un blocco temporaneo del passaggio dell'impulso
- BAV di III grado (o blocco atrioventricolare completo) si manifesta con un blocco completo dell'impulso dagli atri ai ventricoli.

L'impianto del pacemaker elettronico è fortemente consigliato tranne che nel blocco AV di I grado. I pacemaker elettronici hanno contribuito efficacemente a ridurre la mortalità associata a blocco cardiaco e, per molte patologie, rappresentano l'unica terapia valida ma presentano anche

alcuni svantaggi. La limitazione maggiore è sicuramente la mancanza di una modulazione fine da parte del sistema nervoso autonomo ed ormonale in risposta all'esercizio fisico, situazioni di stress o emozioni. Il pacemaker elettronico non rappresenta una cura definitiva, ha una durata limitata nel tempo e necessita di manutenzione periodica; inoltre l'interazione con alcuni strumenti elettronici, quali elettrostimolatori, metal detectors e apparecchi per la risonanza magnetica possono alterarne il corretto funzionamento.

Per superare queste limitazioni diversi gruppi di ricerca stanno studiando un approccio terapeutico alternativo: la creazione di un pacemaker biologico usando un substrato cellulare in grado di generare o stimolare l'attività spontanea. Per costituire una valida alternativa il pacemaker biologico dovrebbe essere in grado di generare un ritmo fisiologico stabile, rispondere alla modulazione autonoma e ormonale, non richiedere l'impiego di batterie o elettrodi, competere con il pacemaker elettronico per durata e stabilità e non conferire un rischio di infiammazione, infezione o neoplasia.

## **PACEMAKER BIOLOGICO**

Il pacemaker biologico potrebbe costituire una valida alternativa al pacemaker elettronico nella cura di alcune aritmie cardiache. Per pacemaker biologico si intende un substrato cellulare in grado di generare o stimolare l'attività spontanea del cuore che deve possedere caratteristiche particolari come la capacità di integrare stimoli nervosi autonomi ed ormonali e di conseguenza modulare la frequenza cardiaca in risposta a particolari richieste, non deve richiedere l'impiego di elettrodi o batterie e non deve conferire un rischio di infezione, infiammazione, o neoplasia. Diverse strategie sono state adottate per la creazione di un pacemaker biologico e sostanzialmente le ricerche si basano su due tipi di approcci, uno di tipo genico e uno cellulare.

## **TERAPIA GENICA**

La terapia genica prevede l'impiego di vettori plasmidici e virali, che permettono di inserire nel genoma di cellule cardiache, geni che codificano per molecole di interesse così da incrementarne l'attività autoritmica intrinseca oppure generare attività spontanea in cellule normalmente quiescenti.

## Overespressione dei recettori $\beta$ -adrenergici

Il primo tentativo di terapia genica, effettuato iniettando un costrutto adenovirale contenente il gene che codifica per il recettore  $\beta$ 2-adrenergico umano nell'atrio di maiale, ha portato ad un aumento del battito cardiaco del 50% rispetto al controllo (Edelberg *et al.*, 1998). L'aumento del battito cardiaco era dovuto essenzialmente all'overespressione dei recettori  $\beta$ -adrenergici, i quali aumentavano considerevolmente la risposta alla stimolazione simpatica basale con conseguente aumento del cAMP intracellulare. Diverse limitazioni sono presenti in questo approccio, l'effetto cronotropo positivo è di breve durata (solo 24 ore) questo perché il costrutto adenovirale non si integra nel genoma delle cellule ospiti quindi l'espressione del recettore è transiente, inoltre l'incremento della risposta a stimoli adrenergici presuppone la presenza di canali pacemaker funzionali nell'area dell'iniezione ed infine l'utilizzo di virus come vettori non ha prospettive cliniche in quanto non si possono escludere con certezza casi di infettività o neoplasia.

## Downregolazione della corrente $I_{K1}$

I cardiomiociti pacemaker differiscono dai cardiomiociti ventricolari in quanto non possiedono la corrente rettificante in entrata  $I_{K1}$  la quale mantiene la fase 4 dei potenziali d'azione ventricolari negativa e costante di circa -75mV. È stato osservato che cardiomiociti non autoritmici dove veniva soppressa l' $I_{K1}$  erano in grado di acquisire la capacità di generare un battito spontaneo. La soppressione dell' $I_{K1}$  è stata ottenuta producendo un costrutto adenovirale contenente il gene *kir2.1* (che codifica per la subunità  $\alpha$  del canale di potassio rettificatore entrante) mutato. Questo rende il canale un dominante negativo, cioè la subunità  $\alpha$  mutata interagisce con le subunità native e renderle non funzionali. La soppressione di questa corrente è sufficiente per indurre nel ventricolo attività ritmica spontanea sia *in vitro* che *in vivo* e l'attività pacemaker nei miociti trasfettati con il costrutto contenente *kir2.1* mutato era modulata da stimolazione  $\beta$ -adrenergica con isoproterenolo che produceva un effetto cronotropo positivo (Miake *et al.*, 2002). Molti effetti negativi comunque sono stati evidenziati, tra cui l'alterazione del ritmo cardiaco nel 40% degli animali trattati per la formazione di diversi foci a livello del ventricolo.

## Overespressione di canali HCN

Un costrutto adenovirale contenente il gene HCN2 è stato utilizzato per la trasfezione di miociti ventricolari neonatali di ratto che mantenuti in coltura per 48 ore acquisivano la capacità di generare un ritmo stabile e regolare (Qu *et al.*, 2001). *In vivo* l'iniezione dello stesso costrutto sia nell'atrio sinistro che nella branca discendente sinistra del sistema del Purkinje di cani ha permesso, dopo blocco sinusale indotto da stimolazione vagale, l'acquisizione di un ritmo stabile e modulabile dall'iniezione di adrenalina (Qu *et al.*, 2003; Plotnikov *et al.*, 2004)

## TERAPIA CELLULARE

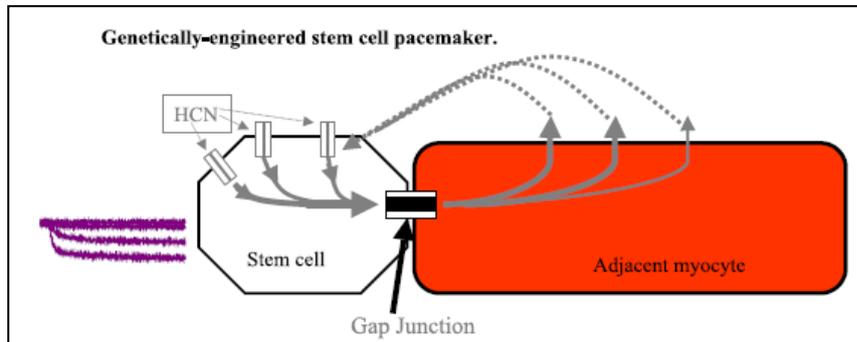
L'obiettivo della terapia cellulare è la creazione di un supporto cellulare che sia modulabile ed in grado di generare e propagare impulsi elettrici una volta trapiantato *in vivo*. A questo scopo diversi tipi di cellule staminali sia adulte che embrionali sono state utilizzate per la creazione di un pacemaker biologico.

### Cellule staminali embrionali

Alcuni studi hanno evidenziato la possibilità di creare un pacemaker biologico funzionale *in vitro* ed *in vivo* trapiantando la porzione dell'EBs che si contrae. *In vitro* il supporto trapiantato si integra elettromeccanicamente con i cardiomiociti ventricolari dell'ospite grazie alla presenza di gap junction nelle regioni di contatto tra le cellule, ed in particolare tra le varie isoforme di connesine che costituiscono le gap junction, l'isoforma maggiormente espressa risultava essere la connessina 43 (Kehat *et al.*, 2004). La frequenza del battito rispondeva all'agonista  $\beta$ -adrenergico isoproterenolo mentre ZD7288 che è un bloccante dei canali ionici pacemaker (Robinson *et al.*, 2003) riduceva la frequenza del battito. *In vivo* l'attività di pacemaking è stata dimostrata trapiantando queste porzioni nell'epicardio del ventricolo sinistro di animali modello come cavie o maiali previa ablazione del fascio di His. Nel sito di trapianto contenente cardiomiociti derivati dalle hESCs è stata rilevata la formazione di foci in grado di generare una depolarizzazione che si propagava al miocardio circostante inoltre si instaurava un nuovo ritmo ventricolare stabile e modulato dalle catecolamine (Kehat *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2005). La formazione di teratomi ed il problema etico dovuto all'utilizzo di embrioni umani sono i limiti principali di questo approccio.

## Cellule staminali mesenchimali ingegnerizzate

L'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali umane per la creazione di un pacemaker biologico è favorito dalle loro particolari proprietà, in particolare l'accoppiamento elettrico con le cellule ventricolari residenti favorito dall'espressione di alcune isoforme di connesine (connessina 43 e 40) che sono i costituenti molecolari delle gap junction (Valiunas *et al.*, 2004). Le cellule mesenchimali umane sono state ingegnerizzate *in vitro* tramite elettroporazione con un plasmide che garantisce l'overespressione di HCN2 e iniettate nell'epicardio del ventricolo sinistro di cane dopo l'induzione di un blocco atrioventricolare. Dopo una settimana erano in grado di originare un ritmo ventricolare stabile e modulabile rispetto al controllo non trattato (Potapova *et al.*, 2004). L'instaurarsi di questo meccanismo è reso possibile grazie al particolare accoppiamento tra miociti residenti e cellule staminali mesenchimali iniettate (**figura 15**). In condizioni di riposo il miocita possiede un potenziale negativo che attiva i canali HCN presenti sulla membrana della cellula staminale accoppiata così da generare una corrente entrante depolarizzante che grazie alla presenza delle gap junction provoca una depolarizzazione nel miocita accoppiato e se la depolarizzazione è tale da raggiungere la soglia nel miocita si verificherà un potenziale d'azione.



**Figura 15:** Rappresentazione schematica del funzionamento di un pacemaker biologico costituito da cellule staminali ingegnerizzate accoppiate con i miociti circostanti.

L'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali umane nella costruzione di un pacemaker biologico presenta diversi limiti come il rischio di rigetto, neoplasia, migrazione in altri siti e differenziamento in altri tipi cellulari.

## SCOPO DEL LAVORO

Le cellule staminali per le loro caratteristiche sono da anni oggetto di grande interesse, in particolare per il loro potenziale utilizzo nel campo della terapia cellulare. Le cellule staminali possono essere indotte a differenziare verso il tipo cellulare di interesse in modo da curare patologie per cui al momento non esistono terapie efficaci e definitive. Il nostro interesse è rivolto, in modo particolare, allo sviluppo di un pacemaker biologico inteso come un substrato cellulare autoritmico con le stesse caratteristiche del pacemaker naturale del cuore, cioè il nodo senoatriale. A questo scopo stiamo prendendo in considerazione diversi tipi di cellule staminali con l'intento di valutarne il loro potenziale differenziativo e definirne le proprietà.

In questa tesi abbiamo preso in considerazione diverse popolazioni di cellule staminali adulte, tra cui cellule staminali ematopoietiche CD34+, isolate dal sangue del cordone ombelicale, e progenitori associati ai vasi sanguigni, i mesoangioblasti, e studiato la capacità di queste cellule di differenziare verso un fenotipo cardiaco. Al momento stiamo prendendo in esame anche un'altra popolazione di cellule staminali adulte, le cellule staminali spermatogoniali o germinali, per cercare di trasformarle in cellule pluripotenti aventi quindi le stesse caratteristiche delle cellule staminali embrionali.

## MATERIALI E METODI

### COLTURE CELLULARI E PROTOCOLLI DI ISOLAMENTO

#### CELLULE STAMINALI CD34+ DEL CORDONE OMBELICALE

L'isolamento delle cellule CD34-positive, l'analisi al FACS, e la produzione del Lentivirus-GFP è stata eseguita dal laboratorio del Prof. Capogrossi dell'Istituto Cardiologico Monzino.

#### ISOLAMENTO DI MIOCITI VENTRICOLARI NEONATALI DI RATTO

Per l'isolamento di miociti ventricolari neonatali abbiamo utilizzato nidi di 12 ratti di due-tre giorni di ceppo CD (Charles River). Avvenuto il sacrificio, si procede all'espanto dei cuori che vengono rapidamente messi in una soluzione fisiologica fredda (Phosphate Buffered Saline, PBS). Gli atri sono stati eliminati mentre i ventricoli sono stati tagliati in piccoli pezzi, raccolti e sottoposti a 5 cicli di digestione enzimatica in una soluzione composta da ADS (NaCl 116.4 mM, KCl 5.4 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mM,  $\text{MgSO}_4$  monoidrato 0.8 mM, Glucosio 5.5 mM, Hepes 20 mM; pH 7.4) diluita 1:10, Collagenasi I (136.8 U/ml, Whorthington) e Pancreatina (0.6 mg/ml, Sigma), in agitazione costante a 37°C per venti minuti. Al termine di ogni dissociazione, ad eccezione della prima, il surnatante è stato raccolto in una falcon contenente FBS, così da inattivare gli enzimi presenti nella soluzione, e centrifugato a 300 x g per 5 min. Il tessuto non dissociato è stato fatto depositare sul fondo della provetta, abbiamo aggiunto altra soluzione enzimatica e sottoposto allo step successivo.

Al termine delle dissociazioni, la sospensione cellulare ottenuta è stata distribuita su un gradiente discontinuo di Percoll (Sigma) così composto:

TOP: Percoll Stock (Percoll 90%, ADS 10X, 10%) 45%, ADS 1X 55%

BOTTOM: Percoll Stock (Percoll 90%, ADS 10X, 10%) 65%, ADS 1X 35%

Si procede quindi ad una centrifugazione a 1750 x g per 30 minuti senza freno. Questo procedimento consente la formazione di tre fasi, di cui la fase superiore del gradiente è costituita dai fibroblasti, i quali vengono scartati, così come i globuli rossi che costituiscono la fase inferiore. La fase centrale è invece costituita dai cardiomiociti ventricolari, i quali vengono prelevati, lavati in ADS 1X e centrifugati a 310 x g per cinque minuti. I cardiomiociti così ottenuti

sono stati risospesi in Plating medium contenente DMEM, Medium 199 (in rapporto 4:1), Horse Serum 10%, Fetal Bovine Serum 5%, L-Glutamina 2mM, Penicillina 100 U/ml, Streptomicina 0,1 mg/ml), contate e piastrate ad una densità di circa  $5 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup>. Il giorno dopo si sostituisce con il terreno di mantenimento (Maintenance Medium: DMEM, Medium 199 (in rapporto 4:1), Horse Serum 5%, Fetal Bovine Serum 5%, L-Glutamina 2mM, Penicillina 100 U/ml, Streptomicina 0,1 mg/ml, Citosina-arabinoside (Ara-C) 2.5  $\mu$ M).

## CO-COLTURA DELLE CELLULE CD34+ CON MIOCITI VENTRICOLARI NEONATALI DI RATTO

Le cellule CD34-positive, sono state messe in co-coltura con i miociti ventricolari di ratto, preparati 2/3 giorni prima, in rapporto 1:4. Le co-culture vengono mantenute per almeno 6 giorni, cambiando il terreno ogni 2/3 giorni.

## MESOANGIOBLASTI

Le cellule caratterizzate in questo lavoro ci sono state fornite dal laboratorio del Prof. Cossu dell'ospedale San Raffaele dove, oltre all'isolamento ed espansione dei mesoangioblasti, è stata effettuata anche la caratterizzazione molecolare tramite FACS e RT-PCR di cui i dati relativi verranno quindi solo riportati ma non trattati in dettaglio.

## ISOLAMENTO DI MESOANGIOBLASTI CARDIACI

Topi del ceppo C57 (Charles River) di 15 giorni sono stati anestetizzati profondamente, uccisi e i cuori sono stati prelevati. Gli atri sono stati eliminati mentre i ventricoli, immersi in una soluzione di Tyrode (NaCl 140mM, KCl 5.4mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM, MgCl<sub>2</sub> 1.0mM, Hepes NaOH 5mM, Glucosio 5.5mM; pH 7.4), sono stati dissezionati in piccoli pezzi ciascuno contenente un vaso sanguigno. Circa 10-12 pezzi sono stati piastrati in una capsula Petri da 35 mm di diametro ricoperta di gelatina B (Sigma) all'1%. Il terreno di coltura utilizzato era costituito da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionato con 20% di FBS (Fetal Bovine Serum), L-glutamina 2mM, penicillina 100U/ml e streptomicina 0.1 mg/ml. Dopo circa 2-3 giorni, cellule morfologicamente simili a fibroblasti migrano fuori dall'espianto e formano uno strato su cui, dopo circa 2-3 settimane, si possono identificare piccole cellule rotonde e luminose. Queste cellule sono state raccolte e piastrate singolarmente in un pozzetto ricoperto di gelatina di una

multiwell da 96 pozzetti con lo stesso tipo di terreno. Dopo un periodo variabile dalle 2 alle 6 settimane, alcune di queste cellule avevano originato cloni che sono stati staccati con tripsina 0.05%/EDTA 0.02% ed espanse in piastre più grandi. Con questa procedura sono stati ottenuti 15 cloni. Per il mantenimento delle cellule allo stadio indifferenziato è stato utilizzato lo stesso terreno con il siero ridotto al 10%. Per indurre il differenziamento il siero è stato ridotto ulteriormente al 2% e le cellule sono state tenute in coltura per almeno 5 giorni.

## ISOLAMENTO DI CELLULE STAMINALI SPERMATOGONIALI

Per l'isolamento di cellule staminali spermatogoniali sono stati utilizzati, a seconda del protocollo scelto, topi wild type C57 (per i protocolli A, B, C e D) oppure topi Oct4-GFP (per il protocollo E), in tutti i casi di un età compresa tra 2 e 5 settimane. I topi sono stati addormentati profondamente con isofluorano e sacrificati. I testicoli sono stati raccolti in una capsula Petri contenente Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma) e privati della tunica albuginea. Dopo aver rimosso l'eccesso di cellule interstiziali attraverso due lavaggi con PBS, i tubuli seminiferi sono stati disgregati per mezzo di un bisturi, raccolti in una falcon da 15 ml e sottoposti a 2 steps di digestione enzimatica per ottenere una sospensione di cellule singole.

### **Protocollo di isolamento A, B, C e D**

Per le condizioni A, B, C e D è stata utilizzata una soluzione enzimatica composta da PBS, Tripsina 0,017% (Sigma), EDTA 17  $\mu$ M (Sigma), Collagenasi di tipo I (Worthington) 25 U/ml e DNasi di pancreas bovino di tipo I (Roche) 100  $\mu$ g/ml. Ogni ciclo di digestione è stata condotta con 5 ml della soluzione sopra descritta per 20 min a 37°C. Al termine di ogni dissociazione la sospensione cellulare è stata risospesa con l'aiuto di una micropipetta, il tessuto non ancora dissociato è stato fatto depositare mentre il surnatante è stato prelevato e trasferito in una nuova falcon da 15 ml in cui abbiamo aggiunto siero fetale bovino (FBS, Invitrogen) pari al 10% del volume finale, in modo da inattivare gli enzimi contenuti nella soluzione enzimatica. Al termine della seconda dissociazione, il surnatante viene recuperato e trasferito nella stessa falcon utilizzata precedentemente a cui viene aggiunto ancora FBS pari al 10% del volume trasferito. Le cellule vengono centrifugate a temperatura ambiente per 5 minuti a 310 x g.

### **Protocollo di isolamento E**

Per il protocollo E è stata utilizzata una soluzione enzimatica, preparata con DMEM+GlutaMAX™ (Euroclone), collagenasi di tipo IV (Sigma) 10 mg/ml e DNasi di

pancreas bovino di tipo I (Roche) 10 mg/ml. I tubuli seminiferi sono stati inizialmente risospesi con 5 ml di questa soluzione enzimatica ed incubati a 37°C per 10 minuti, invertendo la falcon 5 o 6 volte ogni 2-3 minuti. Al termine della prima dissociazione, i tubuli sono stati fatti depositare sul fondo della falcon ed il surnatante, contenente cellule interstiziali e connettivali, è stato rimosso. I tubuli sono stati lavati con DMEM+GlutaMAX™ e sottoposti ad un altro ciclo di digestione enzimatica per 10 minuti, risospendendo vigorosamente il campione con una micropipetta 6 o 7 volte ogni 2-3 minuti. Al termine della seconda digestione, sono stati aggiunti alla sospensione cellulare 5 ml di medium così composto: DMEM+4 mM L-glutamine powder (Invitrogen), 10% FBS (Invitrogen), 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Invitrogen), 1X Penicillina/Streptomicina (Invitrogen), per inattivare la soluzione enzimatica. Le cellule sono state filtrate con un filtro da 30 µm (BD) per eliminare eventuali aggregati residui e centrifugate a 310 x g per 5 minuti a temperatura ambiente.

## PROTOCOLLI DI COLTURA DI SSCs

### Condizione A

Le cellule ottenute dalla dissociazione enzimatica dei tubuli seminiferi sono state piastrate in capsule Petri precedentemente trattate con gelatina allo 0,1% (w/v) per favorirne l'adesione, in un terreno di coltura, Expansion Medium, composto da: DMEM+GlutaMAX™ (Euroclone), 20% FBS (Invitrogen), 1% Penicillina/Streptomicina (Invitrogen) addizionato con le seguenti citochine: 10<sup>3</sup> U/ml LIF (Chemicon), 20 ng/ml hEGF (Invitrogen), 10 ng/ml bFGF (Tebu-bio), 4 ng/ml GDNF (Tebu-bio). Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA 0.25% dopo circa 4-5 giorni e piastrate in pozzetti di una multiwell da 24, contenenti un feeder layer di fibroblasti embrionali murini immortalizzati (STO) inattivati con mitomicina C, ad una densità di 1,25x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> in un terreno di mantenimento ottimizzato per la coltura delle cellule staminali embrionali costituito da: ES-DMEM (Euroclone), 2 mM L-glutammina (Invitrogen), 0,1 mM β-mercaptoetanolo (Invitrogen), 1X MEM NEA (Invitrogen), 5% KO-SR (Invitrogen), 1% Penicillina/Streptomicina (Invitrogen) con l'aggiunta di LIF (10<sup>3</sup> U/ml) e GDNF (4 ng/ml). Le cellule venivano staccate periodicamente, circa ogni 7 giorni con tripsina-EDTA 0.25% e diluite 1:2. Dal momento in cui cominciavano ad essere visibili delle colonie tondeggianti, con margini ben definiti e una morfologia complessivamente molto simile a quella delle colonie di cellule staminali embrionali, al medium di mantenimento non veniva più aggiunto il GDNF, ma solamente il LIF.

## Condizione B

Il protocollo B è una variante del protocollo precedente (Condizione A), con l'unica differenza che al 4° giorno di coltura, le cellule sono state piastrate, anziché su un feeder layer di STO, in capsule Petri precedentemente trattate con gelatina di tipo B (Sigma) allo 0,1% (w/v) ad una densità di  $1,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ .

## Condizione C e D

Per i protocolli C e D abbiamo utilizzato come terreno di coltura per i primi 4 giorni l'Expansion Medium addizionato, nel caso della condizione C unicamente con GDNF mentre, nel caso della condizione D, con GDNF e con LIF. Dopo i primi 4 giorni di coltura, il terreno è stato eliminato e le cellule adese al fondo della Petri sono state staccate in seguito a trattamento con tripsina-EDTA 0,25% per 3 minuti a 37°C. La sospensione di cellule singole così ottenute è stata centrifugata per 5 minuti a 310 x g a temperatura ambiente. Il surnatante è stato rimosso ed il pellet è stato risospeso con terreno, Basic Medium, composto da DMEM+GlutaMAX™ (Euroclone), 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoetanol (Invitrogen), X MEM NEA (Invitrogen), 5% FBS (Invitrogen), 1% Penicillina/Streptomicina (Invitrogen). Le cellule vengono contate e piastrate in capsule Petri da 35 mm di diametro (o in multiwell da 24 pozzetti), trattate anch'esse con gelatina allo 0,1% (w/v).

Nella condizione C, le cellule sono state mantenute in coltura con Basic Medium senza l'aggiunta di fattori di crescita fino al 18° giorno. Successivamente al Basic Medium è stato aggiunto il LIF ad una concentrazione finale di  $10^3$  U/ml. Per la condizione D il Basic Medium è sempre stato utilizzato con l'aggiunta sia di LIF ( $10^3$  U/ml) che di GDNF (4 ng/ml). In entrambi i casi, le cellule sono state divise una volta ogni 7 giorni operando sempre una diluizione 1:2.

## Condizione E

Contrariamente agli altri protocolli, la condizione E prevede l'impiego di topi transgenici Oct4-GFP. Le cellule GFP<sup>+</sup> di nostro interesse sono state isolate tramite FACS e piastrate in un pozzetto di una multiwell da 24 contenente un feeder layer di fibroblasti embrionali murini (MEF) inattivati con mitomicina C in 500  $\mu\text{l}$  di GSC Medium composto da: StemPro-34 SFM (Invitrogen), 1X StemPro Supplement (Invitrogen), 1X N2 Supplement (Invitrogen), 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  DL-Acido Lattico (Sigma), 2 mM L-glutammina (Invitrogen), 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoetanol (Invitrogen). A questo sono addizionati i seguenti fattori di crescita:  $10^3$  U/ml LIF (Chemicon), 20 ng/ml hEGF (Invitrogen), 10 ng/ml bFGF (Tebu-bio), 10 ng/ml GDNF (Tebu-bio). Dopo 2 giorni in incubatore a 37°C sono stati aggiunti altri 250  $\mu\text{l}$  di terreno fresco. Il 4° giorno di coltura

circa metà del terreno è stato rimosso per poterne aggiungere di nuovo. Al 6° giorno di coltura sono stati aggiunti altri 250 µl di terreno fresco. Il giorno seguente il terreno è stato rimosso completamente e le cellule sono state staccate aggiungendo 500 µl di tripsina-EDTA 0,25% per 3 minuti a 37°C. Le cellule sono state quindi centrifugate a 310 x g per 5 minuti a temperatura ambiente ed il pellet risospeso con il terreno di coltura. Le cellule sono state poi piastrate con una diluizione 1:2 in pozzetti di una multiwell da 24 contenenti un feeder layer di MEF inattivati con mitomicina C ed incubate a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. La divisione è stata effettuata ogni 7 giorni diluendo le cellule 1:2 o 1:3 e piastrandole sempre su un feeder layer di MEF trattati con la mitomicina C.

## PREPARAZIONE DI FIBROBLASTI EMBRIONALI MURINI

I fibroblasti embrionali murini sono importanti per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule staminali, in quanto secernono diversi fattori di crescita. A seconda dei protocolli abbiamo utilizzato:

- fibroblasti embrionali murini immortalizzati (STO, SIM mouse embryo fibroblasts resistant to Thioguanine and Oubain)
- fibroblasti embrionali murini (MEF, Mouse Embryo Fibroblast).

La principale differenza consiste nel loro potenziale mitotico, che è ridotto nei MEF, in quanto derivanti da colture primarie, mentre è illimitato per gli STO, che sono immortalizzati e quindi in grado di dividersi per un tempo indefinito. In entrambi i casi, data la loro elevata velocità di proliferazione non è possibile utilizzarli come feeder layer senza averli prima trattati in modo da impedirne la replicazione. A questo scopo è stata utilizzata la mitomicina C (Sigma), un agente alchilante del DNA che ne impedisce la denaturazione e quindi la replicazione. Quando i fibroblasti hanno raggiunto in piastra una confluenza dell'80-90%, la mitomicina C viene aggiunta nel terreno di crescita ad una concentrazione finale di 10 µg/ml e le cellule sono riposte in incubatore a 37°C per circa 2 ore. Al termine dell'incubazione il terreno viene rimosso completamente e le cellule sono sottoposte a 2 lavaggi con PBS, dopo i quali i fibroblasti vengono staccati con tripsina-EDTA 0,25% e centrifugati a 310 x g per 5 minuti a temperatura ambiente. In seguito a trattamento con mitomicina, per ottenere un feeder layer con una giusta confluenza, i fibroblasti sono piastrati ad una densità di circa  $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$  in terreno STO composto da: DMEM+4 mM L-glutamine powder (Invitrogen), 10% FBS (Invitrogen), 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Invitrogen) e 1% Penicillina/Streptomicina (Invitrogen).

## BIOLOGIA MOLECOLARE

### INFEZIONE DELLE CELLULE CON LENTIVIRUS-GFP O RFP

A seconda degli esperimenti  $3 \times 10^5$  o  $5 \times 10^5$  cellule CD34-positive sono state infettate con il Lentivirus EGFP a MOI (Multiplicity Of Infection) 50 o 100 per 24 h in presenza di polibrene  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma Aldrich) e incubate a  $37^\circ\text{C}$  e al 5% di  $\text{CO}_2$ . Successivamente le cellule sono state lavate tre volte con 10 ml di PBS addizionato con FCS 5%. Per l'infezione dei cardiomiociti con il vettore LentiRFP abbiamo diluito il surnatante del vettore con il medium ad un rapporto 1:1. Dopo 24 ore abbiamo lavato i miociti tre volte con PBS e aggiunto terreno fresco. Entrambi i lentivirus sono stati prodotti nel laboratorio del Prof. Capogrossi

### PREPARAZIONE DEL PLASMIDE GATA-6/GFP E TRASFEZIONE DELLE MABS

Per verificare la presenza di una sottopopolazione di mesoangioblasti indirizzata a differenziarsi verso un fenotipo pacemaker-like abbiamo trasfettato le cellule indifferenziate con un plasmide di espressione in cui il gene reporter GFP è sotto un elemento enhancer del fattore di trascrizione GATA-6 (GATA-6/GFP).

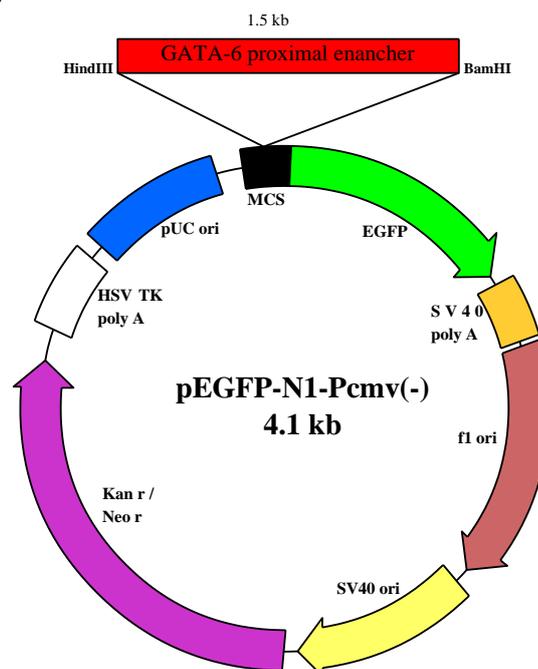


Figura 16: Mappa del vettore pEGFP-N1-Pcmv(-) + cGata-6.

La regione del promotore del GATA-6 di pollo (cGATA-6) (gentilmente fornito dal Dr Burch, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA) è stata excisa usando SalI/BamHI dal vettore pPD46.21 e inserita, usando gli stessi enzimi di restrizione, nel Multiple Cloning Site del vettore pEGFP-N1 (Invitrogen). Il promotore costitutivo P<sub>CMV</sub> è stato quindi rimosso (AseI/XhoI) per ottenere il vettore cGATA-6/GFP (**figura 16**).

I mesoangioblasti cardiaci indifferenziati sono stati trasfettati con il vettore cGATA6-GFP usando la Lipofectamina (Invitrogen), seguendo il protocollo fornito dal distributore. Le cellule sono state co-trasfettate con il plasmide pIRES2a-DsRed2 al fine di valutare l'efficienza della trasfezione.

### ESTRAZIONE DNA

Le cellule sono state staccate con tripsina/EDTA 0,25% e centrifugate per 5 minuti a temperatura ambiente a 310 x g. Il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato risospeso tramite aggiunta di Cell Lysis Solution, in modo da lisare le membrane cellulari, così da liberare gli acidi nucleici. A questa sospensione è stata aggiunta RNase A Solution per eliminare l'RNA e i campioni sono stati invertiti 25 volte. Le cellule sono state poi incubate per 5 minuti a 37°C e successivamente per 1 minuto in ghiaccio. Per eliminare il contenuto proteico è stata aggiunta Protein Precipitation Solution, le cellule sono state risospese tramite vortex per 20 secondi e poi centrifugate a 13 000 x g per 1 minuto a temperatura ambiente. Il surnatante viene trasferito in nuove eppendorf sterili (RNase-free e DNase-free, Eppendorf Biopur<sup>®</sup>), in modo da scartare il pellet proteico ottenuto, e ad esso è aggiunto isopropanolo (Sigma). I campioni vengono invertiti 50 volte e poi centrifugati a 13 000 x g per 1 minuto a temperatura ambiente. Il surnatante viene eliminato, i pellet lavati con etanolo al 70% (Sigma) e centrifugati a 13 000 x g per 1 minuto a temperatura ambiente. Dopo aver nuovamente decantato il surnatante, i pellet vengono fatti asciugare, risospesi in 30 µl di DNA Hydratation Solution ed incubati a 65° per 1 ora. I campioni vengono quindi lasciati overnight a temperatura ambiente prima di poter quantificare il DNA presente tramite spettrofotometro.

### ESTRAZIONE RNA

Le cellule sono state staccate con tripsina/EDTA 0,25% e centrifugate per 5 minuti a temperatura ambiente a 310 x g. Il pellet è stato risospeso in TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, 1 ml per <math>5 \times 10^6</math> cellule e 50mg di tessuto) per lisare le cellule. Il TRIzol Reagent è una soluzione

monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, che distrugge tutte le strutture cellulari mantenendo l'integrità dell'RNA. Dopo la lisi si aggiungono 0,2 ml di cloroformio-isoamil-alcool (49:1, Fluka) per ogni ml di Trizol utilizzato, si invertono i campioni per circa 10 volte e si incuba a temperatura ambiente per 4 min, quindi si centrifuga a 10000g per 20 minuti (4°C). In questo modo si vengono a creare tre fasi diverse: una fase acquosa superficiale contenente l'RNA; una fase intermedia (o interfase) di colore bianco, contenente le proteine; una fase densa, di colore rosa, contenente il DNA. Il volume della fase superficiale è circa il 60% del volume di TRIzol utilizzato per la lisi. La parte superiore contenente RNA viene recuperata e trasferita in nuove eppendorf sterili, a cui viene aggiunto un volume equivalente di isopropanolo (Sigma). I campioni vengono invertiti e lasciati precipitare da 10 minuti a temperatura ambiente fino a overnight a -20°C. I campioni vengono quindi centrifugati a 12 000 x g per 20 minuti a 4°C. Il surnatante viene decantato, i pellet lavati con etanolo al 75% (Sigma) e centrifugati a 7 500 x g per 10 minuti a 4°C. Dopo aver nuovamente decantato il surnatante, i pellet vengono fatti asciugare sotto cappa per 10 minuti e poi risospesi in 10-20 µl di acqua MilliQ per poter quantificare l'RNA presente tramite spettrofotometro. Per eliminare eventuali residui di DNA abbiamo sottoposto i campioni a trattamento con DNasi I (Fermentas).

## Trattamento con DNasi I (Tabella 1)

**Tabella 1** : trattamento con DNasi per 1 µg di RNA

	<b>Stock</b>	<b>Concentrazione finale</b>	<b>Volume</b>
Buffer con MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	10X	1X	1 µl
DNasi I (Fermentas)	1 U/µl	0,1 U/µl	1 µl
Acqua MilliQ			Fino a 9 µl
<b>Volume finale</b>			9 µl

I volumi vengono aggiustati in base ai µg di RNA totali che si vogliono trattare. Il buffer utilizzato ha un'alta concentrazione di Mg<sup>2+</sup>, che catalizza la velocità di reazione della DNasi. I campioni così preparati vengono incubati a 37°C per 30 minuti per consentire all'enzima di agire e degradare il DNA. Al termine dell'incubazione si aggiunge EDTA 25mM (in rapporto 1:1 con il volume di DNasi utilizzato), che inattiva la DNasi I. A questo punto i campioni possono essere conservati a -80°C oppure sottoposti immediatamente a retrotrascrizione.

## RT-PCR

Il metodo RT-PCR prevede l'utilizzo di una polimerasi, detta retro-trascrittasi (RT, Superscript™ II Reverse Transcriptase kit, Invitrogen), che è in grado di sintetizzare un filamento di DNA con sequenza complementare a uno stampo di RNA (DNA-polimerasi RNA-dipendente). I campioni sono stati preparati come indicato nella **tabella 2**.

**Tabella 2:** Preparazione campioni per RT-PCR

	<b>Stock</b>	<b>Campioni</b>	<b>No RT</b>	<b>No RNA</b>
RNA		8 µl della reazione di DNasi	8 µl della reazione di DNasi	-
dNTP mix (Roche)	10 mM	1 µl	1 µl	1 µl
Random Esameri (Invitrogen)	50 ng/ µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Volume Finale</b>		10 µl	10 µl	10 µl

Abbiamo quindi utilizzato due controlli negativi per verificare che il risultato della retrotrascrizione non fosse dovuto a contaminazioni: il campione No RT, in cui non viene aggiunto l'enzima trascrittasi inversa Superscript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) ed il campione No RNA, che contiene tutto il necessario per la reazione di retrotrascrizione a meno dell'RNA.

Dopo aver preparato i campioni, vengono incubati a 65°C per 5 minuti per denaturarli e poi vengono raffreddati in ghiaccio per 1 minuto. Ad ogni campione si aggiunge la seguente mix (9 µl per campione) (**Tabella 3**):

**Tabella 3:** Preparazione mix per RT-PCR

	<b>Stock</b>	<b>Concentrazione finale</b>	<b>Volume</b>
Buffer RT (Invitrogen)	5X	0,5X	4 µl
DTT (Invitrogen)	0,1 M	10 mM	2 µl
RNasi OUT	40 U/µl	4 U/µl	1 µl
Acqua MilliQ			2 µl
<b>Volume Finale</b>			9 µl

I campioni vengono poi mixati e incubati a 25°C per 2 minuti. In seguito, si procede all'aggiunta di 50U di SuperScript II RT, solo nei campioni RT, si incuba per 10 minuti a 25°C, poi per 50 minuti a 42°C (sintesi cDNA) e infine per 15 minuti a 70°C (elongation).

### PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica che consente l'amplificazione di sequenze note del DNA di partenza. In questo modo, anche se il campione iniziale fosse esiguo, esso potrebbe essere moltiplicato per essere poi utilizzato per le successive analisi.:

**Tabella 4:** Preparazione mix per PCR

Componenti	Stock	Concentrazione finale	Per 1 reazione
dNTPs	2 mM	200 µM	2 µ
Primer For	25 µM	1.25 µM	1 µl
Primer Rev	25 µM	1.25 µM	1 µl
Buffer	5X	1X	4 µl
MgCl	25 mM	3 mM	2.4 µl
Templato		100 ng	2 µl
GoTaq	5 U/µl	1.5 U	0.3 µl
Acqua			7.3 µl
<b>Volume finale</b>			20 µl

Il programma di PCR utilizzato prevede:

un ciclo di denaturazione iniziale a 95° per 5 minuti

un ciclo che viene ripetuto per 30 volte composto da:

- ✓ 40" a 95°
- ✓ 40" alla temperatura di annealing dei primers utilizzati
- ✓ 40" a 72°

un ciclo di elongation finale a 72° per 10 minuti

**Tabella 5:** Primers forward e reverse utilizzati per i mesoangioblasti.

	<b>Primer Forward</b>	<b>Primers Reverse</b>
<b>Isl-1</b>	catcgagtgtttccgctgtgtag	gtggtcttctccggctgcttgtgg
<b>Nkx2.5</b>	ttcaagcaacagcgggtacc	taaccgtagggattgaggcc
<b>GATA4</b>	cttggaacagtctggcttgg	acaggagagatgcagtgctgc
<b>GATA6</b>	ccgcgagtgcgtgaact	cgcttctgtggcttgatgag
<b>Tbx2</b>	ggtgcagacagacagtgcgt	aggccagtaggtgacccatg
<b>Tbx5</b>	ccagctcggcgaagggatgttt	ccgacgccgtgtaccgagtgat
<b>b-tub</b>	ccggacagtgtggcaaccagatcg	tggccaaaaggacctgagcgaac
<b>Con43</b>	ttgtttctgtcaccagtaac	gatgaggaaggaagagaagc
<b>ANP</b>	gaacctgctagaccacct	Cctagtccactctgggct
<b>Tbx3</b>	cccgaagaagaggtggaggacgac	gatggagacagcaggagaggat

**Tabella 6:** Primers forward e reverse utilizzati per le SSCs.

<b>Islet1</b>	forward: 5'- act-att-tgc-cac-cta-gcc-aca-gca -3'
	reverse: 5'- gtt-cag-cat-cca-aca-agg-cac-tga -3'
<b>YFP</b>	1: 5'- gga-gcg-gga-gaa-atg-gat-atg -3'
	2: 5'- aaa-gtc-gct-ctg-agt-tgt-tat -3'
	3: 5'- aag-acc-gcg-aag-agt-ttg-tc -3'

La presenza degli amplificati è stata poi analizzata attraverso analisi elettroforetica su gel di agarosio.

## REAL-TIME PCR

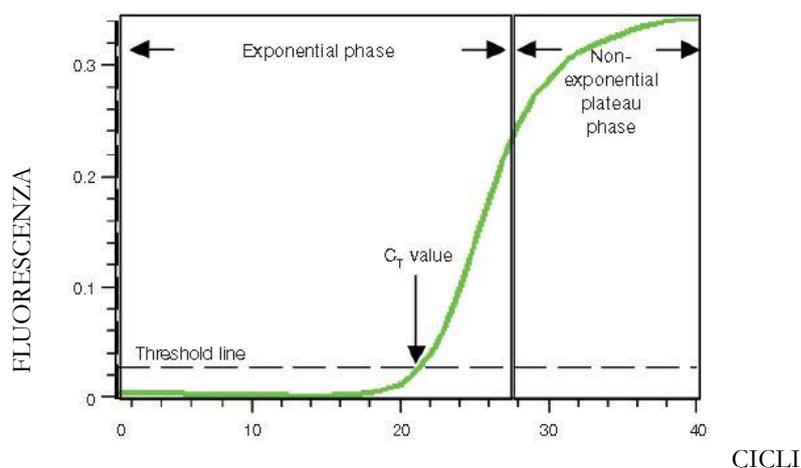
Il cDNA ottenuto in seguito alla retrotrascrizione dell'RNA dei campioni è stato sottoposto a Real-Time PCR, una tecnica che permette di quantificare l'espressione dei geni di interesse rapportandola a quella di geni di controllo, detti geni *housekeeping*. In questo modo è possibile conoscere il livello di espressione di uno o più geni all'interno di diversi tipi cellulari. L'espressione del gene *housekeeping* serve come valore riferimento a cui rapportare il valore di espressione degli altri geni, in quanto è un gene noto per essere espresso ubiquitariamente ed in

qualsiasi condizione. Il gene *housekeeping* da noi utilizzato è l'ipoxantina fosforibosil transferasi (HPRT), un enzima importante nel metabolismo delle purine e costitutivamente espresso in tutti i tipi cellulari. I campioni sottoposti ad analisi di Real-Time RT-PCR sono stati preparati per ogni gene in triplo, aggiungendo ad ognuno la seguente mix così composta (una mix per Oct4 e una per HPRT):

**Tabella 7:** Preparazione dei campioni per l'analisi di real-time PCR.

	Stock	Concentrazione finale	Volume (per 1 campione)
SYBR Green Mix (Takara)	2X	1X	12,5 $\mu$ l
Primer Forward (Sigma)	10 $\mu$ M	0,5 Mm	1,25 $\mu$ l
Primer Reverse (Sigma)	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
Acqua MilliQ			5 $\mu$ l
<b>Volume finale</b>			20 $\mu$ l

Il SYBR Green è un colorante che ha la proprietà di intercalarsi alle basi azotate del DNA, legandosi, in maniera aspecifica, al DNA a doppio filamento. Essendo un fluoroforo, è in grado di assorbire luce ed emettere fluorescenza nel verde. Inoltre, la fluorescenza emessa aumenta di 1000 volte quando esso si trova legato alle eliche appaiate di DNA: la quantità della fluorescenza è quindi indice della quantità di DNA amplificato. Con l'aumentare dei cicli di denaturazione e di amplificazione la fluorescenza emessa dal SYBR Green aumenterà proporzionalmente. Per poter essere rilevata, la fluorescenza emessa deve però superare un valore soglia, delineato dalla *threshold line*. Il punto in cui la curva di emissione di fluorescenza del campione, che ha un andamento di tipo sigmoideale, interseca la *threshold line* è chiamato *ciclo threshold* ( $C_T$ ) ed è a partire da questo ciclo di amplificazione che il segnale di fluorescenza sarà rilevabile. Dopo il *ciclo threshold* la curva seguirà un andamento di tipo esponenziale ed è su questa porzione di curva che sarà effettuata l'analisi comparativa dei dati. Alla fase esponenziale farà seguito la fase non esponenziale, o *plateau*, che indica l'esaurirsi della reazione a causa del consumo dei reagenti e dei primers.



**Figura 17:** Illustrazione di una curva di emissione di fluorescenza ottenuta in seguito a Real-Time RT-PCR (Real-Time PCR Applications Guide, Bio-Rad Laboratories).

Per l'amplificazione dei geni d'interesse, sono stati disegnati primers specifici indicati in **tabella 8**.

**Tabella 8:** Primers per l'analisi di real-time PCR.

<b>Oct4</b>	forward: 5'- gtt-gga-gaa-ggt-gga-acc-aa -3'
	reverse: 5'- ctc-ctt-ctg-cag-ggc-ttt-c -3'
<b>HPRT</b>	forward: 5'- gca-gta-cag-ccc-caa-aat-gg -3'
	reverse: 5'- ggt-cct-ttt-cac-cag-caa-gct -3'

Per ogni campione sono stati uniti 20  $\mu$ l di mix e 40 ng/ $\mu$ l di template, ottenendo un volume finale di 25  $\mu$ l. I campioni sono stati preliminarmente sottoposti ad uno step a 50°C per 2 minuti al fine di eliminare gli eteroduplex di RNA. Dopo uno step a 95°C per 20 secondi, sono stati eseguiti 50 cicli di PCR composti dai seguenti passaggi:

- 30 secondi a 95°C, per la denaturazione del template;
- 30 secondi a 60°C, per la fase di *annealing* dei primers e della DNA polimerasi;
- 30 secondi a 72°C, per la fase di *elongation*;

Infine, è stato eseguito uno step finale a 15°C per un tempo indeterminato.

Al termine della reazione, i risultati sono stati analizzati per mezzo del software Line-Gene (Bioer). Per normalizzare i risultati, sono stati calcolati i valori del  $\Delta C_T$ :

$$\Delta C_T = C_{T(\text{target})} - C_{T(\text{reference})}$$

dove per *target* si intende il gene d'interesse, mentre per *reference* il *gene housekeeping*. Infine, per paragonare i dati riguardanti l'espressione del gene di interesse abbiamo rapportato i valori ottenuti come  $2^{-\Delta CT} * 100$ .

## ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA

Per l'analisi di immunofluorescenza, i mesoangioblasti sono stati fatti crescere su un vetrino coprioggetto precedentemente rivestito di gelatina B all'1%.

Tutte le cellule sottoposte all'analisi di immunofluorescenza sono state fissate in paraformaldeide al 4% (peso/volume) per 10 minuti in ghiaccio con lo scopo di preservare e stabilizzare il campione, mantenendone inalterata la struttura. Questo procedimento protegge le cellule da danni osmotici e impedisce la solubilizzazione dell'antigene, mantenendolo nella posizione originaria e rendendolo accessibile all'anticorpo primario. Successivamente abbiamo effettuato un lavaggio in PBS con glicina 0.1 M per 20 minuti, affinché siano saturati tutti i siti della paraformaldeide residua e incubato il campione per 30 minuti in una soluzione di permeabilizzazione e di blocco composto da Triton X-100 0.3% e Bovine Serum Albumine (BSA) 1% in PBS. Il Triton è un blando detergente che permette di permeabilizzare la membrana plasmatica e di ridurre i siti idrofobici presenti, mentre il blocco con l'albumina è in grado di saturare eventuali cariche aspecifiche. L'incubazione con gli anticorpi primari (**tabella 8**) è stata effettuata overnight a 4°C in camera umida, diluendo l'anticorpo in una soluzione di PBS. Il mattino seguente per eliminare l'anticorpo in eccesso, non legato in modo specifico, i campioni sono stati lavati con PBS per circa 2 ore (cambiando il PBS ogni 15 minuti). Successivamente è stata eseguita l'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato al fluorocromo appropriato, diluito in PBS, a temperatura ambiente per 1 ora (**tabella 9**), ed infine l'anticorpo secondario in eccesso è stato eliminato attraverso lavaggi con PBS della durata di 2 ore. Quando necessario, per marcare il citoscheletro abbiamo effettuato un'ulteriore incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente con falloidina coniugata alla rodamina (1U/vetrino, Molecular Probes) una tossina che si lega all'actina polimerizzata (actina F) e poi abbiamo effettuato dei lavaggi per 45 minuti con PBS. Per montare il vetrino coprioggetto abbiamo utilizzato il montante Vectashield (Vector) contenente un intercalante del DNA fluorescente (DAPI) in grado di colorare i nuclei delle cellule. Per ogni esperimento abbiamo preparato anche un vetrino di controllo in cui abbiamo ommesso l'incubazione con gli anticorpi primari in modo da valutare l'eventuale segnale aspecifico dato dal solo anticorpo secondario. I campioni marcati sono stati conservati al buio a 4°C fino al momento dell'analisi al microscopio. Le immagini in fluorescenza sono state acquisite tramite un microscopio videoconfocale (Video Confocal Microscopy, ViCo Nikon).

**Tabella 9:** anticorpi primari

<b>Anticorpo primario</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Ditta produttrice</b>
Mouse anti-slow myosin	1:500	Sigma
Mouse anti-Cx43	1:50	Chemicon
Mouse anti-Cx45	1:50	Chemicon
Rabbit anti-HCN1	1:100	Alomone labs
Rabbit anti-HCN2	1:100	Alomone labs
Rabbit anti-HCN3	1:100	Alomone labs
Rabbit anti-HCN4	1:100	Alomone labs
Anti-GATA6	1:100	Abcam
Rabbit anti-recettore $\beta_1$ adrenergico policlonale	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-recettore $\beta_2$ adrenergico policlonale	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-recettore muscarinico dell'acetilcolina (M2)	1:200	Santa Cruz Biotechnology

**Tabella 10:** anticorpi secondari

<b>Anticorpo secondario</b>	<b>Fluorocromo coniugato</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Ditta produttrice</b>
Anti-mouse	TRITC	1:1000	Molecular Probes
Anti-mouse	Cy5	1:1000	Chemicon
Anti-rabbit	FITC	1:1000	Molecular Probes

## TEST DELLA FOSFATASI ALCALINA

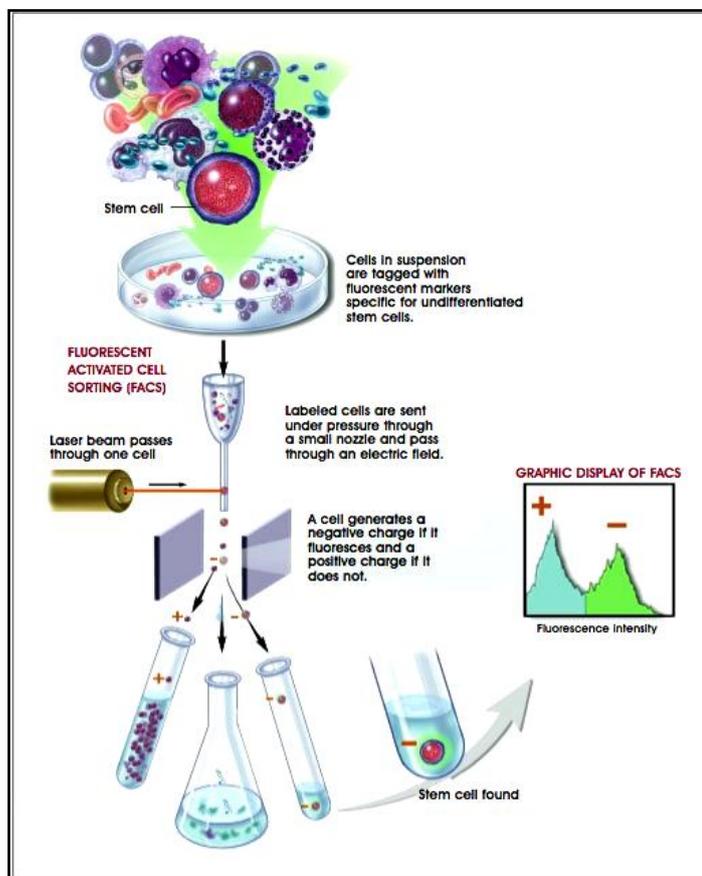
Per l'analisi della fosfatasi alcalina le cellule sono state fatte crescere per 3 giorni su un feeder layer di fibroblasti embrionali murini inattivati in seguito a trattamento con mitomicina C. Successivamente, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% (Sigma) in PBS per 2 minuti a temperatura ambiente. Il fissativo è stato poi rimosso ed è stato effettuato un lavaggio con Rinse Buffer 1X (composto da Tris-HCl 20 mM, 0,15% NaCl pH 7.4, 0.05% Tween<sup>®</sup> 20, Sigma). Per la marcatura è stato usato il Vector<sup>®</sup> Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I (Vector Laboratories). Le cellule sono state quindi incubate al riparo dalla luce per 30 minuti a temperatura ambiente in continua agitazione. Allo scadere del tempo, la soluzione per la marcatura è stata rimossa e si è provveduto ad un lavaggio con Rinse Buffer 1X. Le colonie sono state poi ricoperte con PBS ed è stato quindi possibile procedere alla visualizzazione a microscopio ottico delle colonie positive per la fosfatasi alcalina, ovvero le colonie che avessero acquisito una colorazione rossa.

## CITOFUORIMETRIA

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido. Le cellule di una popolazione eterogenea vengono aspirate dalla provetta e immesse in una camera di flusso dove vengono separate le une dalle altre. Le cellule sono colpite da un fascio di luce focalizzata e, tramite i fenomeni di riflessione, rifrazione e diffrazione della luce, è possibile stabilirne la dimensione (Forward Scatter), ma anche la granulosità e la complessità (Side Scatter). Inoltre, è possibile rilevare la fluorescenza emessa dalle proteine fluorescenti eventualmente presenti all'interno delle cellule, quali GFP (Green Fluorescent Protein) o RFP (Red Fluorescent Protein), o quella emessa da anticorpi monoclonali coniugati a fluorofori diretti contro gli antigeni di interesse. Questi segnali passando attraverso un sistema di filtri e specchi raggiungono un rivelatore, dove vengono processati elettronicamente, trasformati da segnale analogico a digitale e inviato all'analizzatore. Attraverso piastre di deflessione le cellule analizzate possono essere raccolte separatamente tramite un processo definito "sorting".

Per l'analisi al FACS, le cellule sono state risospese in PBS, 10% FBS, EDTA 5 mM. Quando necessario l'incubazione con gli anticorpi di interesse è avvenuta al buio per 30 min in ghiaccio. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate una volta con PBS, 10% FBS, EDTA 5

mM per rimuovere l'anticorpo non legato e filtrate con filtri da 70  $\mu\text{m}$  (BD) per rimuovere eventuali aggregati e analizzati al FACS Aria (Becton Dickinson)



**Figura 18:** La figura illustra il principio su cui di basa il funzionamento della citometria di flusso (©2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwall).

## ANALISI ELETTROFISIOLOGICA

L'analisi elettrofisiologiche sono state condotte a temperatura ambiente (24-25°C) per le cellule CD34 positive oppure a  $36 \pm 1$  °C per i mesoangioblasti. Per questo tipo di analisi le cellule sono state perfuse con una soluzione fisiologica, Tyrode, contenente NaCl, 140 mM; KCl, 5.4 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM; Hepes NaOH, 5 mM; Glucosio, 5.5 mM; pH 7.4). Per le registrazioni della corrente  $I_f$  è stata usata la tecnica di voltage-clamp in configurazione whole-cell, mentre per la registrazione dell'attività spontanea è stata usata la configurazione whole-cell nella modalità current-clamp. Le pipette di vetro borosilicato avevano una resistenza di circa 5 M $\Omega$  quando riempite con una soluzione simile a quella intracellulare contenente: K-aspartato, 130mM; NaCl, 10 mM; EGTA-KOH, 5mM; CaCl<sub>2</sub>, 2mM; MgCl<sub>2</sub>, 2mM; ATP (Na-salt), 2mM; creatina fosfato,

5mM; GTP (Na-salt), 0.1mM; Hepes-KOH, 10mM a pH 7.2. Le soluzioni extracellulari sono state perfuse sulle cellule tramite un sistema che permette il rapido ricambio della soluzione intorno alla cellula. Per le registrazioni della corrente pacemaker abbiamo usato la soluzione fisiologica Tyrode addizionato con BaCl<sub>2</sub> (1 mM) e MnCl<sub>2</sub> (2 mM) per bloccare eventuali correnti contaminanti rispettivamente di potassio e calcio. Inoltre, sono state effettuate registrazioni con Tyrode contenente CsCl (5 mM) per verificare il blocco da cesio della corrente pacemaker. Per valutare la modulazione della frequenza di scarica dei potenziali d'azione e della corrente I<sub>f</sub> da parte dell'agonista autonomico isoproterenolo abbiamo preparato una soluzione madre (Iso 1 mM) in acqua che è stata poi diluita alla concentrazione finale di 1 μM in Tyrode (durante le registrazioni dei potenziali d'azione) o Tyrode Ba<sup>2+</sup> Mn<sup>2+</sup> (durante le registrazioni della corrente I<sub>f</sub>). Per la modulazione indotta dall'acetilcolina abbiamo preparato una soluzione madre (ACh 10 mM) in acqua e poi una diluizione intermedia alla concentrazione di 0.1 mM in Tyrode che è poi stata diluita alla concentrazione finale di 0.1 μM, quest'ultima in Tyrode o Tyrode Ba<sup>2+</sup> Mn<sup>2+</sup> a seconda del tipo di registrazione. I protocolli di voltaggio usati per stimolare le cellule sono stati generati utilizzando un apposito software (pClamp 9, Axon Instruments), interfacciato con un convertitore analogico/digitale (Digitata 1320, Axon Instruments) connesso ad un amplificatore da patch-clamp Axopatch 200B (Axon Instruments).

## ANALISI DEI DATI

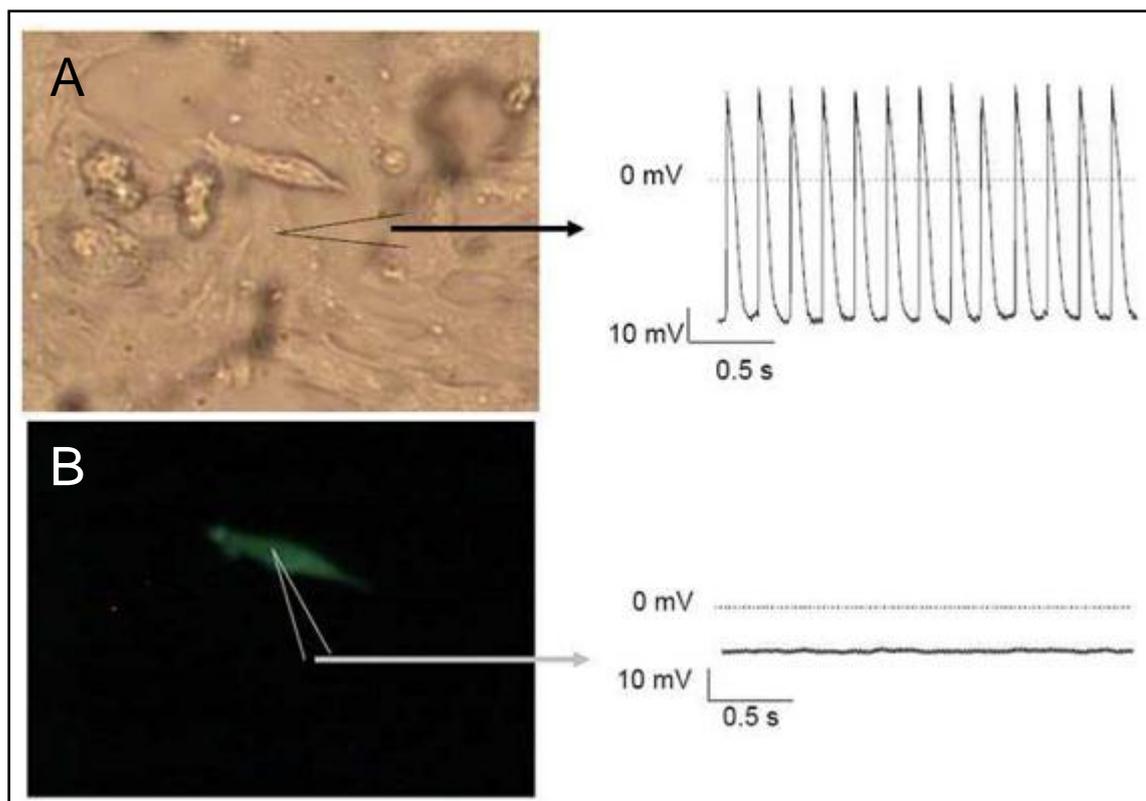
Per quanto riguarda l'analisi dei dati, sono stati utilizzati i softwares pClamp 7 ed Origin 5.0 (Microcal.Inc.). Le curve di attivazione della corrente pacemaker sono state ottenute dall'analisi delle correnti di coda registrate a valori di potenziale di -125 mV o -135 mV, preceduti da gradini test nell'intervallo da -45 mV a -125 mV. Il potenziale di mantenimento (holding potential) è stato imposto a -35 mV. Ogni gradino di potenziale applicato era di una durata sufficientemente lunga da permettere all'attivazione della corrente di raggiungere lo stato stazionario. Le curve di attivazione sono state interpolate con l'equazione di Boltzmann  $y = 1 / \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/s]\}$ , dove V indica il potenziale di comando, y la variabile di attivazione, V<sub>1/2</sub> il valore di voltaggio al quale la metà dei canali sono attivati e s "l'inverse slope factor" della curva. Le costanti di tempo di attivazione sono state ottenute interpolando, l'andamento temporale delle tracce di corrente registrate a potenziali test da -65 mV a -125 mV, tralasciando una fase di attivazione ritardata iniziale con la funzione mono-esponenziale:  $I_t = I_{\infty}(1 - e^{-t/\tau})$  dove τ è la costante di tempo definita come il tempo necessario al raggiungimento del 63% della corrente allo stato stazionario I<sub>∞</sub> (Altomare *et al.*, 2001). Lo spostamento della curva di attivazione della I<sub>f</sub> in seguito a

perfusione con Iso 1  $\mu\text{M}$  e ACh 0.1  $\mu\text{M}$  è stato calcolato utilizzando un metodo rapido che non prevede l'analisi dell'intera curva di attivazione. Il protocollo prevede l'applicazione, partendo da un potenziale di mantenimento di -35 mV, di un impulso a un potenziale vicino a quello di mezza attivazione prima e dopo l'esposizione agli agonisti autonomici. Per compensare l'aumento o la riduzione della quantità di corrente, il potenziale di mantenimento è stato variato manualmente verso valori più positivi (per l'Iso) o negativi (per l'ACh) fino ad ottenere un'ampiezza di corrente sovrapponibile a quella in controllo. Il valore dello shift è stato calcolato sottraendo al nuovo valore di holding quello di controllo. Questo metodo può essere applicato quando le sostanze perfuse cambiano la probabilità di apertura dei canali senza modificare la conduttanza del canale (Accili *et al.*, 1996; Bois *et al.*, 1997). Le differenze statistiche sono state calcolate utilizzando il test t di Student per popolazioni indipendenti oppure il test esatto di Fisher. I dati ottenuti sono stati espressi come valore medio  $\pm$  media degli errori standard (S.E.M, Standard Error of the Mean). Il livello di significatività statistica è stato fissato a  $P=0.05$ .

## RISULTATI

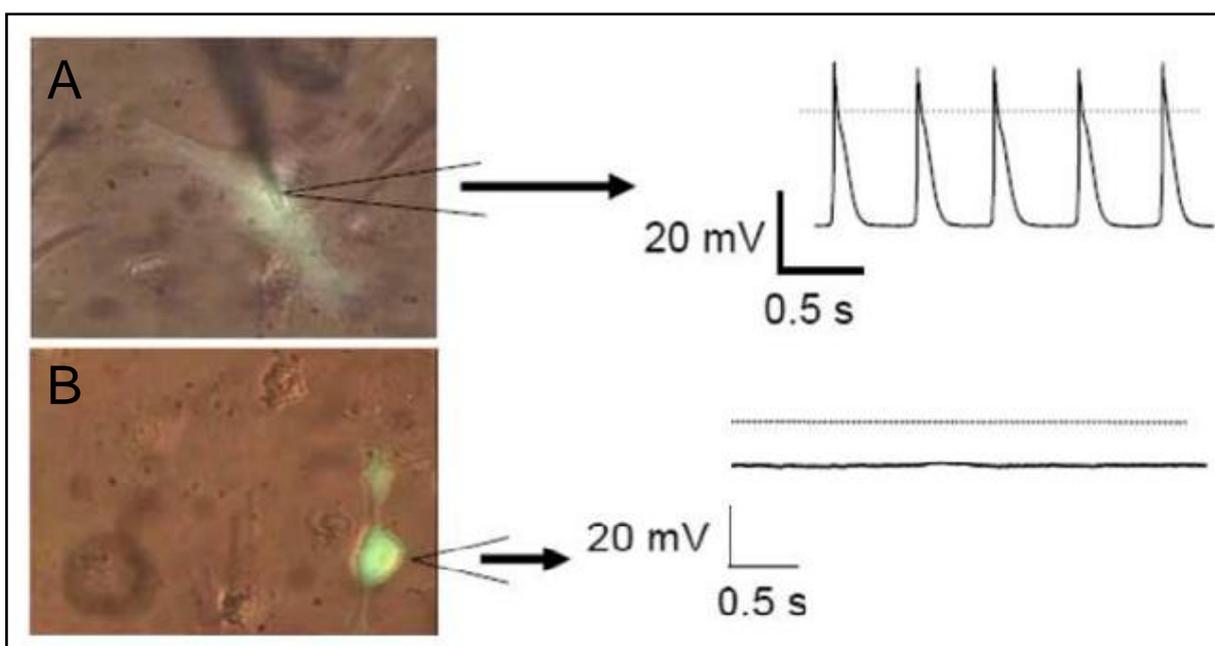
### CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE CD34+ DEL CORDONE OMBELICALE

Per studiare il differenziamento di cellule staminali ematopoietiche verso il fenotipo cardiaco abbiamo condotto esperimenti di co-coltura di cellule CD34+ del cordone ombelicale con un substrato autoritmico. A questo scopo, il giorno dopo l'isolamento le cellule CD34+ sono state infettate con un lentivirus esprime la proteina reporter EGFP, così da renderle facilmente identificabili, e dopo 24 ore sono state messe in coltura su miociti ventricolari neonatali di ratto. In queste condizioni le cellule CD34+ aderiscono al layer sottostante e cambiano lentamente la loro morfologia. Analisi elettrofisiologiche condotte il primo giorno di co-coltura mostrate in **figura 19** hanno evidenziato che, a questo stadio, i miociti ventricolari presentano potenziali d'azione spontanei mentre le cellule CD34+/EGFP+ non mostrano attività autoritmica.



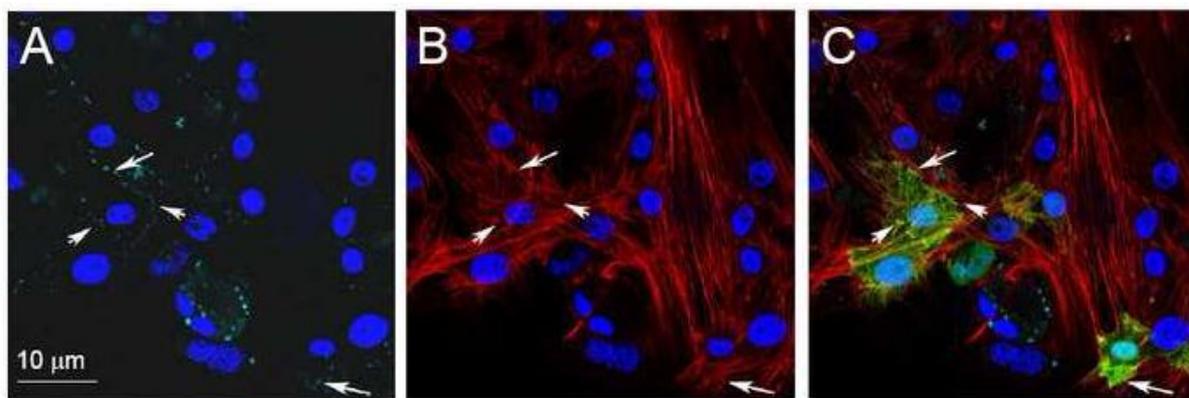
**Figura 19:** Immagini acquisite al microscopio a contrasto di fase della co-coltura di miociti ventricolari neonatali di ratto con cellule CD34+/EGFP+. Immagine dello stesso campo in luce nel pannello A ed in fluorescenza in B, dopo 1 giorno di co-coltura e le rispettive analisi elettrofisiologiche.

Dopo sei giorni di co-coltura abbiamo osservato che la maggior parte delle cellule CD34 + erano integrate con il feeder layer di miociti e assumevano una morfologia allungata e stellata grazie all'emissione di prolungamenti cellulari. L'analisi elettrofisiologica condotta dopo sei giorni di co-coltura ha mostrato che le cellule GFP+/CD34+ integrate con i miociti circostanti presentano potenziali d'azione spontanei (**figura 20A**) e un massimo potenziale diastolico (MDP) di  $-53.1 \pm 3.2$  mV ( $n = 6$ ) mentre le cellule GFP+/CD34+ non integrate al feeder layer sottostante non mostrano attività elettrica (**figura 20B**) e hanno un potenziale di riposo depolarizzato simile a quello delle cellule CD34+ prima della co-coltura, di circa  $-11.4 \pm 3.9$  mV ( $n=7$ ).



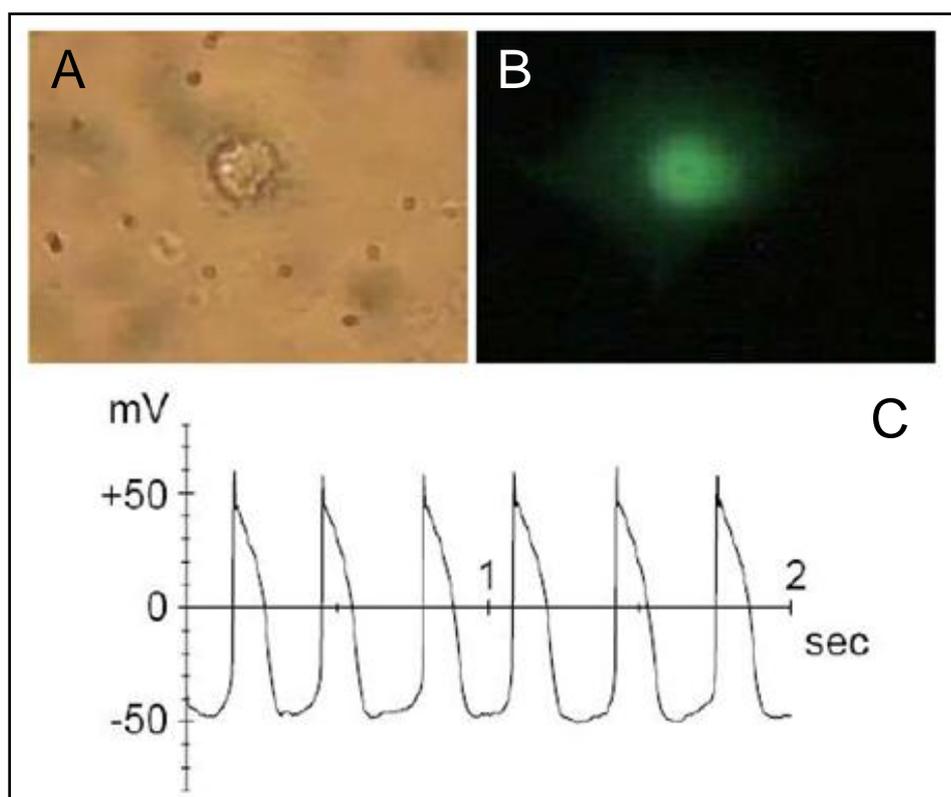
**Figura 20:** Immagini acquisite al microscopio a contrasto di fase dopo 6 giorni di co-coltura. In A immagine di una cellula CD34+/EGFP+ integrata con il feeder layer sottostante di miociti ventricolari neonatali di ratto che presenta potenziali d'azione spontanei. In B immagine di una cellula CD34+/EGFP+ non integrata con le cellule circostanti che non mostra attività ritmica spontanea.

La presenza di potenziali d'azione nelle cellule CD34+ non è una dimostrazione del differenziamento cardiaco di queste cellule ma piuttosto indica che queste cellule sono in grado di accoppiarsi elettricamente con i miociti circostanti grazie alla formazione di gap junction. Abbiamo quindi condotto esperimenti di immunofluorescenza per verificare la presenza della connessina 43 che è l'isoforma maggiormente espressa a livello cardiaco. Come mostrato in **figura 21**, le cellule mostrano un apparato citoscheletrico organizzato e sono connesse alle cellule circostanti grazie alla presenza di gap junctions.



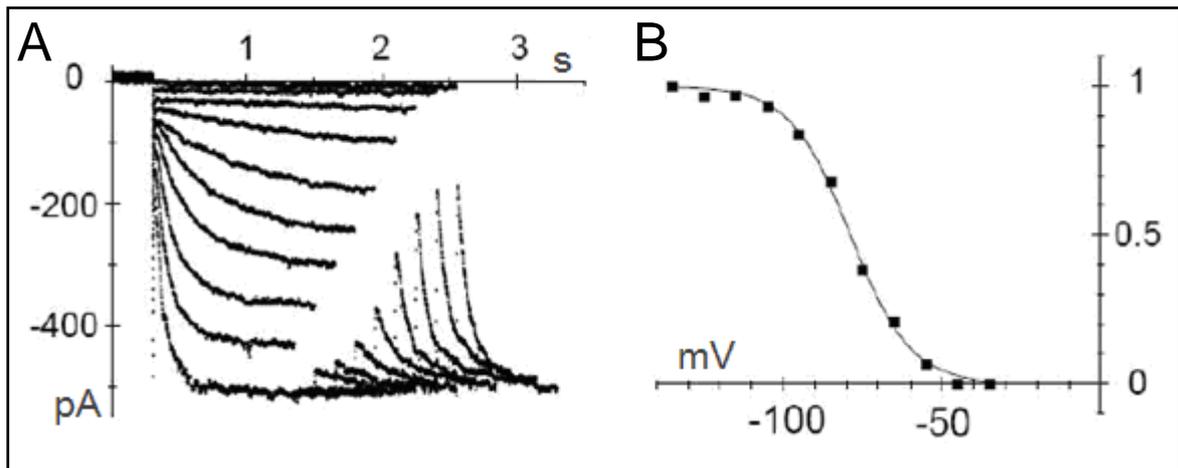
**Figura 21:** Immagini acquisite al microscopio videoconfocale di una co-coltura di cellule CD34+/EGFP+ con miociti ventricolari. Le frecce indicano la marcatura per la Cx43 (in azzurro) in A, per la falloidina (in rosso), in B, in due cellule EGFP+. In C è mostrata la sovrapposizione dei segnali di fluorescenza.

Per questo motivo abbiamo deciso di re-isolare enzimaticamente le cellule dopo sei giorni di co-coltura e piastrarle a bassa densità per evitare la formazione di contatti cellulari e condurre le nostre analisi solo su singole cellule EGFP positive.



**Figura 22:** Immagini acquisite al microscopio a contrasto di fase di una cellula re-isolata dopo 6 giorni di co-coltura. Immagine in luce, nel pannello A, ed in fluorescenza, nel pannello B, di una cellula CD34+/EGFP+. L'analisi elettrofisiologica, in C, condotta su queste cellule mostra la presenza di potenziali d'azione spontanei.

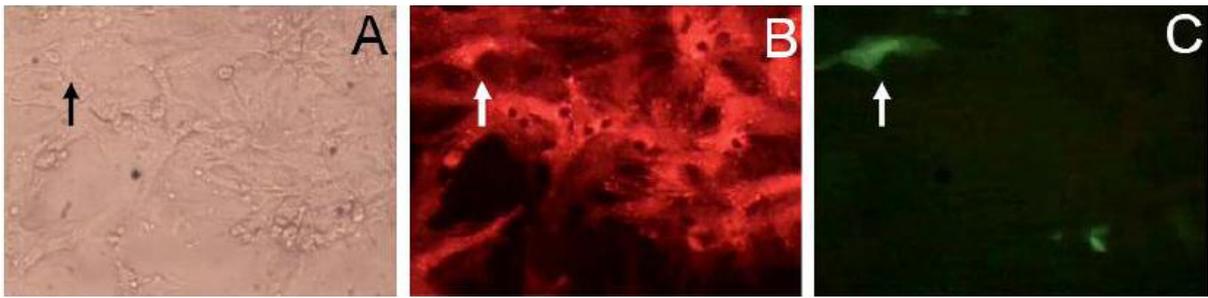
In **figura 22A** e **22B** è mostrata una cellula EGFP positiva re-isolata dalla co-coltura su cui abbiamo effettuato misure elettrofisiologiche per verificare la presenza di attività elettrica e abbiamo osservato, nel 16% delle cellule EGFP positive, la presenza di potenziali d'azione spontanei con la tipica fase di depolarizzazione diastolica lenta (**figura 22C**). Siamo quindi andati ad indagare la presenza della corrente pacemaker ( $I_f$ ), cioè la principale responsabile della fase di depolarizzazione diastolica lenta che caratterizza i potenziali d'azione del nodo senoatriale.



**Figura 23:** Analisi elettrofisiologica condotta su singole cellule CD34+/EGFP+ re-isolate dopo 6 giorni di co-coltura. In A sono mostrate le tracce di corrente  $I_f$ , in B, la rispettiva curva di attivazione.

In **figura 23A** sono mostrate tracce di corrente  $I_f$ , registrate da una cellula EGFP positiva re-isolata, ottenute applicando un protocollo standard che prevede l'applicazione di gradini iperpolarizzanti da -45 a -135 mV partendo da un potenziale di mantenimento di -35 mV e seguiti da uno step di piena attivazione della corrente a -135 mV. In **figura 23B** è mostrata la rispettiva curva di attivazione che mostra un potenziale di mezza attivazione,  $V_{1/2}$ , di  $-73.8 \pm 2.9$  mV e un inverse slope factor,  $s$ , è di  $8.7 \pm 0.9$  mV. Questi valori sono molto simili a quelli di  $V_{1/2}$  e  $s$  registrati nei miociti ventricolari neonatali di ratto ( $-78.2 \pm 2$  mV and  $7.8 \pm 0.5$  mV,  $n = 4$  dati non mostrati) (Barbuti *et al.*, 1999; DiFrancesco D., 1999)

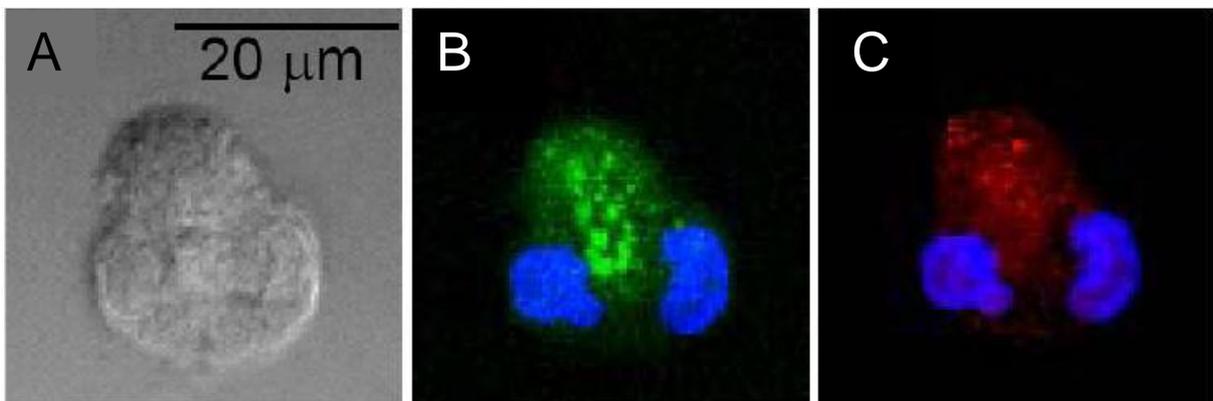
Per verificare se l'acquisizione da parte delle cellule CD34+ di un fenotipo cardiaco fosse il risultato di un processo di transdifferenziamento o di fusione cellulare abbiamo condotto esperimenti di co-coltura di cellule CD34+/EGFP+ su miociti neonatali precedentemente infettati con un lentivirus esprimente la proteina rossa fluorescente RFP. In **figura 24** è mostrato un monostrato di miociti cardiaci RFP + su cui è presente una cellula GFP+. Come si può osservare da queste immagini la cellula esprime sia la RFP che la GFP indicando l'avvenuto processo di fusione e non di transdifferenziamento.



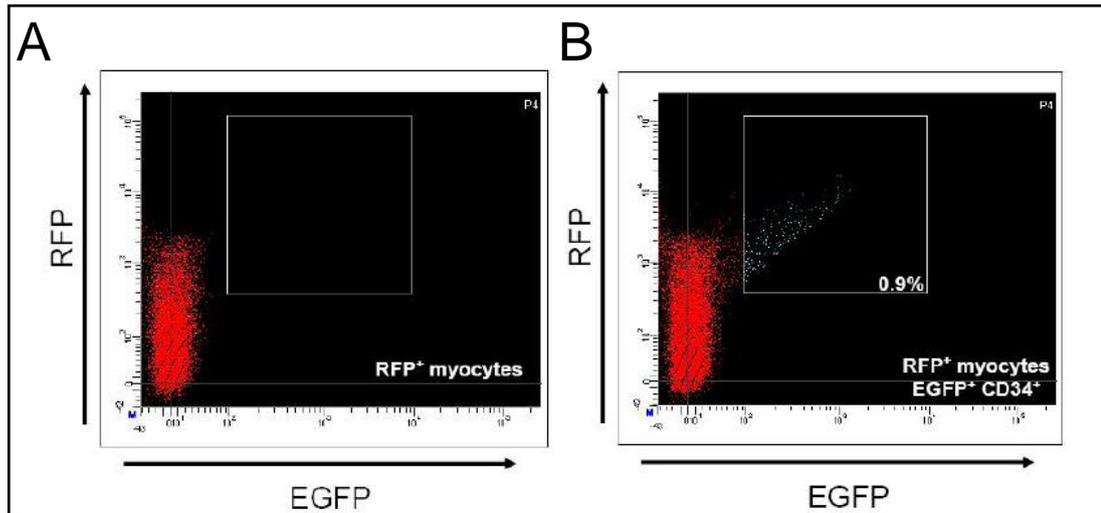
**Figura 24:** Immagini acquisite al microscopio a contrasto di fase della co-coltura di cellule CD34+/EGFP+ con miociti neonatali di ratto RFP+. La freccia indica una cellule che esprime sia il segnale di fluorescenza per la RFP che per la EGFP indicando l'avvenuto processo di fusione.

Questo risultato potrebbe essere anche provocato dalla sovrapposizione dei due segnali di fluorescenza e per cui abbiamo re-isolato enzimaticamente le cellule e le abbiamo piastrate a bassa densità. L'analisi di immunofluorescenza condotta sulle singole cellule re.isolate mostra che il 100% delle cellule EGFP+ positive presenta anche la fluorescenza per la RFP indicando la fusione tra questi due tipi cellulari (**figura 25**).

Questi risultati sono stati confermati da analisi di citofluorimetria, mostrati in **figura 26** che ha evidenziato la presenza di una sottopopolazione di cellule EGFP+/RFP+ che costituiscono lo 0,9% delle cellule totali.



**Figura25:** Immagini di immunofluorescenza acquisite al microscopio videoconfocale di una cellula re-isolata dopo sei giorni di co-coltura che esprime sia il segnale di fluorescenza per la EGFP che per la RFP. La presenza di entrambi i segnali di fluorescenza e di due nuclei indicano l'avvenuto processo di fusione e non di transdifferenziamento.



**Figura 26:** Analisi di citofluorimetria condotta dopo 6 giorni di co-cultura. I citogrammi mostrano sull'asse delle ascisse l'intensità di fluorescenza per la EGFP e sull'asse delle ordinate quella per la RFP. L'analisi è stata condotta solo sul feeder layer di miociti neonatali ventricolari di ratto RFP+ e sulle co-culture dopo 6 giorni.

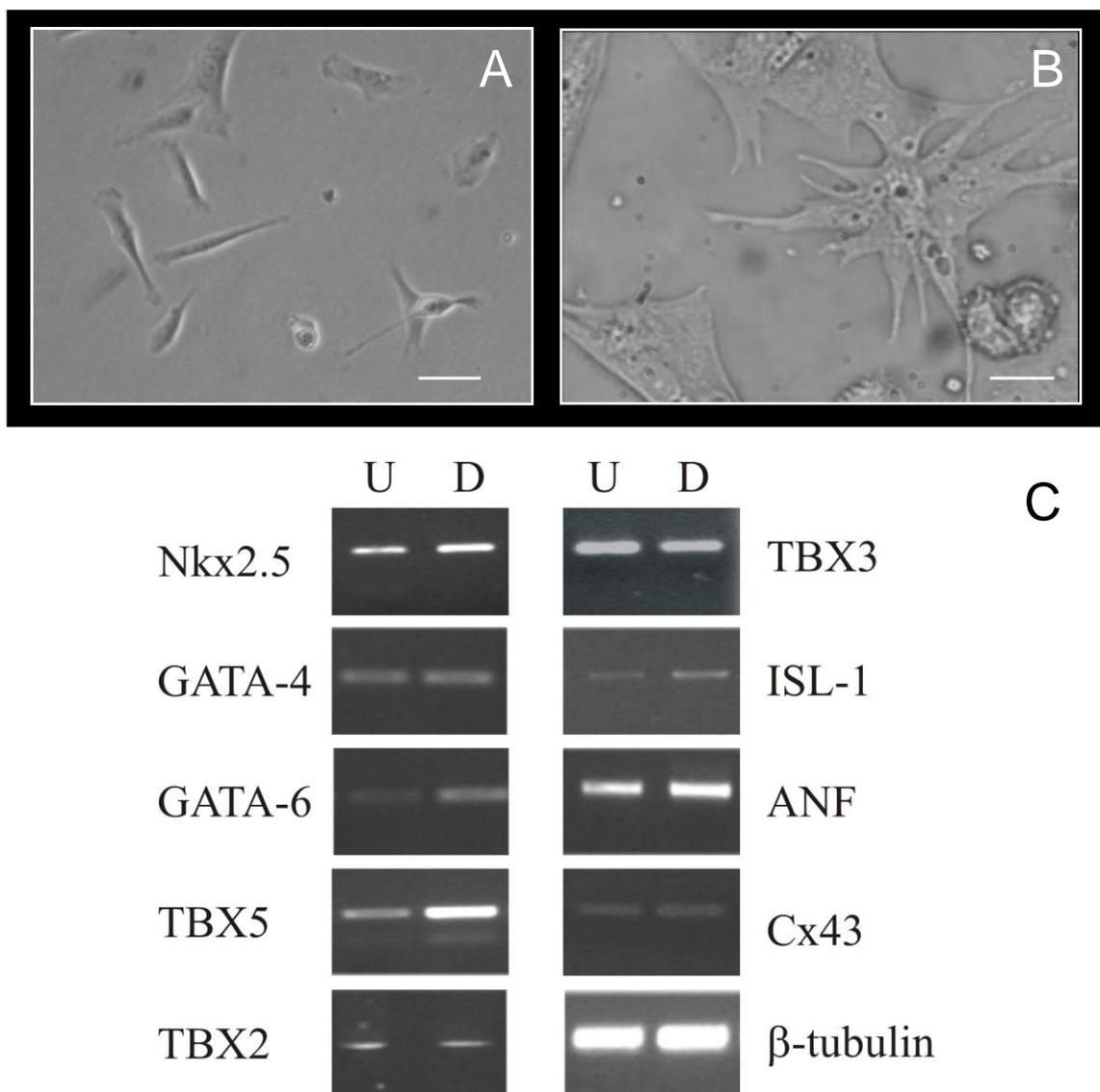
Dai risultati ottenuti possiamo concludere che le cellule staminali CD34+ in co-cultura con miociti ventricolari di ratto sono in grado di acquisire un fenotipo cardiaco esibendo caratteristiche tipiche dei miociti pacemaker. Abbiamo però dimostrato che non si tratta di un processo di transdifferenziamento ma un processo di fusione come dimostrato dalla presenza sia della proteina EGFP che RFP.

## MESOANGIOBLASTI

In un lavoro condotto in collaborazione con il gruppo del Prof. Cossu, il nostro laboratorio ha già precedentemente dimostrato che le MABs esprimono marcatori di cellule staminali e marcatori precoci cardiaci e che, *in vitro*, quando messi in co-cultura con miociti ventricolari neonatali oppure quando la concentrazione di siero nel medium di coltura viene abbassato dal 10% al 2%, sono in grado di acquisire un fenotipo cardiaco, (Galvez *et al.*, 2008). Dopo circa 5 giorni in coltura con terreno differenziativo abbiamo osservato che i mesoangioblasti cardiaci vanno incontro ad un cambiamento di morfologia che da allungata diventa irregolare, simile a quella di miociti ventricolari in coltura (**figura 27A e 27B**). Con una resa variabile da esperimento ad esperimento, abbiamo osservato che circa il 70-80% dei mesoangioblasti indotti a differenziare, era in grado di contrarsi spontaneamente e ritmicamente e, per queste caratteristiche, abbiamo chiamato questa sottopolazione di mesoangioblasti Mesoangioblast-derived Pacemaker Cells (MdPCs). Le nostre analisi sono state condotte principalmente sul clone

di cellule ventricolari J2 che ha mostrato maggior capacità di differenziare verso un fenotipo cardiaco ma abbiamo osservato caratteristiche pacemaker anche in altri due cloni, uno derivante dal ventricolo, J8, e l'altro di derivazione atriale, I4.

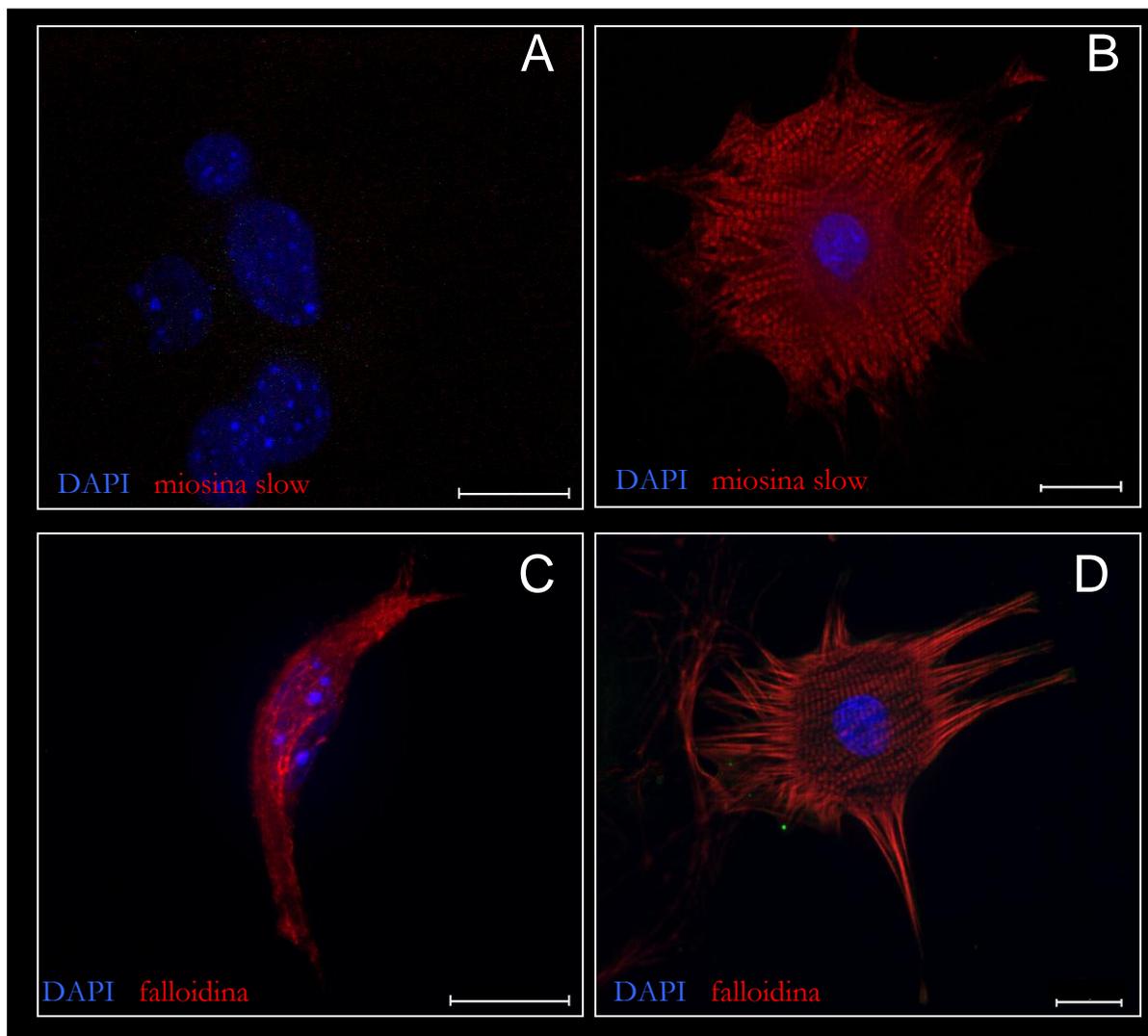
Analisi di RT-PCR, mostrata in **figura 27C** ha evidenziato che sia le cellule indifferenziate che differenziate spontaneamente esprimono marcatori cardiaci come Nkx2.5, GATA4, TBX5, Cx 43 e ANF e fattori trascrizionali noti per essere coinvolti nel programma genico che conduce allo sviluppo del nodo seno-atriale, come GATA 6 Isl-1, Tbx2 ed in modo particolare il Tbx3, quest'ultimo è un fattore di trascrizione che delinea in modo specifico lo sviluppo del nodo senoatriale e del tessuto di conduzione (Davis *et al.*, 2001; Adamo *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Moretti *et al.*, 2006; Christoffels *et al.*, 2004; Christoffels *et al.*, 2006 Mommersteeg *et al.*, 2007).



**Figura 27:** Immagini acquisite al microscopio a contrasto di fase di mesoangioblasti prima (A) e dopo (B) il differenziamento. Barra di calibrazione=20  $\mu$ m. In C è mostrata l'analisi di RT-PCR per marcatori cardiaci in cellule indifferenziate (U) e differenziate (D).

Attraverso analisi di immunofluorescenza siamo andati a verificare la presenza di proteine tipiche cardiache, tra cui actina e miosina, costituenti dell'apparato contrattile.

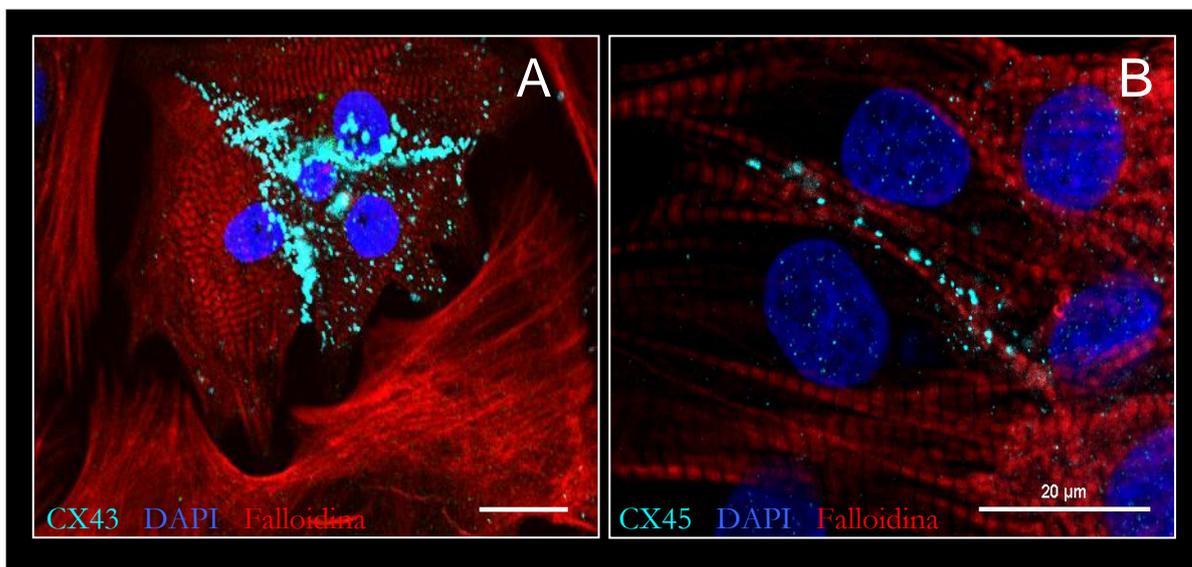
L'analisi di immunofluorescenza, mostrata in **figura 28A** e **28B**, rivela che la miosina risulta assente nelle cellule indifferenziate mentre in quelle differenziate è organizzata in strutture sarcomeriche. In **figura 28C** e **28D** è mostrata la marcatura per l'actina nelle cellule indifferenziate e differenziate che mostra che solo dopo il differenziamento l'actina si organizza a formare un citoscheletro organizzato.



**Figura 28:** Immagini di immunofluorescenza acquisite al microscopio videoconfocale di mesoangioblasti prima e dopo il differenziamento. In A e C marcatura delle cellule indifferenziate con miosina slow (A) e falloidina (C) entrambe in rosso che evidenziano la mancanza di un apparato contrattile ben organizzato. In B e D marcatura delle cellule differenziate con miosina slow (B) e falloidina (D), in entrambe si nota la striatura tipica delle strutture sarcomeriche delle cellule contrattili. In tutti i pannelli i nuclei sono evidenziati in blu con il DAPI. Barra di calibrazione=20  $\mu$ m.

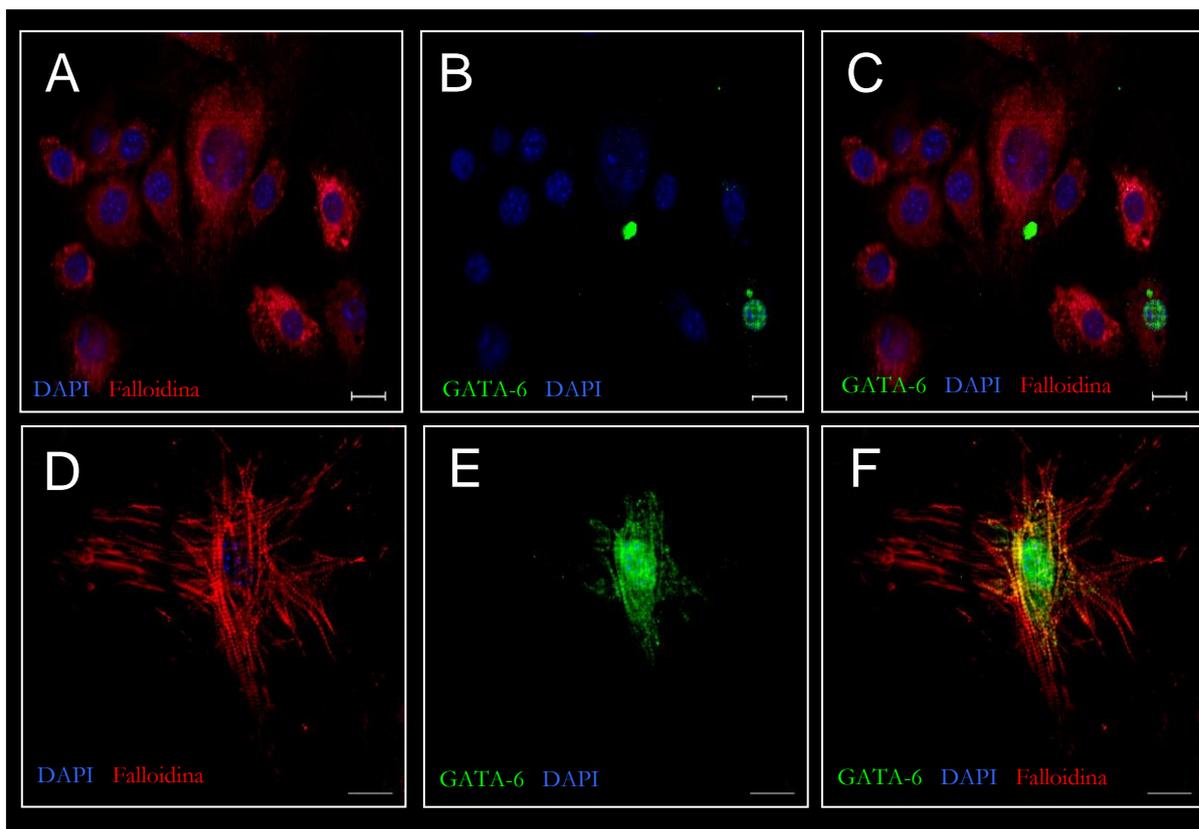
La propagazione dell'impulso elettrico nel cuore avviene grazie alla presenza di giunzioni comunicanti, le gap junction, costituite da proteine dette connesine che garantiscono l'accoppiamento elettrico tra i miociti rendendo il cuore un sincizio funzionale. Siamo andati a valutare l'espressione delle diverse isoforme di connesine nelle MdPCs ed, in particolare, della connessina 43 (Cx43) che è l'isoforma maggiormente espressa nel cuore e della connessina 45 (Cx45) che è l'isoforma più abbondante nel tessuto di conduzione ed in particolare nel nodo senoatriale (Dobrzynski e Boyett 2006; Boyett *et al.*, 2006; Verheule *et al.*, 2001; Van Veen *et al.* 2001).

L'analisi di immunofluorescenza ha mostrato che le cellule differenziate esprimono sia la Cx43 che la Cx45, e che la marcatura è particolarmente evidente nelle regioni di contatto tra cellule adiacenti (**figura 29A e 29B**, rispettivamente).



**Figura 29:** Immagini di immunofluorescenza acquisite al microscopio videoconfocale di mesoangioblasti differenziati marcati per la Cx 43 (in A) e Cx45 (in B) in azzurro. In entrambi i pannelli è mostrata la marcatura per la falloidina in rosso che mostra l'organizzazione del citoscheletrico in strutture sarcomeriche e per i nuclei, in blu, marcate con il DAPI. Barra di calibrazione=20 μm.

Per valutare la presenza di una sottopopolazione di Mesoangioblasti indirizzata a differenziarsi verso un fenotipo pacemaker siamo andati a valutare la presenza di GATA-6, un fattore trascrizionale attivato durante le prime fasi della cardiogenesi considerato un marker specifico del sistema di conduzione cardiaco (Davis *et al.*, 2001; Adamo *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005).



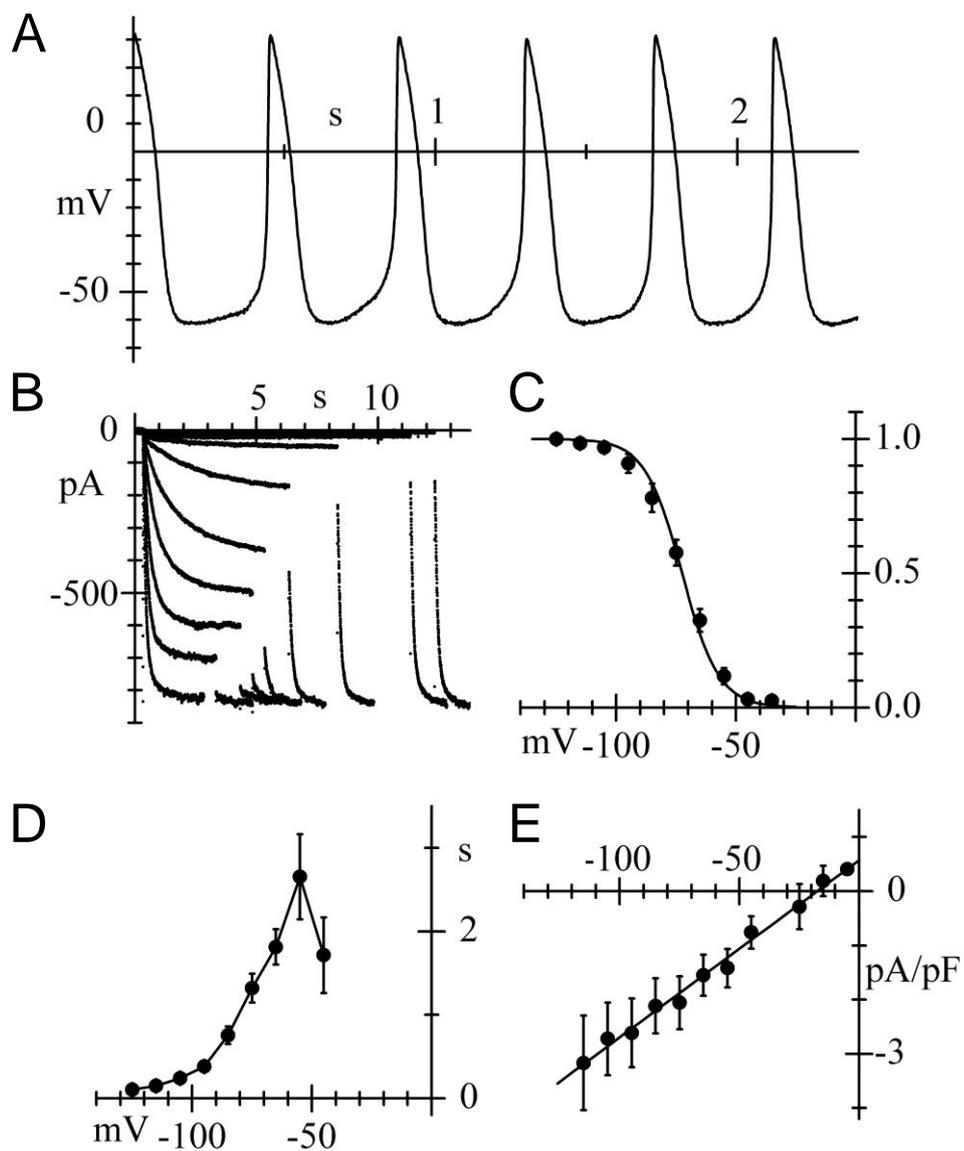
**Figura 30:** Marcatura per GATA-6 di mesoangioblasti differenziati e non. A, B, C: immunofluorescenza per GATA-6 (in verde, pannello B e C) e per falloidina (in rosso, pannello A e C) nei mesoangioblasti indifferenziati. D, E, F: le stesse immagini per i mesoangioblasti differenziati.

La **figura 30** mostra delle immagini acquisite al microscopio confocale in cui è evidenziata la marcatura per GATA-6 (verde) sia prima (A-C) che dopo il differenziamento (D-E); è possibile notare che una frazione di cellule esprime il GATA-6 già allo stato indifferenziato ( $28.2 \pm 10.2 \%$ ,  $n=4$ ) ed inoltre, in seguito al differenziamento, GATA-6 risulta espresso nelle cellule che presentano un apparato contrattile organizzato. Dopo il differenziamento abbiamo constatato che GATA-6 è espresso in una frazione delle cellule pari al  $30 \pm 4.1 \%$  ( $n=4$ ). L'espressione del GATA-6 in una sottopopolazione di mesoangioblasti è stata confermata attraverso la co-trasfezione delle cellule indifferenziate con il plasmide cGATA-6/GFP e un plasmide di controllo che esprime costitutivamente la proteina fluorescente DsRed per valutare l'efficienza di trasfezione. L'analisi al FACS ha mostrato che il 95,98% delle cellule totali esprime il plasmide di controllo, indicando un'alta efficienza di trasfezione, mentre le cellule che co-esprimono la DsRed e la GFP costituiscono il 27,3% di cellule totali, percentuale molto simile a quella riscontrata con gli esperimenti di immunofluorescenza. Inoltre, le cellule GFP-positive, mantenute in terreno differenziativo, sono in grado di contrarsi spontaneamente. Questi dati

supportano l'ipotesi che una sottopopolazione di mesoangioblasti cardiaci sia indirizzata al differenziamento verso il tessuto di conduzione pacemaker.

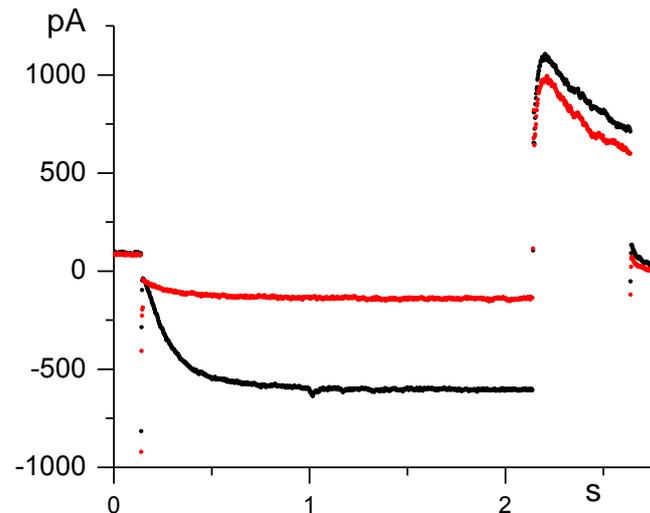
Per verificare il differenziamento verso il fenotipo cardiaco/pacemaker siamo andati a studiare le caratteristiche elettrofisiologiche di queste cellule. Abbiamo registrato potenziali d'azione spontanei con una tipica forma pacemaker-like, caratterizzati quindi dalla fase di depolarizzazione diastolica lenta, che conduce lentamente il potenziale di membrana fino alla soglia per iniziare il potenziale d'azione successivo (**figura 31A**). La corrente ionica principalmente coinvolta in questa fase è la corrente  $I_f$  o pacemaker (DiFrancesco *et al.*, 1986); per questo motivo siamo andati a studiare la presenza e le proprietà cinetiche di questa corrente. La corrente  $I_f$  è stata osservata nel 34% delle cellule differenziate (sia quiescenti che autoritmiche), percentuale che aumenta significativamente al 66% se si prendono in considerazione solo i mesoangioblasti che visivamente erano dotati di attività autoritmica ( $p < 0.01$  con Fisher exact test). Per studiare la voltaggio dipendenza della corrente  $I_f$  abbiamo utilizzato un protocollo che prevede l'applicazione, partendo da un potenziale di mantenimento di -35 mV, di gradini iperpolarizzanti nell'intervallo di potenziali compresi tra -45 e -125 mV ( $\Delta = -10$  mV) (**figura 31B**). Ogni potenziale veniva mantenuto per un tempo sufficientemente lungo da permettere alla corrente di raggiungere lo stato stazionario. Al termine di ogni gradino test è stato applicato un gradino di potenziale a -125 mV per 1.5 s per attivare completamente la corrente.

Dall'analisi delle correnti di coda a -125 mV sono state calcolate le curve di attivazione per ogni singola cellula e poi i valori sono stati mediati e messi in grafico (**figura 31C**). La curva di attivazione ottenuta mostra un potenziale di mezza attivazione ( $V_{1/2}$ ) di  $-72.5 \pm 2.1$  mV e un *inverse slope factor* di  $7.7 \pm 0.5$  mV. La curva delle medie delle costanti di tempo di attivazione (**figura 31D**) è stata ottenuta interpolando le tracce di corrente con una funzione mono-esponenziale, mostra una forte voltaggio dipendenza simile a quella della corrente pacemaker senoatriale con una costante di tempo media di attivazione a -85 mV di  $756 \pm 107$  ms ( $n=16$ ). La curva I/V a canale aperto risulta lineare nell'intervallo di potenziali compresi tra -115 e -15 mV con un potenziale di inversione stimato intorno ai -17.5 mV (**figura 31E**), in accordo con i dati precedenti ottenuti dalle registrazioni su miociti del nodo senoatriale (DiFrancesco *et al.*, 1986).



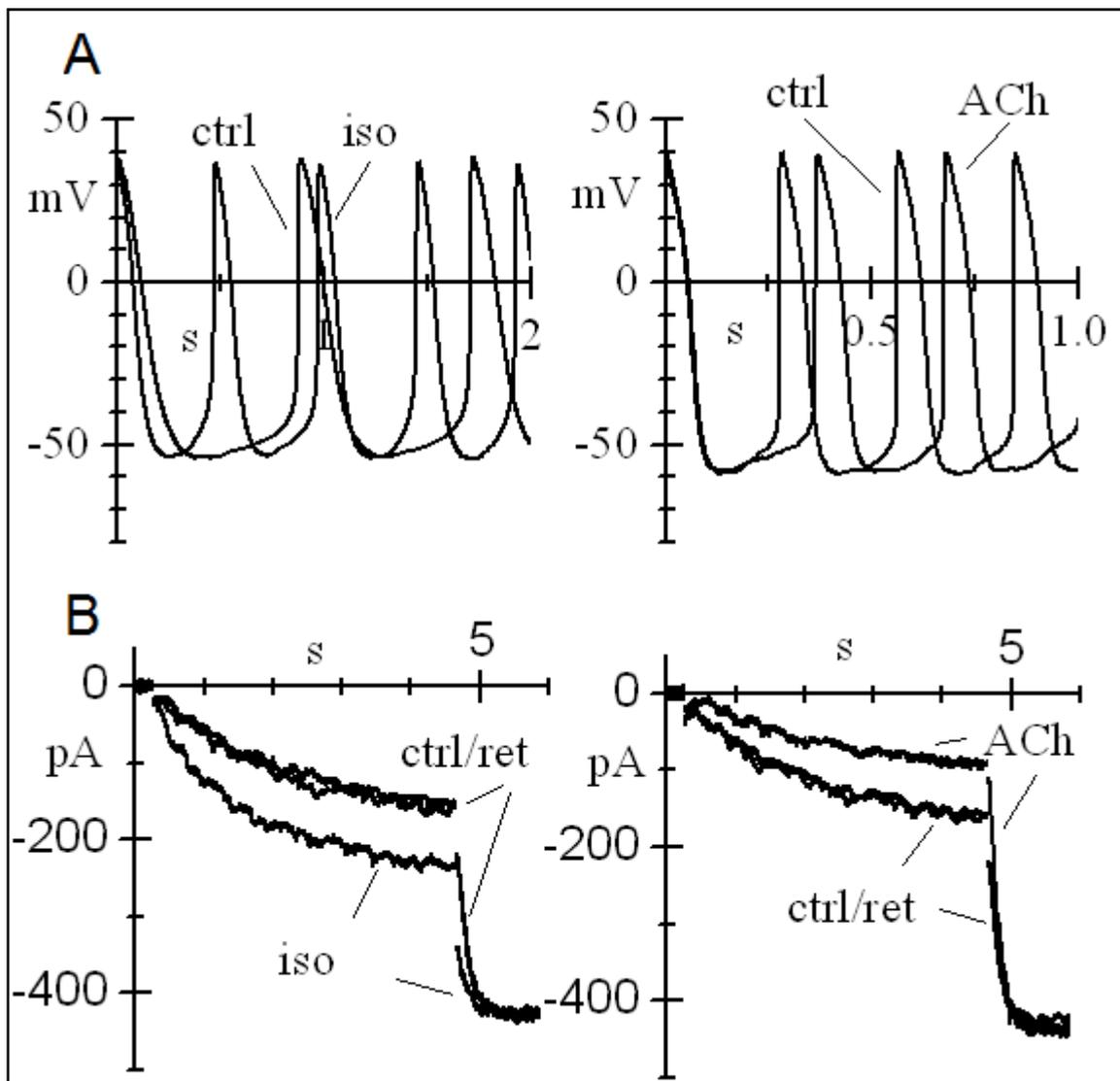
**Figura 31:** Analisi elettrofisiologiche condotte su mesoangioblasti differenziati. In A sono mostrati potenziali d'azione spontanei con la tipica fase di depolarizzazione diastolica lenta. In B sono mostrate le tracce di corrente  $I_f$  e, in C, la rispettiva curva di attivazione. In D la curva delle costanti di tempo di attivazione medie e in E la relazione corrente/voltaggio media a canale aperto della corrente  $I_f$ .

L'applicazione di cesio 5mM blocca la corrente a potenziali iperpolarizzati (DiFrancesco *et al.*, 1986; Moroni *et al.*, 2000). Il blocco è dipendente dal voltaggio e aumenta con l'iperpolarizzazione infatti si osserva a -55 mV un blocco del 53% mentre a -115 aumenta fino al 76% come mostrato per quest'ultimo potenziale in **figura 32**.



**Figura 32:** Effetto della perfusione di 5mM cesio (in rosso) sulla corrente  $I_f$  a -115 mV.

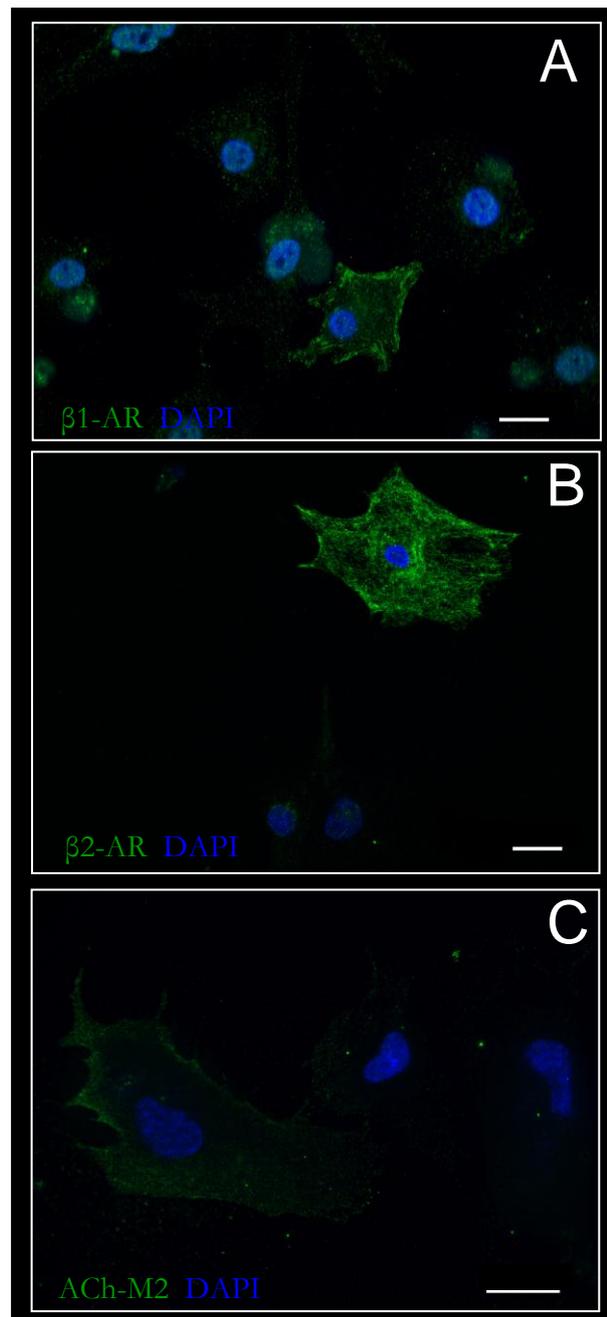
Una caratteristica importante delle cellule pacemaker è la modulabilità da parte del sistema nervoso centrale attraverso i neurotrasmettitori rilasciati dal sistema parasimpatico e simpatico che modificano la frequenza cardiaca tramite un meccanismo  $I_f$ -dipendente. Per questo motivo siamo andati a verificare la capacità dei mediatori autonomici isoproterenolo (agonista  $\beta$  adrenergico) e acetilcolina (agonista muscarinico) di modulare sia la frequenza dei potenziali d'azione, sia la corrente  $I_f$  nelle MdPCs. Abbiamo osservato che la perfusione con isoproterenolo (Iso) 1  $\mu$ M, noto agonista  $\beta$ -adrenergico, provoca un aumento della frequenza di scarica dei potenziali d'azione in media del  $32 \pm 8.2\%$  ( $n=7$ ) rispetto al controllo ed uno spostamento medio della curva di attivazione della  $I_f$  di  $6 \pm 0.5$  mV ( $n=6$ ). Al contrario la perfusione con l'agonista muscarinico acetilcolina (ACh) 0.1  $\mu$ M provoca un rallentamento della frequenza del  $7.3 \pm 2\%$  ( $n=4$ ) ed uno spostamento medio della curva di attivazione di  $-4.4 \pm 0.2$  mV ( $n=5$ ).



**Figura 33:** Regolazione da parte dei mediatori autonomici isoproterenolo e acetilcolina. In A è mostrato l'effetto dei mediatori autonomici sulla frequenza di scarica dei potenziali d'azione ed in B effetto sull'ampiezza di corrente.

La **figura 33A** mostra l'incremento e la riduzione di frequenza dei potenziali d'azione causati rispettivamente da isoproterenolo e acetilcolina. In entrambi i casi, il cambiamento nella frequenza di scarica dei potenziali d'azione, causato rispettivamente da un aumento ed una diminuzione della pendenza della fase di depolarizzazione diastolica lenta era statisticamente significativo ( $P < 0.05$ ). In **figura 33B** è mostrato lo shift indotto dai mediatori autonomici della corrente  $I_f$ . Questi dati dimostrano che le cellule autoritmiche derivate dai mesoangioblasti possono essere modulate dagli agonisti autonomici e quindi possiedono il pathway di trasduzione necessario per la modulazione fisiologica del cuore.

Nei miociti senoatriali, la regolazione da parte degli agonisti autonomici isoproterenolo ed acetilcolina avviene attraverso la stimolazione dei recettori di membrana  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-adrenergici e M2-muscarinici rispettivamente. La presenza dei recettori adrenergici e muscarinici è stata anche dimostrata attraverso analisi di immunofluorescenza (**figura 34**).



**Figura 34:** Analisi di immunofluorescenza per verificare la presenza dei recettori adrenergici e muscarinici, in verde, nei mesoangioblasti differenziati. In tutte le immagini i nuclei sono marcati in blu con il DAPI. Barra di calibrazione=20  $\mu$ m.

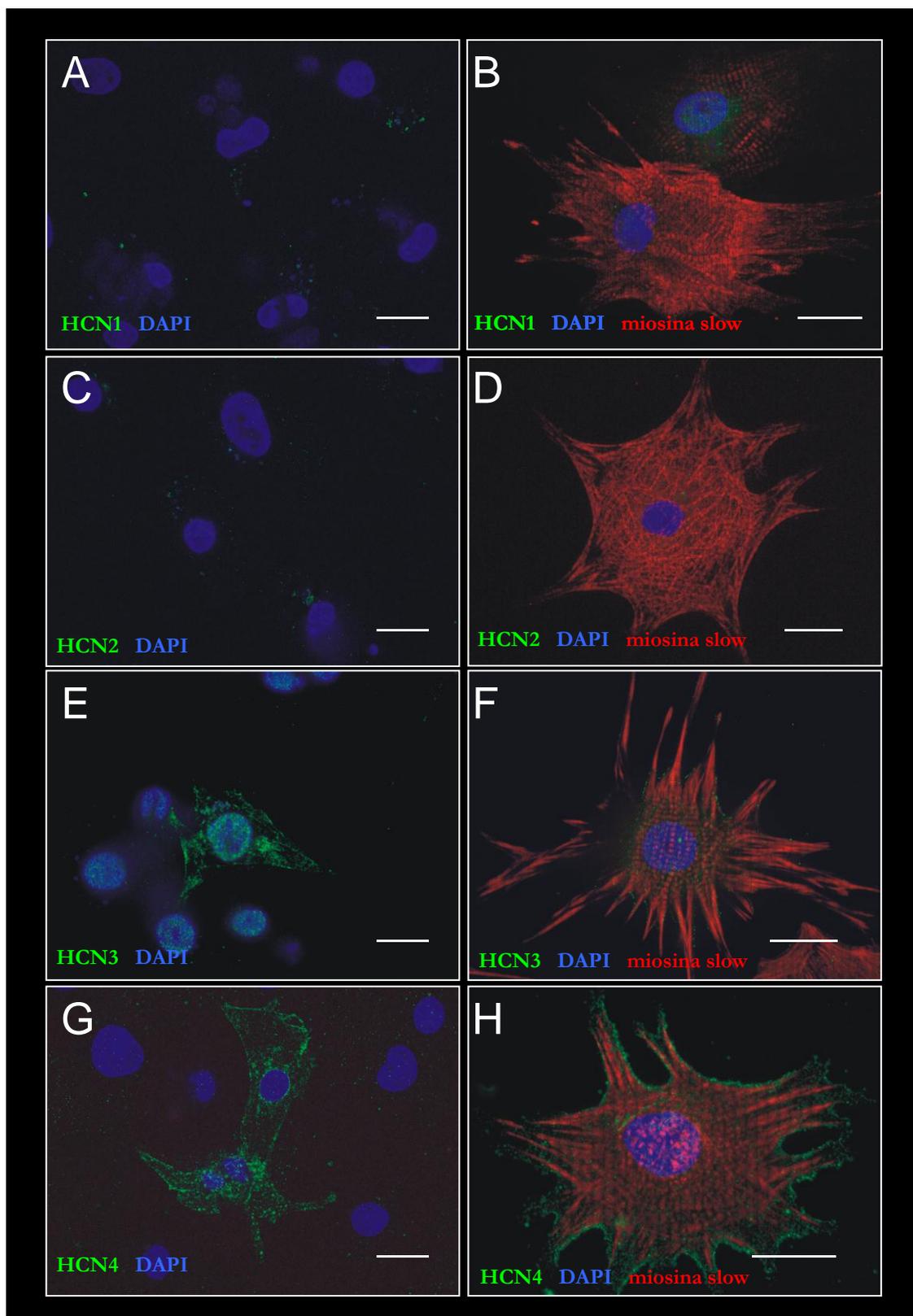
Questi dati dimostrano che le MdPCs presentano un apparato citoscheletrico organizzato in sarcomeri, mostrano attività elettrica spontanea e corrente  $I_f$ . Infine presentano l'apparato di trasduzione del segnale necessario per la modulazione fisiologica del ritmo da parte degli agonisti autonomici.

Data la presenza della corrente pacemaker con caratteristiche cinetiche simili alla corrente nativa del NSA siamo andati a verificare l'espressione dei costituenti molecolari della corrente  $I_f$  cioè i canali HCN. È noto che tutte e quattro le isoforme degli HCN sono presenti nel cuore anche se con una diversa distribuzione; abbiamo quindi effettuato analisi di immunofluorescenza con anticorpi diretti contro tutte le isoforme.

La marcatura per le isoforme HCN1 e HCN2 (**Figura 35A-D**), che nel cuore sono normalmente espresse rispettivamente nel sistema di conduzione anche se a bassi livelli e nel ventricolo, non sono state individuate in alcuna cellula. Alcuni mesoangioblasti hanno mostrato un debole segnale per HCN3 (**figura 35 E-F**) isoforma che in letteratura è stata dimostrata essere presente nelle cellule ventricolari di topo ma non di altre specie (Mistrik *et al.*, 2005). Un segnale molto più forte è stato invece individuato per l'isoforma HCN4 (**figura 35 G-H**) identificato in 39 cellule su 142 analizzate: questo dato è rilevante alla luce del fatto che HCN4 è la principale isoforma espressa a livello del nodo seno-atriale (Shi *et al.*, 1999). Durante le analisi di immunofluorescenza, la marcatura per i canali HCN è stata condotta parallelamente a quella per actina e miosina ed evidenziare così la presenza in queste cellule di tutti gli elementi necessari per un'attività ritmica spontanea.

La marcatura per le isoforme dei canali pacemaker è stata rilevata soltanto nei mesoangioblasti che presentano un apparato contrattile organizzato; non abbiamo mai rilevato l'espressione dei canali HCN nelle cellule indifferenziate (dati non mostrati).

Questi dati indicano chiaramente che l'isoforma dei canali pacemaker maggiormente espressa nei mesoangioblasti differenziati è HCN4 che è anche la principale isoforma presente nei tessuti pacemaker delle varie specie (Shi *et al.*, 1999; Marionneau *et al.*, 2005), e viene considerato un marker del differenziamento verso il fenotipo senoatriale (Mommersteeg *et al.*, 2007; Garcia-Frigola *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Boyett *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2006).

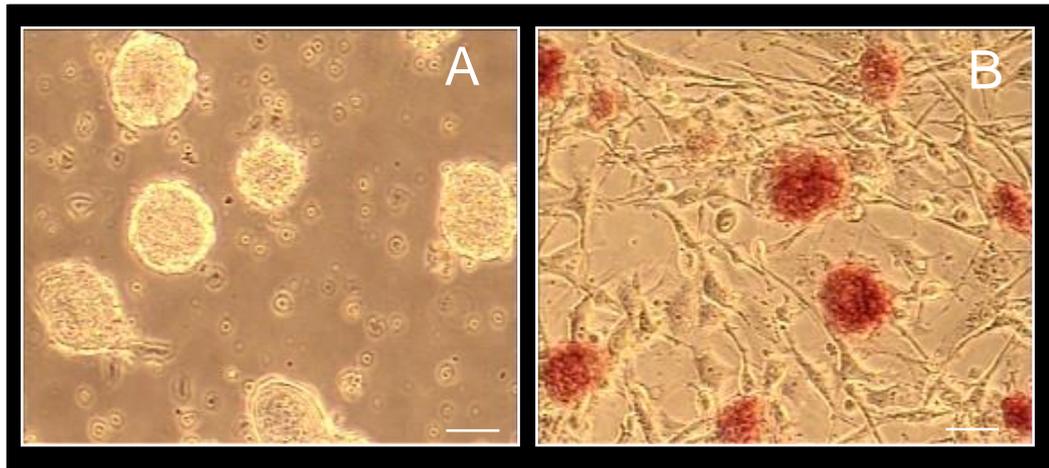


**Figura 35:** Immagini di immunofluorescenza di cellule differenziate, acquisite al microscopio confocale, delle isoforme HCN1, HCN2, HCN3 e HCN4 in verde, della miosina in rosso e dei nuclei in blu. Barra di calibrazione =20  $\mu\text{m}$ .

## CELLULE STAMINALI SPERMATOGONIALI (SSCs) O CELLULE STAMINALI GERMNALI (GSCs)

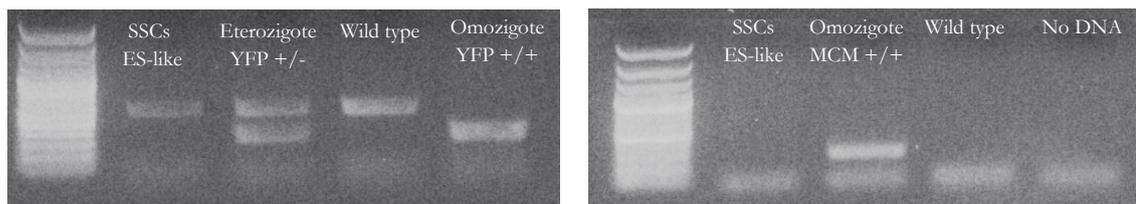
Recentemente diversi lavori hanno dimostrato che le cellule staminali germinali in particolari condizioni di coltura possono acquisire le stesse caratteristiche delle cellule staminali pluripotenti (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004, Guan *et al.*, 2006; Seandel *et al.*, 2007, Ko *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2010). Al momento però non esiste un protocollo standard ed ogni gruppo di ricerca utilizza diverse tecniche di isolamento. Il nostro obiettivo è quindi quello di riuscire ad isolare cellule staminali germinali e successivamente convertirle in cellule pluripotenti.

Il primo protocollo di coltura che abbiamo preso in esame e descritto in materiali e metodi (protocollo A) prevede l'utilizzo di topi adulti wild-type, di età compresa tra 5 settimane e 5 mesi. I testicoli sono stati dissociati enzimaticamente e meccanicamente in modo da ottenere una sospensione di cellule singole. Le cellule ottenute sono state piastrate per i primi 4 giorni in capsule Petri precedentemente trattate con gelatina 0,1% (w/v) in un terreno di coltura, chiamato Expansion Medium, contenente i fattori di crescita GDNF, LIF, bFGF e hEGF, dimostrati essere importanti per la proliferazione delle cellule staminali spermatogoniali (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003). In seguito, il quarto giorno di coltura le cellule venivano staccate e piastrate su un feeder layer di fibroblasti embrionali murini immortalizzati (STO) per uno o due passaggi. Da questo momento in poi veniva utilizzato un diverso terreno di mantenimento, specifico per la coltura di cellule staminali embrionali, contenente il siero sintetico Knockout Serum Replacement (KO-SR), ottimizzato per la crescita ed il mantenimento delle cellule staminali embrionali (ESCs) allo stato indifferenziato (Chaudhry *et al.*, 2008), che sostituisce il siero fetale bovino (FBS). Nel terreno di mantenimento utilizzato sono contenute le citochine GDNF e LIF. Infine, le cellule venivano passate su piastre non trattate fino alla comparsa di colonie tondeggianti, con margini regolari e morfologia simile alle colonie di cellule staminali embrionali, e per questo chiamate ES-like (**figura 36A**). Per la caratterizzazione delle cellule SSC ES-like ottenute abbiamo effettuato una colorazione per la fosfatasi alcalina, in quanto questo enzima è riconosciuto essere un marcatore di membrana delle cellule pluripotenti. Infatti, nonostante la fosfatasi alcalina sia espressa da diversi tipi cellulari, è noto che i suoi livelli di espressione siano particolarmente alti nelle cellule staminali embrionali, e che l'attività di questo enzima decresca in modo proporzionale al differenziamento cellulare (Kumar *et al.*, 2008). In seguito alla marcatura, le colonie di SSC ES-like da noi ottenute assumevano la tipica colorazione rossa, indicando la presenza diffusa dell'enzima (**figura 36B**).



**Figura 36:** Immagini acquisite al microscopio a contrasto di fase di colonie di cellule SSC ES-like in A. In B colorazione per la fosfatasi alcalina in rosso su colonie SSC ES-like cresciute su un feeder layer di fibroblasti embrionali immortalizzati (STO). Barra di calibrazione=50  $\mu$ m.

Per confermare ulteriormente la pluripotenza di queste colonie, abbiamo utilizzato il protocollo di differenziamento delle *hanging drops*, che conduce alla formazione di aggregati cellulari compatti chiamati *Embryoid Bodies* (EBs), che ricapitolano i primi stadi di sviluppo di un embrione. Le cellule da noi ottenute erano in grado di formare EBs contenenti cellule derivate da tutti e 3 i foglietti embrionali, dimostrando quindi la pluripotenza delle cellule di partenza (dati non mostrati). Dati pubblicati in letteratura mostravano che la generazione di cellule pluripotenti da testicoli di topi adulti ha un'efficienza piuttosto bassa, di circa il 27% (Guan *et al.*, 2006). Nelle nostre condizioni sperimentali la resa era significativamente maggiore, (>80%), facendoci dubitare della correttezza dei risultati raggiunti. Abbiamo quindi voluto verificare questi dati applicando il protocollo di isolamento e di derivazione di cellule SSC ES-like da noi adottato, utilizzando diverse linee di topi transgenici. Le colonie di cellule SSC ES-like derivate da topi transgenici sono state analizzate mediante un saggio di PCR, indirizzato ad individuare la presenza del transgene corrispondente. In **figura 37** è mostrato il risultato di una PCR condotta su cellule SSC ES-like ottenute da topi in cui sono stati inseriti i transgeni YFP e MerCreMer, che ha evidenziato l'assenza del transgene nel genoma di queste cellule.



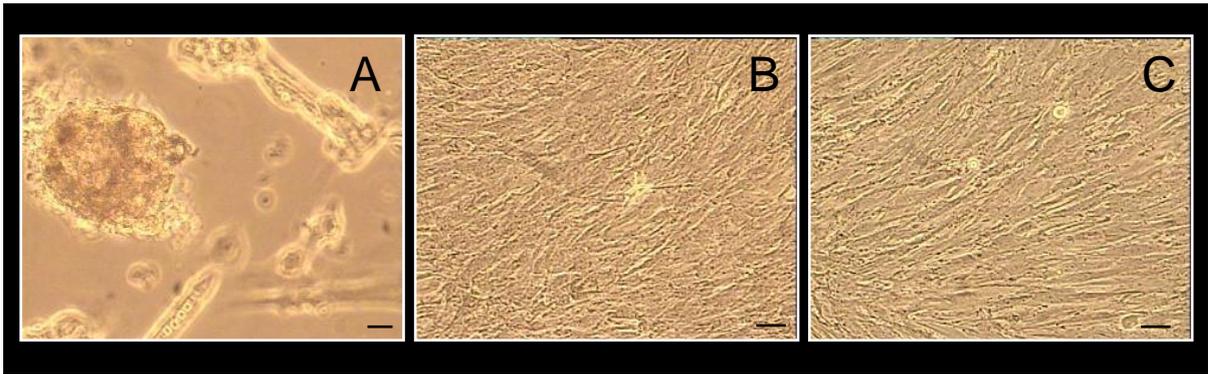
**Figura 37:** Risultato dell'analisi di PCR di un campione di cellule SSC ES-like derivanti da un topo transgenico per la YFP e MerCreMer (MCM) per verificare la presenza dei transgeni ed i rispettivi controlli. Come mostrato dal gel, il campione cellulare preso in esame non esprime né il gene YFP né il gene MCM e presenta un genotipo wild type.

Queste evidenze ci hanno portato a credere che le cellule pluripotenti da noi ottenute derivassero da una “riprogrammazione” delle cellule STO su cui le cellule testicolari venivano coltivate, mediante un meccanismo che non abbiamo al momento investigato. Il protocollo di isolamento da noi fino a questo momento utilizzato è stato perciò modificato ed abbiamo cominciato a testarne di diversi in modo da riuscire a trovare il più adatto. Siamo partiti mettendo a confronto 3 protocolli differenti, derivati da metodi precedentemente pubblicati in letteratura (Guan *et al.*, 2006; Seandel *et al.*, 2007), simili a quello che ci aveva permesso di ottenere delle colonie di SSC ES-like. Abbiamo nominato i diversi protocolli di coltura come condizione B, C e D (**Tabella 11**). A causa dei problemi precedentemente riscontrati, in tutti e 3 i protocolli abbiamo evitato l'utilizzo di un feeder layer di fibroblasti murini immortalizzati.

	<b>Giorno 0</b>	<b>Giorno 4</b>	<b>Giorno 18</b>
<b>Condizione B</b>	Expansion Medium + GDNF, LIF, bFGF, hEGF	Medium KOSR +GDNF, LIF	Medium KOSR + GDNF, LIF
<b>Condizione C</b>	Expansion Medium + GDNF	Basic Medium	Basic Medium + LIF
<b>Condizione D</b>	Expansion Medium + GDNF, LIF	Basic Medium + GDNF, LIF	Basic Medium + GDNF, LIF

**Tabella 11:** Medium e citochine utilizzate nelle condizioni di coltura B, C e D.

Con il protocollo B, simile a quello precedentemente adottato con l'eccezione della mancanza del feeder layer di STO, abbiamo ottenuto aggregati cellulari di forma sferica e di dimensione variabile che si riformavano in seguito ad ogni passaggio (**figura 38A**). Per i protocolli C e D abbiamo utilizzato gli stessi terreni di coltura, ma abbiamo provato a modificare il momento in cui venivano aggiunte le citochine GDNF e LIF. Abbiamo notato che le cellule mantenute nella condizione C (**figura 38B**) e D (**figura 38C**) non presentavano differenze morfologiche tra loro: in entrambi i casi le cellule, che continuavano a proliferare per un lungo periodo di tempo, erano caratterizzate da una morfologia allungata e formavano un monostrato. Questa morfologia e modalità di crescita è tipica delle cellule di Sertoli in coltura (Koruji *et al.*, 2009) e non delle SSCs di nostro interesse.

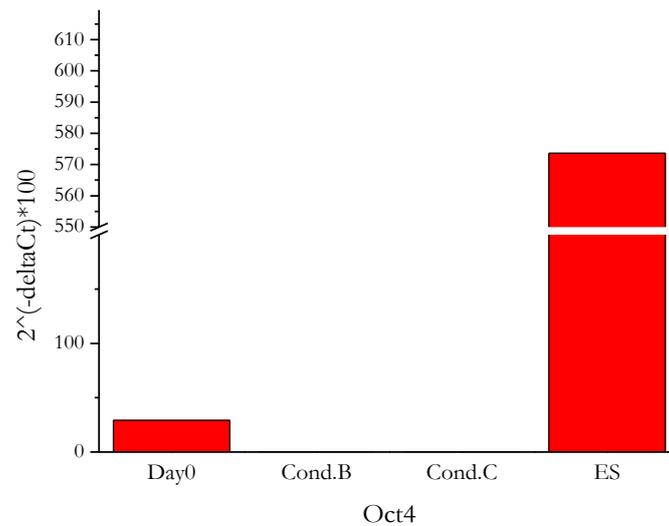


**Figura 38:** Immagini acquisite al microscopio ottico a contrasto di fase. In A aggregati cellulari ottenuti nella condizione B al 16° giorno di coltura. In B e C, 16° giorno di coltura rispettivamente nella condizione C e D. Barra di calibrazione=50  $\mu$ m.

Per verificare la presenza in coltura di cellule staminali germinali abbiamo condotto un'analisi di PCR quantitativa, al fine di verificare l'espressione del gene Oct4 nei campioni derivanti dai diversi protocolli di coltura. Oct4 è noto essere un gene necessario per l'induzione ed il mantenimento della pluripotenza, ma è stato anche ampiamente dimostrato essere espresso ad alti livelli dalle cellule staminali germinali, che daranno poi origine alle cellule pluripotenti (Kehler *et al.*, 2004; Dann *et al.*, 2008). L'analisi di Real-Time RT-PCR (mostrata in **figura 39**) è stata condotta su:

- 1) Cellule al giorno 0, cioè la sospensione cellulare ottenuta immediatamente dopo la dissociazione enzimatica dei tubuli seminiferi che quindi contiene le cellule germinali di nostro interesse ma anche cellule differenziate, tra cui cellule somatiche e spermatidi a vari stadi di maturazione;
- 2) Cellule ottenute con il protocollo di coltura B dopo 12 giorni;
- 3) Cellule ottenute con il protocollo di coltura C. Dato che non abbiamo notato differenze tra la condizione C e D, abbiamo scelto di utilizzare solo il campione ottenuto con il protocollo C.
- 4) Cellule staminali embrionali utilizzate come controllo positivo, che esprimono elevati livelli di Oct4.

I livelli di espressione di Oct4 sono stati normalizzati sui livelli di espressione del gene housekeeping HPRT, ipoxantina fosforibosil transferasi, un enzima importante nel metabolismo delle purine, costitutivamente e stabilmente espresso in tutti i tipi cellulari.

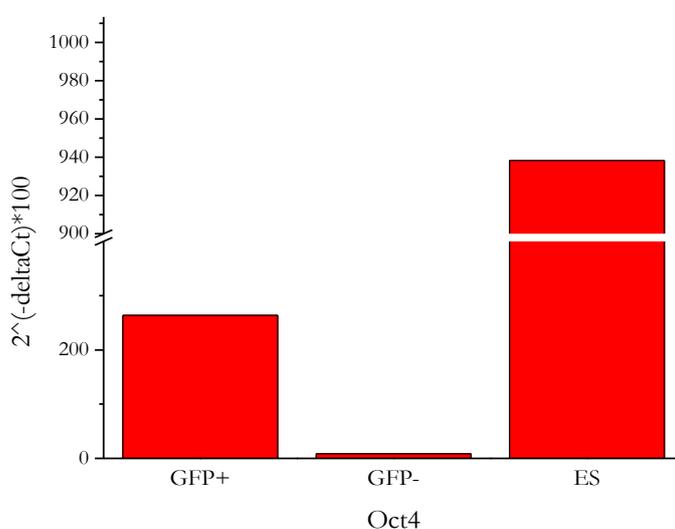


**Figura 39:** Istogramma rappresentante i livelli di espressione del gene Oct4 normalizzato sul gene housekeeping HPRT. I valori sono espressi come  $2^{(-\Delta Ct)}100$  nei seguenti campioni: cellule al giorno 0, cellule ottenute seguendo la condizione B, cellule ottenute con il protocollo C e cellule staminali embrionali (ES).

L'analisi di PCR quantitativa ha mostrato la presenza al giorno 0 di un basso livello di espressione di Oct4, indice della presenza di una piccola popolazione di cellule staminali germinali all'interno dei tubuli seminiferi. Questo risultato è pienamente in accordo con quanto riportato in letteratura, in quanto è stato dimostrato che le cellule staminali germinali costituiscono solo lo 0,02-0,03% delle cellule totali (Kubota *et al.*, 2003). Al contrario, né le cellule ottenute nella condizione B né quelle nella condizione C esprimono livelli rilevabili di Oct4 e possiamo quindi affermare che questi protocolli non costituiscono le condizioni di coltura adatte per la proliferazione delle cellule staminali germinali di nostro interesse.

Recentemente, cellule spermatogoniali pluripotenti sono state generate da topi transgenici, in cui il gene reporter GFP è sotto il controllo trascrizionale del gene Oct4, modificando il protocollo precedentemente utilizzato dal gruppo di Kanatsu-Shinohara per l'isolamento di cellule germinali da testicoli di topi neonatali (Ko *et al.*, 2009). Sulla base di questi risultati ed in seguito alla pubblicazione del protocollo dettagliato di isolamento (Ko *et al.*, 2010), abbiamo deciso di utilizzare le stesse condizioni sperimentali e gli stessi animali transgenici. Il protocollo che abbiamo deciso di prendere in esame, protocollo E, prevede l'utilizzo di un terreno di coltura, Germline Stem Cell Medium (GSC Medium), addizionato con i fattori di crescita GDNF, LIF, bFGF e hEGF, contenente una quantità di siero (FBS) molto basso, di solo l'1%, in quanto l'alta percentuale di FBS potrebbe favorire la proliferazione delle cellule somatiche e, di conseguenza, ostacolare la crescita delle cellule germinali di nostro interesse. Inoltre, abbiamo utilizzato un

feeder layer di fibroblasti embrionali murini (MEF), in quanto secernono importanti fattori che favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule staminali spermatogoniali (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005). L'espressione della proteina fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) guidata dal gene Oct4 (il quale, all'interno dei testicoli di topi adulti, è espresso solo dalle cellule staminali spermatogoniali) ci ha permesso di isolare la popolazione di cellule staminali di interesse tramite Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). La prima analisi condotta è stata quella di real time PCR su cellule GFP+ e GFP- separate attraverso l'utilizzo del citofluorimetro per verificare i livelli di espressione di Oct4. Il risultato di questa analisi, mostrato in **figura 40**, rivela che le cellule GFP+ presentano livelli significativi di Oct4 a differenza delle cellule GFP-.

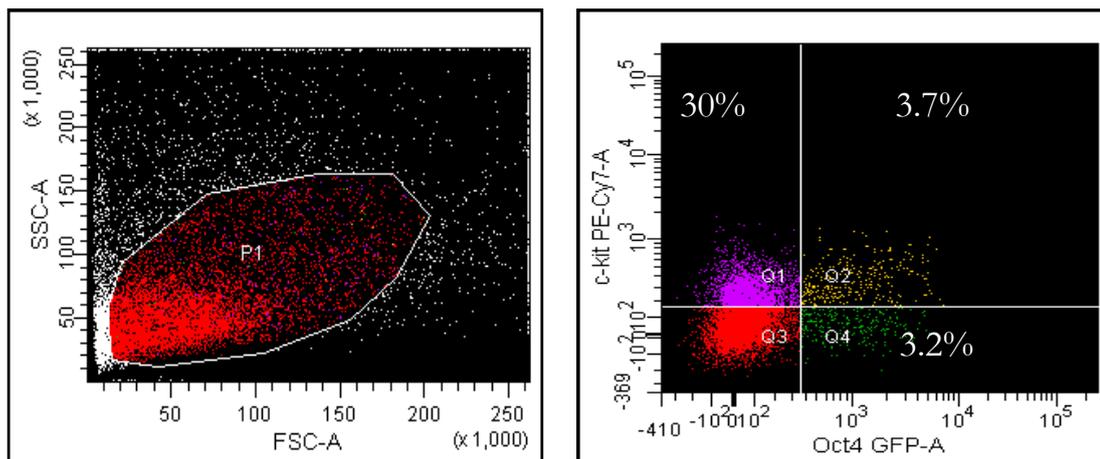


**Figura 40:** Istogramma rappresentante i livelli di espressione del gene Oct4, normalizzato sul gene housekeeping HPRT, in cellule GFP+ e GFP- separate al citofluorimetro e in cellule staminali embrionali (ES).

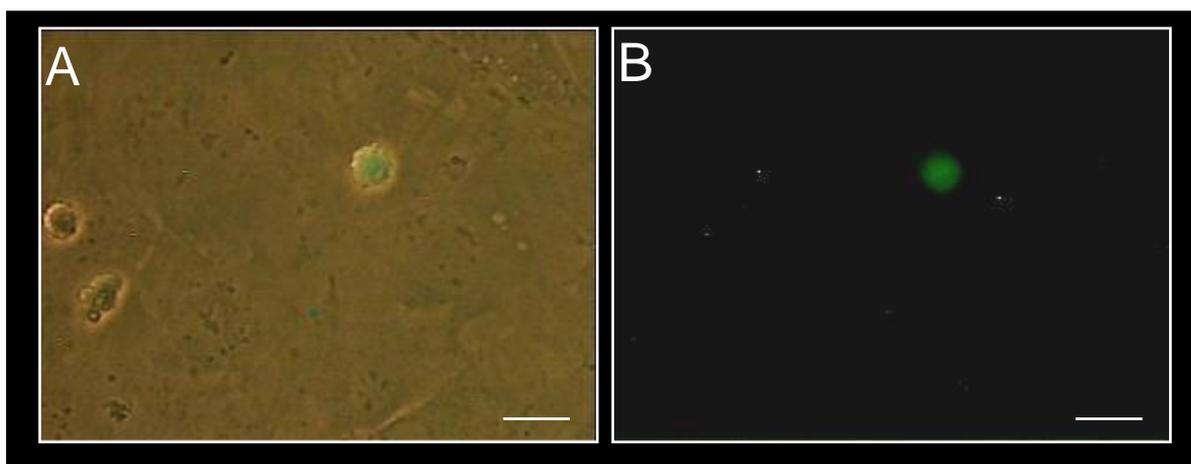
Per arricchire ulteriormente la popolazione di GSC abbiamo utilizzato un altro marcatore, il recettore tirosina chinasi c-kit, che è presente sulla superficie delle cellule testicolari in differenziamento (Schrans-Stassen *et al.*, 1999). Le cellule staminali di nostro interesse sono quindi caratterizzate dall'espressione della GFP ma non di c-kit, cioè sono GFP<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>. Dopo aver selezionato la popolazione cellulare P1 sulla base del Forward Scatter, correlato alle dimensioni e alla forma delle cellule, e del Side Scatter, che varia a seconda della complessità delle cellule (**figura 41**), abbiamo individuato 4 diverse sottopopolazioni:

- Q1, non presenta fluorescenza per la GFP ma esprime il recettore c-kit, cioè GFP<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>;
- Q2, positiva sia per GFP sia per c-kit, GFP<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>;
- Q3, non esprime né la GFP né c-kit, GFP<sup>-</sup>/c-kit<sup>-</sup>;
- Q4, esprime la GFP ma non c-kit, GFP<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>.

L'analisi al FACS mostra quindi la presenza di una popolazione di cellule GFP positiva corrispondente al 5,9% circa delle cellule analizzate, che può a sua volta essere distinta per la presenza o meno dell'antigene di superficie c-kit. Le cellule staminali di nostro interesse GFP<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>, appartenenti alla popolazione Q4 e risultate essere il 3,2% del totale, sono state separate tramite sorting e seminate in pozzetti di una multiwell da 24 contenenti un feeder layer di MEF inattivati con mitomicina C (**figura 42**).

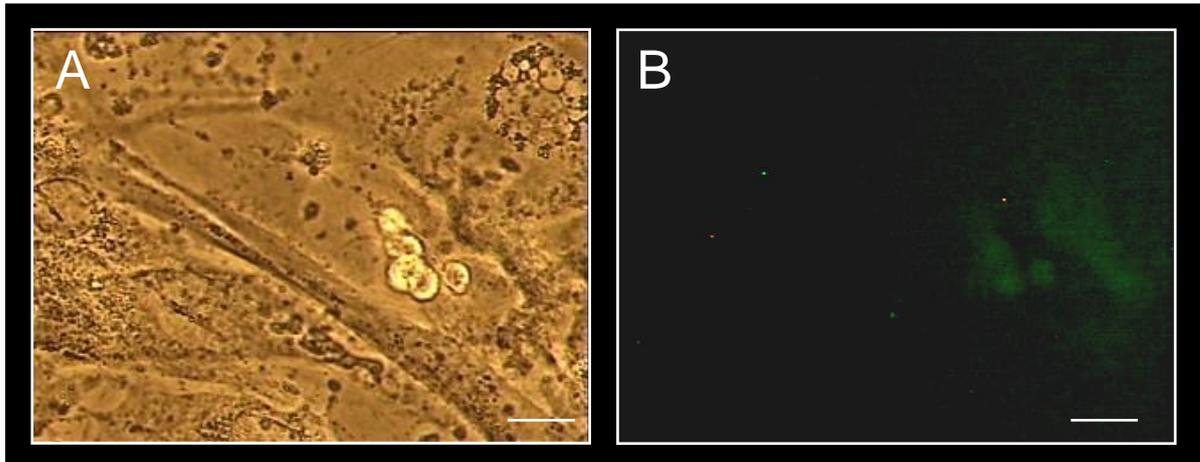


**Figura 41:** Analisi al citofluorimetro della sospensione cellulare ottenuta in seguito a dissociazione dei tubuli seminiferi di un topo Oct4-GFP. Il cistogramma in A mostra la dispersione delle cellule ottenute in base alle loro caratteristiche di Forward Scatter (in ascissa) e Side Scatter (in ordinata). L'area circoscritta e denominata P1 rappresenta la popolazione analizzata. In B è mostrato un dot-plot che riporta l'analisi di fluorescenza per la GFP (in ascissa) rispetto a quella per c-kit (in ordinata). È possibile osservare le quattro popolazioni e le rispettive percentuali.



**Figura 42:** Immagini acquisite al microscopio ottico di cellule GFP<sup>+</sup>/c-kit isolate tramite FACS. In A visualizzazione in luce ed in fluorescenza ed in B visualizzazione in fluorescenza della stessa cellula. Barra di calibrazione=20  $\mu$ m.

Dopo 7 giorni in coltura, gruppi di cellule tondeggianti esprimenti GFP erano ancora osservabili sul feeder layer di MEF, indicando che le cellule separate al FACS sono in grado di sopravvivere (**Figura 43**).



**Figura 43:** Immagini acquisite al microscopio ottico a fluorescenza di cellule al 7° giorno di coltura dopo il sorting. A) Visualizzazione in luce; B) Visualizzazione in fluorescenza. Barra di calibrazione=20 µm.

Nonostante questi risultati siano preliminari, essi indicano che il protocollo E potrebbe essere il più idoneo per l'isolamento delle cellule staminali spermatogoniali. È necessario però perfezionare questo protocollo per favorire la proliferazione delle cellule isolate al FACS e permettere la loro “trasformazione” in cellule pluripotenti.

## DISCUSSIONE

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate con capacità di long-term-self-renewal, ovvero in grado di replicarsi per lunghi periodi di tempo mantenendo lo stato indifferenziato. In presenza di particolari stimoli intracellulari o extracellulari possono dare origine a uno o più tipi di cellule specializzate (Fuchs *et al.*, 2004). Proprio per queste caratteristiche, le cellule staminali sono da anni oggetto di studio per un potenziale impiego in campo clinico, infatti potrebbero essere utilizzate per riparare o sostituire i tessuti danneggiati. Particolare interesse è quindi rivolto per la cura di patologie al cui al momento non esistono terapie efficaci, ad esempio la cura di malattie cardiache che rappresentano uno dei maggiori problemi sanitari a livello mondiale e costituiscono la prima causa di morte nella popolazione dei paesi occidentali.

Tra le malattie cardiovascolari, quella che si manifesta con maggiore incidenza è l'infarto del miocardio che costituisce la manifestazione più grave dell'ischemia cardiaca. In seguito ad un evento ischemico il meccanismo di riparazione endogeno del cuore conduce alla formazione di nuovi vasi, alla proliferazione dei cardiomiociti residenti ed alla migrazione di cellule staminali derivate dal midollo osseo verso la zona ischemica ma tale meccanismo è insufficiente a ripristinare la funzione del miocardio danneggiato (Rosenstrauch *et al.*, 2005). Attualmente per migliorare la condizione circolatoria dei pazienti che hanno avuto un infarto si utilizzano diversi approcci farmacologici sia per diminuire la pressione arteriosa (diuretici, ACE inibitori) che la frequenza cardiaca (beta bloccanti), e nei casi più gravi si ricorre ad interventi chirurgici come il by-pass o l'angioplastica, ma nessuna di queste terapie è in grado di sostituire il tessuto cardiaco danneggiato e nei pazienti sopravvissuti all'infarto la riduzione nel numero dei miociti e nella funzionalità della pompa cardiaca possono causare insufficienza cardiaca e condurre a morte per un nuovo infarto del miocardio. Considerata quindi la gravità di queste patologie risulta evidente la necessità di sviluppare trattamenti innovativi ed efficaci.

Altri esempi di patologie cardiache per cui non esistono terapie efficaci sono le alterazioni del ritmo cardiaco che possono essere causati da problemi a livello del nodo senoatriale, noto come pacemaker naturale del cuore, come nel caso della malattia del nodo del seno (o *Sick Sinus Syndrome*), oppure da problemi che insorgono lungo il percorso di conduzione dello stimolo elettrico tra atri e ventricoli con ritardo o blocco dell'impulso, condizione definita come blocco atrio-ventricolare.

In questi casi l'intervento terapeutico più diffuso consiste nell'impianto di pacemakers elettronici che, però, non rappresentano una cura definitiva per diversi motivi, innanzitutto ha una durata limitata nel tempo e necessita di manutenzione periodica; inoltre l'interazione con alcuni

strumenti elettronici, quali elettrostimolatori, metal detectors e apparecchi per la risonanza magnetica possono alterarne il corretto funzionamento. La limitazione maggiore è sicuramente la mancanza di una modulazione fine da parte del sistema nervoso autonomo ed ormonale in risposta all'esercizio fisico, situazioni di stress o emozioni. Una valida alternativa al pacemaker elettronico può essere rappresentata dalla creazione di un pacemaker biologico cioè un substrato cellulare in grado di generare o stimolare l'attività spontanea. A questo scopo sono state perseguite diverse strategie di terapia genica e cellulare.

Nel caso della terapia genica, attraverso l'impiego di vettori plasmidici e virali, si è cercato di inserire nel genoma di cellule cardiache, geni che codificano per molecole di interesse così da incrementarne l'attività autoritmica intrinseca oppure generare attività spontanea in cellule normalmente quiescenti.

A questo scopo sono state adottate diverse strategie; si è provato con l'over-espressione del gene per il recettore adrenergico  $\beta_2$  (Edelberg *et al.*, 1998; Edelberg *et al.*, 2001), così da indurre una risposta cronotropa positiva, oppure si è cercato, producendo un costrutto adenovirale contenente il gene kir2.1 mutato (Miake *et al.*, 2002), di creare un dominante negativo per il canale rettificatore entrante di potassio responsabile del mantenimento del potenziale di riposo ed infine attraverso l'espressione del gene HCN2 (Qu *et al.*, 2003), uno dei costituenti molecolari dei canali pacemaker, i quali, una volta attivati, sono capaci di conferire autoritmicità alla cellula che li esprime. Tra i diversi svantaggi quello che limita fortemente queste strategie è l'utilizzo di vettori virali quindi si è preferito studiare una terapia di tipo cellulare che presuppone l'utilizzo di cellule staminali come fonte cellulare sostitutiva in grado di ripristinare la funzione persa. In particolare la strategia più promettente sembra quella di indirizzare il differenziamento di cellule staminali verso il fenotipo pacemaker.

Un tipo cellulare per cui esistono protocolli di differenziamento standardizzati ed in grado di dare origine spontaneamente a cellule con un fenotipo cardiaco ed, in particolare, pacemaker-like sono le cellule staminali embrionali (Kehat *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2005). Il vantaggio dell'uso delle cellule staminali embrionali rispetto a quelle adulte è l'elevata capacità proliferativa e differenziativa infatti sono cellule pluripotenti in grado di replicarsi per periodi indefiniti ed in grado di originare qualsiasi tipo cellulare derivato dai tre foglietti embrionali. Il problema principale di queste cellule è che, essendo cellule altamente immature, una volta iniettate nell'organismo ospite conducono alla formazione di teratomi. Inoltre la sperimentazione *in vivo* di cellule staminali embrionali umane è fortemente limitata da norme legislative e solleva forti questioni di carattere etico. L'alternativa è quindi rappresentata dalle cellule staminali adulte, cellule già parzialmente indirizzate, con capacità di self-renewal più limitato rispetto alle staminali

embrionali. Risultati soddisfacenti nel campo della rigenerazione del miocardio infartuato sono stati ottenuti *in vivo* trapiantando cellule staminali adulte nella zona danneggiata (Olivares *et al.*, 2004; Toma *et al.*, 2002). I dati a questo riguardo sono contrastanti e spesso sembra che un miglioramento della funzionalità cardiaca avvenga più grazie a eventi angiogenetici che non per una vera e propria sostituzione del miocardio di lavoro (Kocher *et al.*, 2001). Il meccanismo con cui queste cellule contribuiscono alla rigenerazione del miocardio è però ancora incerto infatti secondo alcuni autori si tratta di transdifferenziamento, altri invece sostengono che dipenda da un processo di fusione con i miociti residenti.

Diversi lavori hanno dimostrato che le cellule staminali ematopoietiche (HSC, Hematopoietic Stem Cells) e progenitori endoteliali (EPCs, Endothelial Progenitor Cells) *in vitro*, quando messi in co-coltura con un layer di cardiomiociti o, *in vivo*, quando iniettati in modelli di topo infartuato sono in grado di differenziare in cardiomiociti ed integrarsi al tessuto miocardico. La capacità di queste cellule di transdifferenziare è ancora argomento di scontro e molti autori sostengono invece la teoria della fusione delle HSC con i miociti circostanti (Murry *et al.*, 2004; Nygren *et al.*, 2004; Orlic *et al.*, 2001; Matsuura *et al.*, 2004; Kajstura *et al.*, 2005; Koyanagi *et al.*, 2005; Badorff *et al.*, 2003)

Per le ragioni sopra elencate abbiamo quindi pensato di utilizzare come substrato cellulare per la creazione di un pacemaker biologico le cellule staminali ematopoietiche CD34+ isolate dal sangue del cordone ombelicale. Per questo motivo abbiamo condotto esperimenti di co-coltura di cellule staminali CD34 positive con un substrato autoritmico di miociti neonatali di ratto. Inoltre le cellule staminali CD34+ sono state infettate con un lentivirus contenente EGFP per renderle facilmente riconoscibili dalle cellule circostanti.

Le analisi elettrofisiologiche condotte il primo giorno di co-coltura dimostra che i miociti ventricolari sono dotati di attività autoritmica a differenza delle cellule CD34+/EGFP+ (**figura 19**). Con il passare dei giorni abbiamo osservato che le cellule CD34 positive sono in grado di integrarsi con i cardiomiociti circostanti infatti cambiano la loro morfologia, assumendo una forma più allungata o stellata in seguito all'emissione di prolungamenti cellulari. La caratterizzazione elettrofisiologica delle cellule CD34 positive e EGFP positive è avvenuta sei giorni dopo la co-coltura, tempo minimo necessario per l'insorgenza di cambiamenti molecolari e funzionali, dato riportato dalla letteratura (Lagostena *et al.*, 2005; Koyanagi *et al.*, 2005). Al sesto giorno di co-coltura abbiamo osservato che le cellule EGFP positive che risultano essere isolate dai miociti ventricolari non presentano attività elettrica, mentre quelle ben integrate al layer di cardiomiociti mostrano attività autoritmica (**figura 20**). Questo risultato è indice della presenza di connessione elettrica tra i miociti e le CD34 e per confermarlo abbiamo condotto esperimenti di immunofluorescenza. Come atteso abbiamo rilevato l'espressione della connessina 43, che è

l'isoforma delle connesine maggiormente presente a livello cardiaco, nelle cellule EGFP positive che presentano anche un apparato contrattile organizzato (**figura 21**).

Per verificare che questo fosse il risultato dell'acquisizione di un fenotipo cardiaco da parte delle cellule CD34+ e non solo il risultato di un accoppiamento elettrico tra i due tipi cellulari abbiamo re-isolato le cellule dopo 6 giorni di co-coltura e le abbiamo piastrate a bassa densità per evitare la formazione di contatti cellulari. Come si può osservare dalla **figura 22** le singole cellule CD34+/EGFP+ presentano potenziali d'azione spontanei dimostrando quindi l'acquisizione di un fenotipo cardiaco.

Siamo quindi andati a studiare le caratteristiche elettrofisiologiche della corrente  $I_f$ , nota essere la principale responsabile della fase di depolarizzazione diastolica lenta che conduce il potenziale di membrana delle cellule senoatriali al valore soglia fino all'insorgenza di un nuovo potenziale d'azione. In **figura 23** sono mostrate le tracce di corrente  $I_f$  registrate da una singola cellula EGFP positiva re-isolata dopo sei giorni di co-coltura e la rispettiva curva di attivazione che mostra un potenziale di mezza attivazione,  $V_{1/2}$ , di  $-73.8 \pm 2.9$  mV e un inverse slope factor,  $s$ , di  $8.7 \pm 0.9$  mV, valori molto simili a quelli registrati nei miociti ventricolari neonatali di ratto ( $-78.2 \pm 2$  mV and  $7.8 \pm 0.5$  mV,  $n = 4$  dati non mostrati) (Barbuti *et al.*, 1999; DiFrancesco *et al.*, 1999; Cerbai *et al.*, 2006).

La capacità delle cellule staminali ematopoietiche di differenziare verso un fenotipo cardiaco è ancora oggetto di discussione nel mondo scientifico e molti ricercatori propendono a favore di una possibile fusione, la quale potrebbe essere un meccanismo alternativo al riprogrammamento cellulare del transdifferenziamento, portando alla generazione di cellule ibride con la formazione di una cellula donatrice e la simultanea espressione sulla cellula ricevente di markers cellulari caratteristici (Nygren *et al.*, 2004; Ying *et al.*, 2002; Terada *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2003; Alvarez-Dolado *et al.*, 2003).

Altri ricercatori si schierano dalla parte opposta e sostengono che l'interazione diretta cell-to-cell sia uno dei fattori microambientali principali per il differenziamento di una cellula staminale adulta verso un fenotipo cardiomiocitario (Yoon *et al.*, 2005).

Per cercare di chiarire quale processo fosse responsabile dell'acquisizione di un fenotipo eccitabile da parte delle nostre cellule abbiamo usato un sistema di doppia marcatura mediante espressione di GFP e RFP. La scelta di utilizzare questo metodo è stata fatta allo scopo di evitare possibili rischi di *trans*-infezione, come, per esempio, può accadere utilizzando un vettore adenovirale ed una possibile perdita della marcatura usando coloranti fluorescenti come marcatori DiI/DiO (Badorff *et al.*, 2003; Garbade *et al.*, 2005). Inoltre questo sistema di marcatura è già stato usato per valutare gli effetti della fusione cellulare di tipi cellulari in co-coltura con i cardiomiociti

(Matsuura *et al.*,2004) o per mostrare la fusione tra le cellule staminali derivate dal midollo osseo e i cardiomiociti in vivo (Ishikawa *et al.*,2006). Con questo metodo la simultanea presenza nella stessa cellula della EGFP e RFP è indice di fusione cellulare. L'analisi al microscopio a fluorescenza, mostrata in **figura 24**, ha evidenziato come tutte le cellule EGFP+ che presentano attività autoritmica risultino anche essere RFP+ confermando un evento di fusione cellulare tra le cellule CD34+/EGFP+ ed i cardiomiociti. L'analisi al microscopio video-confocale, **figura 25**, ha evidenziato anche la presenza di due nuclei in una cellula EGFP+/RFP+ come ulteriore conferma dell'avvenuta fusione.

In conclusione i nostri dati indicano che cellule staminali umane CD34+ isolate dal cordone ombelicale in co-cultura con cardiomiociti ventricolari di ratto acquisiscono caratteristiche elettriche e molecolari cardiache tramite fusione tra le cellule staminali e i cardiomiociti stessi.

I nostri risultati potrebbero comunque risultare interessanti da un punto di vista biotecnologico al fine di creare un pacemaker biologico. Infatti è stato dimostrato dal gruppo di Matsuura che la fusione tra due cellule adulte come ad esempio tra i miociti e cellule somatiche (tra cui cellule endoteliali, fibroblasti cardiaci, cellule derivate dal midollo osseo e progenitori endoteliali) può produrre una cellula ibrida in grado di proliferare grazie all'espressione di geni legati al ciclo cellulare che può condurre all'espansione clonale delle cellule ibride (Matsuura *et al.*, 2004).

Un'altra strategia utilizzata nel nostro laboratorio prevede l'utilizzo di mesoangioblasti, o Mabs, cellule staminali associate ai vasi sanguigni in grado di differenziare spontaneamente in cellule muscolari e per questo motivo utilizzati con successo in ricerche per la cura della distrofia muscolare (Guttinger *et al.*, 2006; Sampaolesi *et al.*, 2006) e sono state impiegate anche nella rigenerazione del miocardio infartuato (Galli *et al.*, 2005). In questo lavoro abbiamo dimostrato che in seguito a differenziamento i mesoangioblasti cardiaci vanno incontro ad un cambiamento di morfologia che da allungata diventa irregolare, simile a quella di miociti ventricolari in coltura (**figura 27A e 27B**) e acquisiscono un fenotipo cardiaco (Galvez *et al.*, 2008). Con una resa variabile da esperimento ad esperimento, abbiamo osservato che circa il 70-80% dei mesoangioblasti indotti a differenziare, erano in grado di contrarsi spontaneamente e ritmicamente, da noi chiamati Mesoangioblast-derived Pacemaker Cells (MdPCs) e che abbiamo sottoposto a caratterizzazione funzionale e molecolare (Barbuti *et al.*, 2010). L'analisi di RT-PCR (**Figura 27C**) ha mostrato la presenza dell'RNA messaggero per i fattori trascrizionali Isl-1, Tbx2, Tbx5, GATA4, GATA 6 e Nkx2.5, tutti coinvolti anche se con tempistiche diverse nel programma genico che conduce al differenziamento verso un fenotipo cardiaco. Di particolare nota la presenza dei fattori di trascrizione Isl-1, Tbx2 e GATA6, noti essere coinvolti nel programma genico responsabile della formazione del nodo senoatriale e del tessuto di conduzione in genere (Davis *et al.*, 2001; Adamo *et al.*, 2004; Christoffels *et al.*, 2004; Hoogaars *et*

*al.*, 2004). È stato anche rilevato il segnale per il fattore natriuretico atriale (ANP) e per la connessina 43, entrambi markers cardiaci. Questo è il primo caso in cui si ottiene *in vitro* una popolazione staminale adulta in grado di propagarsi mantenendo un fenotipo indifferenziato e in seguito stimolare il differenziamento verso un fenotipo cardiaco; fino ad ora il differenziamento cardiaco spontaneo *in vitro* di cellule staminali è stato dimostrato solo con cellule embrionali staminali sia di topo che umane (Doetschman *et al.*, 1985; Wobus *et al.*, 2001).

I nostri risultati di immunofluorescenza mostrano che il differenziamento era accompagnato da una riorganizzazione del citoscheletro infatti abbiamo dimostrato la presenza nelle cellule differenziate di un apparato contrattile strutturato, composto da actina e miosina organizzata in strutture sarcomeriche; tale organizzazione citoscheletrica non è presente nelle cellule indifferenziate in cui la miosina non è rilevabile mentre l'actina non risulta organizzata (**Figura 28**).

Una caratteristica fondamentale richiesta ai cardiomiociti al fine di poter essere utilizzati come substrato terapeutico è la capacità di formare un sincizio funzionale in cui il segnale elettrico possa propagarsi velocemente a tutte le cellule. Questa connessione elettrica è possibile grazie alla presenza di giunzioni comunicanti o gap junctions. La Cx 43 è l'isoforma maggiormente espressa a livello cardiaco e nonostante la sua presenza sia particolarmente abbondante nei miociti ventricolari "adulti", durante lo sviluppo essa è abbondantemente espressa anche a livello del tessuto di conduzione e degli atri; nel tessuto di conduzione in particolare la Cx43 diminuisce durante lo sviluppo e l'isoforma maggiormente espressa rimane la Cx45 (Verheule *et al.*, 2001; Van Veen *et al.*, 2001; Dobrzynski H. & Boyett M.R., 2006; Boyett *et al.*, 2006). I dati mostrati in **figura 29** mostrano chiaramente che i mesoangioblasti cardiaci analizzati esprimono sia la Cx 43 che la Cx 45 e questa espressione è propriamente localizzata nelle regioni di contatto tra cellule adiacenti.

Anche il fattore trascrizionale GATA-6 è stato dimostrato essere espresso nel tessuto di conduzione cardiaco. *In vivo* GATA-6 è tipicamente attivato durante le prime fasi della cardiogenesi (Davis *et al.*, 2001; Adamo *et al.*, 2004) ed è considerato un marker del sistema di conduzione (Davis *et al.*, 2001; Adamo *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005). L'analisi al microscopio confocale ha rilevato GATA-6 sia nelle cellule indifferenziate che in quelle differenziate rispettivamente nel  $28.2 \pm 10.2$  % (n=4) e nel  $30 \pm 4.1$  % (n=4) di tutte le cellule considerate (**figura 30**), percentuale confermata dagli esperimenti condotti al citofluorimetro che mostrano che il 27,3% dei mesoangioblasti indifferenziati, trasfettati con un plasmide che porta la GFP sotto una sequenza enhancer di GATA-6, esprimeva la GFP (dati non mostrati).

Questi dati dimostrano che una certa popolazione di mesoangioblasti esprime alcuni dei fattori trascrizionali necessari per lo sviluppo, *in vivo*, del sistema di conduzione ed in particolare verso il

fenotipo pacemaker. Ulteriore dimostrazione di questa ipotesi è la presenza di una frazione di mesoangioblasti cardiaci che una volta differenziati hanno mostrato attività autoritmica. La nostra attenzione si è quindi rivolta a questa sottopopolazione chiamata Mesoangioblast-derived Pacemaker Cells, MdPCs.

L'analisi elettrofisiologica, mostrata in **figura 31**, rivela la presenza di potenziali d'azione spontanei caratterizzati dalla tipica fase di depolarizzazione diastolica lenta (**figura 31A**).

Le tracce di corrente rappresentate in **figura 31B** mostrano una corrente attivata in iperpolarizzazione, tempo e voltaggio dipendente che abbiamo registrato in circa il 66% delle cellule autoritmiche. Questa corrente presenta tutte le caratteristiche tipiche della corrente  $I_f$  senoatriale (DiFrancesco, 1986), tra cui una relazione corrente/voltaggio lineare con un'inversione intorno ai -20 mV e il blocco da parte del cesio. In generale le caratteristiche cinetiche (voltaggio di mezza attivazione e costanti di tempo di attivazione) risultano simili a quelle riportate in letteratura della corrente pacemaker nativa del NSA di coniglio (Baruscotti *et al.*, 2005) anche se differiscono parzialmente da quelle della  $I_f$  nel NSA di topo (Mangoni M.E. & Nargeot J., 2001) in cui la corrente si attiva a potenziali più negativi.

Abbiamo anche osservato che la perfusione delle MdPCs con l'agonista adrenergico isoproterenolo 1  $\mu$ M provoca un aumento della frequenza di scarica dei potenziali d'azione rispetto al controllo del  $32 \pm 8.2\%$  (n=7) con uno spostamento della curva di attivazione della corrente  $I_f$  verso potenziali più positivi. L'agonista muscarinico acetilcolina invece causa l'effetto opposto diminuendo la probabilità di apertura del canale f e rallentando l'attività autoritmica del  $20.9 \pm 8.4\%$  (n=6) (**Figura 33**). Questi risultati indicano la presenza nelle cellule differenziate dell'apparato di trasduzione responsabile della risposta fisiologica dei canali pacemaker alla stimolazione autonoma (recettori  $\beta$ -adrenergici, recettori muscarinici, proteine G stimolatorie ed inibitorie ed adenilato ciclasi). Queste osservazioni sono stati confermati da analisi di immunofluorescenza che ci hanno permesso di evidenziare la presenza in membrana dei recettori  $\beta$ -adrenergici e muscarinici (**figura 34**).

Complessivamente i dati ottenuti indicano che le cellule autoritmiche derivate dai mesoangioblasti presentano caratteristiche tipiche delle cellule pacemaker tra cui la presenza di un apparato contrattile ben organizzato, di proteine responsabili dell'accoppiamento elettrico, della corrente  $I_f$  con caratteristiche cinetiche simili a quella nativa. Per questo motivo possiamo considerare i mesoangioblasti come i potenziali candidati per lo sviluppo di un pacemaker biologico. Il problema principale riguardo l'utilizzo di mesoangioblasti è la difficoltà di isolamento, il basso potenziale proliferativo e di differenziamento verso il fenotipo pacemaker-like.

I candidati cellulari migliori, per lo sviluppo di un pacemaker biologico, sarebbero cellule staminali autologhe, cioè provenienti dal paziente stesso, che possano acquisire le caratteristiche delle cellule staminali pluripotenti cioè devono essere in grado di proliferare per lunghi periodi ed in grado di differenziare in cellule cardiache. Grande interesse scientifico è rivolto in questi ultimi anni verso una popolazione di cellule adulte somatiche che vengono riprogrammate ad uno stadio indifferenziato, iPS (o induced Pluripotent Stem cells); nello specifico si tratta di fibroblasti adulti ingegnerizzati con un vettore virale contenente i fattori trascrizionali Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc, noti essere responsabili dell'induzione e del mantenimento della pluripotenza (Takahashi *et al.*, 2006), che acquistano la morfologia e le caratteristiche tipiche delle cellule staminali embrionali (Wernig *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2007). Una loro applicazione in campo clinico non è ancora possibile, poiché contengono adenovirus, che sono resi inattivi, ma non è ancora chiaro se possano riacquisire la loro originaria attività virale (Ensenat-Waser *et al.*, 2009). Infine, un altro fattore di rischio è costituito dalla presenza dei fattori trascrizionali c-Myc e Klf4, strettamente correlati alla formazione ed allo sviluppo tumorale (Takahashi *et al.*, 2006). La nostra attenzione si è focalizzata invece su una popolazione di cellule staminali spermatogoniali (SSCs, Spermatogonial Stem Cells) chiamate anche cellule staminali germinali (GSCs, Germline Stem cells), che presenta molti dei vantaggi sopra elencati. Le SSCs sono cellule staminali adulte residenti sulla membrana basale dei tubuli seminiferi e deputate alla produzione dei gameti maschili. Nonostante all'interno dell'organismo siano unipotenti, in quanto strettamente indirizzate al differenziamento verso la linea germinale, è stato dimostrato che è possibile indurle a trasformarsi in cellule staminali pluripotenti, con caratteristiche simili a quelle delle cellule staminali embrionali, e perciò dette cellule SSC ES-like (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2010). L'uso di queste cellule staminali non comporta problemi di tipo etico a cui invece sono vincolate le cellule staminali embrionali ma come esse sono pluripotenti e quindi in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari di un organismo. Inoltre, sono cellule ricavabili dal tessuto adulto del paziente stesso, quindi non comporterebbero alcun problema di rigetto e di incompatibilità immunologica, problemi a cui invece va necessariamente incontro l'utilizzo delle staminali embrionali. L'isolamento di queste cellule è comunque piuttosto difficoltoso perché questa popolazione rappresenta solo lo 0,02-0,03% delle cellule totali (Kubota *et al.*, 2003). Non esistono protocolli standard ed ogni gruppo di ricerca utilizza diverse tecniche di isolamento. In questo lavoro abbiamo testato inizialmente quattro protocolli diversi derivati da lavori presenti in letteratura (Guan *et al.*, 2006, Seandel *et al.*, 2007). Il primo protocollo di coltura utilizzato (condizione A) ci aveva permesso di ottenere colonie di cellule tondeggianti, con margini regolari e morfologia simile alle colonie di cellule staminali embrionali, dette per questo cellule SSC ES-like, (**figura 36A**) che esprimevano anche la fosfatasi alcalina, un enzima espresso sulla superficie

di diversi tipi cellulari ed, in particolare, delle cellule staminali embrionali (**figura 36B**) (Kumar *et al.*, 2008) ed in grado di formare Embryoid Bodies (EBs) cioè aggregati cellulari compatti che ricapitolano i primi stadi di sviluppo di un embrione (dati non mostrati). Purtroppo, attraverso l'analisi di colonie ottenute da topi transgenici, **figura 37**, ci siamo resi conto che le colonie di SSCs ES-like da noi ottenute erano il risultato di una riprogrammazione di fibroblasti embrionali murini immortalizzati (STO) che utilizzavamo come feeder layer cellulare. Con gli altri tre protocolli abbiamo ottenuto cellule di diversa morfologia mostrate in **figura 38** e, per verificare la presenza di cellule di nostro interesse, le abbiamo sottoposte ad analisi di real time PCR per il gene OCT4 (**figura 39**). È infatti ormai ampiamente dimostrato che Oct 4 è un gene strettamente correlato all'induzione ed al mantenimento della pluripotenza; è altamente espresso dalle cellule staminali embrionali ed è essenziale per riprogrammare le cellule somatiche in cellule pluripotenti, ovvero in iPSs (induced Pluripotent Stem cells) (Kim *et al.*, 2008; Takahashi and Yamanaka, 2006).

L'analisi di PCR quantitativa ha mostrato la presenza al giorno 0 di un basso livello di espressione di Oct4, indice della presenza di una piccola popolazione di cellule staminali germinali all'interno dei tubuli seminiferi. Al contrario, le cellule ottenute nelle nostre condizioni di coltura esprimono livelli rilevabili di Oct4 e possiamo quindi affermare che questi protocolli non costituiscono le condizioni di coltura adatte per la proliferazione delle cellule staminali germinali di nostro interesse.

A livello embrionale, l'espressione di Oct4 è limitata alla linea germinale, incluse le cellule germinali primordiali (PGCs, Primordial Germ Cells), le cellule spermatogoniali staminali (SSCs) e gli oociti, ma nell'organismo adulto le SSC sono le uniche cellule staminali a mostrare alti livelli di espressione di questo gene. *In vitro*, la perdita di attività di Oct4 nelle SSC causa la perdita di self renewal e di attività spermatogonica (Dann *et al.*, 2008; Kehler *et al.*, 2004). Per questi motivi ci siamo dedicati ad un nuovo protocollo trovato in letteratura, messo a punto dal gruppo tedesco guidato dal Prof. Shöler che prevede l'utilizzo di topi transgenici Oct4/GFP, cioè topi in cui la proteina fluorescente GFP è sotto il controllo del promotore del gene Oct4.

L'espressione della proteina fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) guidata dal gene Oct4 (il quale, all'interno dei testicoli di topi adulti, è espresso solo dalle cellule staminali spermatogoniali) ci ha permesso di isolare la popolazione di cellule staminali di interesse tramite Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). L'analisi di real time PCR condotta su cellule GFP+ e GFP- separate attraverso l'utilizzo del citofluorimetro per verificare i livelli di espressione di Oct4, mostrata in **figura 40**, rivela che le cellule GFP+ presentano livelli significativi di Oct4 a differenza delle cellule GFP-.

Per arricchire ulteriormente la popolazione di GSC di nostro interesse abbiamo utilizzato anche un anticorpo diretto contro il recettore tirosin chinasi c-kit, un marker di superficie la cui espressione è nota aumentare progressivamente con il progredire del differenziamento cellulare (Schrans-Stassen *et al.*, 1999), ed in seguito analizzata tramite il citofluorimetro FACSaria (Fluorescence Activated Cell Sorting). All'interno della sospensione, è stata selezionata e separata la popolazione cellulare di interesse, ovvero la popolazione c-kit<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup> (**figura 41**). Subito dopo il FACS, le cellule sono state piastrate sul feeder layer di MEF e visualizzate al microscopio a fluorescenza. In **figura 42** è mostrata un'immagine di cellule tondeggianti che presentavano fluorescenza verde, indice dell'espressione della GFP (e quindi di Oct4) e della buona riuscita del sorting. Anche dopo 7 giorni dall'isolamento e dal sorting siamo stati in grado di visualizzare diverse cellule singole ma anche alcuni gruppetti di cellule tondeggianti fluorescenti, mostrate in **figura 43**, indicando che le nostre cellule erano in grado di sopravvivere. Questi risultati devono però essere riconfermati, infatti i dati ottenuti fino a questo momento sono insufficienti per poter capire se con questo protocollo saremo o meno in grado di ottenere delle cellule SSC ES-like a partire dalle cellule staminali spermatogoniali di nostro interesse.

Il lavoro per riuscire ad isolare e mantenere in cultura le cellule staminali spermatogoniali (SSCs) è ancora lungo, in quanto è necessario capire quali siano le condizioni ideali al loro mantenimento e quali i fattori di crescita fondamentali per la loro sopravvivenza, ma soprattutto per la loro proliferazione. Una volta ottenute le colonie di cellule SSC, il passo successivo del progetto di ricerca seguito dal nostro laboratorio è quello di spingere queste cellule staminali adulte a dedifferenziare in cellule staminali pluripotenti con le medesime caratteristiche delle cellule staminali embrionali, e quindi definite cellule SSC ES-like. Queste ultime, avendo le stesse caratteristiche di pluripotenza delle cellule staminali embrionali, possono essere differenziate in tutti i tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti germinali, ovvero ectoderma, mesoderma ed endoderma. Tra questi ovviamente anche quelli appartenenti alla linea cardiaca. L'obiettivo ultimo sarebbe lo stesso perseguito inizialmente in questo lavoro di tesi, ovvero differenziare le cellule ES-like derivate dalle SSC verso il fenotipo cardiaco, con particolare interesse al fenotipo pacemaker, avente le stesse caratteristiche possedute dalle cellule che costituiscono il nodo del seno atriale (SAN). Un traguardo simile potrebbe permettere di curare diverse malattie cardiache, abbandonando l'utilizzo di tecniche invasive e permanenti quali l'utilizzo di pacemaker artificiali o addirittura evitando la necessità del trapianto cardiaco.

---

## BIBLIOGRAFIA

**Accili E.A., Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. (2002).** From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *NIPS*. 17: 32-37.

**Accili E.A., Redaelli G., DiFrancesco D. (1996).** Activation of the hyperpolarization-activated current ( $I_f$ ) in sino-atrial node myocytes of the rabbit by vasoactive intestinal peptide. *Pflugers Arch*. 431: 803-805.

**Adamo RF, Guay CL, Edwards AV, Wessels A, Burch JB (2004).** GATA-6 gene enhancer contains nested regulatory modules for primary myocardium and the embedded nascent atrioventricular conduction system. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 280:1062-71.

**Adan V & Crown LA (2003).** Diagnosis and treatment of Sick Sinus Syndrome. *Am Fam Physician*. 67(8):1725-32.

**Altomare C., Bucchi A., Camatini E., Baruscotti M., Viscomi C., Moroni A., DiFrancesco D. (2001).** Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J. Gen. Physiol*. 117: 519-532.

**Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003).** Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 425(6961):968-73.

**Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S (2003).** Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circ*. 107(7):1024-32.

**Barbuti A, Baruscotti M, Altomare C, Moroni A, DiFrancesco D. (1999).** Action of internal pronase on the f-channel kinetics in the rabbit SA node. *J Physiol*. 520 Pt 3:737-44.

**Baruscotti M., Bucchi A., DiFrancesco D. (2005).** Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther*. 107(1):59-79. Review.

**Barbuti A., Galvez B.G., Crespi A., Scavone A., Baruscotti M., Brioschi C., Cossu G., DiFrancesco D. (2010).** Mesoangioblasts from ventricular vessels can differentiate in vitro into cardiac myocytes with sinoatrial-like properties. *J Mol Cell Cardiol*. 48(2):415-23

- Becker A.J., McCullough E.A., Till J.E. (1963).** Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 197: 452-454.
- Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. (2003).** Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 114: 763-776.
- Biel M., Shneider A., Wahl C., (2002).** Cardiac HCN channels. Structure, function and modulation. *Trends Cardiovasc. Med*. 12: 206-12.
- Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C., Vescovi A.L. (1999).** Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 283: 534-537.
- Bois P., Renaudon B., Baruscotti M., Lenfant J., Di Francesco D. (1997).** Activation of f<sub>c</sub> channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes. *Journal of physiology*. 501: 565-571.
- Boyett MR, Inada S, Yoo S, Li J, Liu J, Tellez J, Greener ID, Honjo H, Billeter R, Lei M, Zhang H, Efimov IR, Dobrzynski H. (2006).** Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Adv Cardiol*. 42:175-97. Review.
- Brinster R.L & Avarbock M.R (1994).** Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* Vol 91: 11303 – 11307
- Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. (2000).** From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 290: 1775-1779.
- Cerbai E. & Mugelli A. (2006).** I(f) in non-pacemaker cells: role and pharmacological implications. *Pharmacol Res*. 53:416-23.
- Chaudhry M. A., Vitalis T. Z., Bowen B. D., Piret J. M. (2008).** Basal medium composition and serum or serum replacement concentration influences on the maintenance of murine embryonic stem cells. *Cytotechnology*. 58 (3): 173-179.
- Chiarini-Garcia and Russell. (2002)** Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction Apr*. 123(4):567-77

- Christoffels VM, Hoogaars WM, Tessari A, Clout DE, Moorman AF, Campione M. (2004).** T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev Dyn.* 229:763-70.
- Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, Prall OW, Gier-de Vries C, Soufan AT. (2006).** Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res.* 98:1555-63.
- Conrad S., Renninger M., Hennenlotter J., Wiesner T., Just L., Bonin M., Aicher W., Bühring H-J., Mattheus U., Mack A., Wagner H-J., Minger S., Matzkies M., Reppel M., Hescheler J., Sievert K-D., Stenzl A., Skutella T. (2008).** Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature.* 456 (7220): 344-349
- Cossu G. & Bianco P., (2003).** Mesoangioblasts-vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Current Opinion in Genetics & Development.* 13:537-542
- Dann C. T., Alvarado A. L., Molyneux L. A., Denard B. S., Garbers D. S., Porteus M. H. (2008).** Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires OCT4, a Factor Downregulated During Retinoic Acid-Induced Differentiation. *Stem Cells.* 26: 2928-2937
- Davis DL, Edwards AV, Juraszek AL, Phelps A, Wessels A, Burch JB (2001).** A GATA-6 gene heart-region-specific enhancer provides a novel means to mark and probe a discrete component of the mouse cardiac conduction system. *Mech Dev.* 108:105-19.
- De Rooji & Mizrak (2008).** Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells a new tool for developmental and clinical research. *Development.* 135, 2207-2213
- Dettin L., Ravindranath N., Hofmann M-C., Dym M., (2003).** Morphological Characterization of the Spermatogonial Subtypes in the Neonatal Mouse Testis. *Biol. Of Reprod.* 69: 1565-1571
- DiFrancesco D. (1982).** Block and activation of the pace maker channels in calf purkinje fibres: Effects of potassim, caesium and rubidium. *Journal of Physiology.* 329: 485-507.
- DiFrancesco D. (1986).** Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature.* 324: 470-473.
- DiFrancesco D. (1993).** Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 455-472.

- DiFrancesco D. (1999).** Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. *J Physiol.* ;515 ( Pt 2):367-76.
- DiFrancesco D., Ferroni A., Mazzanti M., Tromba C. (1986).** Properties of the hyperpolarization-activated current ( $I_f$ ) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *Journal of Physiology.* 377: 61-88.
- DiFrancesco D, Mangoni M. (1994).** Modulation of single hyperpolarization-activated channels ( $i(f)$ ) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *Journal of Physiology.* 474: 473-482.
- DiFrancesco D., Tortora P. (1991).** Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* 351: 145-147.
- Dobrzynski H, Boyett MR (2006).** What do we learn from double Cx40/Cx45-deficient mice about cardiac morphogenetic defects and conduction abnormalities? *J Mol Cell Cardiol.* 41(5):774-7.
- Doetschman, T., Eistetter, H., Katz, M., Schmit, W., and Kemler, R. (1985).** The in vitro development of blastocyst derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morph.* 87: 27-45.
- Edelberg JM, Aird WC, Rosenberg RD. (1998).** Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA. *J Clin Invest.* 101:337-43.
- Edelberg JM, Huang DT, Josephson ME, Rosenberg RD. (2001).** Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. *Heart.* 86:559-62.
- Ensenat-Waser R., Pellicer A., Simon C. (2009).** Reprogrammed induced pluripotent stem cells: how suitable could they be in reproductive medicine? *Fertil. Steril.* 91 (4): 971-974
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. (1998).** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 279: 1528-1530.
- Fuchs E., Tumber T., Guasch G. (2004).** Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 116: 769-778

**Galli D., Innocenzi A., Staszewsky L., Zanetta L., Sampaolesi M., Bai A., Martinoli E., Carlo E., Balconi G., Fiordaliso F., Chimenti S., Cusella G., Dejana E, Cossu G., Latini R. (2005).** Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: a comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:692-697.

**Galvez BG, Sampaolesi M, Barbuti A, Crespi A, Covarello D, Brunelli S, Dellavalle A, Crippa S, Balconi G, Cuccovillo I, Molla F, Staszewsky L, Latini R, DiFrancesco D, Cossu G (2008).** Cardiac mesoangioblasts are committed, self-renewable progenitors, associated with small vessels of juvenile mouse ventricle. *Cell death and differentiation.*

**Garbade J, Schubert A, Rastan AJ, Lenz D, Walther T, Gummert JF, Dhein S, Mohr FW (2005).** Fusion of bone marrow-derived stem cells with cardiomyocytes in a heterologous in vitro model. *Eur J Cardiothorac Surg.* (5):685-91.

**Garcia-Frigola C, Shi Y, Evans SM. (2003).** Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene Expr Patterns.* 3:777-83.

**Gauss R., Seifert R., Kaupp U.B. (1998).** Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature.* 393: 583-587.

**Gluckman E., Vanderson R., Chammard A, Locatelli F., M.D., Arcese W., Pasquini R. (1997).** Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *New England Journal of Medicine.* 337: 373-381.

**Guan K., Nayernia K., Maier L. S., Wagner S., Dressel R., Lee J. H., Nolte J., Wolf F., Li M., Engel W., Hasenfuss G. (2006).** Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* 440 (27): 1199-1203

**Gupta D. K., Sharma S., Venugopal P., Kumar L., Mohanty S., Dattagupta S. (2007).** Stem cells as a therapeutic modality in pediatric malformation. *Transplant Proc.* 39 (3): 700-702

**Guttinger M., Tafi E., Battaglia M., Coletta M., Cossu G., (2006).** Allogenic mesoangioblasts give rise to alpha-sarcoglycan expressing fibers when transplanted into dystrophic mice. *Experimental cell research.* 312: 3872-3879.

**Hille B. (1978).** Ionic channels of excitable membranes. *Sinauer Sunderland*

- Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM (2004).** The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res.* 62:489-499.
- Huckins C, Oakberg EF (1978)** Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. The irradiated testes. *Anatomical record.* 192(4):529-42
- Ishii T.M., Takano M., Xie L.H., Noma A., Ohmori H. (1999).** Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* 274: 12835-12839.
- Ishikawa F., Shimazu H., Shultz L.D., Fukata M. et al. (2006).** Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *The FASEB Journal.* 20:950-952.
- Kajstura J, Rota M, Whang B, et al. 2005.** Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res.* 7;96(1):127-137.
- Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba S., Kato T., Kazuki Y., Toyokuni S., Toyosima M., Niwa O., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., Shinohara T. (2004).** Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis. *Cell.* 119: 1001-1012
- Kanatsu-Shinohara M., Miki H., Inoue K., Ogonuki N., Toyokuni S., Ogura A., Shinohara T. (2005).** Long-Term Culture of Mouse Male Germline Stem Cells Under Serum- or Feeder-Free Conditions. *Biology of Reproduction.* 72: 985-991
- Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Miki H., Ogura A., Toyokuni S., Shinohara T. (2003).** Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells. *Biology of Reproduction.* 69: 612-616
- Kehat I., Khimovich L., Caspi O., Gepstein A., Shofti R., Arbel G. (2004).** Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology.* 22: 1282-9.

- Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., Pesce M., Gentile L., Boiani M., Lomeli H., Nagy A., McLaughlin K. J., Schöler H. R., Tomilin A. (2004).** Oct4 is required for primordial stem cell survival. *EMBO Reports*. 5: 1078-1083.
- Kim J., Seandel M., Falciatori I., Duancheng W., Shahin R. (2008).** CD34<sup>+</sup> testicular stromal cells support long-term expansion of embryonic and adult stem and progenitor cells. *Stem Cells*. 26 (10): 2516-2522.
- Ko K., Araùzo-Bravo M. J., Kim J., Stehling M., Schöler H. R. (2010).** Conversion of adult mouse unipotent germline stem cells into pluripotent stem cells. *Nature Protocols*. 5 (5): 921-928
- Ko K., Tapia N., Wu G., Kim J. B., Araùzo Bravo M. J., Sasse P., Glaser T., Ruau D., Wook Han D., Greber B., Hausdörfer K., Sebastiano V., Stehling M., Fleishmann B. K., Brüstle O., Zenke M., Schöler H. R. (2009).** Induction of Pluripotency in Adult Unipotent Germline Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 5: 87-96
- Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., and Itescu S. (2001).** Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Medicine*. 7: 430-436.
- Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S (2005).** Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res*. 96(10):1039-41.
- Koruji M., Movahedin M., Mowla S. J., Gourabi H., Arfaee A. J. (2009).** Efficency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*. 45 (5-6): 281-289
- Kossack M., Meneses J., Shefi S., Nguyen H. N., Chavez S., Nicholas C., Gromoll J., Turek P. J., Reijo-Pera R. A. (2008).** Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells*. 27 (1): 138-149
- Kubota H., Avarbock M. R., Brinster R. L. (2003).** Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *PNAS*. 100 (11): 6487-6492.

- Kumar D., Anand T., Singh M. K., Chauhan M. S., Manik R. S. (2008).** Characterization of embryonic stem cells: A special focus on farm animals. *Indian Journal of Biotechnology*. 8: 23-32.
- Lagasse E., Connors H., Al Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M. (2000).** Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6: 1229-1234.
- Lagostena L, Avitabile D, De Falco E, Orlandi A, Grassi F, Iachininoto MG, Ragone G, Fucile S, Pompilio G, Eusebi F, Pesce M, Caporossi MC (2005).** Electrophysiological properties of mouse bone marrow c-kit<sup>+</sup> cells co-cultured onto neonatal cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 66(3):482-92.
- Lee MS, Lill M, Makkar RR. (2004).** Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med.* 5(2):82-98.
- Liu J, Dobrzynski H, Gianni J, Boyett MR, Lei M. (2007)** Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res.* 73:729-38.
- Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M. (1999).** Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem.* 9: 179-186.
- Lumelsky N., Blondel O., Laeng P., Velasco I., Ravin R., McKay, R. (2001).** Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 292 (5520), 1389–1394.
- Mangoni ME. & Nargeot J. (2001).** Properties of the hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res.* 52(1):51-64.
- Mardanpour P., Guan K., Nolte J., Lee J. H., Hasenfuss G., Engel W., Nayernia K. (2008).** Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. *J. Anat.* 213 (1): 26-29
- Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J., Lei M., Escande D., Demolombe S. (2005).** Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol.* 562:223-34.
- Matsuura K, Wada H, Nagai T, Iijima Y, Minamino T, Sano M, Akazawa H, Molkenstein JD, Kasanuki H, Komuro I. (2004).** Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J Cell Biol.* 167(2):351-363.

- McKay R. (1997).** Stem cells in the central nervous system. *Science*. 276: 66-71.
- McNeish J. (2004).** Embryonic stem cells in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* .3: 70-80
- Miake J, Marban E, Nuss HB. (2002).** Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature*. 419:132-3.
- Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Sirabella D, Baiocchi M, De Maria R, Boratto R, Jaffredo T, Broccoli V, Bianco P, Cossu G. (2002).** The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 129(11):2773-83.
- Mistrik P., Mader R., Michalakis S., Weidinger M., Pfeifer A, Biel M., (2005).** The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* . 280:27056-61.
- Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE (2007).** Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res*. 100:354-62.
- Moosmang S., Stieber J., Zong X., Biel M., Hofmann F., Ludwig A. (2001).** Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neural tissues. *Eur. J. Biochem*. 268: 1646-1652.
- Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y (2006).** Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*. 127:1151-65.
- Moroni A., Barbuti A., Altomare C., Viscomi C., Morgan J., Baruscotti M., DiFrancesco D. (2000).** Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. *Pflugers Arch*. 439: 618-626.
- Moroni A., Gorza L., Beltrame M., Gravante B., Vaccari T., Bianchi M.E., Altomare C., Longhi R., Heurteaux C., Vitadello M., Malgaroli A., DiFrancesco D. (2001).** Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I<sub>f</sub>. *J Biol Chem*. 276: 29233-29241.
- Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D.,**

- Williams D.A., Field L.J. (2004).** Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 428: 664–668.
- Nygren J.M., Jovinge S., Breitbach M., Sawen P., Roll W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B.K., Jacobsen S.E. (2004).** Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Medicine*. 10: 494–501.
- Oakberg EF. (1971).** Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anatomical record*. 169(3):515-31
- Odorico J. S., Kaufman D. S., Thomson J. A. (2001).** Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cell*. 19: 193-204
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD (2003).** Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(21):12313-8.
- Olivares EL, Ribeiro VP, Werneck de Castro JP, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RC, Mill JG, Dohmann HF, dos Santos RR, de Carvalho AC, Masuda MO.(2004).** Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287(2):H464-70.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. (2001).** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701–705.
- Owen M. (1988).** Marrow derived stromal stem cells. *J. Cell Science Supp*. 10: 63-76.
- Pape H.C. (1996).** Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol*. 58: 299-327.
- Park I-H., Zhao R., West J. A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T. A., Lerou P. H., William Lensch M., Daley G. Q. (2007).** Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 451: 141-146.

- Potapova I., Plotnikov A., Lu Z., Danilo J.P. Valiunas V., Qu J. (2004).** Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circulation Research*. 94: 952-959.
- Plotnikov A.N., Sosunov E.A., Qu J. (2004).** A biological pacemaker implanted in the canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms having physiologically acceptable rates. *Circulation*. 109: 506-12.
- Qu J., Barbuti A., Protas L., Santoro B., Cohen I.S., Robinson R. (2001).** HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes. *Circulation Research*. 89:e8-e14.
- Qu J., Plotnikov A.N., Danilo P.J., Shlapakova I.N., Cohen I.S., Robinson R.B. (2003).** Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation*. 107: 106-109.
- Robinson RB, Siegelbaum SA. (2003).** Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol*. 65:453-480.
- Rosenstrauch D, Poglajen G, Zidar N, Gregoric ID (2005).** Stem cell therapy for ischemic heart failure. *Tex Heart Inst J*. 32:339-347.
- Sampaolesi M., Blot S., D'Antona G., Granger N., Tonlorenzi R., Inoocenzi A., Mognol P., Thibaud J-L., Galvez B. G., Barthèlèmy I., Perani L., Mantero S., Guttinger M., Pansarasa O., Rinaldi C., Cusella De Angelis M. G., Torrente Y., Bordignon C., Bottinelli R., Cossu G. (2006).** Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 444.
- Santoro B., Grant S.G.N., Bartsch D., Kandel E.R. (1997).** Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to Eag and cyclic nucleotide-activated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 14815-14820.
- Santoro B., Liu D.T., Yao H., Bartsch D., Kandel E.R. (1998).** Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*. 93: 1-20.
- Santoro B., Tibbs G.R. (1999).** The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 868: 741-764.
- Schrans-Stassen B. H. G. J., Van De Kant H. J. G., De Rooij D. G., Van Pelt A. M. M. (1999).** Differential Expression of c-kit in Mouse Undifferentiated and Differentiating Type A Spermatogonia. *Endocrinology*. 140 (12): 5894-5900.

- Scholz G., Pohl I., Genschow E., Klemm M., Spielmann H. (1999).** Embryotoxicity Screening Using Embryonic Stem Cells in vitro: Correlation to in vivo Teratogenicity. *Cells Tissues Organs*. 165 (3-4): 203-211
- Seandel M., James D., Shmelkov S. V., Falciatori I., Kim J., Chavala S., Scherr D. S., Zhang F., Torres R., Gale N.W., Yancopoulos G. D., Murphy A., Valenzuela D. M., Hobbs R. M., Pandolfi P. P., Rafii S. (2007).** Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature*. 449 (20): 346-352
- Shi W., Wymore R., Yu H., Wu J., Wymore R.T. (1999).** Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circulation Research*. 85: E1-6.
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006).** Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 126: 663-676
- Tegelenbosch RA, de Rooij DG (1993).** A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. 169(3):515-31.
- Teo A. K. K., Vallier L. (2010).** Emerging use of stem cells in regenerative medicine. *Biochem. J*. 428: 11-23.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002).** Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 416(6880):542-5
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. (1998).** Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 282 (5391): 1145-1147
- Till J.E., McCullough E.A. (1961).** A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res*. 14: 213-222.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. (2002).** Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 105(1):93-8.
- Tse W. & Laughlin M. J. (2005).** Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematopoietic stem cell transplantation*.

- Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Bearzi C, Boni A, Bolli R, Kajstura J, Anversa P, Leri A. (2006).** Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(24):9226-31
- Valiunas V., Doronin S., Valiuniene L., Potapova I., Zuckerman J., Walcott B.(2004).** Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *Journal of Physiology.* 553: 617-26.
- Van Veen A.A., Van Rijen H.V., Opthof T. (2001).** Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res.* 51(2):217-29. Review.
- Verheule S., van Kempen M.J., Postma S., Rook M. B., Jongsma H.J., (2001).** Gap junctions in the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(5):H2103-15
- Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D. (2001).** C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Journal of Biological Chemistry.* 276:29930-29934.
- Watt, F.M & Hogan, B.L. (2000).** Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 287, 1427–1430.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B. E., Jaenisch R. (2007).** In vitro reprogramming of fibroblast into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 448: 318-324
- White SM, Claycomb WC. (2005).** Embryonic stem cells form an organized, functional cardiac conduction system in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H670-H679.
- Wobus A.M. (2001).** Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med.* 22(3):149-64. Review.
- Xue T., Cho H.C., Akar F.G., Tsang S.Y., Jones S.P., Marban E. (2005).** Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardio myocytes: insights into the development of cell based pacemakers. *Circulation.* 111: 11-20.
- Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, Niwa R, Billeter R, Honjo H Kodama I., Boyett M.,. (2006).** Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovasc Res.* 72:271-81.

**Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002).** Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 416(6880):545-8.

**Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS (2005).** Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol*. 84(11):715-21.

**Yu H, Chang F, Cohen IS. (1995).** Pacemaker current  $i(f)$  in adult canine cardiac ventricular myocytes. *Journal of Physiology*. 485:469-483.

**Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. I., Thomson J. A. (2007).** Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 318 (5858): 1917-1920