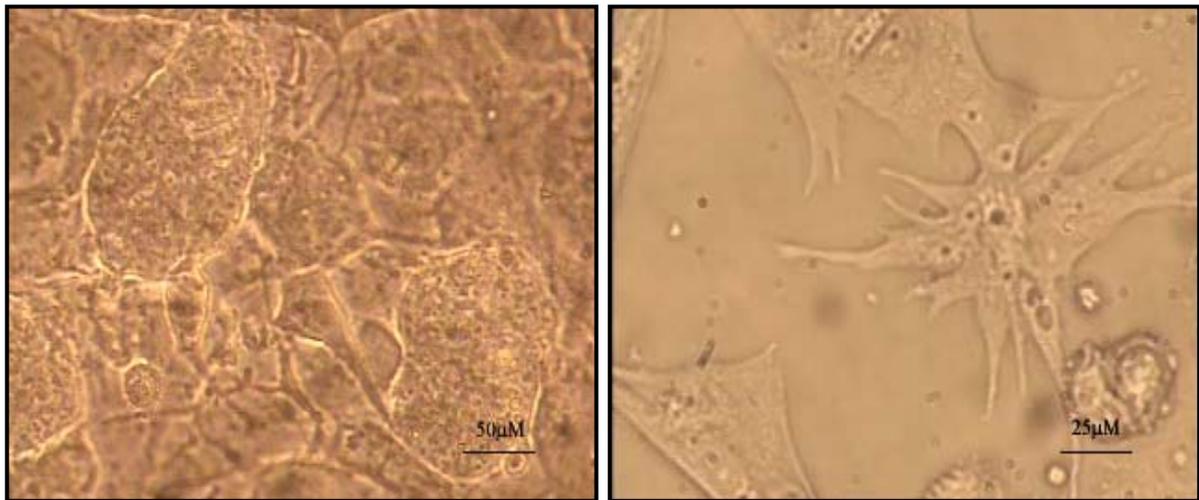


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali
Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie
Laboratorio di Fisiologia Molecolare e Neurobiologia

Dottorato di Ricerca in Scienze Fisiologiche
XX ciclo (Bio/09)

**Pacemaker biologico:
Cellule staminali embrionali murine
Vs
Cellule staminali cardiache adulte**



Docente responsabile: Chiar.mo Prof. Dario **DIFRANCESCO**
Coordinatore del Dottorato: Chiar.mo Prof. Paolo **CAVALLARI**

Tesi di Dottorato di Ricerca
Dott.ssa Alessia **CRESPI**

Anni Accademici 2004-2007

*Alla mia famiglia,
a Matteo,
e a Chiara*

*Grazie per tutto l'**Amore**
e il sostegno che mi avete dato
in questi anni.*

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	5
<u>Il Cuore</u>	5
Embriologia del cuore	5
Il sistema di conduzione	6
Il potenziale d'azione cardiaco	9
Corrente I _f	11
Modulazione da parte del sistema nervoso autonomo	12
Canali HCN	14
<u>Cellule staminali</u>	20
Cellule staminali embrionali	20
Cellule staminali adulte	24
<u>Patologie cardiache e Terapia cellulare</u>	27
Cardiopatie ischemiche	27
Patologie a carico della generazione e conduzione dell'impulso elettrico	30
<u>Pacemaker elettronico e Pacemaker biologico</u>	33
Pacemaker elettronico	33
Pacemaker biologico	34
<i>SCOPO DEL LAVORO</i>	39
<i>MATERIALI E METODI</i>	40
<u>Cellule staminali embrionali murine</u>	40
Coltura di cellule staminali embrionali murine	40
Differenziamento di cellule ES-D3 in cardiomiociti	41
Isolamento delle aree contrattili degli EBs	44
Estrazione dell'RNA totale da cellule con l'utilizzo del TRIzol Reagent	44
Trattamento degli estratti con DNase I (Fermentas)	46
RT-PCR	46
PCR (Polymerase Chain Reaction)	47
Elettroforesi su gel di agarosio	49
Analisi elettrofisiologiche	49
Protocolli ed analisi dei dati	50
Analisi di immunofluorescenza	50
<u>Mesoangioblasti</u>	53
Isolamento di mesoangioblasti da vasi di ventricolo murino	53
Citometria a flusso	53

RT-PCR	55
Costruzione del vettore plasmidico e trasfezione dei mesoangioblasti	55
Analisi di immunofluorescenza	56
Analisi elettrofisiologica	58
Analisi dei dati	59
<i>RISULTATI</i>	61
<u>Cellule staminali embrionali murine</u>	61
<u>Mesoangioblasti</u>	80
<i>DISCUSSIONE</i>	96
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	108

INTRODUZIONE

Il Cuore

Embriologia del cuore

Il cuore deriva embriologicamente dal mesoderma e lo si può considerare un tratto morfologicamente differenziato di un primitivo vaso sanguigno situato ventralmente al tubo digerente e deputato alla propulsione del sangue in direzione caudo-cefalica. Nell'uomo i primi abbozzi compaiono durante la terza settimana di sviluppo dell'embrione prima della delimitazione nella regione cefalica (processo che porta all'avvolgimento dell'embrione su se stesso sia in senso latero-laterale che cranio-caudale in modo tale che da struttura piana esso divenga tubulare e chiuso). Alcuni angioblasti del mesenchima, interposto tra la splancnopleura e l'entoderma della faringe, che inizialmente si trovavano ammassati in modo irregolare (**Figura 1A**), progressivamente si organizzano a delimitare i tubi endocardici destro e sinistro (**Figura 1B**). Da questi angioblasti si origina l'endotelio della parete dei due tubi endocardici che confluiscono nell'unico tubo cardiaco dopo 22 giorni dalla fecondazione dell'ovocita (**Figura 1C e D**). Successivamente la splancnopleura si ispessisce e circonda il primitivo tubo cardiaco formando il miocardio. L'epicardio deriva dall'epitelio celomatico che, dai margini dell'abbozzo del miocardio, progressivamente si estende a rivestire l'abbozzo stesso. Si forma così la prima struttura in grado di contrarsi.

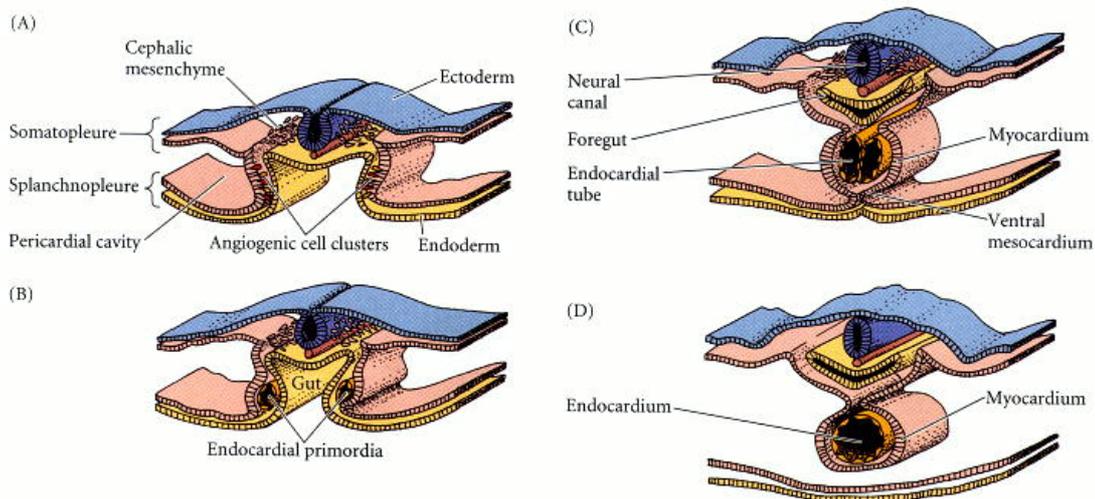


Figura 1: Sviluppo embriologico del primitivo tubo endocardico.

Allungandosi in misura maggiore rispetto alla cavità pericardica in cui è accolto, il primitivo tubo cardiaco, dapprima rettilineo, si incurva a “S”, sia sul piano frontale che sagittale, così che la porzione caudale viene a porsi dorsalmente alla porzione cefalica. Recenti lavori hanno

dimostrato che durante questo processo di torsione vengono reclutate cellule che, proliferando, andranno a formare inizialmente una successione caudo-cefalica di quattro dilatazioni ampollari: il seno venoso, cui arriva il sangue refluo da tutto il corpo dell'embrione, l'atrio, il ventricolo e il bulbo cardiaco. In seguito le quattro cavità continueranno a maturare fino ad assumere la corretta morfologia nel muscolo cardiaco (**Figura 2**).

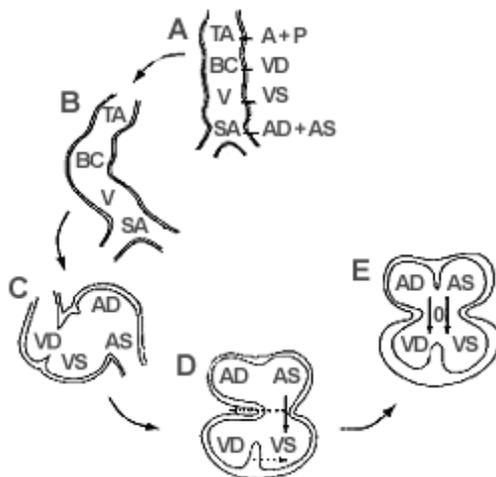


Figura 2: Sviluppo del primitivo tubo cardiaco.

Il sistema di conduzione

Il cuore è un organo posto nella cavità toracica, costituito pressoché esclusivamente da tessuto muscolare striato, supportato da una struttura fibrosa detta pericardio. La parete del cuore è costituita da tre tuniche:

- *Endocardio*, che tappezza la cavità cardiaca ed è costituito da una sottile lamina connettivale rivestita, verso il lume, da cellule endoteliali: ha la funzione di favorire lo scorrimento del sangue all'interno del cuore per evitarne i coaguli;
- *Miocardio*, formato da fibrocellule muscolari cardiache ordinatamente orientate in modo da permettere la corretta contrazione;
- *Epicardio*, costituito da un sottile strato di connettivo lasso e contenente capillari sanguigni, capillari linfatici e fibre nervose.

È l'organo centrale dell'apparato circolatorio, funge da pompa capace di produrre una pressione sufficiente a permettere la circolazione del sangue. Il cuore è un organo autoritmico e quindi non necessita dell'innervazione per contrarsi, presenta infatti un sistema di generazione e di conduzione dell'impulso che permette l'eccitazione prima degli atri e poi dei ventricoli, con modi, tempi e velocità opportuni per permettere al cuore di svolgere correttamente la sua

funzione di contrazione (sistole) e dilatazione (diastole). Le cellule muscolari cardiache sono organizzate a formare un sincizio grazie alla presenza di estesi complessi giunzionali, detti *dischi* o *strie intercalari*, che ne connettono le estremità adiacenti. I complessi giunzionali, oltre che da desmosomi e *fasciae adhaerentes*, sono rappresentati anche da *gap junctions*, sede della propagazione dell'impulso elettrico da una fibra all'altra. L'insieme di queste giunzioni assicura la coesione elettrica e meccanica tra le fibre che compongono il miocardio per facilitare la propagazione dell'eccitamento. Dal punto di vista fisiologico e funzionale, è possibile suddividere il cuore in due distretti fondamentali: il *miocardio di lavoro*, che costituisce la parte muscolare e fibrosa del cuore, formato prevalentemente da cellule muscolari, e il *tessuto di conduzione* (**Figura 3**), di origine nervosa, che assicura la propagazione dell'impulso nervoso a tutto il muscolo cardiaco. Si tratta di un sistema specializzato del cuore che permette, in condizioni normali, che il cuore batta in maniera efficiente ed ordinata (prima gli atri, poi i ventricoli permettendo il completo riempimento di questi ultimi) e che l'impulso generato si diffonda velocemente, facendo contrarre tutte le parti del ventricolo in maniera pressoché simultanea.

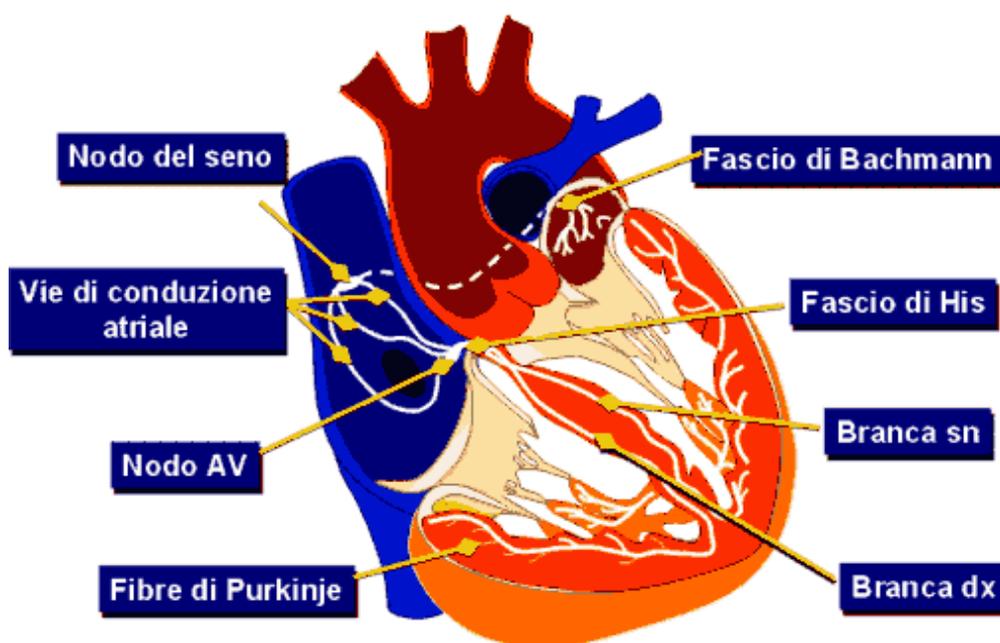


Figura 3: Struttura del cuore e schema del tessuto di conduzione cardiaco in una sezione longitudinale del cuore umano. (da http://pacs.unica.it/cardio/prev/aritmie/datas/an_sis_cond/pag1.htm).

Questo sistema è formato da diverse parti:

- Il *nodo seno-atriale* (S-A): si tratta di una piccola e appiattita striscia ellissoidale larga circa 3 mm, lunga 15 mm e spessa 1 mm, che si trova nella parete posteriore dell'atrio destro subito sotto allo sbocco della vena cava superiore ed è noto anche come pacemaker

naturale del cuore. Le fibre del nodo seno-atriale hanno un diametro variabile tra i 3 e i 5 mm, mentre le fibre circostanti sono delle dimensioni di una decina di micrometri. In questo nodo si genera il normale impulso ritmico, per fare in modo che l'impulso venga trasmesso alle fibre atriali, le fibre del nodo SA si connettono direttamente con quelle atriali; il potenziale d'azione si diffonde, così, in maniera simultanea negli atri.

- Le *vie internodali*: si tratta di una striscia di tessuto di conduzione che deve condurre il segnale verso il nodo atrioventricolare.
- Il *nodo atrio-ventricolare (AV)*: situato nella parte posteriore destra del setto interatriale, è il principale responsabile del ritardo nel passaggio del segnale dagli atri ai ventricoli; rappresenta l'unico punto di connettività elettrica tra atri e ventricoli.
- Le fibre del *Fascio di His* si estendono nella parte membranosa del setto interatriale e propagano l'impulso alla massa cardiaca ventricolare, dividendosi in due branche, destra e sinistra. La branca sinistra possiede due fascicoli, anteriore, più spesso, e posteriore, più sottile.
- Parte terminale del sistema di conduzione del cuore sono le *fibre del Purkinje*, cellule cardiache con conducibilità maggiore dei cardiomiociti.

La principale particolarità del miocardio specifico consiste nella possibilità di generare autonomamente gli impulsi elettrici: in pratica la centrale pacemaker principale si trova nel nodo seno-atriale, ma non è l'unica presente nel miocardio: anche altri distretti cardiaci, quali il Nodo Atrio Ventricolare e le Fibre del Purkinje sono in grado di generare spontaneamente potenziali d'azione. È stato possibile apprezzare questo escludendo dalla conduzione il nodo SA: il cuore continua a battere, anche se a ritmi notevolmente inferiori (40/60 impulsi al minuto, contro i normali 60/100) e il ritmo che si impone è detto "non sinusale" perché ha origine al di fuori del nodo del seno. Questo meccanismo può essere spiegato come una sorta di autoprotezione da parte del cuore, esistono infatti patologie a causa delle quali viene bloccata la conduzione del nodo SA. In questo caso, il cuore può continuare a battere poiché il nodo AV comincia a dettare il passo del ritmo (con frequenza minore) e la situazione è compatibile con la vita. Questo fenomeno viene definito *overdrive suppression*, in quanto il nodo senoatriale è in grado di generare potenziali d'azione con una frequenza più elevata, che "copre" quella degli altri pacemaker cardiaci ausiliari: per questo motivo viene definito pacemaker naturale del cuore, in quanto i miociti senoatriali, formando un sincizio funzionale, sono accoppiati elettricamente, per cui quelli dotati di una frequenza più elevata impongono il proprio ritmo. Nell'uomo l'impulso elettrico che nasce dal nodo seno-atriale stimola il cuore ad una frequenza di circa 70 battiti/minuto in condizioni di riposo, si propaga agli atri provocandone la contrazione e,

attraverso le vie internodali, raggiunge il nodo atrio-ventricolare (nodo AV) dove subisce un leggero ritardo (circa 0.1 ms^{-1}). Il ritardo di trasmissione dell'impulso è indispensabile per un perfetto rendimento della pompa cardiaca, 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 percorre il fascio di His, che si divide in una branca destra e una sinistra, e raggiunge i rami terminali, chiamati fibre di Purkinje, che conducono l'impulso rapidamente fino ai ventricoli che si contraggono.

Il potenziale d'azione cardiaco

Le cellule cardiache esprimono un notevole numero di canali ionici voltaggio-dipendenti e non, con caratteristiche cinetiche diverse che, a seconda del distretto cardiaco in cui sono espressi, generano potenziali d'azione dalle forme molto diverse e con diverse conseguenze funzionali (Figura 4).

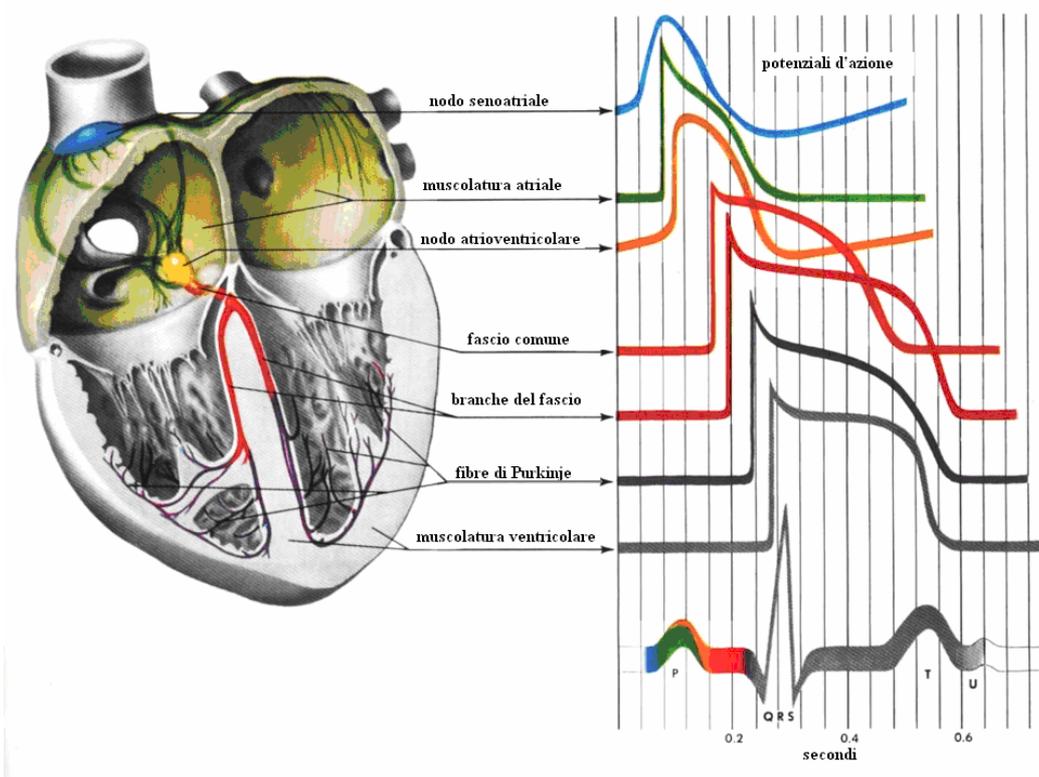


Figura 4: Schema della distribuzione dei potenziali d'azione nei diversi distretti cardiaci. (da <http://www cardiologiapertutti.org/Immagini/Conduzione%20-%20Il%20Sistema.jpg>).

La particolarità che contraddistingue il potenziale d'azione delle cellule autoritmiche da quello delle altre cellule cardiache è l'assenza di una fase di riposo stabile tra un potenziale d'azione e l'altro. I miociti con attività autoritmica presentano una fase di depolarizzazione diastolica lenta

che conduce il potenziale di membrana verso il valore soglia per l'insorgenza di un nuovo potenziale d'azione. Nelle cellule cardiache non autoritmiche alla fine di un potenziale d'azione, durante la fase 4 (**Figura 5A**), il potenziale di membrana rimane stabile intorno a valori di riposo di -75 mV per l'intervento della corrente I_{K1} , una corrente di K^+ rettificante entrante, che risulta invece assente nelle cellule pacemaker (**Figura 5B**).

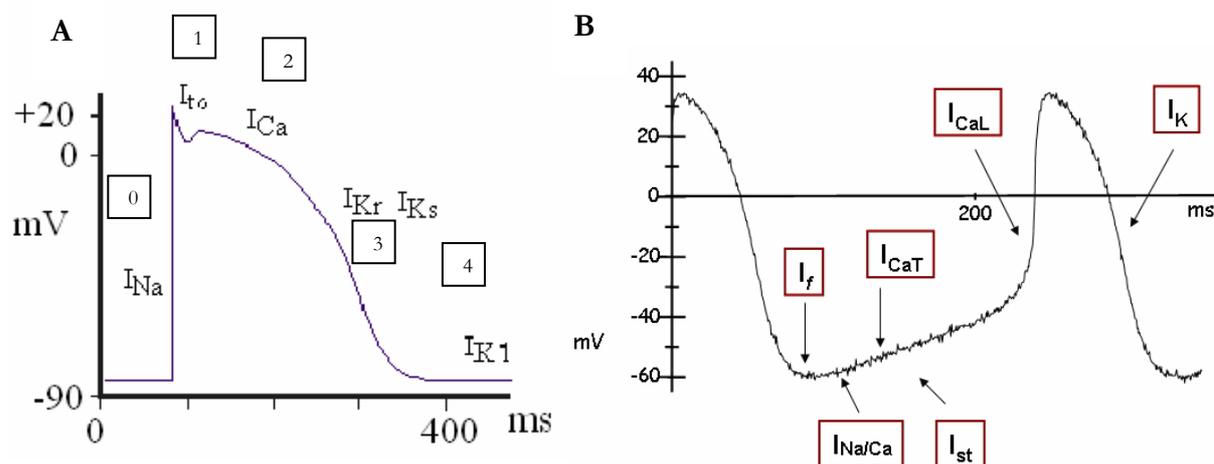


Figura 5: Esempio di un potenziale d'azione di una cellula ventricolare in **A** e di una cellula senoatriale in **B**.

Nei miociti senoatriali, la fase 0 del potenziale d'azione è determinata dall'apertura dei canali di calcio di tipo L e non da quelli del sodio come avviene nei miociti ventricolari. Inoltre la fase 1 e la fase 2, che nelle cellule ventricolari rappresentano, rispettivamente, un primo breve periodo di ripolarizzazione ed il plateau, non sono presenti. L'assenza della fase 2 è dovuta al fatto che i canali di calcio in questa fase sono già inattivi e l'apertura dei canali di potassio conduce il potenziale di membrana verso valori più iperpolarizzati. L'attività spontanea di tali cellule deriva da una tipica fase del loro potenziale d'azione definita "depolarizzazione diastolica lenta" (fase 4) che è successiva al raggiungimento del massimo potenziale diastolico (MDP). Questa fase non mantiene il potenziale di membrana ad un valore di riposo, ma provoca una lenta e spontanea depolarizzazione che porta il potenziale di membrana fino al valore soglia necessario per la generazione di un nuovo potenziale d'azione. L'assenza di una fase di riposo stabile induce così un'attività ripetitiva e autoritmica. Nella fase di depolarizzazione pacemaker delle cellule senoatriali un ruolo fondamentale è 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 [1]. Verso la fine della fase 4, a valori di circa -50 mV, si attivano i canali di calcio di tipo T e L che accelerano la depolarizzazione e sono responsabili dell'upstroke del potenziale d'azione (fase 0). In generale, il potenziale d'azione senoatriale viene definito come

“lento” in quanto mancano i canali del Na^+ rapidi che danno origine alla fase di depolarizzazione veloce (fase 0) dei miociti atriali e ventricolari; è stato però dimostrato che nei miociti senoatriali di topo durante la fase 0 sono coinvolti anche i canali di Na. Inoltre la fase 1 e la fase 2, che nelle cellule ventricolari rappresentano, rispettivamente, un primo breve periodo di parziale ripolarizzazione e il plateau, non sono presenti nei miociti senoatriali. Durante la fase 3 si attivano i canali di potassio rettificatori ritardati che conducono le correnti uscenti, I_{K_r} e I_{K_s} , che non essendo più bilanciate dalle correnti entranti di calcio ripolarizzano la membrana.

Corrente I_f

Tra le varie conduttanze ioniche implicate nel potenziale d'azione, la corrente I_f , o corrente pacemaker o corrente “funny”, svolge un ruolo fondamentale nella genesi spontanea del potenziale stesso, ovvero nella fase di depolarizzazione diastolica lenta [2]. La corrente I_f è una corrente mista di sodio e potassio che si attiva in iperpolarizzazione con un potenziale d'inversione intorno ai -15 mV, risultando quindi entrante durante la fase pacemaker e di conseguenza in grado di depolarizzare la cellula verso il valore soglia (**Figura 6**). Un'altra caratteristica di questa corrente è il blocco parziale da ione Cesio (Cs^+ , [3]). La corrente I_f è inoltre voltaggio e tempo dipendente [2] ed è modulata direttamente dall' adenosina monofosfato ciclico (AMPC) [4]. La bassa soglia di attivazione (circa -40 mV) che tale corrente presenta nei miociti senoatriali è uno dei motivi della loro maggiore frequenza di contrazione e di conseguenza del fenomeno di overdrive suppression.

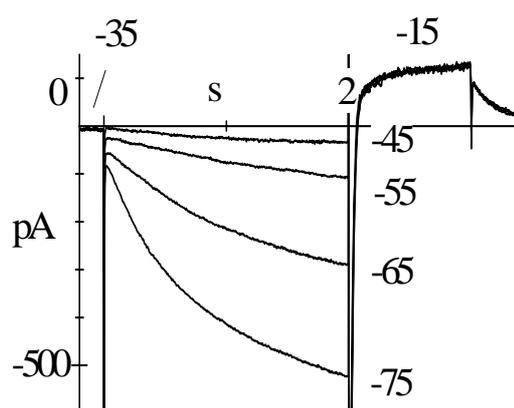


Figura 6: Tracce di corrente I_f registrate a potenziali diastolici.

Durante lo sviluppo embrionale e neonatale del cuore, i canali responsabili della corrente I_f sono funzionalmente espressi anche nei miociti programmati per svilupparsi nelle cellule del

miocardio di lavoro (miociti atriali e ventricolari). Tuttavia, negli stessi miociti adulti, non è evidente un ruolo fisiologico della I_f . Questo accade sia perché la densità dei canali è bassa, sia perché l'attivazione della corrente avviene a potenziali troppo negativi (-120/-150 mV) e quindi al di fuori dei potenziali fisiologici [5]. Di conseguenza, sia i miociti ventricolari che quelli atriali non sono dotati di attività autoritmica in condizioni normali.

Modulazione da parte del sistema nervoso autonomo

L'attività cardiaca viene finemente regolata dal Sistema Nervoso Autonomo (SNA). In particolare il nodo senoatriale, in quanto sede di generazione dell'impulso, è il sito di regolazione della frequenza cardiaca. Esso è infatti riccamente innervato dalle terminazioni nervose del Sistema Nervoso Autonomo, sia Simpatico che Parasimpatico, che esercitano, rispettivamente, un effetto cronotropo positivo e negativo. L'innervazione simpatica e parasimpatica agiscono sulle cellule cardiache rispettivamente mediante recettori β -adrenergici e colinergici muscarinici. I neurotrasmettitori agiscono sulla I_f modulando la concentrazione citoplasmatica del secondo messaggero AMPciclico (nucleotide ciclico adenosin-monofosfato) [6]. Entrambi i recettori sono accoppiati a G-proteine le cui subunità $\alpha\beta$ sono in grado di interagire direttamente con l'adenilato ciclasi modificandone l'attività (**Figura 7**).

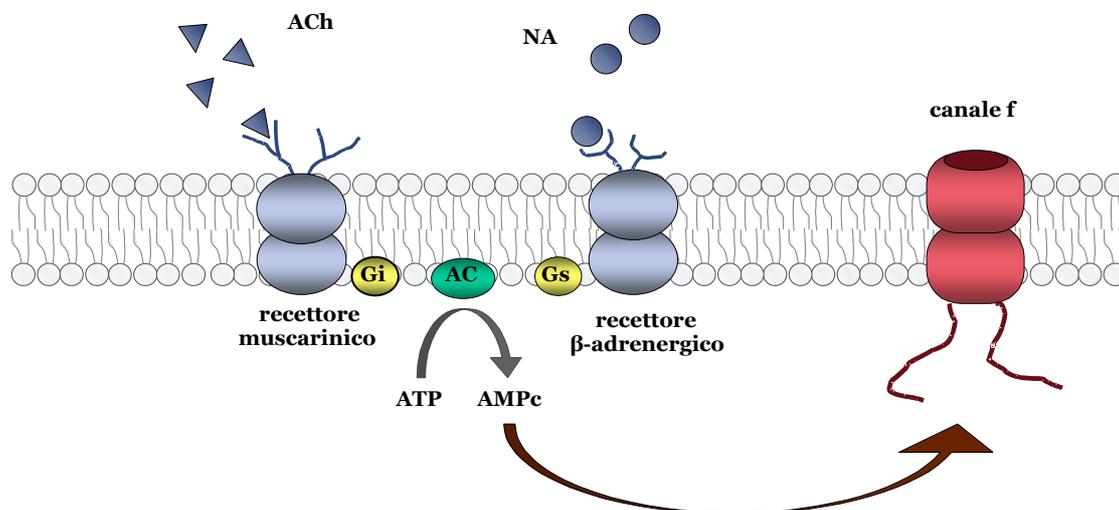


Figura 7: Modulazione del canale f da parte dell'AMP ciclico (AMPC); vie di trasduzione del segnale accoppiate al recettore β -adrenergico e al recettore muscarinico che determinano la variazione dei livelli di AMPC e, di conseguenza, la modulazione del canale pacemaker nei miociti senoatriali. ACh, acetilcolina; NA, noradrenalina; AC, adenilato-ciclasi; Gi, G-protein inibitoria; Gs, G-protein stimolatoria.

Il Sistema Simpatico tramite le G-protein stimolatorie (Gs) causa un aumento di concentrazione di AMPc intracellulare, mentre il Sistema Parasimpatico tramite le G-proteine inibitorie (Gi) ne determina la diminuzione. Gli effetti cronotropi della stimolazione β -adrenergica e di quella colinergica muscarinica possono essere riprodotti in cellule senoatriali isolate, che mantengono la capacità di battere spontaneamente. Quando si applicano basse dosi di agonisti β -adrenergici o di acetilcolina, la frequenza spontanea subisce una accelerazione o un rallentamento, dovuti, rispettivamente, all'aumento o alla diminuzione della pendenza della depolarizzazione diastolica, con piccole variazioni nella forma o nella durata del potenziale d'azione, suggerendo uno specifico coinvolgimento della corrente I_f nella modulazione della pendenza della depolarizzazione diastolica da parte dei neurotrasmettitori (**Figura 8A**). Un incremento dei livelli basali intracellulari di AMPc promuove l'interazione diretta del secondo messaggero con il canale f [4] attraverso un meccanismo indipendente da processi fosforilativi. Questa molecola agisce sul canale f determinandone un aumento della probabilità di apertura senza modificarne la conduttanza [7]. L'aumento di AMPc si traduce quindi in una maggiore probabilità di apertura dei canali pacemaker a parità di potenziale; al contrario, la diminuzione del secondo messaggero ne provoca una minore attivazione.

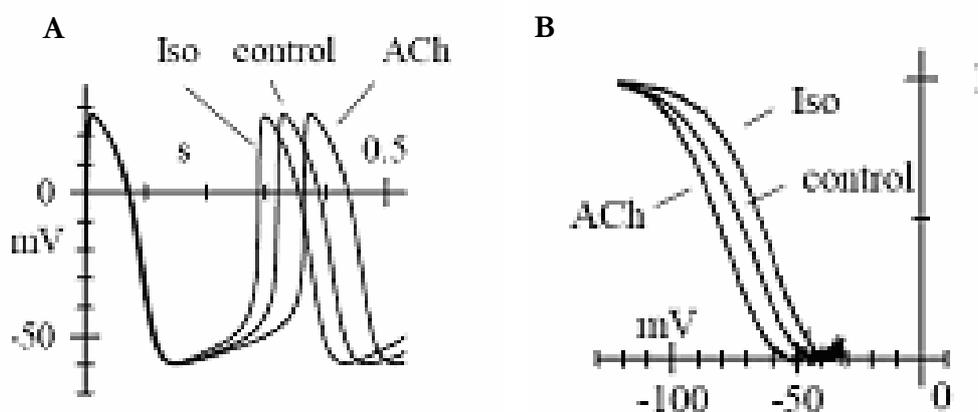


Figura 8: Regolazione autonoma della corrente f . **A:** modulazione dell'attività pacemaker: l'attività spontanea di una singola cellula senoatriale è accelerata dall'isoprenalina ($0.01\mu\text{M}$) e rallentata da acetilcolina ($0.003\mu\text{M}$); tali neurotrasmettitori causano la modificazione della fase di depolarizzazione diastolica lenta. **B:** la stimolazione β -adrenergica e muscarinica aumentano e diminuiscono la quantità di corrente I_f disponibile per la depolarizzazione diastolica spostando la curva d'attivazione verso potenziali più positivi o negativi, rispettivamente.

L'AMPc intracellulare agisce come secondo messaggero determinando uno spostamento depolarizzante della curva di attivazione dell' I_f . In particolare la stimolazione colinergica, diminuendo la produzione di AMPc, sposta la curva di attivazione verso valori di voltaggio più

negativi diminuendo la corrente attivata ai potenziali diastolici e rallentando di conseguenza la depolarizzazione diastolica; la stimolazione β -adrenergica determina il meccanismo opposto, aumentando così la pendenza della depolarizzazione diastolica (**Figura 8B**).

Canali HCN

I costituenti molecolari delle correnti cationiche attivate in iperpolarizzazione appartengono ad una famiglia di canali denominati HCN (*Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated channels*) che comprende 4 isoforme: HCN1, HCN2, HCN3 e HCN4 [8],[9],[10],[11]. Queste presentano diversità sia dal punto di vista elettrofisiologico (cinetica, voltaggio dipendenza e risposta all'AMPC) sia dal punto di vista della distribuzione tissutale. Lo studio della sequenza amminoacidica e del profilo idrofobico ha permesso di classificare i canali HCN come appartenenti alla famiglia dei canali a 6 segmenti transmembrana, insieme ai canali di K^+ voltaggio dipendenti (K_V *Voltage Shaker*) e ai canali nucleotidi ciclici dipendenti (*CNG channels*). Analogamente agli altri membri della famiglia di canali di K^+ voltaggio-dipendenti, i canali HCN si assemblano a formare dei complessi tetrameric [12], [13]. In **figura 9** è mostrata la struttura di una subunità dei canali HCN.

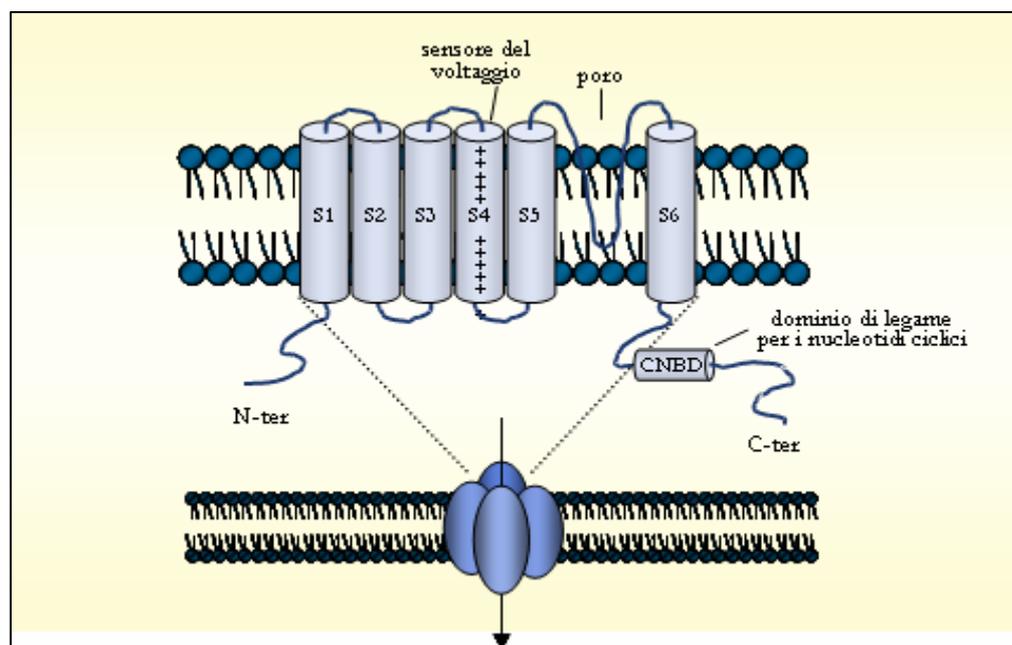


Figura 9: Struttura dei canali HCN. Rappresentazione di una singola subunità dei canali HCN. I 6 cilindri indicano i segmenti transmembrana; S4 è indicato come il sensore del voltaggio; il loop tra S5 e S6 come la regione del poro. A livello del C-terminale è indicato il sito di legame per i nucleotidi ciclici (CNBD). Nella parte inferiore è mostrato il tetramero formato dalle 4 subunità, inserito nella membrana plasmatica. (da [14]).

Ciascuna subunità comprende 6 segmenti transmembrana (S1-S6), di cui il segmento S4, carico positivamente, rappresenta il sensore del voltaggio e il loop tra i segmenti S5 e S6 forma la regione del poro: infatti il linker S5-S6 esibisce la sequenza amminoacidica GYG, sequenza firma dei canali selettivi per il potassio [15], [14]. A valle della sequenza GYG il canale presenta una serie di amminoacidi differenti rispetto ai canali di potassio (due residui carichi positivamente e una Istidina in più) che sono stati dimostrati essere responsabili dell'elevata permeabilità al sodio che lo contraddistingue [16]. Le estremità C ed N terminali sono intracitoplasmatiche; la porzione carbossiterminale mostra un dominio di 120 amminoacidi indicato come Cyclic Nucleotide Binding Domain (CNBD) in quanto rappresenta il sito di legame per i nucleotidi ciclici. Il CNBD è omologo a regioni simili in altre proteine che legano nucleotidi ciclici, incluse le proteinkinasi AMPc e GMPc dipendenti. Il canale funzionale è un complesso multimerico formato da quattro subunità [13].

Differenze strutturali. Le varie isoforme di canali HCN sono altamente conservate tra loro nelle regioni transmembrana S1-S6, con un livello di identità amminoacidica pari ad 80-90%, mentre, se si esclude la regione del CNBD, le sequenze dei carbossi e amino terminali variano considerevolmente sia per la lunghezza, sia per la sequenza primaria. Tale osservazione suggerisce che queste regioni possano essere responsabili delle differenze nelle proprietà biofisiche tra le varie isoforme (**Figura 10**).

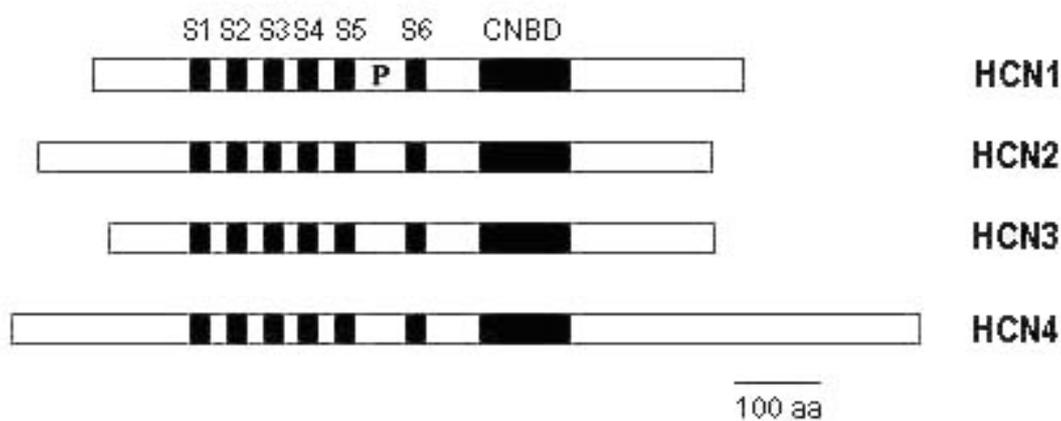


Figura 10: Struttura complessiva dei quattro membri della famiglia di canali HCN. I sei segmenti transmembrana sono numerati 1-6; P e CNBD indicano rispettivamente la regione del poro e il dominio di legame ai nucleotidi ciclici. [11].

Differenze funzionali. Quando espresse in sistemi eterologhi come oociti di *Xenopus* o cellule HEK 293, le isoforme HCN mostrano proprietà caratteristiche della corrente I_f nativa, come l'attivazione in iperpolarizzazione, la permeabilità ad entrambi gli ioni sodio e potassio

(conduzione di ioni Na^+ e K^+ (rapporto di permeabilità $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ di circa 0.2), la modulazione da parte dei nucleotidi ciclici e il blocco da parte dello ione Cs^+ [17], [18], [10], [19], [9]. Una significativa variabilità è mostrata invece nella cinetica di attivazione/deattivazione, come pure nella sensibilità alla modulazione da parte dei nucleotide ciclici. Le isoforme HCN possono essere classificate sulle basi delle loro rispettive cinetiche di attivazione. L'isoforma HCN1 è il canale che si attiva più velocemente con una costante di tempo di attivazione di circa 25-300 ms [10]; [20], seguita dalle isoforme HCN2 e HCN3 (range 180-500 ms). L'isoforma più lenta è HCN4 con una costante di attivazione compresa tra poche centinaia di ms, quando il potenziale di membrana è fortemente iperpolarizzato (ad esempio -140 mV), fino a diversi secondi, a voltaggi più depolarizzati (-70 mV) [17], [21], [22]. Le correnti prodotte dall'espressione di HCN1, HCN2, e HCN4 sono attivate in iperpolarizzazione, ma hanno differenti cinetiche di attivazione e di deattivazione con HCN1 più veloce, seguito da HCN2 e HCN4. L'analisi delle curve d'attivazione (**Figura 11**) mostra invece una posizione più iperpolarizzata per HCN2 ($V_{1/2}$ di -92 mV) seguita da HCN4 ($V_{1/2}$ di -84 mV) e da HCN1 ($V_{1/2}$ di -73mV) [23].

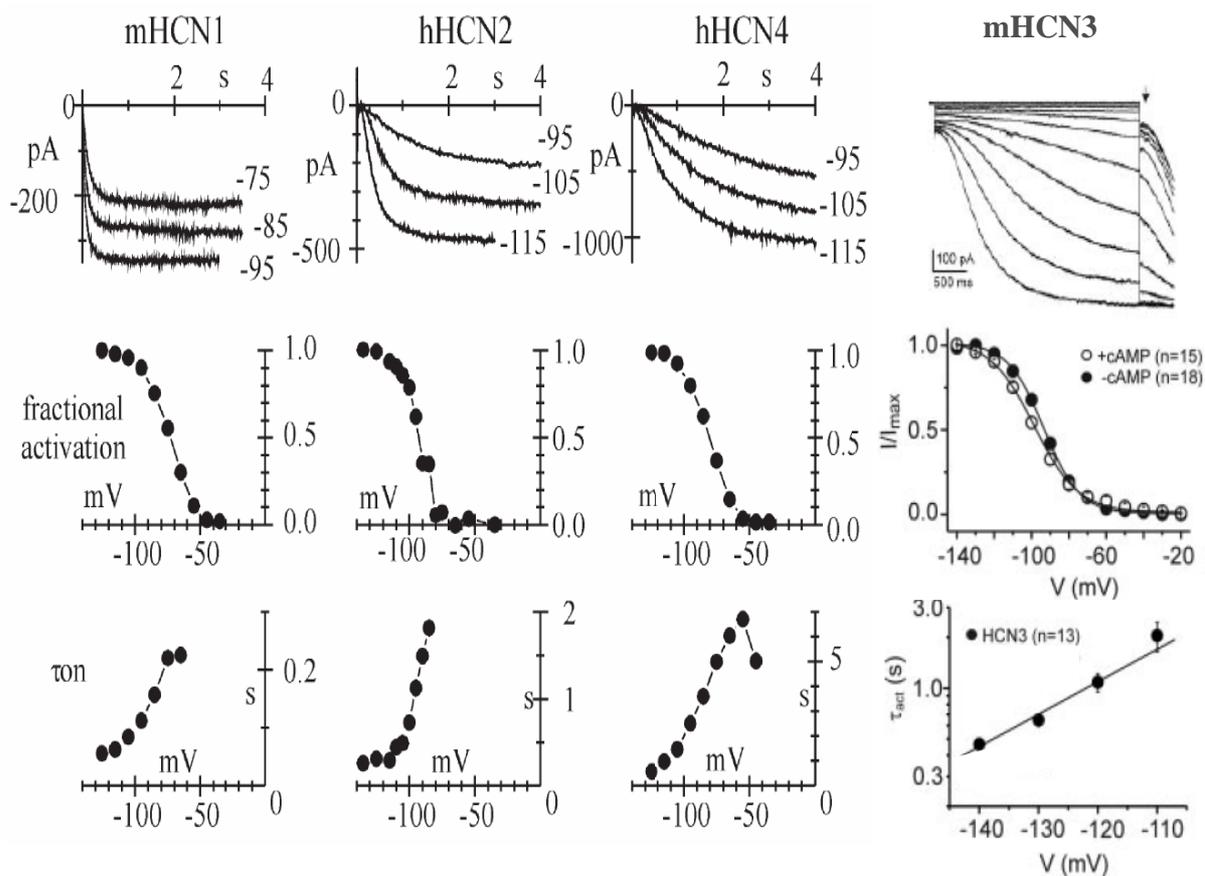


Figura 11: Differenze elettrofisiologiche delle isoforme HCN. Caratteristiche cinetiche delle diverse isoforme degli HCN espresse in cellule HEK-293. **In alto:** per mHCN1, hHCN2 e hHCN4 le tracce di corrente sono state registrate ai potenziali indicati partendo da un potenziale di riposo di -35mV; per mHCN3 le correnti sono state registrate partendo da un potenziale di riposo di -40 mV fino ad arrivare a -140 mV con steps di -20 mV per 3 s,

ogni gradino è seguito da uno step di 500 ms a -140 mV. **In mezzo:** curve di attivazione; per mHCN3 sono riportate le rispettive curve in presenza o in assenza di cAMP (0.5 mM). **In basso:** costanti di tempo di attivazione; per mHCN3 sull'asse delle ordinate l'unità di misura è riportata in scala logaritmica. mHCN1 (mouse-HCN1); hHCN2 (human-HCN2); hHCN4 (human-HCN4) (da [23]) e mHCN3 (mouse-HCN3) (da [24]).

La modulazione dei canali HCN da parte del AMPc avviene attraverso il legame diretto del nucleotide ciclico con il dominio CNB presente all'estremità C-terminale che provoca un aumento della probabilità di apertura del canale senza modificarne la conduttanza [7]. L'AMPc aumenta l'attività dei canali accelerando le cinetiche di attivazione in maniera voltaggio-dipendente e spostando il valore di $V_{1/2}$ verso voltaggi più positivi. Le isoforme altamente sensibili all'AMP ciclico sono HCN2 e HCN4 dove si registra uno shift del $V_{1/2}$ di circa +15mV, mentre è minimo, se non nullo, l'effetto su HCN1 (shift da 0 mV a +7 mV) [14]; [20]. Al contrario l'isoforma HCN3 non viene modulata dall'AMPc intracellulare [24], [25] (**Figura 12**).

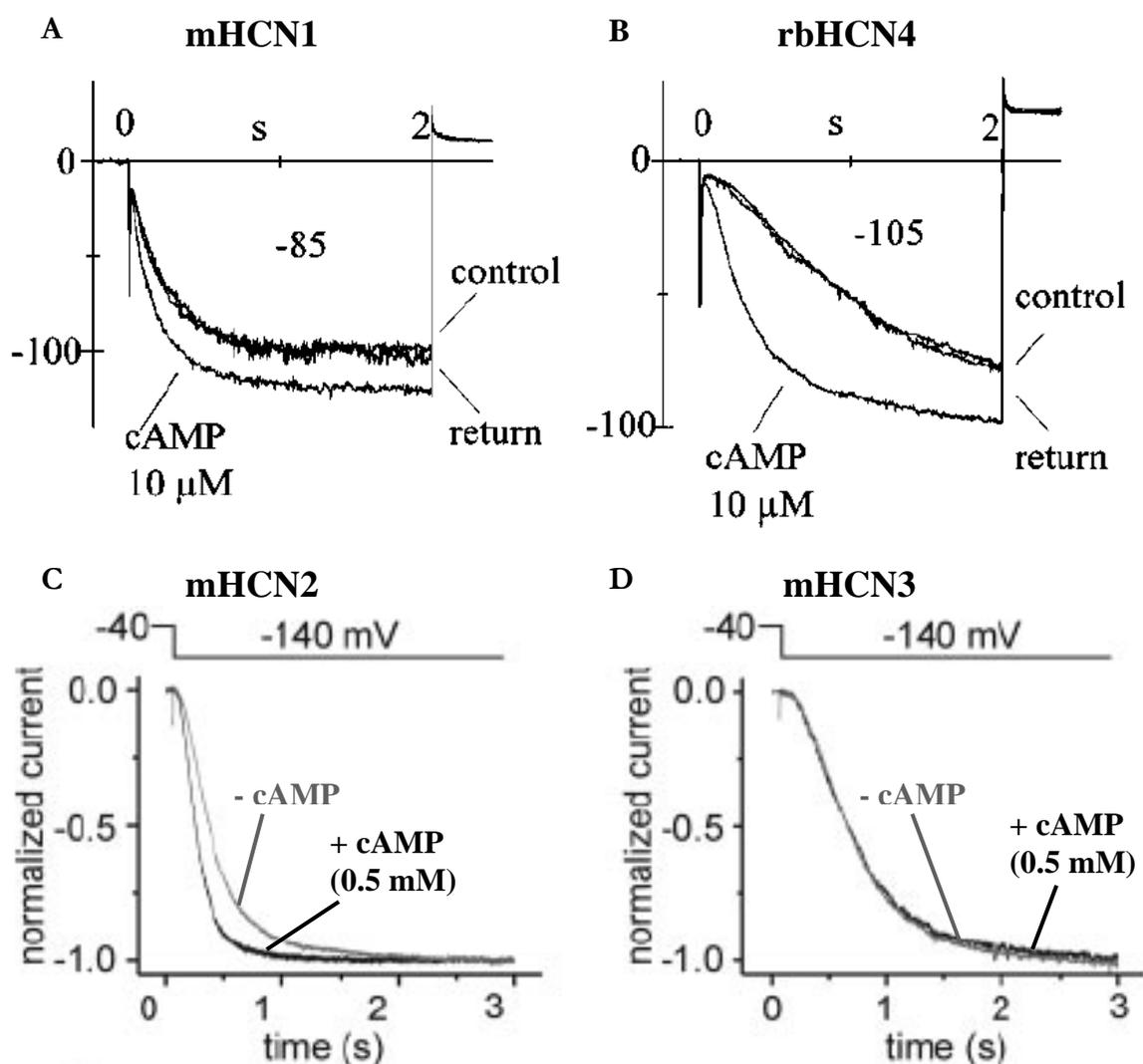


Figura 12: Azioni del cAMP sulla corrente generata dalle diverse isoforme dei canali HCN. **A e B:** le correnti sono state misurate ai potenziali indicati partendo da un potenziale di riposo di -35 mV in condizioni di controllo e in seguito a perfusione con cAMP 10^{-6} M. Gli shift della curva di attivazione erano di 7.6 e 17.4 mV per le isoforme 1 e 4, rispettivamente. Gli shift medi della curva di attivazione erano di 5.6 ± 0.5 mV (n=10) per la corrente mHCN1 e di 16.0 ± 0.9 mV (n=15) per la corrente rbHCN4 (da [22]). **C e D:** le tracce di corrente normalizzate sono state registrate, in assenza e in presenza di 0.5mM di cAMP intracellulare, ad un potenziale di -140 mV partendo da un potenziale di riposo di -40 mV. (da [24]).

Per spiegare l'azione del AMPc è stato proposto un modello in cui il dominio CNBD potrebbe diminuire l'inibizione: la diversità della modulazione da AMPc nelle diverse isoforme potrebbe essere dovuta a differenze nel grado di inibizione [26], [27].

Distribuzione tissutale. Tecniche di Northern Blot, ibridazione *in situ*, RNase Protection Assay e immunolocalizzazione hanno permesso di determinare l'espressione tessuto-specifica delle 4 isoforme HCN [28], [9], [29], [19], [30], [31]. A livello cardiaco sono stati rilevati alti livelli dell'isoforma HCN2 nel ventricolo, moderati nell'atrio, bassi nel SAN [31]. Nel Nodo Senoatriale l'isoforma 4 è senz'altro quella che presenta i più alti livelli di espressione (più dell'80% dell'HCN-mRNA totale) e nelle fibre del Purkinje [17], [18], [10], [31], [9], [11]. Anche l'isoforma HCN1 è espressa nel Nodo Senoatriale, dove rappresenta più del 18% dell'HCN-mRNA totale, e nelle fibre del Purkinje [31]. Bassi livelli di HCN2 sono stati riscontrati nel nodo senoatriale di coniglio [31]. Si è sempre creduto che l'isoforma HCN3 non fosse presente nel cuore, invece dati recenti indicano che è espresso nel ventricolo di topo [24]. In queste cellule HCN2 è l'isoforma maggiormente espressa, soprattutto nei ventricoli. Questi dati suggeriscono che l'espressione di HCN4 è correlata a cellule spontaneamente autoritmiche presenti nel tessuto di conduzione, mentre l'espressione di HCN2 è sostanzialmente correlata a miociti non spontaneamente attivi. Ciò rispecchia i cambiamenti dell'espressione dei canali HCN nel cuore di topo durante lo sviluppo embrionale [32]. Nei miociti ventricolari precoci che battono spontaneamente (9.5 giorni *postcoitum*) le isoforme dei canali HCN espresse in maniera predominante sono HCN4 e HCN1. Nei miociti embrionali più tardivi (da 18 giorni *postcoitum* a 1 anno prima della nascita), che nella maggior parte dei casi hanno perso la loro capacità di battere spontaneamente, HCN2 diventa la principale isoforma. Risultati analoghi sono stati precedentemente riscontrati nei miociti ventricolari neonatali e adulti di ratto [31]. Solo le isoforme HCN2 e HCN4 sono state rilevate in entrambe le tipologie di tessuto; mentre nei miociti neonatali HCN2 era espresso ad alti livelli (circa l'82% dell'mRNA totale dei canali HCN) e HCN4 era espresso a livelli molto più bassi (circa il 18% dell'mRNA totale dei canali HCN), nel ventricolo adulto di ratto questa percentuale cambiava risultando in un incremento

dell'espressione di HCN2 (circa il 93% dell'mRNA totale dei canali HCN, HCN4 diventa circa il 6.8%).

Dato che nessuna delle quattro isoforme ricalca perfettamente le proprietà del canale nativo, non si esclude la possibilità che esso sia in realtà un eterotetramero. Recentemente sono stati condotti degli esperimenti nel nostro laboratorio nei quali si dimostra che le isoforme HCN1 e HCN4 contribuiscono entrambe alla corrente f nativa nelle cellule senoatriali, coassemblandosi in canali eterotetramericici. È stato confermato che le proprietà cinetiche e la sensibilità al cAMP di questi eterotetrameri sono intermedie tra quelle dei canali monomerici HCN1 e HCN4 ed è stato riscontrato che queste proprietà sono strettamente dipendenti dalla composizione delle subunità dell'eterotetramero; nonostante gli eterotetrameri HCN4-1 presentino caratteristiche intermedie ai rispettivi omotetrameri, non riproducono completamente le proprietà dei canali f [33]. Quanto detto sottolinea l'importanza del contesto intracellulare nella determinazione di alcune delle caratteristiche del canale come ad esempio la voltaggio dipendenza. La variabilità funzionale riscontrata nella corrente I_f nativa potrebbe derivare da un'eterogenea distribuzione tissutale delle diverse isoforme, da una diversa composizione eteromultimerica del canale, dalla presenza di subunità accessorie e/o, molto probabilmente, dall'interazione con il "microenvironment" citoplasmatico unico dei vari tipi cellulari [34].

Cellule staminali

Le cellule staminali sono i precursori delle altre cellule che compongono gli organi di un individuo. Il termine “staminale” è utilizzato per definire una cellula “generica”, indifferenziata, in grado di dividersi, in modo asimmetrico, per periodi indefiniti (long-term self renewal) dando vita contemporaneamente ad altre cellule staminali e a cellule *precursori* di una progenie cellulare destinata a differenziarsi e a dar vita a tessuti e organi, come i muscoli, il cuore, il fegato, le ossa ecc.

In base alla capacità differenziativa le cellule staminali si possono dividere in quattro tipi:

- ✓ Le cellule staminali *totipotenti* (dal latino *totus* che significa *tutto*), che sono in grado di dare origine a tutte i tessuti dell'organismo, compresi quelli extraembrionali, come la placenta, il cordone ombelicale e il sacco vitellino. Solo lo zigote (uovo fecondato alla stadio di 4-8 cellule dopo 4-5 giorni dalla fecondazione) è totipotente.
- ✓ Le cellule staminali *pluripotenti* (dal latino *plures* che significa *parecchi*) sono in grado di generare tutte le cellule che fanno parte dell'organismo animale (cellule staminali embrionali) ma non le cellule che compongono i tessuti extra-embriionali.
- ✓ Le cellule staminali *multipotenti* sono in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule.
- ✓ Le cellule staminali *unipotenti* possono generare solamente un tipo di cellula specializzata.

Le cellule staminali si classificano anche secondo la provenienza come embrionali (Embryonic Stem Cells o ESCs) o adulte (Adult Stem Cells o ASCs). Entrambi i tipi di cellule possono essere coltivati *in vitro* e indotti a differenziare.

Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells o ESCs) provengono da un embrione allo stadio di blastocisti quindi a 4-5 giorni dalla fecondazione. La blastocisti è costituita da tre strutture: uno strato cellulare più esterno che circonda la blastocisti chiamato trofoblasto, che darà origine ai tessuti extraembrionali, una cavità interna o blastocele e la inner cell mass, un gruppo di circa 30 cellule all'interno del blastocele, destinato a differenziarsi per dare origine all'embrione (**Figura 13**). Le cellule embrionali staminali sono cellule pluripotenti, capaci quindi di generare tutti i differenti tipi cellulari presenti nell'organismo; sono cellule non specializzate

ed in grado di replicarsi in modo indefinito se mantenute in opportune condizioni. Inoltre sono geneticamente manipolabili.

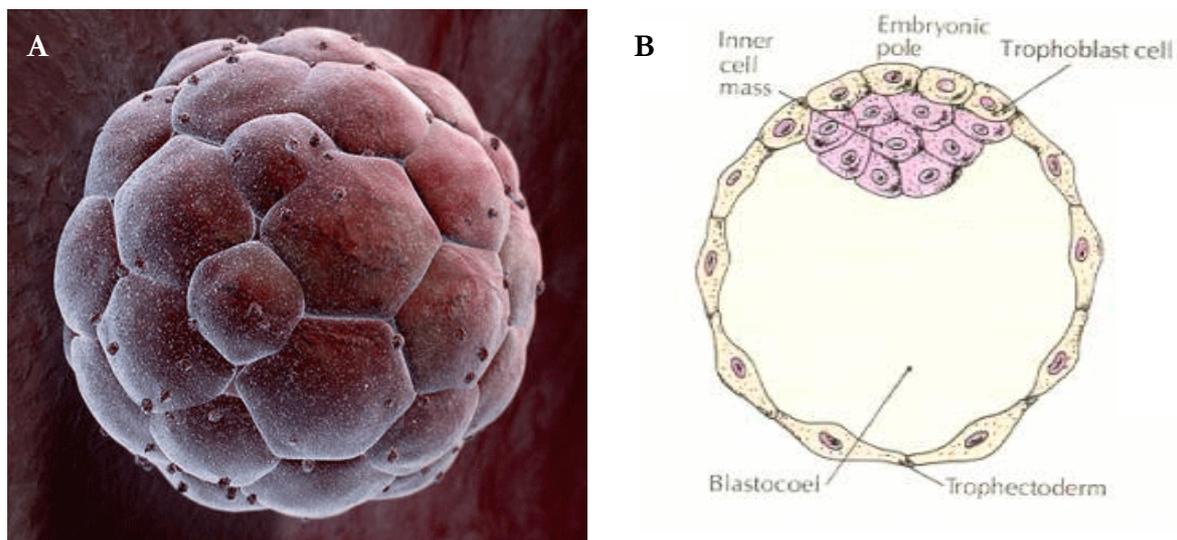


Figura 13: A: immagine elaborata al computer di una blastocisti umana. B: embrione di 4-5 giorni. (da *www.stemcells.nih.gov*).

Sono cellule pluripotenti, in grado di originare qualsiasi tipo cellulare proveniente dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma e endoderma). Grazie a queste caratteristiche, queste cellule potrebbero essere particolarmente utili per uso terapeutico nel tentativo di curare alcune patologie umane in cui vengono alterate funzioni cellulari o distrutti tessuti dell'organismo. Le ES potrebbero essere infatti una fonte rinnovabile per sostituire le cellule dei tessuti malati in un elevato numero di condizioni patologiche, come per esempio nel morbo di Parkinson, nel morbo di Alzheimer, nelle lesioni del midollo spinale, nelle ustioni, nel diabete o nelle malattie cardiache (**Figura 14**).

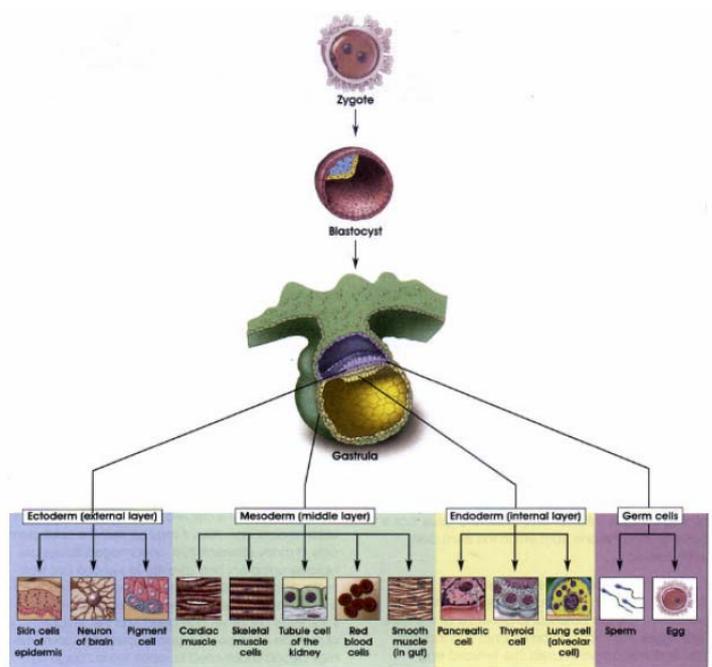


Figura 14: Plasticità delle cellule staminali embrionali. (da http://www.ecologiasociale.org/img/bio_stam_veto.jpg).

Le prime linee di *cellule staminali embrionali murine (mES)* furono generate nel 1981 da Evans e Martin, in modo indipendente, trasferendo cellule della Inner Cell Mass derivate da blastocisti di topo in colture contenenti feeder cells (fibroblasti murini utilizzati per fornire gli elementi necessari per il mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali) [35], [36]. Le colture risultanti contenevano popolazioni cellulari che crescevano come colonie, mostravano un'elevata capacità replicativa mantenendo la pluripotenza, ed erano capaci di differenziarsi in coltura in derivati dell'ectoderma, mesoderma ed endoderma. Le cellule staminali embrionali murine possono ora essere propagate *in vitro* sia attraverso l'uso di feeder cells, sia aggiungendo in coltura il fattore inibitore per la leucemia (LIF: Leukemia Inhibitory Factor, [37]). Le cellule staminali embrionali murine sono commercialmente disponibili, esistono inoltre protocolli ben documentati e standardizzati che ne consentono la coltivazione e il differenziamento, senza trascurare il fatto che il loro utilizzo non è vincolato da problemi di carattere etico. Per questi motivi le cellule staminali embrionali di origine murina sono le più utilizzate nel campo della ricerca. Negli ultimi trent'anni, le cellule staminali embrionali hanno avuto un grosso impatto nella ricerca biomedica permettendo di comprendere meglio molte malattie come diabete, distrofia muscolare, fibrosi cistica e osteoporosi.

L'isolamento di *cellule staminali embrionali umane (hES)*, avvenuto nel novembre del 1998 ad opera di un gruppo di biologi dell'Università di Madison nel Wisconsin, suscitò grande clamore [38].

Gli scienziati riuscirono a produrre cinque linee staminali indipendenti usando 14 blastocisti ottenute da embrioni umani prodotti da fecondazione *in vitro*, donati perchè in soprannumero. Queste linee cellulari erano in grado di proliferare prolungatamente senza differenziarsi e mantenevano la capacità di dare origine ad una varietà di specifici tipi cellulari quali cellule neuronali, muscolari, cartilaginee. Fin da subito si è compresa la grande potenzialità delle cellule staminali embrionali umane e si è aperta la prospettiva di un loro utilizzo clinico. Tuttavia esistono problemi tecnici legati all'uso di queste cellule. Ad esempio, le cellule staminali isolate da embrioni non impiantati, quali quelli ottenuti in eccesso durante procedure di fecondazione *in vitro*, potrebbero essere potenzialmente immunogeniche se trapiantate in un paziente e ciò richiederebbe procedure di immunosoppressione simili a quelle utilizzate attualmente per i trapianti d'organo. Una possibile soluzione a questo problema è rappresentata dalla clonazione terapeutica. In breve, il materiale genomico di una cellula somatica del paziente è trasferito in un ovocita di una donatrice dopo che da questo è stato eliminato il pronucleo. In alcuni casi l'ovocita con il nuovo nucleo comincia a subire una serie di divisioni che lo portano allo stadio di blastocisti. Dalla ICM della blastocisti si possono isolare cellule staminali che hanno lo stesso genoma del paziente e quindi non daranno problemi di rigetto. Altri problemi concernenti l'utilizzo delle cellule staminali embrionali *in vivo*: sono dovuti al fatto che non si conosce ancora come controllare la loro crescita fuori dalla provetta ed evitare quindi che diventino cellule tumorali.

Oltre ai problemi tecnici l'utilizzo di cellule staminali embrionali umane solleva importanti questioni di carattere etico: l'estrazione di queste cellule richiede la soppressione dell'embrione che non supera mai i quattordici giorni dalla sua fecondazione. Negli ultimi tempi le cellule staminali, in particolare la loro creazione e il loro impiego in medicina, sono diventate il tema scientifico più attuale: le ricerche e le scoperte si susseguono a ritmo sfrenato, occupando non solo le pagine delle riviste scientifiche specializzate ma anche quelle dei quotidiani o dei settimanali più popolari. Su questo tema si sollevano numerose polemiche: da una parte sulla capacità di queste cellule di curare malattie finora considerate inguaribili, dall'altra sulla moralità delle tecniche utilizzate per ottenerle.

In Italia la ricerca sulle cellule staminali embrionali è regolata dalla legge n. 40 del 19 febbraio del 2004, "*Norme in materia di procreazione medicalmente assistita*", che vieta qualunque sperimentazione condotta su embrioni umani e qualunque intervento di manipolazione che non sia finalizzato alla tutela della salute e dello sviluppo degli embrioni stessi. La legge non si pronuncia sulla sperimentazione condotta su staminali importate dall'estero o ricavate da embrioni umani, prima dell'entrata in vigore della legge in questione. L'Unione europea non ha

un regolamento comune riguardo la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane. Ogni Stato ha leggi differenti. In Italia è vietato l'utilizzo di embrioni soprannumerari per ricavarne cellule staminali, ma è consentita la ricerca su staminali importate da altri Paesi o su quelle ottenute prima che le leggi attuali entrassero in vigore.

Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte, invece, sono cellule indifferenziate multipotenti caratterizzate da un continuo self-renewal e sono localizzate, insieme alle cellule specializzate tipiche di un tessuto, all'interno del tessuto stesso o di un organo. Il loro ruolo principale in un organismo vivente è quello di mantenere l'omeostasi del tessuto in cui si trovano e di ripararlo in seguito ad un eventuale danno. Al contrario delle ES, che hanno un'origine ben definita, l'origine delle cellule staminali adulte nei tessuti maturi è ancora ignota.

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: le cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che danno origine ai vari tipi di cellule del sangue e le 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 [39], [40], [41], [42], [43] (**Figura 15**).

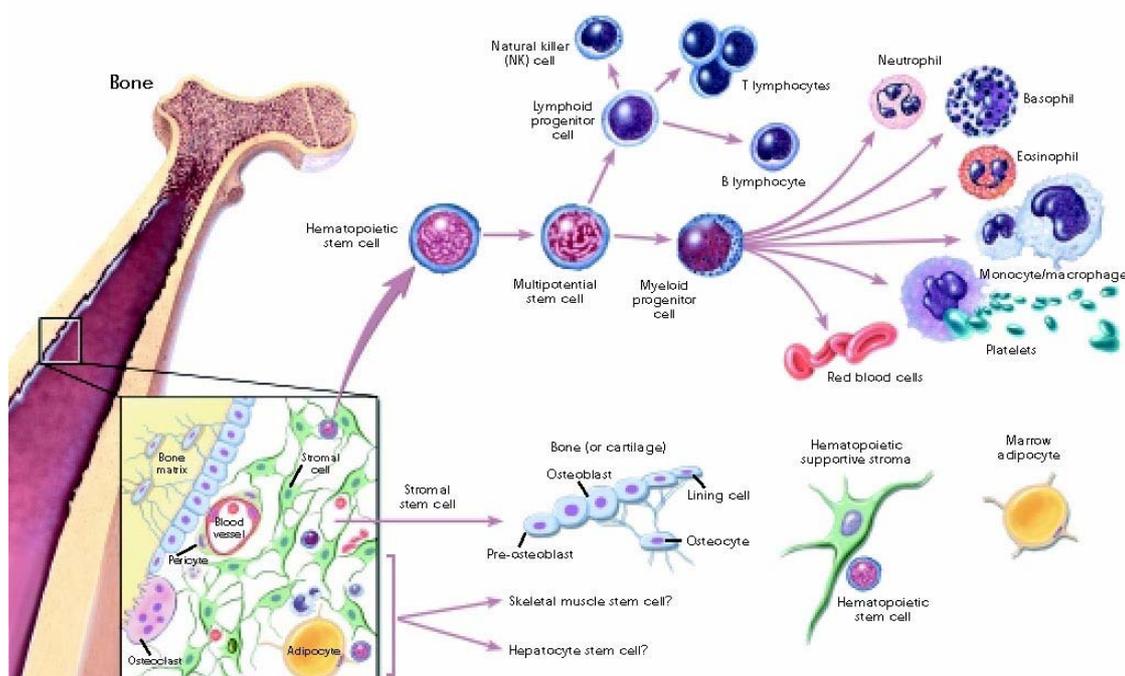


Figura 15: Cellule staminali del midollo osseo: Differenziamento di cellule staminali ematopoietiche e mesenchimali del midollo osseo. (da www.stemcells.nih.gov).

È più recente invece la scoperta di cellule staminali in organi considerati da sempre privi di capacità rigenerativa come il cervello e il cuore [44], [45]. Le cellule staminali cardiache (Cardiac Stem Cells, CSCs) (**Figura 16**) 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.

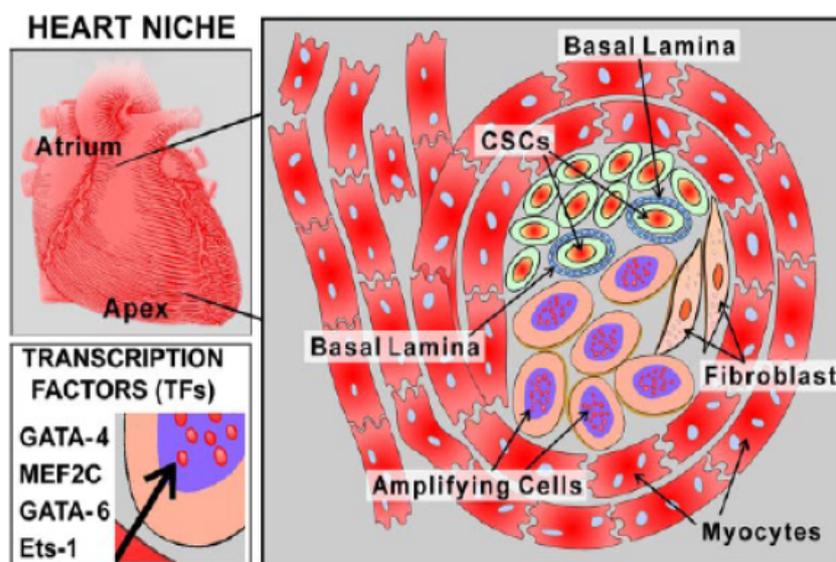


Figura 16: Origine e proprietà delle cellule staminali cardiache.

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 specifiche *nicchie* dove rimangono allo stato quiescente per molto tempo e quando vengono attivati in caso di malattia o danno iniziano a proliferare, migrano fuori dalla nicchia e vanno incontro al differenziamento [46], [47]. 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 le loro capacità di self-renewal o di un eventuale differenziamento. L'architettura di ciascuna nicchia sembra essere costruita *ad hoc* per le esigenze della cellula staminale e ciascuna cellula staminale sembrerebbe giocare un ruolo importante nell'organizzazione e nelle peculiarità della nicchia. Quindi è una combinazione sia del comportamento della cellula staminale sia delle caratteristiche della nicchia stessa a costituire questo microambiente importante per la protezione e il mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule staminali residenti [46]. 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

(cellule multipotenti). Diversi esperimenti hanno dimostrato invece che alcuni tipi di cellule staminali adulte sono pluripotenti 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 [48], [49], [50], [51] mentre le cellule staminali del cervello possono originare anche cellule del sangue e cellule muscolari scheletriche [52],[53] (**Figura 17**).

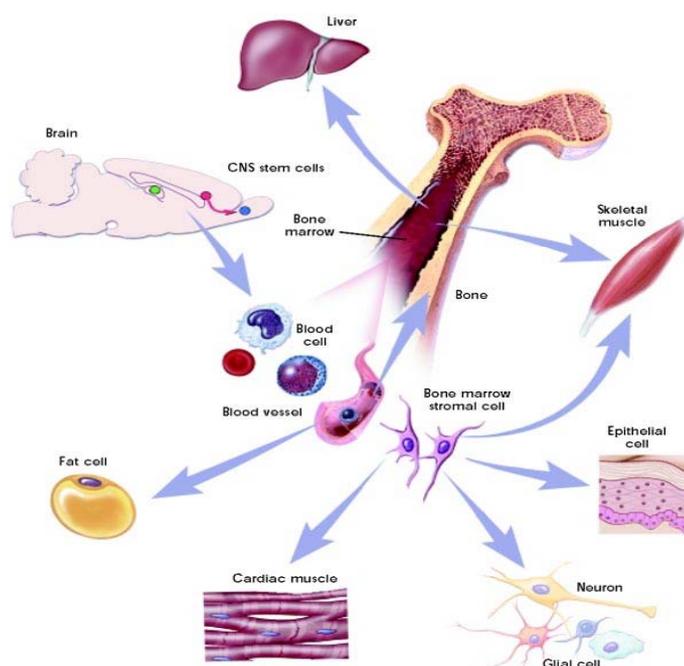


Figura 17: Pluripotenza delle cellule staminali. (da www.stemcells.nih.gov).

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. Recentemente è stata identificata una nuova popolazione di cellule staminali associati ai vasi sanguigni in grado di differenziare in diversi tipi di cellule mesodermiche e perciò chiamati *mesoangioblasti* (Mabs) [54],[55].

Queste cellule sono caratterizzate oltre che dalla presenza di tipici markers staminali, CD34 e Sca-1 anche di markers endoteliali precoci, tra cui Flk-1 e VE-cadherin e di marker muscolari tra cui α -SMA (α smooth muscle actin), Myf5 e MyoD. Per la loro capacità di differenziare spontaneamente in cellule muscolari si pensa possano essere impiegate nella cura della distrofia muscolare; un recente lavoro ha mostrato risultati promettenti in cui 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 [56], [57].

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 è causato 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 prolasso 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

Le cardiopatie ischemiche sono le patologie cardiache con più alta incidenza; in Italia interessano il 5% della popolazione, con 2.000.000 di malati e 350.000 nuovi casi ogni anno. Queste patologie sono caratterizzate 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. La manifestazione più grave dell'ischemia cardiaca è l'infarto del miocardio che si manifesta con una sensazione dolorosa di costrizione o di oppressione al torace, in corrispondenza del cuore, che può irradiarsi alla spalla e al braccio sinistro. L'insufficiente apporto sanguigno ha come conseguenza la necrosi del tessuto miocardico che era prima irrorato dall'arteria ostruita, ma nei casi più gravi può portare al collasso cardiocircolatorio e 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 a un progressivo assottigliamento del tessuto muscolare con l'alterazione della configurazione e della contrattilità del ventricolo sinistro. Le terapie ad oggi utilizzate nei casi di cardiopatie ischemiche comprendono l'uso di farmaci vasodilatatori, anticoagulanti e trombolitici che migliorano la circolazione sanguigna, ma nei casi di maggior gravità sono necessari interventi chirurgici come il by-pass o l'angioplastica. Nessuna di queste terapie è però 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 [58].

Nonostante sia stato dimostrato che le cellule staminali adulte sono caratterizzate da un certo grado di plasticità, la loro capacità di dare origine ad un fenotipo cardiaco differenziato è tuttora oggetto di discussione da parte di molti scienziati. Sono stati infatti riportati in letteratura risultati in contraddizione tra loro riguardo al differenziamento delle cellule staminali verso una linea cardiomiocitaria. Molti ricercatori ritengono possibile una fusione cellulare, altri scienziati invece supportano il processo di differenziamento.

Cellule staminali embrionali

Sono molto più versatili rispetto alle cellule staminali adulte e in grado di differenziare in diversi tipi cellulari. In particolari condizioni di coltura le cellule staminali embrionali umane sono in grado di differenziare in cardiomiociti che esprimono marker cardiaci e rispondono a farmaci cardioattivi [59], [60]. Inoltre, in un modello murino, è stato dimostrato che cellule staminali embrionali iniettate direttamente nel miocardio sono in grado di integrarsi nel tessuto, migliorare la funzione ventricolare e la contrattilità cardiaca dopo circa 6 settimane dal trapianto [61].

Cellule progenitrici endoteliali

Le cellule progenitrici endoteliali (Endothelial Progenitor Cells o EPCs) provengono dal midollo osseo e nell'adulto contribuiscono alla formazione di nuovi vasi sanguigni in risposta a particolari condizioni fisiologiche e patologiche. Queste cellule sono state impiegate in diversi studi per verificare la loro capacità di differenziamento verso un fenotipo cardiaco e la capacità di migliorare la funzionalità cardiaca in modelli di infarto. In questi modelli *in vivo* gli effetti delle EPCs dopo un evento ischemico, sono state valutate o in seguito alla loro mobilitazione dal midollo osseo al sangue periferico attraverso la somministrazione di particolari fattori quali fattori di crescita, citochine e chemochine, oppure iniettando queste cellule in prossimità dell'area infartuata. In un modello murino le EPCs umane sono state iniettate in circolo dopo

infarto del miocardio e si è osservato un accumulo di queste cellule nell'area ischemica seguito da un aumento della formazione di capillari. Il trapianto di queste cellule è quindi in grado di migliorare la funzionalità cardiaca prevenendo l'apoptosi dei miociti cardiaci e limitando il rimodellamento ventricolare piuttosto che rigenerando il miocardio. Alcuni autori hanno dimostrato che le cellule progenitrici endoteliali possiedono la capacità di transdifferenziare in cardiomiociti e quindi contribuire alla rigenerazione cardiaca [62]. Questa capacità è però messa in dubbio da altri studi in cui viene dimostrato che l'acquisizione di un fenotipo cardiaco dipenda da un processo di fusione con i miociti residenti [63].

Cellule staminali ematopoietiche

Diversi studi hanno suggerito un possibile utilizzo delle cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) nella terapia post-infarto per la loro capacità di transdifferenziare e quindi contribuire alla rigenerazione di diverse linee cellulari non ematopoietiche. Orlic e collaboratori hanno dimostrato che in modelli murini l'iniezione di HSCs nell'area infartuata era in grado di rigenerare circa il 70% dell'area danneggiata dall'ischemia [50]. Questi risultati sono stati parzialmente confermati da un altro studio che ha dimostrato la capacità delle cellule staminali ematopoietiche di integrarsi al tessuto lesa ma solo in modo transiente (fino a 28 giorni dal trapianto). Da notare che la maggior parte delle cellule all'interno dell'area infartuata conservava l'identità ematopoietica e i pochi cardiomiociti generati erano il risultato di un processo di fusione e non di differenziamento [64].

Nonostante ci siano in letteratura dati che mostrano un miglioramento della funzionalità cardiaca in seguito a somministrazione di cellule staminali del midollo osseo, il meccanismo preciso attraverso cui ciò avviene è ancora oggetto di discussione [65], [66].

Cellule staminali mesenchimali

La capacità delle cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells o MSCs) o cellule stromali del midollo osseo (Bone Marrow Stromal Cells o BMSCs) di migliorare la funzionalità cardiaca in seguito a infarto del miocardio è stata indagata in diversi studi. L'iniezione di queste cellule direttamente nel miocardio di ratto infartuato ha condotto alla rigenerazione del miocardio e alla formazione di nuovi vasi sanguigni [67]; un altro studio ha mostrato che cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) iniettate nel cuore di topo erano in grado di differenziare verso un fenotipo cardiaco [68]. Studi condotti sui maiali hanno dimostrato che le hMSCs, quando co-iniettate con cardiomiociti fetali, sono in grado di aumentare il flusso sanguigno, generare nuovi miociti cardiaci e ridurre l'area danneggiata conducendo a un

miglioramento globale della funzionalità cardiaca [69]. Anche in questo caso, come per tutte le cellule staminali adulte, i miociti risultanti potrebbero essere il risultato di una fusione e non di un differenziamento.

Cellule staminali cardiache

Nel 2003 Anversa e collaboratori hanno dimostrato che il cuore è dotato di cellule staminali proprie e su questo è stata inaugurata una nuova linea di ricerca [45]. Gli studi di Anversa su modelli murini mostrano che le cellule staminali cardiache (CSCs) sono in grado di attenuare il rimodellamento conseguente all'infarto, migliorare i parametri di funzionalità cardiaca e diminuire l'area infartuata del 29%, favorendo lo sviluppo di nuovi cardiomiociti e strutture vascolari [70]. I meccanismi attraverso cui le CSCs promuovono la rigenerazione non sono ancora del tutto chiari. Il lavoro dimostra comunque che le cellule staminali cardiache non si fondono con i cardiomiociti dell'ospite ma differenziano in nuovi cardiomiociti, anche se in bassa percentuale (0,83%). Inoltre queste cellule, dopo la loro attivazione, possono dare origine anche a cellule parenchimali e vasi sanguigni portando quindi a un miglioramento della funzionalità cardiaca [71], [70].

Mesoangioblasti

I mesoangioblasti murini sono stati iniettati nella camera ventricolare sinistra di un modello di topo infartuato; il trattamento ha portato ad un miglioramento della funzionalità cardiaca che può essere ricondotto a numerosi fattori tra cui la generazione di nuovi elementi contrattili ma anche la riduzione dell'apoptosi dei miociti cardiaci residenti e la formazione di nuovi vasi sanguigni [72].

Patologie a carico della generazione e conduzione dell'impulso elettrico

A riposo un cuore normale batte dalle 60 alle 80 volte al minuto cioè circa 100.000 volte al giorno. Durante l'esercizio fisico o in condizioni di stress emotivo, il corpo necessita di una maggiore quantità di ossigeno e, per rispondere a queste richieste fisiologiche, deve pompare più sangue aumentando la sua frequenza di battito fino a oltre 100 volte al minuto. Talvolta il sistema di conduzione cardiaco, a causa di particolari condizioni quali il normale processo di invecchiamento, eventi ischemici, malattie cardiache varie, disordini del sistema nervoso periferico, non funziona bene. Le disfunzioni che si possono venire a creare possono riguardare il nodo del seno, il nodo atrio ventricolare o le normali vie di conduzione.

Per quanto riguarda il nodo del seno, gli impulsi che partono da esso possono essere troppo lenti (bradicardia sinusale), alternativamente troppo lenti o troppo veloci (sindrome bradicardia tachicardia) o possono saltuariamente mancare (pausa sinusale). A causa di questi problemi gli atri e/o i ventricoli si contraggono ad un ritmo troppo lento, con un numero di battiti al minuto inferiore a quanto sarebbe necessario.

Nel caso di blocco totale, la frequenza di pulsazione dei ventricoli è data dalla frequenza intrinseca del nodo AV e, qualora anch'esso presentasse un deficit, dalla frequenza intrinseca dei fasci che costituiscono il sistema di conduzione ventricolare. Di conseguenza nel caso di blocco completo, i ventricoli pulsano ad una frequenza minore (*bradicardia*). Se la frequenza cardiaca è eccessivamente bassa, si ha quella che viene definita *sindrome di Stokes-Adams*, che costituisce un serio problema che può mettere a repentaglio la vita stessa (la prognosi è di blocco completo e sindrome di Stokes-Adams ha un indice di mortalità del 50% nell'arco di un anno). In questo caso l'impianto di un pacemaker artificiale è obbligatorio.

Un'altra condizione, conosciuta come *Sick Sinus Syndrome (SSS)* o sindrome del seno malato, costituisce un altro caso in cui l'impianto di un pacemaker artificiale è consigliabile. Questa patologia interessa il nodo senoatriale e comporta la presenza di frequenze cardiache inappropriate per le richieste fisiologiche dell'organismo. La SSS non ha un'unica eziologia e patogenesi, ma racchiude una serie di condizioni che alterano il tracciato elettrocardiografico, quali le bradiaritmie atriali, le tachiaritmie atriali, la tachicardia ventricolare oppure l'alternanza di bradicardia e tachicardia [73]. In questo caso, la bradicardia deriva da una frequenza del nodo SA eccessivamente bassa e quindi, anche in assenza di defezioni a livello del nodo AV, i ventricoli pulsano ad una frequenza troppo bassa. Tipicamente si manifesta come una bradicardia sinusale o comunque una bradicardia non adeguata alle richieste fisiologiche (insufficienza cronotropa). Nei casi più gravi possono verificarsi arresti sinusali e blocchi senoatriali. La diagnosi viene solitamente effettuata con il solo ausilio dell'elettrocardiogramma. Il decorso della sindrome in assenza di terapia è discontinuo, con periodi di marcata disfunzione sinusale alternati a periodi di relativa normalità. La malattia del nodo del seno determina il 40-50% delle indicazioni all'impianto di pacemakers elettronici. Spesso queste patologie cardiache sono resistenti alle cure farmacologiche oppure possono essere soggette a trattamenti inadeguati: farmaci cardioattivi quali digossina, quinidina e procainamide possono causare arresti sinusali periodici o blocchi senoatriali, altre sostanze possono peggiorare i sintomi della SSS [73]. L'unica terapia possibile in molti pazienti con questo tipo di patologia richiede l'impianto di un pacemaker elettronico, che contribuisce a diminuire l'incidenza di fibrillazione atriale, eventi tromboembolici, danno miocardico 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:

- B.A.V. di I grado, consiste in un ritardo della conduzione atrio-ventricolare e non necessita di terapia;
- B.A.V. di II grado, è un'interruzione intermittente nella conduzione degli impulsi atriali ai ventricoli, richiede l'impianto di un pacemaker.
- B.A.V. di III grado, caratterizzato dal blocco completo della conduzione elettrica fra atrio e ventricolo. In questo caso un altro centro elettrico ausiliario genera un ritmo molto lento che assicura la sopravvivenza ma non consente di svolgere attività che richiedono al cuore un certo sforzo. Il BAV completo richiede l'impianto di un pacemaker.

Pacemaker elettronico e Pacemaker biologico

Pacemaker elettronico

In ogni situazione in cui i disturbi nella genesi e nella conduzione dell'impulso non possono essere trattati farmacologicamente, è necessario che il cuore sia assistito da un pacemaker artificiale: un "segnapassi", un apparecchio elettronico, piccolo e leggero, che viene sistemato sotto la clavicola destra, in un alloggiamento creato tramite un'operazione chirurgica. Il pacemaker non è altro che un sistema di stimolazione costituito dal generatore di impulsi (il pacemaker vero e proprio), il connettore e gli elettrodi di stimolazione (**Figura 18**).



Figura 18: Un moderno pacemaker elettronico. (da <http://www.syncope.co.uk/pacemaker1.htm>).

Il primo impianto di questo apparecchio è stato effettuato nel 1960; oggi, i dispositivi moderni registrano i battiti cardiaci e, quando è necessario, generano degli impulsi simili a quelli inviati naturalmente dal sistema di conduzione del cuore; in tal modo il cuore riprende il suo ritmo regolare. La particolarità del pacemaker è la capacità di intervenire quando il cuore batte troppo lentamente, senza per questo impedire all'organo di funzionare autonomamente. I moderni pacemakers sono costituiti da un leggero astuccio in titanio biocompatibile che contiene un minuscolo computer e una batteria di lunga durata. Gli elettrodi (uno o due) sono fili ricoperti da una plastica morbida e flessibile, elettricamente isolati, che vengono posizionati direttamente nel ventricolo o nell'atrio destro; essi hanno il compito di consentire al generatore di "ascoltare" il cuore e di inviare al cuore stesso gli impulsi prodotti dal generatore. 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 e ormonale in risposta a l'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. Inoltre, le batterie hanno una durata limitata e richiedono la sostituzione ogni 5-10 anni; dal momento che sono sigillate all'interno del generatore, per sostituirle è necessario cambiare l'intero generatore e quindi intervenire nuovamente in modo invasivo sul paziente. L'insorgenza di infezioni può richiedere talvolta la rimozione e la sostituzione del pacemaker.

Date le importanti problematiche dei pacemaker elettronici, da alcuni anni la ricerca biomedica si è orientata verso la creazione di un pacemaker biologico che possa sostituire gli attuali pacemakers artificiali nella cura di disturbi aritmici e che sia in grado di generare un ritmo stabile e di modulare la frequenza cardiaca in modo appropriato e rapido in seguito a situazioni di stress, esercizio fisico, emozioni. Per la generazione di un substrato autoritmico che funga da pacemaker biologico sono stati utilizzati diversi approcci (vedi sezione pacemaker biologico) che prevedono anche l'utilizzo di cellule staminali, data la loro plasticità e la possibilità di essere manipolabili.

Pacemaker biologico

Le strategie sviluppate per la creazione di un pacemaker biologico in vivo sono state fino ad oggi di due tipi: strategia genica. e strategia cellulare. Il primo tipo di approccio si propone l'obiettivo di modificare le proprietà delle cellule già residenti nel miocardio in modo da incrementarne l'attività autoritmica intrinseca oppure generare attività spontanea in cellule normalmente quiescenti.

Con la strategia cellulare, invece, si intende creare un pacemaker *ex novo* attraverso l'impianto di cellule staminali ingegnerizzate in modo da funzionare da generatori dell'impulso elettrico oppure differenziate verso un fenotipo dotato di capacità autoritmica.

Gene-therapy. Il primo tentativo di risolvere problemi del ritmo attraverso la terapia genica è stato effettuato iniettando nell'atrio destro di cuori murini e di maiale un costrutto plasmidico contenente il gene del recettore β -adrenergico [74], [75]. In entrambe le specie l'overespressione

dei recettori β_2 -adrenergici, nella zona di iniezione, ha permesso di incrementare la sensibilità alla modulazione simpatica con un conseguente aumento del ritmo cardiaco basale di circa il 40-50%. Sebbene questi esperimenti dimostrano che il pacemaker biologico non è solo un concetto, ma una potenziale realtà, questo lavoro presenta diverse limitazioni come la breve durata dell'effetto (solo 24 ore), l'uso di un vettore plasmidico e il fatto che sovraesprimendo i recettori β_2 -adrenergici viene modulata l'attività dei canali pacemaker pre-esistenti ma non ne vengono creati di nuovi. Attraverso questo approccio è quindi possibile modulare soltanto una funzione e non reintrodurla *ex novo*.

Ricerche successive sono state volte a modificare la fisiologia di cardiomiociti non autoritmici in modo da renderli capaci di generare un battito spontaneo. Per raggiungere questo obiettivo sono state sperimentate due vie alternative: la soppressione della corrente uscente iperpolarizzante I_{K_1} e la sovraespressione di canali pacemaker. La prima strategia parte dall'idea che l'attività autoritmica atriale e ventricolare sono latenti e vengono soppressi dalla presenza della corrente I_{K_1} (famiglia Kir2), che stabilizza il potenziale di membrana a valori negativi (-75/-80 mV) e sopprime l'eccitabilità; per cui, spegnendo questa corrente si potrebbe "svelare" l'attività autoritmica. La soppressione di questa corrente è stata ottenuta producendo un costrutto contenente un gene kir 2.1 (subunità α accessoria del canale di potassio rettificatore entrante) mutato. Il gene con la mutazione (dominante negativo) codifica per una subunità α difettosa che, coassemblandosi con le altre subunità endogene, dà origine ad un canale non funzionale. Il dominante negativo, inserito con la proteina fluorescente Green Fluorescent Protein (GFP) in un costrutto adenovirale, è stato iniettato nella camera ventricolare sinistra di cavie [76]. Gli esperimenti effettuati confermano che 3-4 giorni dopo l'iniezione si è ottenuta una soppressione di I_{K_1} dell'80% nei miociti infettati dal costrutto adenovirale. Inoltre questi miociti, isolati dal cuore, mostrano potenziali d'azione spontanei. I principali problemi riguardano l'alterazione del ritmo cardiaco, per la formazione di foci ventricolari, e la comparsa di fenomeni aritmici letali dovuti al prolungamento della fase di ripolarizzazione (~15%). Inoltre, l'attività spontanea che si genera nei miociti ventricolari non è modulata direttamente dal sistema autonomo in quanto, in queste cellule, la principale componente ionica depolarizzante durante la fase 4 non è rappresentata dalla I_f ma dallo scambiatore Na^+/Ca^{2+} . Prendendo atto di questi risultati gli esperimenti successivi si sono focalizzati sull'over-espressione di canali HCN, i componenti molecolari della corrente I_f . Questo approccio presuppone tre vantaggi:

- La I_f è una tra le componenti ioniche determinanti nel processo di pacemaking.

- La corrente I_f è presente unicamente durante la diastole e quindi la sua sovraespressione non causa alterazioni delle altre fasi del potenziale d'azione.
- I canali HCN sono modulati direttamente dal sistema autonomico.

È stato dimostrato che la sovraespressione del gene HCN2 in colture di miociti ventricolari neonatali che presentano attività spontanea irregolare è in grado di generare un ritmo stabile con potenziali d'azione caratterizzati da una fase di depolarizzazione diastolica lenta normalmente assente in questi preparati e aumentare la frequenza e la regolarità del battito [77]. Anche in questo caso è stato creato un costrutto adenovirale, contenente però il gene HCN2 accoppiato al gene per la proteina GFP. Il virus è stato iniettato nell'atrio sinistro e nella branca discendente sinistra del sistema del Purkinje di cani nei quali l'attività intrinseca del nodo del seno era stata soppressa tramite stimolazione vagale [78], [79]. Gli animali trattati presentavano una sorgente di ritmo spontaneo nell'area dell'iniezione, modulabile tramite somministrazione di adrenalina. Un aspetto negativo di questa strategia è la formazione di ecchimosi e la creazione di un ritmo ectopico vicino al sito di iniezione per le prime 48 ore. Nonostante quest'ultima strategia sia stata l'unica in grado di originare un ritmo ventricolare stabile e modulabile da parte del sistema nervoso autonomico, l'utilizzo di un vettore virale e la durata limitata dell'infezione limita notevolmente la possibilità di applicazioni terapeutiche; inoltre, l'utilizzo di virus come vettori non ha prospettive cliniche in quanto non si possono escludere con certezza casi di infettività o neoplasia.

Cell-therapy. La terapia cellulare mira a creare pacemaker *ex novo* e prevede l'utilizzo di cellule staminali adulte ingegnerizzate o di cellule staminali embrionali differenziate in vitro verso la linea cardiaca.

Una delle strategie utilizzate consiste nel modificare geneticamente cellule staminali mesenchimali umane adulte (hMSC) affinché esse esprimano i canali HCN necessari alla funzione di pacemaking (normalmente poco espressi nei miociti ventricolari quiescenti) per poi impiantarle nel miocardio. Dalla letteratura è noto che le cellule staminali mesenchimali esprimono endogenamente connesine cardiache (isoforme 40 e 43) [80]: questo garantirebbe la connessione elettrica tra le cellule staminali opportunamente ingegnerizzate ed i miociti residenti. Il pacemaker così ottenuto può essere definito passivo, in quanto la cellula staminale non è in grado di generare potenziali d'azione, ma fornisce solamente una fonte di corrente entrante depolarizzante che conduce il potenziale di membrana del miocita adiacente alla soglia per la genesi del potenziale d'azione. Il miocita ventricolare presenta un potenziale di riposo di -75 mV; grazie alla comunicazione elettrica garantita dalle *gap-junctions*, anche il potenziale di

membrana della cellula staminale è trascinato verso valori negativi; nella cellula staminale a valori iperpolarizzati del potenziale di membrana si aprono i canali HCN, con conseguente ingresso di corrente depolarizzante; la membrana del miocita risente della depolarizzazione e raggiunge il valore soglia per la genesi del potenziale d'azione. Il pacemaker biologico passivo è stato sperimentato sul miocardio ventricolare di cani sottoposti a stimolazione vagale per sopprimere il ritmo sinusale. Gli animali trattati tramite l'impianto di cellule staminali modificate geneticamente presentavano un ritmo ventricolare con frequenza di 60 battiti al minuto, un valore significativamente maggiore rispetto ai non trattati [81]. Il pacemaker passivo funziona e permette di eliminare l'utilizzo di vettori virali; inoltre non necessita del differenziamento della cellula staminale. Tuttavia anche questo tipo di pacemaker presenta delle limitazioni legate alla mancanza di modulazione da parte del sistema autonomo (a meno che non si introducano nella cellula staminale anche recettori adrenergici e muscarinici) e altri limiti legati all'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali umane adulte riguardano la possibile insorgenza di neoplasie, la possibile migrazione di queste cellule in altri siti e il differenziamento in altri tipi cellulari (**Figura 19A**).

La strategia ad oggi più promettente sembra essere la terapia cellulare applicata alla creazione di un substrato che non sia semplicemente un fornitore passivo di corrente necessaria al pacemaking ma che sia di per sé elettricamente attivo e modulabile, in modo da mimare il più possibile la situazione fisiologica. A questo scopo, recentemente, si è cercato di sfruttare le potenzialità differenziative delle cellule staminali con lo scopo di utilizzarle come fonte cellulare sostitutiva. Particolare attenzione è stata posta sull'uso di cellule staminali embrionali, in quanto possiedono un potenziale differenziativo intrinseco più elevato e si sono dimostrate più facilmente manipolabili rispetto alle staminali adulte. Ad oggi è stato dimostrato che le cellule staminali embrionali umane e murine possono essere indotte a differenziare *in vitro* in cardiomiociti autoritmici [82], [83], [60]. Inoltre, le cellule così differenziate sono in grado di stimolare un substrato quiescente sia *in vitro* [84] che *in vivo* [85], [86], funzionando quindi come un pacemaker. Le cellule staminali embrionali umane coltivate *in vitro* ed indotte a differenziare sono in grado di formare aggregati cellulari compatti, detti Embryoid Bodies, contenenti cellule contrattili. Dopo l'induzione di un blocco AV, attraverso ablazione del fascio di His, le porzioni contrattili degli EBs sono state iniettate nella parete del ventricolo sinistro del cuore di maiale o di cavia. Dopo pochi giorni dal trapianto si è osservato un nuovo ritmo ventricolare stabile modulato dalle catecolamine [84], [86]. In questo caso il pacemaker biologico si definisce attivo in quanto la cellula staminale differenziata in miocita autoritmico è capace di generare spontaneamente potenziali d'azione (**Figura 19B**).

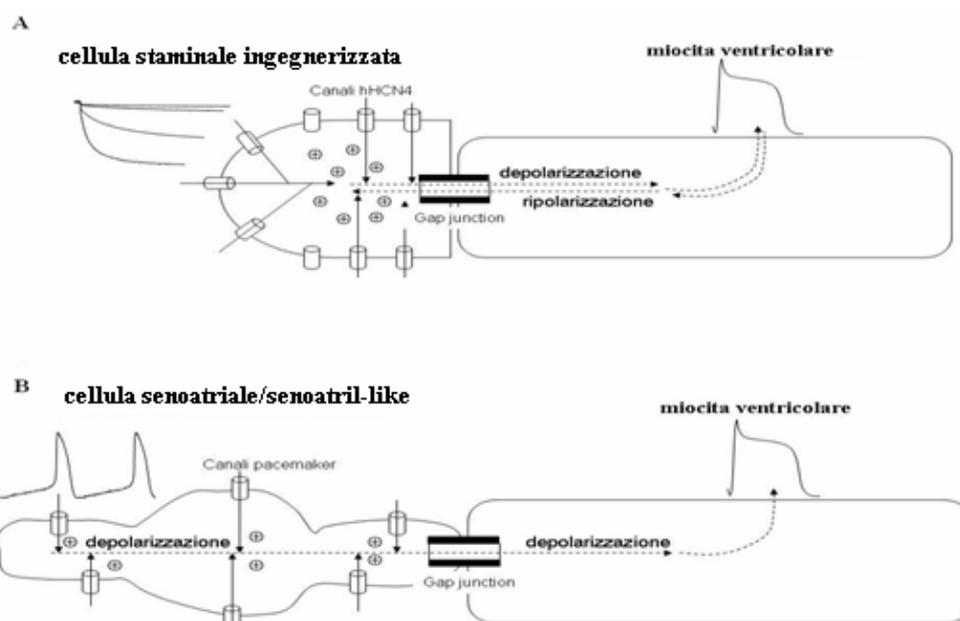


Figura 19: Confronto fra pacemaker biologico attivo e passivo. **A:** rappresentazione schematica del funzionamento di un pacemaker biologico attivo. **B:** rappresentazione schematica del funzionamento di un pacemaker biologico passivo.

Il problema principale di questo tipo di strategia è di isolare una popolazione differenziata omogenea che non contenga cellule immature che risulterebbero altamente teratogeniche [87]. La scelta di utilizzare cellule staminali embrionali umane o murine per creare un pacemaker biologico sembra al momento la più premiante, logica e promettente. Tuttavia, soprattutto per quanto riguarda l'utilizzo di staminali embrionali umane esistono problemi etici ed operativi ancora irrisolti.

SCOPO DEL LAVORO

Questo lavoro si inserisce nel contesto di un ampio progetto riguardante la generazione di un pacemaker biologico inteso come un substrato cellulare autoritmico, omogeneo con caratteristiche fisiologiche, elettriche e molecolari quanto più possibile simili a quelle delle cellule del nodo senoatriale nativo. 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 particolare la nostra ricerca si è incentrata sulle cellule staminali embrionali murine e su un particolare tipo di cellule staminali adulte denominate mesoangioblasti.

Abbiamo messo a punto i protocolli di differenziamento di cellule staminali embrionali murine verso il fenotipo *pacemaker-like* e, successivamente, caratterizzato funzionalmente e molecolarmente le cellule differenziate. La caratterizzazione è stata particolarmente incentrata sulle proprietà cinetiche della corrente I_f ed il profilo di espressione delle proteine HCN, dato il ruolo chiave svolto da questa componente ionica nella genesi e modulazione dell'attività pacemaker. Abbiamo inoltre verificato la modulazione da parte degli agonisti autonomici.

Per quanto riguarda le cellule staminali adulte, il laboratorio del Prof. Cossu dell'Ospedale San Raffaele di Milano, ha isolato un nuovo tipo di cellule staminali associate con i vasi sanguigni del ventricolo di topo denominate per questo mesoangioblasti cardiaci. Le cellule sono state espanse in coltura e in particolari condizioni sperimentali sono state indotte a differenziare verso un fenotipo cardiaco. In particolare, noi ci siamo occupati della caratterizzazione di una sottopopolazione di mesoangioblasti cardiaci, che presentavano attività autoritmica, al fine di poterli eventualmente utilizzare come substrato cellulare autoritmico idoneo per la creazione di un pacemaker biologico. Le cellule autoritmiche differenziate dai mesoangioblasti cardiaci sono state caratterizzate attraverso esperimenti di elettrofisiologia ed immunofluorescenza per verificare la presenza di marcatori tipici delle cellule cardiache (miosina, connesine) ed in particolare di marcatori di cellule pacemaker e del tessuto di conduzione, tra cui la corrente I_f , l'espressione dei canali HCN, della Cx45 e del fattore di trascrizione GATA-6, oltre che per la capacità di generare potenziali d'azione spontanei e modulabili da parte del sistema nervoso autonomo.

MATERIALI E METODI

Cellule staminali embrionali murine

Coltura di cellule staminali embrionali murine

Le cellule staminali indifferenziate mES-D3 (ATCC, CRL-1934; [82], [88]) sono state coltivate in terreno così composto: ES-DMEM (ATCC); Non Essential Amino Acids, 0.1mM (Gibco); L-Glutammina 2mM (Gibco), β -mercaptoetanolo 0.1mM (Sigma), Knock-Out serum 15% (Gibco), Leukemia Inhibitory Factor (LIF) 10^3 U/ml (Chemicon), NaHCO_3 1.5 g/l (Gibco), Pen-Strep 100U/ml Penicillina & 0,1mg/ml Streptomicina (Euroclone) (**Figura 20A**). Diversi fattori contribuiscono al mantenimento delle cellule staminali nel loro stato indifferenziato: abbiamo innanzitutto usato un siero sintetico, specifico per questo tipo di cellule, che garantisce l'assenza di fattori che possano indurre il differenziamento; inoltre abbiamo aggiunto al medium di mantenimento il LIF, una glicoproteina di 180 residui aminoacidici che si lega ad un recettore presente sulla membrana delle cellule staminali e trasduce all'interno di queste ultime segnali che promuovono ulteriormente il mantenimento dello stato indifferenziato [37], [89]. Inoltre le ES indifferenziate possono essere coltivate su un feeder layer di fibroblasti embrionali murini [90] mitomicinizzati. I fibroblasti da noi utilizzati sono fibroblasti embrionali murini del tipo STO (ATCC, CRL-1503), mantenuti in terreno così composto: DMEM powder (Invitrogen), L-Glutammina 4mM (Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (Cambrex), NaHCO_3 1.5g/l (Gibco), PenStrep 100U/ml Penicillina & 0.1mg/ml Streptomicina, che promuovono l'adesione delle ES-D3 e producono una serie di fattori chimici che ne prevengono il differenziamento, come il LIF [89],[37] (**Figura 20B**). La capacità proliferativa dei fibroblasti viene inibita trattando queste cellule con l'antibiotico mitomicina C (0.01 mg/ml, Sigma), ottenuto da colture di *Streptomyces caespitosus*, che si intercala tra le basi del DNA. Le cellule staminali embrionali hanno una capacità replicativa molto elevata, con un tempo di duplicazione di circa 9 ore, e vengono passate ogni 2 giorni a diluizioni adeguate, al fine di prevenirne il differenziamento.

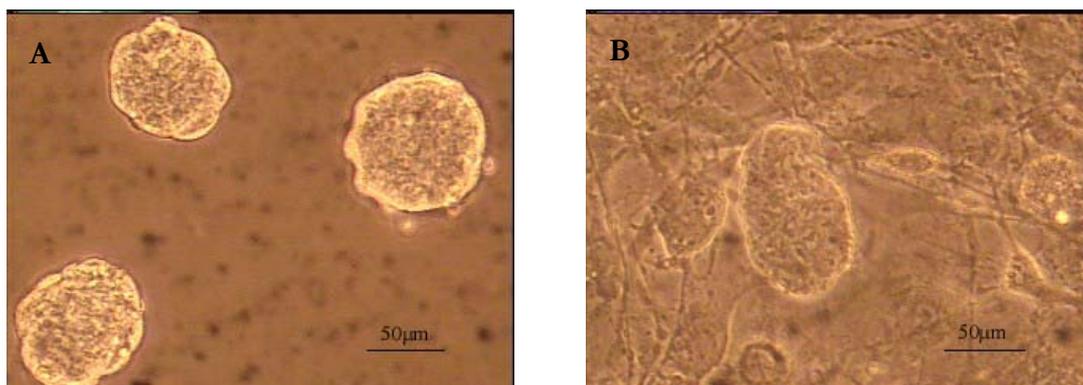


Figura 20: Cellule mES indifferenziate coltivate in sospensione (A) e su feeder layer di fibroblasti (B).

Differenziamento di cellule ES-D3 in cardiomiociti

Il differenziamento *in vitro* delle cellule staminali embrionali avviene tramite la formazione di aggregati cellulari compatti, definiti *Embryoid Bodies* (EBs), in grado di differenziarsi in diversi tipi cellulari, tra cui i miociti cardiaci [91].

Abbiamo utilizzato un protocollo di differenziamento standardizzato che prevede la formazione degli EBs, con un numero definito di cellule in hanging drops (letteralmente “gocce appese”) [88], [92] (Figura 21).

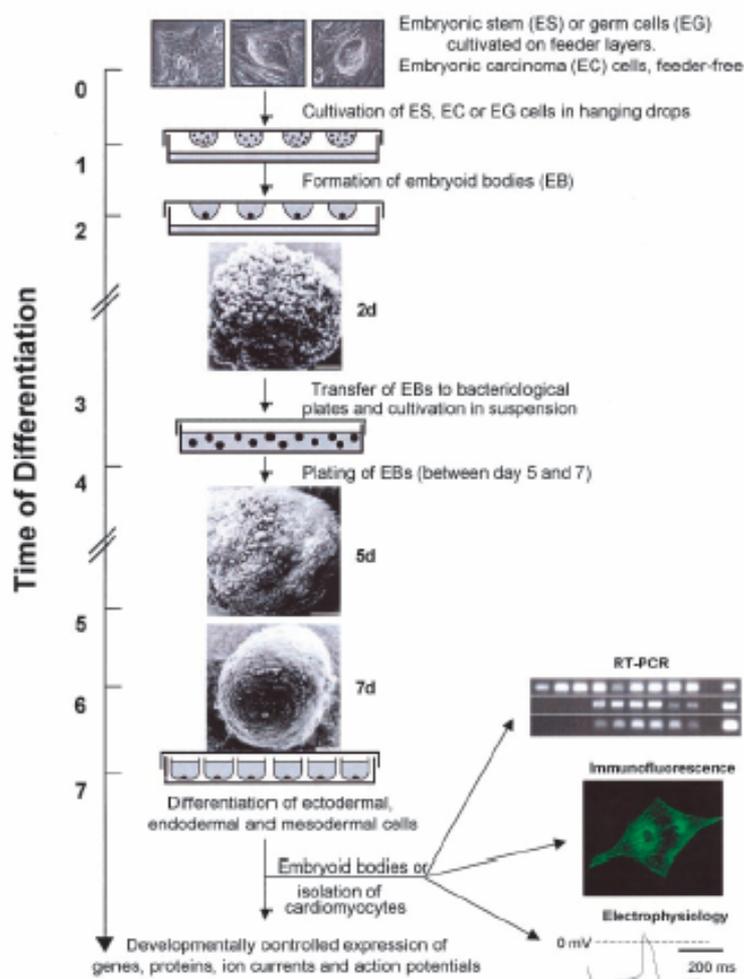


Figura 21: Schema del protocollo di differenziazione a partire da cellule ES indifferenziate (da[91]).

Per procedere alla formazione delle hanging drops, la coltura di mES deve essere pura, ovvero non ci deve essere una contaminazione di fibroblasti; per questo motivo le cellule staminali vengono fatte mantenere in sospensione per alcuni passaggi prima di procedere al differenziamento. Per formare le hanging drops, le cellule vengono risospese alla densità di 2.5×10^4 cellule/ml in terreno differenziativo, che non contiene il LIF e prevede l'utilizzo di siero fetale bovino al posto del siero sintetico ed è così composto: DMEM powder (Invitrogen), L-Glutammina 4mM (Gibco), Non Essential Amino Acids 0.1mM (Gibco), β -mercaptoetanolo 0.1mM (Sigma), Fetal Bovine Serum (FBS) 20% (Cambrex), NaHCO_3 1.5g/l (Gibco), PenStrep 100U/ml Penicillina & 0.1mg/ml Streptomicina. La sospensione cellulare viene piastrata in gocce da 20 μl , contenenti ognuna circa 500 cellule, sulla parte interna del coperchio di una petri. Il coperchio viene capovolto (hanging drops) e riposto sopra la base della piastra, riempita con 5 ml di PBS per mantenere al suo interno un certo grado di umidità necessario per impedire l'evaporazione della goccia (giorno 0).

Le hanging drops vengono incubate a 37°C per due giorni, periodo durante il quale le cellule si addensano all'apice delle gocce formando gli EBs (**Figura 21**). Gli EBs vengono quindi trasferiti in piastre batteriche (giorno 2), contenenti 10 ml di terreno di differenziamento, per 5 giorni, dove crescono in sospensione. Durante questo periodo l'embryoid body aumenta di volume, e alcune cellule della massa interna dell'EB danno origine a componenti cellulari ectodermiche mentre altre mantengono la loro staminalità ed un potenziale proliferativo elevato che consente la crescita in dimensioni dell'EB stesso. Al settimo giorno di differenziamento gli EBs vengono piastrati singolarmente su petri trattate per l'adesione cellulare e ricoperte con gelatina (0,1%, Type B, Sigma) per favorire l'adesione degli aggregati cellulari (giorno 7+0). L'adesione cellulare induce la riorganizzazione strutturale degli EBs in quanto perdono la forma sferica e si appiattiscono sulla superficie della piastra. Nella regione dell'EB che corrisponde al mesoderma si differenziano i cardiomiociti localizzati tra il foglietto epiteliale (ectodermico) e quello basale delle cellule mesenchimali (endodermico) [93]. La **figura 22** riassume come differenziano i tre foglietti embrionali all'interno dell'EB.

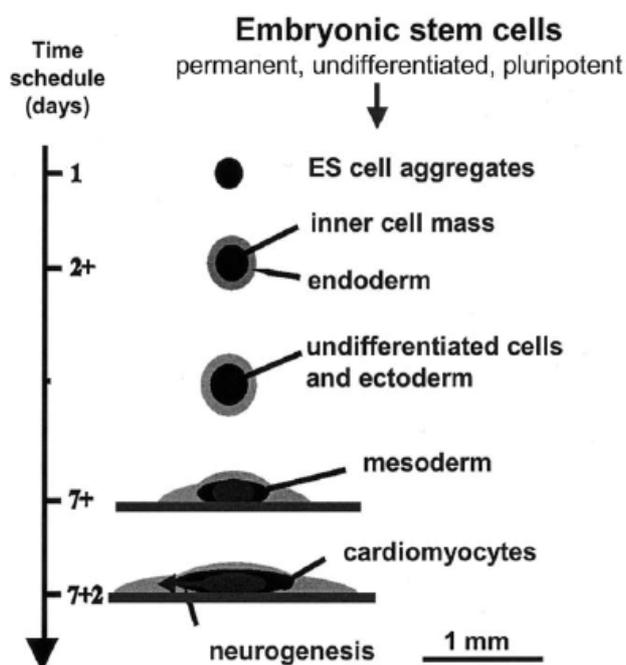


Figura 22: Schema che mostra le fasi del differenziamento dei tre foglietti embrionali all'interno dell'EB (da [94]).

Le porzioni di EBs contenenti i cardiomiociti sono chiaramente identificabili in quanto, tra il primo e il quarto giorno dopo il piastramento, iniziano a contrarsi spontaneamente.

Isolamento delle aree contrattili degli EBs

Le porzioni contrattili sono state individuate al microscopio a contrasto di fase ed isolate meccanicamente tramite un bisturi sterile monouso. Per ogni esperimento sono state raccolte le aree contrattili di circa 12 EBs. Gli EBs sono stati dissociati al giorno $7+7 \pm 1$ e al $7+12 \pm 1$ di differenziamento, dove 7 e 12 rappresentano, rispettivamente, il numero di giorni trascorsi dal piastramento su gelatina. Le porzioni contrattili vengono sottoposte ad un blando trattamento in tripsina 0.25%/EDTA 0.53mM in modo da ottenere gruppi contenenti un numero variabile di cellule. Il prodotto della digestione viene piastrato in capsule petri da 35mm trattate per l'adesione cellulare contenenti terreno differenziativo. Le cellule singole vengono ottenute utilizzando, con opportune modifiche, la procedura descritta da Isenberg e Klöckner [95]. Le aree battenti isolate dagli EBs vengono lavate in Low Ca^{2+} medium (NaCl 120mM, KCl 5.4mM, $MgSO_4$ 5mM, Na-piruvato 5mM, glucosio 20mM, taurina 20mM, HEPES/NaOH 10mM) per 30 minuti a temperatura ambiente; successivamente i frammenti di tessuto sono incubati con un soluzione enzimatica (Low Ca^{2+} medium addizionato con 500U totali di collagenasi I (Whorthington) e $CaCl_2$ 30 μ M) per 25-35 minuti a 37°C. L'ultima parte della dissociazione prevede una separazione meccanica delle cellule in KB medium (KCl 85mM, K_2HPO_4 30mM, $MgSO_4$ 5mM, EGTA 1mM, Na_2ATP 2mM, Na-piruvato 5mM, taurina 20mM, creatina 5mM, glucosio 20mM) per 50 minuti in agitazione e negli ultimi 10 minuti, per favorire la completa disgregazione tissutale, viene effettuata una dissociazione meccanica più energica tramite una micropipetta. Le cellule isolate vengono risospese nel medium differenziativo e piastrate in una petri per 20 minuti (*pre-plating*) dopodichè le cellule in sospensione vengono raccolte e piastrate in Petri da 35 mm, e incubate a 37°C in 5% di CO_2 . Il pre-plating ha la funzione di eliminare il maggior numero di fibroblasti grazie alla loro capacità di aderire in fretta alla piastra di coltura. Dopo 12-24 ore dall'incubazione i cardiomiociti ricominciano a battere spontaneamente. Sia i clusters cellulari che le singole cellule contrattili sono state usate per analisi elettrofisiologiche e di immunofluorescenza.

Estrazione dell'RNA totale da cellule con l'utilizzo del TRIzol Reagent

Circa 2×10^6 mES e le porzioni contrattili di 30 EBs sono state utilizzate per l'estrazione dell'RNA. Come controllo positivo abbiamo utilizzato il ventricolo e il cervello di topo adulto. I campioni di tessuto vengono mantenuti in ghiaccio, per evitare la degradazione dell'RNA mentre le cellule e gli EBs vengono centrifugati a RT a 270g per 5 minuti. Si procede quindi alla lisi aggiungendo il TRIzol Reagent (Invitrogen, 1 ml per $<5 \times 10^6$ cellule e 50mg di tessuto).

Il TRIzol Reagent è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, che distrugge tutte le strutture cellulari mantenendo l'integrità dell'RNA. Il procedimento di lisi viene effettuato con o senza l'utilizzo del potter (necessario per i tessuti e consigliato nel caso degli EBs), precedentemente trattato con DEPC per inibire le RNasi. Dopo la lisi si aggiungono 0,2 ml di cloroformio-isoamil-alcool (49:1, Fluka) per ogni ml di Trizol utilizzato e si incuba in ghiaccio per 15 minuti, quindi si centrifuga a 10000g per 20 minuti (4°C). In questo modo nella eppendorf si separano tre fasi: 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. Per separare l'RNA è sufficiente raccogliere la fase acquosa con una micro-pipetta e trasferirla in una eppendorf pulita (RNasi free). Si aggiungono 0,5 ml di isopropanolo (Fluka) per ogni ml di Trizol usato per la lisi e si incuba per almeno due ore e mezzo a -20°C. Al termine dell'incubazione si centrifuga a 10000g per 30 minuti (4°C) per far precipitare l'RNA, che forma un pellet bianco sul fondo della provetta. Il surnatante viene rimosso. Il pellet viene lavato con circa 0,2 ml di etanolo al 75% e ancora centrifugato (a 10000g per 10 minuti a 4°C) per eliminare eventuali residui contaminanti. L'etanolo viene rimosso e i pellet sono messi ad asciugare sotto cappa a flusso laminare per 5 min., in modo da far evaporare eventuali residui di alcool. A seconda del pellet, l'RNA viene quindi risospeso in un volume adeguato di acqua MilliQ o RNasi-free (circa 20- 30 µl).

L'RNA viene poi quantificato allo spettrofotometro. Le cuvette utilizzate sono di quarzo, in quanto l'RNA tende a formare legami aspecifici con le pareti di plastica delle normali cuvette, e questo interferisce nel calcolo dell'assorbanza. L'assorbanza viene misurata a 260nm, e ciò che riveste particolare importanza nell'estrazione dell'RNA è il rapporto A_{260}/A_{280} , che indica la purezza dell'estratto: nel caso di RNA deve essere compreso tra 1.8 e 2.0. Valori inferiori indicano la presenza nel campione di una certa quota di DNA che potrebbe interferire negli esperimenti di PCR, producendo dei falsi positivi. Per ovviare a questo problema, viene sempre consigliato il trattamento dei campioni con DNasi I (enzima che degrada il DNA), soprattutto quando i primers che verranno utilizzati per la PCR si trovano all'interno dello stesso esone.

Ciò che è stato così isolato rappresenta l'intero pool ribonucleotidico delle cellule di partenza, compresi i cosiddetti RNA stabili (tRNA, rRNA), che nel loro insieme costituiscono il 99% dell'RNA totale. L'mRNA rappresenta quindi solo una minima frazione di quanto è stato estratto.

Trattamento degli estratti con DNase I (Fermentas)

Preparazione dei campioni (**Tabella 1**):

RNA	1 µg di RNA
10x Buffer	1 µl
DNasi I	1 µl
Acqua DEPC	fino a 10 µl

Tabella 1: Schema per la preparazione dei campioni per il trattamento con DNase I

I volumi vengono aggiustati in base ai µg di RNA totali che si vogliono trattare. Il buffer utilizzato ha un'alta concentrazione di Mg^{2+} , 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 il campione è pronto per essere retrotrascritto.

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). Per ogni campione di RNA, viene fatto un controllo (no RT) in cui non si aggiunge la retrotrascrittasi, per evidenziare delle possibili contaminazioni delle soluzioni utilizzate per la retrotrascrizione. I campioni vengono così preparati (**Tabella 2**):

RNA (concentrazione ignota dopo trattamento con DNasi I)	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Random hexamers (50 ng/µl)	1.2 µl

Tabella 2: Schema per la preparazione dei campioni per RT-PCR.

I random esameri utilizzati sono primers di sei nucleotidi assemblati a caso, con la funzione di facilitare l'inizio della reazione polimerasica. Dopo aver preparato i campioni, li si incuba 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**):

10x RT buffer	2 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNase OUT (2 U/µl)	1 µl (2 U)

Tabella 3: Mix da aggiungere ai campioni durante RT-PCR.

Il DTT è un denaturante degli acidi nucleici, utilizzato per consentire un miglior funzionamento della retrotrascrizione; la RNase OUT (Recombinat RNase Inhibitor) è stata aggiunta alla soluzione per ottimizzare il processo e inibire ulteriormente l'attività RNasica dell'enzima RT. 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). Dopo aver raffreddato i campioni in ghiaccio si aggiungono 2U di Rnasi H solo nei campioni RT al fine di degradare i filamenti di RNA degli ibridi RNA/cDNA formatisi durante la reazione; i campioni vengono incubati a 37° per 20 minuti.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Per la tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) si utilizzano 2 µl di ogni campione, che vengono aggiunti singolarmente a 18 µl di mix (**Tabella 4**):

10x Buffer	2 µl
dNTPs (2mM)	2 µl
Primer Forward (25µM)	1 µl
Primer Reverse (25µM)	1 µl
Taq Pol (5U/µl)	0.4 µl
Acqua MilliQ	fino a 18 µl

Tabella 4: Mix per PCR.

Per il controllo negativo della PCR si preparano 18 μ l di soluzione senza altre aggiunte (no-DNA). La presenza di bande di DNA a livello del controllo negativo PCR dimostra che qualcuno dei reagenti utilizzati con i campioni RT e no-RT è contaminato. Una volta preparate queste soluzioni da 20 μ l totali, le si copre con una goccia di olio minerale per evitare l'evaporazione del campione e si programma il termociclatore. L'enzima *Taq* polimerasi catalizza la reazione di sintesi del DNA: è un enzima termostabile, in quanto purificato dal batterio termofilo *T. aquaticus*. Ogni ciclo di temperatura consta di un periodo a 95°C (denaturazione degli acidi nucleici), un periodo a 56-66°C (appaiamento dei primers con le sequenze specifiche) e un periodo a 72°C, temperatura ottimale per il funzionamento della *Taq* (sintesi di DNA). Il ciclo viene ripetuto per 30 volte, finché a partire da pochi nano-grammi (o meno) di DNA bersaglio si arriva ad ottenerne diversi micro-grammi. Il protocollo da noi utilizzato è il seguente (touch-down):

1. denaturazione iniziale a 95° per 5 minuti
2. 30" a 95°
3. 30" a 56°-66° (ogni 5 cicli la temperatura della fase 3 si abbassa di 2 gradi)
4. 30" a 72°
5. elongation finale a 72° per 10 minuti

Il touch down è un protocollo utile nel caso i primers abbiano temperature di annealing molto diverse perchè la variazione di temperatura favorisce il corretto appaiamento dei primers e limita la comparsa di bande aspecifiche. Abbiamo analizzato i nostri campioni al fine di verificare la presenza dell'mRNA per i canali HCN. I primers utilizzati per ciascuno dei geni HCN sono stati disegnati su esoni adiacenti in modo da essere specifici per l'mRNA (vedi **Tabella 5**):

Gene	Primer FORWARD 5'-3'	Primer REVERSE 5'-3'	Tm	Prodotto mRNA (bp)
HCN1	ctcttttgctaacgccgat	cattgaaattgtccaccgaa	58/56	291
HCN2	gtggagcgcgactctactcgt	gttcacaatctcctcacgca	64/60	369
HCN3	cgtagctgggtaccgtcaat	acttgggtgtggacaaggagg	62/62	111
HCN4	tgctgtgcattgggtatgga	tttcggcagttaaagttgatg	60/58	337

Tabella 5: Primers utilizzati per PCR.

Elettroforesi su gel di agarosio

Per analizzare il risultato della PCR viene preparato un gel di agarosio (Sigma) al 2%, utile per separare frammenti di piccole dimensioni, sciolto in TAE 1X (Tris Base 40mM, EDTA 1mM, acido acetico glaciale 20mM, pH 8). Al gel viene aggiunto del bromuro di etidio, un intercalante del DNA che sarà poi rivelato irradiando il gel con raggi UV attraverso un transilluminatore e fotografando con camera CCD (charge-coupled device). I markers utilizzati sono frammenti di peso molecolare definito, in questo caso multipli di 50bp (Promega), che permettono il monitoraggio della corsa elettroforetica. Il risultato della PCR viene visualizzato tramite un transilluminatore: i raggi UV rivelano il bromuro d'etidio, che a sua volta è legato al DNA.

Analisi elettrofisiologiche

Le piastre contenenti i clusters cellulari o le cellule singole derivate dalla dissociazione delle parti contrattili degli EBs sono state perfuse alla temperatura di 37°C con soluzione fisiologica Tyrode, contenente: NaCl 140mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 1.8mM, MgCl₂ 1mM, Hepes NaOH 5mM, glucosio 5.5mM, pH 7.4. Per registrare la corrente I_f abbiamo utilizzato la tecnica del 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 utilizzate per le registrazioni, riempite con una soluzione simile a quella intracellulare (K-aspartato 130mM, NaCl 10mM, EGTA-KOH 5mM, Hepes-KOH 10mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 2mM, Na-ATP 2mM, creatina fosfato 5mM, GTP (Na-salt) 0.1mM, a pH 7.2), avevano una resistenza di circa 5-8 MΩ. Le misure dei potenziali d'azione sono state effettuate perfondendo con Tyrode come soluzione extracellulare di controllo. Per le misure della corrente pacemaker è stato utilizzato Tyrode al quale sono stati addizionati BaCl₂ (1mM) e MnCl₂ (2mM) per bloccare eventuali correnti contaminanti rispettivamente di potassio e calcio ed aumentare così la risoluzione della corrente pacemaker. Inoltre, sono state effettuate registrazioni con Tyrode contenente CsCl (5 mM) per verificare il blocco da cesio della corrente pacemaker. Per testare se nelle cellule differenziate vi fosse una modulazione della frequenza di scarica dei potenziali d'azione e della corrente pacemaker da parte di mediatori autonomici, sono state utilizzate soluzioni test contenenti l'agonista β-adrenergico isoproterenolo (Iso 1μM) o l'agonista muscarinico acetilcolina (ACh 0.1μM). Le soluzioni test sono state preparate diluendo soluzioni concentrate di mediatori autonomici in Tyrode (per le registrazioni dei potenziali d'azione) oppure in Tyrode con bario e manganese (per le registrazioni della corrente pacemaker).

I protocolli di current-clamp e voltage-clamp utilizzati per stimolare le cellule sono stati generati ed acquisiti 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 220B, Axon Instruments).

Protocolli ed analisi dei dati

I dati sono stati analizzati usando i softwares pClamp 9 ed Origin 7.0 (Microcal. Inc.). La corrente I_f è stata registrata utilizzando un protocollo che prevede la stimolazione delle cellule attraverso una serie di gradini di potenziale nell'intervallo -25/-125 mV ad intervalli di 10 mV, applicati per un tempo sufficientemente lungo da permettere alla corrente di raggiungere lo stato stazionario. Il potenziale di mantenimento (holding potential) è stato imposto a -20 mV.

La curva di attivazione è stata calcolata applicando il protocollo descritto per la registrazione della corrente pacemaker seguito da un gradino a -125mV della durata di 1.5 s per attivare completamente i canali f. Le ampiezze delle correnti di coda a -125 mV sono state poi normalizzate e i valori così ottenuti messi in grafico in funzione del potenziale e infine interpolati con l'equazione di Boltzmann:

$$y = 1 / \{1 + \exp [(V - V_{1/2})/s]\}$$

dove V indica il potenziale di registrazione, y la variabile di attivazione, $V_{1/2}$ il valore di voltaggio al quale metà dei canali sono attivati e s l'*inverse slope factor* della curva di attivazione. 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 monoesponenziale:

$$I_t = I_\infty(1 - e^{-t/\tau})$$

dove τ è la costante di tempo definita come il tempo necessario al raggiungimento del 63% della corrente allo stato stazionario I_∞ [96].

In tutti gli esperimenti, le differenze statistiche sono state determinate mediante il test t di Student per popolazioni indipendenti e i dati ottenuti sono 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 $P=0.05$.

Analisi di immunofluorescenza

Il protocollo utilizzato prevede uno sciacquo iniziale delle piastrine, da cui è stato precedentemente tolto il terreno di coltura, con PBS. Si procede poi con la fissazione in

formaldeide al 4% (Sigma), in ghiaccio, 6 minuti per le singole cellule mentre 10 minuti per gli EBs. Questo passaggio ha lo scopo di preservare e stabilizzare il campione mantenendone inalterata la struttura, inoltre le cellule vengono protette da danni osmotici e si impedisce la solubilizzazione dell'antigene, mantenendolo nella posizione originaria e rendendolo accessibile all'anticorpo primario. Seguono due lavaggi in PBS con glicina 0.1M di 10 minuti l'uno sia per le singole cellule che per gli EBs, per saturare tutti i siti di formaldeide residua. Per le singole cellule le fasi di permeabilizzazione e di blocco avvengono insieme: il campione viene incubato per 30 minuti in una soluzione con Triton X-100 0.3%, Bovine Serum Albumine (BSA) 1%, Normal Donkey Serum (NDS) 10% 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. Per gli EBs viene eseguita per prima la fase di permeabilizzazione con una soluzione composta da Triton X-100 1% e PBS per 35 minuti, segue poi la fase del blocco nella quale si utilizza Triton X-100 0.3%, Bovine Serum Albumine (BSA) 1%, Normal Donkey Serum (NDS) 10% in PBS per un ora. Successivamente i campioni vengono incubati con l'anticorpo primario, diluito in PBS, overnight a 4°C in camera umida, questo vale sia per le singole cellule che per gli EBs. Il giorno seguente, l'anticorpo primario in eccesso viene rimosso tramite lavaggi in PBS per 2 ore, si incuba quindi con l'anticorpo secondario coniugato al fluoroforo, diluito in PBS, per 60 min a temperatura ambiente in camera umida ed al buio per evitare il decadimento della fluorescenza. In ciascun esperimento viene preparato un controllo in cui viene omessa l'incubazione con l'anticorpo primario in modo da valutare l'eventuale segnale aspecifico dato dal solo anticorpo secondario. Conclusi i lavaggi finali in PBS per due ore in modo da asportare l'anticorpo secondario in eccesso, si monta il vetrino coprioggetto utilizzando il montante Vectashield (Vector) contenente glicerolo e 4,6-DiAmino-Phenyl Indole (DAPI), un intercalante del DNA fluorescente che permette di evidenziare i nuclei cellulari. Le immagini in fluorescenza sono state acquisite tramite un microscopio videoconfocale (Visual Confocal Microscopy, ViCo Nikon).

Anticorpi utilizzati

Tabella 6: anticorpi primari e diluizioni

Anticorpo primario	Diluizione	Ditta produttrice
Rabbit anti-HCN1 policlonale	1:100	Alomone labs
Rabbit anti-HCN2 policlonale	1:100	Alomone labs
Rabbit anti-HCN3 policlonale	1:100	Alomone labs

Rabbit anti-HCN4 policlonale	1:100	Alomone labs
Rabbit anti-recettore β_1 adrenergico policlonale	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-recettore β_2 adrenergico policlonale	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-recettore muscarinico dell'acetilcolina (M2)	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Mouse anti-caveolina 3 monoclonale	1:500	BD Biosciences
Mouse anti-miosina slow scheletrica monoclonale	1:500	SIGMA

Tabella 7: anticorpi secondari e diluizioni

Anticorpo secondario	Fluorocromo coniugato	Diluizione	Ditta produttrice
Donkey anti-rabbit	TRITC	1:1000	Molecular Probes
Donkey anti-mouse	FITC	1:1000	Molecular Probes

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; i dati relativi a queste analisi verranno quindi solo riportati ma non trattati in dettaglio.

Isolamento di mesoangioblasti da vasi di ventricolo murino

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, CaCl₂ 1.8mM, MgCl₂ 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'espanto 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 espanso 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.

Citometria a flusso

I mesoangioblasti cardiaci sono stati staccati dalla piastra con PBS (Phosphate Buffered Saline) e EDTA 5mM e incubati per 30 minuti in ghiaccio con gli anticorpi primari contro i seguenti marcatori di superficie: CD45, CD34, CD44, CD31, FIK-1, Sca-1 e c-kit. Le cellule sono poi state incubate con l'anticorpo secondario coniugato con il fluorocromo e analizzate al FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) (**Figura 23**).

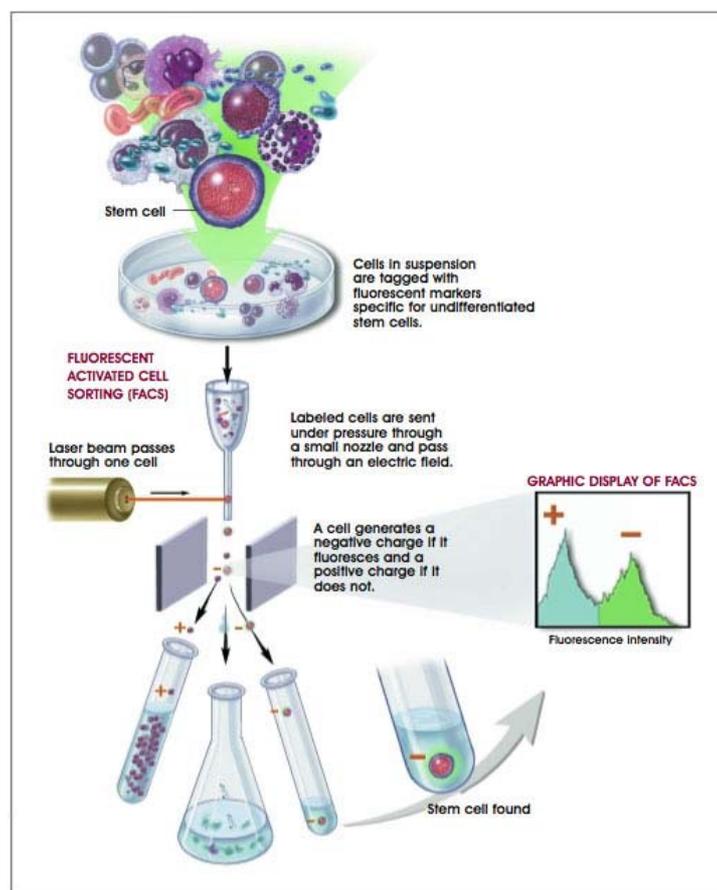


Figura 23: Procedimento del FACS, in grado di separare le cellule marcate con fluorocromi specifici (©2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwall).

Il FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) (**Figura 23**) è una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido. Le cellule vengono immerse in una camera di flusso dove vengono diluite, separate le une dalle altre, allineate e trasportate fino al punto di misura dove ogni singola cellula viene colpita dal fascio di luce emesso dal laser. L'incontro tra il raggio di luce e la singola cellula genera dei segnali dipendenti dalle caratteristiche fisiche della cellula ed alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori che ne misurano l'intensità. I segnali elettrici provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore di dati. Infine i citometri a flusso possono essere associati ad unità di sorting, che offrono la possibilità di separare fisicamente le diverse sottopopolazioni.

RT-PCR

L'RNA totale proveniente dalle cellule è stato isolato con il protocollo TRIzol (Invitrogen) e retro-trascritto con Taqman kit (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen). Il cDNA ottenuto è stato amplificato utilizzando coppie di primers specifici per i fattori analizzati (**Tabella 8**). La presenza degli amplificati è stata poi analizzata attraverso analisi elettroforetica su gel di agarosio.

	Primer Forward	Primers Reverse
Isl-1	catcgagtgttccgctgtgtag	gtggtcttctccggctgcttgagg
Nkx2.5	ttcaagcaacacgcggtacc	taaccgtagggattgaggcc
GATA4	cttggaacagtctggcttgg	acaggagagatgcagtgctgc
GATA6	ccgcgagtgcgtgaact	cgcttctgtggcttgatgag
Mef2a	ttgaggctctgaacaagaagg	gcattgccagtacttggtgg
Tbx2	ggtgcagacagacagtgctg	aggccagtaggtgacctatg
Tbx5	ccagctcggcgaagggatgttt	ccgacgccgtgtaccgagtgat
Ske-act	gatctcgagatgtgcgacgaagac	gcagaattcgggaagcatttgcgg
Car-act	cagttttctatttttaactgggtg	cagttttcgattcttaactgggtg
b-tub	ccggacagtgtggcaaccagatcg	tggcctaaaggacctgagcgaac
Con43	ttgtttctgtcaccagtaac	gatgaggaaggaagagaagc
ANP	gaacctgctagaccacct	cctagtccactctgggct
cTnI	gtgttaattaacatctactg	ataatgagccgttacagttc
Tbx3	cccgaagaagaggtggaggacgac	gatggagacagcaggagaggat

Tabella 8: Elenco primers utilizzati per PCR.

Costruzione del vettore plasmidico e trasfezione dei mesoangioblasti

Il GATA-6 è un fattore di trascrizione che viene attivato precocemente durante la cardiogenesi nei vertebrati [97], [98]. La regione regolatoria a monte di questo gene (GATA-6 enhancer) si attiva prima della formazione del tubo lineare ed è inattivata nelle cellule destinate alla linea ventricolare prima del giorno E9.5 [97]. L'espressione dei geni reporter LacZ o GFP guidata dal GATA-6 enhancer mette in evidenza in modo specifico il sistema di conduzione

atrioventricolare in via di sviluppo *in vivo* [97], [98] o le cellule pacemaker like derivate dalle cellule staminali embrionali *in vitro* [99].

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_{CMV} è stato quindi rimosso (AseI/XhoI) per ottenere il vettore cGATA-6/GFP (Figura 24).

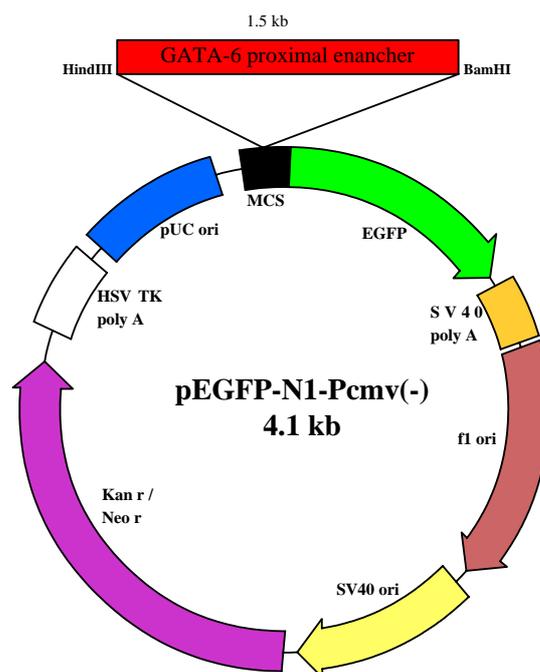


Figura 24: Mappa del vettore pEGFP-N1-Pcmv(-) + cGata-6.

I mesoangioblasti cardiaci indifferenziati sono stati trasfettati con il vettore cGATA6-GFP usando la Lipofectamina (Invitrogen), seguendo il protocollo fornito dal distributore. Dal momento che la GFP viene espressa solo nelle cellule che trascrivono in modo attivo il gene *GATA-6*, le cellule sono state co-trasfettate con il plasmide pIREs2a-DsRed2 al fine di valutare l'efficienza della trasfezione.

Analisi di immunofluorescenza

Per gli esperimenti di immunomarcatura le cellule sono state fatte crescere su un vetrino coprioggetto rivestito di gelatina B all'1%. Al momento della marcatura, abbiamo rimosso il terreno di coltura e fissato le cellule in formaldeide 4% (per 10 min su ghiaccio) per preservare e stabilizzare il campione mantenendone inalterata la struttura. I campioni sono stati sciacquati per 20 min con una soluzione di PBS e 0.1M di glicina per rimuovere la paraformaldeide

residua e saturare i siti di legame aspecifici. A questo punto abbiamo trattato le cellule con una soluzione di permeabilizzazione e blocco contenente PBS, BSA (Bovine Serum Albumine) 1% w/v e Triton X-100 0.3% v/v per 30 minuti. Il Triton è un blando detergente in grado di permeabilizzare la membrana plasmatica così da consentire l'ingresso in cellula degli anticorpi che riconoscono epitopi citoplasmatici, mentre la BSA permette di saturare eventuali cariche aspecifiche.

Gli anticorpi primari (**Tabella 9**) sono stati incubati overnight a 4°C in camera umida, diluendo l'anticorpo in una soluzione di PBS. Il mattino seguente i campioni sono stati lavati con PBS per eliminare l'anticorpo in eccesso non legato in modo specifico per 2 ore e poi sono stati incubati a temperatura ambiente per 1 ora con l'anticorpo secondario appropriato (diluito in PBS) coniugato con il fluorocromo (**Tabella 10**).

Per marcare il citoscheletro abbiamo usato la falloidina (1U/vefrino, Molecular Probes) una tossina che lega in modo specifico l'actina polimerizzata (actina F), coniugata alla rodamina. Il protocollo prevede una incubazione ulteriore dei campioni con falloidina per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio finale con PBS abbiamo montato il vetrino coprioggetto utilizzando il montante Vectashield (Vector) contenente un intercalante del DNA fluorescente (DAPI) in grado di colorare i nuclei delle cellule.

Per ogni esperimento è stato preparato 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 mantenuti al buio a 4°C fino al momento dell'analisi al microscopio. Le immagini in fluorescenza sono state acquisite tramite un microscopio videoconfocale (Visual Confocal Microscopy, ViCo Nikon).

Anticorpi utilizzati

Tabella 9: anticorpi primari

Anticorpo primario	Diluizione	Ditta produttrice
Mouse anti-slow myosin	1:500	Sigma
Mouse anti-myosin heavy chain	1:10	Chemicon
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 β_1 adrenergico policlonale	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-recettore β_2 adrenergico policlonale	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-recettore muscarinico dell'acetilcolina (M2)	1:200	Santa Cruz Biotechnology

Tabella 10: anticorpi secondari

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

Analisi elettrofisiologica

Per lo studio funzionale è stata utilizzata la tecnica di patch-clamp in configurazione whole cell e tutti gli esperimenti sono stati condotti alla temperatura di $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Per questo tipo di analisi le cellule sono state piastrate in Petri da 35 mm ricoperte di gelatina che venivano poste sul piano di un microscopio ad inversione e perfuse con soluzione fisiologica Tyrode contenente NaCl 140mM, KCl 5.4mM, CaCl_2 1.8mM, MgCl_2 1mM, Hepes NaOH 5mM, glucosio 5.5mM, pH 7.4. Le pipette di vetro borosilicato, utilizzate per il patch-clamp, avevano una resistenza di circa 3-6 $\text{M}\Omega$ quando riempite con una soluzione intracellulare contenente: K-aspartato 130mM, NaCl 10mM, EGTA-KOH 5mM, CaCl_2 2mM, MgCl_2 2mM, Na-ATP 2mM, creatina fosfato 5mM, Na-GTP 0.1mM, Hepes-KOH 10mM, pH 7.2. Le soluzioni test sono state perfuse tramite un sistema che ne permette il rapido ricambio intorno alla cellula. Il potenziale di membrana è stato registrato, usando la modalità current-clamp, da cellule singole o da piccoli gruppi di cellule autoritmiche perfondendo con Tyrode come soluzione extracellulare di controllo. Per le registrazioni della corrente pacemaker, alla soluzione extracellulare Tyrode sono stati aggiunti BaCl_2 1mM e MnCl_2 2mM che consentono di bloccare eventuali correnti contaminanti rispettivamente di potassio e calcio ed aumentare così la risoluzione della corrente I_f . Per valutare la modulazione della frequenza di scarica dei potenziali d'azione e della corrente I_f da parte dell'agonista autonomo isoproterenolo abbiamo utilizzato una soluzione alla concentrazione finale di $1\mu\text{M}$ in Tyrode (durante le registrazioni dei potenziali d'azione) o Tyrode Ba^{2+} Mn^{2+} (durante le registrazioni della corrente I_f). Per la modulazione indotta

dall'acetilcolina abbiamo preparato una soluzione alla concentrazione finale di $0.1\mu\text{M}$, quest'ultima in Tyrode o Tyrode Ba^{2+} Mn^{2+} a seconda del tipo di registrazione.

La corrente rettificante entrante di potassio I_{K_1} è indicata come corrente sensibile al bario (Ba^{2+}) ed è stata registrata applicando una rampa di 5s nell'intervallo $-100/-25$ mV, da potenziale di holding di -80mV , con e senza BaCl_2 2mM nella soluzione extracellulare. 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

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando i softwares pClamp 9 ed Origin 7.0 (Microcal. Inc.). Il protocollo utilizzato per la registrazione della corrente I_f prevede l'applicazione di gradini iperpolarizzanti da -45 a -125 mV con intervalli di 10 mV partendo da un potenziale di mantenimento di -35 mV e applicati per un tempo sufficientemente lungo da permettere alla corrente di raggiungere lo stato stazionario. Ogni gradino è seguito da un impulso a -125 mV di 1.5 s per attivare completamente la corrente.

La curva di attivazione della corrente I_f è stata costruita misurando le correnti di coda a -125 mV normalizzandole al valore massimo; i valori ottenuti sono stati posti in grafico con in ascissa i corrispondenti potenziali test. Il potenziale di mezza attivazione (potenziale a cui sono aperti il 50% dei canali) e l'*inverse slope factor* sono stati calcolati interpolando i dati con l'equazione di Boltzmann: $y = 1 / \{1 + \exp[V - V_{1/2}] / s\}$, dove V indica il potenziale test, y la variabile di attivazione, $V_{1/2}$ il valore di mezza attivazione e s l'*inverse slope factor* della curva di attivazione.

Le costanti di tempo di attivazione sono state ottenute interpolando le tracce di corrente registrate applicando il protocollo di attivazione con la funzione monoesponenziale $I_t = I_\infty(1 - e^{-t/\tau})$ dove τ è la costante di tempo definita come il tempo necessario al raggiungimento del 63% della corrente allo stato stazionario I_∞ [96].

Lo spostamento della curva di attivazione della I_f 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 in quanto le sostanze perfuse cambiano la probabilità di apertura dei canali senza modificare la conduttanza del canale [100]; [101].

Il protocollo usato per misurare la relazione voltaggio/corrente a canale aperto consiste nell'applicazione di due stimoli, uno all'inizio (-25 mV) e uno alla fine (-125 mV) dell'intervallo di attivazione della corrente I_f , seguiti da gradini ai potenziali test. La differenza tra i valori istantanei delle code di corrente ai potenziali test rappresenta la quantità di corrente a quel voltaggio [102].

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).

RISULTATI

Cellule staminali embrionali murine

Le cellule staminali embrionali murine, appartenenti alla linea ES-D3, sono state differenziate *in vitro* attraverso un protocollo sviluppato precedentemente [92] e descritto in dettaglio nei **Materiali e Metodi**; questo protocollo prevede il piastramento in “hanging drops” di circa 500 cellule per goccia (20 μ l), al cui apice le cellule si aggregano a formare delle strutture compatte dette embryoid bodies (EBs). Gli EBs si differenziano in un’ampia varietà di tipi cellulari specializzati, inclusi i cardiomiociti [92], [103], [93]. Il potenziale differenziativo delle cellule staminali embrionali verso un fenotipo cardiaco, in coltura, viene influenzato da molti parametri, tra cui il numero iniziale di cellule che formano gli EBs, il terreno di coltura, il siero e i fattori di crescita. Già dal giorno successivo al piastramento su petri ricoperte di gelatina 0.1% (7+1), gli EBs assumono la forma di un disco con una parte centrale più spessa costituita da cellule addensate e disposte su molti strati (**Figura 25A**). Attorno alla zona centrale di maggiore spessore, in corrispondenza del foglietto mesodermico, iniziano a distinguersi una o più aree che si contraggono spontaneamente, manifestando quindi l’inizio del processo di differenziamento cardiaco (**Figura 25B**).

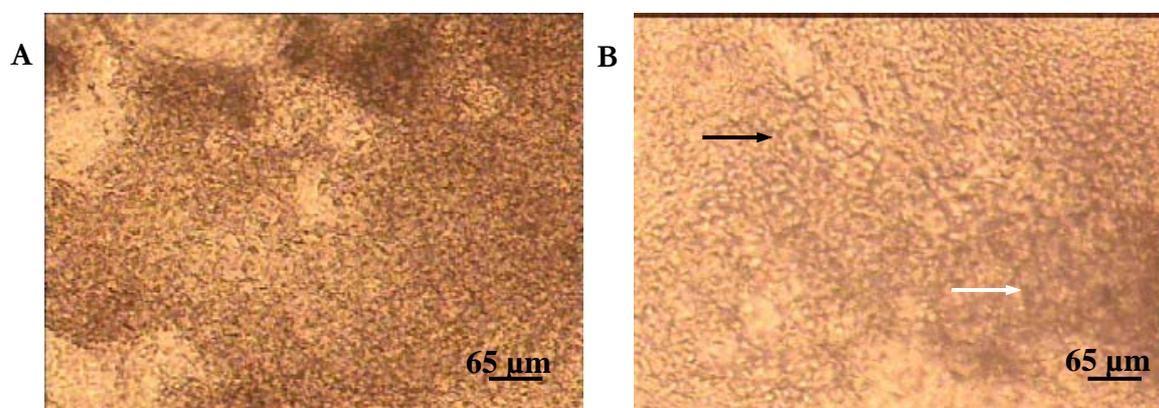


Figura 25: Immagini 10X di porzioni di EBs. **A:** zona centrale di un EB con cellule addensate e disposte su più strati; **B:** porzione più periferica di EB: la freccia nera indica la zona in corrispondenza della quale è stata rilevata attività contrattile mentre la freccia bianca indica la zona centrale di maggior spessore.

A questo stadio le aree contrattili costituite da poche cellule e rappresentano una piccola parte dell’area totale dell’EB. Ad uno stadio più avanzato (7+5/6) le aree che si contraggono spontaneamente sono presenti nell’85-95% degli EBs e coprono una porzione rilevante dell’area dell’intero EB. Le cellule che costituiscono la stessa area contrattile presentano attività

sincrona tra loro ed un ritmo regolare; la frequenza di contrazione è invece molto variabile da area ad area. Queste proprietà sono mantenute pressoché invariate per alcuni giorni; in seguito diminuiscono numero e dimensioni dei foci battenti ed il ritmo diventa lento ed irregolare: all'incirca 30 giorni dopo il piastramento (7+30) nessun EB mostra aree che possiedono la capacità di contrarsi spontaneamente. Durante i primi stadi di differenziamento, i cardiomiociti, presenti negli EBs, sono tipicamente piccoli e tondi; poi con il procedere della maturazione tendono ad assumere una forma allungata con miofibrille e sarcomeri ben sviluppati [93].

In questo lavoro sono stati analizzati EBs allo stadio di differenziamento compreso tra il giorno 7+6 e 7+12 in cui la percentuale di EBs che battono non varia significativamente (dati non mostrati). Le porzioni contrattili degli EBs sono state isolate meccanicamente e successivamente dissociate tramite digestione enzimatica al fine di ottenere sia aggregati multicellulari sia cellule singole (vedi **Materiali e Metodi**). Nella **figura 26** sono riportati esempi sia di un aggregato cellulare (pannello **A**) che di una singola cellula (pannello **C**), con la corrispondente attività elettrica di membrana (pannelli **B** e **D** rispettivamente).

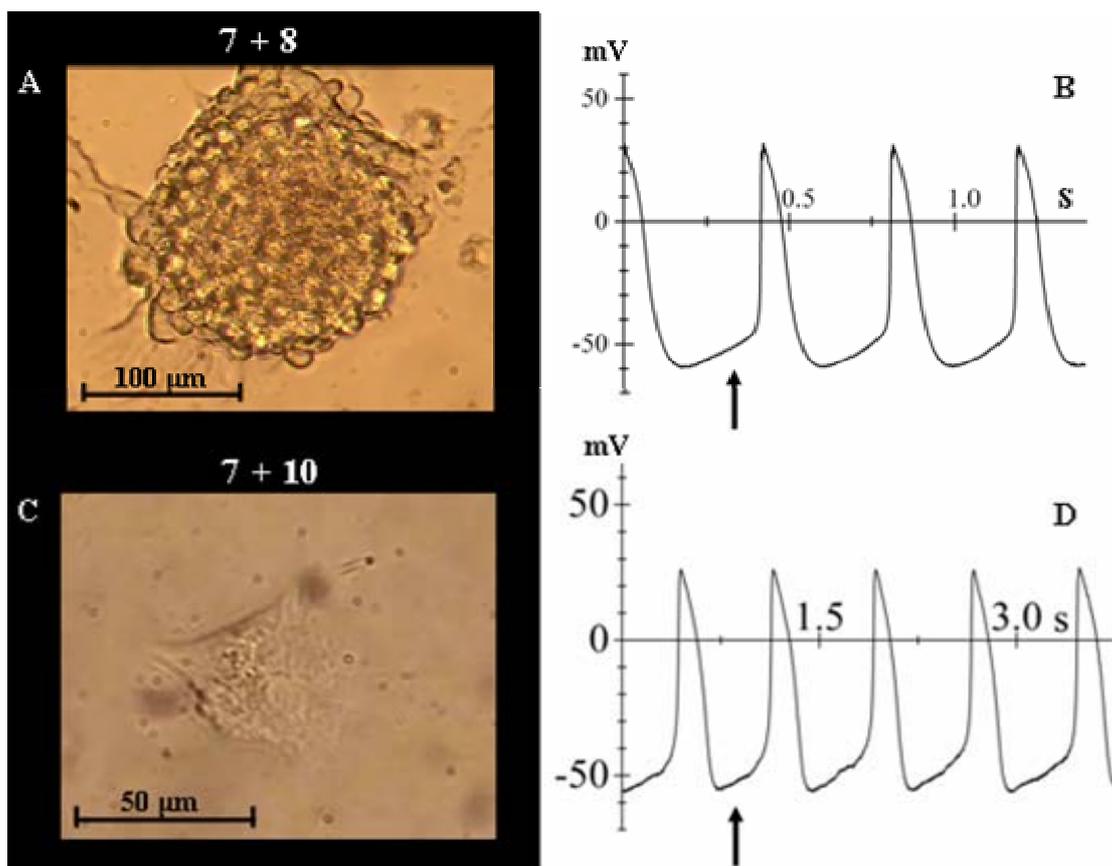
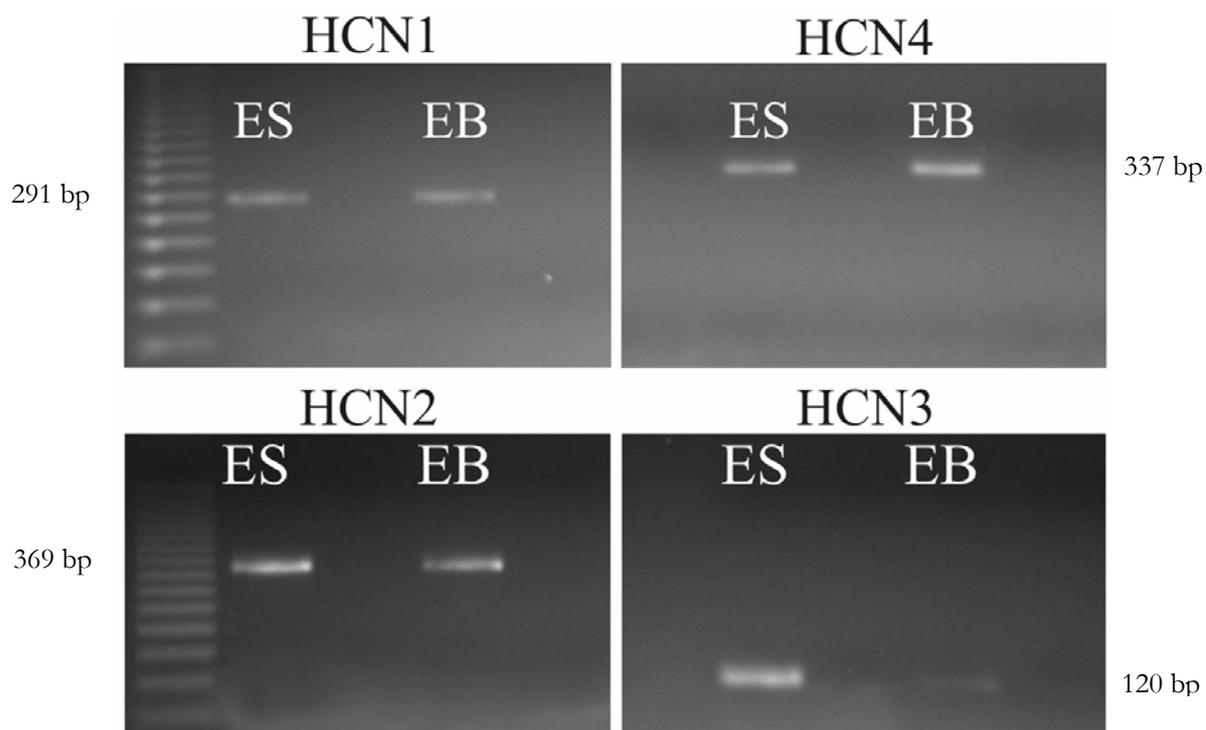


Figura 26: **A:** immagine a luce trasmessa di un aggregato cellulare (7+8). **B:** potenziali d'azione spontanei registrati dal gruppo di cellule mostrato nel pannello A. **C:** immagine di una cellula autoritmica isolata da un EB al giorno 7+10 di differenziamento **D:** potenziali d'azione corrispondenti registrati dalla singola cellula mostrata nel pannello C. Le frecce, nei pannelli B e D, indicano la fase di depolarizzazione diastolica lenta, o fase pacemaker, che conduce il potenziale di membrana al valore soglia per la generazione di un nuovo potenziale d'azione.

L'analisi elettrofisiologica ha dimostrato che sia i clusters cellulari che le singole cellule presentano potenziali d'azione spontanei con una forma simile ai potenziali d'azione delle cellule senoatriali native, caratterizzati dalla presenza della fase di depolarizzazione diastolica lenta (freccia in **B** e **D**) e dall'assenza della fase di plateau (**Figura 26**).

Data l'importanza dei canali pacemaker (canali f o HCN) nella generazione della fase di depolarizzazione diastolica lenta, abbiamo verificato la presenza dell'RNA messaggero dei canali HCN, tramite RT-PCR (**Figura 27**).

Data l'importanza dei canali pacemaker (canali f o HCN) nella generazione della fase di depolarizzazione diastolica lenta, abbiamo verificato la presenza dell'RNA messaggero dei canali HCN, tramite RT-PCR (**Figura 27**).



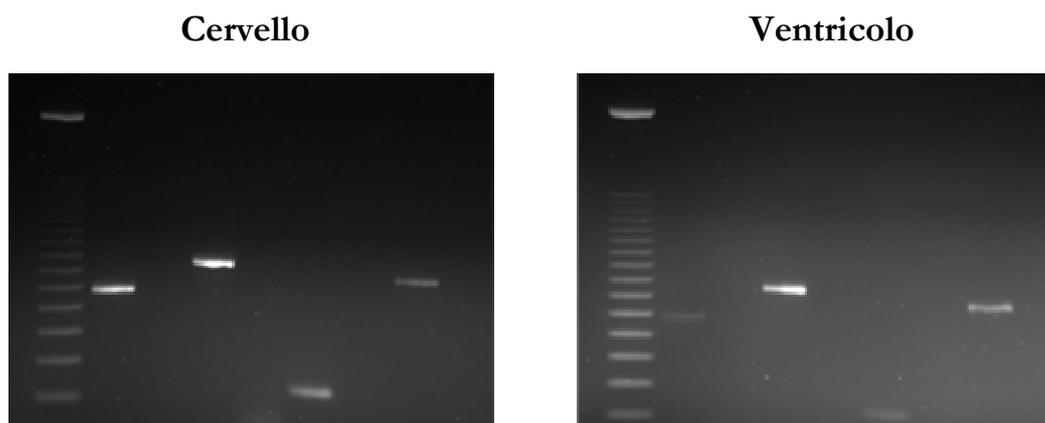


Figura 27: RT-PCR dell'mRNA totale estratto da cellule staminali embrionali murine indifferenziate (ES) e dalle porzioni contrattili degli embryoid bodies (EB) al giorno 7+8 per le varie isoforme dei canali HCN. I pannelli in basso mostrano l'analisi di RT-PCR di estratti di cervello e ventricolo di topo, tessuti che esprimono tutte e quattro le isoforme dei canali HCN utilizzati come controlli positivi. In questi pannelli accanto ad ogni campione è stato caricato il rispettivo controllo noRT nel quale l'mRNA non è stato retrotrascritto. Come controllo negativo è stato retrotrascritto l'mRNA totale di due linee cellulari (HEK e CHO) che non esprimono i canali HCN (dati non mostrati).

Il cDNA ottenuto dai diversi campioni è stato poi amplificato tramite PCR utilizzando primers specifici per le varie isoforme dei canali HCN (vedi **Materiali e Metodi**). Dai gel della corsa elettroforetica dei campioni mostrati in **figura 27** risulta chiara la presenza di bande specifiche della lunghezza attesa per tutte e quattro le isoforme HCN, sia nelle cellule ES indifferenziate che nelle porzioni contrattili degli EBs. I due pannelli in basso mostrano i risultati di RT-PCR sui tessuti da noi scelti come controllo positivo: il cervello e il ventricolo di topo adulto; come è possibile osservare dalla **figura 27**, sono presenti le bande per tutte e 4 le isoforme dei canali HCN in entrambi i campioni, all'altezza attesa.

Data la presenza del messaggero per tutte le isoforme dei canali HCN, sia prima che dopo differenziamento, abbiamo voluto indagare la presenza delle a livello proteico delle varie isoforme tramite esperimenti di immunofluorescenza, e la loro funzionalità, attraverso l'indagine elettrofisiologica. Entrambi gli esperimenti sono stati condotti sia sulle cellule staminali embrionali indifferenziate, sia sugli Embryoid Bodies.

La **figura 28** mostra un esempio di singole cellule ES (**pannello A**) e delle loro proprietà elettriche e molecolari.

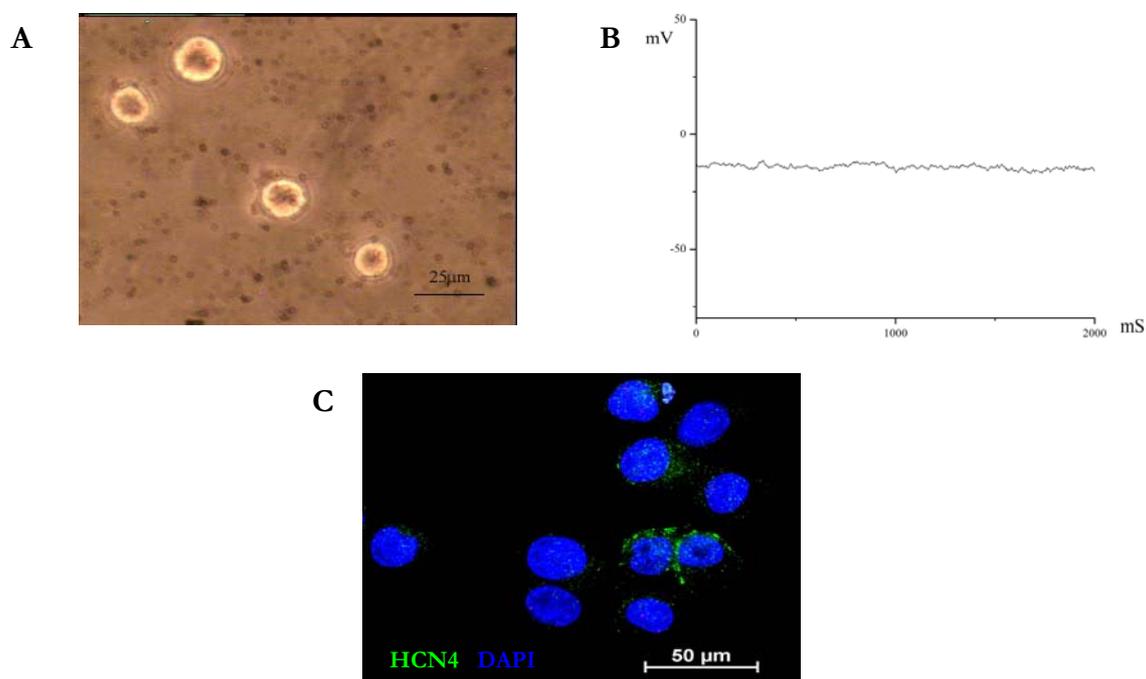


Figura 28: Caratterizzazione delle cellule mES indifferenziate. **A:** immagine al microscopio a contrasto di fase all'ingrandimento 40X di cellule mES piastrate a bassa densità per le registrazioni elettrofisiologiche. **B:** registrazione dell'attività elettrica spontanea delle mES. **C:** immunofluorescenza per HCN4 (in verde).

Le colonie di cellule mES sono state dissociate enzimaticamente con tripsina 0.25%/EDTA 0.53mM per isolare le singole cellule che sono state piastrate a bassa densità per facilitare gli esperimenti di elettrofisiologia. L'analisi elettrofisiologica ha mostrato come queste cellule non possiedano alcuna attività elettrica spontanea (**Figura 28B**) e infatti presentano un potenziale di riposo stabile (di -12.6 ± 1.9 mV, $n=18$). Inoltre hanno una capacità di membrana media di 17.8 ± 1.6 pF (dati non mostrati) e nonostante la presenza dell'mRNA per tutte e quattro le isoforme dei canali HCN e l'espressione dell'isoforma HCN4 in una piccola frazione di cellule (6 su 64) (**Figura 28**, pannello **C**), le cellule ES non presentano alcuna corrente pacemaker (dati non mostrati).

Abbiamo quindi condotto gli stessi tipi di esperimenti sugli embryoid bodies al giorno 7+8 e sulle cellule isolate dagli stessi. Il criterio da noi scelto per selezionare le cellule da studiare a livello elettrofisiologico è basato sulla loro capacità di contrarsi spontaneamente, ciò non è applicabile per gli esperimenti di immunofluorescenza. Abbiamo quindi scelto dei marcatori

(caveolina 3 e miosina) che facilitino l'identificazione delle cellule differenziate verso un fenotipo muscolare/cardiacο durante l'analisi al microscopio video-confocale. Dati pubblicati precedentemente dal nostro laboratorio hanno dimostrato l'interazione tra i canali HCN4 e la caveolina 3 nei miociti senoatriali di coniglio [34], [104]. La presenza della caveolina 3 in cellule derivate da porzioni contrattili è stata quindi considerata come indice di differenziamento verso un fenotipo muscolare/cardiacο. Un altro marker cardiacο da noi scelto è la miosina, una proteina strutturale altamente espressa nel tessuto muscolare; essa interagisce con l'actina formando filamenti contrattili. Le cellule pacemaker hanno la capacità di contrarsi spontaneamente, nel citoscheletro di queste cellule la miosina è presente in strutture ordinate, anche se è noto che il loro apparato contrattile è poco sviluppato. La presenza della miosina quindi è indice di differenziamento verso fenotipo muscolare.

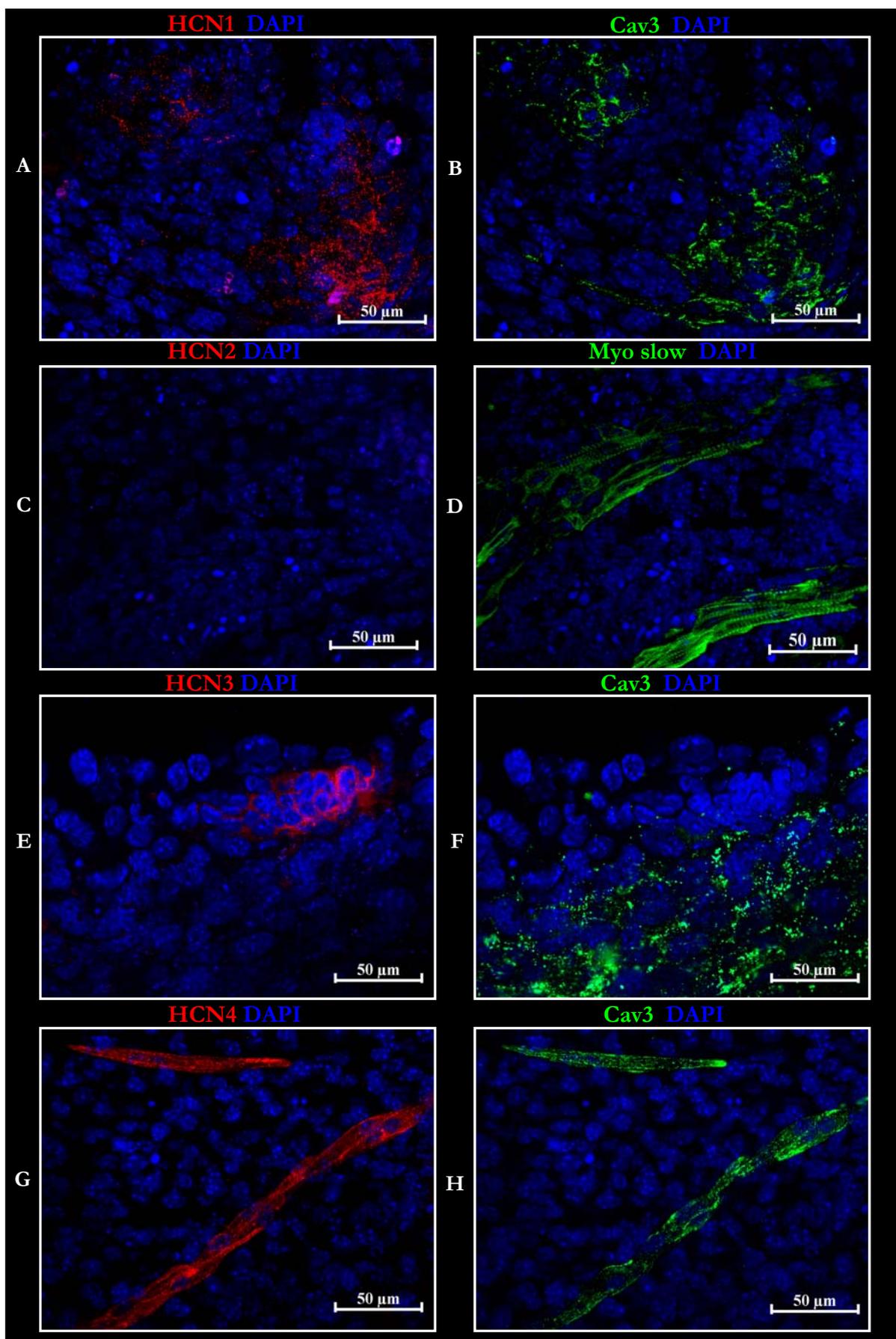


Figura 29: Immagini di immunofluorescenza acquisite al microscopio video-confocale di EBs interi al giorno 7+8 di differenziamento. Nei pannelli **A** e **G** sono marcate in rosso cellule positive per HCN1 e HCN4 (rosso) nei pannelli **B** e **H** sono mostrate le stesse immagini marcate con la caveolina 3 (verde). Nel pannello **C** è mostrata la marcatura per HCN2 e in **D** la stessa immagine con miosina slow (verde). Nel pannello **E** è mostrata un'immagine con cellule positive per HCN3 (rosso), mentre nel pannello **F** sono evidenziate cellule marcate con caveolina 3 (verde). In tutti i pannelli i nuclei sono stati marcati con DAPI.

La **figura 29** mostra i risultati della marcatura effettuata sugli EBs utilizzando anticorpi diretti contro le diverse isoforme dei canali HCN (**rosso**), e contro caveolina 3 (**verde**) o contro la miosina. L'isoforma HCN4 e HCN1 sono le uniche subunità rilevabili nelle porzioni degli EBs che esprimono anche la caveolina 3 come si può vedere nei pannelli **A**, **B**, **G** e **H** della **figura 29**. L'isoforma HCN3 è stata rilevata raramente e solo in porzioni di EBs non esprimenti marcatori muscolari (**Figura 29**, pannelli **E** e **F**). L'isoforma HCN2 non è mai stata osservata in alcuna porzione (**Figura 29C**). Gli EBs marcati con anticorpi diretti contro la miosina mostrano zone con cellule marcate con una struttura sarcomerica tipica dei miociti (**Figura 29**, pannello **D**).

È interessante osservare come le cellule marcate dagli anticorpi per i canali HCN3 sono morfologicamente simili a cellule indifferenziate con un citoplasma sottile intorno al nucleo (**Figura 30**, pannello **A**). La maggior parte delle cellule esprimenti i canali HCN1 e HCN4, così come quelle esprimenti la caveolina 3 o la miosina, hanno una forma piuttosto allungata che ricorda la morfologia dei cardiomiociti differenziati (**Figura 30**, pannelli **B**, **C** e **D**, **Figura 29**, pannello **H**).

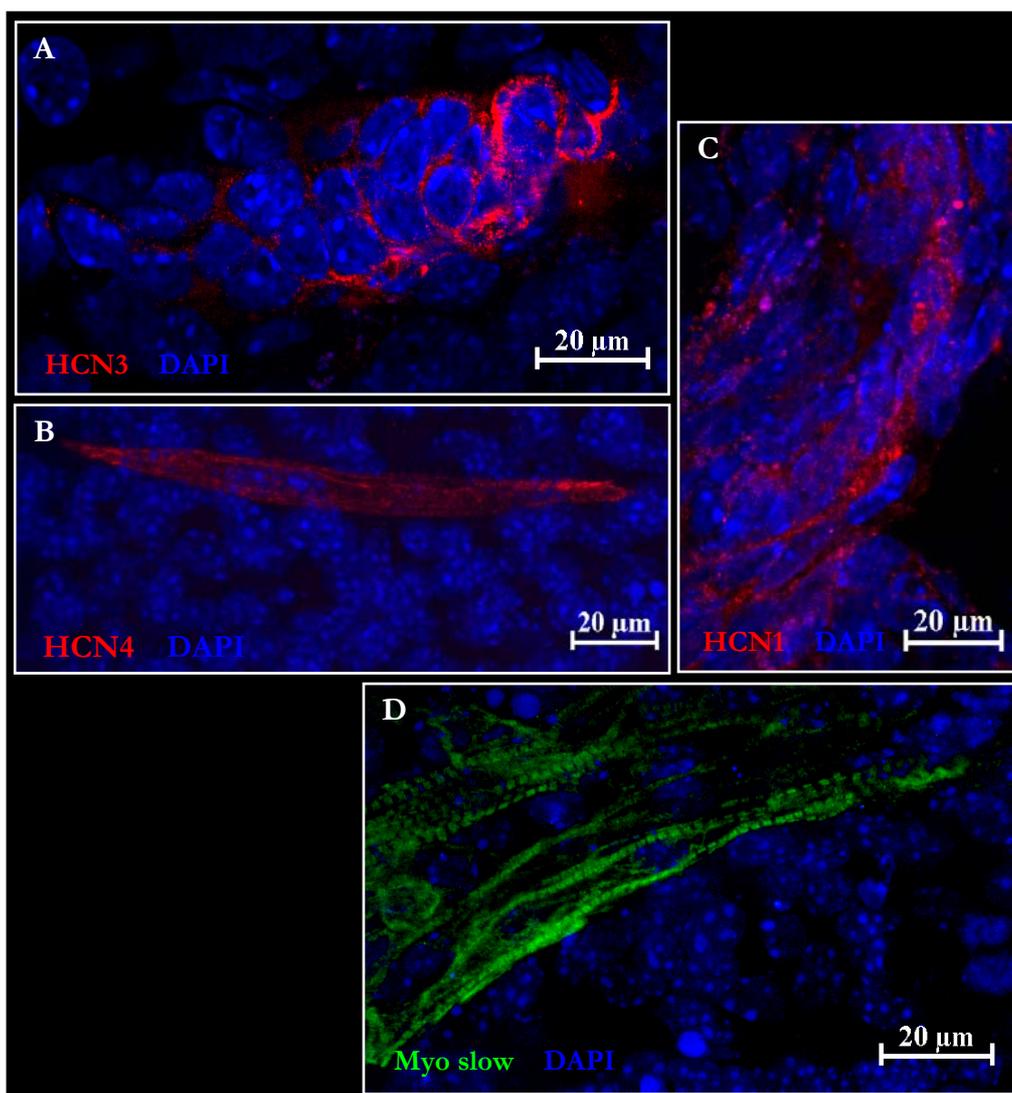


Figura 30: **A:** particolare del pannello **E** della **figura 29**; da notare la morfologia delle cellule marcate con HCN3 che ricorda quella delle cellule ES in stadi precoci di differenziamento. **B:** particolare del pannello **G** della **figura 29**; in rosso cellule positive per HCN4. **C:** in rosso cellule marcate con HCN1. **D:** particolare del pannello **D** della **figura 29**; sono marcate in verde cellule positive per la miosina. Da notare come le cellule marcate con HCN4 (pannello **B**), HCN1 (pannello **C**) e miosina (pannello **D**) presentano una forma allungata tipica dei cardiomiociti differenziati.

Per meglio caratterizzare la distribuzione delle varie isoforme dei canali HCN, abbiamo condotto delle marcature su cellule isolate enzimaticamente dagli EBs (**Figura 31**). Anche in questa serie di esperimenti la marcatura con la caveolina 3 è stata utilizzata come discriminante per riconoscere le cellule differenziate verso un fenotipo muscolare/cardiaco (pannelli **B**, **D**, **F** e **H**). I dati ottenuti sono in completo accordo con quelli riguardanti gli EBs interi, infatti le isoforme HCN1 (pannello **A**) e HCN4 (pannello **G**) sono risultate essere le uniche espresse in cellule caveolina 3 positive. Le due cellule rappresentative mostrate in questi due pannelli

evidenziano marcatura sia in membrana che nella regione perinucleare, suggerendo quindi che i canali siano ancora in fase di sintesi. L'espressione dell'isoforma HCN2 (pannello **C**) non è mai stata osservata, mentre l'isoforma HCN3 (pannello **E**) è stata rilevata in un numero limitato di cellule che non mostravano però espressione della caveolina 3.

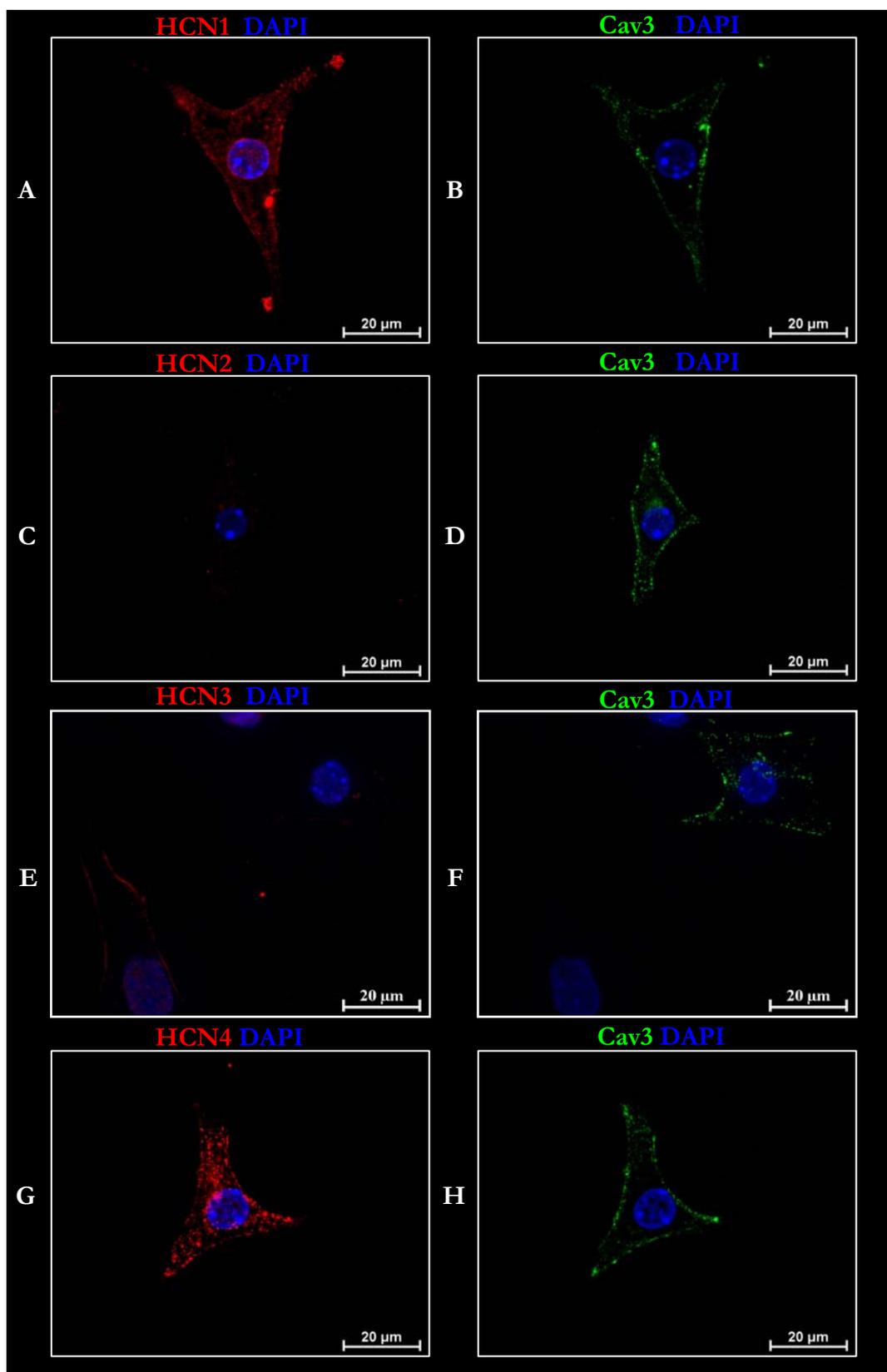


Figura 31: A sinistra (pannelli **A**, **C**, **E** e **G**) Immagini di immunofluorescenza acquisite al microscopio videoconfocale di singole cellule isolate dalle porzioni contrattili di EBs marcate con anticorpi contro HCN1, HCN2, HCN3 e HCN4 (rosso); a destra (pannelli **B**, **D**, **F** e **H**) le corrispondenti immagini marcate con anticorpi contro la caveolina 3 (verde). Il nucleo è stato evidenziato con DAPI.

È interessante notare come questi risultati siano in accordo con analisi eseguite precedentemente nel tessuto del nodo senoatriale. Nei miociti senoatriali infatti le isoforme HCN1 e HCN4 sono le più abbondanti sia a livello di mRNA che di proteina, in diverse specie [20], [105], [31], [106].

Abbiamo quindi analizzato le proprietà elettriche di cellule autoritmiche isolate dalla porzioni contrattile degli embryoid bodies.

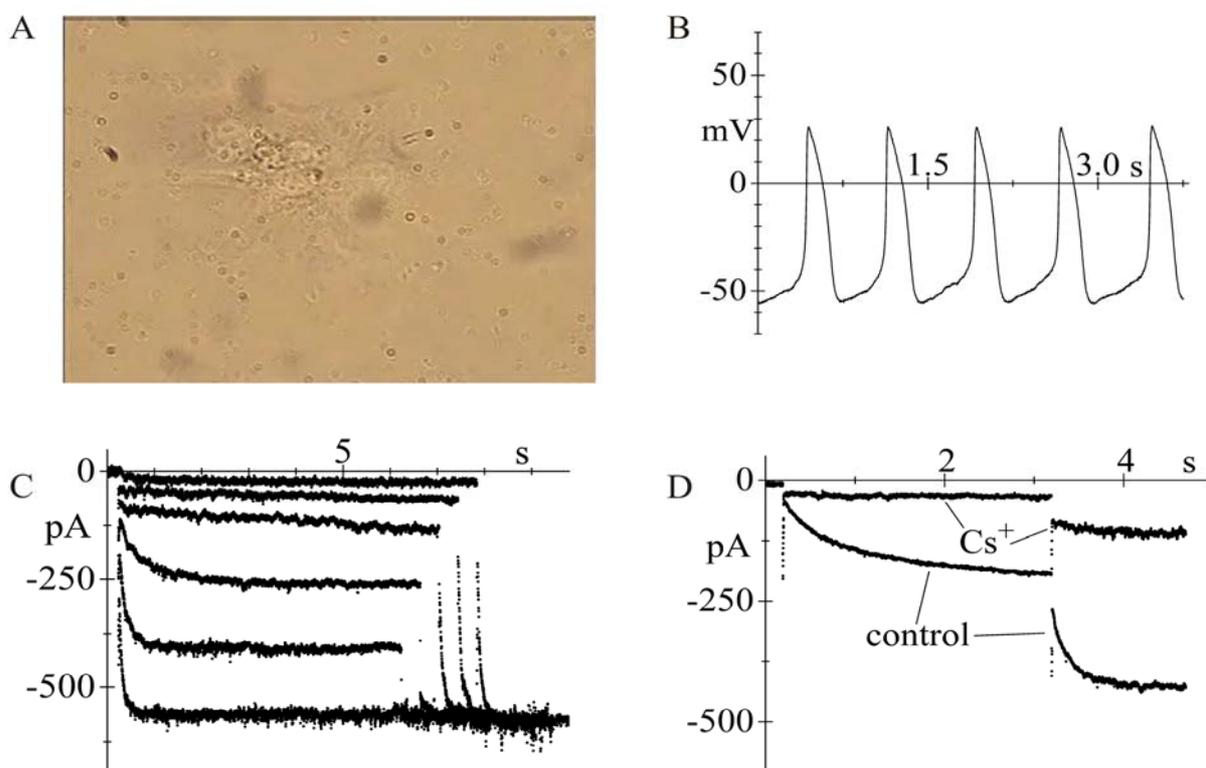


Figura 32: **A:** singola cellula autoritmica isolata da EBs al giorno 7+8. **B:** attività elettrica spontanea registrata in questa cellula. **C:** tracce di corrente I_f registrate con un protocollo di attivazione in iperpolarizzazione (vedi **Materiali e Metodi**). **D:** blocco da Cs^+ 5mM.

La **figura 32** mostra una singola cellula autoritmica (pannello **A**) e i potenziali d'azione spontanei registrati, in cui risulta evidente la fase di depolarizzazione diastolica lenta (pannello **B**). Abbiamo condotto esperimenti di voltage clamp per valutare la presenza delle correnti I_f . L'applicazione di gradini iperpolarizzanti nell'intervallo -45/-125 ha evidenziato la

presenza di una corrente tempo e voltaggio dipendente (pannello **C**) che risulta completamente bloccata dalla perfusione di cesio 5mM (pannello **D**), caratteristiche distintive della corrente I_f nativa [102].

Data la diversa espressione delle isoforme dei canali pacemaker in queste cellule, abbiamo voluto approfondire l'analisi elettrofisiologica, al fine di evidenziare una possibile correlazione.

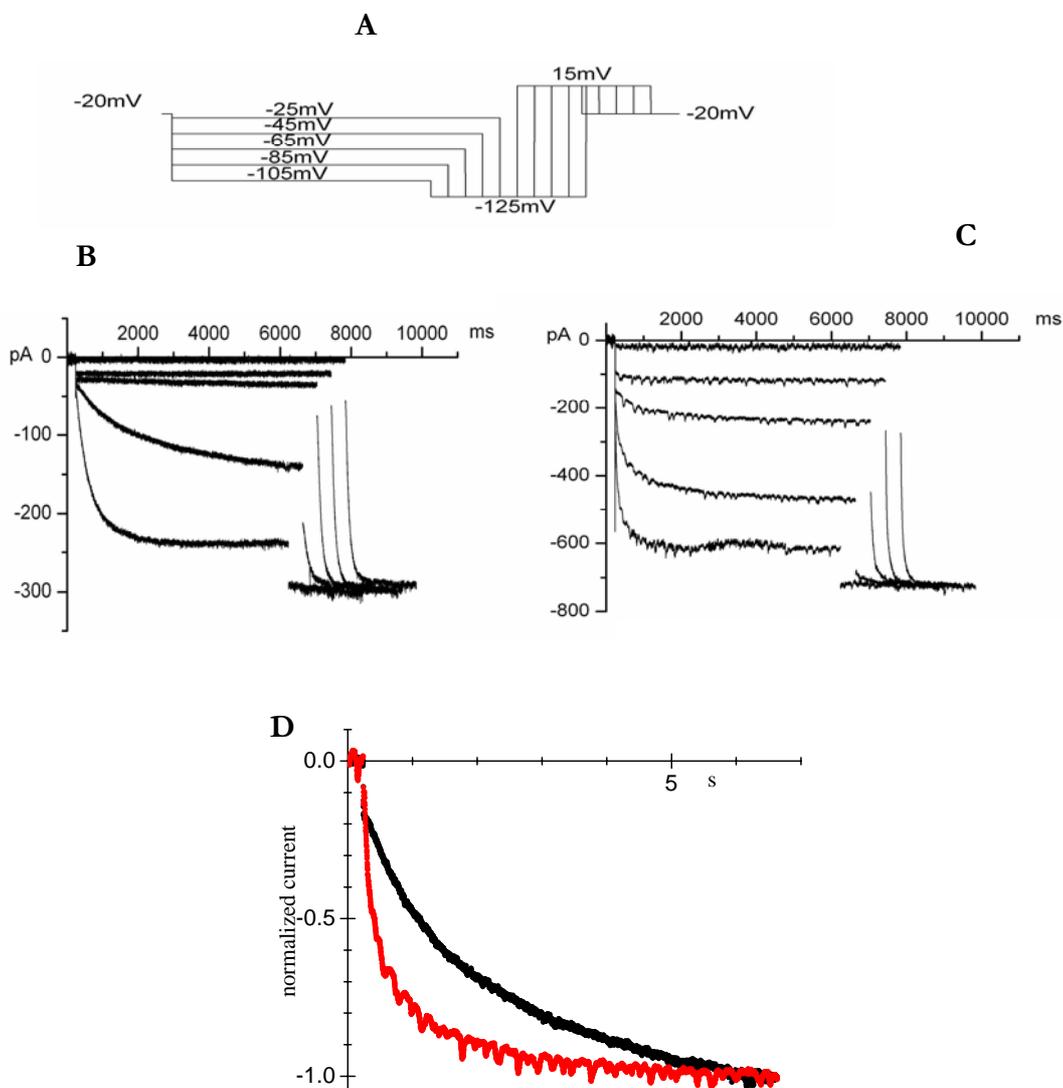


Figura 33: In **B** e **C** sono mostrate tracce di corrente I_f con cinetica d'attivazione lenta e rapida rispettivamente, registrate da cellule isolate dalle porzioni contrattili al giorno 7+8 in seguito all'applicazione del protocollo di voltaggio mostrato nel pannello **A**. In **D** sono raffigurate tracce di corrente a -75 mV, delle cellule in **B** e **C**, mostrate sovrapposte e normalizzate per evidenziare le differenze nelle cinetiche; in rosso corrente con cinetica veloce, in nero corrente con cinetica più lenta.

I pannelli **B** e **C** della **figura 33** mostrano due famiglie di tracce di corrente I_f registrate in due cellule ES autoritmiche derivate da EBs al giorno 7+8, in seguito all'applicazione del protocollo standard di attivazione mostrato nel pannello **A**. Si può però notare che alcune cellule presentano una corrente I_f con una attivazione lenta (**Figura 33**, pannello **B**) mentre altre presentano una corrente con attivazione più rapida (**Figura 33**, pannello **C**). Per meglio esemplificare la differenza cinetica, nel pannello **D** sono mostrate sovrapposte e normalizzate le tracce di corrente registrate al potenziale di -75 mV.

L'analisi dettagliata delle cinetiche di attivazione mostrata in **figura 34** (pannello a **sinistra**), ottenuta interpolando le tracce con una funzione monoesponenziale [96], evidenzia la presenza di due popolazioni di cellule con una voltaggio dipendenza delle costanti di tempo diversa.

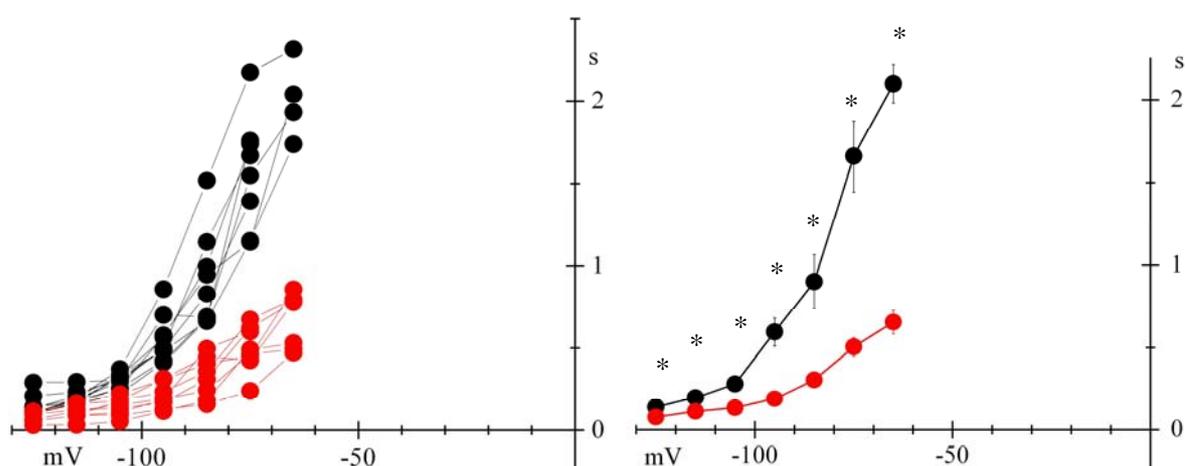


Figura 34: **A sinistra:** grafico delle curve delle costanti di tempo di attivazione di tutte le cellule analizzate che evidenzia, soprattutto a potenziali più depolarizzati, la presenza di due popolazioni distinte, una con cinetiche veloci (rosso) e l'altra con cinetiche più lente (nero). **A destra:** curve medie delle due popolazioni (n=7, simboli neri; n=5, simboli rossi).

Nel pannello **a destra** della **figura 34** sono mostrate le curve medie per le due popolazioni in oggetto, le costanti di tempo risultano significativamente diverse a tutti i potenziali ($P < 0.05$, t-test di Student). A questo punto abbiamo analizzato le curve di attivazione, ottenute dalle correnti di coda registrate a -125 mV mantenendo le cellule appartenenti alle due popolazioni separate. La curva di attivazione di ogni singola cellula è stata interpolata con l'equazione di Boltzmann (vedi **Materiali e Metodi**) per ottenere il valore di $V_{1/2}$ e di s (*inverse slope factor*). Il grafico nel pannello **A** in **figura 35** mostra le curve di attivazione medie per le due popolazioni in oggetto: la popolazione con cinetiche di attivazione veloci presenta un $V_{1/2}$ medio di

-71.4 ± 1.3 mV e un s di 6.9 ± 0.5 mV, mentre quella con cinetiche lente ha un $V_{1/2}$ medio di -77.0 ± 2.2 mV e un s di 7.9 ± 0.9 mV. L'analisi statistica rivela una significativa differenza tra i valori medi di $V_{1/2}$ mentre i valori di s non risultano essere statisticamente diversi. Ciò conferma la presenza di due popolazioni con caratteristiche cinetiche diverse.

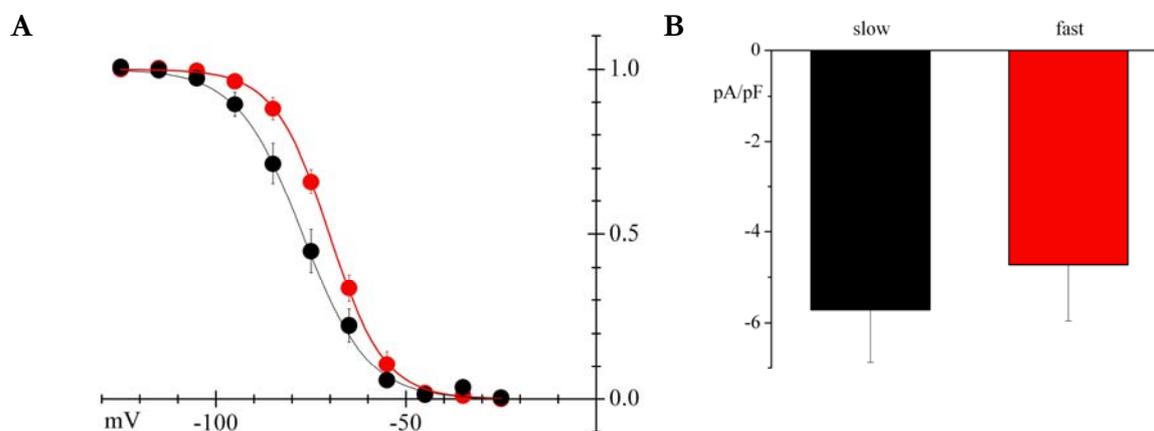


Figura 35: **A:** curve di attivazione ottenute dalle correnti con cinetiche veloci (simboli rossi, $n=9$) e lente (simboli neri, $n=9$). Le linee continue rappresentano l'interpolazione con l'equazione di Boltzmann (vedi **Materiali e Metodi**). **B:** grafico a barre rappresentante la densità di corrente media calcolata a -125 mV per le cellule con corrente con cinetica lenta ($n=11$, barra nera) e veloce ($n=10$, barra rossa).

Come mostrato dal grafico a barre nel pannello **B** di **figura 35** la popolazione con attivazione rapida e quella con attivazione lenta presentano densità di corrente I_f medie di -5.7 ± 1.2 pA/pF e -4.7 ± 1.2 pA/pF, rispettivamente, che non risultano significativamente diverse.

Un'altra caratteristica fondamentale delle cellule pacemaker è la modulazione da parte degli agonisti autonomici. Abbiamo quindi studiato la risposta in termini di frequenza dei potenziali d'azione delle cellule autoritmiche in risposta all'azione dei neuromodulatori; inoltre, dal momento che è noto che la modulazione della frequenza è causata da un cambiamento, in termini di ampiezza, della corrente I_f , siamo andati a valutare l'azione di questi agonisti sulla corrente pacemaker nelle due popolazioni cellulari.

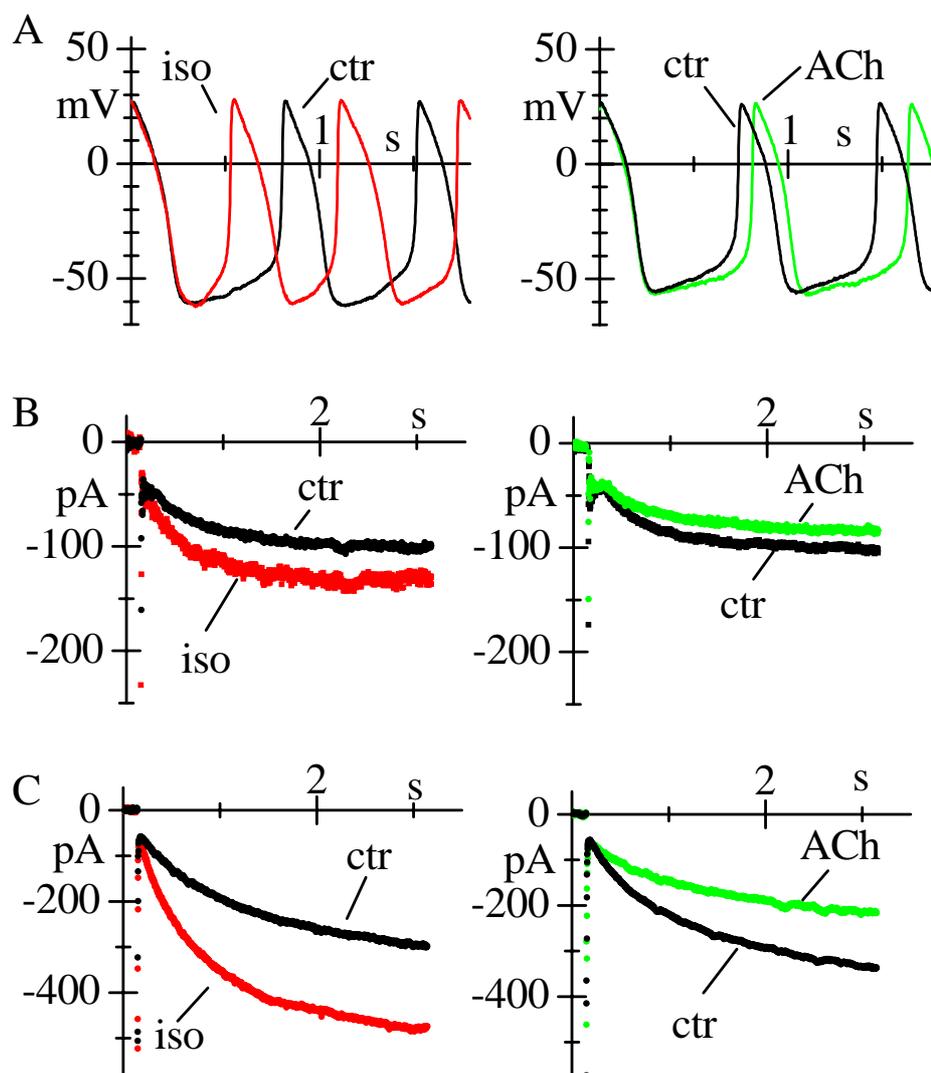


Figura 36: Il pannello **A** mostra l'andamento temporale della frequenza dei potenziali d'azione registrati da una cellula rappresentativa, in controllo (Tyrode) e presenza di isoproterenolo 1 μ M (**sinistra**) o di ACh 0.1 μ M (**destra**). **B** e **C**: effetto della perfusione di isoproterenolo (**sinistra**) e acetilcolina (**destra**) sulla corrente I_f registrata a -75 mV in cellule con cinetica di attivazione veloce (pannello **B**) e lenta (pannello **C**).

Nella **figura 36A** sono mostrati potenziali d'azione pontanei registrati da aggregati cellulari autoritmici derivati da cellule mES in controllo (ctr) e durante la perfusione degli agonisti autonomici. In particolare si può osservare come l'agonista β -adrenergico isoproterenolo (Iso 1 μ M) provochi un'aumento della frequenza di scarica dei potenziali d'azione (pannello **A**, **sinistra**) Al contrario l'agonista muscarinico acetilcolina (ACh 0.1 μ M) determina una diminuzione della frequenza di scarica dei potenziali d'azione (pannello **A**, **destra**). La perfusione di isoproterenolo ha causato in media un aumento del $50.0 \pm 7.7\%$ (n=4) mentre la perfusione di acetilcolina ha causato una diminuzione media del $12.3 \pm 5.5\%$ (n=4).

Sia l'aumento che la diminuzione di frequenza sono causati principalmente da una variazione della pendenza della fase di depolarizzazione diastolica lenta, fase in cui è attiva la corrente I_f .

Abbiamo quindi studiato gli effetti di questi agonisti sulla corrente I_f nelle due popolazioni cellulari. Nei pannelli **B** e **C** della **figura 36** sono mostrate le tracce di corrente I_f registrate a -75 mV in una cellula con cinetica veloce (pannello **B**) e una con cinetica lenta (pannello **C**): in entrambi i casi la registrazione è stata effettuata in condizioni di controllo e durante la perfusione di isoproterenolo (1 μ M, **sinistra**) e acetilcolina (0.1 μ M, **destra**). In media l'isoproterenolo ha causato un aumento di corrente dovuta ad uno shift della curva di attivazione della corrente I_f di 2.7 ± 0.56 mV (n=7) e 5.9 ± 0.4 mV (n=10) mentre l'acetilcolina ha provocato una diminuzione di corrente dovuta a uno shift negativo di 2.0 ± 0.7 mV (n=6) e 4 ± 0.5 mV (n=10) in cellule con cinetica di attivazione veloce e lenta, rispettivamente (**Figura 37**). L'analisi statistica rivela che l'effetto dell'isoproterenolo e dell'acetilcolina risulta significativamente diverso nelle due popolazioni (* $p < 0.05$ con il t-test di Student per popolazioni indipendenti).

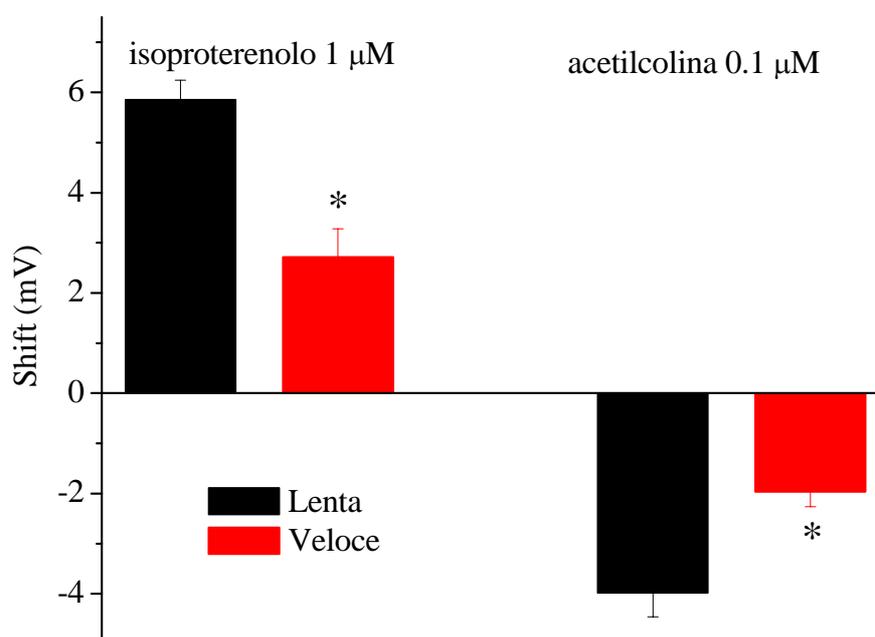


Figura 37: Grafico dello shift medio della curva di attivazione della corrente I_f durante perfusione di isoproterenolo 1 μ M (**sinistra**) e acetilcolina 0.1 μ M (**destra**) (barra nera: cellule con cinetica lenta, barra rossa: cellule con cinetica veloce). * $p < 0.005$.

Dal momento che le cellule autoritmiche derivate dalle mES presentano una risposta ai modulatori autonomici simile a quella delle cellule pacemaker native, abbiamo indagato la presenza dei recettori di membrane che, nelle cellule pacemaker cardiache, sono alla base di questa via di trasduzione del segnale, attraverso esperimenti di immunofluorescenza (**Figura 38**). Le branche simpatiche e parasimpatiche del sistema nervoso rilasciano neurotrasmettitori che attivano rispettivamente i recettori adrenergici e muscarinici. Per questo motivo abbiamo utilizzato anticorpi diretti contro le isoforme β_1 e β_2 dei recettori adrenergici, le più espresse a livello cardiaco, e contro l'isoforma M_2 del recettore muscarinico, responsabile dell'effetto cronotropo negativo nel cuore. Ancora una volta abbiamo utilizzato come marcatore di differenziamento verso il fenotipo muscolare/cardiaco la caveolina 3.

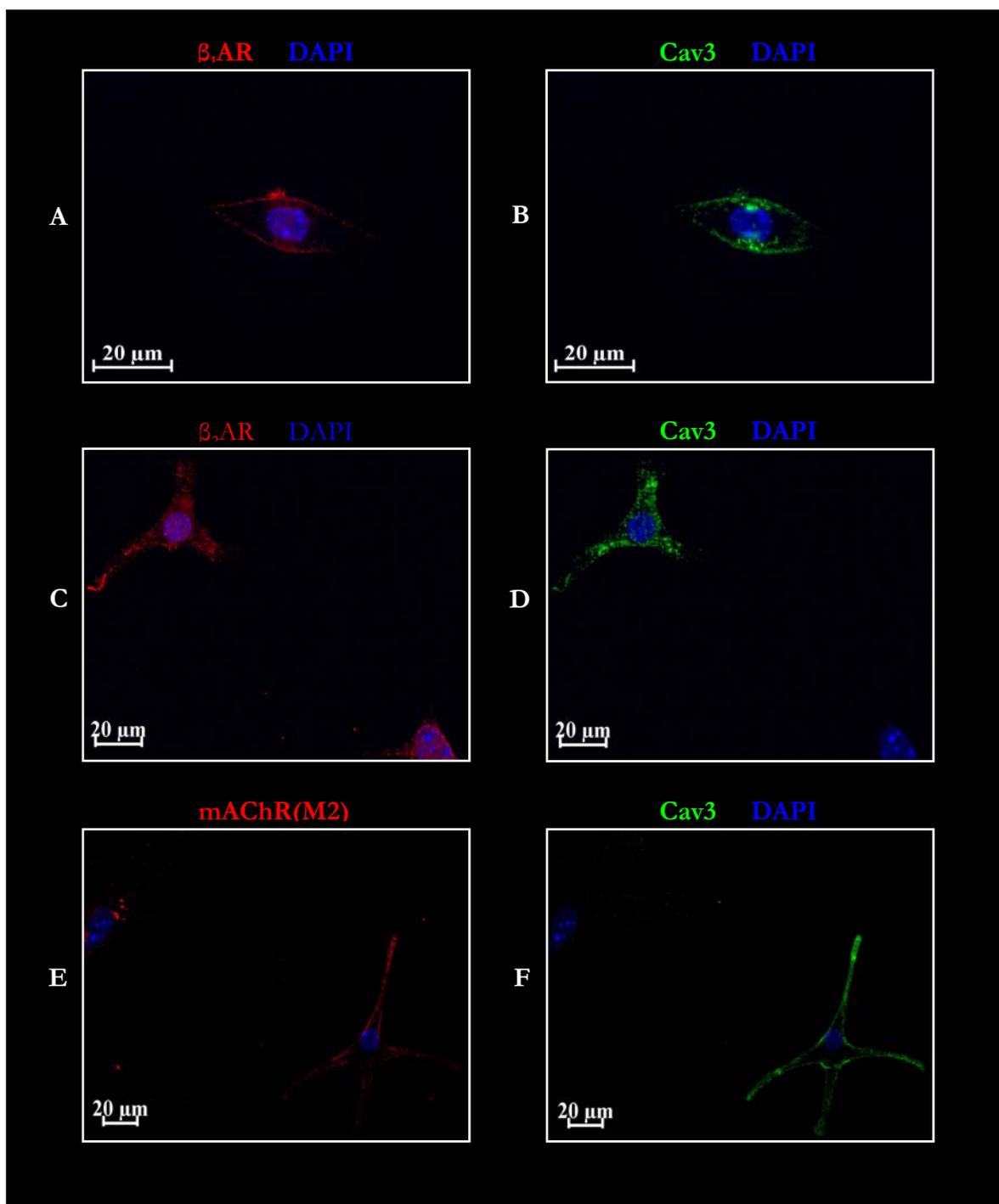


Figura 38: A sinistra: immagini di immunofluorescenza acquisite al microscopio video-confocale di cellule isolate da porzioni spontaneamente contrattili, marcate per i recettori β_1 e β_2 adrenergici (pannelli A e C rispettivamente) e per l'isoforma muscarinica M_2 (pannello E). A destra (pannelli B, D e F): le immagini corrispondenti marcate con la caveolina 3 (verde). In tutti i pannelli il nucleo è stato evidenziato tramite marcatura con DAPI.

Nella **figura 38** sono mostrate tre cellule rappresentative esprimenti la caveolina 3 (pannelli **B**, **D** e **F**) in cui sono espressi i recettori β_1 -adrenergici (pannello **A**), β_2 -adrenergici (pannello **C**) e M_2 muscarinici (pannello **E**).

In conclusione i nostri dati dimostrano che le cellule mES possono differenziare verso un fenotipo cardiaco. In particolare una porzione di queste cellule risulta essere autoritmica e presenta caratteristiche elettriche e molecolari tipiche delle cellule pacemaker native quali l'espressione della corrente I_f , ed in particolare delle isoforme HCN1 e HCN4 dei canali pacemaker, espressione dei recettori β -adrenergici e muscarinici necessari per la corretta interazione con il sistema nervoso autonomo e responsabili della modulazione fisiologica della frequenza cardiaca.

Mesoangioblasti

Attraverso il metodo di isolamento descritto precedentemente (vedi **Materiali e metodi**) sono stati ottenuti diversi cloni di mesoangioblasti, ma in questo lavoro di tesi ci siamo occupati solo del clone J2 che ha mostrato una elevata capacità di differenziare verso un fenotipo cardiaco.

I mesoangioblasti indifferenziati del clone J2 sono stati sottoposti all'analisi al FACS per verificare la presenza dei seguenti marcatori di superficie: CD45, CD34, CD44, CD31, Flk-1, Sca-1 e c-kit. Come mostrato in **figura 39**, queste cellule sono risultate positive per i comuni marcatori staminali CD34, Sca-1 e c-kit, per la proteina transmembrana CD44 e anche per CD31 ma non per flk-1 (VEGFR2), quest'ultimi entrambi markers delle cellule endoteliali. Sono risultate invece negative per l'antigene CD45, una glicoproteina di membrana espressa sulla superficie cellulare della linea leucocitaria.

	CD45	CD34	CD44	CD31	Flk-1	Sca-1	c-kit
Ventricle J2	-	+	+	+	-	+	+

Figura 39: Espressione dei marcatori di superficie da parte dei mesoangioblasti ventricolari attraverso l'analisi al FACS.

Un'ulteriore caratterizzazione dei mesoangioblasti indifferenziati è stata condotta tramite RT-PCR; in particolare sono stati analizzati una serie di fattori trascrizionali che non possono essere rilevati attraverso l'analisi al FACS. L'analisi di RT-PCR (**Figura 40**) ha evidenziato che le cellule indifferenziate esprimono Isl-1, Tbx2, Tbx5, GATA4, GATA 6 e Nkx2.5 attivatori e repressori trascrizionali coinvolti nel programma genico che conduce al differenziamento verso un fenotipo cardiaco, [107], [97], [98], [99], [108], [109]. Abbiamo inoltre verificato la presenza di Tbx3, un fattore di trascrizione che delinea in modo specifico lo sviluppo del nodo senoatriale e del tessuto di conduzione [108], [110] (dati non mostrati).

È stato anche rilevato il segnale per il peptide natriuretico atriale (ANP) e della connessina 43, entrambi markers cardiaci. Gli mRNA di proteine dell'apparato contrattile, normalmente espressi nei miociti scheletrici e cardiaci, come l'actina cardiaca e actina muscolare scheletrica

risultano assenti (**Figura 40**), suggerendo che queste cellule sono effettivamente dei progenitopri immaturi.

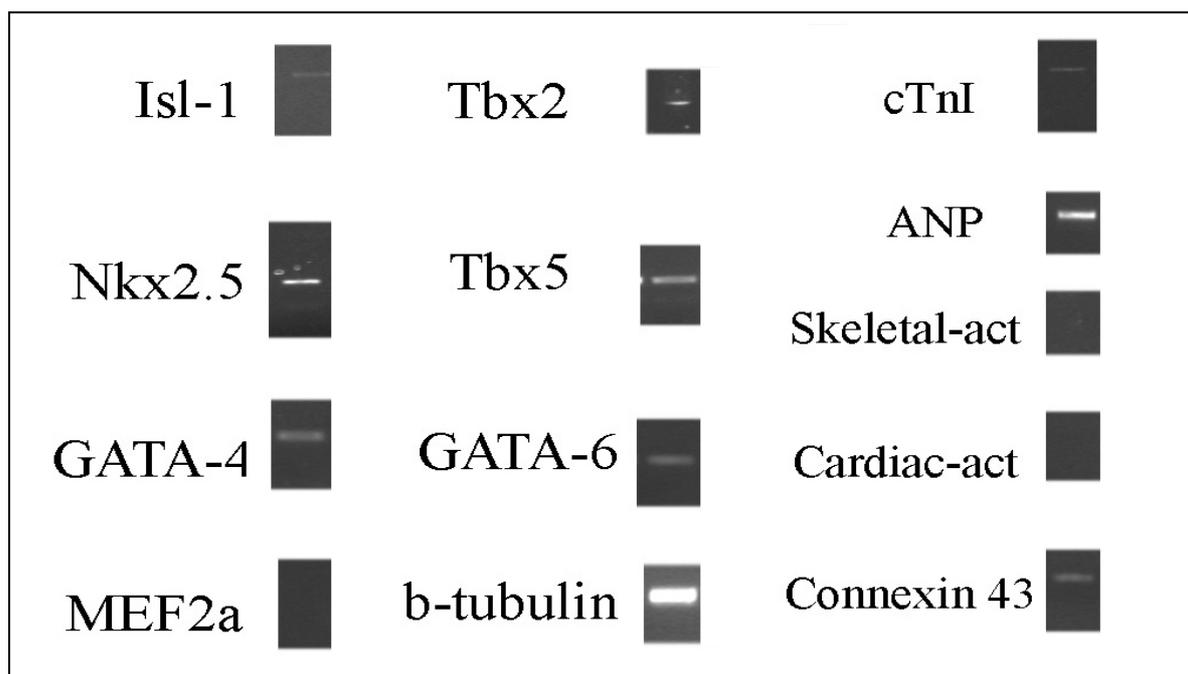


Figura 40: Analisi di RT-PCR per verificare l'espressione di alcuni marcatori cardiaci nei mesoangioblasti ventricolari.

Il differenziamento verso un fenotipo cardiaco è stato indotto abbassando la percentuale di siero nel terreno di coltura da 10% a 2%. Dopo circa 5 giorni in coltura con terreno differenziativo i mesoangioblasti cardiaci vanno incontro ad un cambiamento di morfologia che da allungata diventa alquanto irregolare (**Figura 41**), simile a quella di miociti ventricolari in coltura. Inoltre con una resa variabile da esperimento ad esperimento, circa il 70-80% dei mesoangioblasti indotti a differenziare, esprime la miosina, proteina tipica delle cellule contrattili e una loro sottopopolazione è inoltre in grado di contrarsi spontaneamente e ritmicamente.

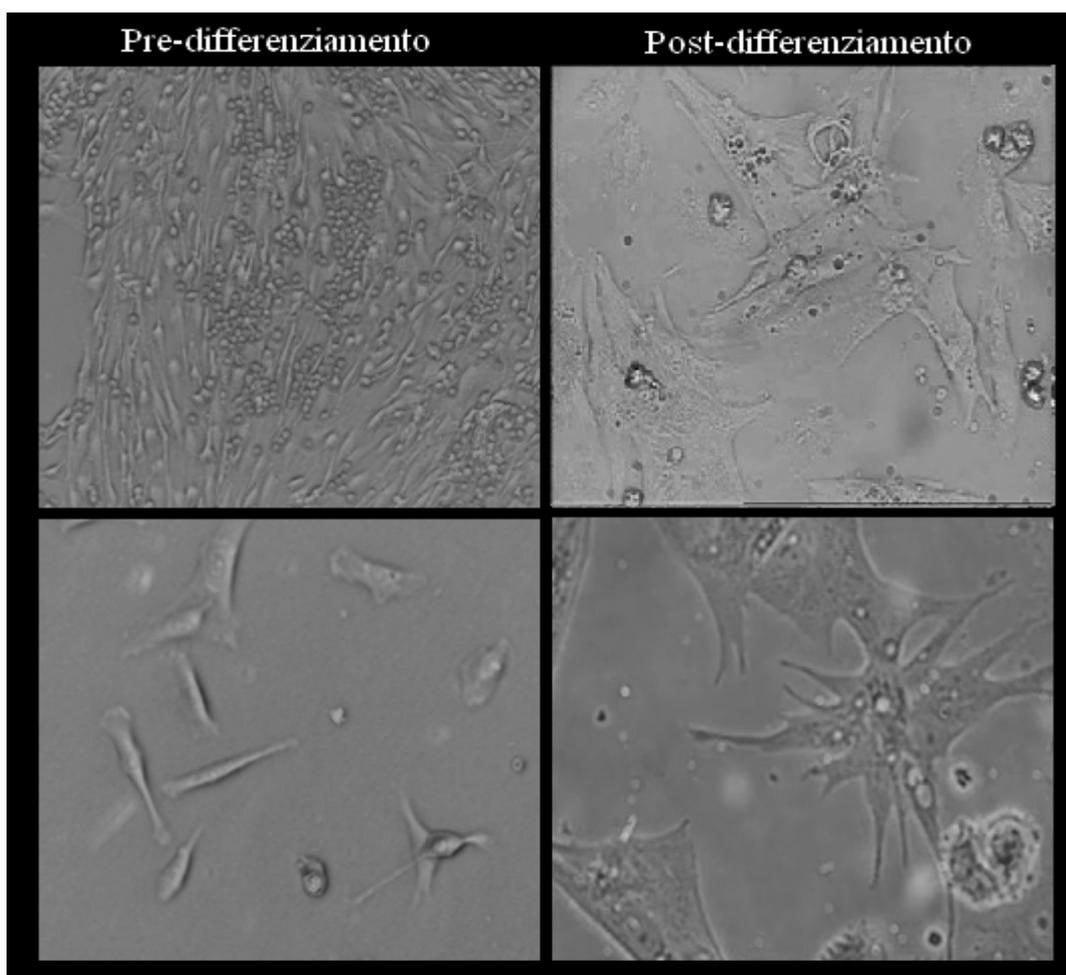


Figura 41: Immagini a contrasto di fase di mesoangioblasti prima e dopo il differenziamento, ad alta (pannelli in alto) e bassa confluenza (nei pannelli inferiori) in cui si vede chiaramente il cambiamento morfologico.

Date le caratteristiche osservate (cambiamento morfologico e contrazione spontanea), abbiamo voluto verificare la presenza di una struttura molecolare tipica del differenziamento verso un fenotipo cardiaco attraverso analisi di immunofluorescenza.

Tramite la marcatura delle proteine tipiche dell'apparato contrattile, siamo andati ad analizzare la struttura citoscheletrica sia dei mesoangioblasti indifferenziati sia di quelli differenziati. La **figura 42** mostra, come atteso in seguito a differenziamento spontaneo verso un fenotipo cardiaco, che i mesoangioblasti differenziati presentano una marcatura che evidenzia strutture simili ai sarcomeri sia della miosina che della actina mentre i mesoangioblasti indifferenziati non presentano alcuna marcatura per la miosina e il citoscheletro di actina non risulta strutturato in sarcomeri.

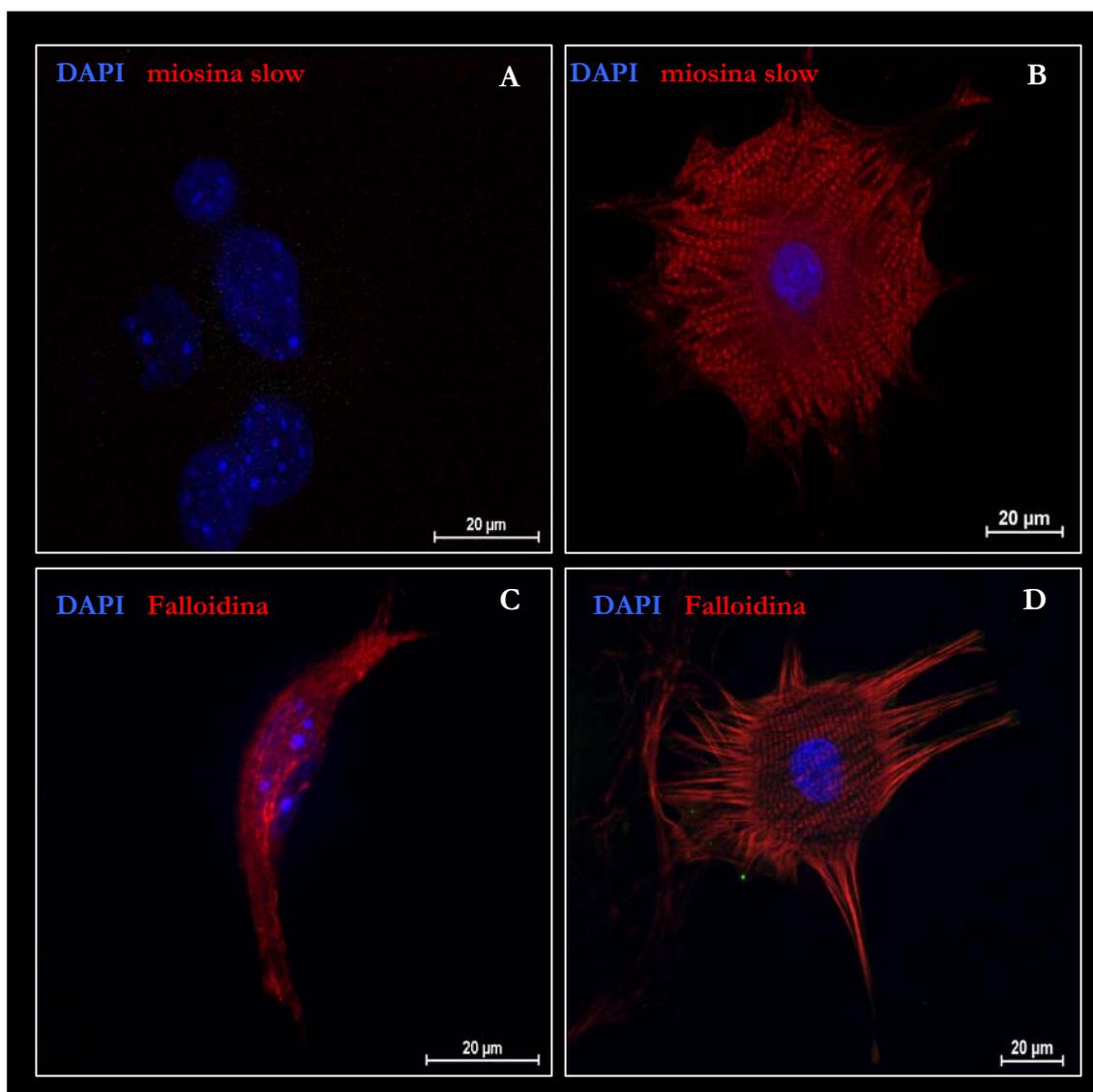


Figura 42: Immagini di immunofluorescenza acquisite al microscopio confocale. In **A e C**: marcatura delle cellule indifferenziate con miosina slow (A) e falloidina (C) entrambe in rosso che evidenziano la mancanza di un apparato contrattile ben organizzato. In **B e D**: marcatura delle cellule differenziate 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.

Una caratteristica funzionale importante dei miociti è la loro capacità di propagare l'impulso elettrico da una cellula all'altra; questo avviene grazie alla presenza di giunzioni comunicanti, le gap junctions, costituite da proteine dette connesine che garantiscono l'accoppiamento cellulare tramite dei canali ionici. Siamo quindi andati a valutare l'espressione della connessina 43 (Cx43) che è l'isoforma maggiormente espressa a livello cardiaco. Inoltre dato che una frazione dei mesoangioblasti differenziati presenta attività autoritmica abbiamo verificato la presenza della connessina 45 (Cx45) che è l'isoforma più abbondante nel tessuto di conduzione

ed in particolare nel nodo senoatriale. La **figura 43** mostra un esempio di espressione sia della Cx43 che della Cx45 in mesoangioblasti differenziati che presentano una struttura sarcomerica ben organizzata (pannelli in basso); da notare che la marcatura è particolarmente evidente nelle regioni di contatto tra cellule adiacenti dove ci si aspetta che queste proteine siano localizzate. L'analisi di immunofluorescenza sulle cellule indifferenziate non ha evidenziato la presenza di alcuna delle due isoforme nonostante l'analisi di RT-PCR su queste cellule abbia evidenziato la presenza dell'mRNA della Cx43 (dati non mostrati).

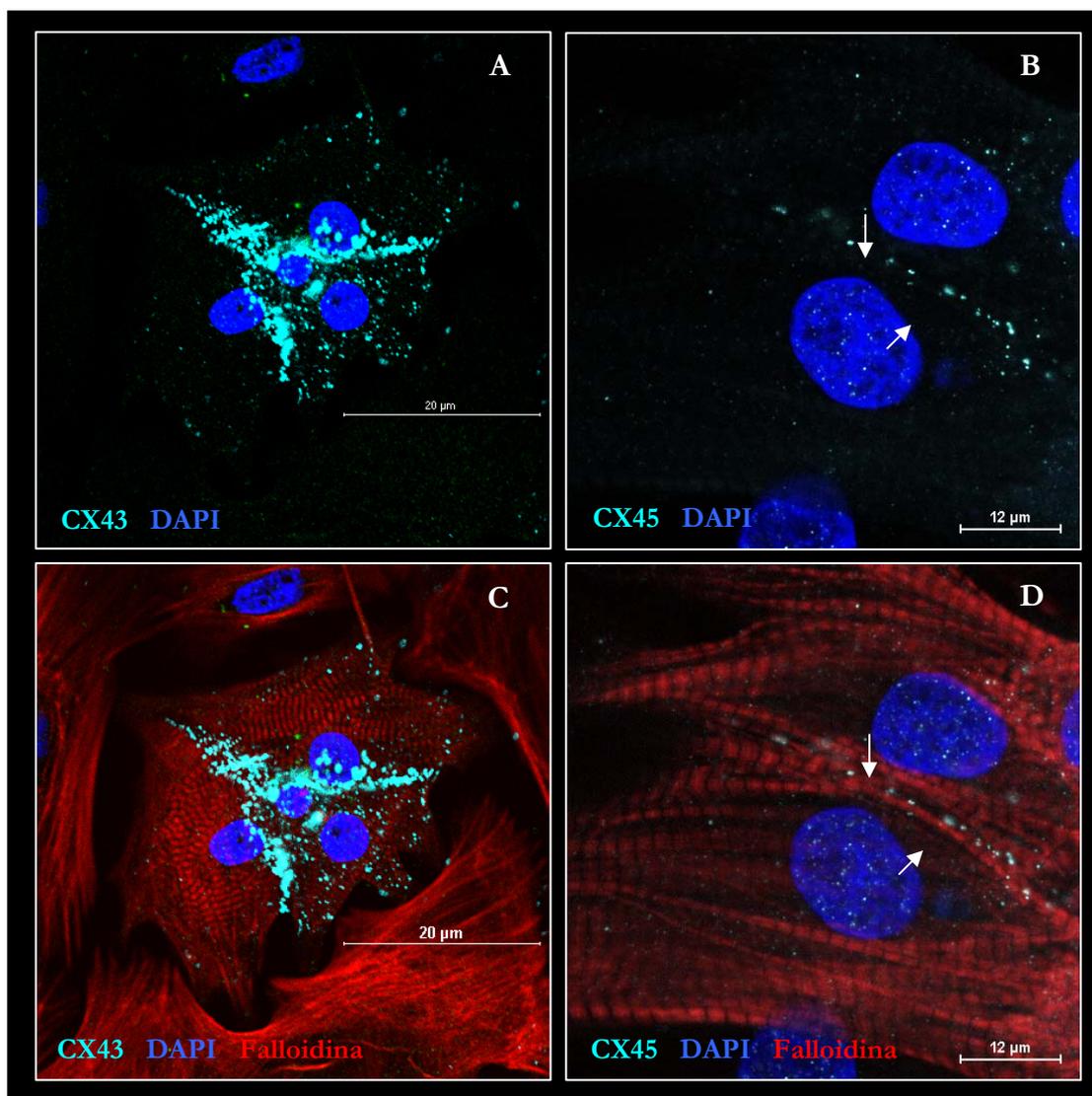


Figura 43: Marcatura della Cx43 e Cx45 in mesoangioblasti cardiaci differenziati. **A:** in azzurro marcatura con Cx43; la marcatura risulta localizzata nelle regioni di contatto tra cellule vicine come evidente nel pannello **C** in cui è stato messo in evidenza il citoscheletro. **B e D:** le frecce indicano la presenza della Cx45 al confine tra una cellula e l'altra.

Per verificare la presenza di una sottopopolazione di cellule indirizzata verso un fenotipo pacemaker/tessuto di conduzione, abbiamo indagato, attraverso esperimenti di immunofluorescenza, la presenza di un fattore trascrizionale che è stato dimostrato essere importante per lo sviluppo del tessuto pacemaker *in vitro* e del tessuto di conduzione *in vivo* [97], [98], il fattore di trascrizione GATA-6.

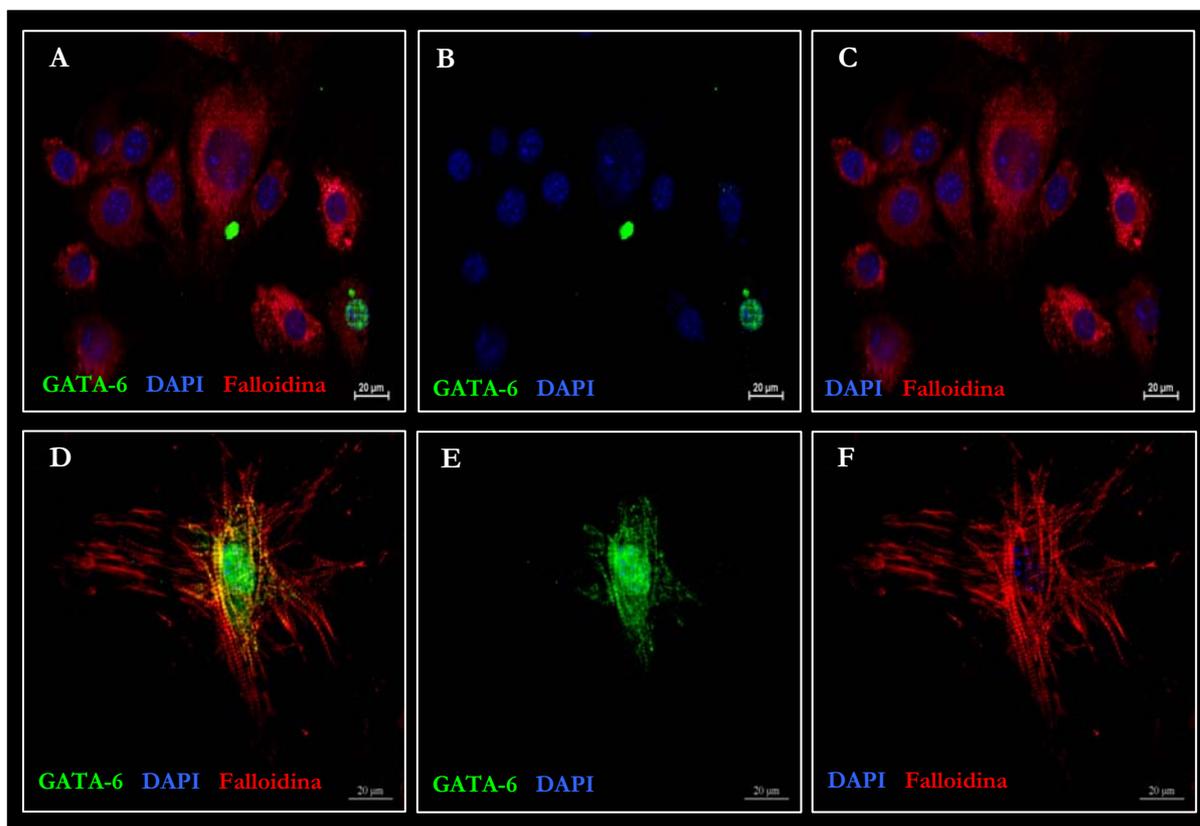


Figura 44: Marcatura per GATA-6 di mesoangioplasti differenziati e non. **A, B, C:** immunofluorescenza per GATA-6 (in verde, pannello **A** e **B**) e per falloidina (in rosso, pannello **A** e **C**) nei mesoangioplasti indifferenziati. **D, E, F:** le stesse immagini per i mesoangioplasti differenziati.

La **figura 44** 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; è possibile notare che una frazione di cellule esprime il GATA-6 già allo stato indifferenziato (31.9%) ed inoltre, in seguito al differenziamento, GATA-6 risulta espresso nelle cellule che hanno sviluppato un apparato contrattile organizzato. Dopo differenziamento abbiamo constatato che GATA-6 è espresso in una frazione delle cellule pari al 34.2%. L'espressione del GATA-6 in una sottopopolazione di mesoangioplasti è stata confermata attraverso la co-trasfezione delle cellule indifferenziate con il plasmide cGATA-6/GFP e un plasmide di che esprime costitutivamente la proteina fluorescente DsRed per valutare l'efficienza di trasfezione (vedi **Materiali e**

Metodi). L'analisi fluocitometrica ha evidenziato che circa il 27% delle cellule trasfettate esprimono GFP. Inoltre, le cellule GFP-positive, mantenute in terreno differenziativo, sono in grado di contrarsi spontaneamente (dati non mostrati). Questi dati supportano l'ipotesi che una sottopopolazione di mesoangioblasti cardiaci sia indirizzata al differenziamento verso il tessuto di conduzione pacemaker.

La presenza di attività autoritmica in alcune delle cellule differenziate ci ha portato ad indagare più approfonditamente le caratteristiche elettrofisiologiche di queste cellule. Siamo quindi andati a caratterizzare l'andamento del potenziali di membrana in cellule singole. In alcune cellule differenziate abbiamo registrato potenziali d'azione spontanei con una tipica forma pacemaker-like, caratterizzati quindi da una fase di depolarizzazione diastolica lenta, che conduce lentamente il potenziale di membrana fino alla soglia per iniziare il potenziale d'azione successivo (**Figura 45A**). Altre cellule invece sono in grado di generare un potenziale d'azione solo se stimolate elettricamente (**Figura 45B**).

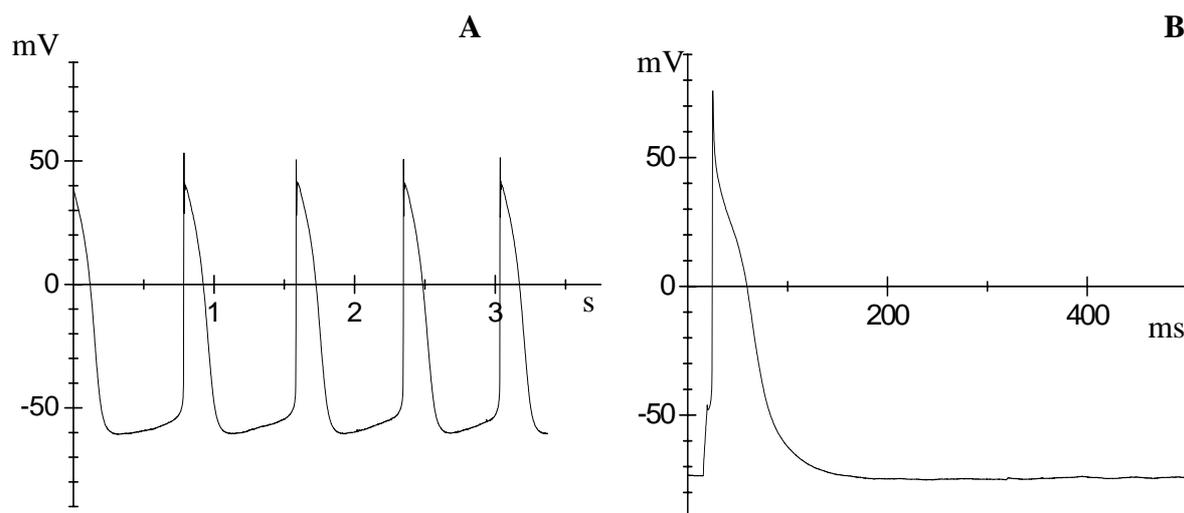


Figura 45: RegISTRAZIONI DEI potenziali di membrana effettuati su singola cellula. **A:** potenziali d'azione spontanei. **B:** potenziale d'azione registrato in seguito ad applicazione di uno stimolo elettrico in cellule quiescenti.

È noto che la principale componente ionica della fase di depolarizzazione diastolica lenta, responsabile del comportamento autoritmico di molto tipi cellulari è la corrente I_f o pacemaker [102]; 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 68% se si prendono in considerazione solo i mesoangioblasti che visivamente erano dotati di attività autoritmica ($p < 0.01$ con Fisher exact test).

Per studiare le proprietà cinetiche della corrente I_F , il protocollo utilizzato 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 ($\Delta V = -10$ mV) (**Figura 46A**). Ogni potenziale viene applicato 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 al potenziale di piena attivazione di -125 mV. 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 46B**). L'interpolazione della curva di attivazione media, calcolata su 16 cellule con l'equazione di Boltzmann, mostra un potenziale di mezza attivazione ($V_{1/2}$) di -72.5 ± 2.1 mV e un *inverse slope factor* (s) di 7.7 ± 0.5 mV. Le costanti di tempo di attivazione sono state ottenute interpolando le tracce di corrente con una funzione monoesponenziale come mostrato per la traccia a -75 mV mostrata in **figura 46C**. Il grafico della voltaggio dipendenza delle costanti di tempo di attivazione medie è mostrato in **figura 46D** e mostra una forte voltaggio dipendenza simile a quella della corrente pacemaker senoatriale: la costante di tempo media di attivazione a -85 mV è 756 ± 107 ms ($n=16$).

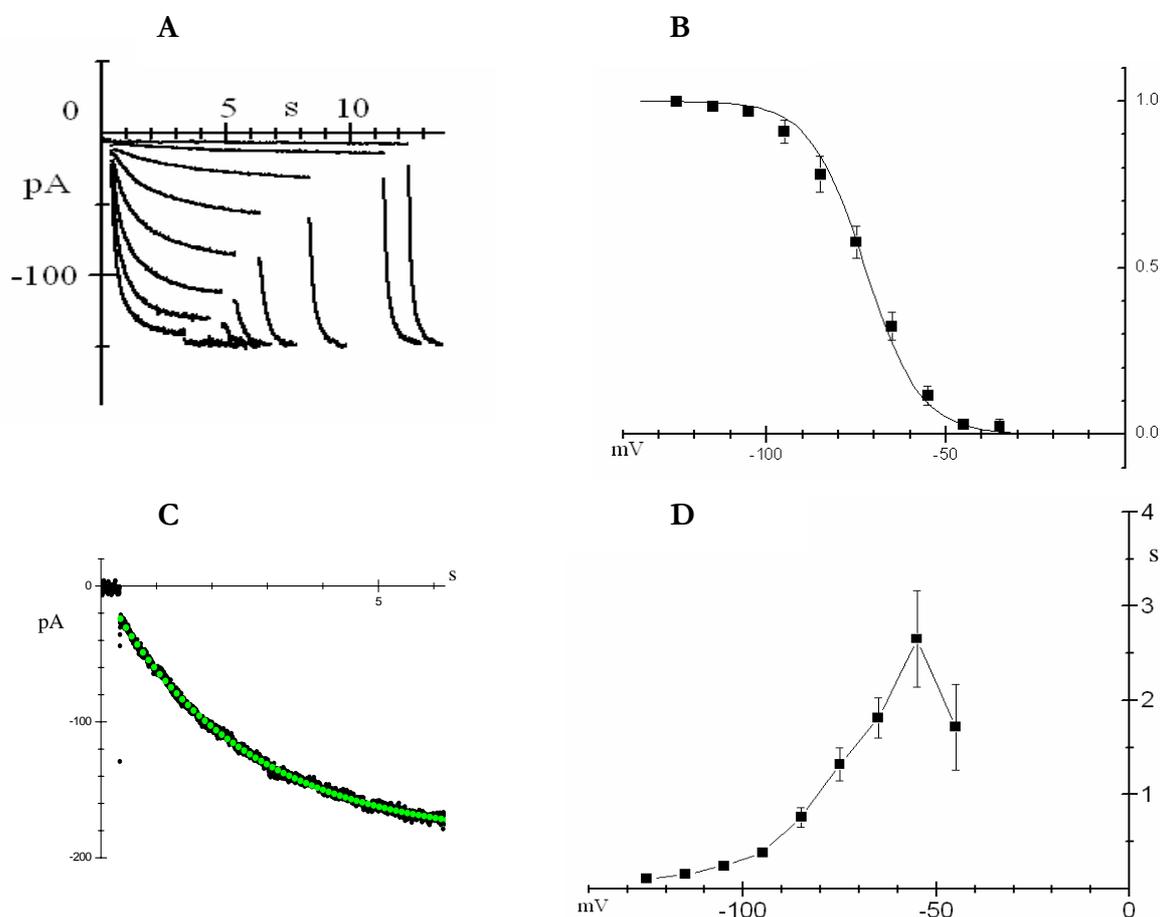


Figura 46: **A:** Tracce rappresentative della corrente pacemaker registrata da una cellula isolata che evidenziano l'attivazione della corrente a potenziali iperpolarizzati, la voltaggio- e tempo-dipendenza. **B:** curva di attivazione media della corrente I_f . **C:** traccia di corrente a -75 mV fittata con una funzione monoesponenziale. **D:** curva delle costanti di tempo di attivazione medie.

Questi dati dimostrano che le cellule autoritmiche derivate dai mesoangioblasti presentano una corrente attivata in iperpolarizzazione, a potenziali compatibili con quelli della depolarizzazione diastolica lenta, e con caratteristiche cinetiche simili a quelle della corrente pacemaker nativa delle cellule senoatriali di molte specie [111], anche se differiscono dai dati pubblicati sul nodo senoatriale murino [112].

Per meglio caratterizzare la corrente I_f di queste cellule abbiamo valutato la relazione corrente/voltaggio (I/V) a canale aperto ed il blocco da parte del cesio, noto per bloccare la corrente pacemaker a potenziali in cui la corrente risulta entrante [3]. 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 47**), in accordo con i dati precedenti ottenuti dalle registrazioni su miociti del nodo senoatriale [102].

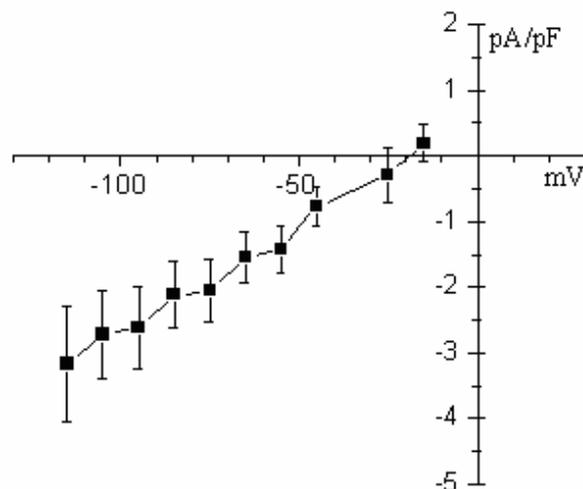


Figura 47: Relazione corrente/voltaggio media (n=6) a canale aperto della corrente I_f registrata in mesoangioblasti differenziati

L'applicazione di cesio 5mM blocca la corrente a potenziali iperpolarizzati ([102], [113]). 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 48**.

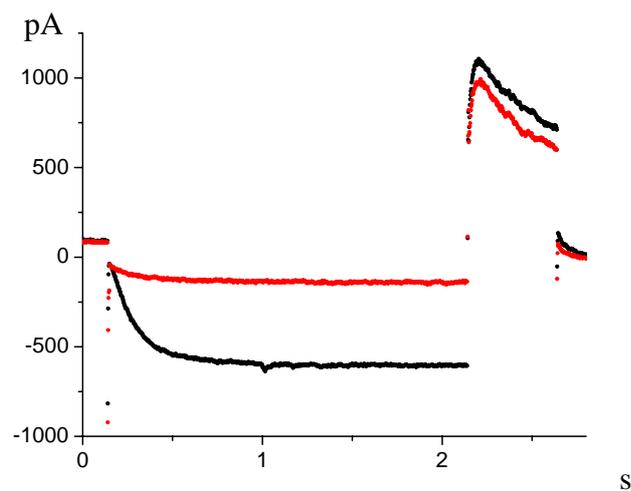


Figura 48: Effetto della perfusione di 5mM cesio (in rosso) sulla corrente I_f a -115 mV.

La **figura 49** mostra la densità di corrente I_f media e la capacità media dei mesoangioblasti cardiaci differenziati.

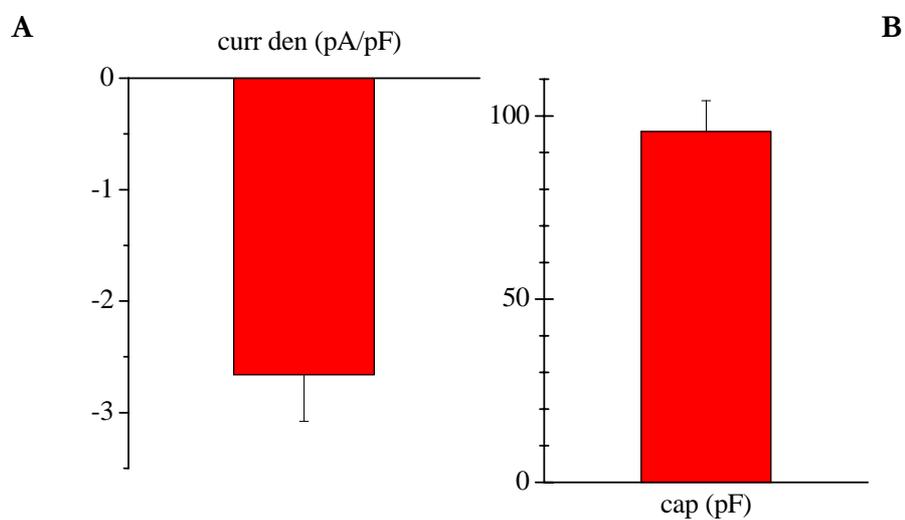


Figura 49: **A:** densità media della corrente I_f nei mesoangioblasti cardiaci differenziati ($n=22$). **B:** capacità di membrana media delle stesse cellule ($n=22$).

Un'ulteriore proprietà delle cellule pacemaker senoatriali è la mancanza della corrente di potassio rettificante entrante I_{K_1} [114], fenomeno che favorisce la fase di depolarizzazione

diastolica lenta, in cui viene attivata la corrente I_f . Abbiamo quindi valutato se l'espressione delle correnti I_f e I_{K_1} fosse inversamente correlata.

Nella **figura 50A** e **B** sono mostrate le curve I/V medie per la corrente I_{K_1} in mesoangioblasti differenziati che esprimono (**B**) o non esprimono (**A**) la corrente I_f . La densità di corrente a -100mV è -1.93 ± 0.49 e -0.175 ± 0.04 pA/pF nelle cellule senza (**A**) e con I_f (**B**), rispettivamente ($p < 0.05$).

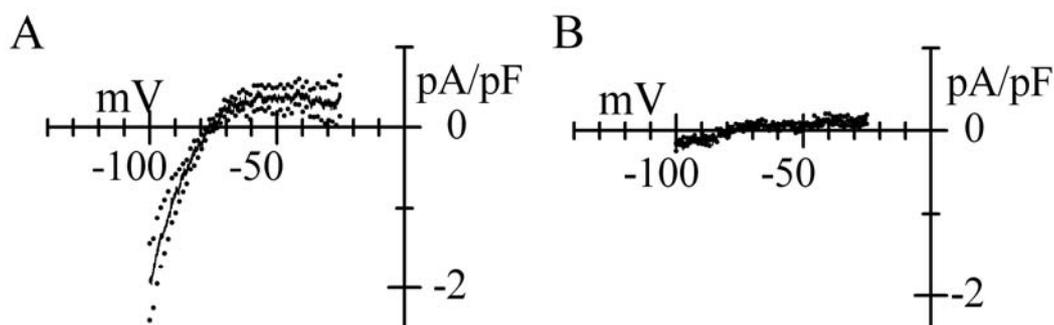


Figura 50: **A:** curva I/V media per la corrente I_{K_1} in mesoangioblasti differenziati che non esprimono la corrente I_f . **B:** curva I/V media per la corrente I_{K_1} in mesoangioblasti differenziati che esprimono la corrente I_f .

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 51**), 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 52**) isoforma che in letteratura è stata dimostrata essere presente nelle cellule ventricolari di topo ma non di altre specie [24]. Un segnale molto più forte è stato invece individuato per l'isoforma HCN4 (**Figura 52**) 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 [31]. 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.

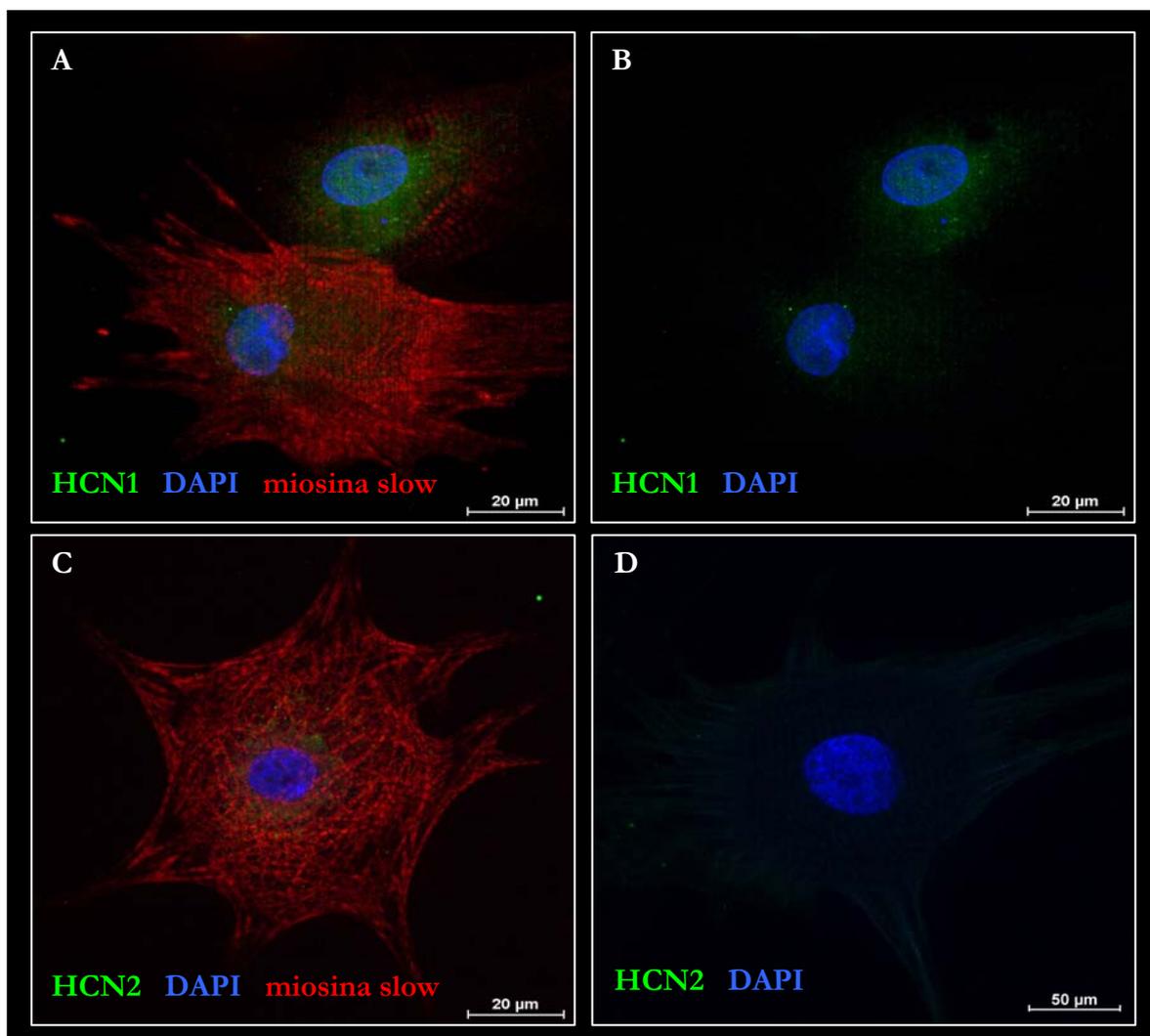


Figura 51: Immagini di immunofluorescenza di cellule differenziate, acquisite al microscopio confocale, delle isoforme HCN1 e HCN2 in verde, della miosina in rosso e dei nuclei in blu.

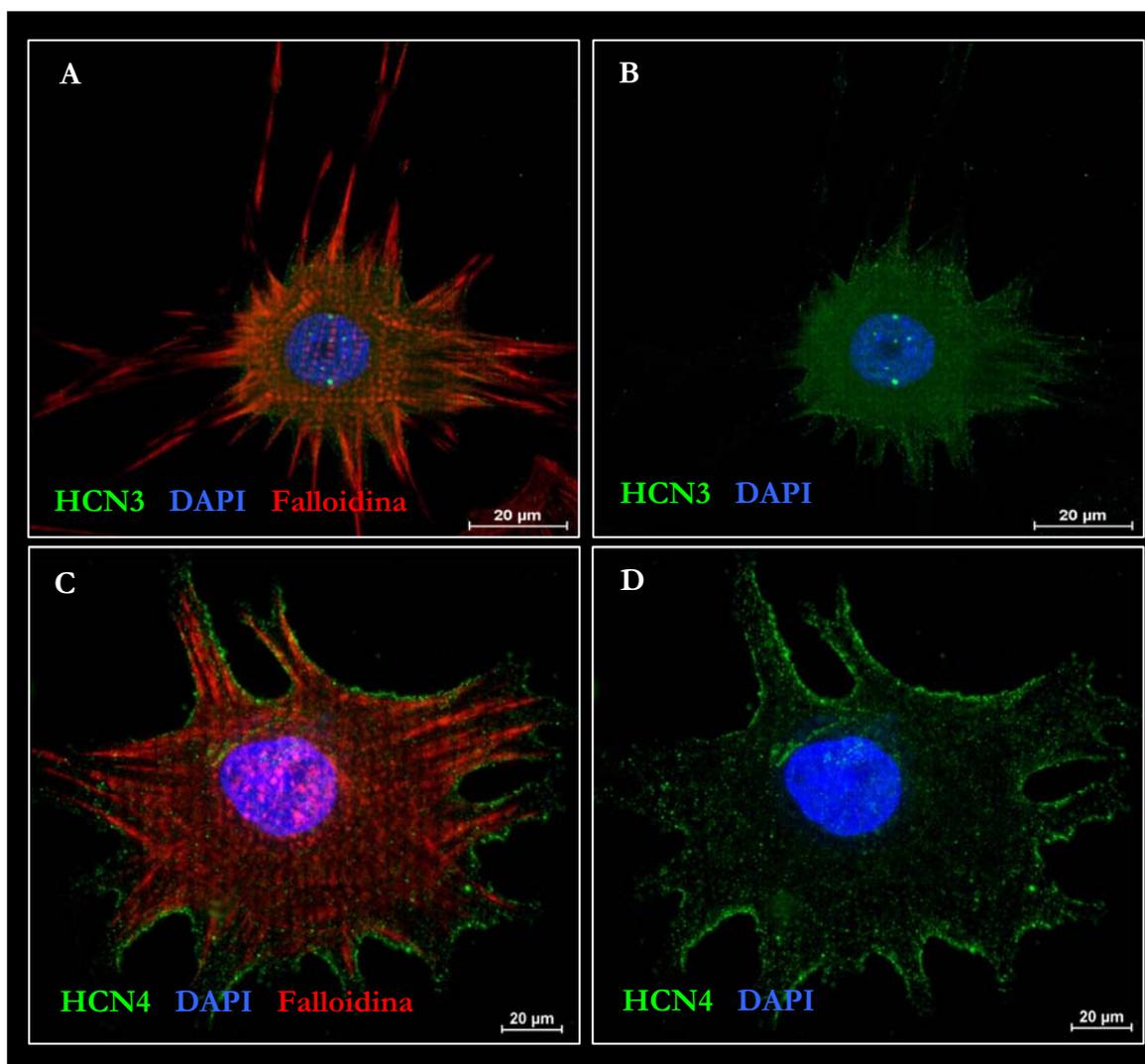


Figura 52: Immagini di immunofluorescenza di cellule differenziate, acquisite al microscopio confocale, delle isoforme HCN3 e HCN4 in verde, della falloidina in rosso e dei nuclei in blu.

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 HCN4 è l'isoforma dei canali pacemaker maggiormente espressa nei mesoangioblasti differenziati; dal momento che HCN4 è la principale isoforma presente nei tessuti pacemaker delle varie specie [31], [115], e viene considerato un marker del differenziamento verso il fenotipo senoatriale [116], [110], [117], [118], [119], abbiamo indagato la presenza di una correlazione tra l'espressione di HCN4 e GATA-6 nei mesoangioblasti differenziati.

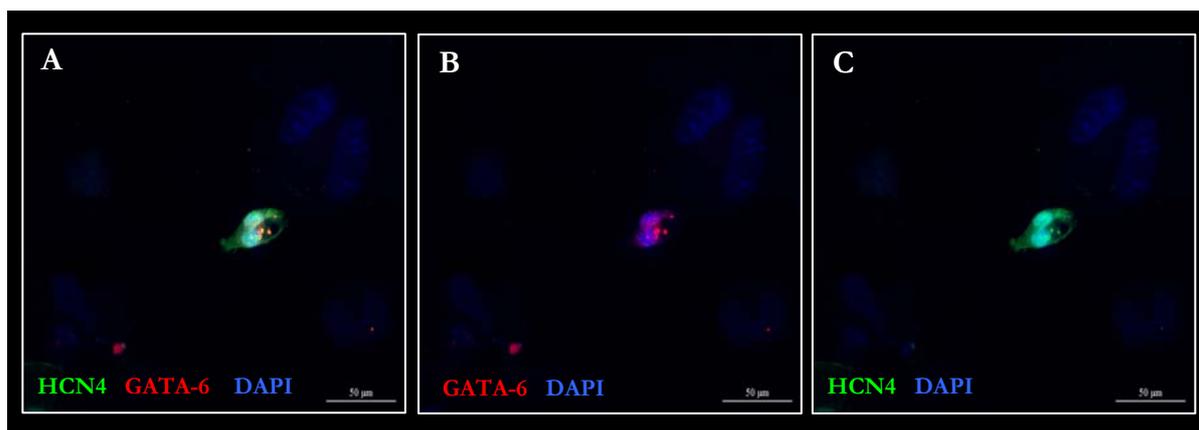


Figura 53: Comarcatura per HCN4 (in verde, pannello **A** e **C**) e GATA-6 (in rosso, pannello **A** e **B**). I nuclei sono stati marcati con DAPI.

L'analisi condotta sui mesoangioblasti differenziati attraverso la comarcatura per anti-HCN4 e anti GATA-6 ha rivelato che su 102 cellule analizzate, 28 delle 34 cellule positive per GATA-6 esprimono anche HCN4 (82,4%; in **figura 53** ne è mostrato un esempio), mentre delle rimanenti 68 cellule negative per GATA-6, una soltanto esprime HCN4 (1.5%). Questo dato indica che la frazione di cellule che esprime l'isoforma HCN4 è pressochè coincidente con la sottopopolazione GATA-6 positiva.

Un'altra caratteristica importante che un substrato cellulare con funzione pacemaker deve possedere, è la capacità di essere regolata dal sistema nervoso autonomo. Per questo motivo abbiamo valutato la capacità dei mediatori autonomici isoproterenolo e acetilcolina di modulare sia la frequenza dei potenziali d'azione sia la corrente I_f . La perfusione con l'agonista β -adrenergico isoproterenolo (Iso) $1\mu\text{M}$, ha aumentato la frequenza di scarica dei potenziali d'azione in media del $32 \pm 8.2\%$ ($n=7$) rispetto al controllo e ha causato uno spostamento medio della curva di attivazione della I_f verso potenziali positivi di 6.15 ± 0.95 mV ($n=5$). Al contrario la perfusione con l'agonista muscarinico acetilcolina (ACh) $0.1\mu\text{M}$ ha provocato un rallentamento della frequenza del $20.9 \pm 8.4\%$ ($n=6$) ed uno spostamento medio della curva di attivazione verso potenziali negativi di 4.45 ± 0.05 mV ($n=5$).

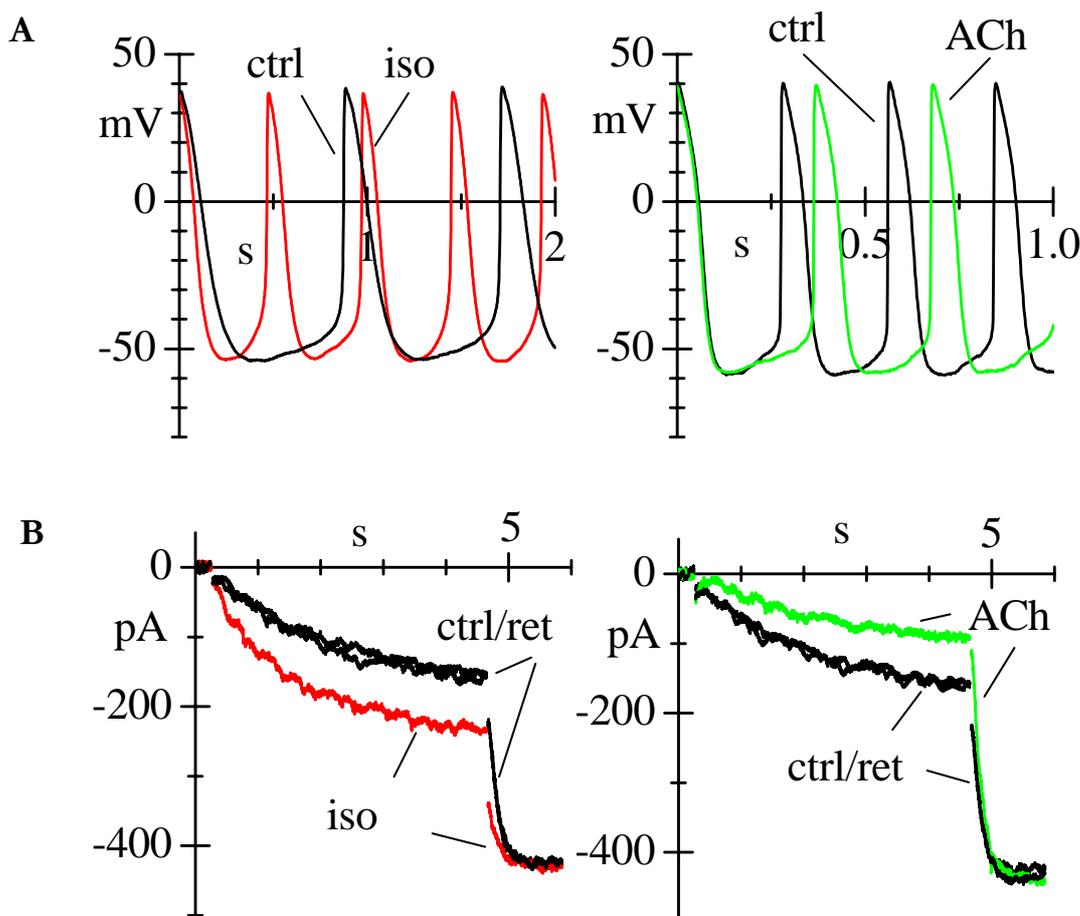


Figura 54: Potenziali d'azione registrati in condizioni iniziali di controllo e durante la perfusione di Iso 1 μ M (A, rosso) o ACh 0.1 μ M (A, verde). Tracce di corrente registrate in controllo, durante la perfusione con Iso 1 μ M (B, rosso) o ACh 0.1 μ M (B, verde) e il ritorno in controllo.

La **figura 54A** mostra un esempio di potenziali d'azione sovrapposti, registrati da una stessa cellula, prima (ctrl) e durante la perfusione di isoproterenolo e acetilcolina. In entrambi i casi, è chiaro come la variazione di frequenza sia accompagnata da variazioni della pendenza della fase di depolarizzazione diastolica lenta, in cui è attiva la corrente I_f . In **figura 54B** sono mostrate tracce di corrente registrate in seguito all'applicazione di un protocollo a due gradini di voltaggio (-75/-125): l'isoproterenolo aumenta la corrente durante il gradino a -75 mV mentre l'ampiezza totale registrata a -125 mV non varia; viceversa l'acetilcolina diminuisce la corrente a -75 mV senza variazione della conduttanza massima. Questi dati confermano che mediatori autonomici agiscono sulla corrente I_f modificandone la posizione della curva di attivazione e quindi la dipendenza dal voltaggio.

Abbiamo voluto confermare questi dati con esperimenti di immunofluorescenza: la **figura 55** mostra la marcatura per il recettore adrenergico β_1 (pannello A), β_2 (pannello B) e muscarinico M_2 (pannello C).

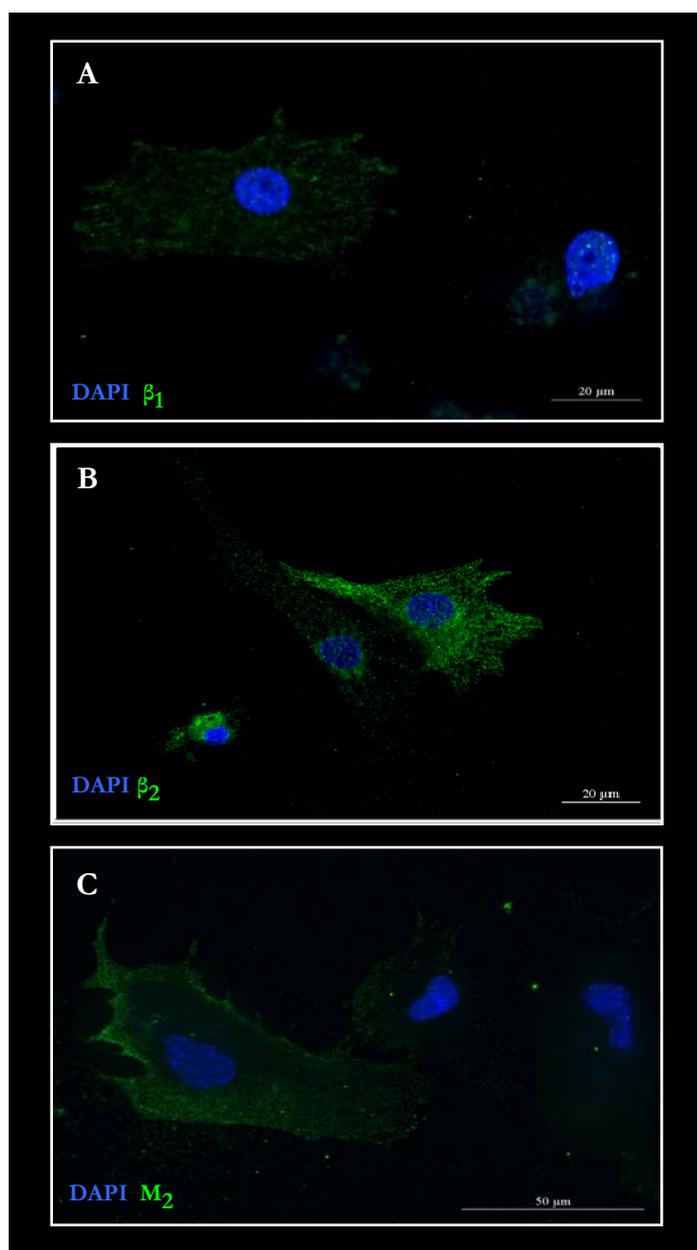


Figura 55: Immunofluorescenza sui mesoangioblasti differenziati per i recettori adrenergici β_1 (pannello A), β_2 (pannello B) e muscarinico M_2 (pannello C).

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.

DISCUSSIONE

La medicina rigenerativa si pone il traguardo di ripristinare la funzionalità dei tessuti o degli organi danneggiati da una patologia. In ambito cardiaco molte delle terapie ad oggi disponibili non consentono di raggiungere questo obiettivo ma costituiscono cure palliative e non definitive. Ad esempio, nel caso di patologie che causano disturbi nella generazione o propagazione del ritmo, l'intervento terapeutico più diffuso consiste nell'impianto di pacemakers elettronici. Questi apparecchi hanno salvato la vita a milioni di persone in tutto il mondo, ma non sono in grado di eguagliare le performance del pacemaker naturale, in quanto presentano innanzitutto il grosso svantaggio di non poter essere finemente modulati da parte del sistema nervoso autonomo; nondimeno, vanno considerate altre limitazioni quali la difficoltà di impianto e adattamento in pazienti pediatrici, la necessità di manutenzione e i disagi legati all'interazione dei pacemakers con gli apparecchi che generano campi magnetici. La prospettiva della creazione di un pacemaker biologico, che possa costituire una valida alternativa all'apparecchio elettronico, alimenta speranze fra clinici e pazienti. Le strade che la ricerca sta esplorando sono orientate in direzioni diverse con risultati più o meno promettenti. Uno dei primi approcci volti alla creazione del pacemaker biologico ha coinvolto la terapia genica, attraverso la quale diversi gruppi di ricerca hanno tentato di aumentare o conferire capacità autoritmica ai miociti residenti. Ciò è stato effettuato tramite il trasferimento di costrutti virali contenenti geni coinvolti nel processo di pacemaking come il gene per il recettore adrenergico β_2 [74], [75], che, una volta stimolato, induce risposta cronotropa positiva, il gene per la subunità accessoria Kir2.1 mutato [76], al fine di creare un dominante negativo per il canale rettificatore entrante di potassio, a sua volta coinvolto nel mantenimento del potenziale di riposo e il gene per l'isoforma HCN2 [120], uno dei costituenti molecolari dei canali pacemaker, i quali, una volta attivati, sono capaci di conferire autoritmicità alla cellula che li esprime. L'applicazione clinica della terapia genica risulta comunque ostacolata dai rischi derivati dall'utilizzo dei vettori virali impiegati per il trasferimento dei geni di interesse. Più recentemente l'attenzione di chi svolge ricerca in questo campo si è orientata verso una terapia di tipo cellulare che presuppone l'utilizzo di cellule staminali come fonte cellulare sostitutiva in grado di ripristinare la funzione persa.

L'approccio basato sull'ingegnerizzazione di cellule staminali adulte tramite l'inserimento di canali HCN (pacemaker passivo, [81]) prevede comunque l'inserimento di materiale genico esogeno all'interno del genoma della cellula ricevente attraverso un processo di integrazione casuale e del quale non si possono controllare o prevedere le conseguenze.

Una strategia alternativa per la generazione di un pacemaker biologico che sia capace di mimare il più possibile le proprietà del pacemaker naturale è rappresentata dal differenziamento guidato di cellule staminali verso il fenotipo pacemaker. Lo scopo principale del nostro laboratorio è la creazione di un substrato autoritmico omogeneo che deve essere eventualmente in grado di funzionare come tessuto pacemaker capace di guidare un tessuto quiescente e generare quindi un ritmo fisiologico stabile e modulabile da parte del sistema nervoso autonomo. Questo substrato cellulare deve quindi possedere caratteristiche elettriche e molecolari il più possibile simili a quelle del nodo senoatriale, il pacemaker naturale del cuore. In questo lavoro ci siamo concentrati sui due fenotipi principali di cellule staminali: le cellule staminali embrionali, nel nostro caso murine, e cellule staminali adulte, nel nostro caso cardiache.

In virtù della loro elevata capacità differenziativa, le cellule staminali embrionali sembrano essere le candidate ideali per la generazione di un substrato autoritmico.

Abbiamo scelto di utilizzare le cellule ES di topo in quanto hanno un'elevata capacità di "self-renewal", possono essere facilmente mantenute in uno stato indifferenziato, si prestano alla manipolazione genica e inoltre presentano il più alto grado di plasticità differenziativa essendo in grado di generare cellule differenziate appartenenti a tutti i tessuti di un organismo. Un altro aspetto che rende le cellule staminali embrionali adatte all'utilizzo in campo rigenerativo, è la presenza di protocolli precisi di differenziamento che permettono una piena riproducibilità delle condizioni sperimentali. Già agli inizi degli anni '90, furono condotti esperimenti che dimostrarono la capacità delle cellule staminali embrionali di differenziarsi spontaneamente verso un fenotipo cardiaco [88], [92]. Da allora diversi gruppi di ricerca si sono dedicati allo studio dello sviluppo e del differenziamento di queste cellule verso un fenotipo cardiaco, ponendo l'attenzione anche su geni e fattori precoci responsabili dell'avvio di tale processo. Una tecnica che consente di ottenere *in vitro* cellule differenziate verso la linea cardiaca, è quella di coltivare le cellule staminali embrionali nelle così dette "hanging drops", tecnica che favorisce la formazione degli EBs ed il successivo differenziamento. È stato dimostrato che all'interno di questi EBs si differenziano cellule con caratteristiche elettriche simili a quelle dei miociti immaturi ventricolari, atriali e senoatriali [92], [103]. I nostri risultati confermano che le ES murine sono in grado di generare Embryoid Bodies (EBs): strutture all'interno delle quali si differenziano cellule appartenenti ai tre foglietti embrionali. Inoltre, è di particolare interesse ai nostri fini la comparsa all'interno degli EBs di aree costituite da cellule di derivazione mesodermica che si contraggono in modo spontaneo (**Figura 25B**). Questa evidenza porta ad ipotizzare che all'interno dell'area contrattile sia presente una

popolazione di cellule capaci di generare attività elettrica autoritmica e che, quindi, posseggano alcune delle caratteristiche distintive di una cellula pacemaker. Una componente ionica di fondamentale importanza per la generazione della depolarizzazione diastolica lenta è la corrente pacemaker I_f che infatti può essere registrata nelle nostre cellule autoritmiche derivate da EBs (**Figura 32**). La corrente I_f non è però peculiare delle cellule pacemaker, infatti può essere registrata anche in altri tipi cellulari cardiaci (miociti atriali e ventricolari) e non (neuroni, cellule retiniche etc. [121]); la sua importanza nel meccanismo di pacemaking deriva dalle caratteristiche cinetiche e molecolari di questa corrente. I costituenti molecolari dei canali f sono i canali HCN di cui sono note quattro isoforme (HCN1-4) variamente distribuite in diversi tessuti. A livello cardiaco l'isoforma HCN2 è quella maggiormente espressa negli atri e nei ventricoli, mentre nel NSA e nelle fibre del Purkinje le isoforme prevalenti sono HCN4 e HCN1 [122]. L'isoforma HCN3 è abbondantemente espressa nel sistema nervoso centrale mentre a livello cardiaco è stata trovata solo di recente nel ventricolo di topo [24].

Gli RNA messaggeri per le quattro isoforme di canali HCN non sono esclusivi delle cellule senoatriali, ma sono diversamente espressi in varie regioni cardiache e anche in altre cellule eccitabili [123], [124]. Lavori precedenti hanno dimostrato la presenza dell'mRNA dei canali HCN nelle cellule staminali embrionali murine pluripotenti: van Kempen e collaboratori hanno mostrato la presenza del messaggero per le isoforme HCN1 e HCN4 sia nelle cellule indifferenziate sia dopo differenziamento [125]. In un lavoro successivo Wang e collaboratori hanno dimostrato che cellule embrionali staminali di topo indifferenziate presentano la corrente I_f ed esprimono gli RNA messaggeri per le isoforme HCN2 e HCN3 ma non per HCN1 o HCN4 [126]. Infine White & Claycomb hanno dimostrato tramite real-time PCR che le cellule autoritmiche derivate dalle ES presentano tutte e quattro le isoforme HCN anche se HCN2 e HCN3 risultano molto più abbondanti delle altre [99]. I nostri dati di RT-PCR hanno rilevato la presenza di tutte e quattro le isoforme HCN sia prima che dopo differenziamento ma, poiché la nostra analisi non è di tipo quantitativo, non abbiamo indicazioni circa l'abbondanza relativa delle diverse isoforme. I risultati sugli embryoid bodies sono coerenti con il fatto che le cellule all'interno di queste strutture sono in grado di differenziare verso tutti i tessuti derivati dai tre foglietti germinali, quindi sono presenti cellule neuronali e altre cellule che ipoteticamente esprimono i canali HCN [29], [127], [128]. Il ruolo dei canali pacemaker nelle cellule indifferenziate, non è ancora chiaro, dal momento che queste cellule presentano un potenziale di riposo di circa -20mV e non esprimono la corrente I_f : la presenza dell'mRNA potrebbe essere dovuta alla necessità di esprimere i canali pacemaker molto precocemente durante il differenziamento, o potrebbe essere il risultato della probabile presenza di una minoranza di

colonie di mES che stanno andando incontro a differenziamento, e questo processo viene messo in luce dall'alta sensibilità della tecnica di PCR. Un'altra ipotesi potrebbe essere orientata sulla presenza di un pool di mRNA codificanti per diverse proteine a livello delle cellule indifferenziate, e la contemporanea presenza di meccanismi di controllo della traduzione, in grado di prevenire la traduzione di proteine che ne indurrebbero il differenziamento.

Dal momento che i nostri risultati di RT-PCR non hanno mostrato alcuna differenza di espressione tra le cellule indifferenziate e differenziate, siamo andati a valutare l'espressione proteica di questi canali. In un lavoro recente Yanagi e collaboratori hanno dimostrato che cellule ES derivate da cellule $flk-1^+$ presentano una marcatura diffusa per HCN1 e HCN4, una volta differenziate in cardiomiociti [129]. I nostri esperimenti di immunofluorescenza condotti sia su singole cellule che su EBs, hanno rivelato la presenza delle proteine canale HCN4 e HCN1 in cellule differenziate verso un fenotipo muscolare, come evidenziato dalla co-marcatura con la proteina caveolina 3; queste subunità sono quelle maggiormente espresse a livello del nodo del seno di diverse specie di mammiferi [20], [104], [117]. Nonostante l'isoforma HCN2 sia quella maggiormente espressa a livello dei ventricoli e degli atri adulti, tessuti la cui abbondanza supera di gran lunga quella del tessuto di conduzione, non abbiamo mai rilevato questa isoforma né nelle cellule singole né negli EBs interi. Questo potrebbe derivare dal fatto che tale subunità venga espressa solo tardivamente durante lo sviluppo embrionale del cuore e che non sia ancora sufficientemente presente da essere rilevata a livello proteico a questo stadio di differenziamento. Questa ipotesi è supportata da uno studio che ha messo in evidenza come, nel topo, durante lo sviluppo embrionale del cuore ci sia un cambiamento nei livelli di mRNA delle varie isoforme HCN; Yasui et al. hanno infatti dimostrato che, in stadi precoci dello sviluppo embrionale, i miociti ventricolari di topo presentano un'alta espressione di mRNA per HCN4 e HCN1, e scarse quantità di HCN2; mentre in stadi più tardivi HCN2 aumenta, a scapito sia di HCN1 che di HCN4, diventando l'isoforma predominante [32]. Quindi i nostri dati potrebbero indicare o che le cellule da noi prese in considerazione riflettano gli sviluppi precoci dell'intero cuore oppure che effettivamente rispecchino cellule del tessuto di conduzione preposte a diventare le cellule pacemaker. A sostegno di questa ultima ipotesi lavori recenti hanno dimostrato che durante il normale sviluppo cardiaco l'isoforma HCN4 non è mai espressa nei precursori delle cellule che formeranno l'atrio mentre è abbondantemente espressa nelle cellule che formeranno il futuro tessuto di conduzione [109], [110]. Per quanto riguarda l'isoforma HCN3 invece, essa è stata rilevata sia negli EBs sia nelle cellule isolate ma solo in regioni o in cellule non esprimenti marcatori muscolari/cardiaci. Questa isoforma è stata poco caratterizzata e non si conosce

molto riguardo alla sua espressione/funzione a livello cardiaco, infatti, solo recentemente, è stata dimostrata la sua presenza nel ventricolo di topo [24].

Quando espresse in sistemi eterologhi le isoforme HCN1 e HCN4 presentano proprietà cinetiche significativamente diverse sia tra loro che rispetto ai canali f nativi [33]. In particolare le correnti registrate in seguito all'espressione dell'isoforma HCN1 presentano cinetiche di attivazione più rapide sia rispetto al canale f nativo che al canale HCN4 il quale è caratterizzato da cinetiche più lente. L'analisi delle cinetiche di attivazione della corrente I_f registrata dalle cellule autoritmiche isolate dagli EBs ha messo in evidenza la presenza di due popolazioni con cinetiche di attivazione nettamente distinte (**Figure 33 e 34**). Nonostante un confronto diretto con i dati precedentemente riportati in letteratura non sia completamente corretto, a causa delle diverse condizioni sperimentali (come per esempio la temperatura) che influiscono sui parametri cinetici, si può però speculare che le correnti registrate dalle cellule ES con cinetiche rapide possano essere date da omotetrameri di subunità HCN1, mentre quella con cinetica lenta possano essere il risultato di omotetrameri HCN4 oppure possano essere eterotetrameri HCN1-HCN4 con prevalenza di una o dell'altra isoforma. A questo proposito esperimenti di co-marcatura su singole cellule con anticorpi anti-HCN1 e anti-HCN4 sono attualmente in corso per verificare un'eventuale co-espressione di entrambe le subunità. La presenza di due popolazioni di cellule pacemaker che esprimono una corrente I_f con attivazione lente o veloce è stata precedentemente osservata nei miociti isolati dal nodo del seno di topo [112], che sono noti per esprimere al livelli di HCN1 e HCN4 rispetto alle altre due isoforme [115], [117].

Gli stessi esperimenti effettuati sulle cellule indifferenziate, hanno messo in evidenza come queste cellule, nonostante la presenza dell'mRNA per tutte e quattro le isoforme dei canali pacemaker, non presentano attività elettrica di alcun tipo, anche se una piccola percentuale di cellule esprime l'isoforma HCN4 dei canali pacemaker (**Figura 28**).

Un substrato autoritmico con caratteristiche tipiche del tessuto pacemaker deve possedere, oltre alle strutture molecolari preposte alla generazione di potenziali d'azione spontanei, anche l'apparato molecolare necessario per la modulazione autonoma della frequenza. Il nodo senoatriale è particolarmente innervato dalla branca simpatica e parasimpatica del sistema nervoso autonomo e, a livello cellulare, i miociti senoatriali sono particolarmente ricchi di recettori β -adrenergici (β_1 e β_2) e muscarinici M_2 ([130], [131], [132]). L'elevata densità di questi recettori assicura una risposta rapida alla stimolazione autonoma. Questo processo di modulazione è basato sulle variazioni intracellulari del secondo messaggero AMP ciclico che agisce direttamente sui canali pacemaker aumentando la loro probabilità di apertura [4], [7]. Le nostre misure elettrofisiologiche dimostrano chiaramente che gli agonisti β -adrenergico

(isoproterenolo) e muscarino (acetilcolina) sono in grado di modulare la frequenza dei potenziali d'azione registrati da aggregati cellulari autoritmici isolati dagli EBs, in maniera del tutto simile a quanto avviene nei miociti senoatriali [133].

Inoltre i nostri dati sulla modulazione confermano la presenza di due diverse popolazioni, che rispecchiano le caratteristiche delle isoforme HCN1 e HCN4. Le due popolazioni precedentemente descritte, infatti, rispondono in modo diverso alla per fusione con agonisti autonomico: la popolazione con cinetica lenta ha infatti una sensibilità maggiore all'azione dei mediatori autonomici, rispetto alla popolazione con cinetica veloce, e ciò corrisponde a quanto descritto in letteratura riguardo alle caratteristiche delle diverse isoforme dei canali pacemaker [14], [20], [24], [25]. Nonostante tale modulazione preveda la presenza di tutte le proteine coinvolte in questa via di trasduzione del segnale (recettori, proteine G, adenilato ciclasi) abbiamo voluto verificare la presenza dei recettori β -adrenergici e muscarinici, a livello di singole cellule, tramite esperimenti di immunofluorescenza. I nostri dati, hanno evidenziato la presenza sia delle isoforme β_1 che β_2 dei recettori adrenergici in cellule co-esprimenti la caveolina 3 nonostante non abbiamo condotto delle analisi statistiche l'impressione è che l'isoforma β_2 sia espressa meno dell'isoforma β_1 . Questi dati sono in parziale contraddizione con quanto precedentemente osservato nel nostro laboratorio, infatti per quanto riguarda il nodo senoatriale di coniglio è stato trovato che i canali pacemaker (HCN4) co-localizzano maggiormente con i recettori β_2 -adrenergici [104]. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta alla diversità di specie oppure allo stadio precoce di sviluppo del sistema cellulare in esame. Questi dati confermano comunque la presenza, nei miociti derivati da cellule ES, dell'apparato trasduzionale che fisiologicamente media la modulazione fine della frequenza cardiaca.

In conclusione i nostri dati dimostrano che le cellule ES di topo possono essere indotte a differenziare verso un fenotipo autoritmico con caratteristiche elettriche e molecolari del tutto simili a quelle dei miociti senoatriali.

L'altra strategia perseguita in questo lavoro è stata la caratterizzazione di una sottopopolazione di cellule staminali adulte associati ai vasi sanguigni, i mesoangioblasti (MABs), in grado di differenziare spontaneamente in cellule cardiache con caratteristiche simili alle cellule pacemaker.

I mesoangioblasti per la loro capacità di differenziare spontaneamente in cellule muscolari sono già stati utilizzati con successo in ricerche per la cura della distrofia muscolare [56], [57] e sono state impiegate anche nella rigenerazione del miocardio infartuato [72]. I mesoangioblasti caratterizzati in questo lavoro sono stati isolati dai vasi di ventricolo di topo, espansi in coltura e

indotti a differenziare verso un fenotipo cardiaco. Le cellule ottenute presentano caratteristiche comuni con i mesoangioblasti derivati dall'aorta isolati in studi precedenti; l'analisi al FACS ci ha permesso infatti di rilevare l'espressione di alcuni marcatori comuni tra cui Flk-1, CD34, c-kit e CD31 (**Figura 39**) [55], [54]. Inoltre le MABs isolate esprimevano CD44, presente anche sulla superficie di mesoangioblasti di derivazione scheletrica impiegati negli studi contro la distrofia [134].

Di particolare evidenza ed interesse è il fatto che questi mesoangioblasti cardiaci differenziano *in vitro* verso un fenotipo cardiaco spontaneamente, senza bisogno di essere co-coltivate con un substrato di miociti ventricolari. 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. Ad oggi il differenziamento cardiaco spontaneo *in vitro* di cellule staminali è stato dimostrato solo con cellule embrionali staminali sia di topo che umane [82], [135]. Questa evidenza è di certo importante in vista di un possibile impiego clinico di queste cellule.

I nostri dati 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 42**).

Una frazione di mesoangioblasti cardiaci differenziati ha mostrato capacità contrattile spontanea, per cui la nostra attenzione si è rivolta in modo particolare su questa sottopopolazione di cellule che mostrava attività autoritmica.

L'analisi di RT-PCR (**Figura 40**) ha mostrato la presenza dell'RNA messaggero per i fattori trascrizionali Isl-1, Tbx2, Tbx3, 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, Tbx3 e GATA6, noti essere coinvolti nel programma genico responsabile della formazione del nodo senoatriale e del tessuto di conduzione in genere [107], [136], [110], [97], [98], [99], [108], [109]. Isl-1 è una proteina regolatoria coinvolta nel differenziamento delle cellule del cosiddetto "second heart field" durante lo sviluppo del cuore. Le cellule Isl-1 positive sono in grado di differenziare verso molti fenotipi cardiaci e in particolare contribuiscono in modo consistente alla formazione del nodo senoatriale [107]. È inoltre importante sottolineare che le cellule Isl-1 positive rimangono nel cuore anche dopo la nascita, come precursori cardiaci [137], [138].

Tbx2 e il suo omologo Tbx3 sono dei repressori trascrizionali ampiamente espressi nei precursori cardiaci. Durante lo sviluppo cardiaco, l'mRNA per Tbx3 è espresso solo nelle regioni indirizzate a formare il nodo del seno e il tessuto di conduzione in generale, e la sua espressione viene inibita altrove. Inoltre, l'espressione ectopica di Tbx3 può fornire proprietà pacemaker ai miociti atriali [139].

Abbiamo utilizzato GATA-6, un noto marker del sistema di conduzione cardiaco, per identificare la sottopopolazione di mesoangioblasti geneticamente predisposta a diventare cellule pacemaker [97], [98], [99]. Il 34.2% delle cellule indifferenziate e il 31.5% di quelle differenziate, esprimono GATA-6 (**Figura 44**). I mesoangioblasti indifferenziati sono stati inoltre transfettati con un costrutto esprimente la proteina fluorescente GFP sotto il promotore del gene GATA-6: l'analisi citofluorimetrica delle cellule trasfettate ha indicato il 27% di cellule positive per la GFP, confermando quindi la presenza di una sottopopolazione di mesoangioblasti esprimenti endogenamente GATA-6. La frazione di cellule indifferenziate GATA-6 positive è simile alla percentuale di mesoangioblasti differenziati che esprimono la corrente I_f (34.5%), un marker funzionale del differenziamento pacemaker.

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 Cx43 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 [140], [141], [142], [118]. Gli esperimenti di immunofluorescenza hanno evidenziato che i mesoangioblasti differenziati esprimono sia la Cx43 che la Cx45 (**Figura 45**) e questa espressione è propriamente localizzata nelle regioni di contatto tra cellule adiacenti; le cellule indifferenziate non esprimono alcuna isoforma delle connesine. L'analisi di RT-PCR ha mostrato che queste cellule possiedono l'RNA messaggero per la Cx43 già allo stadio indifferenziato ma non presentano marcatura in membrana; questa discrepanza può essere dovuta o alla maggiore sensibilità della tecnica di RT-PCR rispetto all'analisi di immunofluorescenza oppure potrebbe essere dovuta alla presenza di una piccola frazione di cellule che sono andate incontro a differenziamento anche in condizioni di coltura in alto siero. Questi dati indicano quindi l'esistenza di un accoppiamento cellulare che garantisce la corretta propagazione dell'impulso

elettrico ed in particolare dimostrano anche l'acquisizione da parte di queste cellule di un fenotipo pacemaker-like.

Per caratterizzare approfonditamente le caratteristiche autoritmiche di queste cellule abbiamo effettuato analisi elettrofisiologiche; abbiamo dimostrato che una porzione rilevante di mesoangioblasti cardiaci isolati presentano potenziali d'azione spontanei con una forma simile ai potenziali delle cellule pacemaker native caratterizzati quindi da una chiara fase di depolarizzazione diastolica lenta che depolarizza la membrana fino alla soglia per il potenziale d'azione successivo, rendendo le cellule autoritmiche (**Figura 45**). Alcune cellule, una volta "clampate", mostravano potenziali d'azione solo se stimolate elettricamente.

È noto che nella fase di depolarizzazione pacemaker un ruolo fondamentale è svolto dalla corrente I_f [102] quindi siamo andati a verificare la presenza di questa corrente e le sue caratteristiche cinetiche. Le tracce di corrente rappresentate in **figura 46** mostrano una corrente attivata in iperpolarizzazione, tempo e voltaggio dipendente che abbiamo registrato in circa il 68.3% delle cellule autoritmiche. Questa corrente presenta tutte le caratteristiche tipiche della corrente I_f senoatriale [102], tra cui una relazione corrente/voltaggio lineare con una inversione intorno ai -20 mV e il blocco da parte del cesio (**Figura 47 e 48**). La corrente I_f misurata nei mesoangioblasti presenta un potenziale di mezza attivazione di -72.5 mV con una soglia in trono ai -45 mV, caratteristiche che la rendono attiva proprio nel range di potenziali della depolarizzazione diastolica lenta. 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 [111], anche se differiscono parzialmente da quelle della I_f nel NSA di topo [112], in cui la corrente si attiva a potenziali più negativi. Data la presenza della corrente I_f , siamo andati a verificare quali delle quattro diverse isoforme degli HCN, i costituenti molecolari di questa corrente, sono espresse in queste cellule. I nostri dati hanno mostrato che l'isoforma maggiormente espressa nei mesoangioblasti differenziati è HCN4 (**Figura 52**), che è anche la principale isoforma espressa nel nodo senoatriale in diverse specie sia a livello di mRNA che di proteina [122], [34], [104]. Inoltre abbiamo riscontrato una debole marcatura anche per l'isoforma HCN3 (**Figura 52**); questa subunità è stata dimostrata essere abbondantemente espressa nel sistema nervoso centrale, mentre a livello cardiaco è stata trovata solo nel ventricolo di topo ma non nell'uomo o nel coniglio [24], [25]. In nessun caso abbiamo riscontrato un segnale per le isoforme HCN1 e HCN2 (**Figura 51**). L'espressione dei canali HCN è legata strettamente al processo differenziativo, infatti né la corrente I_f né la marcatura per gli HCN è mai stata osservata nei mesoangioblasti prima del differenziamento.

Vista la presenza di marker tipici del tessuto di conduzione, quali HCN4 e GATA-6, abbiamo indagato la presenza di una correlazione tra la loro espressione: i nostri dati indicano che l'82.4% dei mesoangioblasti esprimenti GATA-6 esprimono anche HCN4; questi risultati confermano quindi il fatto che la sottopopolazione di cellule indifferenziate esprimente GATA-6 è effettivamente indirizzata ad acquisire un fenotipo pacemaker, e, in seguito a differenziamento, esprimono markers tipici di queste cellule (**Figura 53**).

Un'altra proprietà delle cellule pacemaker è l'assenza della corrente rettificante entrante I_{K_1} [114], componente fondamentale per la ripolarizzazione della membrane nei miociti ventricolari e per il mantenimento del potenziale di riposo. Nei mesoangioblasti differenziati, abbiamo individuato una correlazione tra la presenza di questa corrente di potassio e la corrente I_f : infatti, nelle cellule che hanno la corrente I_f , la componente I_{K_1} ha una densità di corrente molto minore rispetto alle cellule che non esprimono la corrente pacemaker. Questa evidenza avvalorava maggiormente l'ipotesi che questa sottopopolazione di cellule staminali possa fungere da substrato pacemaker.

Una caratteristica importante che un substrato adatto alla generazione di un pacemaker biologico deve possedere è la capacità di interazione con il sistema autonomo al fine di attuare una modulazione rapida (beat to beat) del ritmo cardiaco. Uno dei principali meccanismi che fisiologicamente attuano il controllo della frequenza cardiaca avviene tramite una modulazione da parte dei nucleotidi ciclici della corrente I_f [4], [143]. Il cAMP intracellulare modula la probabilità di apertura del canale f che attivandosi a potenziali più positivi o più negativi conduce rispettivamente ad un aumento o una riduzione della pendenza della depolarizzazione diastolica lenta e quindi della frequenza di contrazione. La concentrazione di cAMP intracellulare è controllata dall'azione reciproca degli agonisti simpatici e parasimpatici rilasciati dalle terminazioni autonome, particolarmente abbondanti nel nodo senoatriale. La perfusione dei mesoangioblasti differenziati con isoproterenolo $1\mu\text{M}$ causa 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'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 54**). Questi risultati indicano la presenza nelle cellule differenziate dell'apparato di trasduzione responsabile della risposta fisiologica dei canali pacemaker alla stimolazione autonoma (recettori β -adrenergici, recettori muscarinici, proteine G stimolatorie ed inibitorie ed adenilato ciclasi). In accordo con questi dati, i nostri esperimenti di immunofluorescenza condotti sui mesoangioblasti differenziati

confermano l'espressione dei recettori adrenergici β_1 e β_2 e del recettore muscarinico M_2 (**Figura 55**).

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.

Alla luce di questi risultati, possiamo affermare che entrambi i tipi cellulari da noi presi in considerazione, in opportune condizioni, sono in grado di differenziare verso un fenotipo pacemaker-like, e potrebbero rappresentare un substrato favorevole all'applicazione clinica.

Per quanto concerne le embrionali staminali, il loro vantaggio è l'elevata capacità differenziativa, e la scelta del loro utilizzo è supportata dalla loro disponibilità commerciale e dalla presenza di un consolidato background scientifico circa il loro differenziamento verso una linea cardiaca. La possibilità di trapiantare cellule staminali embrionali murine nell'uomo è infatti poco probabile in quanto questa operazione potrebbe scatenare nel paziente reazioni di rigetto: per cui il bagaglio di esperienze accumulato in questo ambito, dovrà essere applicato allo studio delle cellule staminali umane, che, pur essendo simili per origine, potrebbero presentare caratteristiche diverse. È importante comunque sottolineare che l'utilizzo di cellule staminali embrionali umane e la loro sperimentazione *in vivo* sono fortemente limitati da norme legislative e sollevano forti questioni di carattere etico. Tuttavia non va dimenticato che anche il trapianto di cellule staminali umane eterologhe può causare rigetto; inoltre, in letteratura sono presenti dati che mostrano assenza di reazioni immunogene in caso di trapianti di mES in altri animali, quali le pecore [144].

Anche nel caso dei mesoangioblasti, il substrato di partenza è comunque murino, e ciò rende difficile la loro applicabilità clinica; si rende perciò indispensabile la ricerca e caratterizzazione di queste cellule nel tessuto cardiaco umano, in modo da predisporre il loro utilizzo per trapianti eterologhi.

Uno dei limiti di questo lavoro è rappresentato dalla resa di cardiomiociti *pacemaker-like*: riguardo le cellule staminali embrionali, come ci si potrebbe aspettare, il numero di queste cellule all'interno di un singolo EB è molto basso, così come, nel cuore, il tessuto di conduzione rappresenta una piccola percentuale della massa cardiaca. Le porzioni contrattili, individuate al microscopio a

contrasto di fase, vengono isolate manualmente con un bisturi; tale processo non è né semplice e né preciso e la resa cellulare rimane comunque bassa.

Una delle strategie utile per aumentare ad esempio la resa e la facilità di isolamento delle cellule staminali embrionali murine è la loro ingegnerizzazione: infatti, stiamo cercando di ingegnerizzare le mES con vettori plasmidici contenenti Tbx2, Tbx3 o GATA6 [136], [97], fattori trascrizionali coinvolti in fasi diverse dello sviluppo del sistema di conduzione cardiaco. In particolare per incrementare il numero di cellule all'interno dell'EB con fenotipo pacemaker abbiamo creato un clone di cellule staminali embrionali che esprime stabilmente il gene Tbx3 e stiamo valutando se la sua espressione costitutiva già a livello delle cellule indifferenziate si ripercuote sul numero di cellule che andranno incontro a differenziamento verso tessuto di conduzione: infatti è già stato dimostrato che il gene Tbx3 è in grado di indurre cellule atriali a sovraesprimere geni tipici del tessuto di conduzione (canali HCN, Connexina 45) e di reprimere l'espressione di geni propriamente atriali (Connexina 43, Connexina 40, canali di potassio responsabili del mantenimento del potenziale di riposo come Kir2.1) [139].

Nel caso dei mesoangioblasti, invece, la porzioni di cellule differenziate pacemaker-like è relativamente alta, intorno al 30%, ma in entrambi i casi si tratta comunque di sottopopolazioni inserite in un contesto eterogeneo e in vista di un utilizzo clinico, si rende necessaria la loro purificazione.

Un altro importante passo è l'impianto di questi 2 tipi cellulari in un modello animale, per verificarne l'integrazione al tessuto circostante e la loro capacità di originare un ritmo cardiaco stabile e modulabile dal sistema nervoso centrale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Brown H, DiFrancesco D. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 1980;308:331-51.
- [2] DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (i_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 1986;377:61-88.
- [3] DiFrancesco D. Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J Physiol* 1982;329:485-507.
- [4] DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 1991;351:145-7.
- [5] Yu H, Chang F, Cohen IS. Pacemaker current i_f in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol* 1995;485:469-83.
- [6] DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 1993;55:455-72.
- [7] DiFrancesco D, Mangoni M. Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i_f) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 1994;474:473-82.
- [8] Gauß R, Seifert R, Kaupp BU. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 1998;393:583-7.
- [9] Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 1998;393:587-91.
- [10] Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 1998;93:717-29.
- [11] Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M. Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem* 1999;9:179-86.
- [12] Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 2001;117:491-504.
- [13] Ulens C, Tytgat J. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* 2001;276:6069-72.
- [14] Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:206-12.
- [15] Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity [see comments]. *Science* 1998;280:69-77.

- [16] Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* 2001;63:235-57.
- [17] Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 1999;274:12835-9.
- [18] Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 2001;268:1646-52.
- [19] Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9391-6.
- [20] Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I_f. *J Biol Chem* 2001;276:29233-41.
- [21] Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A et al. Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol* 2001;117:519-32.
- [22] Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A et al. C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 2001;276:29930-4.
- [23] Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. *NIPS* 2002;17:32-7.
- [24] Mistrik P, Mader R, Michalakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2005;280:27056-61.
- [25] Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem* 2005;280:34635-43.
- [26] Barbuti A, Baruscotti M, Altomare C, Moroni A, DiFrancesco D. Action of internal pronase on the f-channel kinetics in the rabbit SA node. *J Physiol* 1999;520 Pt 3:737-44.
- [27] DiFrancesco D. Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. *J Physiol* 1999;515 (Pt 2):367-76.
- [28] Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14815-20.
- [29] Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biological Chemistry* 1999;380:975-80.

- [30] Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L et al. Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J Physiol* 2002;542:89-97.
- [31] Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 1999;85:e1-e6.
- [32] Yasui K, Liu W, Opthof T, Kada K, Lee JK, Kamiya K et al. I(f) current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circ Res* 2001;88:536-42.
- [33] Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C et al. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 2003;549:347-59.
- [34] Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, Milanesi R, Terragni B, DiFrancesco D. Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ Res* 2004;94:1325-31.
- [35] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
- [36] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-8.
- [37] Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-7.
- [38] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
- [39] BECKER AJ, McCULLOCH EA, TILL JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452-4.
- [40] TILL JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-22.
- [41] Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:63-76.
- [42] Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381-90.
- [43] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3:393-403.
- [44] McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997;276:66-71.

-
- [45] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-76.
- [46] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116:769-78.
- [47] Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T et al. From the Cover: Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9226-31.
- [48] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-9.
- [49] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
- [50] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
- [51] Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-34.
- [52] Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999;283:534-7.
- [53] Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000;3:986-91.
- [54] Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A et al. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 2002;129:2773-83.
- [55] Cossu G, Bianco P. Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:537-42.
- [56] Guttinger M, Tafi E, Battaglia M, Coletta M, Cossu G. Allogeneic mesoangioblasts give rise to alpha-sarcoglycan expressing fibers when transplanted into dystrophic mice. *Exp Cell Res* 2006;312:3872-9.
- [57] Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006;444:574-9.
- [58] Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med* 2004;5:82-98.

- [59] Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91:501-8.
- [60] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108:407-14.
- [61] Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:361-9.
- [62] Szmítko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation* 2003;107:3093-100.
- [63] Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968-73.
- [64] Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10:494-501.
- [65] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664-8.
- [66] Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668-73.
- [67] Olivares EL, Ribeiro VP, Werneck de Castro JP, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RC et al. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H464-H470.
- [68] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-8.
- [69] Min JY, Sullivan MF, Yang Y, Zhang JP, Converso KL, Morgan JP et al. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg* 2002;74:1568-75.
- [70] Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3766-71.
- [71] Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95:911-21.

- [72] Galli D, Innocenzi A, Staszewsky L, Zanetta L, Sampaolesi M, Bai A et al. 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* 2005;25:692-7.
- [73] Adan V, Crown LA. Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *Am Fam Physician* 2003;67:1725-32.
- [74] Edelberg JM, Aird WC, Rosenberg RD. Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA. *J Clin Invest* 1998;101:337-43.
- [75] Edelberg JM, Huang D'T, Josephson ME, Rosenberg RD. Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. *Heart* 2001;86:559-62.
- [76] Miake J, Marban E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* 2002;419:132-3.
- [77] Qu J, Barbuti A, Protas L, Santoro B, Cohen IS, Robinson RB. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability. *Circ Res* 2001;89:E8-14.
- [78] Qu J, Plotnikov AN, Danilo P, Jr., Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation* 2003;107:1106-9.
- [79] Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovskiy EP, Liu L et al. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation* 2004;109:506-12.
- [80] Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapova I, Zuckerman J, Walcott B et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *J Physiol* 2004;555:617-26.
- [81] Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P, Jr., Valiunas V, Qu J et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res* 2004;94:952-9.
- [82] Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985;87:27-45.
- [83] Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1525-39.
- [84] Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:1282-9.

- [85] Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:1282-9.
- [86] Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marban E et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 2005;111:11-20.
- [87] Rosen MR, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB. Genes, stem cells and biological pacemakers. *Cardiovasc Res* 2004;64:12-23.
- [88] Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 1991;48:173-82.
- [89] Smith SC, Reuhl KR, Craig J, McBurney MW. The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. *J Cell Physiol* 1987;131:74-84.
- [90] Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 1984;152:212-9.
- [91] Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 2002;91:189-201.
- [92] Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 1993;44:41-50.
- [93] Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM et al. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 1997;36:149-62.
- [94] Hescheler J, Halbach M, Egert U, Lu ZJ, Bohlen H, Fleischmann BK et al. Determination of electrical properties of ES cell-derived cardiomyocytes using MEAs. *J Electrocardiol* 2004;37 Suppl:110-6.
- [95] Isenberg G, Klockner U. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflugers Arch* 1982;395:6-18.
- [96] Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A et al. Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol* 2001;117:519-32.
- [97] Davis DL, Edwards AV, Juraszek AL, Phelps A, Wessels A, Burch JB. 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* 2001;108:105-19.
- [98] Adamo RF, Guay CL, Edwards AV, Wessels A, Burch JB. 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* 2004;280:1062-71.
- [99] White SM, Claycomb WC. Embryonic stem cells form an organized, functional cardiac conduction system in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H670-H679.
- [100] Accili EA, DiFrancesco D. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) of rabbit SA node myocytes by niflumic acid. *Pflugers Arch* 1996;431:757-62.
- [101] Bois P, Renaudon B, Baruscotti M, Lenfant J, DiFrancesco D. Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 1997;501 (Pt 3):565-71.
- [102] DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 1986;377:61-88.
- [103] Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 1994;75:233-44.
- [104] Barbuti A, Terragni B, Brioschi C, DiFrancesco D. Localization of f-channels to caveolae mediates specific beta2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:71-8.
- [105] Barbuti A, Baruscotti M, DiFrancesco D. The pacemaker current: from basics to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2007;18:342-7.
- [106] Liu J, Dobrzynski H, Gianni J, Boyett MR, Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res* 2007;73:729-38.
- [107] Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y et al. Multipotent embryonic *isl1*⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 2006;127:1151-65.
- [108] Christoffels VM, Hoogaars WM, Tessari A, Clout DE, Moorman AF, Campione M. T-box transcription factor *Tbx2* represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev Dyn* 2004;229:763-70.
- [109] Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, Prall OW, Gier-de Vries C, Soufan AT et al. Formation of the venous pole of the heart from an *Nkx2-5*-negative precursor population requires *Tbx18*. *Circ Res* 2006;98:1555-63.
- [110] Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE et al. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* 2007;100:354-62.
- [111] Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther* 2005;107:59-79.

- [112] Mangoni ME, Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res* 2001;52:51-64.
- [113] Moroni A, Barbuti A, Altomare C, Viscomi C, Morgan J, Baruscotti M et al. Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. *Pflugers Arch* 2000;439:618-26.
- [114] Irisawa H, Brown HF, Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiological Reviews* 1993;73:197-227.
- [115] Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J et al. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 2005;562:223-34.
- [116] Garcia-Frigola C, Shi Y, Evans SM. Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene Expr Patterns* 2003;3:777-83.
- [117] Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, Boyett MR, Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res* 2007;73:729-38.
- [118] Boyett MR, Inada S, Yoo S, Li J, Liu J, Tellez J et al. Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Adv Cardiol* 2006;42:175-97.
- [119] Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, Niwa R, Billeter R, Honjo H et al. Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovasc Res* 2006;72:271-81.
- [120] Qu J, Plotnikov AN, Danilo P, Jr., Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation* 2003;107:1106-9.
- [121] Pape HC. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. [Review] [142 refs]. *Annu Rev Physiol* 1996;58:299-327.
- [122] Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circulation Research (Online)* 1999;85:e1-e6.
- [123] Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 2003;65:453-80.
- [124] Cerbai E, Mugelli A. I_f in non-pacemaker cells: role and pharmacological implications. *Pharmacol Res* 2006;53:416-23.
- [125] van Kempen M, van Ginneken A, de G, I, Mutsaers N, Opthof T, Jongsma H et al. Expression of the electrophysiological system during murine embryonic stem cell cardiac differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:263-70.
- [126] Wang K, Xue T, Tsang SY, Van Huizen R, Wong CW, Lai KW et al. Electrophysiological properties of pluripotent human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23:1526-34.

- [127] Doan TN, Stephans K, Ramirez AN, Glazebrook PA, Andresen MC, Kunze DL. Differential distribution and function of hyperpolarization-activated channels in sensory neurons and mechanosensitive fibers. *J Neurosci* 2004;24:3335-43.
- [128] El Kholy W, MacDonald PE, Fox JM, Bhattacharjee A, Xue T, Gao X et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 2007;21:753-64.
- [129] Yanagi K, Takano M, Narazaki G, Uosaki H, Hoshino T, Ishii T et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and T-type calcium channels confer automaticity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* 2007;25:2712-9.
- [130] Brodde OE, Leifert FJ, Krehl HJ. Coexistence of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the rabbit heart: quantitative analysis of the regional distribution by (-)-3H-dihydroalprenolol binding. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;4:34-43.
- [131] Rodefeld MD, Beau SL, Schuessler RB, Boineau JP, Saffitz JE. Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996;7:1039-49.
- [132] Brodde OE, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol* 2001;96:528-38.
- [133] DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 1993;55:455-72.
- [134] De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG et al. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999;147:869-78.
- [135] Wobus AM, Guan K, Pich U. In vitro differentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes. *Methods Mol Biol* 2001;158:263-86.
- [136] Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT et al. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* 2004;62:489-99.
- [137] Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003;5:877-89.
- [138] Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005;433:647-53.
- [139] Hoogaars WM, Barnett P, Moorman AF, Christoffels VM. Cardiovascular development: towards biomedical applicability : T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:646-60.

-
- [140] Verheule S, van Kempen MJ, Postma S, Rook MB, Jongsma HJ. Gap junctions in the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2103-H2115.
- [141] van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res* 2001;51:217-29.
- [142] Dobrzynski H, Boyett MR. What do we learn from double Cx40/Cx45-deficient mice about cardiac morphogenetic defects and conduction abnormalities? *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:774-7.
- [143] Bucchi A, Baruscotti M, Robinson RB, DiFrancesco D. I(f)-dependent modulation of pacemaker rate mediated by cAMP in the presence of ryanodine in rabbit sino-atrial node cells. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:905-13.
- [144] Menard C, Hagege AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 2005;366:1005-12.