



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA
SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09
CICLO XXVI°

Tesi di Dottorato di Ricerca
**I CANALI HCN E IL LORO RUOLO NELL'ECCITABILITÀ
CARDIACA E NEURONALE**

**PARTE I: CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE "SINOATRIAL-LIKE" DA PRECURSORI
CD166+ DERIVATI DA mESCs**

**PARTE II: SCREENING GENETICO DI PAZIENTI AFFETTI DA EPILESSIA DEL LOBO
TEMPORALE**

Dottorando: Stefano Zoia
Matricola: R09129

Relatore: Dott. Andrea Barbuti
Dipartimento di Bioscienze,
Università degli Studi di Milano

Coordinatore: Prof. Michele Mazzanti

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

| | |
|---------------------------------------------------|-----------|
| INTRODUZIONE GENERALE | 5 |
| IL POTENZIALE D'AZIONE | 6 |
| CANALI HCN E CORRENTE $I_{f/h}$ | 6 |
| CANALI HCN | 7 |
| DISTRIBUZIONE ISOFORME | 7 |
| STRUTTURA DEL CANALE | 8 |
| CORRENTE $I_{f/h}$ | 10 |
| NATURA IONICA | 10 |
| MODULAZIONE | 11 |
| PROTEINE INTERAGENTI CON I CANALI HCN | 14 |
| CANALOPATIE | 16 |
| | |
| PARTE I | 18 |
| | |
| INTRODUZIONE | 19 |
| IL CUORE | 19 |
| ANATOMIA | 19 |
| CIRCOLAZIONI SANGUIGNE | 20 |
| STRUTTURA DELLA PARETE CARDIACA | 20 |
| INNERVAZIONE DEL SISTEMA NERVOSO | 21 |
| ATTIVITÀ AUTORITMICA DEL CUORE | 21 |
| OVERDRIVE SUPPRESSION | 24 |
| I POTENZIALI D'AZIONE CARDIACI | 25 |
| SVILUPPO EMBRIONALE CARDIACO | 28 |
| CELLULE STAMINALI | 31 |
| CELLULE STAMINALI EMBRIONALI (ESCs) | 32 |
| CELLULE STAMINALI ADULTE (ASCs) | 34 |
| PACEMAKER E TERAPIE | 34 |
| TERAPIA GENICA | 35 |
| TERAPIA CELLULARE | 35 |
| CD166 | 36 |
| | |
| SCOPO DEL LAVORO | 39 |
| | |
| MATERIALI E METODI | 40 |
| COLTURE CELLULARI | 40 |
| MANTENIMENTO | 40 |
| DIFFERENZIAMENTO | 41 |
| CITOFLUORIMETRIA | 43 |
| ESTRAZIONE DEL RNA | 45 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| TRATTAMENTO CON DNASI I | 45 |
| RT-PCR | 46 |
| REAL-TIME PCR | 47 |
| ALLESTIMENTO DELLE CO-COLTURE | |
| CON MIOCITI VENTRICOLARI NEONATALI DI RATTO | 50 |
| ANALISI ELETTROFISIOLOGICHE | 51 |
| ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA | 52 |
| BRDU STAINING | 53 |
| MICROSCOPIO VIDEO-CONFOCALE (ViCo) | 54 |
| STATISTICA | 56 |
| | |
| RISULTATI | 57 |
| I PRECURSORI EMBRIONALI STAMINALI | |
| CD166+ DIFFERENZIANO IN CELLULE | |
| “SINOATRIAL-LIKE” PIENAMENTE FUNZIONALI | 57 |
| COESPRESSIONE DI HCN4 E CD166 DURANTE LO SVILUPPO CARDIACO | 57 |
| CD166 IDENTIFICA LE CELLULE INDIRIZZATE VERSO IL FENOTIPO CARDIACO | |
| TRA LE mESCs IN DIFFERENZIAZIONE | 59 |
| LE CELLULE CD166+ ESPRIMONO I GENI TIPICI DEL NSA | 64 |
| I CANALI HCN E QUELLI DEL CALCIO SONO FUNZIONALI | |
| NEI CARDIOMIOCITI CD166+ | 68 |
| IL PROMOTORE DI HCN4 È ATTIVO E DELINEA LE CELLULE CD166+ | 74 |
| LE CELLULE CD166+ GUIDANO LA FREQUENZA | |
| NEI MIOCITI VENTRICOLARI NEONATALI | 76 |
| LE CELLULE CD166+ PRESENTANO UN | |
| BASSO POTENZIALE PROLIFERATIVO IN VITRO | |
| E NON SONO TERATOGENE IN VIVO | 76 |
| | |
| DISCUSSIONE | 78 |
| | |
| PARTE II | 83 |
| | |
| INTRODUZIONE | 84 |
| FUNZIONI DELLA I_{Tb} NEI NEURONI | 84 |
| EPILESSIA | 85 |
| EPILESSIA DEL LOBO TEMPORALE (TLE) | 87 |
| | |
| SCOPO DEL LAVORO | 89 |
| | |
| MATERIALI E METODI | 90 |
| REPERIMENTO CAMPIONI PER LO SCREENING | 90 |
| ESTRAZIONE DI DNA DA SANGUE INTERO | 90 |
| QUANTIFICAZIONE DEL DNA | 91 |
| PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) | 91 |
| ANALISI DEL SEQUENZIAMENTO | 93 |
| | |
| RISULTATI | 95 |
| SCREENING GENETICO DELLE ISOFORME | |
| hHCN1, hHCN2 E DELLA PROTEINA ACCESSORIA MiRP1 | |
| IN PAZIENTI AFFETTI DA EPILESSIA DEL LOBO TEMPORALE | 95 |

| | |
|-------------|----|
| hHCN1 | 96 |
| hHCN2 | 96 |
| MiRP1 | 97 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| DISCUSSIONE | 98 |
|--------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------------|------------|
| CONCLUSIONI GENERALI | 101 |
|-----------------------------------|------------|

| | |
|---------------------------|------------|
| BIBLIOGRAFIA | 104 |
|---------------------------|------------|

INTRODUZIONE GENERALE

IL POTENZIALE D'AZIONE

In condizioni di riposo le cellule eccitabili presentano a livello della membrana plasmatica una separazione di cariche elettriche. Questa condizione rappresenta il potenziale di membrana della cellula a riposo. La separazione di cariche elettriche a cavallo del plasmalemma è dovuta all'accumulo di ioni che si distribuiscono diversamente ai due lati della membrana, determinando così un'eccedenza di cariche negative sul lato intracellulare e un'eccedenza di cariche positive sul lato extracellulare. In seguito a una stimolazione che porta il potenziale di membrana a uno specifico valore, si verifica una rapida variazione nella polarità elettrica della membrana cellulare andando quindi a generare il potenziale d'azione.

Questa rapida variazione si concretizza nel passaggio a tempistiche precise di più correnti ioniche attraverso specifiche e differenti proteine di membrana denominate canali ionici [1].

CANALI HCN E CORRENTE $I_{f/h}$

Tra i vari tipi di canali ionici coinvolti nella definizione dei potenziali d'azione, i canali HCN rivestono un ruolo fondamentale nella loro genesi. In quanto attivati sia dal voltaggio che da nucleotidi ciclici [2; 3], queste proteine di membrana sono state appunto denominate *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated cation channels* (HCN) [4; 5; 6; 7; 8; 9; 10]. Chiamati anche *canali pacemaker* o *canali f (f-channels)*, gli HCN rappresentano i costituenti molecolari della corrente $I_{f/h}$.

Inizialmente scoperta verso la fine degli Anni Settanta nelle cellule del nodo senoatriale (NSA, pacemaker principale cardiaco) e successivamente nei neuroni agli inizi degli Anni Ottanta, questa tipologia di corrente attivata in iperpolarizzazione (*hyperpolarization-activated current*, $I_{f/h}$) ha da

subito attratto notevole interesse scientifico proprio per la capacità di controllo sulla genesi dei potenziali d'azione [11; 12].

CANALI HCN

Appartenenti alla superfamiglia dei canali di K⁺ voltaggio dipendenti (K_v), questi canali presentano omologia con i canali attivati dai nucleotidi ciclici (CNG) [12; 13]. Ne esistono 4 isoforme diverse codificate ciascuna dal rispettivo gene (HCN1-4) [14; 15]. Nell'uomo i 4 geni localizzano su 4 cromosomi diversi: hHCN1 su 5p12, hHCN2 su 19p13.3, hHCN3 su 1q22, hHCN4 su 15q24-25 [14]. Sul finire degli anni '90, diversi gruppi di ricerca riuscirono a clonarli [5; 6; 7; 8; 9; 10; 16].

DISTRIBUZIONE ISOFORME

Le diverse isoforme di HCN sono espresse in maniera differente nell'organismo. Studi di espressione nel NSA e nel nodo atrioventricolare (NAV) hanno mostrato la prevalenza di HCN4 accostata a più bassi livelli espressivi di HCN1 e di HCN2. Da specificare è però il fatto che nel NAV sia i livelli espressivi che i rapporti riscontrati sono decisamente più bassi rispetto a quelli del NSA [17; 18; 19; 20; 21]. Nelle fibre di Purkinje i livelli di espressione sono simili a quelli del NSA ma la quantità totale di canali HCN è 25 volte minore rispetto a quella nel NSA. Nei ventricoli prevale HCN2 ma a bassi livelli, mentre le altre isoforme sono assenti o non funzionali [17]. Bassi livelli di HCN1 e di HCN4 sono stati trovati anche nel muscolo scheletrico, nei polmoni e nel pancreas [22]. A livello del sistema nervoso centrale (SNC), i fotorecettori della retina esprimono solamente HCN1 mentre nei gangli delle radici dorsali prevale HCN1 e in misura minore HCN2 [15]. Nella zona corticale risulta essere predominante HCN1. A livello sottocorticale si registra invece una prevalenza di HCN3 e di HCN4 (soprattutto rispettivamente in ipotalamo e talamo). HCN2 mostra una larga diffusione in tutto il cervello. Infine HCN1 e HCN2 colocalizzano nei dendriti delle cellule piramidali dell'ippocampo e della neocorteccia [23] e anche nei neuroni del Purkinje del cervelletto [24].

STRUTTURA DEL CANALE

Il canale funzionale è un complesso tetramerico, che può essere costituito da isoforme identiche (omotetramero) o diverse (eterotetramero) [25; 26]. Ogni subunità (o monomero) HCN è composta da 6 segmenti transmembrana (α -eliche, da S1 a S6) uniti da loops sia intra- che extra-cellulari, inclusi tra un N-terminale e un C-terminale entrambi citoplasmatici.

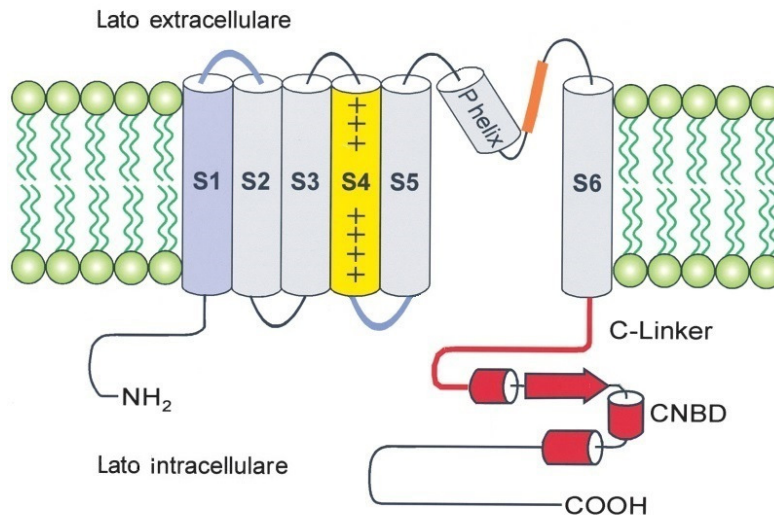


Figura 1 _ Modello strutturale della subunità HCN. Tale subunità consiste di due parti funzionali: una composta dalla regione transmembrana (S1-S6 e quindi anche dal poro, tra S5 e S6) e l'altra dalla regione C-terminale (comprendente il segmento C-linker e il cyclic nucleotide-binding domain, CNBD) [Modificato da 27].

A livello del segmento S4 (carico positivamente) si trova il sensore del voltaggio [25; 28]. Si tratta di un α -elica carica positivamente che include 9 residui di arginina o lisina regolarmente disposti e che permette l'apertura del poro in stato di iperpolarizzazione [29]. A livello del loop tra S5 e S6 si ha il poro del canale [30] che include il filtro di selettività rappresentato dal motivo GYG (glicina-tirosina-glicina, conservato anche nei canali K_v). Questo filtro conferisce la permeabilità al K^+ e, a valle dei residui GYG, sono inoltre presenti amminoacidi (due residui carichi e un'istidina) responsabili della permeabilità al Na^+ [29]. All'estremità C-terminale è presente il dominio per il legame dei nucleotidi ciclici chiamato CNBD (Cyclic Nucleotide Binding Domain), omologo a quello dei canali CNG e di fondamentale importanza per la regolazione del canale da parte dell'adenosin monofosfato ciclico (cyclic Adenosin Mono-Phosphate, cAMP) [27]. Il CNBD è una sequenza di circa 120 AA, costituita da un dominio di 3 α -eliche (A, B e C) con un β -barrel tra le eliche A e B. Il cAMP si lega in una tasca di residui tra il β -barrel e l' α -elica C [13].

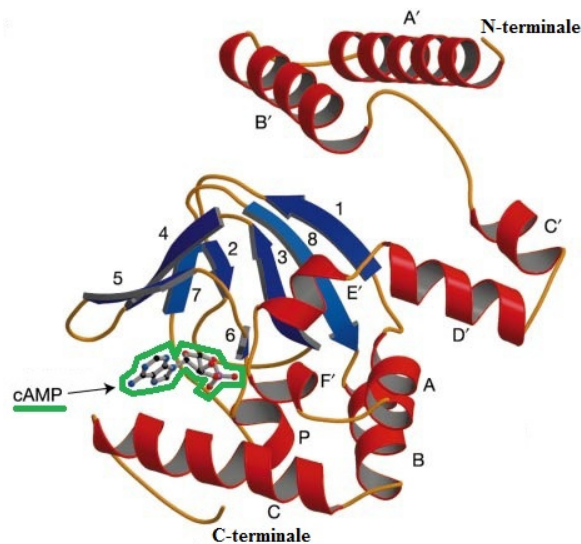


Figura 2 _ Ricostruzione 3D del CNBD. La sua struttura risulta composta dalle 3 α -eliche (A, B e C) con il β -barrel e dal sito di interazione con il cAMP [Modificato da 13].

Tramite il C-linker (di circa 80 AA), è collegato al segmento S6. La porzione distale del C-terminale (a valle del dominio CNBD) può essere coinvolta nel legame di numerose proteine regolatrici come MiRP1, TRIP8b, Filamina A (descritte più avanti). Queste proteine ne controllano non solo il suo trafficking e l'espressione in membrana, ma anche la sua attivazione e conduttanza [11]. Caveolina 3 (Cav3, un'altra proteina regolatrice) è invece fondamentale per la formazione delle *caveolae*, invaginazioni del plasmalemma, dove colocalizzando con HCN4 ne modifica le proprietà [31]. Infine la porzione N-terminale sembra conferire ai monomeri del canale la capacità di tetramerizzare, requisito fondamentale per costituire un canale attivo [32].

In assenza di cAMP, le probabilità di apertura del canale sono basse. L'interazione tra le strutture del C-linker e del CNBD determina infatti una sorta di inibizione del canale, abbassandone la probabilità di apertura. Il legame di cAMP al CNBD porta ad una modificazione conformazionale che interessa l'elica C del CNBD e il C-linker. Come conseguenza, il canale assume quindi una struttura più lassa che toglie l'inibizione [33; 34].

La fosforilazione dei canali HCN da parte delle tirosin-kinasi Src permette una loro ulteriore modulazione che determina la loro attivazione a potenziali più positivi e quindi un aumento della loro conduttanza [11; 35]. Tutte le isoforme hanno le stesse proprietà biofisiche, ma presentano differenze a livello di voltaggio-dipendenza, cinetiche d'attivazione e modulazione da parte del cAMP [12].

Le varie isoforme del canale HCN sono caratterizzate da proprietà diverse. HCN1 è l'isoforma con le cinetiche di attivazione e deattivazione più rapide [18], seguita da HCN2 e HCN4. Inoltre HCN1 subisce meno l'autoinibizione C-linker-CNBD risultando meno sensibile all'attività del cAMP [34]. Le isoforme HCN2 e HCN4 risultano invece molto più sensibili al cAMP, subendo un deciso

spostamento della loro curva di attivazione verso valori più positivi [36; 37]. Infine in HCN3 non sono state registrate variazioni di sensibilità a questo nucleotide ciclico [29].

CORRENTE $I_{f/h}$

A livello cardiaco questa corrente è stata definita appunto come “*funny*” (divertente, buffa, I_f) a causa del suo profilo biofisico abbastanza inusuale. A livello del SNC, alcuni gruppi di ricerca l’hanno anche denominata I_q , ossia “*queer*” (anomala) oltre che I_h [11; 12].

Come largamente dimostrato in letteratura, la corrente $I_{f/h}$ svolge ruoli importantissimi. A livello cardiaco viene appunto definita anche come “*pacemaker current*” in quanto capace non soltanto di dare inizio all’attività spontanea di quest’organo ma anche di controllarne la frequenza [4]. Nel SNC, questa corrente è inoltre implicata nel controllo dell’attività ritmica dei circuiti neuronali (come ad esempio nel talamo) e contribuisce a parecchi altri processi come la determinazione del potenziale di riposo neuronale (resting membrane potential, RMP), l’integrazione dendritica, la trasmissione sinaptica e la processazione temporale dei segnali visivi nella retina [11; 12].

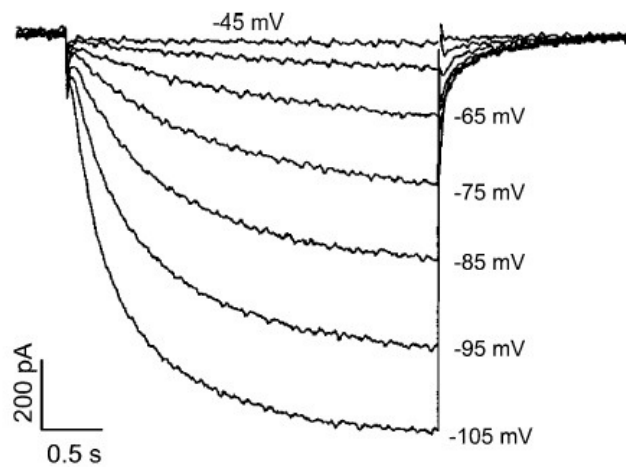


Figura 3 _ Tracce di corrente $I_{f/h}$ registrate a -45, -65, -75, -85, -95 e -105 mV partendo da un potenziale di riposo di -35 mV in miociti isolati dal NSA di coniglio [38].

NATURA IONICA

La scelta di questo termine deriva quindi dalle sue peculiarità. Innanzitutto la sua dipendenza dal voltaggio mostra un’attivazione inusuale che si verifica appunto in iperpolarizzazione a valori di potenziale di circa -40 mV [39]. La sua natura mista determina l’uscita di ioni K^+ e l’ingresso di ioni Na^+ in un rapporto variabile da 3:1 a 5:1 [11]. Il relativo rapporto di permeabilità P_{Na}/P_K (compreso tra 0,2 e 0,4 [27]) spiega il valore del suo potenziale di inversione di circa -10/-20 mV [40; 41]. E’ importante notare anche che questo suo valore del potenziale di inversione risulta essere intermedio

ai potenziali di equilibrio delle due specie ioniche permeanti, calcolati secondo l'equazione di Nernst [39]. A potenziali diastolici, la corrente risultante è entrante ed è prevalentemente data da ioni Na^+ che depolarizzano la cellula fino al valore soglia [4; 11]. La $I_{f/h}$ è inoltre soggetta al blocco da parte di ioni come Rb^+ e Cs^+ [42; 43].

Oltre che voltaggio-dipendente, gli HCN vengono attivati dai livelli intracellulari di cAMP secondo un meccanismo fosforilazione indipendente [2]. Questa attivazione non altera la loro conduttanza ma determina uno spostamento della curva di attivazione della $I_{f/h}$ a valori di voltaggio più positivi [2; 44].

A livello cardiaco, questa corrente è presente non solo nei miociti senoatriali ma anche nelle cellule del sistema di conduzione con attività autoritmica (quindi quelle del NAV [45; 46] e quelle delle fibre del Purkinje [47; 48]) e persino nei miociti ventricolari di lavoro. A causa di una soglia di attivazione troppo negativa (quindi non fisiologica) e di una bassa densità dei canali, in questi ultimi viene a mancare l'attività autoritmica [49].

Questo tipo di corrente è stato inoltre identificato in diverse cellule neuronali del sistema nervoso centrale e periferico in cui svolge funzione regolatrice dell'eccitabilità, contribuendo alla trasmissione sinaptica e all'integrazione dendritica [30; 50; 51].

MODULAZIONE

A livello cardiaco, il sistema nervoso autonomo con le sue afferenze simpatiche e parasimpatiche esercita un controllo sul NSA, modulandone l'attività della $I_{f/h}$ tramite la regolazione dei livelli intracellulari di cAMP.

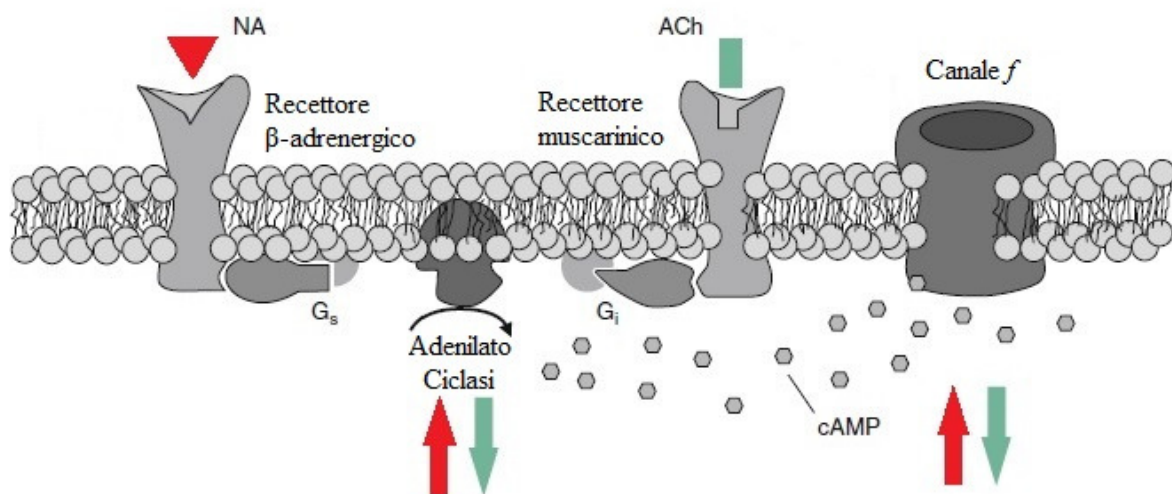


Figura 4 _ Schematizzazione del plasmalemma dei miociti senoatriali. La modulazione dei canali f nativi (composti dalle subunità HCN), avviene attraverso la up- o down-regolazione dell'Adenilato Ciclasi di membrana. I conseguenti livelli di cAMP influiscono sulla quantità di corrente $I_{f/h}$. Infatti l'aumento nei livelli di questo nucleotide ciclico determina un

aumento della corrente, mentre una sua diminuzione comporta una diminuzione della $I_{f/h}$. ACh=acetilcolina; NA=noradrenalina (norepinefrina); Gi=Proteine G inibitorie; Gs=Proteine G stimolatorie [Modificato da 52].

Il trasmettitore postgangliare dell'afferenza simpatica è l'adrenalina e lega i recettori β -adrenergici, mentre quello dell'afferenza parasimpatica è l'acetilcolina e lega quelli muscarinici [53].

Entrambe queste tipologie di recettori sono G Protein-Coupled Receptors (GPCR) in quanto associati a proteine G, fondamentali nella trasduzione dei segnali. Ogni proteina G risulta composta da tre subunità (α , β , γ) che nella forma inattiva costituiscono un eterotrimerico. In seguito al legame di un agonista recettoriale, si verifica una transizione alla forma attiva in cui la subunità α -GTP si separa dalla $\beta\gamma$. I recettori β -adrenergici risultano accoppiati a proteine G_{os} che attivano l'adenilato ciclasi, enzima di membrana che sintetizza il cAMP. I recettori muscarinici sono invece associati a proteine G_{oi} che ne inibiscono l'attività [54]. Il cAMP esercita il suo effetto legandosi al CNBD [5; 27; 13]. L'aumento di cAMP intracellulare (conseguente al legame di adrenalina) sposta la curva di attivazione della $I_{f/h}$ verso valori più positivi senza modificarne la conduttanza. La diminuzione di cAMP (conseguente al legame di acetilcolina) invece muove la curva verso valori più negativi [55]. L'aumento della probabilità di apertura del canale comporta un maggior passaggio di $I_{f/h}$ con conseguente aumento nella pendenza della DDL (fase di Depolarizzazione Diastolica Lenta, tipica dei potenziali d'azione a risposta lenta) e riduzione dei tempi necessari alla formazione del potenziale d'azione. L'effetto risultante è quindi l'aumento della frequenza cardiaca. La diminuzione della probabilità di apertura del canale porta invece a un minor flusso di corrente con conseguente riduzione della pendenza della curva di DDL e quindi riduzione della frequenza cardiaca [33].

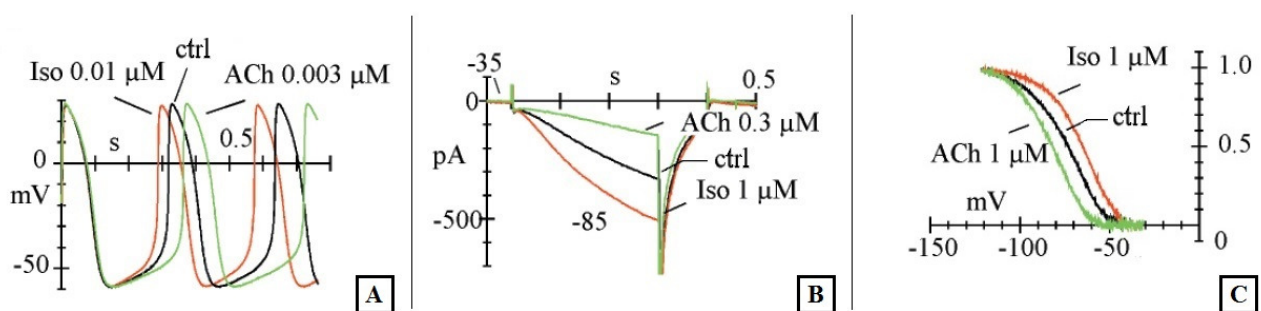


Figura 5 _ Schema che illustra gli effetti degli agonisti autonomici sull'autoritmicità del NSA. (A) Potenziali d'azione registrati in condizioni di controllo e in presenza o di Iso o di ACh alle concentrazioni indicate in figura. Da notare che l'aumento nella frequenza (con Iso) e la diminuzione (con ACh) sono dovuti a cambiamenti nella velocità di depolarizzazione diastolica. (B) $I_{f/h}$ ottenuta mediante gradini iperpolarizzanti a -85mV da un potenziale holding di -35mV. Da evidenziare è l'aumento della corrente con Iso e la sua riduzione con ACh. (C) Curve di attivazione che riflettono il $V_{1/2}$ dei canali f in condizioni di controllo e in presenza o di Iso o di ACh. I neurotrasmettitori autonomici spostano la curva verso valori di voltaggio più positivi (Iso) o più negativi (ACh) senza alterare la corrente totale [Modificato da 33].

Avvalendosi della Protein Kinasi A (PKA, mediante cAMP), l'attivazione dei recettori β -adrenergici ha come effetto finale del processo non solo un aumento della $I_{f/h}$ ma anche quello di altre correnti come I_{CaL} , [56], I_{Kr} e I_{Ks} [57]. La PKA agisce anche a livello del reticolo sarcoplasmatico. La sua attività di fosforilazione sui recettori rianodinici (RyR) determina un aumento nel rilascio del Ca^{2+} [58], fondamentale per la contrazione dei miociti. Al contrario, la diminuita concentrazione di cAMP (dovuta alla stimolazione parasimpatica) determina non solo una diminuzione dell'ampiezza della corrente pacemaker (tramite uno spostamento della curva di attivazione verso potenziali più negativi) ma causa inoltre l'apertura di canali di K^+ acetilcolina-dipendenti ($I_{K,ACh}$) [59].

A livello del SNC, le variazioni intracellulari di questo secondo messaggero dipendono invece da tipologie diverse di recettori metabotropici. Ad esempio, sulle spine dendritiche dei neuroni della corteccia prefrontale gli HCN colocalizzano e interagiscono funzionalmente con gli α -adrenocettori e i recettori D1. Grazie a livelli relativamente bassi di adrenalina (rilasciata durante lo stato di veglia), l'attivazione degli α -adrenocettori inibisce la produzione di cAMP sfruttando proteine G inibitorie (G_i). La conseguente diminuzione nella probabilità di apertura dei canali HCN determina un aumento nella resistenza di membrana. Tale variazione favorisce la sommazione temporale dei vari stimoli sinaptici a livello dei dendriti, contribuendo così ad aumentare l'attività di questi network neuronali. Al contrario, il legame con la dopamina da parte dei recettori D1 attiva proteine G stimolatorie (G_s) che incrementano la sintesi di cAMP. La successiva apertura degli HCN provoca una riduzione nella resistenza di membrana che causa perciò la dissipazione dei vari stimoli sinaptici [11; 12].

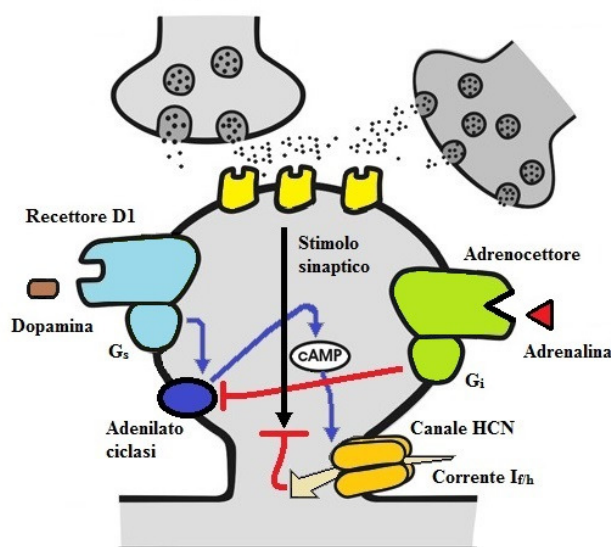


Figura 6 _ Schematizzazione in cui viene mostrata la modulazione operata dal cAMP sulla corrente $I_{f/h}$ a livello del dendrite di un neurone. Sfruttando una proteina G di tipo inibitorio (G_i), il legame dell'adrenalina all' α -adrenocettore inattiva

l'adenilato ciclasi causando una diminuzione nei livelli intracellulari di cAMP. La conseguente diminuzione nella probabilità di apertura degli HCN comporta un aumento nella resistenza di membrana che favorisce la sommazione dei vari stimoli sinaptici. Sfruttando invece proteine G di tipo eccitatorio (Gs) che attivano l'adenilato ciclasi, il legame della dopamina al recettore D1 attiva questi canali comportando un aumento nella resistenza di membrana che dissipa perciò gli stimoli sinaptici [Modificato da 12].

Nei neuroni talamici, la variazione dei livelli intracellulari di cAMP viene invece garantita dalle variazioni intracellulari dei livelli di Ca^{2+} causate dai bursts tipici di queste cellule eccitabili. Molto probabilmente, in questi neuroni viene appunto attivata un'isoforma di adenilato ciclasi sensibile a questo catione [11; 12].

Come precedentemente accennato, gli HCN vengono ulteriormente modulati da parte delle tirosin-kinasi Src. La loro fosforilazione causa l'attivazione di questi canali a potenziali più positivi [11; 12; 35]. La regolazione della $I_{f/h}$ per mezzo delle tirosin-kinasi Src è stata individuata non solo nei cardiomiociti senoatriali pacemaker murini [11; 12] e nel cuore di ratto [11; 12] ma anche nei neuroni [11; 12]. I risultati presenti in letteratura sostengono appunto che il controllo dello stato fosforilativo rappresenta un meccanismo aggiuntivo di regolazione che permette alla $I_{f/h}$ di adattarsi alle specifiche richieste nei differenti tipi di neuroni e nei cardiomiociti.

PROTEINE INTERAGENTI CON I CANALI HCN

Oltre che essere regolati dal voltaggio e dai nucleotidi ciclici, i canali HCN interagiscono con proteine regolatrici come Caveolina 3, MiRP1, Filamina A e TRIP8b [11; 60].

La *caveolina 3* (Cav3) è una proteina di 151 AA che forma le *caveolae*, invaginazioni nel plasmalemma dei cardiomiociti [61]. I miociti senoatriali ne risultano particolarmente ricchi e in queste invaginazioni Cav3 interagisce con altre proteine [62], quali HCN4 [31], eNOS (*endotelial Nitric Oxide Syntase*), il recettore β 2-adrenergico e l'adenilato ciclasi [63].

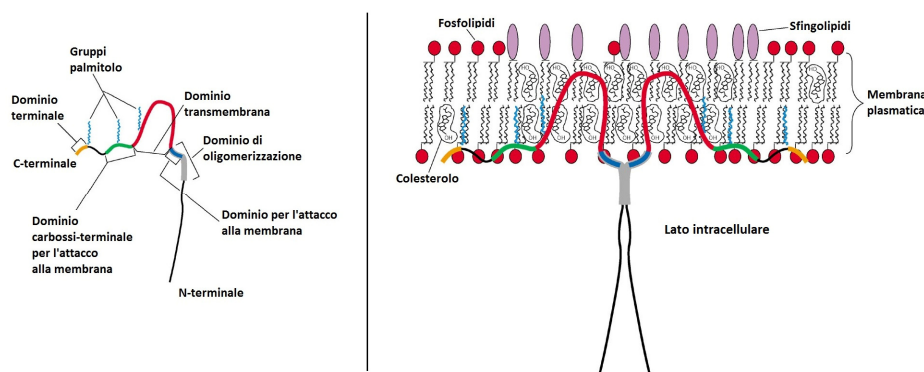


Figura 7 _ Rappresentazione schematica di Caveolina3 e dei suoi domini di interazioni sia con la membrana plasmatica che con altre caveoline.

Questa compartimentalizzazione influenza il comportamento sia del canale HCN4 che del canale *f* nativo. L'impiego di un agente disaggregante del colesterolo (metil- β -ciclodestrina, M β CD) causa infatti sia lo spostamento della curva di attivazione della I_{T_h} verso potenziali piú positivi (Figura 8-A) che il rallentamento delle sue cinetiche di deattivazione (Figura 8-B) [64].

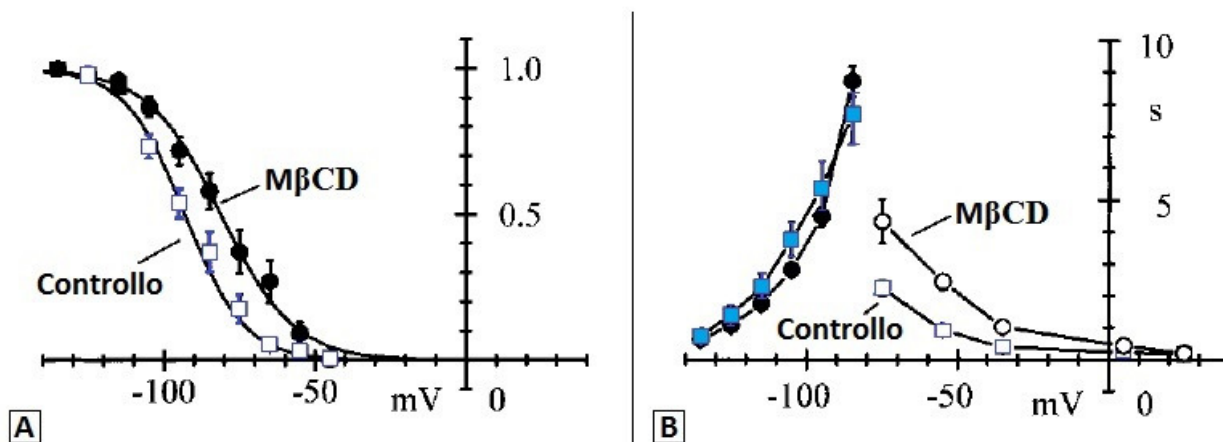


Figura 8 _ (A) Confronto tra la curva di attivazione di cellule controllo (quadrati) e quella di cellule trattate con M β CD (cerchi). Da notare è lo spostamento verso valori di potenziale piú positivi della curva relativa alle cellule trattate. (B) Cinetiche di attivazione (simboli pieni) e deattivazione (simboli vuoti). Rispetto alla condizione di controllo, è emerso che la deattivazione risulta maggiormente rallentata dal trattamento con M β CD [Modificato da 64].

MiRP1 (*Mink-Related Peptide 1*) è una proteina di 123 AA caratterizzata da unico dominio transmembrana. Codificata dal gene KCNE2, è stata originariamente scoperta come subunità ausiliaria di HERG (canale rettificante ritardato del K⁺, *delayed rectifier K⁺ channel*) [11; 12]. Presente soprattutto nella regione del NSA e in misura minore sia in atri che ventricoli [65; 66; 67], la sua espressione è stata identificata anche nel SNC [68].

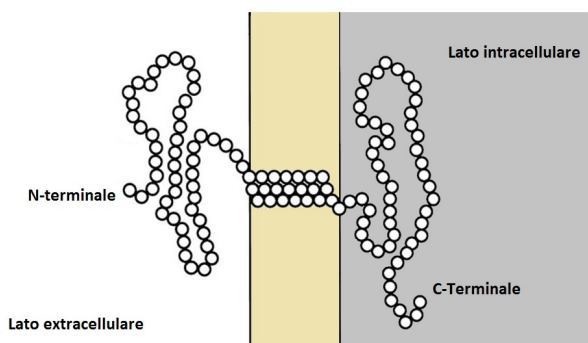


Figura 9 _ Rappresentazione schematica di MiRP1 nella membrana plasmatica [Modificato da 69].

Oltre che con i canali HERG [70], diversi studi hanno dimostrato che questo peptide e gli HCN interagiscono tra loro grazie alle corrispettive porzioni C-terminali [12; 65; 66; 67]. La coespressione sia di HCN1+MiRP1 che di HCN2+MiRP1 ha dimostrato in entrambi i casi di

determinare un aumento della corrente $I_{f/h}$ e della conduttanza [65]. Inoltre la coespressione eterologa di HCN4 e MiRP1 determina un aumento della corrente $I_{f/h}$, un rallentamento delle cinetiche di attivazione, uno spostamento del $V_{1/2}$ verso valori più negativi ed un aumento dell'*inverse slope factor* della curva di attivazione [65].

TRIP8b (*tetratricopeptide repeat containing Rab8b-interacting protein*, chiamata anche PEX5R, *peroxin 5-related protein*) è una proteina accessoria di 70kDa che regola il *trafficking*, l'espressione in membrana e la funzionalità dei canali HCN (soprattutto HCN1 e HCN2) in particolar modo nel cervello. Colocalizza infatti con HCN1 nei dendriti distali dei neuroni corticali e nei neuroni piramidali dell'ippocampo [71]. La sua interazione viene assicurata da una sequenza conservata al C-terminale degli HCN [12]. TRIP8b subisce *splicing* alternativi all'N-terminale. Le isoforme che ne derivano regolano differientemente l'espressione dei canali HCN in membrana e la densità di corrente $I_{f/h}$, determinando uno spostamento della curva di attivazione verso potenziali più negativi [72; 73].

La proteina lega il CNBD e gli ultimi tre amminoacidi del C-terminale dei canali HCN. Questa competizione con il cAMP a livello del CNBD definisce un equilibrio di effetti opposti, in cui un aumento dei livelli di cAMP è sufficiente per spiazzare TRIP8b da questo sito di legame [74].

La *Filamina A* (FLNA) è una proteina di 280 kD che lega l'actina citoscheletrica [75] presente a livello del SNC [76]. La sua funzione principale è quella di collegare al citoscheletro proteine transmembrana, come ad esempio i canali ionici.

Poiché le altre isoforme ne risultano prive, interagisce solo con HCN1 tramite una sequenza di 22 AA a valle del relativo CNBD [12; 77]. Data la sua natura citoscheletrica, vincola la distribuzione di HCN1 in membrana e, infatti, in sua assenza questa isoforma si distribuisce irregolarmente. Infine la coespressione di FLNA e HCN1 determina un calo della sua conduttanza lasciandone la capacità invariata. La relativa curva di attivazione si sposta verso potenziali più negativi rispetto alle cellule prive di FLNA. Anche le costanti di tempo di attivazione e deattivazione risultano più grandi rispetto alle cellule che esprimono solo HCN1.

CANALOPATIE

Le canalopatie sono patologie causate da alterazioni nel funzionamento di canali ionici, innescabili anche da anomalie in loro proteine regolatrici [78; 79; 80; 81]. In base alla loro causa scatenante, vengono distinte in:

- genetiche _ provocate da mutazioni nei geni codificanti e
- acquisite _ di origine diversa, conseguenti per esempio a infezioni.

Le canalopatie più studiate sono quelle di tipo cardiaco (aritmie) e di tipo neurologico (epilessie).

I geni responsabili delle aritmie sono diversi e molto spesso risultano espressi anche in altri tessuti [82; 83; 84], estendendo quindi le anomalie al di fuori del distretto cardiaco. Un altro aspetto preoccupante è la loro correlazione a un elevato rischio di mortalità.

In letteratura sono state identificate centinaia di mutazioni alla base delle aritmie [80; 85]. Tra quelli coinvolti, anche i geni HCN ne sono compresi [14; 86]. Una prima loro mutazione venne individuata nel gene *Hcn4* di un paziente affetto da disfunzione idiopatica del NSA (idiopathic sinus node dysfunction, SND) accompagnata da bradicardia di grado severo [87]. In questo caso, la delezione di una singola base (1631delC) nel relativo esone 5 inseriva un codone di stop che ha portato a codificare per una proteina mutata priva del CNDB.

Anche a livello del SNC è stata dimostrata la correlazione tra mutazioni nelle sequenze nucleotidiche dei geni HCN e l'insorgenza di fenotipi epilettici [88; 89].

Ad esempio in letteratura è riportato che una specifica delezione a valle del CNBD (delPPP 719-721) nel gene di *HCN2* scatena l'epilessia. In questo caso, il notevole cambiamento dell'eccitabilità neuronale è provocato da un aumento nella $I_{f/h}$, maggiore del 35% rispetto alla stessa corrente di un canale non mutato [89]. In un recente lavoro del nostro laboratorio [88], abbiamo dimostrato che una mutazione (E515K) localizzata nel C-linker nuovamente di *HCN2* predispone all'epilettogenesi. E515K provoca non solo un ampio spostamento della curva di attivazione della corrente $I_{f/h}$ verso potenziali negativi, ma ne allunga anche i tempi di attivazione con una conseguente forte riduzione nella disponibilità della stessa corrente a potenziali di riposo. Poiché questi canali sono coinvolti nella modulazione dell'eccitabilità dei neuroni e quindi nella loro plasticità [11; 30; 50], loro alterazioni si traducono comprensibilmente in modificazioni della corrente $I_{f/h}$ causando quindi disordini nell'eccitabilità sia a livello di singola cellula che di interi networks [90; 91].

PARTE I

CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE “SINOATRIAL-LIKE” DA PRECURSORI
CD166+ DERIVATI DA mESCs

PARTE I

INTRODUZIONE

IL CUORE

Il cuore è un organo cavo muscolare di forma conica dotato di autoritmicità.

È collocato nella parte inferiore del mediastino (cavità toracica) e con il suo apice appoggia sul diaframma. Anteriormente si trova dietro lo sterno e tra i due polmoni, mentre posteriormente esofago e aorta lo separano dalla colonna vertebrale.

Svolge azione propulsiva per il sistema cardiocircolatorio permettendo il regolare flusso di sangue attraverso organi e tessuti periferici [92].

ANATOMIA

Il cuore è rivestito completamente dal pericardio, membrana a doppio strato di origine mesodermica in cui è possibile riconoscere uno strato esterno fibroso e uno interno sieroso.

Esternamente il cuore presenta delle linee depresse (solchi) che aiutano a immaginare la sua ripartizione interna in quattro cavità, due atri (a parete sottile) e due ventricoli (a parete più spessa).

La presenza del setto cardiaco (suddiviso in setto interatriale e setto intraventricolare) definisce due porzioni funzionalmente distinte, una di destra ed una di sinistra.

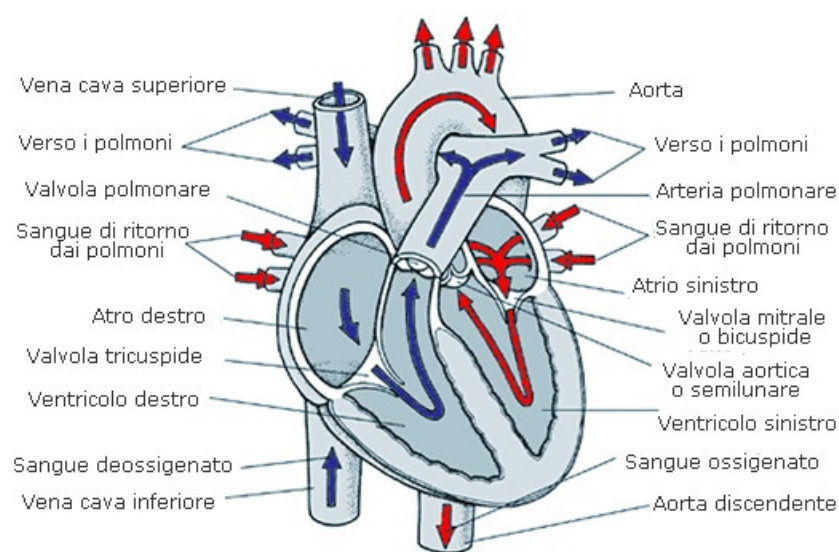


Figura 10 _ Sezione longitudinale di un cuore umano, rappresentazione schematica.

Ciascuna porzione risulta composta da un atrio e da un ventricolo che comunicano tra loro per mezzo di orifizi atrioventricolari dotati di valvole. La loro presenza impedisce reflusso sanguigno garantendo circolazione sempre nella stessa direzione. La valvola tricuspide collega l'atrio destro con il ventricolo destro, mentre la valvola bicuspid (o mitrale) l'atrio sinistro con il ventricolo sinistro [92].

CIRCOLAZIONI SANGUIGNE

L'atrio destro riceve le vene cave superiore e inferiore con apporto di sangue venoso, che dal ventricolo destro viene pompato nell'arteria polmonare. Si realizza così la piccola circolazione che termina con il ritorno all'atrio sinistro di sangue ossigenato attraverso le quattro vene polmonari. Il sangue arterioso viene quindi pompato dal ventricolo sinistro nell'aorta, dando origine alla grande circolazione. Dopo aver trasportato sangue ossigenato a tutti i tessuti e apparati del nostro organismo, si chiude con la restituzione di sangue venoso all'atrio destro. Aorta e arteria polmonare originano entrambe da valvole semilunari dei rispettivi ventricoli.

A livello cardiaco, l'irrorazione viene garantita dalle diramazioni delle due arterie coronarie (rami del primo tratto dell'aorta) e dalle varie vene cardiache [92].

STRUTTURA DELLA PARETE CARDIACA

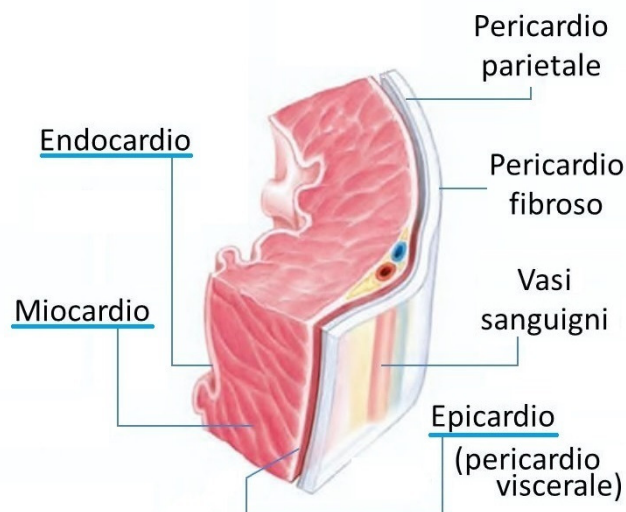


Figura 11 _ Struttura della parete cardiaca.

La parete cardiaca è costituita da tre tonache. Partendo dall'esterno all'interno si evidenziano:

- epicardio _ membrana connettivale sierosa che riveste esternamente il cuore e rappresenta il foglietto viscerale del pericardio sieroso. Contiene capillari sanguigni e linfatici e fibre nervose;

- miocardio _ strato più spesso e costituito da cellule muscolari striate cardiache ordinatamente orientate in modo da permettere la corretta contrazione. Lo spessore è variabile ed è maggiore in corrispondenza dei ventricoli. Le fibre muscolari sono unite tra loro da *gap junctions* (che le connettono elettricamente) e immerse in abbondante tessuto connettivo ricco di vasi. Le *gap junctions* (dette anche *connessine*) sono costituite da connessioni, ognuno dei quali è costituito da 6 proteine transmembrana chiamate connessine, che formano dei pori a livello delle zone di contatto e adesione (dischi intercalari) [93; 94];
- endocardio _ tessuto endoteliale che riveste le cavità cardiache e in continuità con la tonaca intima dei vasi collegati con il cuore. Ha la funzione di favorire lo scorrimento del sangue all'interno del cuore per evitare coaguli sanguigni.

INNERVAZIONE DEL SISTEMA NERVOSO

Il cuore presenta attività autoritmica intrinseca, che verrà analizzata più avanti.

L'innervazione del sistema nervoso autonomo si limita infatti a modularne frequenza e forza di contrazione.

L'innervazione simpatica (che origina dal Ganglio Stellato) ha un effetto inotropo e cronotropo positivo, mentre quella parasimpatica (che dipende dal Nervo Vago) un effetto bradicardizzante. Entrambe le fibre post-gangliari simpatiche e parasimpatiche si uniscono nel plesso cardiaco [95]. L'attività simpatica si traduce nella liberazione di noradrenalina (causando un aumento della frequenza cardiaca) mentre l'attività parasimpatica si manifesta con la liberazione di acetilcolina (portando alla riduzione della frequenza cardiaca) [96].

ATTIVITA' AUTORITMICA DEL CUORE

La generazione e la propagazione dell'impulso elettrico porta all'eccitazione prima degli atri e poi dei ventricoli consentendo lo svolgimento dei cicli di contrazione (sistole) e di rilasciamento/dilatazione (diastole).

Dal punto di vista anatomico-funzionale il miocardio può essere infatti suddiviso in:

- MIOCARDIO DI LAVORO _ costituito da cellule muscolari cardiache adibite appunto al lavoro di contrazione;
- TESSUTO DI CONDUZIONE _ specializzato nell'iniziare e nel coordinare il battito cardiaco [97]. Il relativo network risulta essere composto nell'ordine da:
 - nodo senoatriale (NSA);
 - fascio internodale;
 - nodo atrioventricolare (NAV);

- fascio di His;
- fibre del Purkinje.

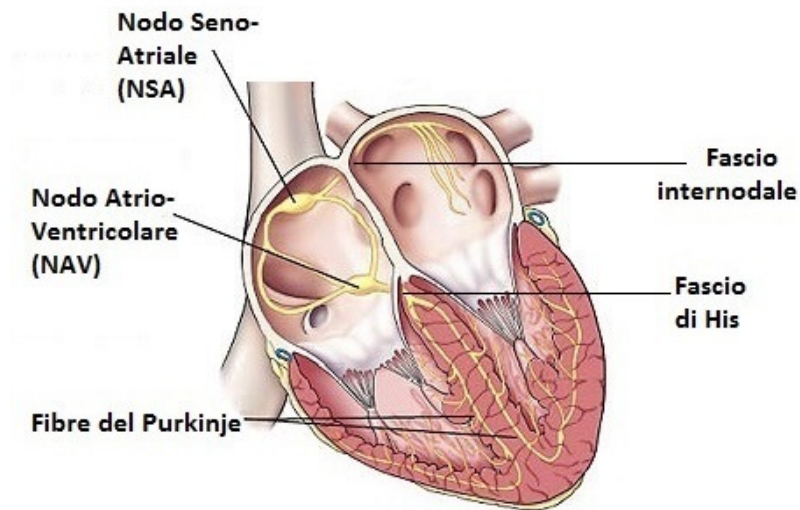


Figura 12 _ Rappresentazione schematica del sistema di conduzione cardiaco.

La generazione dell'impulso elettrico avviene in maniera autonoma a livello del nodo senoatriale (NSA o nodo di Keith-Flack), pacemaker primario del cuore [4; 98; 99; 100; 101; 102].

La sua struttura (generalmente allungata) cambia a seconda della specie considerata [4; 93; 99]. La sua posizione è generalmente nel sub-epicardio dell'atrio destro, dietro alla *crista terminalis* e lateralmente allo spazio del *sulcus terminalis* [103; 104]. In sezione trasversale, su preparato umano risulta facilmente discriminabile dalla presenza dell'arteria nodale che lo attraversa completamente [105].

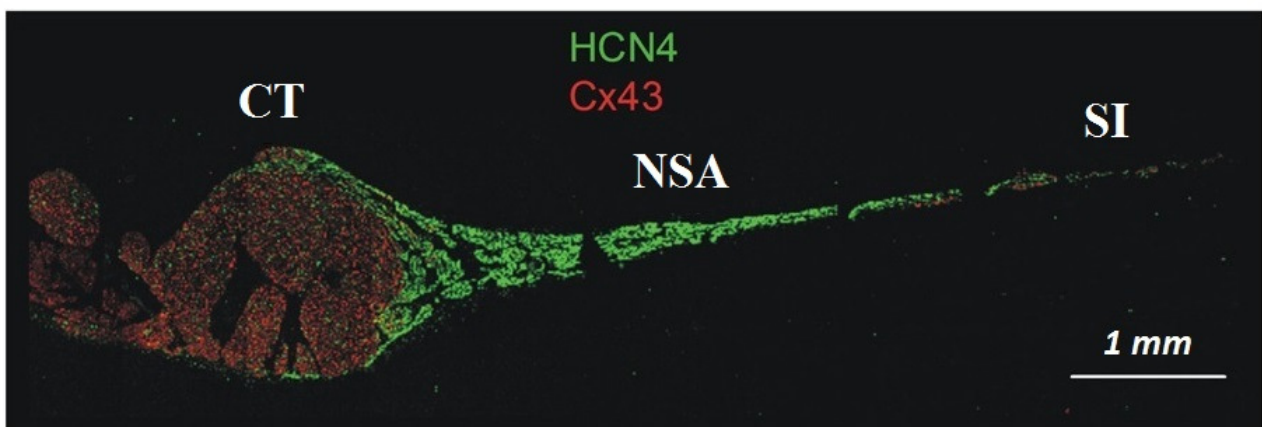


Figura 13 _ Analisi di immunofluorescenza di una sezione del NSA di coniglio marcata con anticorpi anti-connessina 43 (Cx43, in rosso) e anti-HCN4 (in verde). HCN4 viene altamente espresso nella regione centrale del NSA, mentre la colorazione per Cx43 risulta evidente sia nella crista terminalis (CT) che nel setto interatriale (SI) [Modificato da 60].

Proprio per la loro autoritmicità (e quindi per la loro capacità di generare potenziali d'azione spontanei che garantiscono il ritmo cardiaco), i miociti senoatriali vengono definiti *cellule pacemaker* [106; 107; 108]. Queste cellule di origine muscolare hanno perso la maggior parte delle miofibrille, acquisendo quindi funzione elettrica. Rispetto ai miociti atriali di lavoro, presentano infatti dimensioni ridotte e un apparato contrattile poco sviluppato [4; 109].

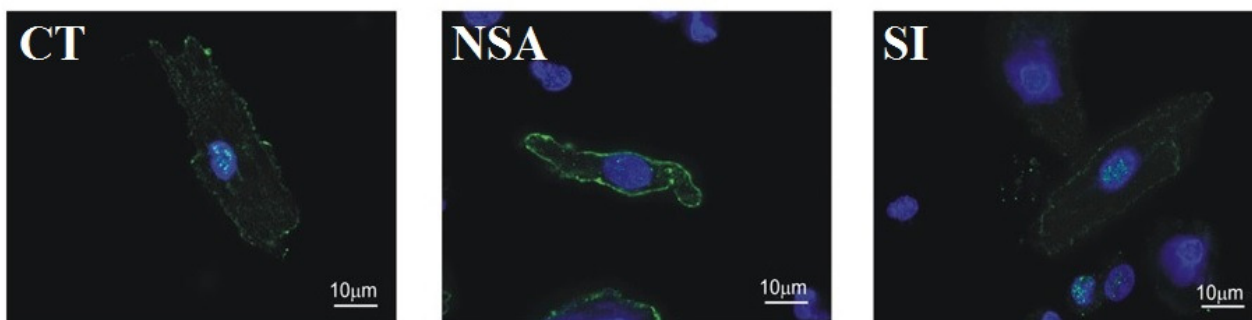


Figura 14 _ Analisi di immunofluorescenza _ Marcatura con HCN4 di singoli miociti isolati rispettivamente dalla cresta terminalis(CT), dal Nodo SenoAtriale (NSA) e dal setto interatriale (SI) del cuore di coniglio [Modificato da 60].

I miociti senoatriali sono contenuti in una matrice di tessuto connettivo fibroso che istologicamente discrimina la regione del NSA dal circostante tessuto non nodale [109].

La presenza di questo connettivo permette non solo di proteggere il NSA dal carico resistivo dell'atrio ma anche di attivare l'atrio stesso attraverso strette vie di uscita [99].

Procedendo in direzione sempre più periferica, questi miociti tendono ad assumere un fenotipo transitorio sempre più simile a quello del miocardio atriale di lavoro [99].

I potenziali senoatriali si propagano poi alla velocità di circa 1m/s [110] attraverso il fascio internodale raggiungendo quindi il nodo atrioventricolare (NAV o di Tawara-Aschoff), posizionato alla giunzione tra l'atrio destro e il ventricolo destro. Questo distretto (dotato anch'esso di autoritmicità) garantisce l'importante connessione elettrica tra atri e ventricoli. Provvede infatti a definire il fondamentale ritardo nella contrazione tra questi due tipi di camere, consentendo quindi il corretto svuotamento atriale prima dell'inizio della contrazione ventricolare [111]. Il NAV viene generalmente considerato pacemaker secondario in quanto subentra al NSA nel caso in cui smette di funzionare [46; 112; 113].

Un'importante branca del fascio internodale è il fascio interatriale (o di Bachmann) [114], in quanto garantisce la principale connessione elettrica tra i due atri. Assicurando una rapida connessione, consente la fisiologica contrazione sincrona di entrambi gli atri [115].

Dal NAV all'interno del setto interventricolare, la propagazione dell'impulso elettrico passa attraverso il fascio di His. Dividendosi poi in una branca destra (più sottile che si ramifica nel ventricolo destro) e una sinistra (più grossa che si dirama nel ventricolo sinistro), l'impulso elettrico

raggiunge una velocità di circa 2m/s [110]. Ciascuna branca si ramifica ulteriormente modellando una rete di fibre. Queste fibre (denominate del Purkinje) garantiscono l'attivazione del miocardio ventricolare. La funzione principale di quest'ultima parte del network è assicurare la rapida propagazione degli impulsi nell'intero miocardio ventricolare [116]. La rapidità è infatti essenziale per l'attivazione dei ventricoli dall'apice alla base, favorendo così l'efficiente eiezione di sangue dai ventricoli nelle rispettive arterie [117].

OVERDRIVE SUPPRESSION

Il fenomeno di overdrive suppression indica la dominanza senoatriale nella regolazione del ritmo totale cardiaco.

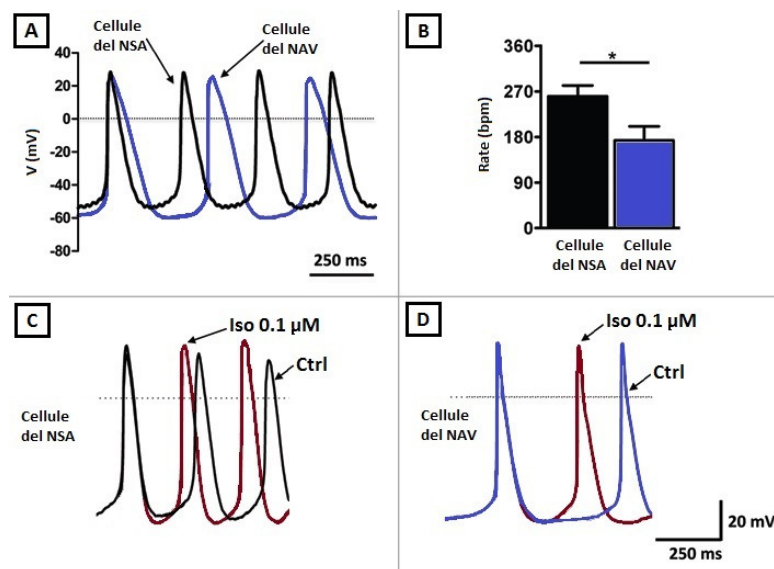


Figura 15 _ Overdrive suppression _ L'autoritmicità delle cellule del NAV presenta una frequenza minore rispetto a quella delle cellule del NSA. (A)_Esempi di potenziali d'azione in cellule del NSA e in cellule del NAV. (B)_Grafico a barre in cui viene mostrata la differente frequenza (rate) tra le cellule del NSA e del NAV di topo.

La perfusione con una dose massimale di Isoproterenolo (Iso, analogo dell'adrenalina) fa aumentare il rate sia delle cellule del NSA (C) che di quelle del NAV (D) ma in queste stesse condizioni l'autoritmicità delle cellule del NAV rimane ancora minore rispetto a quella delle cellule del NSA [Modificato da 46].

L'attività autoritmica a frequenza più elevata del NSA gli permette infatti di sopprimere l'automaticità degli altri foci ectopici, confermando quindi il suo ruolo di pacemaker cardiaco principale. L'attività di questi pacemaker secondari (intrinsecamente più lenta e quindi fisiologicamente oscurata da quella del NSA) emerge infatti solo in condizioni patologiche. [53; 118; 119; 120].

I POTENZIALI D'AZIONE CARDIACI

In generale la durata dei potenziali d'azione dei cardiomiociti è in media sui 300ms, mentre nelle altre cellule eccitabili (quelle nervose e i miociti sia lisci che scheletrici) risulta invece più breve attestandosi intorno al 1ms [1; 53; 121].

A seconda del distretto cardiaco, i relativi potenziali d'azione mostrano inoltre significative differenze che riflettono specifiche esigenze e funzioni. Tali differenze sono determinate dalle diverse correnti che prendono parte alla loro generazione, diretta conseguenza dell'espressione di differenti e specifici canali ionici [109].

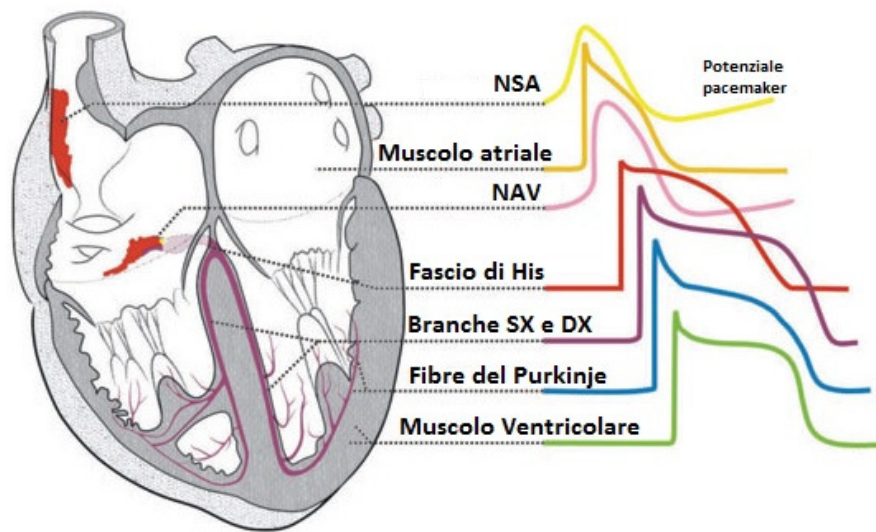


Figura 16 _ Schema rappresentativo delle differenti forme di potenziale [Modificato da 109].

Si possono quindi distinguere due tipologie di potenziali d'azione cardiaci:

- a risposta rapida _ tipica dei miociti della muscolatura atriale, di quella ventricolare, del fascio di His e delle fibre del Purkinje;
- a risposta lenta _ specifica delle cellule del NSA e del NAV.

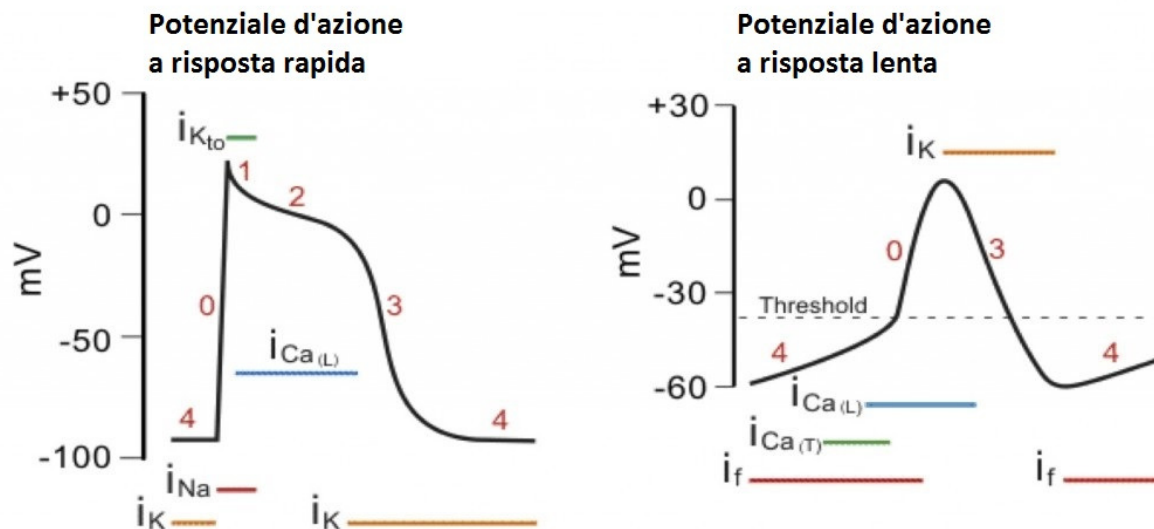


Figura 17 _ Rappresentazione schematica dei due tipi di potenziali d'azione cardiaci _ Confrontando la tipologia a risposta lenta con quella a risposta rapida è possibile notare: (a) il valore meno negativo raggiunto durante l'iperpolarizzazione, (b) la mancanza di un potenziale di riposo che assicura autoritmicità; (c) una sua più lenta risalita (*upstroke*) durante la fase di depolarizzazione, (d) la minore ampiezza raggiunta dalla sua depolarizzazione e (e) differenti correnti ioniche coinvolte.

I miociti a RISPOSTA RAPIDA possiedono un potenziale d'azione caratterizzato da cinque fasi [121]:

- FASE 0 _ FASE DI DEPOLARIZZAZIONE RAPIDA _ si verifica quando il potenziale di membrana passa dal valore di riposo di -90mV a quello di $-65/-70\text{mV}$, potenziale di apertura dei canali del Na^+ voltaggio dipendenti rapidi. In seguito all'apertura di alcuni di questi canali, si ha l'ingresso in cellula di ioni Na^+ (corrente I_{Na}) secondo il gradiente elettrochimico che porta quindi all'aumento del valore di potenziale e di conseguenza all'apertura di ulteriori canali di Na^+ voltaggio dipendenti. Quando un numero sufficiente di canali è stato aperto, il fenomeno diventa autocatalitico. Il conseguente ingresso massiccio di ioni Na^+ porta il potenziale ad un picco di $+30\text{mV}$ in 2-3ms. Si verifica inoltre l'attivazione della I_{CaL} (a -40mV).
- FASE 1 _ FASE DI RIPOLARIZZAZIONE RAPIDA PARZIALE _ inizia con l'inattivazione della corrente I_{Na} e l'apertura dei canali di K^+ voltaggio dipendenti che fanno passare la I_{Kto} , una corrente di ioni K^+ che inizia a riportare il potenziale verso valori più negativi. I_{Kto} è una corrente transiente uscente che inizia ad attivarsi già durante la parte finale del picco di depolarizzazione della FASE 0, andando incontro ad inattivazione durante la successiva FASE DI PLATEAU del potenziale d'azione. Si attivano inoltre lentamente le correnti I_{Kr} e I_{Ks} .
- FASE 2 _ FASE DI PLATEAU _ dovuta all'ingresso di ioni Ca^{2+} che contrastano la perdita di cariche positive dovuta alla fuoriuscita di K^+ . In questa fase, il valore del potenziale di membrana risulta essere leggermente positivo dato che le correnti entranti I_{CaT} e I_{CaL} controbilanciano le correnti uscenti I_{Kr} e I_{Ks} . I primi canali ad aprirsi sono i canali T

(*transienti*) voltaggio dipendenti che portano all'apertura dei canali L (*long lasting*), i quali fanno entrare lo ione Ca^{2+} responsabile dell'accoppiamento eccitazione-contrazione. Il Ca^{2+} che entra attraverso i canali di tipo L è necessario ad attivare i recettori rianodinici (RyR), che a loro volta favoriscono il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico necessario alla contrazione dei miociti. L'elevata durata della FASE DI PLATEAU è dovuta alla non completa inattivazione dei canali di Ca^{2+} .

- FASE 3 _ FASE DI RIPOLARIZZAZIONE FINALE _ molto più lenta della depolarizzazione, inizia con l'inattivazione dei canali di calcio (I_{CaL}) lasciando solamente le correnti di K^+ che tendono ad abbassare il potenziale di membrana. Si hanno la I_{Ks} (*slow*), la I_{Kur} (*ultra rapid*, solo nei miociti atriali) e la I_{Kr} (*rapid*).
- FASE 4 _ FASE DI RIPOSO _ con attivazione della I_{K1} che riporta il potenziale verso i valori di equilibrio elettrochimico del K^+ (potenziale di riposo: -90 mV) e mantiene la cellula iperpolarizzata fino all'arrivo del successivo stimolo soprasoglia.

I miociti a RISPOSTA LENTA (e quindi le cellule *pacemaker*) sono caratterizzati invece da un potenziale d'azione differente in quanto privo della FASE 1 e inoltre caratterizzato nella FASE 4 dalla DEPOLARIZZAZIONE DIASTOLICA LENTA (DDL, fondamentale per l'autoritmicità di queste cellule).

Nei miociti a RISPOSTA LENTA (autoritmici), il potenziale d'azione presenta quattro fasi [121]:

- FASE 4 _ CARATTERIZZATA DALLA DEPOLARIZZAZIONE DIASTOLICA LENTA (DDL), in cui si verifica il passaggio da circa -60/-55mV (potenziale diastolico massimo, valore più negativo raggiungibile) a -40mV (potenziale soglia per la formazione di un nuovo potenziale d'azione). La DDL è dovuta fondamentalmente alla I_f (*funny current*), corrente cationica mista sostenuta da ioni Na^+ e da ioni K^+ . Caratterizzata da tempo e voltaggio dipendenza, si attiva in iperpolarizzazione a potenziali inferiori ai -35mV e, in condizioni fisiologiche, permette il transito prevalentemente di ioni Na^+ all'interno della cellula (corrente entrante) [4]. Questa corrente si attiva già in FASE 3 durante la fase di ripolarizzazione a potenziali più negativi di -40mV e più negativo diventa il potenziale maggiore sarà la I_f . Intorno a -50mV verso la fine della FASE 4, si attiva la corrente entrante I_{Ca} che (fluendo attraverso i canali del Ca^{2+} di tipo T, I_{CaT}) accelera la depolarizzazione fino ai valori di attivazione dei canali di Ca^{2+} di tipo L (-30mV) con l'inizio della FASE 0. È presente anche un ingresso continuo di Na^+ attraverso canali non selettivi.
- FASE 0 _ FASE DI DEPOLARIZZAZIONE VELOCE, dovuta alla corrente entrante di Ca^{2+} attraverso canali di tipo L (I_{CaL} , -30mV) e caratterizzata dalle ulteriori attivazioni lenta della corrente uscente di K^+ I_{Kr} (*rapid*) e molto lenta della I_{Ks} (*slow*). Rispetto alla corrispondente

ventricolare, la lentezza tipica di questa FASE 0 è dovuta alle cinetiche dei canali di Ca^{2+} (più lente di quella dei canali di Na^+) responsabili della fase ascendente del potenziale d'azione.

- FASE 1: ASSENTE, in quanto manca completamente la corrente di K^+ I_{Kto} (*transient outward*).
- FASE 2: FASE DI SWITCH caratterizzato dalla lenta inattivazione di I_{CaL} e di I_{Kr} (dopo la loro massima attivazione) e dalla lenta attivazione di I_{Ks} . Rispetto alla corrispettiva ventricolare, risulta molto più breve in quanto i canali di Ca^{2+} (essendosi già stati attivati nella FASE 0) iniziano già ad inattivarsi.
- FASE 3: FASE DI RIPOLARIZZAZIONE, con massima attivazione della corrente I_{Ks} che si inattiva velocemente.

SVILUPPO EMBRIONALE CARDIACO

Il cuore trae essenzialmente origine dal mesoderma e riceve un contributo minore da parte di cellule della cresta neurale per formare il setto aorto-polmonare. La sua organogenesi viene regolata dall'endoderma. Durante e brevemente dopo la gastrulazione, le cellule mesodermiche (organizzatesi in foglietti epiteliali bilaterali) assumono un commitment cardiogenico [122].

Le cellule mesenchimali (tessuto connettivo embrionale derivante dal mesoderma) ammassate irregolarmente si dispongono delimitando i due tubi endocardici destro e sinistro. La loro confluenza verso la linea mediana definisce il tubo cardiaco. L'ispessimento del mesoderma splancnico (o splancnopleura) che avvolge il tubo forma il mantello da cui derivano miocardio e epicardio. A questo stadio, il cuore si presenta quindi come un enorme vaso (ventrale al tubo digerente) capace di contrarsi e deputato alla propulsione sanguigna in direzione caudo-cefalica.

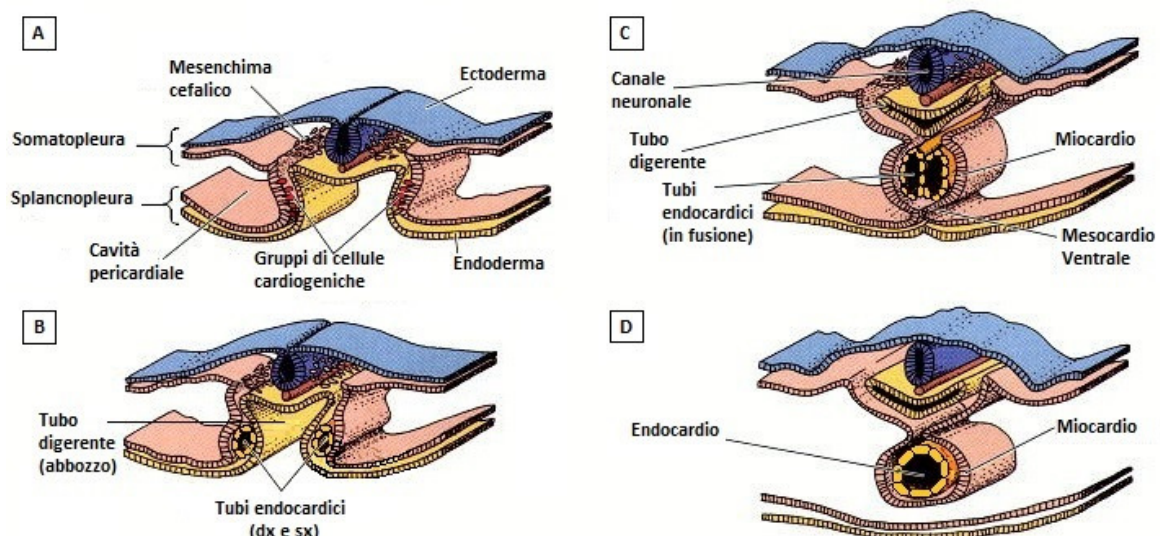


Figura 18 _ Sviluppo embriologico del tubo endocardico. La migrazione delle cellule mesodermiche e mesenchimali (A) contribuisce alla formazione dei due tubi endocardici di sinistra e di destra (B). Una volta costituiti, la loro confluenza verso la linea mediana (C) permette la strutturazione del tubo endocardico (D).

Nel tubo si distinguono 3 porzioni principali: un estremo cefalico (rappresentato dall'aorta ventrale bulbare), un settore medio-ventricolare e un estremo caudo-atriale (rappresentato dal seno venoso). Le due estremità (e relative diramazioni) rappresentano i suoi punti fissi che auto-impongono una curvatura durante il suo accrescimento. Recenti lavori hanno dimostrato che durante questa torsione si verifica il reclutamento di cellule, la cui proliferazione porta alla formazione di 4 dilatazioni ampollari. Andando in direzione caudo-craniale, si apprezzano quindi il *seno venoso* (bacino drenante del sistema venoso che facilita il riempimento atriale), l'*atrio primitivo*, il *ventricolo primitivo* e il *bulbo cardiaco* (connessione tra ventricolo e aorta, equivalente al cono arterioso di altre specie) [122]. Anche a questo livello di sviluppo, le due estremità (e le relative diramazioni) continuano a imporsi come punti fissi nell'accrescimento del tubo cardiaco. Grazie a segnali miocardici, alcune cellule endocardiche si trasformano da epiteliali a mesenchimali, generando così i *cuscinetti cardiaci* [122]. La fusione di questi *cuscinetti* contribuisce alla formazione di parte dei setti cardiaci e ai muscoli papillari. I diversi rimodellamenti costringono la vena cava superiore, quella inferiore e il seno coronarico a sboccare nel seno venoso. La formazione del setto interatriale definisce l'atrio destro e il sinistro. Il destro è formato dall'incorporazione del seno venoso con la sezione destra dell'atrio primitivo (ostio seno-atriale). Il sinistro è invece dato dalla confluenza dell'estroflessione diverticolare dell'atrio primitivo con la vena polmonare comune (unico tronco venoso di confluenza dei rami polmonari destro e sinistro che originano dal plesso splancnico polmonare). Alle giunzioni seno-atriale, atrio-ventricolare e ventricolo-conale si sviluppano le valvole [122]. Nell'accrescimento, il bulbo cardiaco e il ventricolo primitivo si avvicinano molto fino a saldare completamente le loro pareti. Nel punto di passaggio tra ventricolo primitivo e bulbo cardiaco si forma un setto. Per effetto dell'invaginazione del tessuto muscolare, il bulbo cardiaco dà il ventricolo destro mentre il ventricolo primitivo quello sinistro.

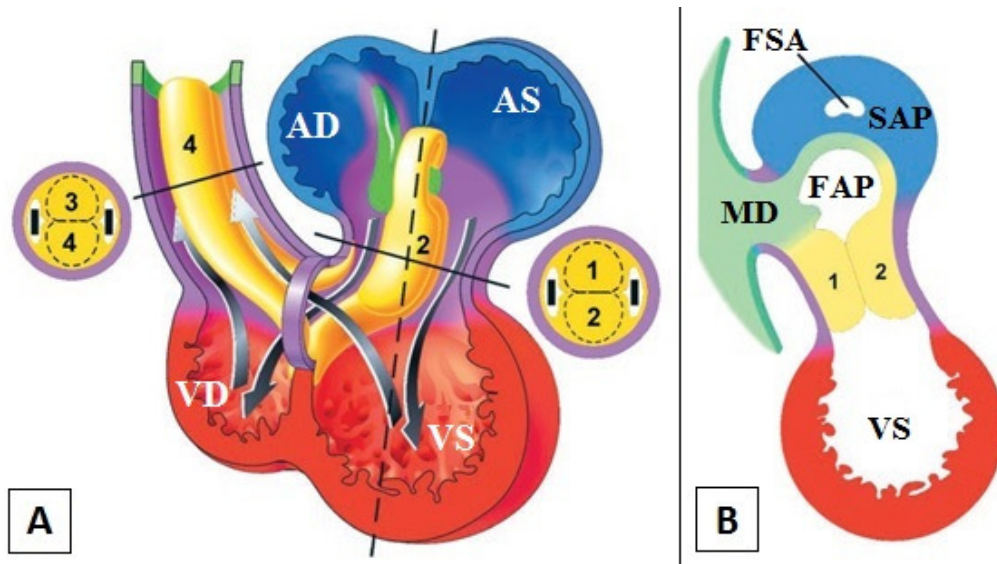


Figura 19 _ Torsione e sepimentazione cardiaca. (A) Rappresentazione della fase di transizione da tubo cardiaco a cuore con quattro camere. Il tubo cardiaco primario è indicato in viola, le camere atriali in blu, quelle ventricolari in rosso, i cuscinetti cardiaci in giallo e le connessioni venose e arteriose in verde. (B) Sezione trasversale che mostra la formazione del setto atriale (dal setto interatriale primario muscolare, in blu) , il miocardio dorsale (in verde) e i cuscinetti cardiaci atrioventricolari (in giallo, che diventeranno interamente muscolari durante lo sviluppo successivo). VD/VS=Ventricolo Destro/sinistro, AD/AS=Atrio Destro/Sinistro; SAP=Setto Atriale Primario; FAP=Forame Atriale Primario; FSA=Forame SenoAtriale; MD=Miocardio Dorsale; 1=cuscinetto atrioventricolare dorsale; 2=cuscinetto atrioventricolare ventrale; 3=cuscinetto parietale per il tratto di uscita; 4=cuscinetto settale per il tratto di uscita. La linea tratteggiata in (A) raffigura il piano di sezione mostrato in (B) [Modificato da 122].

Contemporaneamente il tratto craniale del bulbo cardiaco si divide in cono (porzione più caudale) e in tronco (più craniale), entrambi sepimentati poi da un setto mediano. Il procedere dell'organogenesi permette così ad ogni ventricolo di essere strutturato in una camera di afflusso (derivante a sinistra dal ventricolo primitivo e a destra dal bulbo cardiaco) e in una di efflusso (derivante per entrambi i ventricoli dal bulbo cardiaco). Ripiegandosi a "S", gli atri si spostano dorsalmente mentre i ventricoli ventralmente. In questa torsione, l'inlet e l'outlet ventricolari si posizionano quasi nello stesso piano, con le valvole atrioventricolari localizzate posteriormente rispetto alle due semilunari. Nella morfogenesi cardiaca questi passaggi avvengono di solito parallelamente [122].

Nella specificazione della lateralità cardiaca (destra vs sinistra), il fattore trascrizionale Pitx2 svolge un ruolo fondamentale nei meccanismi che impongono le torsioni al cuore in formazione [123].

Sebbene nel cuore in sviluppo tutti i miociti embrionali posseggono inizialmente caratteristiche autoritmiche, soltanto una loro piccola popolazione contribuisce a realizzare il sistema di conduzione cardiaco. La stragrande maggioranza dei cardiomiociti embrionali differenzia infatti in miocardio di lavoro. Studi recenti hanno rivelato che lo sviluppo del sistema di conduzione viene

quindi garantito attraverso una soppressione selettiva (operata da specifici fattori trascrizionali) del fenotipo miocardico di lavoro [99].

E' stato infatti dimostrato che i componenti del sistema di conduzione centrale si delineano all'interno del dominio espressivo di fattori trascrizionali appartenenti alla T-box family, che condividono struttura ed elementi riconoscitivi sul DNA. Queste proteine conferiscono alle cellule che le esprimono un fenotipo differente da quello di lavoro assicurato dall'espressione del fattore trascrizionale Nkx2.5 [124].

Limitatamente alla formazione del NSA, alcune delle cellule mesenchimali alla porzione caudale del tubo cardiaco ne rappresentano i suoi precursori [99; 125; 126]. Grazie all'espressione di Shox2 (fattore trascrizionale appartenente alla SHOX gene family), queste cellule abbandonano l'indirizzamento verso il fenotipo miocardico di lavoro. Shox2 non solo blocca l'attività di Nkx2.5 e del relativo pathway [107; 127; 128] ma promuove inoltre la trascrizione di Tbx3 e Hcn4 [99], a loro volta necessari per attivare Tbx3 [125].

Quest'ultimo fattore trascrizionale rappresenta uno dei marcatori tipici del NSA sia in fase di sviluppo che in fase post-natale. La sua attivazione svolge infatti un ruolo fondamentale nel regolare l'espressione genica mirata a sviluppare e mantenere il fenotipo pacemaker [127; 129; 130].

Infine è interessante notare che Pitx2 (un altro membro della SHOX gene family) garantisce lo sviluppo di un unico NSA in quanto inibisce totalmente la sintesi e l'attività di Shox2 nell'atrio di sinistra [99; 127; 131].

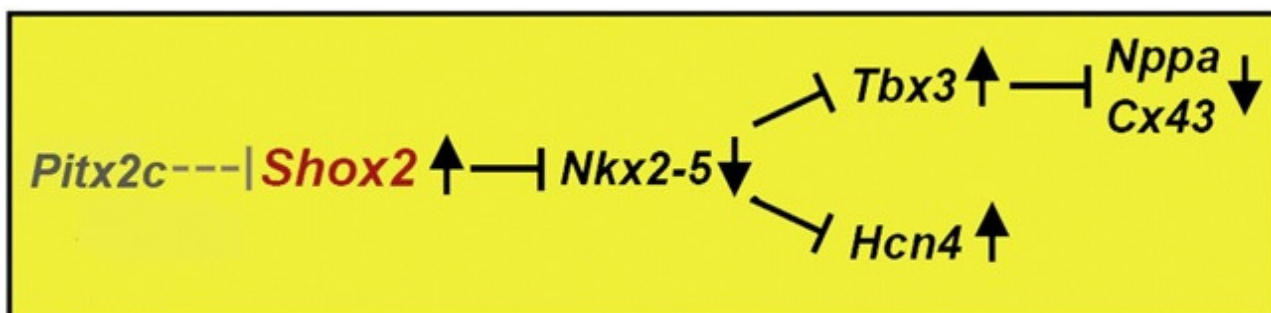


Figura 20 _ Pathway che garantisce la corretta genesi di un unico NSA e dei suoi caratteristici livelli espressivi [Modificato da 107].

CELLULE STAMINALI

Con il termine “staminale” si intende una cellula derivata da embrione, feto o organismo adulto che in particolari condizioni conserva la capacità di replicarsi per periodi indefiniti mantenendo l'iniziale stato indifferenziato (e quindi rimanendo uguale a se stessa). Per questa loro importante caratteristica, le staminali vengono appunto definite cellule indifferenziate dotate di long-term self

renewal. Sottoposte a particolari stimoli, queste cellule sono inoltre in grado di originare uno o più tipi cellulari diversi.

Le staminali sono caratterizzate da due diversi meccanismi di divisione cellulare:

- REPLICAZIONE ASIMMETRICA _ la cellula staminale origina due cellule figlie di cui una conserva le caratteristiche di staminalità mentre l'altra (definita progenitore cellulare) differenzia;
- REPLICAZIONE SIMMETRICA _ la cellula staminale origina due cellule figlie identiche che possono essere due cellule staminali oppure due cellule progenitrici.

In base al loro potenziale differenziativo, sono state classificate in:

- TOTIPOTENTI _ in grado di dare origine sia ai tessuti embrionali che a quelli extraembrionali (come placenta e sacco vitellino), prerogativa del solo zigote;
- PLURIPOTENTI _ in grado di generare tutte le cellule derivate dai tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma) ma non le cellule che compongono i tessuti extraembrionali;
- MULTIPOTENTI _ in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule, generalmente solo nei tipi cellulari del tessuto di appartenenza;
- UNIPOTENTI _ in grado di generare solamente un tipo di cellula specializzata.

Invece a seconda della provenienza, le cellule staminali vengono suddivise in due grandi gruppi:

- cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESCs);
- cellule staminali adulte (Adult Stem Cells, ASCs).

CELLULE STAMINALI EMBRIONALI (ESCs)

Le ESCs vengono estratte da embrioni derivati generalmente da fecondazione *in vitro*. Dopo 4/5 giorni, l'embrione è una blastocisti composta da 3 strutture:

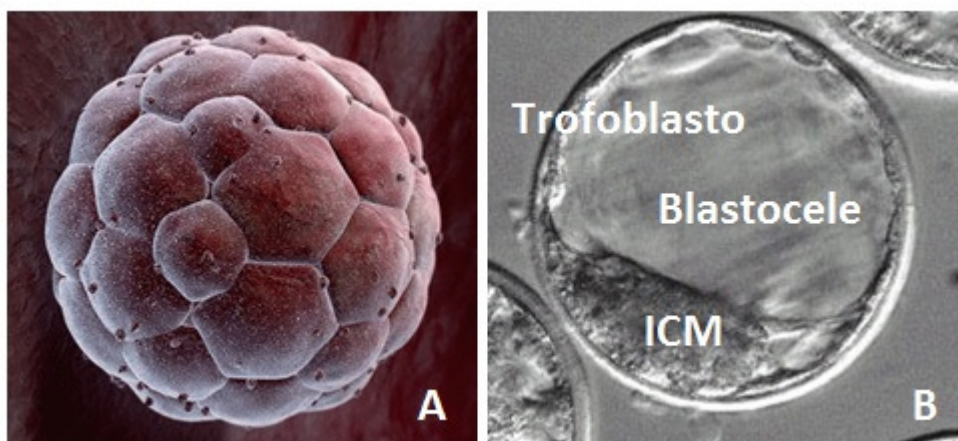


Figura 21 _ (A) Immagine elaborata al computer di una blastocisti. (B) Acquisizione di una blastocisti al microscopio elettronico in cui è possibile individuare le sue tre caratteristiche strutture: trofoblasto, blastocele e massa cellulare interna (Inner Cell Mass, ICM).

- trofoblasto _ strato cellulare protettivo esterno che circonda la blastocisti e che darà origine ai tessuti extraembrionali di supporto (placenta e cordone ombelicale);
- blastocele _ cavità interna della blastocisti;
- massa cellulare interna (inner cell mass, ICM) _ gruppo costituito da circa trenta cellule situate a un estremo del blastocele e da cui si originano i tre foglietti embrionali che permettono lo sviluppo dell’embrione.

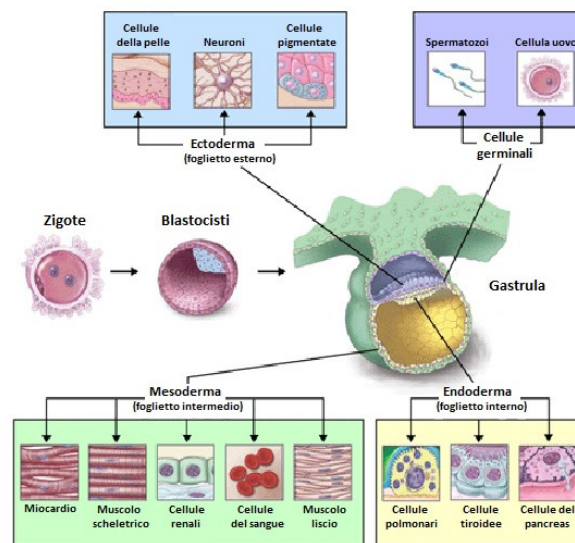


Figura 22 _ Le ESCs sono caratterizzate da notevole plasticità. Durante le loro divisioni, si organizzano a formare i tre foglietti embrionali dai quali si sviluppano successivamente tutti i tessuti e gli organi di un organismo.

La ICM rappresenta la porzione della blastocisti da cui vengono fisicamente estratte le ESCs [132; 133]. La relativa estrazione prevede la soppressione dell’embrione a tempi non oltre i 14 giorni dalla fecondazione. Messe in opportune condizioni di coltura, risulta facile farle espandere *in vitro* mediante divisioni simmetriche per un numero teoricamente illimitato di passaggi. In altre condizioni di coltura, è possibile invece indurle al differenziamento.

Questa loro plasticità a sviluppare specifici fenotipi di interesse permetterebbe quindi di impiegarle per scopi terapeutici.

Le cellule staminali embrionali di topo (murine Embryonic Stem Cells, mESCs) rappresentano una delle relative tipologie cellulari più utilizzate nel campo della ricerca, in quanto il loro utilizzo non è vincolato a problemi di carattere etico. Esistono infatti protocolli ben documentati e standardizzati che ne descrivono la coltivazione, il differenziamento e l’ingegnerizzazione.

CELLULE STAMINALI ADULTE (ASCs)

Le ASCs sono cellule indifferenziate che si trovano nei tessuti di un organismo adulto e contraddistinte da una capacità di self-renewal più limitata però rispetto alle ESCs. Trattandosi di cellule o unipotenti o multipotenti, sono appunto predisposte al mantenimento e alla riparazione del tessuto di appartenenza. Generano solitamente cellule di tipo intermedio non ancora differenziate ma comunque indirizzate verso un determinato fenotipo (cellule progenitrici).

I primi tipi di ASCs furono scoperti all'interno del midollo osseo e vennero classificati come:

- cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) _ che originano tutte le tipologie di cellule del sangue [134];
- cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) _ che differenziano in osteociti, condrociti, adipociti e altre cellule del tessuto connettivo; vengono anche chiamate cellule stromali del midollo osseo [135; 136; 137; 138].

La ricerca ha permesso successivamente non solo di identificare ASCs in altri organi come cuore [139], cervello [140; 141], fegato e pancreas [142], ma anche di descriverne i relativi marcatori fenotipici utili per un loro possibile isolamento [139; 143; 144; 145; 146; 147].

PACEMAKER E TERAPIE

Pur presentando anche alcuni svantaggi, attualmente i *pacemakers elettronici* costituiscono l'unica terapia valida nel trattamento di diverse patologie del sistema di conduzione cardiaco. Tra le loro limitazioni, quella fisiologicamente più rilevante è sicuramente la loro impossibilità ad essere modulati da parte del sistema nervoso autonomo in seguito a situazioni di stress, esercizio fisico o stati emozionali. Inoltre esibendo tempo di autonomia limitato e necessitando di manutenzione periodica, non possono essere considerati come cura definitiva. Infine il loro corretto funzionamento può essere alterato dall'interazione con alcuni strumenti elettronici, quali elettrostimolatori, metal detectors e apparecchi per la risonanza magnetica.

Per queste problematiche legate al loro utilizzo, da alcuni anni la ricerca biomedica si è orientata verso la creazione di un pacemaker biologico come valida alternativa a quello elettronico. Per pacemaker biologico si intende un substrato cellulare in grado di generare e governare l'attività spontanea del cuore, di possedere specifiche caratteristiche (come la capacità di rispondere a stimoli nervosi autonomi ed ormonali e di conseguenza modulare la frequenza cardiaca in risposta a particolari richieste), di non richiedere l'impiego di elettrodi o batterie e di non scatenare infezioni, infiammazioni o addirittura neoplasie.

Le strategie finora adottate possono essere suddivise in due categorie: una di tipo genico e l'altra di tipo cellulare.

TERAPIA GENICA

L'approccio di tipo genico prevede l'inserzione di geni codificanti per molecole specifiche all'interno del genoma di cellule cardiache tramite l'impiego di vettori plasmidici e virali. Alterando quindi le proprietà di cellule già residenti nel miocardio si ricerca o un incremento di attività autoritmica intrinseca o comunque l'induzione di attività spontanea in cellule normalmente quiescenti.

I primi tentativi di terapia genica vennero effettuati iniettando un costrutto adenovirale contenente il gene codificante per il recettore β 2-adrenergico umano prima nell'atrio di topo e successivamente in quello di maiale [148; 149]. I relativi risultati permisero di apprezzare in entrambi i casi un netto aumento del battito cardiaco, dovuto essenzialmente all'incremento dei livelli intracellulari di cAMP.

Un tentativo successivo in cellule ventricolari di porcellini d'India prevede l'impiego di un altro costrutto adenovirale contenente le informazioni per un dominante negativo della corrente I_{K1} [150]. Tale dominante negativo era una variante mutata del gene Kir2.1 che codifica per la subunità α del canale per la I_{K1} . La sua interazione con le subunità native del canale rendeva l'intera proteina non funzionale, dimostrando così che la soppressione di questa corrente induceva in vivo nel ventricolo attività ritmica spontanea.

Un ulteriore costrutto adenovirale contenente il gene HCN2 di topo venne utilizzato per la trasfezione di miociti ventricolari neonatali di ratto che dopo 48 ore in coltura acquisivano la capacità di generare un ritmo stabile e regolare [151]. In vivo l'iniezione dello stesso costrutto sia nell'atrio sinistro che nella branca discendente sinistra del sistema del Purkinje di cani ha permesso, dopo blocco sinusale indotto da stimolazione vagale, l'instaurazione di un ritmo stabile e modulabile dall'iniezione di adrenalina [152; 153].

Nonostante il conseguimento di riscontri positivi nei modelli animali, l'impiego di un vettore virale limita notevolmente le potenzialità applicative di questo tipo di strategia nell'uomo.

TERAPIA CELLULARE

L'approccio di tipo cellulare invece si prefigge la creazione di un *pacemaker ex-novo* utilizzando o cellule staminali adulte ingegnerizzate o cellule staminali embrionali differenziate in vitro verso il fenotipo cardiaco/pacemaker. Il substrato risultante è necessario che sia non solo modulabile ma anche capace di generare e propagare impulsi elettrici una volta trapiantato in vivo.

Limitatamente all'impiego di cellule staminali adulte ingegnerizzate, le cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) esprimenti i canali HCN hanno avuto un ruolo importante. Uno studio a riguardo ha dimostrato che dopo la loro elettroporazione con un plasmide codificante per

HCN2 di topo, le hMSCs in cocoltura con miociti ventricolari neonatali di ratto determinano un aumento considerevole nel loro beating rate. La loro funzione pacemaker è stata anche confermata nel cuore adulto di cane. Dopo l'induzione di un arresto del NSA, la stessa tipologia di hMSCs ingegnerizzate è stata iniettata a livello sub-epicardico nella parete ventricolare sinistra generando così una regione con attività ritmica spontanea simile al NSA [154]. L'espressione endogena delle connesine cardiache Cx40 e Cx43 da parte delle hMSCs [155] è ciò che ha garantito (e garantirebbe) la loro connessione elettrica alle cellule ventricolari residenti. Il pacemaker biologico così strutturato viene definito di tipo passivo, in quanto la cellula mesenchimale è incapace di generare autonomamente potenziali d'azione. Grazie all'espressione dei canali HCN, essa si limita a fornire quella corrente entrante che depolarizza il potenziale di membrana del miocita adiacente fino al raggiungimento della soglia. Non presentando i recettori adatti, queste hMSCs non sono modulabili da parte del sistema nervoso autonomo. Ma la limitazione più grave di questa strategia resta però legata al vasto potenziale differenziativo di questa stessa tipologia staminale. Infatti portano con sé un alto rischio tumorigenico.

Attualmente la strategia più incoraggiante verte alla creazione di un substrato fisiologicamente più stabile e quanto più possibile simile al pacemaker naturale del cuore, quindi elettricamente attivo e modulabile dal sistema nervoso autonomo. In questo ambito, è stata posta particolare attenzione sulle cellule staminali embrionali dato il loro enorme potenziale differenziativo intrinseco e la loro maggiore manipolabilità rispetto alle staminali adulte.

E' ormai noto che le cellule staminali embrionali sia murine (mESC) che umane (hESC) sono inducibili *in vitro* a differenziare in cardiomiociti autoritmici [156; 157; 158; 159] capaci di stimolare un substrato quiescente sia *in vitro* [158] che *in vivo* [159]. Il pacemaker biologico così ottenuto viene definito di tipo attivo. Infatti la cellula staminale differenziando acquisisce la capacità di generare spontaneamente potenziali d'azione. Il principale problema di questa strategia consiste nel sapere isolare una popolazione differenziata e omogenea in cui non siano presenti cellule immature che possano costituire una fonte di teratogenesi nell'ospite ricevente [38]. La scelta di utilizzare mESCs o hESCs come substrato cellulare per la realizzazione del pacemaker biologico sembra al momento essere la migliore, sebbene esistano problematiche ancora irrisolte di carattere etico ed operativo.

CD166

La proteina CD166 è una glicoproteina transmembrana di tipo I che appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF). Costituita da 500 AA, mostra un peso molecolare di circa 90KDa.

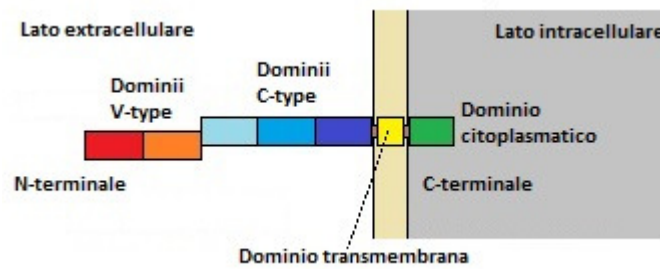


Figura 23 _ Rappresentazione schematica della proteina CD166 [Modificato da 160].

Essendo un antigene di superficie, presenta appunto una più lunga porzione extracellulare posizionata al suo N-terminale. In questo segmento extracellulare sono identificabili cinque domini di tipo Ig-like raggruppabili in due tipologie. I due domini (posti più vicini al terminale) sono di tipo variabile (V-type) e a loro volta collegati con un altri tre di tipo costante (C-type). Questa porzione extracellulare è poi connessa alla regione transmembrana idrofobica, a sua volta unita con il corto dominio citoplasmatico posto al C-terminale. La sequenza di questa proteina esibisce similarità significativa con una sottoclasse di IgSF che comprende molecole di adesione neurale. [160; 161; 162].

Nota anche con il nome di ALCAM (Activated Leukocytes Cell-Adhesion Molecule), è coinvolta nell'orientamento degli assoni, nell'ematopoiesi, nella risposta immunitaria e nella metastasi tumorale.

In letteratura è stato dimostrato che durante l'embriogenesi l'mRNA codificante per CD166 viene espresso nel *cardiac crescent* (posizione in cui si trovano i progenitori dei futuri tubi endocardici) e nella doccia neurale (*neural groove*) al giorno embrionale 7.75, mentre alti livelli di espressione sono presenti nel tubo cardiaco al giorno embrionale 8.5. L'espressione di CD166 viene persa nei cardiomiociti dal giorno embrionale 12.5; durante gli stadi di sviluppo più tardivi invece CD166 è presente in diversi organi [163]. Durante i primi stadi di sviluppo del cuore embrionale, CD166 potrebbe quindi rappresentare un importante marcatore di superficie per i cardiomiociti. Studi successivi hanno dimostrato come nel sacco vitellino di topo, le cellule positive al CD166 compaiono al giorno embrionale 8.5. In esse, quelle con positività bassa o nulla costituiscono la sottopopolazione dei precursori ematopoietici. Le cellule fortemente positive rappresentano invece la sottopopolazione dei precursori sia endoteliali che cardiaci. Specificatamente in quest'ultima sottopopolazione, l'espressione di CD166 con il recettore di membrana Flk-1 (o Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2) discrimina i precursori endoteliali da quelli cardiaci che ne risultano quindi sprovvisti [164].

In un altro studio condotto su ESCs umane selezionate al giorno 12 di differenziamento in base alla positività per CD166 e analizzate con tecniche di RT-qPCR, immunoistochimica e di metilazione

del DNA, emerge la conferma che i precursori esprimenti ALCAM differenziano in una popolazione particolarmente arricchita in cardiomiociti (dotati sia di proteine contrattili che di canali ionici tipici delle cellule cardiache) ma vitali per un periodo di tempo limitato [165].

La mancanza di antigeni di superficie specifici e tipici delle cellule cardiache/pacemaker è un'altra limitazione per quanto riguarda l'isolamento di una popolazione omogenea e differenziata di queste cellule. L'ingegnerizzazione di substrati cellulari a scopo terapeutico non è ben vista in campo clinico. Quindi la specifica e temporale espressione di CD166 nel cuore embrionale rappresenta un importante strumento per l'identificazione e l'isolamento di cardiomiociti durante gli stadi precoci di differenziamento.

SCOPO DEL LAVORO

Per i primi due anni dell'esperienza di dottorato, il mio lavoro di ricerca è rientrato nel più ampio progetto volto alla realizzazione di un pacemaker biologico.

Lo scopo del mio lavoro è stato dimostrare che le cellule autoritmiche ottenute dal differenziamento di cellule embrionali staminali di topo (mESCs) e isolate seguendo un protocollo elaborato dal nostro laboratorio possedessero le caratteristiche proprie dei miociti senoatriali nativi.

Per valutare il loro grado di differenziamento sono state utilizzate tecniche di PCR quantitativa (qPCR), immunofluorescenza ed elettrofisiologia.

I nostri dati hanno appunto dimostrato che il protocollo sviluppato è in grado di individuare e separare cellule autoritmiche con le caratteristiche fenotipiche desiderate [102].

COLTURA CELLULARE

Recentemente il nostro gruppo ha sviluppato un protocollo per ottenere ed isolare cellule autoritmiche partendo da cellule embrionali staminali di topo (mESCs).

Le mESCs da noi impiegate sono state:

1. cellule ES-D3 (ATCC) da cui abbiamo poi sviluppato dei cloni che esprimono in maniera costitutiva i geni reporter LacZ (ES-LacZ) e GFP (ES-GFP) e
2. cellule ES CGR8 (forniteci gentilmente dal gruppo della Professoressa Cerbai, Università degli Studi di Firenze).

MANTENIMENTO

Al fine di conservare la loro pluripotenza, queste mESCs vengono fatte crescere in sospensione in un MEDIUM DI MANTENIMENTO contenente ES-DMEM (ATCC), 15% di Knock-Out Serum Replacement (KOSR, Gibco), Non Essential Amino Acids (NEAA, Gibco) 0,1mmol/L, β -mercaptoetanololo (Sigma) 0,1mmol/L, L-glutamina (Gibco) 2mmol/L, Leukemia Inhibitory Factor (LIF, Chemicon) 103U/ml, Penicillina 100U/ml e Streptomicina 0.1mg/ml (Euroclone).

In questo medium, il LIF assicura che le mESCs conservino la loro pluripotenza.

Una volta che le relative colonie raggiungono una dimensione adeguata, il nostro protocollo prevede la loro divisione in singole cellule mediante l'utilizzo di Tryple (Life Technologies).

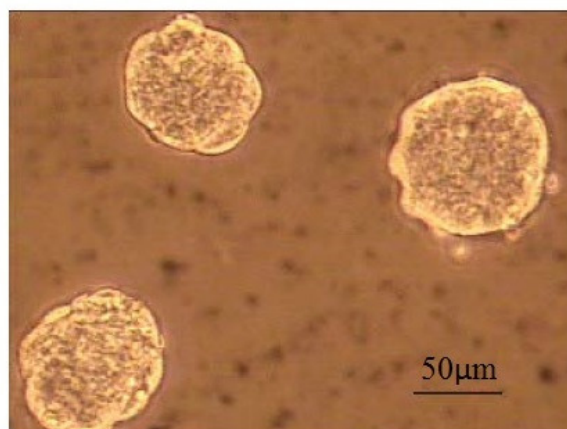


Figura 24 _ Colonie in sospensione di mESCs indifferenziate.

Dopo essere risaliti al numero indicativo di cellule vitali, il passaggio successivo prevede di destinarne una loro parte al differenziamento e un'altra per un ulteriore mantenimento.

DIFFERENZIAMENTO

Il protocollo di differenziamento *in vitro* delle mESCs utilizzato nel nostro laboratorio prevede la formazione di aggregati cellulari compatti, definiti *Embryoid Bodies* (EBs), attraverso la tecnica delle *Hanging Drops* (HD), protocollo ampiamente adoperato in letteratura [166; 167; 168; 169; 170].

In questo processo un ruolo importante è svolto dal tipo di medium utilizzato: il TERRENO DIFFERENZIATIVO. La sua composizione comprende DMEM (Invitrogen), L-glutammina (Gibco) 4mmol/L, Non Essential Amino Acids (NEAA, Gibco) 0,1mmol/L, β -mercaptoetanololo (Sigma) 0,1mmol/L, 20% di Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen), Penicillina 100U/ml e Streptomicina 0,1mg/ml (Euroclone).

In questo medium il FBS rappresenta un fattore importante nel promuovere il differenziamento cellulare.

Una volta risospese le singole mESCs nell'adeguato volume di TERRENO DIFFERENZIATIVO, si allestiscono gocce da 20 μ L (contenente ciascuna circa 500 cellule) sul fondo di ogni piastra. Ciascuna di queste petri viene quindi capovolta e nel relativo coperchio viene versato del phosphate-buffered saline (PBS). La presenza di questa soluzione fisiologica ha lo scopo di mantenere all'interno della piastra quell'umidità necessaria ad impedire l'evaporazione delle HDs (GIORNO 0). Le HDs vengono quindi lasciate in incubatore a 37° C per 2 giorni, durante i quali le cellule addensandosi sul fondo della goccia vanno a formare gli EBs. Trascorso questo periodo, nelle varie piastre vengono aggiunti 10mL di TERRENO DIFFERENZIATIVO fresco (GIORNO 2) permettendo così agli EBs di crescere in sospensione per altri 5 giorni. Al settimo giorno di differenziamento gli EBs vengono poi piastrati singolarmente in petri trattate per l'adesione cellulare e ricoperte con gelatina (0,1%, Type B, Sigma) al fine di favorirne appunto la loro adesione (GIORNO 7+0). Questa adesione è importante in quanto stimola una loro riorganizzazione strutturale che li fa passare da una forma sferica a una appiattita sul fondo della piastra.

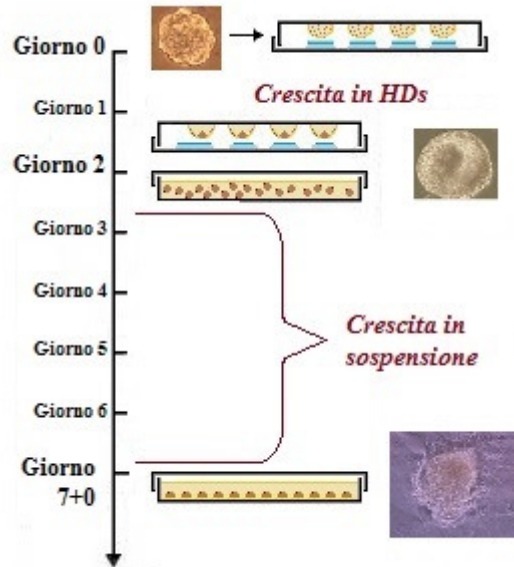


Figura 25 _ Schema del protocollo di differenziamento a partire da mESCs indifferenziate. Partendo dalla dissociazione delle relative colonie e dalla risospensione delle cellule ottenute in terreno differenziativo, attraverso la tecnica delle HDs è possibile ricavare degli EBs dotati di autoritmicità.

Durante il differenziamento in EBs, alcune cellule della massa interna danno origine a componenti cellulari dell'ectoderma mentre altre formano l'endoderma ed il mesoderma. Dal settimo giorno di differenziamento (7+0) alcune regioni degli EBs presentano attività ritmica spontanea, segno che alcune cellule si sono differenziate in cardiomiociti pacemaker [102; 170].

Al giorno 7+1 del nostro protocollo questi EBs vengono dissociati enzimaticamente e meccanicamente in singole cellule utilizzando del Tryple. Una volta risospese in PBS+FBS 10% (*volume/volume*)+CaCl₂ 1mM+EDTA 5mM e stimato il numero indicativo di cellule presenti in questo volume, si effettua la marcatura con l'anticorpo α -CD166 (coniugato con *ficoeritrina*, PE; eBioscience) e con l'isotipo (usato come controllo, eBioscience). Dopo due passaggi in centrifuga e una serie di lavaggi, il pellet ottenuto viene risospeso in PBS+FBS 10% (*v/v*)+EDTA 5mM e fatto passare attraverso un filtro del diametro di 70 μ m. Questo filtraggio consente di ottenere un volume di risospensione contenente solo cellule singole. Tramite la successiva analisi citofluorimetrica, queste cellule vengono separate in due sottopopolazioni in base all'espressione del CD166. Le cellule ricavate di ciascun sottogruppo vengono quindi lasciate per 24 ore a riaggregare in piastre batteriche inclinate. Messe in coltura in piastre distinte, la sottopopolazione CD166+ sviluppa da subito autoritmicità al contrario delle CD166-.

Questo studio (mirato a valutare l'espressione temporale dell'antigene di nostro interesse) è stato eseguito marcando le cellule derivate dalla dissociazioni degli EBs a 6, 8, 10 e 15 giorni del loro differenziamento.

CITOFUORIMETRIA

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione fenotipica di milioni di cellule sospese in un mezzo fluidico.

Il citofluorimetro ottico a flusso consente quindi di ottenere diverse informazioni su strutture e funzioni di singole cellule attraverso l'analisi di alcuni parametri fisici (diffrazione, rifrazione, riflessione, fluorescenza) che caratterizzano un fascio di luce dopo la sua interazione con ogni singola cellula del campione in esame. Impiegando sonde fluorescenti (endogene e/o esogene) diventa così possibile misurare qualsiasi parametro di cellule singole (o di particelle subcellulari) in sospensione.

Lo strumento da noi utilizzato è un BD FACSAria II. Operando a pressioni differenti, questo macchinario è in grado di acquisire fino a 70.000 eventi al secondo [per evento si intende la formazione di una singola goccia contenente una singola cellula analizzata] consentendo anche un'analisi multicolore fino a 13 marcatori fluorescenti e due parametri *scatter* alla volta.

Il sistema BD FACSAria II consiste di tre principali componenti: un carrello contenente i serbatoi per le soluzioni, un macchinario in cui viene eseguita fisicamente l'analisi citofluorimetrica e una postazione di lavoro ed elaborazione.

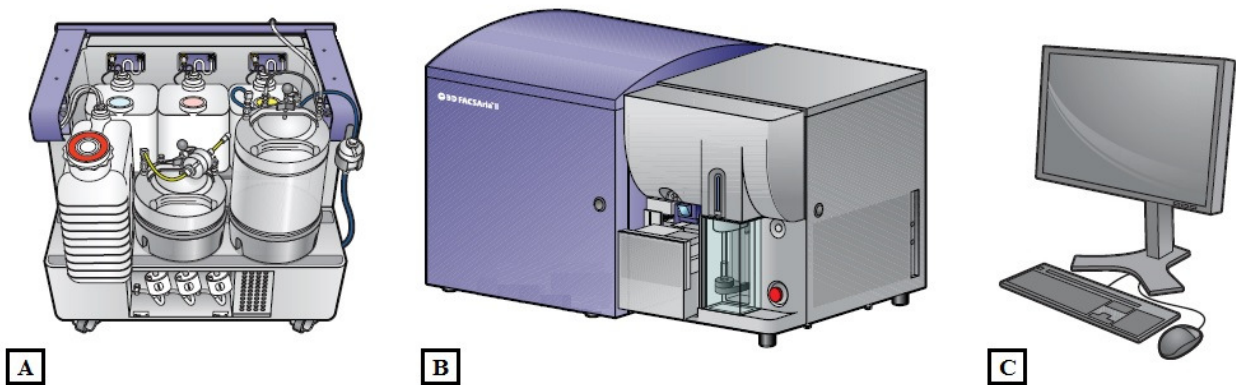


Figura 26 _ Componentistica del BD FACSAria II. (A) Carrello in cui sono posizionati i serbatoi contenenti le varie soluzioni utili ad effettuare le analisi citofluorimetriche (quindi per la pulizia dei condotti e per il fluido di guaina) ed anche per la raccolta del derivante scarto. Il collegamento a un sistema di aria compressa e a un dispositivo per il sottovuoto garantisce le varie possibilità di cell-sorting modulabili grazie al relativo software di controllo. (B) Macchinario in cui la sospensione monocellulare (fatta scorrere attraverso sue specifiche strutture) viene fisicamente analizzata e successivamente separata nelle sue relative sottopopolazioni cellulari. (C) Postazione di lavoro ed elaborazione, grazie a cui l'operatore è in grado di controllare l'analisi citofluorimetrica regolandone i relativi parametri.

Nel citofluorimetro, la *camera di iniezione del campione* rappresenta il dispositivo con cui l'analita (in condizione di *single cells*) viene introdotto nel macchinario. A livello della successiva *camera di flusso*, la sospensione monocellulare incontra il fluido di guaina, soluzione che circondando la

sospensione focalizza le singole cellule al centro del flusso separandole l'una dalle altre. Ciascuna cellula singola viene quindi intercettata da un raggio laser. Quest'interazione permette di stabilire non soltanto la dimensione (*Forward Scatter*), la granulosit  e la complessit  (*Side Scatter*) di ogni cellula, ma eccita inoltre le proteine fluorescenti eventualmente espresse nella cellula (come la Green o Red Fluorescent Protein, GFP o RFP) e/o i fluorofori coniugati ad anticorpi monoclonali diretti contro specifici antigeni di interesse. Le relative emissioni a lunghezze d'onda differenti transitano in seguito attraverso un sistema di filtri e specchi. I segnali vengono cos  processati elettronicamente convertendoli da informazioni di tipo analogico a informazioni di tipo digitale e inviati all'analizzatore.

A seguito dell'interazione con il laser, ogni cellula generer  una carica negativa dopo l'emissione di fluorescenza mentre in caso opposto ne avr  una positiva. Procedendo poi attraverso le *piastre di deflessione* (elettricamente cariche), le cellule analizzate vengono infine separate e raggruppate a livello della *camera di raccolta*. Le cellule prive di interesse finiscono invece nel bidone degli scarti cellulari.

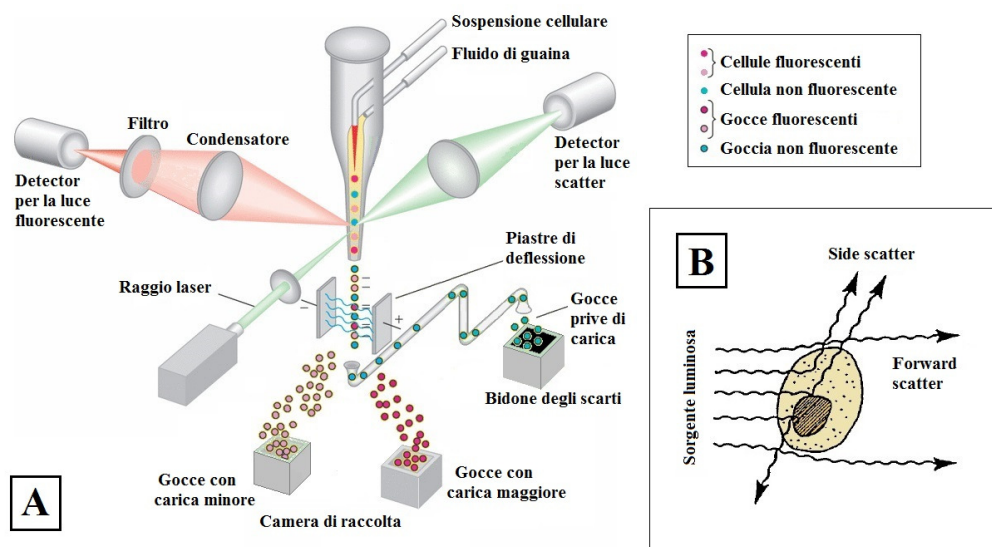


Figura 27 _ (A) Schematizzazione del funzionamento del citofluorimetro. In base ai diversi livelli di fluorescenza che caratterizzano le cellule di un certo campione, l'operatore   in grado non solo di analizzare ma anche selezionare e separare specifiche sottopopolazioni cellulari di interesse. (B) Interazione della luce laser con la singola cellula. I segnali che ne risultano non solo permettono di identificarne le sue reali dimensioni (*Forward Scatter*) ma anche granulosit  e complessit  (*Side Scatter*).

Durante questi passaggi la pressurizzazione garantisce l'instaurazione e il mantenimento del flusso necessario per l'attuazione di questa selezione cellulare definita con il termine di "sorting".

ESTRAZIONE DEL RNA

Le cellule di entrambe le sottopopolazioni sono state lisate in eppendorf sterili utilizzando del TRIzol[®] Reagent (LifeTechnologies, in quantità variabile e dipendente dal numero di cellule a disposizione). Questa soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato è infatti in grado di distruggere tutte le strutture cellulari lasciando però intatto l'RNA.

Dopo una lisi meccanica, a questa soluzione viene aggiunto cloroformio (Sigma, in rapporto 1:5 per ogni ml di Trizol utilizzato). Per mescolare i due componenti, ogni campione viene prima invertito per circa 10 volte e lasciato poi a riposare per 4min a temperatura ambiente. Dopo aver centrifugato ogni eppendorf a 12000g per 20min a 4° C, vengono a crearsi tre fasi distinte: una fase acquosa superficiale contenente RNA, una intermedia di colore bianco comprendente le proteine e un'altra più densa di colore rosa che invece racchiude DNA. La parte superiore contenente RNA viene quindi recuperata e trasferita in una nuova eppendorf sterile aggiungendo un volume equivalente di isopropanolo (Sigma). Ogni campione viene così invertito e lasciato precipitare per un intervallo di tempo di 10min a temperatura ambiente oppure overnight a -20° C. Trascorso questo periodo, ogni campione viene centrifugato a 12000g per 20min a 4° C. Eliminato il surnatante per decantazione, ogni pellet viene lavato con etanolo al 75% (Sigma) e successivamente centrifugato a 7500g per 10min a 4° C. Dopo una nuova decantazione, ogni pellet viene lasciato asciugare sotto cappa per circa 10min per risospenderlo quindi in circa 10µl di H₂O MilliQ. Questa risospensione permette all'operatore di quantificare tramite spettrofotometro l'RNA estratto. Al fine di eliminare eventuali residui di DNA, ogni campione viene perciò sottoposto a un trattamento con DNasi I (Thermo scientific).

TRATTAMENTO CON DNASI I

| | Stock | Concentrazione finale | Volume |
|--------------------------------------------------------------|-------|-----------------------|--------------------|
| Buffer con MgCl ₂ (Thermo scientific) | 10X | 1X | 1µL |
| DNasi I (Thermo scientific) | 1U/µL | 0,1U/µL | 1µL |
| H ₂ O MilliQ | | | Fino ai 9µL totali |
| Volume finale - comprendente il volume contenente 1µg di RNA | | | 9µL totali |

Tabella 1 _ Trattamento con DNasi I. I valori riportati si riferiscono per ogni singolo µg di RNA. In questo trattamento i 9µL totali derivano da: 1µL di Buffer, 1µL di DNasi I, il volume (in µL) corrispondenti a 1µg di RNA (che intendiamo trattare) e il volume di H₂O MilliQ utile a raggiungere appunto i 9µL totali. A tale volume verrà in seguito aggiunto 1µL di EDTA.

Come mostrato nella tabella 1, i volumi dei vari reagenti sono stabiliti in base ai µg totali di RNA che si vogliono trattare. I campioni così preparati vengono incubati a 37° C per 30min in modo da consentire all'enzima di degradare il DNA presente nel volume. Al termine dell'incubazione,

l'aggiunta di EDTA 25mM (in rapporto 1:1 con il volume di DNasi utilizzato) inattiva l'enzima. A questo punto i campioni possono essere conservati a -80° C oppure sottoposti immediatamente a retrotrascrizione.

RT-PCR

La tecnica della RT-PCR utilizza una particolare polimerasi definita retro-trascrittasi (RT, Superscript® II Reverse Transcriptase, conc.200U/μL, Life technologies). Questo enzima è infatti in grado di sintetizzare un filamento di DNA con sequenza complementare a uno stampo di RNA. Si tratta quindi di una DNA-polimerasi RNA-dipendente che porta alla formazione di complementary DNA (cDNA). I campioni sono stati preparati come qui indicato:

| | Stock | Campioni | No RT | No RNA |
|------------------------------------|---------|----------|-------|--------|
| RNA | | 8μL | 8μL | NO |
| dNTPs (Roche) | 10mM | 1μL | 1μL | 1μL |
| Random esameri (Life technologies) | 50ng/μL | 1μL | 1μL | 1μL |
| Volume finale | | 10μL | 10μL | 10μL |

Tabella 2 _ Preparazione dei campioni per la RT-PCR. Nel caso il volume di RNA sia minore di 8μL, viene aggiunta H2O MilliQ fino al raggiungimento dei 10μL totali.

Il No RT e il No RNA rappresentano dei particolari tipi di campione il cui scopo è confermare che il risultato della retrotrascrizione non sia dovuto ad eventuali contaminazioni. Precisamente, nel campione No RT non viene aggiunto l'enzima Superscript® II Reverse Transcriptase mentre quello No RNA risulta appunto privo di RNA.

Al fine di denaturarli, questi campioni vengono poi incubati per 5min a 65° C e quindi raffreddati in ghiaccio per 1min. A ciascuno dei campioni viene successivamente aggiunto 9μL della seguente mix:

| | Stock | Concentrazione finale | Volume |
|--------------------------------------------------------------|---------|-----------------------|------------|
| Buffer 5X FS (Life technologies) | 5X | 1X | 4μL |
| DTT (Life technologies) | 0,1M | 10mM | 2μL |
| H ₂ O MilliQ | | | 2μL |
| RNasi OUT (Life technologies) | 400U/μL | 20U/μL | 1μL |
| Volume da aggiungere al singolo campione da retrotrascrivere | | | 9μL totali |

Tabella 3 _ Mix per la RT-PCR _ i volumi dei componenti di questa mix vengono calcolati considerando un volume finale totale di 20μL. Il volume di 9μL indica il volume di questa mix da aggiungere ai precedenti 10μL di ciascun tipo di campione.

Dopo essere stati incubati per 2min a 25° C, questa mix di reazione viene completata aggiungendo 50U di SuperScript II RT a ciascun campione (escludendo il No RT). Per ricavare cDNA, tutti i campioni affrontano inizialmente un riscaldamento a 25° C per 10min, fatto seguire da un periodo di 50min a 42° C (in cui avviene la sintesi di cDNA) e infine da un ulteriore di 15min a 70° C (in cui si verifica il relativo elongation).

REAL-TIME PCR

Il cDNA ottenuto in seguito alla retrotrascrizione di RNA dei vari campioni è stato sottoposto a Real-Time PCR. Questa tecnica consente di quantificare l'espressione di geni di interesse rapportandola a quella di geni di controllo definiti *housekeeping*. Grazie a questa quantificazione è possibile quindi risalire al livello di espressione del certo gene di interesse all'interno di tipologie cellulari specifiche. L'espressione del gene housekeeping rappresenta perciò il valore di riferimento su cui viene paragonato il valore di espressione di altri geni da analizzare. La scelta di avere come riferimento un gene housekeeping è motivata dal fatto che la loro espressione è ubiquitaria e costante in qualsiasi condizione.

Il gene housekeeping che abbiamo usato come riferimento è l'ipoxantina fosforibosil transferasi (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HPRT), un enzima importante nel metabolismo delle purine e costitutivamente espresso in tutti i tipi cellulari.

Limitatamente alla quantificazione per l' α -actinina, gli esperimenti sono stati eseguiti usando sia HPRT che la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), altro gene housekeeping. Dato che il pattern di espressione per l' α -actinina si è rilevato simile con entrambi questi housekeeping, l'analisi dell'espressione di tutti gli altri geni considerati è stata quantificata utilizzando solo HPRT.

I campioni sottoposti a questo tipo di analisi sono stati preparati in triplo per ogni gene, aggiungendo ad ognuno la seguente mix così composta (una mix per HPRT e un'altra per il gene di interesse):

| | Stock | Concentrazione finale | Volume |
|-----------------------------------------|------------------|-----------------------|-------------------|
| SYBR Premix Ex Taq II (Takara) solution | 2X | 1X | 12,5 μ L |
| Primer forward (Sigma) | 10 μ mol/L * | 500nmol/L | 1,25 μ L |
| Primer reverse (Sigma) | 10 μ mol/L * | 500nmol/L | 1,25 μ L |
| H ₂ O MilliQ | | | 5 μ L |
| Volume finale - campione escluso | | | 20 μ L totali |

Tabella 4 _ Mix per la Real-Time PCR _ singola quantità a cui va aggiunto 5 μ L di cDNA (corrispondente a 50ng totali) [* indica che le soluzioni che noi consideriamo come stock di primers a 10 μ mol/L sono preparati diluendo 1:10 in H₂O MilliQ i primers a 100 μ mol/L ordinati dalla Sigma].

Il SYBR Premix Ex Taq II[®] (Takara) è il tipo di SYBR Green usato per i nostri esperimenti. Si tratta di un colorante che ha la proprietà di intercalarsi alle basi azotate del DNA nella sua condizione a doppio filamento. Essendo un fluorocromo, è in grado di assorbire luce ed emettere fluorescenza nel verde. La sua fluorescenza aumenta notevolmente quando si trova legato alle eliche appaiate di DNA: la quantità della fluorescenza è quindi indice della quantità di DNA amplificato. Con l'aumentare dei cicli di denaturazione e di amplificazione la fluorescenza emessa dal SYBR Green aumenterà proporzionalmente. Per poter essere rilevata, la fluorescenza emessa deve però superare un valore soglia rappresentato dalla *threshold line*. La curva di emissione di fluorescenza del campione mostra un andamento di tipo sigmoidale. Il punto in cui questa curva interseca la soglia, viene chiamato *ciclo threshold* (C_T). A partire da questo ciclo di amplificazione, la curva assume un andamento di tipo esponenziale ed il segnale di fluorescenza (diventando rilevabile) permette di effettuare l'analisi comparativa dei dati. La successiva fase (chiamata non esponenziale o di *plateau*) è infine determinata dal consumo dei reagenti e dei primers, indicando quindi l'esaurimento della reazione di amplificazione.

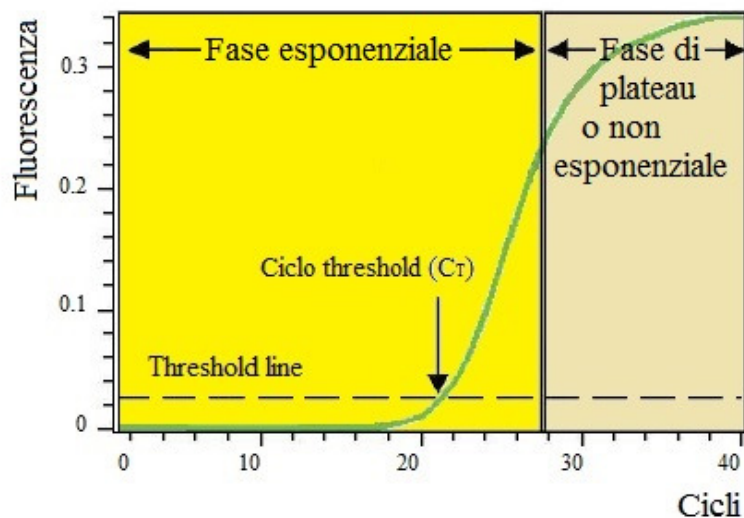


Figura 28 _ Illustrazione della curva di emissione di fluorescenza derivante dalla Real-Time PCR.

Per l'amplificazione dei geni d'interesse sono stati disegnati primers specifici, indicati nella tabella 5.

| Gene | Nome | Numero di accesso | Primer forward | Primer reverse |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
| α -actinina | Actina, alfa, cardiaca 1 (Actc1) | NM_009608.3 | gcttcgctgtccagaga | atgccagcagattccatacc |
| CaV1.3 | Canale di calcio, voltaggio-dipendente, tipo L, subunità alfa 1D (Cacna1d) | NM_028981.2 | ggtgtaagtgcggtagaagca | ctggctcctctgcatagttt |
| CaV3.1 | Canale di calcio, voltaggio-dipendente Tipo T, subunità alfa 1G (Cacna1g) | NM_009783.2 | taacctgctgtgcaccatt | actcgtatctcccgtttgc |
| CaV3.2 | Canale di calcio, voltaggio-dipendente, Tipo T, subunità alfa 1H (Cacna1h) | NM_021415.4 | cctgctggacactgtggtt | ggagcatgaaaagaagaccaa |
| CD166 | Activated leukocyte cell adhesion molecule (alcam) | NM_009655.2 | cttcagtgtttgggaatgg | ttatgccttcaggctgtcct |
| cTnI | Troponina I, cardiaca 3 (Tnni3) | NM_009406.3 | gcaggtgagaagaggagaca | cgatattctgcccagtc |
| Cx 30.2 | Proteina gap junction, delta 3 (Gjd3) | NM_178596.2 | cactaccgcttctgctctt | tgagtagatgacgaacagca |
| Cx43 | Proteina gap junction, alfa 1 (Gja1) | NM_010288.3 | ttctttgactcagcctcca | ccatgctcggcactctt |
| Cx 45 | Proteina gap junction, gamma 1 (Gjc1) | NM_008122.3 | gggtaacaggagttctggtga | ctagcaggcagtcaggaag |
| GATA-4 | Fattore trascrizionale GATA-4 | NM_008092.3 | ggaagacacccaatctcg | catgccccacaattgac |
| HCN1 | Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel 1 | NM_010408.2 | ggcgaggtcataggtcatgt | cgcttcaagggtaatcaga |
| HCN2 | Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel 2 | NM_008226.2 | caagggcagcccgaac | gtgccccctcatc |
| HCN4 | Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel 4 | NM_001081192.1 | ccatcaatggcatggtga | ccttgaagagggcgtagga |
| HPRT | Ipxantina guanina fosfonbosil transferasi 1 | NM_013556.2 | gcagtagacccccaaaatgg | ggtcctttcaccagcaagct |
| Isl1 | Fattore trascrizionale ISL1, LIM/homeodomain (Isl1) | NM_021459.4 | agcaaccaacgacaaaact | ccatcatgtctctccgact |
| Kir3.1 | Canale rettificante entrante del potassio, subfamiglia J, membro 3 (Kcnj3) | NM_008426.1 | gaacagttcgaggtgtcgtc | gaacagttcgaggtgtcgtc |
| Kv4.2 | Canale voltaggio-dipendente del potassio, famiglia shal-related, membro 2 (Kcnd2) | NM_019697.3 | tgggctactgagcaaccag | tgatccagattgcttatgaa |
| Mef2c | Myocyte enhancer factor 2C | NM_025282.2 | tctgccctcagtcagttgg | ctggtgtgttgggtat |
| MyoD | Myogenic differentiation 1 | NM_010866.2 | cgacaccgctactacagtg | tatgctgacagggcagtcg |
| Nanog | Homeobox transcription factor Nanog | NM_028016.2 | ttcttgettacaagggtctgc | agaggaagggcaggagaga |
| Nkx2.5 | NK2 transcription factor related, locus 5 | NM_008700.2 | gacgtagcctgtgtctcg | gtgtggaatccgtcgaagt |
| Oct4 | POU domain, class 5, transcription factor 1 (Pou5f1) | NM_013633.2 | gttgagaaggtggaaccaa | ctctctgtcagggccttc |
| Rex-1 | Proteina 42, zinc finger, Zfp42 | NM_009556 | cagcagctcctgcacacaga | gggcactgatccgaaac |
| Shox2 | Short stature homeobox protein 2 | NM_013665.1 | aacgtaggtccttaaggatc | gaaaggacaagggcgtcac |
| ssTnI | Troponina I, scheletrica lenta 1 (Tnni1) | NM_021467.5 | tgaagaaagaaagacagaaaag | gccagacatagcctcaca |
| Syp | Sinaptofisina | NM_009305.2 | ctggcagacatggacgtg | ctgaccaccgggaactg |
| Tbx3 | Fattore trascrizionale T-box TBX3 (T-box protein 3) | NM_190852.1 | ttgcaaaagggttttcgagac | tgcaggtgtagctcctct |
| Tbx18 | Fattore trascrizionale T-box TBX18 (T-box protein 18) | NM_023814.4 | ccgagactctggagggaac | tgatggcctcagaatgc |
| Ttr | Transtiretina | NM_013697.4 | catgaattcgggatgtg | gatggttagtgccgatgg |
| Myh6 | Catena pesante dell'alfa miosina cardiaca | NM_010856.4 | tgctcagagctcaagaagat | cccagccatctcctctgta |
| Mlc2v | Catena leggera della miosina 2v | NM_010861.3 | ggacacatttctgccta | atcgtgaggaacacgggtga |

Tabella 5 _ Primers usati nelle analisi di Real-Time PCR.

Per ogni campione sono stati analizzati 50ng di templatato (cDNA). I campioni sono stati preliminarmente sottoposti ad uno step a 50° C per 2 minuti al fine di eliminare gli eteroduplex di RNA. Dopo uno step a 95° C per 20 secondi, sono stati eseguiti 50 cicli di PCR composti dai seguenti passaggi:

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

Alla fine di questi cicli è sempre stata eseguita l'analisi della melting curve (60° C to 96° C) con lo scopo di verificare la presenza di un singolo amplicone. Al termine della reazione, i risultati sono stati analizzati per mezzo del software Line-Gene (Bioer). Il CT medio (mean cycle threshold, mean

CT) del gene di interesse è stato normalizzato al CT medio del gene housekeeping. Per normalizzare i risultati, sono stati calcolati i valori del ΔCT : $\Delta CT = CT_{(target)} - CT_{(reference)}$ dove per *target* si intende il gene d'interesse, mentre per *reference* il gene housekeeping. Infine, per paragonare i dati riguardanti l'espressione del gene di interesse abbiamo rapportato i valori ottenuti come $2^{-\Delta CT} * 100$.

ALLESTIMENTO DELLE CO-COLTURE CON MIOCITI VENTRICOLARI NEONATALI DI RATTO

I cardiomiociti neonatali di ratto sono stati isolati come già fatto precedentemente nel nostro laboratorio [171]. Questa procedura (utilizzata appunto per recuperare cardiomiociti neonatali) risulta conforme alle linee guida per la cura e l'utilizzo degli animali da laboratorio come stabilito dallo Stato Italiano (D.L. 116/1992) e dalle Direttive Europee (86/609/CEE). Questo protocollo (come altri che prevedono la manipolazione di animali) è stato controllato e approvato sia dal Comitato di Revisione Istituzionale dei Dipartimenti Biologici dell'Università degli Studi di Milano che dal Ministro italiano della Salute.

Dopo aver rimosso rapidamente i cuori da ratti nati da 2 giorni, i relativi ventricoli sono stati isolati e posti in PBS. Una volta rimossa questa soluzione fisiologica e tritato queste porzioni cardiache, il protocollo prevede di aggiungere la soluzione con cui vengono eseguite le cinque digestioni enzimatiche consecutive. Queste digestioni tissutali vengono realizzate avvalendosi di una delicata agitazione a 37° C. La soluzione utilizzata (ADS 1X a pH 7.4) è composta da NaCl 116.4mM, KCl 5.4mM, NaH₂PO₄H₂O 1mM, MgSO₄H₂O 0.8mM, Glucosio 5.5mM, HEPES 20mM e dagli enzimi Collagenasi I (136.8 U/ml, Worthington) e pancreatina (0.6 mg/ml, Sigma). La sospensione cellulare così ottenuta viene collocata in gradiente (40.5%, 58.5% in ADS 1X) di Percoll discontinuo (Sigma) e centrifugato a 1750g per 30min a temperatura ambiente. Questo passaggio consente di separare i cardiomiociti ventricolari dalle altre tipologie cellulari presenti nella sospensione. All'interno di questo gradiente, si ricavano così tre livelli in cui superiormente si depositano i fibroblasti, in mezzo i cardiomiociti e più in basso le cellule del sangue. I cardiomiociti recuperati vengono quindi utilizzati per allestire co-culture con le cellule CD166.

Per realizzare questi esperimenti di co-cultura, abbiamo prima lasciato a riaggregare 2.5×10^5 cellule (sia per la sottopopolazione CD166+ che per quella negativa CD166-) in supporti quadrati di silicone (0.03 cm², Ibidi) posizionati in piastre da 35mm. Dopo 4h, questi supporti sono stati rimossi e il medium di coltura è stato cambiato il giorno successivo. Dopo 3-4 giorni, 8×10^5 cardiomiociti ventricolari neonatali di ratto sono stati piastrati in un'area delimitata (usando appositi cilindri) sia sopra alle CD166+ che alle CD166- e sia su un'area distale sgombra di cellule

all'interno della stessa piastra. Questo tipo di inserti sono stati infine rimossi dopo circa 3h. Le colture così allestite vengono infine mantenute in TERRENO DIFFERENZIATIVO per almeno 3-4 giorni prima di iniziare le analisi elettrofisiologiche.

ANALISI ELETTROFISIOLOGICHE

Le analisi elettrofisiologiche sono state condotte su queste sottopopolazioni cellulari fino le 3-4 settimane in coltura. Queste piastre sono state quindi posizionate in un locatore di un microscopio invertito e mantenute in questa sede a una temperatura di $36^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C. Le misure dei relativi potenziali d'azione sono state effettuate perfondendo con Tyrode le piastre. Questa soluzione fisiologica extracellulare di controllo a pH 7.4 contiene NaCl 140mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 1.8mM, MgCl₂ 1mM, D-glucosio 5.5mM e Hepes-NaOH 5mM. Le pipette di vetro borosilicato (usate per questo tipo di analisi) presentano una resistenza compresa tra i 3 e i 6 M Ω , in quanto riempite con una soluzione a pH 7.2 simile a quella intracellulare contenente K-aspartato 130mM, NaCl 10mM, EGTA-KOH 5mM, CaCl₂ 2mM; MgCl₂, 2mM; ATP (*sale di Na⁺*) 2mM; creatina fosfato 5mM; GTP (*sale di Na⁺*) 0.1mM; Hepes-KOH 10mM. Per la registrazione dell'attività spontanea è stata usata la configurazione whole-cell nella modalità current-clamp. L'aggiunta nella soluzione Tyrode di isoproterenolo (Iso) e acetilcolina (ACh) (Sigma) a concentrazioni specifiche (Iso 1 μ M e ACh 0.1 μ M, e in momenti differenti) ha permesso di valutare la differente modulazione nella frequenza di scarica dei potenziali d'azione e della corrente I_f da parte dei mediatori autonomici. Le registrazioni voltage-clamp sono state fatte impiegando solo singole cellule. Per le misure della corrente pacemaker è stato utilizzato Tyrode al quale sono stati addizionati BaCl₂ (1mM) e MnCl₂ (2mM) in modo da bloccare eventuali correnti contaminanti rispettivamente di potassio e calcio ed aumentare così la risoluzione della corrente pacemaker.

Per registrare la I_f , sono stati applicati test steps in un intervallo compreso tra i -125 e i -45mV.

Ciascuno test step è stato abbastanza lungo da permettere il raggiungimento dell'attivazione della corrente a steady-state. Le curve di attivazione sono state ottenute da correnti di coda normalizzate misurate a -125mV e fittate secondo la distribuzione di Boltzmann:

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

in cui V rappresenta il voltaggio, y l'attivazione frazionale, $V_{1/2}$ il voltaggio di mezza attivazione e s il fattore di inversione della pendenza.

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 DI IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza è una tecnica di indagine molecolare che utilizza anticorpi rivolti contro un particolare antigene proteico. Consente perciò di valutare l'eventuale presenza di proteine di interesse e la loro localizzazione.

Per le analisi di immunofluorescenza si utilizzano anticorpi coniugati a fluorocromi. In questo modo, le proteine di interesse vengono facilmente rilevate dall'osservatore.

Esistono principalmente due metodi di marcatura del campione con anticorpi: il metodo diretto e quello indiretto. Il metodo diretto prevede l'utilizzo di un anticorpo a cui è direttamente coniugato un fluorocromo. Nel secondo metodo vengono invece utilizzati due tipi di anticorpi diversi. L'anticorpo che riconosce la proteina di interesse viene detto primario, mentre quello diretto contro l'anticorpo primario viene definito secondario ed è coniugato ad un fluorocromo. Nel metodo indiretto più molecole di anticorpo secondario (e quindi più fluorocromi) legano diversi epitopi dell'anticorpo primario, portando così a un maggiore numero di fluorocromi presenti e quindi a una più forte fluorescenza. Per le analisi di immunofluorescenza abbiamo utilizzato il metodo indiretto.

Il protocollo utilizzato prevede di sciacquare inizialmente con PBS le piastrine (a cui è stato precedentemente tolto il medium). Tutte le cellule devono essere poi fissate in paraformaldeide al 4% (*peso/volume*) per 30min in ghiaccio con lo scopo di proteggere il campione da danni osmotici e conservarne inalterata la struttura. Impedendone la sua solubilizzazione, questo trattamento rende quindi l'antigene accessibile all'anticorpo primario. Al fine di saturare tutti i siti della paraformaldeide, bisogna poi sciacquare le cellule in PBS con glicina 0.1M per due volte nei 20min successivi. Dovendo analizzare anche la presenza di antigeni intracellulari, bisogna quindi lasciare per 30min il campione in presenza di una soluzione di permeabilizzazione e blocco. La relativa composizione prevede Triton X-100 (Sigma) allo 0.3% (*volume/volume*), albumina da siero bovino (Bovine Serum Albumine, BSA; Sigma) 1% (*p/v*) e siero (*della specie animale in cui è stato fatto l'anticorpo secondario*; Sigma) al 10% (*v/v*) sciolti in PBS. Nello specifico il Triton è un detergente che permeabilizza la membrana plasmatica e ne riduce i siti idrofobici presenti, mentre l'impiego dell'albumina consente di saturare eventuali cariche aspecifiche. A questo punto, le cellule vengono quindi incubate durante la notte a 4° C con l'anticorpo primario in PBS con Triton X-100 0.3% (*v/v*) e BSA 1% e siero (*dell'animale in cui è stato fatto l'anticorpo secondario*) 2%. Gli anticorpi primari che abbiamo utilizzato per questi esperimenti sono mostrati nella tabella 6.

| ANTICORPI PRIMARI utilizzati e relative diluizioni | | | | |
|----------------------------------------------------|-------------|-------------|----------------------|-------------------|
| Nome anticorpo | Prodotto in | Tipo | Concentrazione d'uso | Ditta produttrice |
| anti- α -actinina (sarcomerica) | topo | monoclonale | 1 a 700 | Sigma |
| anti-caveolina 3 | topo | monoclonale | 1 a 500 | BD Biosciences |
| anti-HCN1 | coniglio | policlonale | 1 a 100 | Alomone labs |
| anti-HCN2 | coniglio | policlonale | 1 a 100 | Alomone labs |
| anti-HCN4 | coniglio | policlonale | 1 a 100 | Alomone labs |
| anti- β 1 adrenergico (recettore) | coniglio | policlonale | 1 a 50 | Santa Cruz |
| anti- β 2 adrenergico (recettore) | coniglio | policlonale | 1 a 50 | Santa Cruz |
| anti-M2 muscarinico (recettore) | coniglio | policlonale | 1 a 200 | Santa Cruz |
| anti-GFP | pollo | policlonale | 1 a 1500 | Abcam |

Tabella 6 _ Anticorpi primari utilizzati e relative diluizioni. Tutti gli anticorpi mostrati in questa tabella reagiscono contro specifici antigeni delle proteine menzionate espresse nella specie topo (*mus musculus*).

La mattina successiva questi campioni vengono prima sciacquati con PBS e poi incubati per 1h con l'anticorpo secondario coniugato all'appropriato fluoroforo in una soluzione di PBS con Triton X-100 0.3%, BSA 1% e siero (*dell'animale a cui appartiene l'anticorpo secondario usato*) 2%. Gli anticorpi secondari che abbiamo impiegato sono elencati nella tabella 7.

| ANTICORPI SECONDARI utilizzati e relative diluizioni | | | | |
|------------------------------------------------------|-------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| Nome anticorpo | Prodotto in | Fluorocromo coniugato | Concentrazione d'uso | Ditta produttrice |
| anti-mouse | asino | Alexa488 | 1 a 1000 | Molecular Probes |
| anti-rabbit | asino | Alexa594 | 1 a 1000 | Molecular Probes |
| anti-chicken | capra | Alexa488 | 1 a 1000 | Molecular Probes |
| anti-rabbit | capra | Alexa405 | 1 a 500 | Molecular Probes |

Tabella 7 _ Anticorpi secondari utilizzati e relative diluizioni. Tutti gli anticorpi mostrati in questa tabella riconoscono specifici epitopi degli anticorpi primari mostrati nella precedente tabella.

Dopo un lavaggio finale in PBS, ci si occupa dell'allestimento dei campioni montando prima il Vectashield mounting medium (con o senza 4',6-diamidin-2-fenilindolo, DAPI) (Vector) e poi posizionando gli appositi vetrini coprioggetto. Le relative immagini sono state quindi acquisite utilizzando il microscopio Video Confocale (ViCo, Nikon). La proporzione di cellule esprimenti α -actinina sarcomerica e/o HCN4 è stata calcolata come rapporto tra il numero di cellule positive e il numero totale di nuclei visibili in ciascuna immagine. Per ciascun giorno preso in considerazione, abbiamo analizzato tre o più campi da almeno due differenti esperimenti.

BrdU STAINING

Questa tipologia di saggio colorimetrico quantitativo permette di analizzare in generale il potenziale proliferativo cellulare, sfruttando la capacità del nucleotide 5-Bromo-2'-deossiridina (5-Bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) di legarsi al DNA durante la fase replicativa. Poiché la proliferazione cellulare richiede la replicazione del DNA, il monitoraggio della sua sintesi rappresenta un parametro

indiretto per valutare la proliferazione del certo campione. La BrdU è un analogo pirimidinico in grado di intercalarsi al posto della timidina nel DNA durante la fase mitotica. Dopo l'incorporazione nel DNA delle cellule del campione, la BrdU viene quindi rilevata mediante analisi di immunofluorescenza.

Per questo motivo abbiamo deciso di impiegare tale tecnica per analizzare la differenza nella proliferazione cellulare tra la sottopopolazione CD166+ e le mESCs.

Le cellule CD166+ (dopo 24 e 48h dalla loro separazione al citofluorimetro, sorting) e le mESCs sono state incubate per 1h nel loro medium di coltura con 50µmol/L di BrdU (Sigma) in incubatore con il 5% di CO₂ a 37° C.

Le cellule sono state poi sciacquate due volte in PBS e fissate con etanolo 95% e acido acetico 5% per 20min a temperatura ambiente. I passaggi successivi hanno previsto inizialmente di sciacquarle una volta con HCl 1.5mol/L per 10min, risciacquarle altre due volte in PBS, permeabilizzarle con una soluzione di PBS con Triton X-100 0.25% per 5min fino ad incubarle con l'anticorpo primario mouse anti-Bromo-deoxyuridine (clone BU-1, GE Healthcare) per 1h at 4° C. Dopo ulteriori lavaggi in PBS, questi campioni sono stati successivamente lasciati in Triton X-100 0.25% per 5min e incubati con l'anticorpo secondario donkey anti-mouse Alexa488 per 40min al buio sempre a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio finale in PBS, abbiamo allestito i vetrini utilizzando Vectashield mounting medium con DAPI (Vector). Il grado di proliferazione è stato valutato contando la proporzione delle cellule BrdU-positive sul totale riscontrata in diversi campi acquisiti tramite microscopia (più di 9 campi da 3 differenti esperimenti).

MICROSCOPIO VIDEO-CONFOCALE (ViCo)

Per l'acquisizione delle immagini è stato usato un microscopio ottico Video-Confocale (ViCo, Nikon) ed il relativo software Image-Pro Plus 6.0.

Questo sistema si basa su una tecnica denominata Microscopia Video-Confocale (VCM). Una delle sue proprietà più importanti è la modalità di illuminazione multi-puntuale contrapposta a quella dei microscopi confocali basati invece su metodi di illuminazione mono-puntuale e quindi necessariamente legati all'uso di sorgenti laser. ViCo è un nuovo tipo di microscopio ottico che riassume in sé le capacità operative tipiche del microscopio ottico convenzionale, di quello assistito da telecamera e di quello confocale.

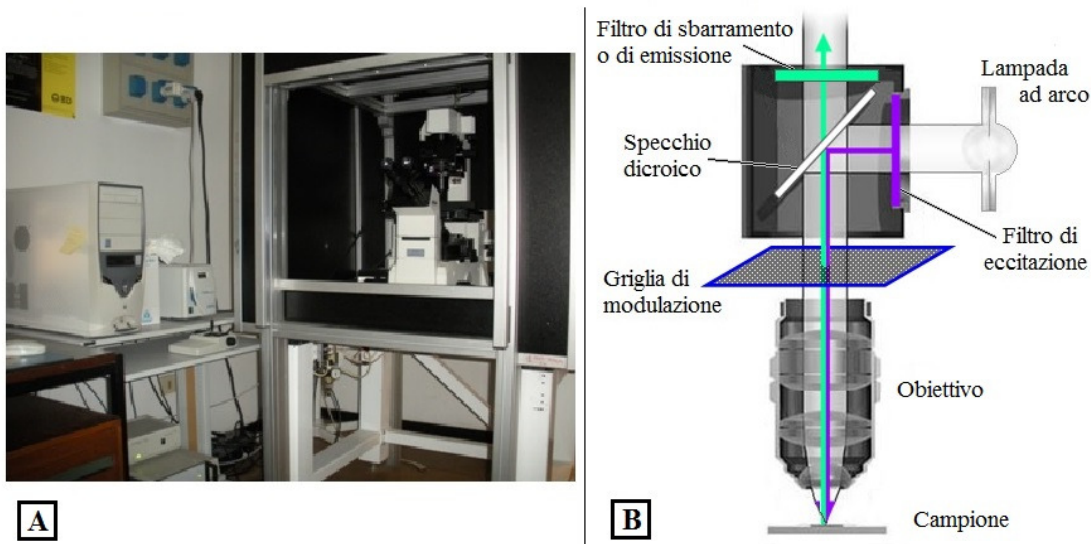


Figura 29 _ Microscopio Video Confocale (ViCo). (A) Postazione ViCo presente nel nostro laboratorio. (B) Percorso delle radiazioni luminose dal blocchetto dei filtri al campione (freccia viola) e dal campione oltre il blocchetto (freccia verde acqua).

Il tipo di sorgente luminosa convenzionalmente utilizzata è una lampada ad arco Xenon, che permette così di ridurre i costi di acquisizione e gestione derivanti dall'uso di una fonte laser.

Questa lampada emette luce bianca, costituita quindi da tutte le lunghezze d'onda (λ). Prima di raggiungere il campione, la radiazione luminosa viene convogliata nel *blocchetto dei filtri* dove il *filtro di eccitazione* (posto al relativo ingresso) consente di selezionare solo una ristretta gamma di lunghezze d'onda di interesse della luce bianca. La gamma selezionata viene poi riflessa da uno *specchio dicroico* (filtro di vetro ricoperto da un sottilissimo film di alluminio o fluoruro di calcio o fluoruro di magnesio) che riflette i raggi con una certa lunghezza d'onda e ne lascia passare inalterati quelli con lunghezza d'onda maggiore. La radiazione luminosa selezionata viene così convogliata sul campione ed eccita i fluorocromi presenti. La fluorescenza che ne scaturisce ritorna nel blocco dei filtri e attraversa liberamente lo *specchio dicroico* per passare infine dal *filtro di emissione* (o *filtro di sbarramento*) che seleziona un ristretto range di lunghezze d'onda emesse in seguito all'eccitazione dei fluorocromi. Questa radiazione luminosa viene poi raccolta dagli oculari o dal sensore di immagini CCD.

Nel nostro microscopio è possibile selezionare tramite il software tre diversi canali con cui analizzare il campione e a cui sono collegati tre combinazioni di filtri per l'eccitazione a 345nm, a 495nm e a 547nm. Ogni canale è quindi dedicato ad eccitare un fluorocromo specifico e a selezionare la fluorescenza emessa evitando interferenze.

Un'altra caratteristica importante della VCM è la presenza di una *griglia per la modulazione spaziale del fascio di luce*, posta lungo il cammino ottico di illuminazione tra il filtro di eccitazione e il campione. Questo dispositivo accompagna spazialmente il fascio di luce sul campione

realizzando così l'illuminazione multi-puntuale e a campo-ristretto. La griglia, costituita da tanti fori di uguali dimensioni, ha lo scopo di dividere la radiazione luminosa in tanti fasci il più possibile unidirezionali in modo che questi raggiungano il campione perpendicolarmente. Una luce unidirezionale garantisce una maggiore qualità dell'immagine e la presenza della griglia infatti tenta di rendere la luce incidente proveniente dalla lampada simile a quella di un raggio laser.

La griglia è motorizzata ed è in grado di spostarsi nello spazio lungo le tre dimensioni (x , y e z). Lo spostamento della griglia lungo gli *assi* x e y è necessario in quanto va a suddividere il campione in tante cellette che lasciano passare la radiazione luminosa solo attraverso i fori. Per ottenere un'immagine completa, tutta l'area di interesse del campione deve essere colpita dalla luce di eccitazione. Ciò avviene grazie allo spostamento della griglia di un numero di passaggi (*steps*) forniti dallo sperimentatore tramite il software.

Lo spostamento della griglia lungo l'*asse* z consente invece di acquisire diverse sezioni lungo lo spessore del campione dopo aver impostato grazie al software un piano focale di inizio e uno di fine. Tra questi riferimenti il software calcola due parametri: il numero di sezioni e il loro spessore. È possibile scegliere anche tra vari modelli di griglie con grandezza e interasse dei fori diversi in base alle esigenze e alle caratteristiche del campione.

Prima di acquisire un'immagine è necessario impostare anche i valori di altri parametri come integrazione, guadagno e offset che riguardano il sistema di rilevamento del segnale (CCD). L'integrazione è il tempo in cui la telecamera rimane aperta per captare la fluorescenza del campione durante uno step della griglia; più è intenso il segnale della fluorescenza più l'integrazione sarà bassa. Gain e offset invece regolano rispettivamente il guadagno e il contrasto della camera prima della conversione del segnale da analogico a digitale.

Durante l'acquisizione, per ogni canale, la griglia esegue il numero di spostamenti lungo l'asse x e y forniti dallo sperimentatore, e ciò viene ripetuto per ogni sezione impostata del campione. Il programma di acquisizione elabora tutta la serie di immagini che la telecamera ha raccolto fornendo un unico output che mostra le diverse sezioni del campione prese in esame.

STATISTICA

Le differenze statistiche sono state valutate mediante il test ANOVA a una via, seguito da test esatto di Fisher per la valutazione della significatività, o mediante il test t di Student per popolazioni indipendenti. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $P=0.05$.

I PRECURSORI EMBRIONALI STAMINALI CD166+ DIFFERENZIANO IN CELLULE DI TIPO “SINOATRIAL-LIKE” PIENAMENTE FUNZIONALI

La separazione al citofluorimetro (sorting) di mESCs in base all'espressione per l'antigene CD166 (CD166+) consente di selezionare al giorno di differenziamento 8 (giorno 7+1 del nostro protocollo) una popolazione di precursori pacemaker. Queste cellule CD166+ esprimono non solo alti livelli di geni coinvolti sia nello sviluppo del NSA (Tbx18, Tbx3, Isl1, Shox2) che nel suo corretto funzionamento (Cx30.2, HCN4, HCN1, CaV1.3), ma anche bassi livelli di geni ventricolari (Cx43, Kv4.2, HCN2, Nkx2.5). Messe in coltura, le CD166+ sono in grado di formare sincizi autoritmici in cui queste cellule risultano essere non solo morfologicamente simili ai miociti senoatriali murini ma anche dotate delle stesse proprietà elettrofisiologiche. La somministrazione di agonisti autonomici (isoproterenolo e acetilcolina) permette di modulare la loro frequenza di battito in quanto provviste sia dei recettori β -adrenergici che di quelli muscarinici. Nelle co-culture allestite, le cellule CD166+ sono in grado di imporre il proprio ritmo (a velocità maggiore) su quello dei miociti ventricolari neonatali di ratto.

A dimostrazione del loro fenotipo maturo, le CD166+ hanno inoltre perso l'espressione dei geni legati alla pluripotenza e non formano teratomi in vivo nell'animale.

Grazie ai risultati ottenuti, abbiamo perciò dimostrato per la prima volta come isolare una popolazione non teratogena di precursori cardiaci che maturando sono in grado di formare un tessuto pienamente funzionale del tutto simile al nodo senoatriale (NSA).

COESPRESSIONE DI HCN4 E CD166 DURANTE LO SVILUPPO CARDIACO

Finora CD166 è l'unico marcatore individuato anche nel seno venoso, il futuro NSA [163, 164]. In questi anni è stato valutato il pattern di espressione di CD166 durante lo sviluppo sia del sistema di conduzione cardiaco che del NSA di topo, regioni cardiache identificate dall'espressione del canale pacemaker HCN [172; 173]. Per valutare il pattern espressivo di CD166 e HCN4 durante l'embriogenesi murina, ci siamo avvalsi della collaborazione con il gruppo della Dottoressa Graziella Messina (Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Bioscienze) che ha appunto eseguito analisi di immunofluorescenza sul cuore embrionale di topo in sviluppo. Come mostrato nella Figura 30, durante il giorno E10.5 queste due proteine presentano segnali quasi completamente sovrapposti nei cuori in sviluppo degli embrioni di topo (Figura 30 _ A-B-C).

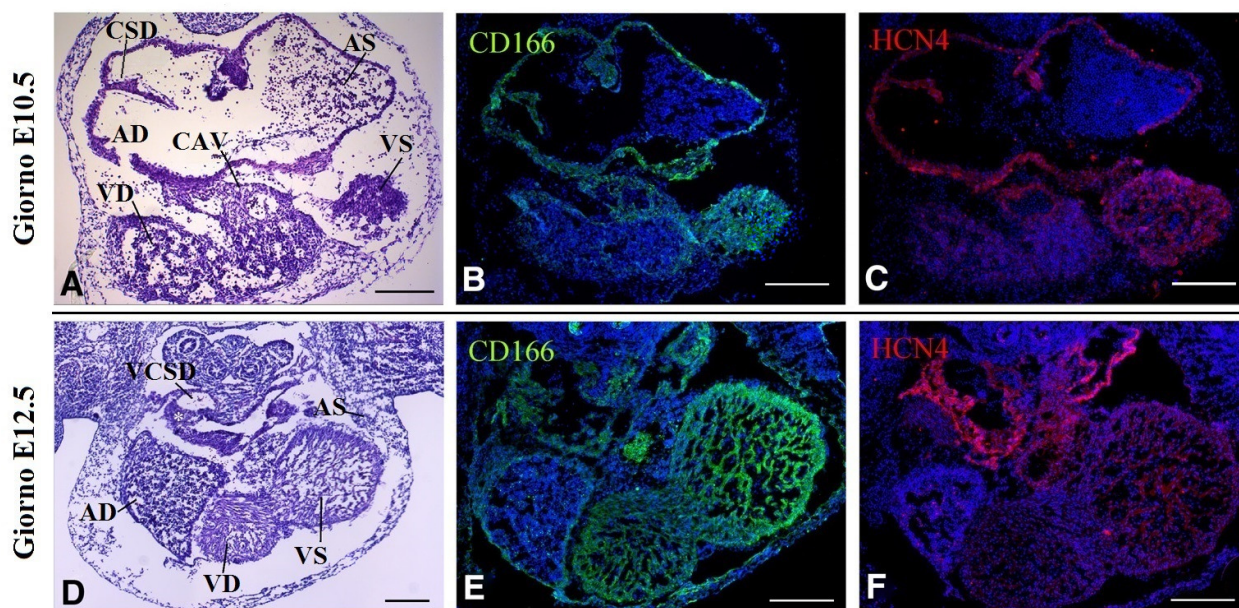


Figura 30 _ Espressione di CD166 nel sistema di conduzione cardiaco in sviluppo. Colorazione in ematossilina ed eosina al giorno E10.5 (A) e al giorno E12.5 (D). Immagini da microscopio confocale di fettine adiacenti al giorno E10.5 (B+C) e al giorno E12.5. (E+F) che mostrano l'espressione di CD166 e HCN4. I nuclei sono stati colorati con 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI). Barra di calibrazione nelle varie immagini: 200μm. Sigle: (A) CSD: corno del seno venoso destro; AS: atrio sinistro; AD: atrio destro; CAV: canale atrioventricolare; VS: ventricolo sinistro; VD: ventricolo destro. (D) VCSD: vena cava superiore destra; AS: atrio sinistro; AD: atrio destro; VD: ventricolo destro; VS: ventricolo sinistro.

Al giorno E12.5, HCN4 e CD166 colocalizzano ancora nella regione che corrisponde al NSA in sviluppo (Figura 30 _ D-E-F), ma come precedentemente riportato in letteratura [163] l'espressione di CD166 si espande diventando più evidente nel ventricolo (Figura 30-E) e in molti organi e tessuti extracardiaci (Figura 31).

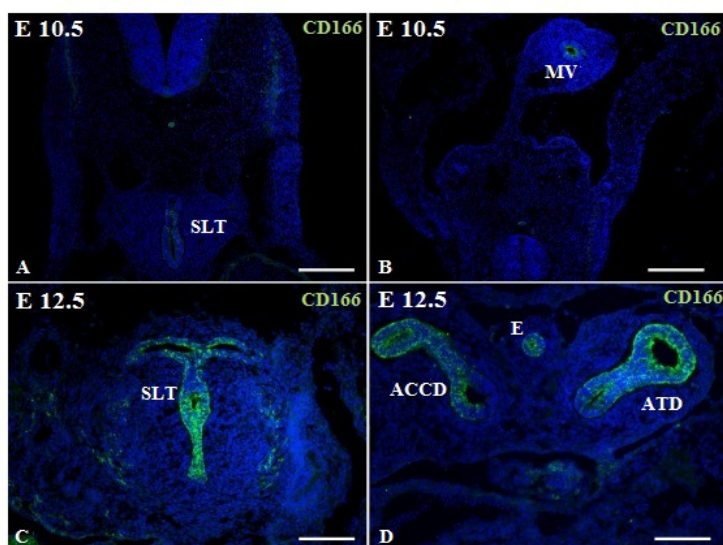


Figura 31 _ Espressione di CD166 in tessuti extracardiaci. Immagini da microscopio confocale di fettine al giorno E10.5 (A + B) e al giorno E12.5 (C + D) di embrioni che mostrano appunto l'espressione di CD166 al di fuori del cuore. Barra di

calibrazione: 200µm. Sigle: (A) SLT: solco laringo-tracheale; MV: medio ventre; E: esofago; ACCD: arteria carotidea comune destra; ATD: aorta toracica discendente.

Questi dati avvalorano quindi l'idea di impiegare CD166 come marcatore per isolare precursori di cellule pacemaker durante gli stadi precoci dello sviluppo embrionale.

CD166 IDENTIFICA LE CELLULE INDIRIZZATE VERSO IL FENOTIPO CARDIACO TRA LE mESCs IN DIFFERENZIAZIONE

Per meglio stabilire quando CD166 identifica specificatamente cellule indirizzate verso un fenotipo cardiaco, abbiamo eseguito vari tentativi. Lo schema comune prevede innanzitutto la dissociazione (a vari momenti di differenziamento) delle cellule da EBs marcandole con anticorpi anti-CD166, la successiva analisi al citofluorimetro (che ha permesso così la loro separazione in sottopopolazioni in base all'espressione di questo antigene di superficie) e infine l'ulteriore analisi di qRT-PCR (quantificando i corrispettivi livelli espressivi di α -actinina sarcomerica). La Figura 32 mostra un grafico a punti in cui il raggruppamento P1 rappresenta la popolazione di cellule vitali ottenute dalla dissociazione di EBs. In base alla positività per l'antigene, questa popolazione P1 è stata quindi suddivisa nei grafici successivi in due sottopopolazioni: CD166-negativa (CD166-; P2) e CD166-positiva (CD166+; P3). Questa suddivisione siamo stati in grado di eseguirla nei vari giorni di differenziamento considerati per l'analisi citofluorimetrica (giorno 6, 8, 10 e 15).

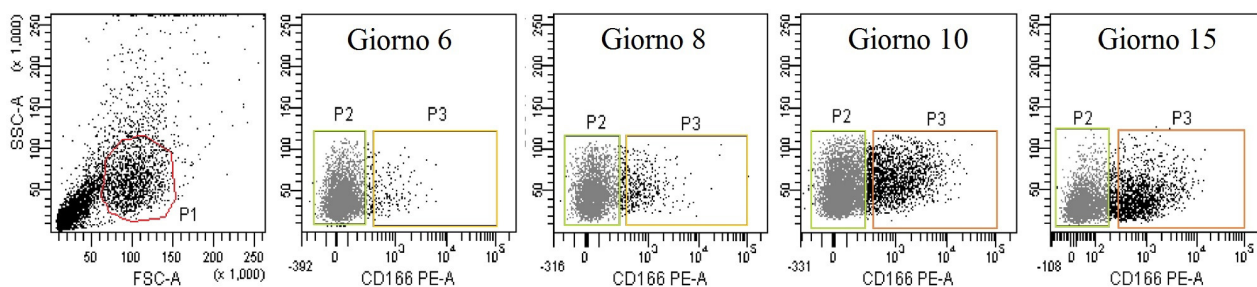


Figura 32 _ Grafici a punti della sottopopolazione CD166- (P2) e di quella CD166+ (P3) ottenute dalle analisi citofluorimetriche di cellule dissociate da EBs (P1) giunti a diversi giorni di differenziamento.

I valori ottenuti limitatamente alla popolazione CD166+ sono stati rispettivamente: $1.4 \pm 1.3\%$ al giorno di differenziamento 6, $12.1 \pm 6.4\%$ al giorno 8, $20.7 \pm 8.1\%$ al giorno 10 e infine $37.3 \pm 9.0\%$ al giorno 15

Dopo la separazione al citofluorimetro (sorting), le analisi di qRT-PCR hanno rivelato livelli di α -actinina più alti nelle CD166+ rispetto a quelli riscontrati nella sottopopolazione negativa sia al giorno 6 che al giorno 8, mentre ai giorni 10 e 15 l'espressione di α -actinina in entrambe le

sottopopolazioni era similmente bassa indicando perciò la perdita di specificità cardiaca (Figura 33).

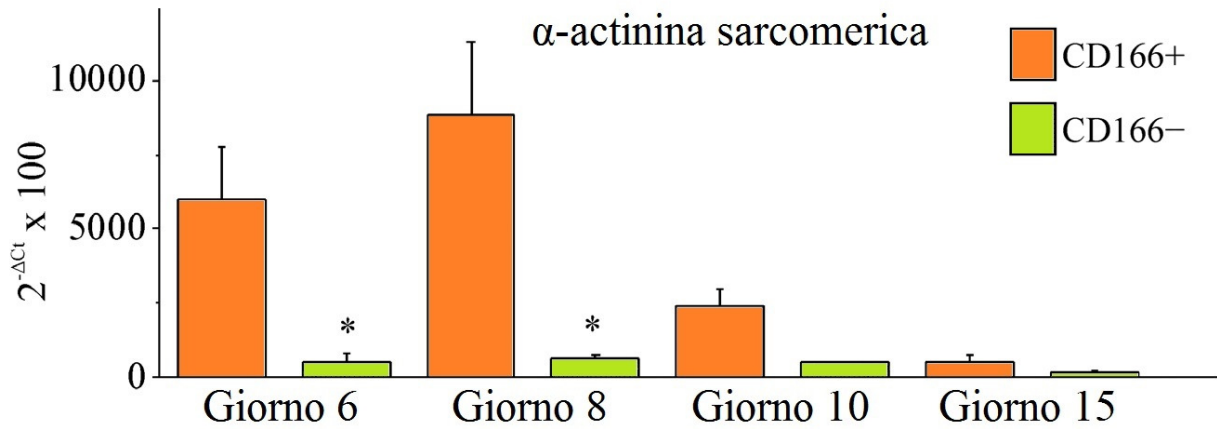


Figura 33 _ qRT-PCR per α -actinina sarcomerica (tipologia cardiaca) in CD166+ (barre arancioni) e in CD166- (barre verdi) a diversi momenti di differenziamento [* indica $P < 0.05$ vs CD166+].

Al fine di trovare il migliore compromesso tra quantità e specificità cardiaca contemporaneamente, abbiamo quindi scelto come utile il giorno 8 ai fini selettivi per le cellule CD166+. Confrontando poi i livelli espressivi di questo antigene sia nelle due sottopopolazioni che nelle mESCs indifferenziate, abbiamo stimato la purezza dei vari campioni ottenuti con questa procedura di sorting. Come ci aspettavamo, soltanto la sottopopolazione positiva ha mostrato alti livelli di espressione per CD166 (Figura 34).

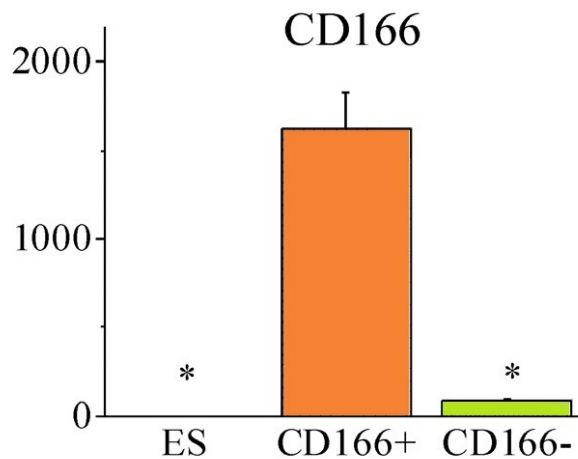


Figura 34 _ qRT-PCR per l'antigene di superficie in mESCs indifferenziate, nella sottopopolazione CD166+ e in quella CD166- al giorno 8 di differenziamento [* indica $P < 0.05$ vs CD166+].

Abbiamo inoltre rilevato che altri marcatori cardiaci (come cTnI, Mef2c e GATA4) risultano essere maggiormente espressi nelle cellule CD166+ rispetto che nella sottopopolazione negativa e nelle mESCs indifferenziate (Figura 35).

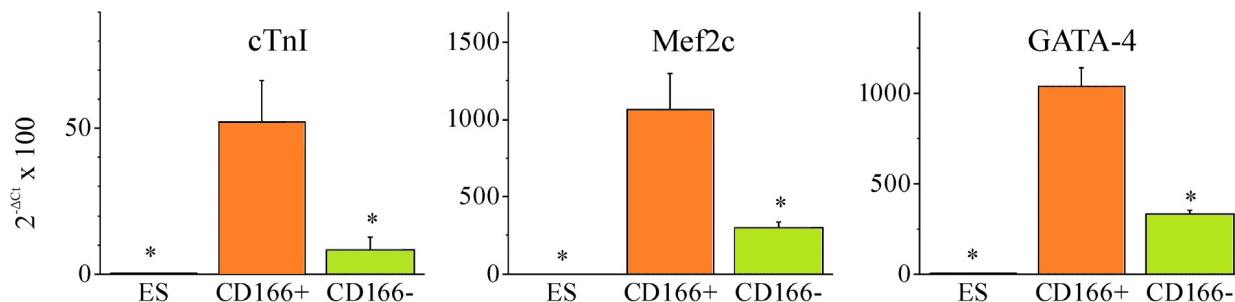


Figura 35 _ qRT-PCR per marcatori cardiaci (geni: cTnI, Mef2c e GATA4) in mESCs indifferenziate, nella sottopopolazione CD166+ e in quella CD166- al giorno 8 di differenziamento [* indica $P < 0.05$ vs CD166+].

Poiché è risaputo che il potenziale di differenziazione cardiaca varia da clone a clone e tra differenti linee di cellule ES [174], abbiamo ripetuto questa modalità di selezione utilizzando la linea cellulare differente: la ES-CGR8. Sia le analisi al citofluorimetro che quella qRT-PCR hanno confermato che al giorno 8, l'espressione di α -actinina sarcomerica nelle cellule CD166+ era 10 volte maggiore di quella rilevata nella sottopopolazione negativa (Figura 36). Queste dimostrazioni hanno perciò indicato l'efficacia della nostra procedura di selezione nell'isolare precursori cardiaci indipendentemente dalla linea cardiaca impiegata.

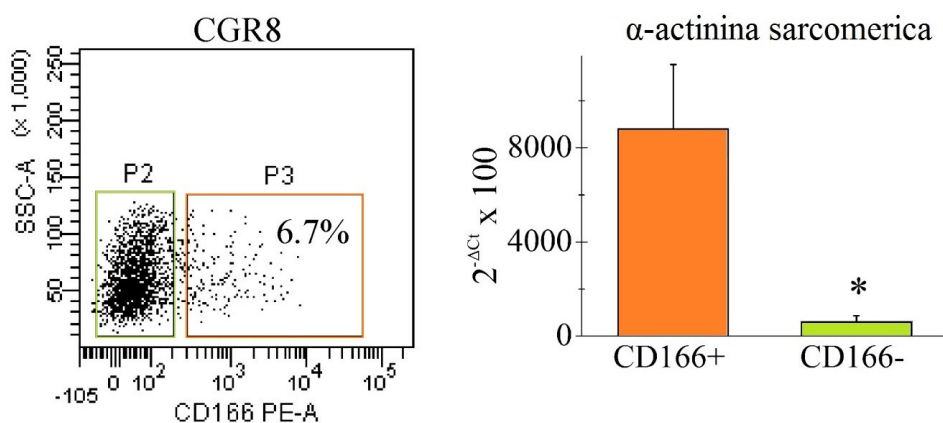


Figura 36 _ Selezione di cellule CD166+ dal differenziamento della linea ES-CGR8. Analisi citofluorimetrica (sulla sinistra) e qRT-PCR per α -actinina sarcomerica in cellule CD166+ e CD166- (sulla destra) derivate dalla dissociazione di EBs (al giorno 8) ottenuti dalla linea ES-CGR8 [* indica $P < 0.05$ vs CD166+].

Per meglio caratterizzare la popolazione CD166, abbiamo quindi eseguito un'analisi citofluorimetrica sulle cellule dissociate da EBs di 8 giorni sfruttando anticorpi coniugati a sonde

fluorescenti. Lo scopo di questa operazione è controllarne l'eventuale espressione di marcatori tipici dei precursori cardiovascolari (flk-1, Sca-1 e c-kit), di cellule mesenchimali (CD44 and CD90) e dei precursori ematopoietici (CD34) [175; 176; 177; 178].

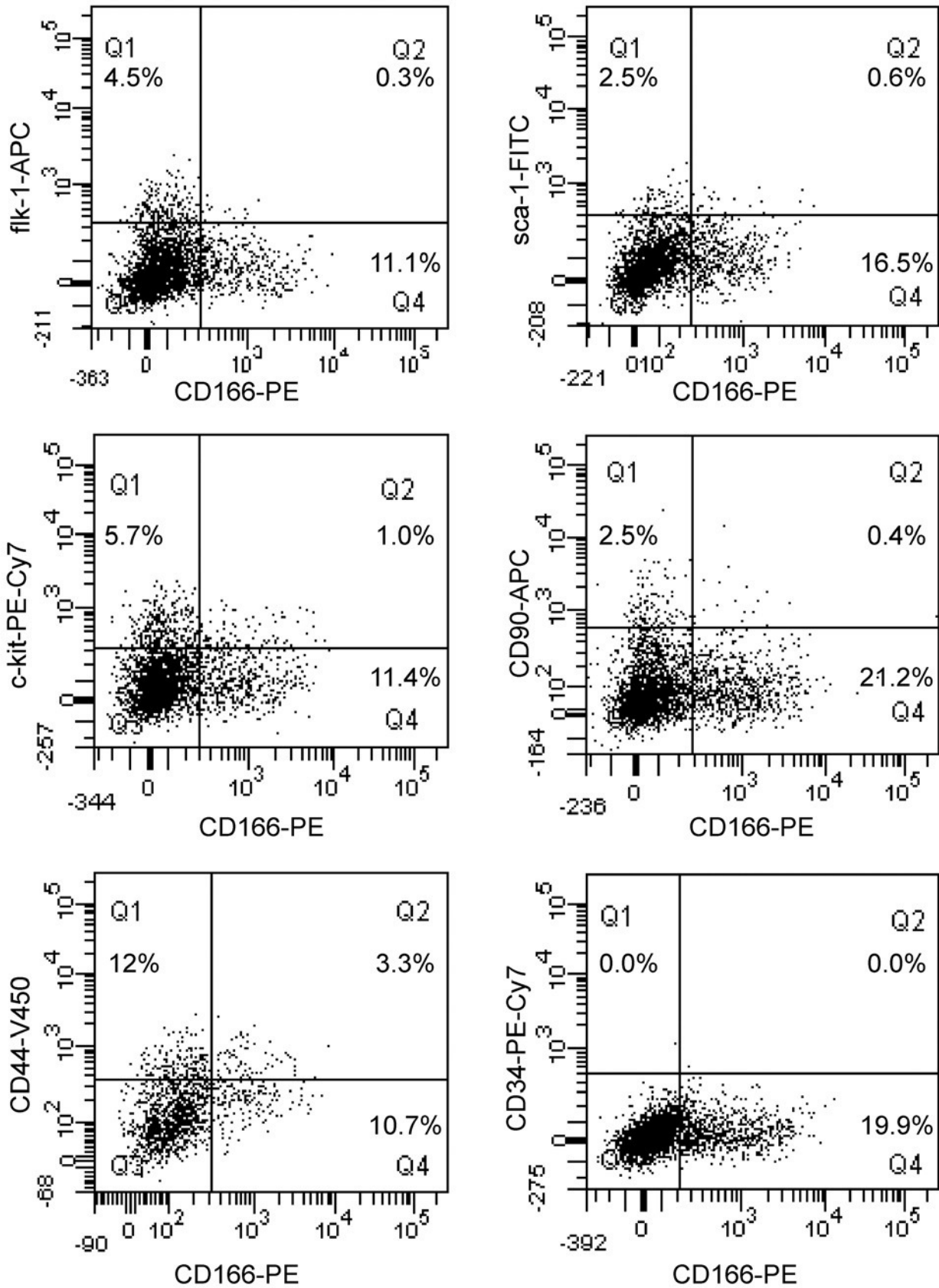


Figura 37 _ Caratterizzazione della popolazione CD166+ tramite citofluorimetria. Grafici a punti in cui è mostrata la proporzione di cellule CD166+ che coesprimono marcatori cardiovascolari (flk-1, Sca-1 e c-kit), mesenchimali (CD90 e CD44) ed ematopoietici (CD34) al giorno 8 di differenziamento. Sigle: APC: alloficocianina; FITC: fluoresceina isotiocianato.

I grafici a punti ottenuti da queste analisi (Figura 37) mostrano che sebbene flk-1, Sca-1 e c-kit siano espressi negli EBs di 8 giorni (quadrante 1), la frazione di cellule coesprimenti CD166 con uno di questi marcatori (quadrante 2) è veramente bassa. Limitatamente ai marcatori mesenchimali, le cellule coesprimenti CD90 sono altrettanto poche, mentre la coespressione con CD44 è comunque bassa ma in proporzione leggermente maggiore. Infine, il marcatore ematopoietico CD34 non viene affatto espresso. In media, i valori percentuali relativi alle sottopopolazioni cellulari doppiamente positive sono stati i seguenti: flk-1+/CD166+ $0.3\pm 0.1\%$; Sca-1+/CD166+ $0.6\pm 0.1\%$; c-kit+/CD166+ $3.7\pm 2.8\%$; CD90+/CD166+ $1.0\pm 0.8\%$; CD44+/CD166+ $6.5\pm 2.3\%$ e CD34+/CD166+ 0% [n=3].

Abbiamo inoltre valutato nelle cellule CD166+ l'espressione di geni specificatamente associati a fenotipo endodermico, ectodermico e mesodermico non-cardiaco. L'analisi qRT-PCR ha rivelato che in questa sottopopolazione i livelli espressivi di sinaptofisina (marcatore ectodermico), transtiretina (marcatore endodermico) e MyoD (marcatore mesodermico tipico del muscolo scheletrico) sono decisamente bassi (Figura 38). Questo risultato conferma ulteriormente che la selezione tramite CD166 permette di riconoscere quindi una popolazione specifica di precursori cardiaci.

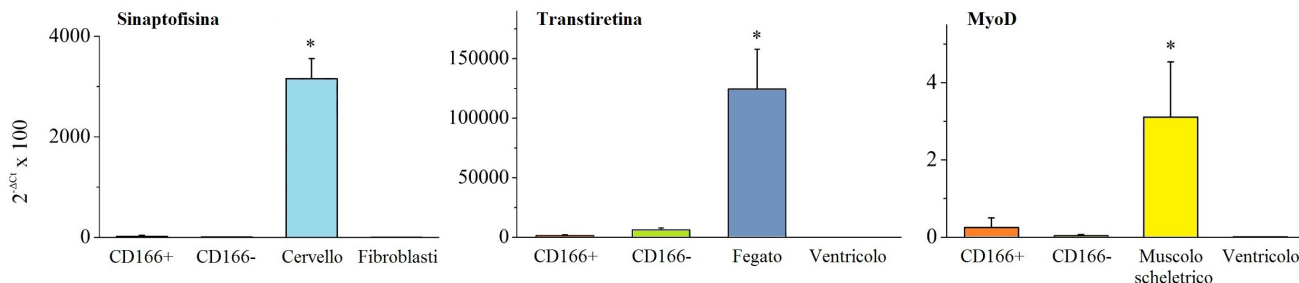


Figura 38 _ Confronto dei livelli espressivi di geni ectodermici, endodermici e mesodermici di tipo non cardiaco sia in cellule CD166+ che in quelle CD166-. Livelli espressivi di sinaptofisina (ectoderma), transtiretina (endoderma) e MyoD (mesoderma di tipo non cardiaco) sia nella sottopopolazione CD166+ che in quella negativa. Cervello, fegato o muscolo scheletrico e fibroblasti o ventricoli sono stati usati rispettivamente come controlli positivi e negativi [* indica $P < 0.05$ versus gli altri gruppi].

LE CELLULE CD166+ ESPRIMONO I GENI TIPICI DEL NSA

Dopo il sorting e le 24h di riaggregazione, la maggior parte degli aggregati derivati da CD166+ iniziavano a battere spontaneamente e hanno continuato a battere fino a circa 4 settimane in coltura. In maniera opposta, negli aggregati derivati da CD166- non abbiamo rilevato alcuna contrazione spontanea. Abbiamo così quantificato la frazione di cellule esprimenti α -actinina e HCN4 a diversi giorni dopo il sorting (giorni: 2, 3 e 4; Figura 39).

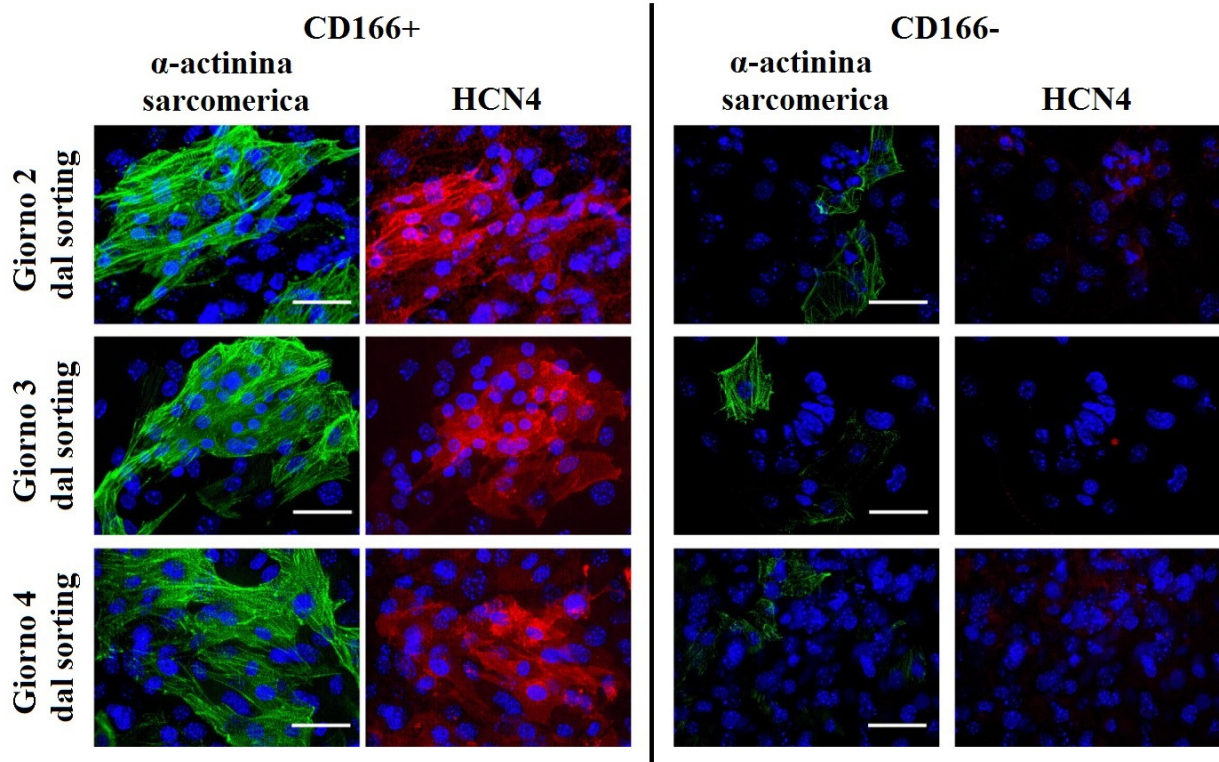


Figura 39 _Espressione di α -actinina sarcomerica e HCN4 in aggregati cellulari sia di tipo CD166+ che di tipo CD166- a diversi giorni in coltura. Immagini confocali di cellule CD166+ e di CD166- fissate il giorno dopo la riaggregazione (Giorno 2) e nei due giorni consecutivi (Giorno 3 e 4). Questi aggregati cellulari sono stati marcati con anticorpi diretti sia contro la proteina cardiaca α -actinina sarcomerica che contro il canale pacemaker HCN4, tipico marcatore senoatriale [124; 173; 179]. I relativi nuclei sono stati colorati con DAPI. Barra di calibrazione: 50 μ m.

Abbiamo così potuto apprezzare che l'espressione di α -actinina varia nelle due sottopopolazioni. Infatti nelle cellule CD166+ si attesta al 82 \pm 5% delle cellule considerate mentre in quelle negative al 16 \pm 1%. Anche per l'espressione di HCN4 è stata individuata un'interessante differenza: nella sottopopolazione positiva è stato appunto registrato un livello espressivo del 83 \pm 1%, decisamente distante dal valore di 8.5 \pm 7.5% riscontrato in quella negativa (tabella 13).

| | α -actinina | | HCN4 | |
|-----------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | CD166+ | CD166- | CD166+ | CD166- |
| Giorno 2 | 77.2 \pm 6.3% (3) | 15.6 \pm 1.3% (4) | 82.1 \pm 8.8%(3) | 16.4 \pm 1.6% (4) |
| Giorno 3 | 84.6 \pm 2% (4) | 16.7 \pm 1.6%(6) | 83.3 \pm 2% (3) | 1.2 \pm 1.2% (5) |
| Giorno 4 | 87.6 \pm 1.7% (11) | 17.3 \pm 7.4% (6) | 84.2 \pm 2.9% (6) | 4.6 \pm 2.6% (6) |

Tabella 8 _ Percentuale delle cellule CD166+ e CD166- che esprimono α -actinina o HCN4. I valori all'interno delle parentesi rappresentano il numero di campi in cui le cellule sono state contate.

Abbiamo poi utilizzato la tecnica della qRT-PCR per confrontare i livelli di mRNA di diversi geni espressi o nel NSA adulto o nei ventricoli con i livelli trovati nelle cellule CD166+ sia a giorni precoci (appena dopo il sorting) che tardivi (dopo 3-4 settimane in coltura) (Figura 40)

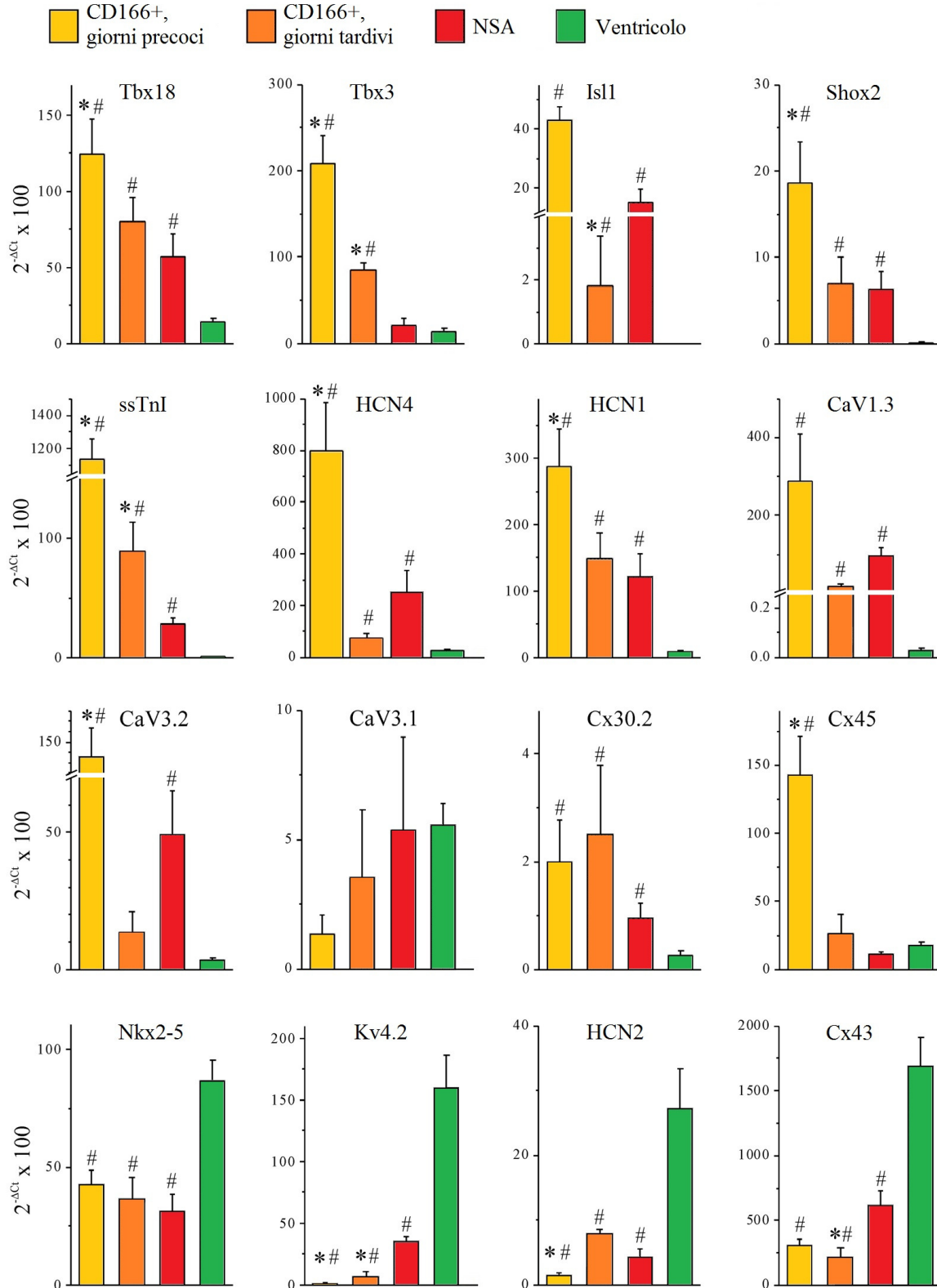


Figura 40 _ Comparazione dell'espressione genica in cellule CD166+ (a giorni sia precoci che tardivi), in cellule del nodo senoatriale (NSA) e del ventricolo. Le analisi di qRT-PCR sono state condotte non solo su fattori trascrizionali (Tbx18, Tbx3, Isl1 e Shox2), proteine strutturali (ssTnI, Cx 30.2 e Cx 45) e canali ionici (HCN4, HCN1, CaV1.3, CaV3.2 e CaV3.1) coinvolti sia nello sviluppo che nel funzionamento del NSA ma anche su geni ventricolari (Nkx2.5, Kv 4.2, HCN2 e Cx43) [* indica P<0.05 vs NSA; # indica P<0.05 vs ventricolo].

Abbiamo prima analizzato l'espressione dei fattori trascrizionali Tbx18, Tbx3, Isl1 e Shox2 importanti per la formazione del NSA [99; 125; 130]. L'espressione di questi geni era alta nelle cellule CD166+ a giorni precoci e, sebbene decrescesse in colture a giorni più tardivi, rimaneva a livelli paragonabili a quelli ritrovati nel NSA e a livelli significativamente più alti di quelli trovati nel ventricolo.

Abbiamo poi quantificato l'espressione genica di diverse proteine e canali ionici essenziali per il funzionamento del NSA [19]. Nelle cellule CD166+ e del NSA la maggior parte di questi geni (ssTnI, HCN4, HCN1 e Cx30.2) sono espressi a livelli significativamente più alti di quelli del ventricolo.

L'espressione del canale di Ca²⁺ di tipo T (CaV3.2) più alta nelle cellule CD166+ a giorni precoci, decresce significativamente a stadi più tardivi; tuttavia questa decrescita è stata accompagnata da un debole aumento dell'isoforma CaV3.1 (altro tipologia del canale di Ca²⁺ di tipo T espressa nel NSA [19; 180]). Un simile cambiamento di isoforma tra CaV3.2 e CaV3.1 è stato precedentemente documentato durante sia lo sviluppo murino che la differenziazione delle mESCs [181; 182].

La connessina 45, un'isoforma presente in tutti i distretti del cuore embrionale e down-regolata durante la nascita [19; 183], è espressa a livelli simili in tutti i gruppi ad esclusione delle cellule CD166+ a giorni precoci in cui la sua espressione si è attestata a livelli significativamente più alti. Infine abbiamo quantificato l'espressione di geni tipicamente ventricolari (come Nkx2.5, Kv4.2, HCN2 e Cx43) e nuovamente nelle cellule CD166+ abbiamo riscontrato livelli simili a quelle delle cellule del NSA piuttosto che di quelli del ventricolo (Figura 40). Considerati nel loro insieme, questi dati indicano che durante la loro maturazione in vitro le cellule CD166+ mostrano cambiamenti nel profilo espressivo dei geni che ricapitolano quelli del NSA.

In questa tipologia di esperimenti, abbiamo anche valutato l'espressione di HCN4, HCN1, ssTnI e Shox2 nelle cellule CD166- (e come ci aspettavamo) questi marcatori erano significativamente meno espressi rispetto alle cellule CD166+ (Figura 41).

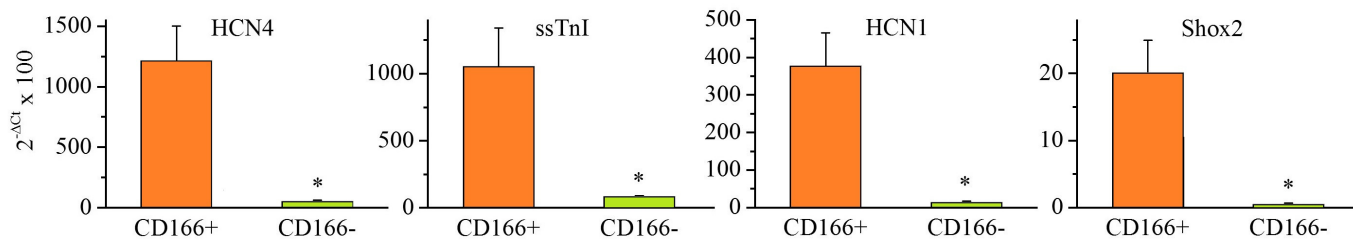


Figura 41 _ Espressione di geni del NSA in cellule CD166-. Comparazione nell'espressione di geni tipici del NSA (HCN1, HCN4; ssTnI e Shox2) in cellule CD166+ e in CD166- attraverso analisi qRT-PCR [* indica $P < 0.05$].

I CANALI HCN E QUELLI DEL CALCIO SONO FUNZIONALI NEI CARDIOMIOCITI CD166+

I canali HCN sono essenziali per l'attività pacemaker nel NSA sia embrionale che adulto [184; 185] e, come documentato in letteratura [152], la loro espressione ectopica è in grado di indurre attività spontanea ripetitiva anche nel ventricolo. Abbiamo perciò valutato l'espressione delle varie subunità degli HCN a livello proteico dopo 1 o 3 settimane in coltura (Figura 42).

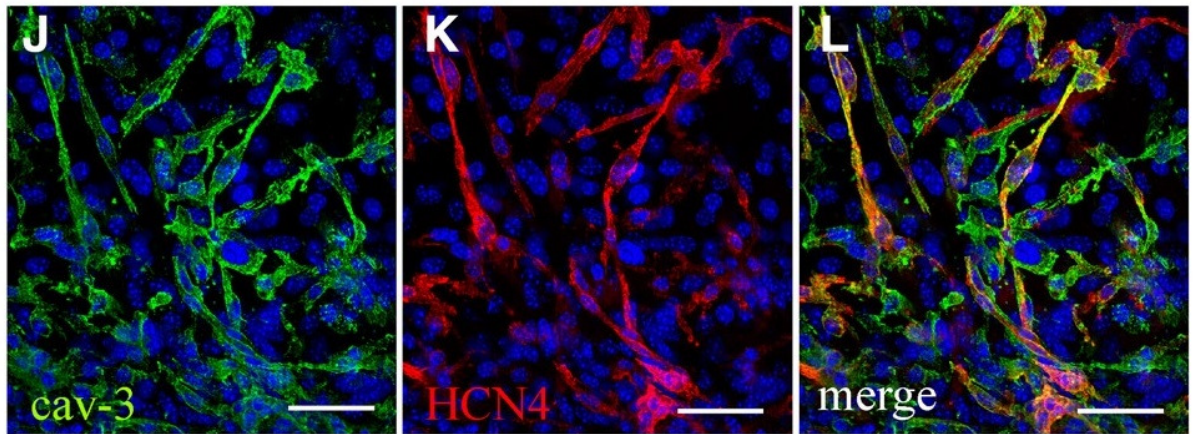
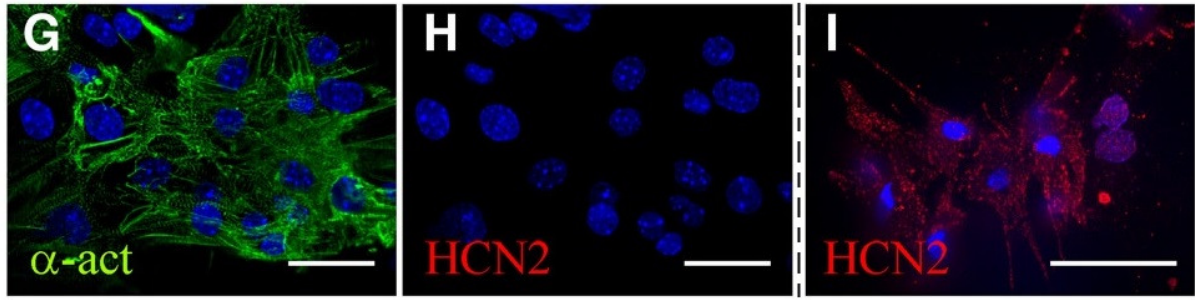
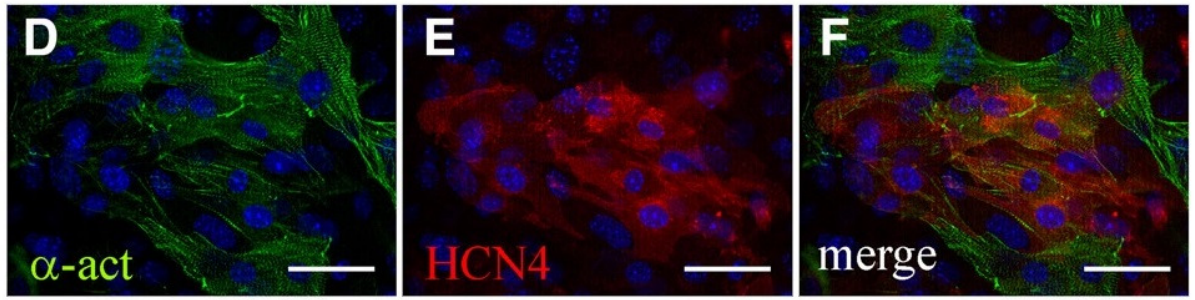
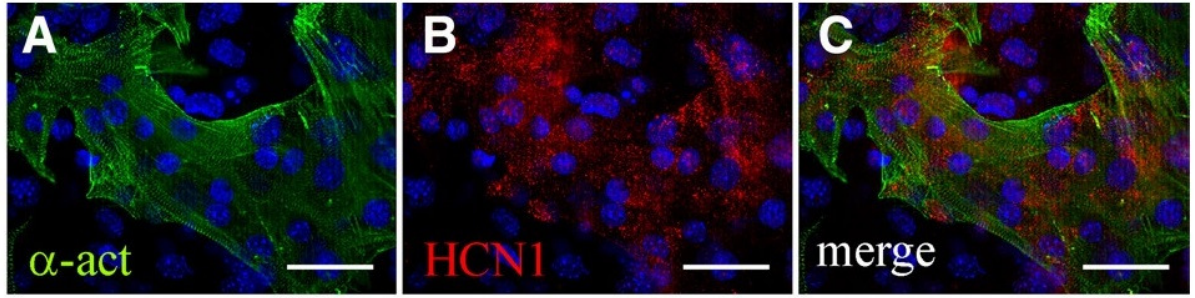


Figura 42 _ Espressione dei canali HCN nelle cellule selezionate per CD166. Immagini confocali di cellule CD166+ sia dopo 1 settimana (A-H) che dopo 3 settimane (J-L) in coltura. Le marcature sono state eseguite per valutare la coespressione delle varie isoforme HCN (in rosso) o con α -actinina (α -act, in verde) o con caveolina 3 (Cav3, in verde). I miociti ventricolari neonatali di ratto sono stati utilizzati come controllo positivo per la marcatura di HCN2 (I, in rosso). I relativi nuclei sono stati colorati con DAPI. Immagini a contrasto di fase di singola cellula derivata dalla selezione per CD166 dopo 25 giorni dal sorting (M) e di una cellula appena dissociata dal nodo senoatriale di topo. Barra di calibrazione: 50 μ m.

In accordo con i dati della qRT-PCR, abbiamo appunto trovato che dopo una settimana in coltura, le cellule CD166+ hanno espresso sia HCN1 (Figura 42-B) che HCN4 (Figura 42-E) insieme al marcatore cardiaco α -actinina sarcomerica (α -act: Figura 42-A e 42-D), mentre non è stato possibile identificare HCN2 (la principale isoforma ventricolare [186]) in cellule esprimenti α -actinina (Figura 42-G e 42-H). Come controllo positivo per la marcatura con l'anticorpo diretto contro HCN2 sono stati impiegati miociti ventricolari neonatali di ratto (Figura 42-I). Dopo 3 settimane in coltura, le cellule CD166+ hanno inoltre acquisito una morfologia simile a quella dei miociti senoatriali adulti (Figura 42 _ J+K+M+N) e, come le cellule adulte del NSA, hanno esibito una colocalizzazione di HCN4 e Cav3 [62] come dimostrato dalle relative colorazioni (Figure 42-L). Inoltre, esattamente come il NSA, le cellule selezionate per CD166 esprimono trascurabili livelli della catena pesante della α -miosina (Myh6, proteina specificatamente atriale) e della catena leggera 2v della miosina (mlc2v, specificatamente ventricolare) suggerendo in questo modo nessuna possibile progressione di differenziamento verso il fenotipo di lavoro (Figura 43)

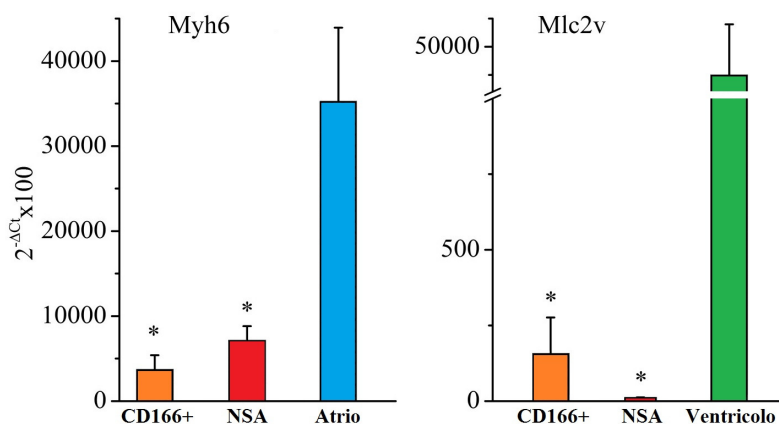


Figura 43 _ Le cellule CD166+ a giorni tardivi non mostrano alcun arricchimento di gene specificamente o atriali o ventricolari. Confronto tra i livelli espressivi del marcatore atriale Myh6 e di quello ventricolare Mlc2v in cellule CD166+ (a giorni tardivi), in cellule del NSA e rispettivamente in cellule atriali o in ventricolari [* indica P<0.05 vs atrio o ventricolo].

Dopo essere giunti a 25 giorni di coltura in piastra, i sincizi cellulari derivate dalle CD166+ esibivano una distribuzione della marcatura per HCN4 del tutto simile a quella osservata nelle fette di NSA di topo (Figura 43).

Cellule CD166+ (dopo 25 giorni)

Cellule del NSA di topo

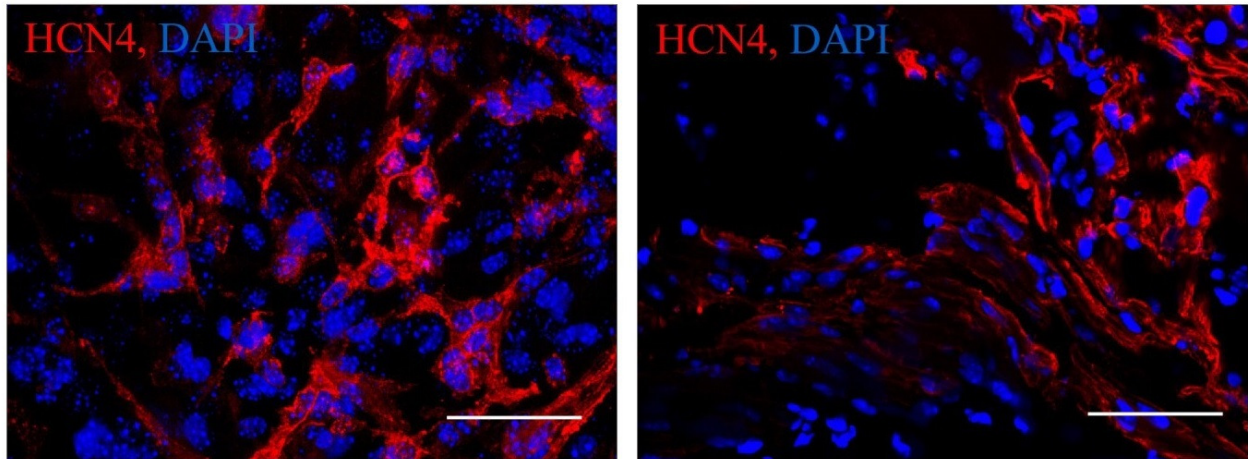


Figura 43 _ Confronto tra cellule CD166+ e cellule del NSA nativo. Immagini confocali di sincizi di cellule derivate dalla selezione per CD166 e di cellule del NSA di topo marcate con anticorpi anti-HCN4 (in rosso). I relativi nuclei sono stati colorati con DAPI. Barra di calibrazione: 50µm.

Dato che le cellule CD166+ esprimono le isoforme HCN (HCN4 e HCN1) tipicamente riscontrate nel NSA, abbiamo inoltre provveduto ad analizzare la relativa corrente I_f . Le cellule selezionate in base alla positività per CD166 esibiscono infatti sia dopo 1 settimana (Figura 44, sinistra) che dopo 3 settimane in coltura tale corrente con una voltaggio dipendenza paragonabile a quella delle cellule senoatriali native di topo (Figura 44, destra). I valori di $V_{1/2}$ misurati sono stati -77.4 ± 2.4 mV per le cellule CD166+ a giorni precoci ($n=7$, cerchi pieni), -73.4 ± 1.2 mV in quelle a giorni tardivi ($n=3$, cerchi vuoti) e infine -73.6 ± 1.4 mV per i miociti senoatriali di topo ($n=9$, quadrati vuoti) [185].

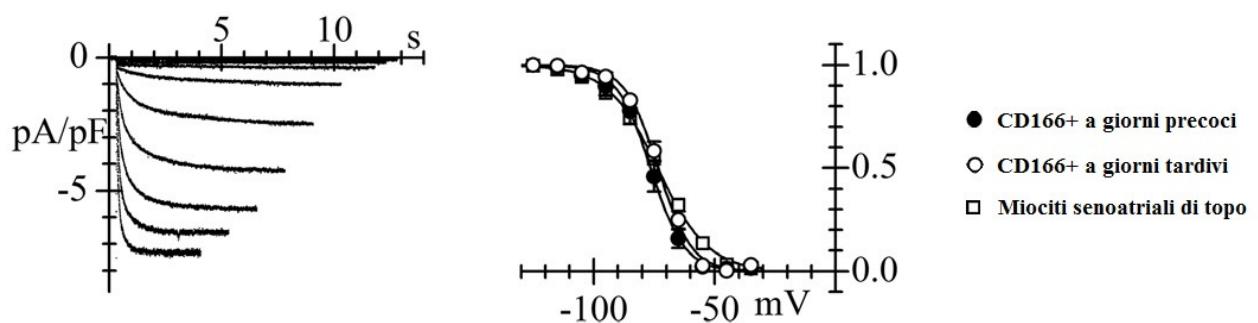


Figura 44 _ Confronto funzionale tra le cellule CD166+ e i miociti senoatriali (da NSA) di topo. A sinistra, tracce rappresentative di corrente I_f registrata da singole cellule CD166+ dopo 1 settimana in coltura. A destra, Curve di attivazione ottenute dalla registrazione di cellule CD166+ dopo 1 settimana in coltura (cerchi pieni), dopo 3 settimane in coltura (cerchi vuoti) e da miociti senoatriali di topo (quadrati vuoti). Le linee rappresentano il migliore riempimento dei punti dato dall'equazione di Boltzmann.

Abbiamo inoltre valutato il contributo delle correnti di Ca^{2+} sia di tipo L che di tipo T (I_{CaL} e I_{CaT}) nell'attività spontanea delle cellule CD166+ attraverso la perfusione (in momenti differenti) di Ni^{2+}

(50 μ mol/L, bloccante della I_{CaT}) e di nifedipina (0.1 μ mol/L, bloccante della I_{CaL}) durante le registrazioni dei loro potenziali d'azione spontanei (Figura 45).

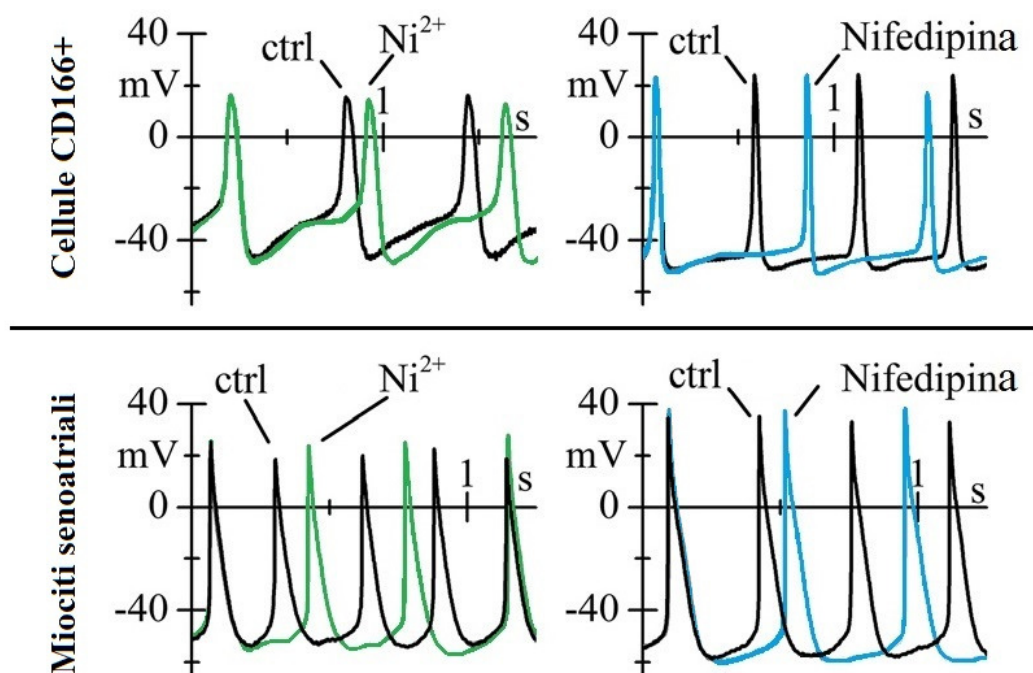


Figura 45 _ Confronto funzionale tra le cellule CD166+ e i miociti senoatriali (da NSA) di topo. Potenziali d'azione rappresentativi registrati da cellule CD166+ (parte superiore) e miociti senoatriali (da NSA, parte inferiore) in controllo (Tyrode) e durante la perfusione di Ni²⁺ 50 μ mol/L o di nifedipina 100nmol/L.

Perfondendo Ni²⁺ durante le registrazioni, la frequenza dell'attività spontanea nelle CD166+ è decresciuta in media del 17.7 \pm 2.6% [n=5]. In presenza di nifedipina, il rallentamento è invece stato intorno al 16.9 \pm 6.4% [n=3]. Questi valori non sono significativamente diversi da quelli ottenuti durante le registrazioni dell'attività spontanea nei miociti senoatriali alle stesse condizioni. Infatti in presenza di Ni²⁺ abbiamo apprezzato una diminuzione nella loro frequenza del 21.6 \pm 7.5 [n=5], mentre con nifedipina la riduzione è stata del 16.5 \pm 2.2 [n=6]. Come menzionato precedentemente, i cardiomiociti selezionati in base alla positività per CD166 si sono dimostrati capaci di mantenere la loro attività spontanea per più di 3 settimane in coltura. In questo periodo la loro frequenza di battito è aumentata (Figura 46) così come accade durante il normale sviluppo embrionale murino [187], suggerendoci quindi un certo grado nella loro maturazione.

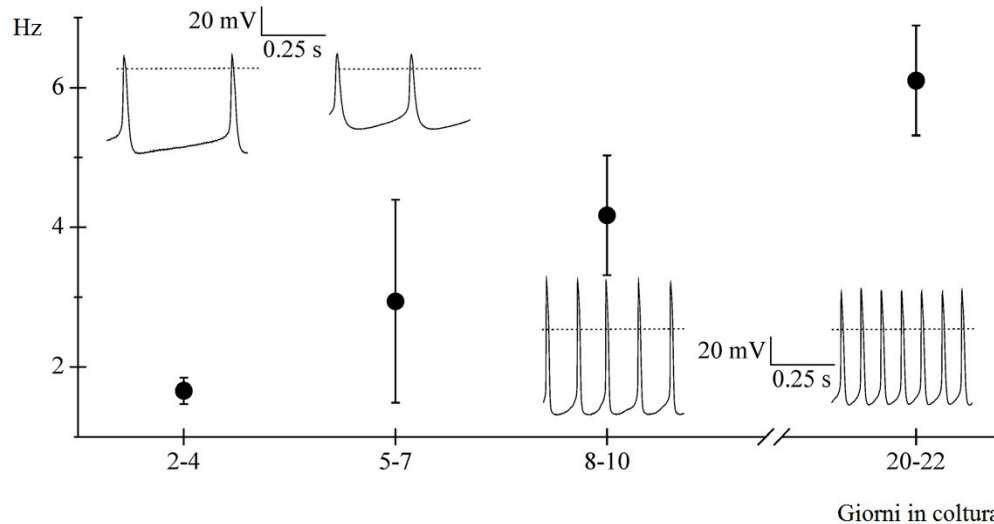


Figura 46 _ Attività autoritmica dei cardiomiociti selezionati in base alla positività per CD166. Media nella frequenza dei potenziali d'azione calcolata nelle cellule CD166+ a diversi giorni in cultura. Gli inserti presenti in figura mostrano tracce rappresentative di potenziali d'azione.

Alla fine, abbiamo valutato se questi cardiomiociti derivati dalle cellule CD166+ fossero anche in grado di rispondere alla stimolazione dei modulatori autonomici, altra caratteristica distintiva dei miociti senoatriali e importante per la modulazione del cronotropismo cardiaco. Le analisi di immunofluorescenza hanno permesso così di constatare sia la presenza dei recettori di tipo β 1-adrenergico e di tipo β 2-adrenergico che quella del recettore M2 muscarinico (Figura 47).

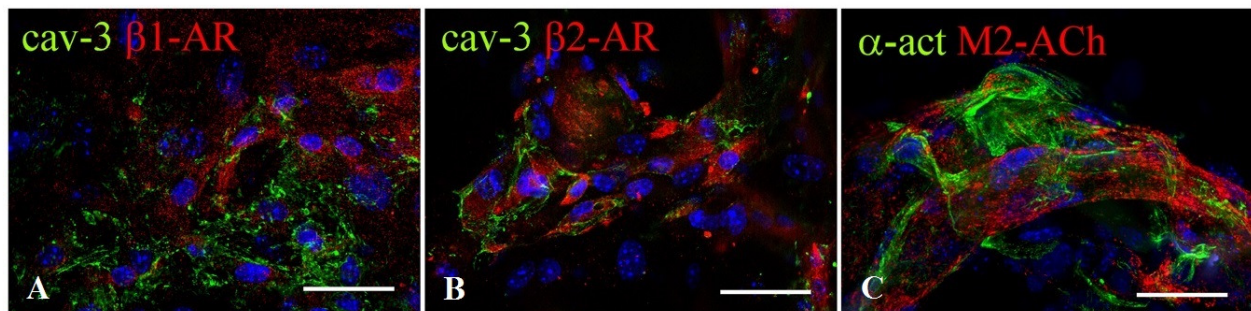


Figura 47 _ Attività autoritmica dei cardiomiociti selezionati in base alla positività per CD166. Immagini confocali che mostrano la coespressione di caveolina 3 (Cav3) con il recettore β 1-adrenergico (A) e con il recettore β 2-adrenergico (B) e quella di α -actinina sarcomerica con il recettore M2 muscarinico (C). I relativi nuclei sono stati colorati con DAPI. Barra di calibrazione: 50 μ m.

Per valutare la funzionalità di questi recettori, abbiamo perciò effettuato registrazioni dell'attività spontanea di questi cardiomiociti sia in soluzione fisiologica di controllo (Tyrode) che in perfusione (a tempi distinti) con l'agonista β -adrenergico isoproterenolo (Iso) e con l'agonista muscarinico acetilcolina (ACh). Sotto la stimolazione di questi agonisti autonomici abbiamo potuto apprezzare cambiamenti nella relativa frequenza. Specificatamente, l'isoproterenolo ha portato a un aumento

nella frequenza del $56.9 \pm 8.0\%$ [n=5], mentre l'acetilcolina ha determinato una diminuzione del $22.9 \pm 5.4\%$ [n=3] (Figura 48).

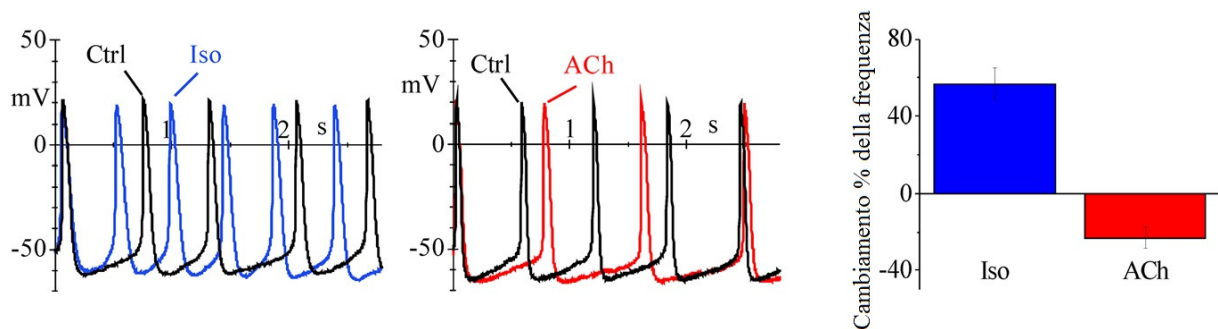


Figura 48 _ Attività autoritmica dei cardiomiociti selezionati in base alla positività per CD166. Potenziali d'azione spontanei registrati in soluzione fisiologica di controllo (Tyrode, in nero) e in perfusione a momenti differenti con $1\mu\text{mol/L}$ di isoproterenolo (Iso, in blu) e $0.1\mu\text{mol/L}$ di acetilcolina (ACh, in rosso) su cellule CD166+. Sulla destra, grafico a barre che mostra le variazioni percentuali provocate da questi agonisti autonomici.

IL PROMOTORE DI HCN4 E' ATTIVO E DELINEA LE CELLULE CD166+

Abbiamo anche creato un clone di mESCs che stabilmente esprime la enhanced green fluorescent protein (EGFP) sotto il controllo trascrizionale del promotore del gene di HCN4 (pHCN4-EGFP). Gli EBs che derivano da questo clone (con integrato nel proprio genoma il plasmide pHCN4-EGFP) esibiscono positività per la EGFP nelle regioni contrattili esprimenti sia Caveolina 3 (Cav3) che HCN4 (Figura 49).

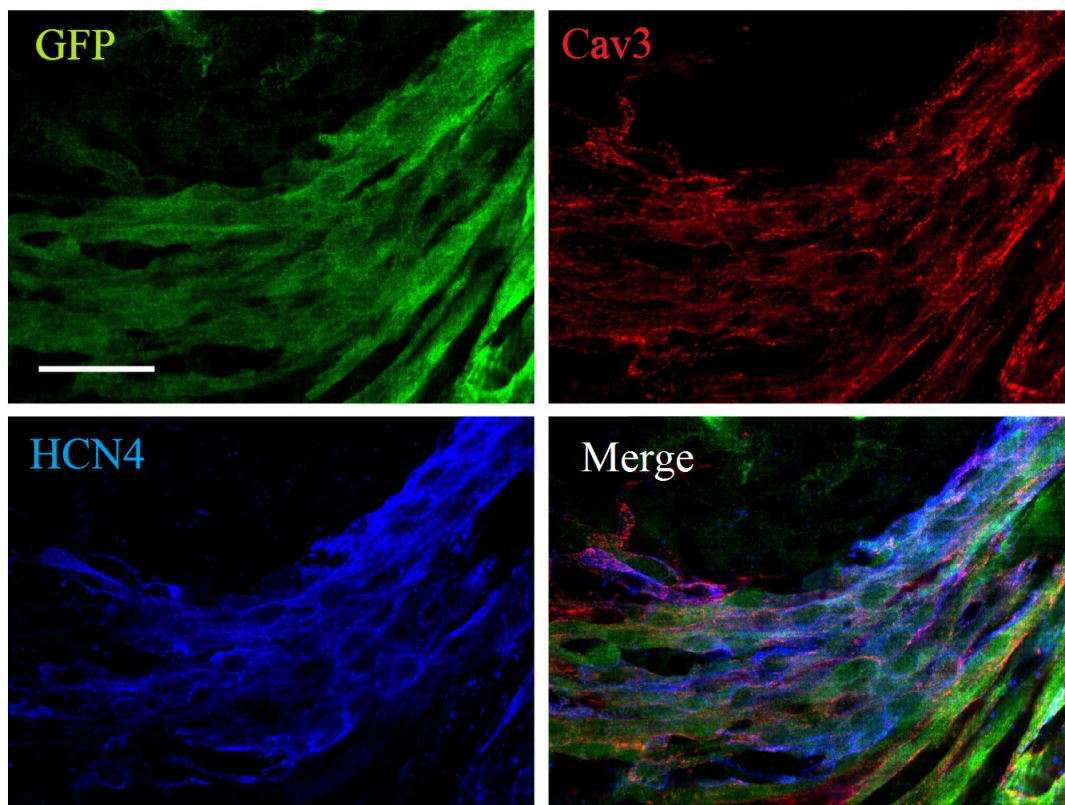


Figura 49 _ Analisi di immunofluorescenza sulla porzione contrattile di un EB che deriva dal differenziamento di mESCs nel cui genoma è integrato il plasmide pHCN4-EGFP. Immagini confocali della relativa porzione in cui è possibile apprezzare sia separatamente l'espressione di GFP (in verde), di Cav3 (in rosso) e di HCN4 (in blu) che la sovrapposizione di tutti questi segnali. Barra di calibrazione: 50 μ m.

Esattamente come ci aspettavamo, la selezione delle cellule CD166+ dagli EBs di tipo pHCN4-EGFP ha permesso di ricavare layers battenti positivi per la EGFP (Figura 50).

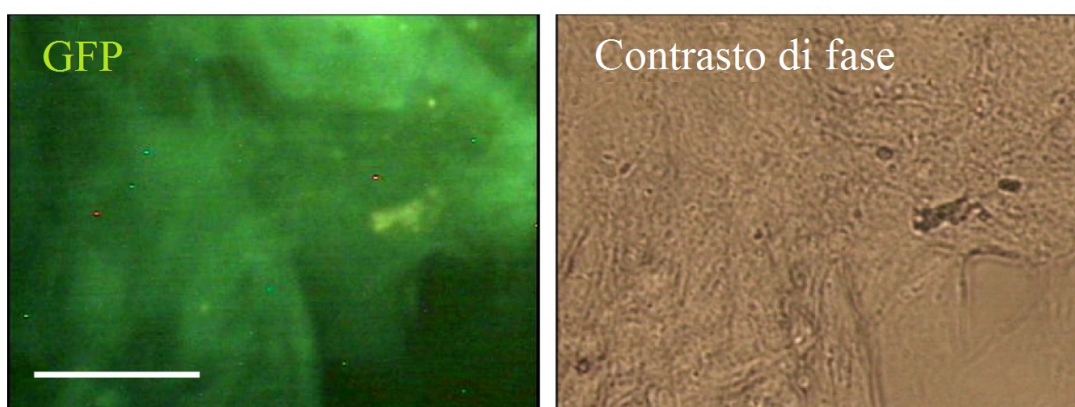


Figura 50 _ Analisi di cellule CD166+ ricavate dalla dissociazione di EBs derivanti dal differenziamento di mESCs nel cui genoma è integrato il plasmide pHCN4-EGFP. Immagine in fluorescenza delle risultanti cellule CD166+ (a sinistra) affiancata alla corrispondente immagine in contrasto di fase (a destra). Barra di calibrazione: 50 μ m.

LE CELLULE CD166+ GUIDANO LA FREQUENZA DEI MIOCITI VENTRICOLARI NEONATALI

Abbiamo inoltre valutato se i cardiomiociti derivati dalla selezione per CD166 sono capaci di funzionare come pacemaker. Per questo motivo, abbiamo perciò allestito un sistema di co-coltura ampiamente utilizzato in letteratura [154; 158; 159] che prevede l'impiego di miociti ventricolari di ratto. All'interno di ogni piastra, questi miociti sono stati posizionati sia sopra le cellule CD166+ che da soli. Per questi esperimenti sono state utilizzate anche le piastre contenenti le CD166-. Dopo pochi giorni quando il sincizio viene formato, la frequenza dell'attività spontanea è stata calcolata dalle registrazioni dei potenziali d'azione. I cardiomiociti in co-coltura con le cellule CD166+ hanno mostrato una frequenza media di 1.7 ± 0.19 Hz [n=5] risultando così significativamente più alta sia di quella di 0.82 ± 0.17 Hz [n=6] ottenuta dai cardiomiociti messi in co-coltura con le CD166- che anche di quella di 0.84 ± 0.09 Hz [n=7] ricavata dai soli cardiomiociti. Questi dati indicano quindi le cellule CD166+ sono capaci di accoppiarsi elettricamente e di guidare un substrato eccitabile, comportandosi cioè da pacemaker biologico.

LE CELLULE CD166+ PRESENTANO UN BASSO POTENZIALE PROLIFERATIVO IN VITRO E NON SONO TERATOGENE IN VIVO

Uno dei maggiori punti a sfavore nell'utilizzo delle cellule staminali pluripotenti è rappresentato dal loro alto potenziale proliferativo e differenziativo che sfocia quindi nella formazione di teratomi. Abbiamo perciò quantificato la proliferazione cellulare delle CD166+ attraverso la colorazione con bromo-deossi-uridina (bromo-deoxy-uridine staining, BrdU staining). Le cellule CD166+ hanno mostrato un basso potenziale proliferativo a 24h ($7.2 \pm 2.7\%$), valore che è decresciuto ulteriormente a 48h ($3.8 \pm 1.8\%$). Come ci aspettavamo, la velocità nell'incorporazione di BrdU riscontrata nelle mESCs è stata invece molto più alta ($63.5 \pm 4.9\%$). Differentemente dalle mESCs, le cellule CD166+ non sono inoltre state in grado di indurre teratomi quando iniettate in vivo in topi nudi CD1 (Figura 51). Quest'ultima parte che ha previsto l'utilizzo di animali per test teratogenici è stata gestita e realizzata dal gruppo della Dottoressa Messina.

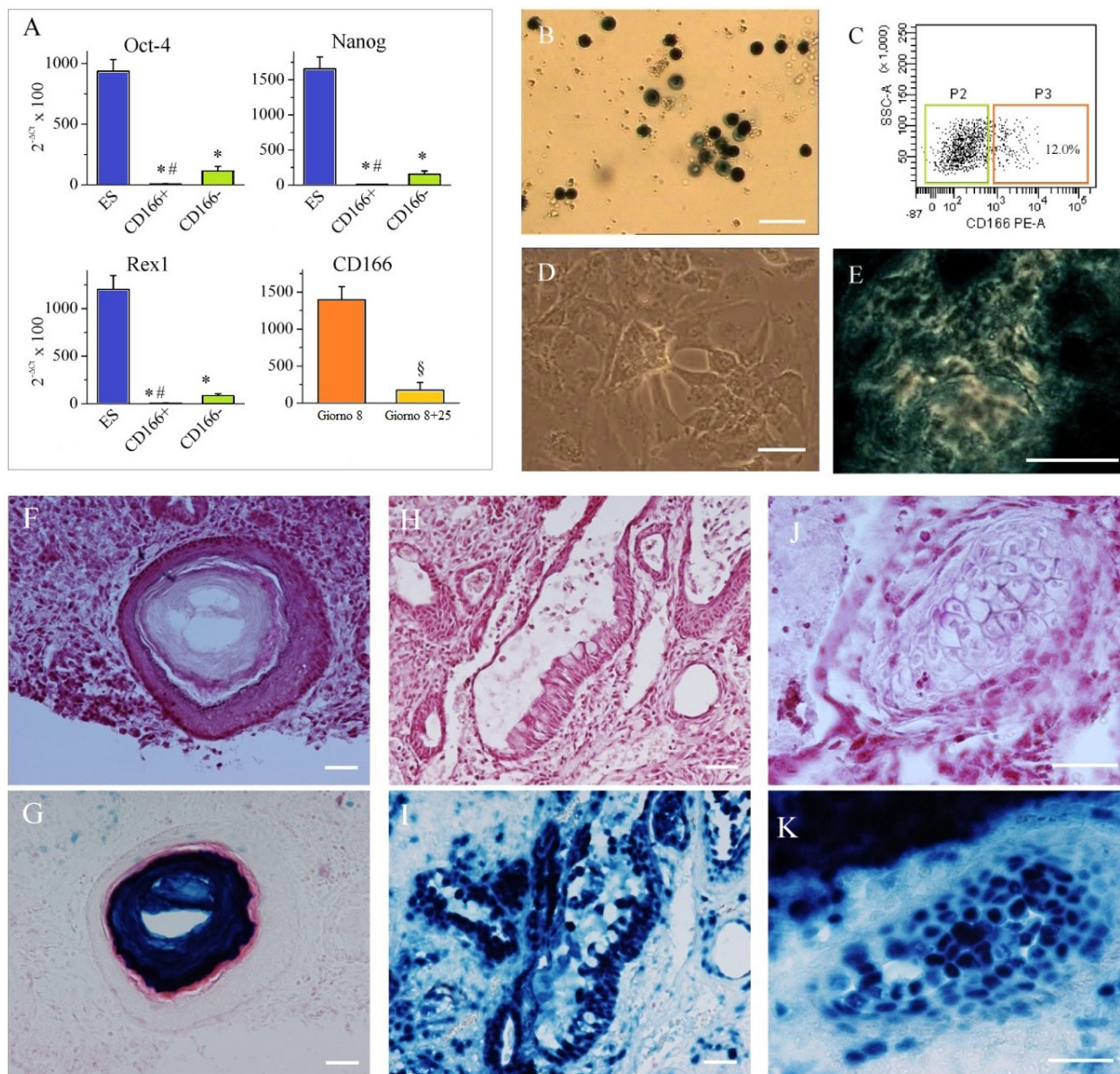


Figura 51 _ Le cellule CD166+ non esprimono marcatore di pluripotenza e non sono teratogeniche in vivo. (A) Analisi di qRT-PCR dei geni di pluripotenza Oct4, Nanog, Rex1 e confronto dell'espressione di CD166 in cellule selezionate per quest'antigene dopo 8 e 25 giorni in cultura [* indica $P < 0.05$ vs ES; # indica $P < 0.05$ vs CD166-; § indica $P < 0.05$ vs giorno 8]. (B) Immagini a contrasto di afse di singole mESCs nLacZ colorate tramite X-gal. (C) Analisi citofluorimetrica delle mESCs nLacZ isolate da EBs al giorno 8 che mostrano come la proporzione tra le sottopopolazioni ottenute sia simile a quella ottenuta per le mESCs di controllo (non elettroporate/infettate). (D+E) Dopo separazione citofluorimetrica, la sottopopolazione di cellule LacZ esprimenti CD166 sono in grado di formare un sincizio in grado di battere spontaneamente e positivi alla colorazione per X-gal (E). (F – K) Colorazione sia con ematossilina ed eosin ache X-gal di un teratoma, che forniscono esempi di come le mESCs iniettate differenziano nei derivati dei tre foglietti embrionali: ectoderma (F+G, epitelio squamoso), endoderma (H+I, cartilagine) e mesoderma (J+K, strutture di tipo intestinale con epitelio mucinoso e ghiandole). L colorazione X-gal è stata eseguita su sezioni adiacenti a quelle utilizzate per la colorazione con ematossilina ed eosina. Barre di calibrazione: 100 μ m.

La comunità scientifica dimostra notevole interesse nell'impiego di cellule staminali embrionali (ESCs) al fine di sviluppare approcci terapeutici alternativi nel trattamento di patologie degenerative. La scelta di adoperare in ricerca questa tipologia cellulare è dovuta alla loro notevole capacità di replicazione, al loro alto grado di plasticità differenziativa e alla presenza di protocolli standardizzati per il differenziamento e l'ingegnerizzazione.

Il loro utilizzo spiana quindi la strada alla possibilità di generare *de novo* un tessuto compromesso. Ad esempio, la rigenerazione del tessuto cardiaco in seguito ad eventi ischemici o ad altri tipi di patologie cardiovascolari (come quelle che coinvolgono la generazione o la propagazione del ritmo) consentirebbe un importante progresso nel loro trattamento. La rigenerazione di un tessuto permetterebbe così di aumentare i benefici delle attuali terapie, efficaci e sicure ma per ora palliative e non in grado di ripristinare la funzionalità dell'organo compromesso. Limitatamente al caso di alterazioni nella generazione del ritmo, l'intervento terapeutico più diffuso consiste nell'impianto di pacemakers elettronici.

Sebbene questi dispositivi risultino di fondamentale importanza per la sopravvivenza del paziente, non risultano però in grado di eguagliare le prestazioni del nodo senoatriale (NSA), il pacemaker naturale. Difatti questi apparecchi presentano diverse limitazioni quali l'impossibilità ad essere modulati dai neurotrasmettitori autonomici, difficoltà sia di impianto che adattamento in pazienti pediatrici, la necessità di manutenzione periodica e tutti quei disagi causati dall'interazione con alcuni strumenti elettronici (quali elettrostimolatori, metal detectors e apparecchi per la risonanza magnetica).

Uno dei progetti del nostro laboratorio è appunto mirato alla creazione di un pacemaker biologico, cioè di un substrato cellulare autoritmico che presenti caratteristiche elettriche e molecolari il più possibile simili a quelle del tessuto pacemaker nativo e che possa pertanto oltrepassare i limiti ad oggi imposti dalle controparti elettroniche.

Per questo motivo, la capacità di ricavare una popolazione di cardiomiociti pacemaker simile (o addirittura identica) a quella del NSA maturo partendo da una qualsiasi linea staminale rappresenta un target essenziale nella realizzazione di questo progetto. Il substrato cellulare ottenuto potrebbe essere così impiegato non solo per ristabilire l'appropriato ritmo cardiaco (pacemaker biologico) ma anche per testare nuovi farmaci cardioattivi.

Durante la loro differenziazione in Embryoid Bodies (EBs), le cellule staminali pluripotenti (ESCs e induced pluipotent stem cells, iPSCs) sono in grado di generare spontaneamente cellule dotate di battito che presentano le caratteristiche molecolari e funzionali tipiche dei miociti pacemaker del NSA [170; 188; 189; 190]. Tali cellule risultano però essere disperse tra le altre varietà cellulari che costituiscono questi aggregati tridimensionali eterogenei [170]. Quindi la specifica selezione e il

successivo isolamento di questi miociti di interesse rappresentano un primo ostacolo nella realizzazione del nostro progetto.

In letteratura finora sono stati identificati due marcatori la cui espressione è accertata sia nel cuore che nei cardiomiociti derivati da ESCs: CD166 (o ALCAM) [163; 164; 165; 191] e CD172a (or SIRPA) [192]. Tra i due, il marcatore SIRPA non consente però la selezione di una popolazione di precursori pacemaker. Nelle ESCs umane (human ESCs, hESCs) in differenziazione la sua positività discrimina infatti una sottopopolazione arricchita in precursori esprimenti troponina T cardiaca, proteina tipica del miocardio di lavoro. Nel topo invece CD172a potrebbe non essere addirittura espressa a livello cardiaco [192], indicando quindi la possibilità per cui questo marcatore di superficie non costituisca una proteina conservata dal punto di vista evolutivo nello sviluppo cardiaco. La nostra scelta di selezionare le cellule in base alla positività per CD166 durante una finestra temporale specifica del differenziamento delle mESCs ha permesso di ottenere una popolazione di cardiomiociti pacemaker. Nonostante questo antigene di superficie non sia accertato essere un marcatore cardiaco, in letteratura è stato però documentato come la sua espressione in maniera transiente ma specifica nel tubo cardiaco in sviluppo si localizza a livello del seno venoso, il futuro NSA [163; 164]. Attraverso i dati raccolti (e pubblicati nell'articolo Scavone et al, 2013 [102]) dal nostro gruppo, abbiamo dimostrato come le cellule positive per CD166 coesprimono la proteina HCN4 (Figura 30) che specificatamente delinea la regione del NSA sia durante l'embriogenesi [124; 172; 173] che durante la vita post-natale [179; 193; 194; 195]. HCN4 è anche necessaria per il corretto funzionamento del NSA, in quanto la sua assenza rende impossibile la vita [184; 185] e mutazioni nella sua sequenza genica possono provocare disturbi ereditari del ritmo [60]. Durante questo lavoro di ricerca, abbiamo fatto vedere come le cellule CD166+ appena selezionate (in modo opposto a quelle CD166-) esprimono alti livelli di mRNA di HCN4. Infatti trascorso un giorno dalla loro separazione (sorting) nelle due sottopopolazioni, la maggior parte delle cellule CD166+ esprimono la proteina HCN4 (Figura 39). Dopo 4 settimane in coltura, le cellule CD166+ non solo mantengono un alto livello espressivo di HCN4 ma assumono perfino la morfologia a forma di fuso tipica dei miociti senoatriali, unendosi così in agglomerati simili a quelli del NSA nativo (Figure 42 J+K+L+M+N e Figura 43). La sottopopolazione positiva esprime inoltre alti livelli di fattori trascrizionali (Tbx18, Shox2, Tbx3 e Isl1) che specificatamente definiscono i progenitori mesodermici che, separandosi precocemente durante la cardiogenesi [173], vanno a costituire il seno venoso e quindi il NSA. Dopo 3 settimane in coltura, il livello espressivo di questi geni è ancora paragonabile a quello trovato nel NSA, risultando inoltre più alto rispetto ai livelli trovati nel ventricolo. Quindi i nostri dati mostrano appunto che CD166 rappresenta un marcatore ottimale per selezionare specificatamente precursori del NSA.

Nel topo, la decisione di selezionare cellule in base alla positività per CD166 è già stata utilizzata precedentemente ma soltanto per isolare precursori cardiovascolari dal sacco vitellino [164]. Il loro isolamento al giorno embrionale 8.5 (E8.5) permette in questo modo di ricavare cellule sia endoteliali che cardiache. La loro contemporanea selezione anche per flk-1 porta ad ottenere cardiomiociti solo dalla sottopopolazione CD166+/flk-1- [164], concordando con quanto scoperto nelle nostre analisi e cioè la trascurabile coespressione di CD166 con flk-1 (Figura 37).

La selezione per CD166 nelle hESCs in differenziazione ha permesso invece di ricavare una popolazione cellulare in cui sia il pattern espressivo (di proteine contrattili e canali ionici) che lo stato di metilazione (in regioni promotrici di geni regolati durante lo sviluppo) consentono di accomunarla a cardiomiociti di tipo embrionico [165]. Il nostro criterio di selezione ci ha invece permesso di ottenere da mESCs realmente miociti di tipo senoatriale. La conferma sull'efficacia di questo metodo deriva dai risultati ottenuti dalle varie analisi eseguite valutando non solo l'espressione sia di geni specifici (Figura 40) e di proteine caratteristiche (Figura 42) ma anche le proprietà elettrofisiologiche del tutto simili a quelle delle cellule adulte del NSA nativo (Figure 44 e 45). La discrepanza fra i nostri dati e quelli ottenuti dal precedente metodo selettivo [165] potrebbe essere motivata dall'impiego di specie differenti e, più probabilmente, dai differenti protocolli usati per isolarle. Nel lavoro precedentemente citato [165], l'isolamento delle cellule veniva attuato quando l'espressione di CD166 raggiungeva il suo picco. Il criterio selettivo scelto dal nostro laboratorio si basa invece sulla differenza nell'espressione di α -actinina sarcomerica tra le cellule CD166+ e quelle CD166- e quindi l'isolamento veniva realizzato quando questa differenza era massima. Un'altra importante differenza tra questi due tipi di sottopopolazioni positive riguarda la loro diversità nel potenziale di proliferazione cellulare. Nel caso dell'altro protocollo [165] la velocità di proliferazione riscontrata nelle cellule CD166+ si è attestata a tra il 20% e il 30%, valori percentuali decisamente più alti rispetto a quelle rilevati nella sottopopolazione positiva ottenuta con il nostro protocollo (minore del 4% dopo 48h dal sorting). Un'ulteriore disuguaglianza tra queste due tipologie di cellule CD166+ concerne i livelli espressivi di questo stesso antigene. Infatti, mentre il precedente tipo di sottopopolazione [165] ne ha conservato alti livelli per un periodo di tempo uguale o maggiore alle 2 settimane, nelle nostre cellule la sua espressione è decresciuta significativamente (Figura 51-A) esattamente come dimostrato verificarsi durante la maturazione dei cardiomiociti murini [163]. Tentativi precedenti mirati ad ottenere miociti senoatriali/pacemaker da mESCs non hanno garantito alcuna popolazione omogenea, pur avvalendosi o di tecniche di biologia molecolare [196] o di approcci di tipo farmacologico [197; 198].

La creazione di una linea di mESCs che esprimesse EGFP sotto il controllo trascrizionale del promotore del gene di HCN4 [196] si è dimostrata appunto infruttuosa. Le aree contrattili dei relativi EBs mostravano comunque positività per EGFP, HCN4 e altre proteine cardiache. La loro successiva separazione al citofluorimetro ha permesso però di riscontrare l'espressione del marcatore neuronale nestina e l'assenza di attività spontanea nella maggior parte di queste cellule EGFP+ [196]. La loro contemporanea positività per HCN4 e nestina permise di classificarle come neuroni, in quanto è dimostrata l'espressione dell'isoforma 4 anche a livello del sistema nervoso centrale (SNC) [172].

Limitatamente all'approccio farmacologico, il trattamento delle mESCs in differenziazione o con 1-etil-2-benzimidazolinone [197] o con suramina [198] ha permesso certamente un aumento nella frazione di cellule con fenotipo riconducibile a quelle del NSA (rispettivamente di 6 volte e di 3 volte), ma non ha comunque impedito contaminazioni nella resa da parte di altre linee cellulari [197; 198].

Oltre ai livelli di espressione, i cardiomiociti selezionati per CD166 grazie al nostro protocollo esibiscono realmente anche le peculiari proprietà funzionali dei miociti senoatriali nativi. I miociti del NSA non solo generano spontaneamente potenziali d'azione ma sono anche in grado di controllare il ritmo cardiaco grazie alla modulazione garantita dai neurotrasmettitori autonomici rilasciati in base ai cambiamenti nella richiesta di ossigeno. I cardiomiociti selezionati per CD166 grazie al nostro protocollo formano (ogni volta che vengono ottenuti) un sincizio battente in maniera sincrona che genera potenziali d'azione ripetitivi e regolari.

E' importante notare che questi cardiomiociti selezionati per CD166 (esattamente come il cuore embrionale di topo [187]) aumentano nel tempo la loro frequenza di battito, raggiungendo valori simili a quelli riportati in letteratura per i miociti senoatriali dissociati da NSA adulto di topo [185; 199]. L'omogeneità tra i sincizi formati dalle CD166+ e lo stesso NSA maturo è stata inoltre confermata dalle caratteristiche elettrofisiologiche analizzate che ci hanno consentito di apprezzare la presenza di pathways funzionali sia di tipo β -adrenergico che di tipo colinergico (Figura 48) in grado di determinare la corretta risposta fisiologica alla specifica stimolazione autonoma. Dai nostri dati emerge inequivocabilmente che nelle cellule selezionate per CD166 le proprietà cinetiche della corrente I_f e l'effetto sulla frequenza esercitata dal blocco dei canali di Ca^{2+} sono gli stessi di quelli riscontrati nei cardiomiociti appena isolati dal NSA. In vitro, le CD166+ risultano inoltre essere capaci di connettersi elettricamente e guidare il ritmo di un monolayer di miociti ventricolari neonatali di ratto.

Poiché il nostro protocollo prevede di selezionare una specifica sottopopolazione partendo da cellule pluripotenti in differenziamento, ci siamo interessati a valutarne l'eventuale teratogenicità in

vivo. L'esito di questi studi condotti iniettando cellule CD166+ in topi nudi CD1 ha mostrato una loro incapacità a indurre teratomi (Figura 51).

Questi risultati ci permettono quindi di considerare le cellule CD166+ (ottenute con il nostro protocollo) un substrato decisamente sicuro da impiegare nello sviluppo di un pacemaker biologico. Confermate le loro abilità di pacemaker in vitro, rimangono ancora da studiare e valutare le loro capacità prima di integrazione all'interno di un cuore vero proprio e poi di consecutivo controllo sul relativo ritmo. La progettazione di una matrice biopolimerica ad hoc favorirebbe quindi il loro trapianto e pertanto lo studio di tali abilità in modelli animali integri (a seguito dell'induzione del blocco sinusale).

La scelta di utilizzare mESCs rimane certamente penalizzante in una prospettiva clinica per l'uomo, ma le nozioni acquisite con questo protocollo incoraggiano il passaggio in ambito umano. Il tipo di linea cellulare che meglio si presta a questo impiego è rappresentato dalle hiPSCs, in quanto eticamente più accettabili rispetto alle hESCs.

La definizione di un protocollo per cellule pluripotenti umane consentirebbe davvero di spianare la strada alla realizzazione di un pacemaker biologico utile per applicazioni non solo cliniche ma anche di tipo farmacologico in vitro.

PARTE II

**SCREENING GENETICO DI PAZIENTI AFFETTI DA EPILESSIA
DEL LOBO TEMPORALE**

PARTE II

INTRODUZIONE

FUNZIONE DELLA $I_{f/h}$ NEI NEURONI

A livello di singolo neurone la corrente $I_{f/h}$ contribuisce non solo alla generazione del potenziale a riposo (Resting Membrane Potential, RMP) ma anche a mantenerlo stabile controllandone le oscillazioni.

Nelle cellule neuronali l'elevata permeabilità del plasmalemma agli ioni K^+ costituisce il principale stimolo nella definizione del RMP. Il suo valore risulta però più positivo rispetto a quello del potenziale di equilibrio del catione (circa $-75mV$), in quanto alcune correnti depolarizzanti ne contrastano in parte il suo effetto iperpolarizzante. Tra queste, la $I_{f/h}$ svolge un ruolo importantissimo [50; 200]. La dimostrazione empirica si ottiene somministrando Cs^+ (bloccante della $I_{f/h}$) ai neuroni. La derivante iperpolarizzazione (misurabile nel potenziale di membrana neuronale) conferma appunto il suo contributo depolarizzante nel definire il valore del RMP [201; 202].

I canali HCN stabilizzano il potenziale di membrana contro input sia eccitatori che inibitori variando la resistenza d'ingresso del plasmalemma [11; 203].

La loro espressione in membrana varia a seconda del tipo neuronale che si considera. A livello subcellulare, generalmente risulta maggiore a livello dei dendriti e decrescente procedendo verso il soma e l'assone [203; 204].

Sebbene la $I_{f/h}$ rappresenti una corrente depolarizzante, l'attivazione dei canali HCN sui dendriti distali determina uno smistamento (*shunt*) degli inputs sinaptici che porta a diminuire sia l'eccitabilità derivante da stimoli di natura sinaptica che la connessione funzionale del network neuronale. L'effetto inibitorio della $I_{f/h}$ sull'eccitabilità dendritica dipende dall'impatto di questa stessa corrente sulle proprietà passive della membrana dendritica e anche dalla sua interazione con le altre conduttanze ioniche. Dato che parte degli HCN è aperta al RMP, la presenza della $I_{f/h}$ nei dendriti riduce la resistenza di membrana e la relativa costante di tempo degli EPSPs. In queste condizioni, il restringimento nell'ampiezza e l'accorciamento nella costante di tempo sfavoriscono la sommazione temporale dei vari EPSPs (conosciuto come *shunting effect*) [203; 205; 206; 207; 208; 209; 210] e quindi impediscono il raggiungimento (o il superamento) del valore di soglia.

Studi recenti hanno dimostrato l'interazione di questa corrente con altre conduttanze ioniche, quali quelle del K^+ (delayed-rectifier M-type K^+ channels) e del Ca^{2+} (voltage-dependent Ca^{2+} channels)

nel processo di riduzione dell'eccitabilità neuronale [203; 211; 212]. Nei dendriti distali infatti la $I_{f/h}$ provoca l'inibizione dei canali voltaggio dipendenti del Ca^{2+} (e quindi delle loro correnti di tipo T e N), contrastandone in questo modo i relativi spikes coinvolti nei fenomeni di Long Term Potentiation (LTP) [212].

L'attivazione dei canali HCN nel soma agisce invece depolarizzando la membrana e favorendo il firing neuronale, in quanto aumenta le oscillazioni sottosoglia del potenziale di membrana. Il ruolo della $I_{f/h}$ nella genesi del ritmo è stato studiato dettagliatamente nei neuroni di relais talamocorticali [202; 213; 214], in quelli del nucleo soprachiasmatico [215; 216], nei GABAergici del setto mediale [217; 218] e in quelli del nucleo paraolivare superiore del tronco cerebrale [219]. Ad esempio, i neuroni talamocorticali presentano firing spontaneo caratterizzato da un burst ritmico dovuto all'interazione tra gli HCN e i canali di Ca^{2+} di tipo T (I_T). L'attivazione della $I_{f/h}$ causa una depolarizzazione della membrana che attiva la I_T e innesca un burst di potenziali d'azione. Nel burst, ogni singolo spike di Ca^{2+} inizia con la deattivazione della $I_{f/h}$ e termina con la sua riattivazione. In questo modo si realizza la rigenerazione del ciclo [11; 202; 203; 213; 214].

Infine a livello assonico i canali HCN si localizzano in stretta prossimità dei bottoni sinaptici, dove l'effetto depolarizzante della loro corrente attiva i vicini canali di Ca^{2+} di tipo P/Q. Grazie all'apertura di questi canali voltaggio dipendenti ad alta soglia (*high-threshold voltage-gated Ca^{2+} channels*), la $I_{f/h}$ facilita quindi il rilascio dei neurotrasmettitori a livello pre-sinaptico [203; 220; 221]. Per questa sua forma di controllo sui fenomeni di plasticità sia a corto che a lungo termine, emerge quindi il suo importante ruolo a livello del SNC [203].

Per questo motivo, molti gruppi di ricerca stanno focalizzando la loro attenzione per capire il possibile ruolo della $I_{f/h}$ nei meccanismi patogenetici che scatenano l'epilessia [222; 223; 224; 225; 226].

EPILESSIA

L'epilessia è una patologia caratterizzata da disordini neurologici [227; 228] dovuti al verificarsi di bursts nel firing contemporaneo di estese popolazioni di neuroni [228]. Dal punto di vista clinico si manifesta attraverso ricorrenti attacchi (definiti *seizures*) che portano a disturbi psichici, cognitivi, motori, sensoriali e autonomici. Secondo studi epidemiologici, circa il 3% della popolazione mondiale ne è afflitta [90].



Figura 23 _ Esempio di registrazione elettroencefalografica. Nel riquadro le alterazioni del tracciato contraddistinguono l'insorgenza e la durata dell'attacco epilettico [88].

Le sue diverse modalità di insorgenza e propagazione nel cervello dimostrano la complessità di questa patologia. Una sua classificazione basata sulla sintomatologia clinica e sul tracciato elettroencefalografico (EGG, principale mezzo di indagine nell'uomo) permette la definizione di due grandi gruppi [229; 230]:

- epilessie generalizzate _ indotte da una scarica che fin dall'esordio coinvolge contemporaneamente estese aree corticali di entrambi gli emisferi cerebrali e del ponte determinando perdita di coscienza ed eventualmente crisi convulsive;
- epilessie parziali o focali _ provocate da una scarica che si origina e rimane confinata in un gruppo di neuroni ristretto di una specifica area celebrale senza portare a perdita di coscienza.

Un'ulteriore metodo che ne considera invece i relativi aspetti eziologici, classifica le epilessie in [229; 230]:

- idiopatiche _ non correlabili a lesioni encefaliche ma a carattere genetico ed età specifiche;
- sintomatiche _ conseguenti a uno o più danni cerebrali prima o dopo la nascita;
- criptogenetiche _ con eziopatogenesi incerta.

Le epilessie idiopatiche sopraggiungono generalmente già dall'infanzia e davvero poche sue forme mostrano base monogenica. Nella maggior parte dei casi infatti sono contraddistinte da un meccanismo più complesso a carattere poligenico in cui un ruolo importante può essere assunto dalle interazioni di tipo ambientale [231; 232; 233]. Le mutazioni coinvolgono geni codificanti per

canali ionici [234; 235; 236; 237; 238], recettori di neurotrasmettitori [239; 240; 241; 242] e persino geni coinvolti in funzioni mitocondriali [243], nello sviluppo corticale e nel metabolismo cellulare [244]. Per questo motivo vengono attualmente denominate epilessie genetiche [245].

Come è stato messo finora in evidenza, queste mutazioni alterano i meccanismi di eccitabilità neuronale modificando di conseguenza il flusso ionico attraverso i canali del plasmalemma. I canali ionici coinvolti appartengono non solo alla classe dei canali attivati da ligando (recettore GABA e recettore nicotinico dell'acetilcolina) o dei canali voltaggio dipendenti (per Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) ma anche al gruppo dei canali HCN, precedentemente descritti nell'INTRODUZIONE GENERALE.

In letteratura è stato ad esempio documentato che una specifica delezione a valle del CNBD (delPPP 719-721) nella sequenza amminoacidica di HCN2 risulta essere epiletto genica [89]. In un recente lavoro del nostro laboratorio [88], abbiamo provato che una mutazione (E515K) localizzata nel C-linker nuovamente di HCN2 scatena fenotipo epiletto.

La corrente $I_{\text{f/h}}$ gioca infatti un ruolo complesso e importante sia a livello dell'eccitabilità di singola cellula che di interi networks [90; 91].

Limitatamente alle epilessie sintomatiche viene loro attribuita un'origine traumatica o patologica. Questo tipo di disturbi si verifica maggiormente durante l'età adulta in seguito a traumi cranici, tumori cerebrali, malattie infettive del sistema nervoso, ictus, postumi di interventi chirurgici al cervello, malattie neurodegenerative e metaboliche. Quindi si è recentemente preferito identificarle come strutturali-metaboliche [245].

Anche in questo ambito è stato dimostrato che alterazioni sia nell'espressione [246] che nella funzione [247] dei canali HCN portano all'insorgenza di forme sintomatiche appartenenti al gruppo delle epilessie del lobo temporale (TLE, Temporal Lobe Epilepsy).

Infine, per alcune delle forme criptogenetiche è stata riconosciuta una causa sintomatica. Di conseguenza, oggi si preferisce definirle piuttosto come probabilmente sintomatiche o di causa sconosciuta [245]. Al contrario delle idiopatiche, le forme criptogenetiche possono insorgere a qualsiasi età esattamente come le sintomatiche.

EPILESSIA DEL LOBO TEMPORALE (TLE)

L'epilessia del lobo temporale (TLE) rappresenta la più comune e severa forma di tipo parziale e sintomatica. Il suo nome deriva appunto dalla zona di cervello da dove originano le relative crisi. È caratterizzata da sclerosi ippocampale e deficit nella memoria [91; 248]. Il focus epiletto nei pazienti affetti da TLE risiede spesso nelle strutture del lobo temporale mesiale come l'ippocampo [91; 249]. La TLE è anche la più comune forma focale di tipo farmaco-resistente. Viene innescata non solo da traumi subiti dal cervello ma anche (come recentemente sostenuto) da alterazioni

genetiche [91; 249; 250; 251]. In entrambi i casi si verificano modificazioni nei networks neuronali che ne scatenano il fenotipo. Queste alterazioni innescano difatti devastanti eventi neurobiologici che conducono ai cambiamenti istologici e biochimici tipici della patologia. L'identificazione dei vari geni e la comprensione dei relativi pathways implicati in questa alterazione espressiva permetterebbe in futuro un possibile intervento. In quest'ottica, la possibilità di alterare (o comunque frenare) lo sviluppo di questa patologia porterebbe quindi a un miglioramento delle condizioni di vita nei pazienti [246].

Anche tra questa forma di epilessia e i canali HCN è stata confermata l'esistenza di un'importante connessione [246; 247].

SCOPO DEL LAVORO

Durante il terzo ed ultimo anno, il mio lavoro di ricerca ha avuto infine come scopo lo screening genetico di pazienti su cui condurre analisi molecolari per identificare eventuali cause genetiche nell'epilessia del lobo temporale (TLE).

I geni di mio interesse sono stati le isoforme cerebrali dei canali HCN (HCN1 e HCN2) e MiRP1, codificante per una loro proteina accessoria. I risultati finora ottenuti hanno permesso di riscontrare solo la presenza di polimorfismi già presenti in letteratura. Questo screening è attuato con la speranza di individuare eventuali nuove mutazioni coinvolte nella patogenesi di questa forma epilettica.

REPERIMENTO CAMPIONI PER LO SCREENING

Sono stati sottoposti allo screening pazienti epilettici di età adulta affetti da epilessia del lobo temporale (Temporal Lobe Epilepsy, TLE).

Il materiale genetico è stato estratto da campioni di sangue intero ottenuti tramite prelievo, provenienti da una struttura ospedaliera con cui abbiamo in essere una collaborazione. Prima di procedere alla loro analisi è stato ovviamente acquisito il consenso informato di tutti i soggetti coinvolti in questo studio.

ESTRAZIONE DI DNA DA SANGUE INTERO

Il materiale genomico è stato ottenuto utilizzando il kit QUIAGEN REPLI-g UltraFast MINI (Quiagen), che garantisce amplificazione del DNA genomico ma in maniera frammentata (di lunghezza media sopra i 10 kb e compresa tra 2 kb e 100 kb).

I campioni con cui ho lavorato sono stati estratti mediante il seguente protocollo standard.

Il primo dei suoi passaggi obbliga l'operatore a preparare un volume sufficiente di Buffer D2 per il numero di totale di campioni da trattare. Questo buffer è molto importante in quanto permette la denaturazione del DNA. In ciascuna eppendorf (su cui è stato precedentemente scritto il codice alfanumerico dello specifico campione) si va ad unire 1 μ L di PBS con 0.5 μ L di sangue. Lo step successivo prevede l'aggiunta di 1.5 μ L di Buffer D2. Dopo aver lasciato i vari campioni a incubare per 10min in ghiaccio, aggiungo poi 1.5 μ L di Stop Solution. Dopo lo scongelamento della REPLI-g UltraFast DNA Polymerase in ghiaccio e degli altri componenti a temperatura ambiente, preparo una master mix come indicato nella tabella 9.

| Componenti | Volume/reazione |
|---------------------------------------------|-----------------------------|
| REPLI-g UltraFast Reaction Buffer | 15 μ L |
| REPLI-g UltraFast DNA Polymerase | 1 μ L |
| Volume totale - per singolo campione | 16 μL |

Tabella 9 _ Preparazione della Master Mix del kit QUIAGEN REPLI-g UltraFast MINI (Quiagen).

Una volta pronta, unisco 16 μ L di questa mix ai 4.5 μ L di volume contenente il DNA denaturato e lascio quindi i campioni a incubare per 1.5h a 30° C. Trascorso questo lasso temporale, si provvede a inattivare la REPLI-g UltraFast DNA Polymerase scaldando i campioni per 3min a 65° C.

A questo punto, il DNA è stato estratto e amplificato e posso quindi conservare i vari campioni a -20° C fino al momento del loro utilizzo.

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

La quantificazione del materiale genomico è stata realizzata tramite elettroforesi su gel di agarosio oppure avvalendosi della lettura allo spettrofotometro. Limitatamente all'impiego dell'elettroforesi, un'aliquota di campione viene caricata in un pozzetto di un gel di agarosio all'1% (g/100mL). La qualità di intensità della banda viene quindi comparata a quella delle bande che costituiscono il marker di dimensioni note (1kb DNA Ladder, Fermentas™) fatto correre in un pozzetto diverso dello stesso gel.

Lo spettrofotometro (Ultrospec 1100 Pro, Amersham Biosciences™) è uno strumento in grado di leggere l'assorbanza del campione a diverse lunghezze d'onda (λ). La concentrazione di DNA è stata ricavata eseguendo la lettura a 260nm. Per capire e determinare la purezza relativa di ogni campione, viene ogni volta fatta anche una contemporanea lettura a 280nm. Questo valore permette di rilevare l'eventuale contaminazione da proteine. Tale lunghezza d'onda corrisponde infatti al picco di assorbimento delle proteine; convenzionalmente la soluzione si considera pura se il rapporto tra l'assorbanza a 260 e quella a 280 è superiore a 1,7 mentre contaminata da proteine se il rapporto risulta inferiore.

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che, basandosi sulla reazione di replicazione in vitro del DNA catalizzata dall'enzima Taq polimerasi (una DNA polimerasi batterica resistente alle alte temperature), consente di ottenere un elevato numero di copie di uno specifico frammento di DNA. Oltre al filamento stampo, all'enzima Taq servono due sequenze oligonucleotidiche a singolo filamento che fungono da innesco per la sintesi. Queste sequenze (solitamente lunghe circa 20 nucleotidi) vengono definite primers e risultano essere esattamente complementari alle estremità del frammento da amplificare. Di conseguenza, per la reazione di PCR servono sia un primer FORWARD (5'→3') che un primer REVERSE (3'→5'), ai quali la polimerasi aggiunge nucleotidi (dNTPs) in direzione 5'→3'. È essenziale che i primers abbiano elevata specificità per la sequenza d'interesse.

La PCR prevede il ripetersi di cicli di amplificazione. Ognuno di questi cicli è diviso in tre fasi, caratterizzate ciascuna da altrettante diverse temperature:

- DENATURAZIONE _ fase in cui viene raggiunta la temperatura di 95° C che determina quindi la rottura dei legami idrogeno presenti tra le basi complementari. In questo modo, le due eliche che compongono la sequenza stampo vengono separate;
- APPAIAMENTO O ANNEALING _ fase in cui i due primers si legano alle singole eliche. Avviene a una temperatura specifica per i due primers, generalmente compresa tra i 50° e i 60° C;

- ESTENSIONE _ fase in cui la Taq polimerasi allunga i filamenti aggiungendo dNTPs ai primers in direzione 5'→3'. Si verifica a 72° C. Questo valore rappresenta infatti la temperatura ottimale per il funzionamento dell'enzima (la cui velocità di sintesi si attesta mediamente intorno ai 1kb/min).

L'appaiamento rappresenta un punto critico che influenza la specificità della reazione: la sua temperatura corrisponde alla differenza tra le temperatura di melting (T_m) dei due primers meno 5° C. Ogni primer è infatti caratterizzato da una propria T_m, differente in base alla lunghezza del suo costruito e al suo contenuto in GC. Ai fini pratici è infatti noto che maggiore è la somiglianza tra i valori delle T_m, tanto più efficace sarà la reazione di PCR. La scelta di una temperatura di annealing a cui entrambi i primers riescano ad appaiarsi correttamente alla propria elica complementare è infatti garanzia di un risultato migliore.

Per ogni reazione di amplificazione è stata utilizzata una mix di reazione la cui composizione è schematizzata nella tabella 10.

| | Concentrazione iniziale | Concentrazione finale |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------|
| DNA | 100ng | 4ng/μL |
| PCR Buffer | 10X | 1X |
| GC-rich solution | 5X | 1X |
| dNTPs | 100mM (per ogni dNTP) | 2mM (per ogni dNTP) |
| Primer forward | 25μM | 1.25μM |
| Primer reverse | 25μM | 1.25μM |
| Taq-polimerasi | 5U/μL | 0.05U/μL |
| H ₂ O MilliQ | Fino al raggiungimento del volume finale di 50μL totali | |

Tabella 10 _ Composizione della mix per le varie reazioni di PCR.

In questo progetto di screening, abbiamo iniziato (e stiamo tutt'ora portando avanti) l'analisi dei geni KCNE2, hHcn1 e hHcn2. Al fine di ottimizzare sia l'amplificazione che il sequenziamento, abbiamo deciso di dividere in più parti alcuni degli otto esoni che costituiscono i geni delle due isoforme dei canali HCN presi in esame. Queste suddivisioni rappresentano gli ampliconi delle reazioni di PCR come indicato nelle tabelle 12 e 13. Consistendo invece di un unico esone, il gene KCNE2 (codificante per MiRP1) è stato amplificato interamente alle condizioni descritte nella tabella 11.

ANALISI DEL SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento degli amplificati viene eseguito da una ditta esterna (Bio-Fab research srl).

L'analisi della sequenza nucleotidica dei vari campioni viene successivamente compiuta nel nostro laboratorio avvalendoci degli opportuni software (Chromas Lite, GeneDoc) grazie ai quali viene confrontata la sequenza dei diversi campioni con quella *wild type* di riferimento.

Lo scopo di questo lavoro è identificare eventuali mutazioni coinvolte nella patogenesi della epilessia.

| MiRP1 - Amplicone | PCR (95°x5',...,72°x5',4°x1') | Cicli | Lunghezza | Primer forward | Primer reverse |
|-------------------|----------------------------------|-------|-----------|-----------------------|----------------------|
| Unico | 95°x30'' | 30 | 453 | CCTTGTTTCGCTATTTTATTA | GGACGTCAGATGTTAGCTTG |
| | 57.5°x30'' | | | | |
| | 72°x60'' | | | | |

Tabella 11 _ Condizioni della PCR per l'amplificazione dell'unico amplicone di KCNE2, gene della proteina MiRP1.

| HCN1 - Ampliconi | PCR (95°x5',...,72°x5',4°x1') | Cicli | Lunghezza | Primer forward | Primer reverse |
|------------------|----------------------------------|-------|-----------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1.1-1.2 | 95°x40'' | 35 | 368 | TACCCTCTCGGCTACGTGTC | TACCCTCTCGGCTACGTGTC |
| | 60.5°x40'' | | | | |
| | 72°x40'' | | | | |
| 1.2-1.3 | 95°x30'' | 35 | 447 | GGACGATGGCAACAGCGTCT | GCGGGGAAGCGGTTTCA |
| | 59°x30'' | | | | |
| | 72°x40'' | | | | |
| 2 | 95°x1' | 35 | 620 | GGGGATAGGCTGGTTATTT | CATGGAAAAGAGTCGTCGAA |
| | 60°x1' | | | | |
| | 72°x1'30'' | | | | |
| 3 | 95°x1' | 33 | 301 | ACGCTACACAACATCAATGC | GGCACAACGTTGAAAAGTCA |
| | 58°x1' | | | | |
| | 72°x1'30'' | | | | |
| 4 | 95°x1' | 33 | 301 | GCCATCCTAATGGCTCAGTC | TGTTAAAGACATTGGCGATA |
| | 58°x1' | | | | |
| | 72°x1'30'' | | | | |
| 5 | 95°x1' | 33 | 287 | TGATTTCTGATACACCTA ACAAT | AACGTGGACTAGAAGATT CTCCA |
| | 58°x1' | | | | |
| | 72°x1'30'' | | | | |
| 6 | 95°x1' | 35 | 395 | TTCAGCATGTTTTTCTTCCAGA | CTGACATGCTGACATCTCCAAA |
| | 58°x1' | | | | |
| | 72°x1'30'' | | | | |
| 7 | 95°x1' | 30 | 264 | TCAAACAAGTCATTCTTCTT TGTTG | GCAAACCTGTATTATGCCAGGA |
| | 60°x1' | | | | |
| | 72°x1'30'' | | | | |
| 8.1-8.3 | 95°x1'' | 30 | 596 | TCTCACTGGCGTTGTCATC | CGTGCTCTGTGCACTTCAT |
| | 60°x1'' | | | | |
| | 72°x1'30'' | | | | |
| 8.4-8.5 | 95°x1' | 35 | 506 | CCGCTCGAACTTCCACTAT | TGCGTCTGGGTCTGTGTTTA |
| | 56°x1' | | | | |
| | 72°x1'30'' | | | | |
| 8.6 | 95°x45'' | 35 | 265 | GTCACCTCTCCGACAGAT | CTTCATAGTAGGCTAGAGGG |
| | 58°x45'' | | | | |
| | 72°x1' | | | | |

Tabella 12 _ Condizioni delle PCR per l'amplificazione dei vari ampliconi in cui è stato diviso il gene della proteina HCN1.

| HCN2 - Ampliconi | PCR (95°x5',...,72°x5',4°x1') | | Cicli | Lunghezza | Primer forward | Primer reverse | | | | |
|------------------|-------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|----|-----|----------------------------------|-------------------------------|
| Esone 1 | Non ancora ottenuto l'intero amplificato | | | | | | | | | |
| 1.3 | TD | 95°x30" | 15 | 236 | AGCTTCATGCAGCGCCAG | CTCCCCAGGCGCTCCAAG | | | | |
| | | 65.2°x30" | | | | | | | | |
| | | (-0.5° per ciclo) | | | | | | | | |
| | | 72°x30" | | | | | | | | |
| | | 95°x30" | | | | | | | | |
| | | 58.2°x30" | 20 | | | | | | | |
| | | 72°x30" | | | | | | | | |
| | | 95°x1' | | | | | 7 | 419 | CTACTGGGACTTCACCATGCTGC TGITC | CCTCCCCTGATGGATGTAGCG GATC |
| | | 70°x1' | | | | | | | | |
| | | 72°x1'30" | | | | | | | | |
| 95°x1' | | | | | | | | | | |
| 68°x1' | | | | | | | | | | |
| 2 intraesonico | TD | 72°x1'30" | 7 | | | | | | | |
| | | 95°x1' | | | | | | | | |
| | | 66°x1' | | | | | 7 | | | |
| | | 72°x1'30" | | | | | | | | |
| | | 95°x1' | | | | | | | | |
| 64°x1' | | | | | | | | | | |
| 72°x1'30" | | | | | | | | | | |
| 2 lungo | | 95°x30" | 30 | 508 | CGTCCCCCAAGGAAGAGT | CCTCCCCTGATGGATGTAGC GGATC | | | | |
| | | 59°x30" | | | | | | | | |
| | | 72°x40" | | | | | | | | |
| | | 95°x30" | | | | | 30 | 277 | GCTGGGGCTCTGAAGGTG | CTGTATGGGAGCCTGCGTCT |
| | | 61°x30" | | | | | | | | |
| 72°x30" | | | | | | | | | | |
| 95°x35" | 35 | 327 | GAGGACCGAGGGCTCCTG | GCCTCCCCATCAGAACC | | | | | | |
| 66.3°x35" | | | | | | | | | | |
| 72°x35" | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | TD | 95°x30" | 30 | 214 | GACCCAGCCTCGCCTCCTCC | GTACCGGAGGCTGCCTCCCGC |
| | | | | | | 70°x30" | | | | |
| | (-0.5° per ciclo) | | | | | | | | | |
| 6 | TD | 72°x30" | 15 | 392 | TCTCTCAGACGAGGAAACTGG | GTGCCCTCCCTCCAG | | | | |
| | | 95°x30" | | | | | | | | |
| | | 65.6°x30" | | | | | | | | |
| | | (-0.5°x ciclo) | | | | | | | | |
| | | 72°x40" | | | | | | | | |
| 7 | TD | 95°x30" | 20 | 280 | GCGCCGCTCGTCCAGCAAC | TCTCCTGATGCCTTGCCACGC | | | | |
| | | 71.5°x30" | | | | | | | | |
| | | (-0.5° per ciclo) | | | | | | | | |
| | | 72°x30" | | | | | | | | |
| | | 95°x30" | | | | | | | | |
| 8.1 | | 64.5°x30" | 30 | 281 | GCAGGCGCTCCTGTGCACAC | GCCACCTGCGGGCAGAAGCTC | | | | |
| | | 72°x30" | | | | | | | | |
| | | 95°x30" | | | | | | | | |
| Esone 8 | Non ancora ottenuto l'intero amplificato | | | | | | | | | |

Tabella 13 _ Condizioni delle PCR per l'amplificazione dei vari ampliconi in cui è stato diviso il gene della proteina HCN2.

SCREENING GENETICO DELLE ISOFORME hHCN1, hHCN2 E DELLA PROTEINA ACCESSORIA MiRP1 IN PAZIENTI AFFETTI DA EPILESSIA DEL LOBO TEMPORALE.

Durante il mio terzo ed ultimo anno ho collaborato nel progetto di screening genetico dell'epilessia del lobo temporale (Temporal Lobe Epilepsy, TLE), conducendo quindi analisi molecolari mirate ad identificare eventuali cause genetiche in questo tipo di disordine neurologico.

Questo progetto è giustificato dal fatto che l'espressione dei canali HCN non è limitata soltanto al cuore ma è anche presente a livello del sistema nervoso centrale (SNC) [11; 30; 50]. In questo importante distretto, i canali HCN e la loro corrente $I_{f/h}$ agiscono come modulatori dell'eccitabilità neuronale [90; 91].

Appare quindi chiaro che loro mutazioni genetiche o comunque alterazioni nel loro funzionamento o nella loro espressione determinano l'insorgenza di alcune patologie del SNC, quale ad esempio l'epilessia [88; 89].

Verificare se in questi pazienti le anomalie di tale corrente sono dovute a difetti strutturali nei geni degli HCN e/o nelle relative proteine regolatrici permetterebbe quindi al nostro laboratorio di studiarne le importanti relazioni che causano il fenotipo patologico. Per questo motivo, il nostro laboratorio è interessato a condurre lo screening dei geni hHCN1, hHCN2 e del gene della proteina accessoria MiRP1 in pazienti affetti da TLE con lo scopo di indagare la presenza di mutazioni o polimorfismi nelle relative sequenze codificanti.

Il materiale genetico è stato ottenuto tramite estrazione da sangue intero. Limitatamente ai geni di HCN1 e HCN2, i relativi esoni sono stati suddivisi in più ampliconi e quindi amplificati tramite PCR. Dato che il gene di MiRP1 è invece costituito da un unico esone, per il suo screening abbiamo provveduto ad amplificarlo direttamente e interamente. I prodotti di PCR ottenuti vengono di conseguenza sequenziati e allineati con la corrispondente sequenza *wild type*. Nel caso in cui venga trovata un'eventuale mutazione, questa verrà quindi analizzata tramite espressione eterologa del canale mutato in eterozigosi e in omozigosi al fine di valutare se la mutazione comporta modifiche alla corrente $I_{f/h}$.

Da quando è iniziato questo tipo di screening, ho sempre cercato di trovare le migliori condizioni su cui impostare le PCR. L'obiettivo di questi tentativi è mirato ad ottenere amplificati validi da inviare quindi alla ditta che si occupa del relativo sequenziamento.

I tentativi di settaggio delle condizioni di PCR sono stati resi più difficile anche dalla qualità del materiale genetico di partenza, estratto con il kit QUIAGEN REPLI-g UltraFAst MINI (Quiagen) che

garantisce amplificazione del DNA genomico ma in maniera frammentata (con una lunghezza media sopra le 10kb e compresa tra i 2kb e 100kb).

hHCN1

Lo screening del gene hHCN1 è stato completato in soli 5 pazienti in cui non sono state rilevate né mutazioni o polimorfismi. Per gli altri campioni purtroppo non siamo sempre riusciti ad ottenere amplificati che permettessero poi l'allineamento con la sequenza *wild type* di riferimento. Lo stato attuale dello screening risulta perciò frammentato. Analizzando in 20 pazienti l'amplicone 2 dell'esone 1, abbiamo però identificato un polimorfismo come mostrato nella tabella 14.

In questo paziente il polimorfismo è rappresentato da una delezione di 2 glicine nel tratto poliglicinicico presente all'estremità N-terminale della proteina. Questa sequenza di dodici glicine consecutive è soggetta a delezioni di alcuni dei suoi amminoacidi non polari [252]. Come appunto riportato in letteratura [252], l'allele con tutte e 12 le glicine (G12) è considerato l'allele dominante mentre quelli che presentano la delezione di 2 o 3 glicine rappresentano le varianti alleliche minori. Dato che questi alleli vengono trovati con frequenza simile sia in individui sani che in epilettici, i ricercatori sono quindi portati a ritenere che la mutazione non comporti problemi nella funzionalità del canale HCN1.

| Esone | Cambio nucleotidico | Cambio amminoacidico | Funzione | Presenza nel dbSNP | Numero pazienti |
|-------|---------------------|----------------------|-----------|--------------------|-----------------|
| 1 | 202_207 delGGCGGC | Del 2 Gly _ 73,74 | Delezione | rs56063136 | 1 su 20 |

Tabella 14 _ Risultati dello screening di hHCN1

hHCN2

Anche nel caso del gene hHCN2 non siamo sempre stati purtroppo in grado di ottenere amplificati che permettessero una loro analisi. Differentemente da hHCN1, abbiamo però ottenuto un maggior numero di dati (tabella 15), rappresentati da 12 polimorfismi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) già segnalati nella relativa banca dati del *National Center for Biotechnology Information* (dbSNP, NCBI) o comunque presenti in letteratura Trattandosi tutte di mutazioni sinonime (che non portano cioè a cambiamenti nella struttura amminoacidica della proteina), è da escludere quindi la loro associazione a fenotipo patologico. Nello specifico, un allele viene definito polimorfico se presente in almeno l'1% della popolazione, mentre nel caso in cui sia al di sotto dell'1% viene definito mutazione.

| Esone | Cambio nucleotidico | Cambio amminoacidico | Funzione | Presenza dbSNP | Numero pazienti |
|-------|---------------------|-----------------------------|----------|----------------|-----------------|
| 2 | 714 T→C | D238D (Acido Aspartico) | Sinonimo | rs56342526 | 2 su 5 |
| 2 | 723 T→C | T241T (Treonina) | Sinonimo | rs56131056 | 2 su 5 |
| 2 | 858 T→C | Y286Y (Tirosina) | Sinonimo | rs55659726 | 2 su 5 |
| 2 | 915 C→T | F305F (Fenilalanina) | Sinonimo | rs56170955 | 2 su 5 |
| 2 | 963 C→T | R321R (Arginina) | Sinonimo | rs55780677 | 1 su 5 |
| 3 | 1089 G→A | A363A (Alanina) | Sinonimo | rs55839339 | 1 su 13 |
| 3 | 1167 T→C | P389P (Prolina) | Sinonimo | rs12981860 | 13 su 13 |
| 4 | 1239 G→C | L413L (Leucina) | Sinonimo | rs3752158 | 3 su 11 |
| 5 | 1452 G→A | E484E (Acido Glutammico) | Sinonimo | rs34397648 | 1 su 15 |
| 5 | 1542 C→T | D514D (Acido Aspartico) | Sinonimo | rs141337133 | 1 su 15 |
| 6 | 1644 C→T | A548A (Alanina) | Sinonimo | rs2301778 | 2 su 3 |
| 7 | 1862 T→C | A624A (Alanina) | Sinonimo | rs1054786 | 3 su 7 |

Tabella 15 _ Risultati dello screening di hHCN2

MiRP1

Data la non ottima qualità dei campioni, anche per il gene della proteina MiRP1 non abbiamo sempre ottenuto amplificati che permettessero una loro analisi. Nonostante ciò, lo screening di questa sequenza genica è stato completato per 20 pazienti. Il relativo amplificato comprende tutta la porzione codificante del relativo gene e le zone fiancheggianti. Limitatamente ai campioni esaminati, non sono stati individuati polimorfismi e/o mutazioni.

Come riportato in letteratura i canali HCN sono espressi anche a livello del sistema nervoso centrale (SNC) [15; 23; 24] dove, insieme agli tipi di canali ionici presenti (tra i quali quelli del Na^+ , del K^+ , del Ca^{2+} e del Cl^-), ne controllano la corretta fisiologia. I canali HCN attraverso la loro corrente $I_{f/h}$ regolano infatti l'eccitabilità neuronale integrando correttamente stimoli inibitori ed eccitatori [11; 203]. Il corretto funzionamento di questi canali è importante a livello non soltanto di singolo neurone ma anche di interi networks [90; 91]. Le isoforme maggiormente espresse a livello del sistema nervoso sono HCN1 e HCN2 [23]. E' stato infatti dimostrato che loro mutazioni genetiche o comunque alterazioni nel loro funzionamento o nella loro espressione causano l'insorgenza di alcune patologie del SNC, quale ad esempio l'epilessia [88; 89].

L'epilessia è una patologia molto complessa appunto caratterizzata da disordini neurologici. Dal punto di vista clinico questa disfunzione si manifesta attraverso attacchi ricorrenti (definiti *seizures*) ed esistono due tipi contemporanei di classificazione. In base alla sua sintomatologia clinica, si parla di epilessie generalizzate (compromettenti l'intero encefalo) e di epilessie parziali (o focali, se coinvolgono un'area cerebrale confinata) [245].

Da un punto di vista eziologico vengono invece recentemente classificate come: genetiche (derivate da alterazioni nelle sequenze nucleotidiche codificanti per proteine specifiche), strutturali-metaboliche (conseguenti a uno o a più danni cerebrali oppure ad alterazioni metaboliche) e di causa sconosciuta [245].

Proprio per le importanti funzioni svolte dalla corrente $I_{f/h}$ nel SNC, abbiamo quindi deciso di intraprendere lo screening dei geni hHcn1, hHcn2 e KCNE2 (codificanti rispettivamente per hHCN1, hHCN2 e MiRP1, loro proteina regolatrice) in pazienti affetti da epilessia del lobo temporale (temporal lobe epilepsy, TLE).

Anche se questo tipo di epilessia viene classificata come strutturale-metabolica di tipo focale (nonché farmaco-resistente), da poco è stato dimostrato essere innescata anche da alterazioni genetiche [91; 249; 250; 251].

Lo screening di questi campioni è iniziato da poco ed è reso complicato dalla qualità del materiale genetico di partenza, in quanto estratto con un kit che garantisce amplificazione del DNA in maniera frammentata (QUIAGEN REPLI-g UltraFast MINI, Quiagen). Al fine di ottenere amplificati di qualità da spedire alla ditta specializzata nel loro sequenziamento, l'esecuzione di tentativi mirati a definire le migliori condizioni di PCR ha inoltre contribuito a rallentare questo lavoro di screening. Lo scopo preliminare di questo progetto mira ad individuare eventuali modificazioni nella sequenza

nucleotidica di questi geni e (una volta trovate) di studiarne quindi un loro possibile coinvolgimento con la patologia.

I risultati finora ottenuti hanno permesso di identificare 1 sola delezione in hHCN1 e 12 polimorfismi in hHCN2.

L'unica delezione trovata coinvolge un tratto poliglicinico nella proteina hHCN1 che interessa le Gly in posizione 72 e 73 (rs56063136). Questo tipo di mutazione non viene considerata patogenetica ma addirittura una variante allelica minore contrapposta a quella dominante (caratterizzata appunto da tutte e 12 le glicine e considerata come sequenza *wild type*) [252]. Poiché queste varianti alleliche si riscontrano con frequenza simile sia in individui sani che in epilettici, i ricercatori ritengono pertanto che questo tipo di mutazione non comporti problemi nella funzionalità del canale HCN1.

Limitatamente ai 12 polimorfismi (single nucleotide polymorphism, SNP) trovati nella sequenza nucleotidica di hHCN2, abbiamo riscontrato essere tutti di tipo sinonimo e cioè non alteranti la sequenza amminoacidica della proteina (pertanto non portatori di effetti patologici).

Il passaggio successivo all'analisi genetica è rappresentato dalla comprensione dei meccanismi che ne scatenano il fenotipo patologico. L'identificazione di eventuali mutazioni e la loro espressione in sistemi eterologhi su cui effettuare analisi elettrofisiologiche assume infatti notevole importanza anche in termini terapeutici, in quanto può fornire indicazioni utili al miglioramento delle cure al momento disponibili. Questo tipo di approccio costituisce una pratica oramai abituale soprattutto nel testare farmaci correttivi delle disfunzioni aritmiche cardiache. Il trasferimento di questo schema di lavoro nell'analisi dell'epilessia consentirebbe non solo di comprendere meglio la sua patogenesi ma anche successivamente di migliorarne e personalizzarne il trattamento terapeutico.

Nonostante l'aumento del numero delle opzioni farmacologiche, ancora fino al 30% dei pazienti epilettici non raggiunge purtroppo il controllo delle crisi con i farmaci oggi disponibili. Per molti altri malati, gli effetti avversi o le controindicazioni rendono questi stessi farmaci opzioni non sostenibili costringendoli a considerare quindi il trattamento chirurgico come ultima e unica opzione.

L'azione di questi farmaci (classificati come *antiepilettici*) è indirizzata ai soli sintomi (le crisi) dell'epilessia. Stabilizzando le proprietà elettriche della membrana dei neuroni, impediscono in questo modo la generazione di scariche elettriche spontanee.

Tra le forme focali di tipo farmaco-resistente, la TLE rappresenta una tra le più citate in letteratura. Quindi potere trovare un trattamento che superi questa forma di resistenza renderebbe la vita di chi ne soffre meno difficile.

Una volta analizzati tutti e tre i geni per tutti questi pazienti, un possibile indirizzo futuro potrebbe prevedere l'analisi di sequenze geniche specifiche di altre proteine regolatrici dei canali HCN, come ad esempio TRIP8b o Filamina A [12; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77].

In conclusione, l'epilessia è una patologia complessa che si manifesta in più varianti caratterizzate da sintomi differenti. L'individuazione delle cause molecolari delle singole sindromi epilettiche diventa quindi necessaria per potere non solo comprendere i meccanismi che determinano la diversità nei sintomi ma anche per impostarne o potenziarne la terapia. La possibilità di ricorrere a studi di Genome-Wide Association (GWAS) per soddisfare analisi contemporanee di più geni di interesse, snellirebbe i tempi necessari ad individuare cause genetiche e a collegarle quindi allo specifico fenotipo patologico. Le scoperte di mutazioni in geni specifici del genoma umano trovano infatti risvolto sia nella farmacogenetica che nella farmacogenomica, permettendo in quest'ottica di impostare più facilmente nuove terapie personalizzate e di risolvere così le problematiche derivanti da effetti collaterali e perfino l'inefficacia dei farmaci attualmente in uso.

CONCLUSIONI GENERALI

CONCLUSIONI GENERALI

Nonostante siano trascorsi circa trent'anni dalla prima scoperta della $I_{f/h}$ nel cuore [48] e quasi vent'anni dal clonaggio dei canali HCN [5; 6; 7; 8; 10; 16; 36; 253; 254; 255, 256], lo studio in questo ambito continua a richiamare l'attenzione di numerosi gruppi di ricerca.

L'identificazione degli HCN e la loro correlazione alla $I_{f/h}$ hanno infatti permesso ai ricercatori non solo di studiarne la struttura ma anche la loro implicazione nella genesi della corrente. Queste proteine svolgono infatti un ruolo fondamentale nel controllo di processi fisiologici vitali, quali la capacità di iniziare e governare l'autoritmicità cardiaca e la regolazione dell'eccitabilità neuronale [4; 11; 12]. La loro complessa funzione dipende non soltanto dal tipo di subunità espressa o dalle loro interazioni a livello di singola cellula, ma anche dal particolare contesto tissutale in cui si trovano [30]. Alterazioni nella sequenza genica degli HCN (o anche in quella delle loro proteine regolatrici) causano infatti l'insorgenza di stati patologici riconducibili alle canalopatie. Le disfunzioni in queste proteine a livello del distretto cardiaco provocano infatti aritmie [14; 86], mentre quelle a carico del sistema nervoso centrale (SNC) scatenano diverse forme di epilessia [88; 89]. Le conoscenze acquisite finora ci permettono quindi di iniziare a considerare questi canali come un target su cui impostare terapie.

L'ivabradina rappresenta un farmaco bradicardizzante sviluppato in quest'ottica. Agendo direttamente sul poro del canale HCN4 [257], questo farmaco inibisce in maniera selettiva e mirata la $I_{f/h}$ riducendo così la frequenza cardiaca. La sua specificità evita perciò che si verifichino gli effetti indesiderati tipici dei β -bloccanti (come broncospasmo, riduzione della contrattilità del miocardio, della conduzione del sistema cardiaco o della resistenza vascolare periferica).

Impiegando cardiomiociti senoatrial-like derivati da iPSCs umane di paziente con aritmia, lo sviluppo di un relativo pacemaker biologico consentirebbe di testare in vitro nuove molecole cardioattive in modo da scoprire nuovi farmaci più specifici o comunque migliorare quelli già disponibili in commercio.

In modo parallelo, l'utilizzo di neuroni derivati da iPSCs umane di paziente epilettico consentirebbe ai ricercatori di sviluppare modelli di aree cerebrali in vitro. Certamente molto più semplificati rispetto alla complessa architettura del SNC, questo tipo di substrati rappresenterebbero comunque una soluzione di compromesso in vitro indiscutibilmente migliore rispetto alla classica espressione in sistema eterologo di mutazioni di interesse su cui condurre analisi elettrofisiologiche. I ricercatori potrebbero così condurre le relative analisi su porzioni di organi umani altrimenti non accessibili. La comprensione dei meccanismi scatenanti l'epilessia potrebbe quindi aiutare ad impostare un eventuale trattamento valutando in quel contesto l'efficacia dei farmaci antiepilettici disponibili o comunque di nuove molecole.

L'analisi elettrofisiologica di queste mutazioni facilita innanzitutto la comprensione dei meccanismi epilettogenici e quindi potrebbe contribuire a migliorare anche quelle terapie che ancora oggi risultano inefficaci per alcuni pazienti.

I lavori pubblicati finora in letteratura dimostrano appunto l'importante ruolo che i canali HCN e la loro corrente $I_{f/h}$ svolgono sia nell'eccitabilità cardiaca che in quella neuronale. Qualsiasi tipo di alterazione nella loro sequenza amminoacidica causa patologie che limitano la qualità di vita per il paziente. In questo contesto, lo sviluppo di trattamenti più efficaci e privi di effetti collaterali garantirebbe ai pazienti una vita migliore.

BIBLIOGRAFIA

1. LIBRO DI NEUROFISIOLOGIA: **Principi di Neuroscienze** _ Kandel ER, Schwartz JH e Jessel TM, cap.7+8+9, p127-172
2. **DiFrancesco D and Tortora P.** *Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP.* Nature (1991), Volume 351: 145-147
3. **Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A and DiFrancesco D.** *Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels.* J. Gen. Physiol. Rockefeller University Press Volume 117 (2001): 519–532
4. **DiFrancesco D.** *The role of the funny current in pacemaker activity.* Circ Res. 2010;106:434-446
5. **Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F and Biel M.** *A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels.* Nature, Volume 393 (1998): 587-591
6. **Santoro B, Grant SGN, Bartsch D and 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 Vol. 94 (1997), pp. 14815–14820
7. **Gauss R, Seifert R and Kaupp UB.** *Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm.* Nature (1998), Volume 393: 583-587
8. **Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M and DiFrancesco D.** *The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart.* Biochimica et Biophysica Acta 1446 (1999) 419-425
9. **Ishii TM, Takano M, Xie L, Noma A and Ohmori H.** *Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node.* The Journal Of Biological Chemistry Vol. 274 (1999), No. 18, pp. 12835–12839
10. **Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P and 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) Vol. 96, pp. 9391–9396
11. **Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S and Zong X.** *Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function.* Physiol Rev (2009) 89: 847-885
12. **Wahl-Schott C and Biel M.** *HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function.* Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 470 – 494

13. **Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R and Gouaux E.** *Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels.* Nature, Volume 425 (2003): 200-205
14. **Baruscotti M, Bottelli G, Milanesi R, DiFrancesco JC and DiFrancesco D.** *HCN-related channelopathies.* Pflugers Arch - Eur J Physiol (2010) 460:405–415
15. **Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F and Ludwig A.** *Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues.* Eur. J. Biochem. 268, 1646-1652 (2001)
16. **Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, and Tibbs GR.** *Identification of a gene encoding a Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channel of brain.* Cell (1998), Vol. 93, 717-729
17. **Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D and Cohen IS.** *Distribution and prevalence of Hyperpolarization-Activated Cation Channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues.* Circ. Res. 1999;85:e1-e6
18. **Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A and DiFrancesco D.** *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I_f .* J. Biol. Chem. 2001, 276:29233-29241
19. **Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D and Demolombe S.** *Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart.* J Physiol 562.1 (2005): 223-234
20. **Tellez JO, Dobrzynski H, Greener ID, Graham GM, Laing E, Honjo H, Hubbard SJ, Boyett MR and Billeter R.** *Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and Sinoatrial Node in rabbit.* Circ Res. 2006;99:1384-1393
21. **Liu J, Noble PJ, Xiao G, Abdelrahman M, Dobrzynski H, Boyett MR, Lei M, Noble D.** *Role of pacemaking current in cardiac nodes: Insights from a comparative study of sinoatrial node and atrioventricular node.* Progress in Biophysics and Molecular Biology 96 (2008) 294–304
22. **Santoro B and Tibbs GR.** *The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels.* Annals New York Academy Of Sciences (1999) Apr 30;868:741-64
23. **Notomi T and Shigemoto R.** *Immunohistochemical localization of I_h channel subunits, HCN1–4, in the rat brain.* The Journal of Comparative Neurology 471:241-276 (2004)

24. **Herrmann S, Stieber J and Ludwig A.** *Pathophysiology of HCN channels.* Pflugers Arch - Eur J Physiol (2007) 454:517–522
25. **Ulens C and Tytgat J.** *Functional Heteromerization of HCN1 and HCN2 Pacemaker Channels.* The Journal of Biological Chemistry (2001) Vol. 276, No. 9, Issue of March 2, pp. 6069–6072
26. **Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D.** *Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node.* J Physiol. 2003 Jun 1;549: 347–359
27. **Biel M, Schneider A and Wahl C.** *Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation.* TCM Vol. 12, No. 5, 2002
28. **Chen J, Mitcheson JS, Lin M, Sanguinetti MC.** *Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel.* J. Biol. Chem. (2002) 275:36465-36471
29. **Kaupp UB and Seifert R.** *Molecular diversity of pacemaker ion channels.* Annu. Rev. Physiol. 2001. 63:235-57
30. **Robinson RB and Siegelbaum SA.** *Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function.* Annu Rev Physiol. 2003. 65:453-80
31. **Ye B, Balijepalli RC, Foell JD, Kroboth S, Ye Q, Luo Y and Shi N.** *Caveolin-3 associates with and affects the function of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel 4.* Biochemistry. 2008 November 25; 47(47): 12312-12318
32. **Tran N, Proenza C, Macri V, Petigara F, Sloan E, Samler S and Accili EA.** *A conserved domain in the NH2 terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels.* J. Biol. Chem. 2002, 277:43588-43592
33. **Accili EA, Proenza C, Baruscotti M and DiFrancesco D.** *From Funny Current to HCN Channels: 20 years of excitement.* News Physiol. Sci. Volume 17 (2002): 32-37
34. **Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA and Tibbs GR.** *Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels.* Nature (2001) Volume 411: 805-810
35. **Wu J and Cohen IS.** *Tyrosine kinase inhibition reduces if in rabbit sinoatrial node myocytes.* Pflugers Arch - Eur J Physiol (1997) 434:509-514
36. **Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F and Biel M.** *Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics.* The EMBO Journal Vol.18 No.9 pp.2323–2329, 1999

37. **Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A and DiFrancesco D.** *C Terminus-mediated Control of Voltage and cAMP Gating of Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels.* The Journal of Biological Chemistry Vol. 276 (2001), No. 32, pp. 29930-29934
38. **Rosen MR, Brink PR, Cohen IS and Robinson RB.** *Genes, stem cells and biological pacemakers.* Cardiovascular Research 64 (2004):12-23
39. **DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M and Tromba C.** *Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node.* J. Physiol. (1986), 377, pp. 61-88
40. **Frace AM, Maruoka F and Noma A.** *Control of the hyperpolarization-activated cation current by external anions in rabbit sino-atrial node cells.* Journal of Physiology (1992), 453, pp. 307-318
41. **Ho WK, Brown HF and Noble D.** *Internal K ions modulate the action of external cations on hyperpolarization-activated inward current in rabbit isolated sinoatrial node cells.* Pflug. Arch. (1993): 424, 308-314
42. **DiFrancesco D.** *Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium.* J. Physiol. (1982), 329, pp. 485-507
43. **DiFrancesco D.** *Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers.* Pharmacological Research 53 (2006) 399–406
44. **DiFrancesco D and Mangoni M.** *Modulation of single hyperpolarization-activated channels (I_f) by cAMP in the rabbit sino-atrial node.* Journal of Physiology (1994), 474.3
45. **Munk AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel A and Shrier A.** *Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node.* Journal of Physiology (1996), 493.3, pp. 801-818
46. **Marger L, Mesirca P, Alig J, Torrente A, Dubel S, Engeland B, Kanani S, Fontanaud P, Striessnig J, Shin H, Isbrandt D, Ehmke H, Nargeot J and Mangoni ME.** *Pacemaker activity and ionic currents in mouse atrioventricular node cells.* Channels 5:3, 241-250; May/June 2011
47. **DiFrancesco.** *A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf purkinje fibres.* J. Physiol. (1981), 314, pp. 377-393
48. **DiFrancesco D.** *A new interpretation of the pace-maker current in calf purkinje fibres.* J. Physiol. (1981), 314, pp. 359-376
49. **Yu H, Chang F and Cohen IS.** *Pacemaker current I_f in adult canine cardiac ventricular myocytes.* Journal of Physiology (1995), 485.2, pp. 469-483

50. **Pape HC.** *Queer Current And Pacemaker: The Hyperpolarization- Activated Cation Current in Neurons.* Annu Rev. Physiol. 1996 58:299-327
51. **Chu H and Zhen X.** *Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the regulation of midbrain dopamine systems.* Acta Pharmacologica Sinica (2010) 31: 1036 - 1043
52. **DiFrancesco D and Borer JS.** *The Funny Current – Cellular basis for the control of heart rate.* Drugs 2007; 67 Suppl. 2: 15-24
53. **LIBRO DI FISIOLOGIA GENERALE: Principi di fisiologia di Berne e Levy** _ Levy MN, Koeppen BM e Stanton BA _ Capitolo 3 (potenziale d'azione) p32-43 _ Capitolo 10 (sistema nervoso autonomo) p152-160 _ Capitolo 17 (overdrive suppression) p233
54. **Wettschureck Nina and Offermanns S.** *Mammalian G Proteins and their cell type specific functions.* Physiol Rev 85: 1159–1204, 2005
55. **Baruscotti M, Bucchi A and DiFrancesco D.** *Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current.* Pharmacology & Therapeutics 107 (2005) 59 - 79
56. **Tanaka H, Clark RB and Giles WR.** *Positive chronotropic responses of rabbit sino-atrial node cells to flash photolysis of caged isoproterenol and cyclic AMP.* Proc. R. Soc. Lond. B 1996 263
57. **Zhang H, Butters T, Adeniran I, Higham J. Holden AV, Boyet MR and Hancox JC.** *Modeling the chronotropic effect of isoprenaline on rabbit sinoatrial node.* Frontiers in physiology (2012), volume 3, Article 241
58. **Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N and Marks AR.** *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (Ryanodine Receptor): defective regulation in failing hearts.* Cell, Vol. 101, 365–376, May 12, 2000
59. **DiFrancesco D.** *Serious workings of the funny current.* Progress in Biophysics and Molecular Biology 90 (2006) 13–25
60. **Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A.** *The cardiac pacemaker current.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 48 (2010) 55–64
61. **Balijepalli RC, Kamp TJ.** *Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias.* Prog Biophys Mol Biol. 2008 Oct-Nov;98(2-3):149-60
62. **Barbuti A, Terragni B, Brioschi C and DiFrancesco D.** *Localization of f-channels to caveolae mediates specific beta2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes.* J Mol Cell Cardiol. 2007 Jan;42(1):71-8

63. **Sowa G.** *Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights.* Front Physiol. 2012;2:120
64. **Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, Milanesi R, Terragni B and DiFrancesco D.** *Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics.* Circ Res. 2004 May 28;94(10):1325-31
65. **Decher N, Bundis F, Vajna R, Steinmeyer K.** *KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents.* Pflugers Arch. 2003 Sep;446(6):633-40
66. **Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M, Krishnamurthy G, Cohen IS and Robinson RB.** *MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes.* J Biol Chem. 2004 Oct 15;279(42):43497-502
67. **Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R.** *MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation.* Circ Res. 2001 Jun 22;88(12):E84-7
68. **Zhang M, Jiang M and Tseng G.** *MinK-Related Peptide 1 Associates With Kv4.2 and Modulates Its Gating Function: Potential Role as b Subunit of Cardiac Transient Outward Channel?* Circ Res. 2001;88:1012-1019; originally published online May 10, 2001
69. **Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT.** *Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2.* Circulation. 2000 Sep 5;102(10):1178-85
70. **Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT and Goldstein SA.** *MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia.* Cell. 1999 Apr 16;97(2):175-87
71. **Santoro B, Wainger BJ and Siegelbaum SA.** *Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction.* J Neurosci. 2004 Nov 24;24(47):10750-62
72. **Lewis AS, Schwartz E, Chan CS, Noam Y, Shin M, Wadman WJ, Surmeier DJ, Baram TZ, Macdonald RL and Chetkovich DM.** *Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function.* J Neurosci. 2009 May 13;29(19):6250-65

73. **Santoro B, Hu L, Liu H, Saponaro A, Pian P, Piskorowski RA, Moroni A, Siegelbaum SA.** *TRIP8b regulates HCN1 channel trafficking and gating through two distinct C-terminal interaction sites.* J Neurosci. 2011 Mar 16;31(11):4074-86
74. **Han Y, Noam Y, Lewis AS, Gallagher JJ, Wadman WJ, Baram TZ and Chetkovich DM.** *Trafficking and gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels are regulated by interaction with tetratricopeptide repeat-containing Rab8b-interacting protein (TRIP8b) and cyclic AMP at distinct sites.* J Biol Chem. 2011 Jun 10;286(23):20823-34
75. **van der Flier A and Sonnenberg A.** *Structural and functional aspects of filamins.* Biochim Biophys Acta. 2001 Apr 23;1538(2-3):99-117
76. **Guerrini R and Marini C.** *Genetic malformations of cortical development.* Exp Brain Res (2006) 173: 322-333
77. **Gravante B, Barbuti A, Milanesi R, Zappi I, Viscomi C and DiFrancesco D.** *Interaction of the pacemaker channel HCN1 with filamin A.* J Biol Chem. 2004 Oct 15;279(42):43847-53
78. **Kass RS.** *The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease.* The Journal of Clinical Investigation (2005) Volume 115 Number 8, pp 1986-1989
79. **Ashcroft FM.** *From molecule to malady.* Nature (2006) Volume 440, pp 440-447
80. **Campuzano O, Beltran-Alvarez P, Iglesias A, Scornik F, Perez G and Brugada R.** *Genetics and cardiac channelopathies.* Genetics in Medicine (2010) Volume 12, Number 5, pp: 260-267
81. **Napolitano C, Bloise R, Monteforte N and Priori SG.** *Sudden cardiac death and genetic ion channelopathies: long qt, brugada, short qt, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and idiopathic ventricular fibrillation.* Circulation. 2012;125:2027-2034
82. **Zamorano-León JJ, Yañez R, Jaime G, Rodriguez-Sierra P, Calatrava-Ledrado L, Alvarez-Granada RR, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C and López-Farré AJ.** *KCNH2 gene mutation: a potential link between epilepsy and long QT-2 syndrome.* J Neurogenet. 2012 Sep;26(3-4):382-6
83. **Parisi P, Oliva A, Coll Vidal, Partemi S, Campuzano O, Iglesias A, Pisani D, Pascali VL, Paolino MC, Villa MP, Zara F, Tassinari CA, Striano P and Brugada R.** *Coexistence of epilepsy and Brugada syndrome in a family with SCN5A mutation.* Epilepsy Research (2013) 105, 415-418

84. **Partemi S, Cestele S, Pezzella M, Campuzano O, Paravidino R, Pascali VL, Zara F, Tassinari CA, Striano S, Oliva A, Brugada R, Mantegazza M and Striano P.** *Loss-of-function KCNH2 mutation in a family with long QT syndrome, epilepsy, and sudden death.* *Epilepsia*, 54(8):e112–e116, 2013
85. **Hsiao P, Tien H, Lo C, Juang JJ, Wang Y and Sung RJ.** *Gene mutations in cardiac arrhythmias: a review of recent evidence in ion channelopathies.* *The Application of Clinical Genetics* 2013:6 1–13
86. **Scicchitano S, Carbonara S, Ricci G, Mandurino C, Locorotondo M, Bulzis G, Gesualdo M, Zito A, Carbonara R, Dentamaro I, Riccioni G and Ciccone MM.** *HCN Channels and Heart Rate.* *Molecules* 2012, 17, 4225-4235
87. **Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O and Isbrandt D.** *Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease.* *J Clin Invest* (2003) 111:1537-1545
88. **DiFrancesco JC, Barbuti A, Milanesi R, Coco S, Bucci A, Bottelli G, Ferrarese C, Franceschetti S, Terragni B, Baruscotti M and DiFrancesco D.** *Recessive loss-of-function mutation in the pacemaker HCN2 channel causing increased neuronal excitability in a patient with idiopathic generalized epilepsy.* *The Journal of Neuroscience* (2011) 31(48):17327-17337
89. **Dibbens LM, Reid CA, Hodgson B, Thomas EA, Phillips AM, Gazina E, Cromer BA, Clarke AL, Baram TZ, Scheffer IE, Berkovic SF and Petrou S.** *Augmented currents of an HCN2 variant in patients with febrile seizure syndromes.* *ANN NEUROL* (2010) 67:542-546
90. **Deng H, Xiu X and Song Z.** *The molecular biology of genetic-based epilepsies.* *Mol Neurobiol* (2013), [Epub ahead of print]
91. **Kitchigina V, Popova I, Sinelnikova V, Malkov A, Astatheva E, Shubina L, Aliev R.** *Disturbances of septohippocampal theta oscillations in the epileptic brain: Reasons and consequences.* *Experimental Neurology* 247 (2013) 314-327
92. **LIBRO DI ANATOMIA: Anatomia umana** _ Ambrosi G, Anastasi G, Cantino D, Capitani S, Castano P, Donato RF, Franzi AT, Gaudio E, Geremia R, Gulisano M, Marcello MF, Martelli AM, Mazzotti G, Paparelli A, Rende M e Zummo G _ Capitolo 6, p161-172 _ Capitolo 15, p391-400
93. **Boyett MR, Honjo H, Kodama I.** *The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure.* *Cardiovasc Res.* 2000 Sep;47(4):658-87

94. **Jansen JA, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV.** *Cardiac connexins and impulse propagation.* J Mol Cell Cardiol. 2010 Jan;48(1):76-82
95. LIBRO DI NEUROANATOMIA: **Neuroanatomia con riferimenti funzionali e clinici** _ Turlough FitzGerald MJ, Gruener G e Mtui E _ Capitolo 13 (Sistema nervoso autonomo e afferenze viscerali), p151-168
96. **Kobayashi M, Massiello A, Karimov JH, Van Wagoner DR and Fukamachi K.** *Cardiac autonomic nerve stimulation in the treatment of heart failure.* Ann Thorac Surg 2013;96:339–45
97. **Boyett MR.** *'And the beat goes on.'* *The cardiac conduction system: the wiring system of the heart.* Exp Physiol. 2009 Oct;94(10):1035-49
98. **Joyner RW, Ronald Wilders R, Wagner MB.** *Propagation of pacemaker activity.* Med Bio Eng Comput (2007) 45:177–187
99. **Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A and Moorman AFM.** *Development of the pacemaker tissues of the heart.* Circ Res. 2010;106:240-254
100. **Fedorov VV, Glukhov AV, and Chang R.** *Conduction barriers and pathways of the sinoatrial pacemaker complex: their role in normal rhythm and atrial arrhythmias.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 302: H1773–H1783, 2012.
101. **Barbuti A, Scavone A, Mazzocchi N, Terragni B, Baruscotti M, DiFrancesco D.** *A caveolin-binding domain in the HCN4 channels mediates functional interaction with caveolin proteins.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 53 (2012) 187–195
102. **Scavone A, Capiluppo D, Mazzocchi N, Crespi A, Zoia S, Campostrini G, Bucchi A, Milanese R, Baruscotti M, Benedetti S, Antonini S, Messina G, DiFrancesco D and Barbuti A.** *Embryonic stem cell-derived CD166+ precursors develop into fully functional sinoatrial-like cells.* Circ Res. 2013;113:389-398; originally published online June 10, 2013
103. **Anderson RH, Ho SY.** *The architecture of the sinus node, the atrioventricular conduction axis, and the internodal atrial myocardium.* J Cardiovasc Electrophysiol. 1998;9:1233-1248
104. **Anderson KR, Ho Y, Anderson RH.** *Location and vascular supply of sinus node in human heart.* Br Heart J. 1979;41:28-32
105. **Balbi T, Ghimenton C, Pasquinelli G, Foroni L, Grillini M and Pierini G.** *Advancement in the examination of the human cardiac sinus node _ An unexpected architecture and a novel cell type could interest the forensic science.* Am J Forensic Med Pathol 2011;32: 112-118

106. **Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, Milanese R, Terragni B and DiFrancesco D.** *Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics.* Circ Res. 2004;94:1325-1331; originally published online April 8, 2004
107. **Espinoza-Lewis RA, Yu L, He F, Liu H, Tang R, Shi J, Sun X, Martin JF, Wang D, Yang J, Chen Y.** *Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5.* Developmental Biology 327 (2009) 376–385
108. **Kapoor N, Liang W, Marbán E and Cho HC.** *Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18.* Nature Biotechnology; volume31, number1:54-62
109. **Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, Boyett MR and Morris GM.** *The anatomy and physiology of the sinoatrial node – A contemporary review.* Pacing Clin Electrophysiol. 2010 Nov;33(11):1392-406
110. **Kreuzberg MM, Willecke K and Bukauskas FF.** *Connexin-mediated cardiac impulse propagation: Connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart.* Trends Cardiovasc Med 2006;16:266–272
111. **Zhang Q, Timofeyev V, Lu L, Li N, Singapuri A, Long MK, Bond CT, Adelman JP and Chiamvimonvat N.** *Functional roles of a Ca²⁺-activated K⁺ channel in atrioventricular nodes.* Circ Res. 2008;102:465-471; originally published online December 20, 2007
112. **Meijler FL, Janse MJ.** *Morphology and electrophysiology of the mammalian atrioventricular node.* Physiol Rev 1988; 68:608-47
113. **Efimov IR, Nikolski VP, Rothenberg F, Greener ID, Li J, Dobrzynski H and Boyett M.** *Structure-function relationship in the AV junction.* Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2004; 280:952-65
114. **James TN.** *The connecting pathways between the sinus node and A-V node and between the right and the left atrium in the human heart.* American Heart Journal 66 (4): 498-508
115. **Saremi F, Channal S, Krishnan S, Gurudevan SV, Narula J and Abolhoda A.** *Bachmann Bundle and its arterial supply: imaging with multidetector CT – Implications for interatrial conduction abnormalities and arrhythmias.* Radiology: Volume 248: Number 2—August 2008
116. **Mikawa T and Hurtado R.** *Development of the cardiac conduction system.* Seminars in Cell & Developmental Biology 18 (2007) 90–100

117. **Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE, Jalife J and Fishman GI.** *Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system.* Development 128, 1785-1792 (2001)
118. **Fisch C.** *Bundle branch block after ventricular tachycardia: A manifestation of "fatigue" or "overdrive suppression".* J Am Coll Cardiol. 1984; 3; 1562-4
119. **Langendorf R, Pick A.** *Artificial pacing of the human heart: Its contribution to understanding of the arrhythmias.* Am J Cardiol. 1971; 28: 516-25
120. **Runge M, Narula O.** *"Fatigue" phenomenon in the human His-Purkinje system.* Circulation. 1973; 48: IV-103
121. **LIBRO DI FISIOLOGIA CARDIACA: Heart Physiology and Pathophysiology** _ Sperelakis N, Kurachi Y, Terzic A and Cohen MV _ *Chapter 10 - Cardiac action potentials;* p199-210
122. **Moorman AFM and Christoffels VM.** *Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution.* Physiol Rev 83: 1223-1267, 2003; 10.1152/physrev.00006.2003
123. **Franco D and Campione M.** *The role of Pitx2 during cardiac development linking left-right signaling and congenital heart diseases.* Trends Cardiovasc Med 2003;13:157-163
124. **Hoogaars WMH, Tessari A, Moorman AFM, de Boer PAJ, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM.** *The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart.* Cardiovascular Research 62 (2004) 489-499
125. **Wiese C, Grieskamp T, Airik R, Mommersteeg MTM, Gardiwal A, de Gier-de Vries C, Schuster-Gossler K, Moorman AFM, Kispert A and Christoffels VM.** *Formation of the Sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3.* Circ Res. 2009;104:388-397; originally published online December 18, 2008
126. **Mommersteeg MTM, Dominguez JN, Wiese C, Norden J, de Gier-de Vries C, Burch JBE, Kispert A, Brown NA, Moorman AFM and Christoffels VM.** *The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development.* Cardiovascular Research (2010) 87, 92-101
127. **Liu H, Espinoza-Lewis RA, Chen C, Hu X, Zhang Y and Chen Y.** *The role of shox2 in SAN development and function.* Pediatr Cardiol (2012) 33:882-889
128. **Munshi NV.** *Gene regulatory networks in cardiac conduction system development.* Circ Res. 2012;110:1525-1537

129. **Hoogaars WMH, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LYE, Bakker ML, Clout DE, Wakker V, Barnett P, Hindrik Ravesloot J, Moorman AFM, Verheijck EE and Christoffels VM.** *Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria.* Genes & Development (2007) 21:1098–1112
130. **Bakker ML, Christoffels VM and Moorman AFM.** *The cardiac pacemaker and conduction system develops from embryonic myocardium that retains its primitive phenotype.* J Cardiovasc Pharmacol (2010), Volume 56, Number 1
131. **Galli D, Dominguez JN, Zaffran S, Munk A, Brown NA and Buckingham ME.** *Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field, which acquires left-right identity as Pitx2c is expressed.* Development 135, 1157-1167 (2008)
132. **Evans MJ and Kaufman MH.** *Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos.* Nature (1981) 292: 154-156
133. **Martin GR.** *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78: 7634-7638
134. **Spangrude GJ, Heimfeld S and Weissman IL.** *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells.* Science (1988) 241, 58-62
135. **Friedenstein AJ, Gorskaja JF and Kulagina NN.** *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.* Exp. Hematol. (1976) 4, 267-274
136. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK and Gerasimov UV.** *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.* Cell Tissue Kinet. (1987) 20, 263-272
137. **Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O and Prockop DJ.** *Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 4857-4861
138. **Prockop DJ, Gregory CA and Spees JL.** *One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100, 11917-11923
139. **Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B and Anversa P.** *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.* Cell (2003), Vol. 114, 763-776

140. **Moe MC, Varghese M, Danilov AI, Westerlund U, Ramm-Petersen J, Brundin L, Svensson M, Berg-Johnsen J and Langmoen IA.** *Multipotent progenitor cells from the adult human brain: neurophysiological differentiation to mature neurons.* Brain (2005), 128, 2189-2199
141. **Moe MC, Westerlund U, Varghese M, Berg-Johnsen J, Svensson M, Langmoen IA.** *Development of neuronal networks from single stem cells harvested from the adult human brain.* Neurosurgery (2005) 56:1182-1190
142. **Miszta-Lane H, Mirbolooki M, Shapiro AMJ and Lakey JRT.** *Stem cell sources for clinical islet transplantation in type 1 diabetes: Embryonic and adult stem cells.* Medical Hypotheses (2006) 67, 909-913
143. **Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A and Simmons PJ.** *Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow.* J. Cell Sci. (2003) 116, 1827-1835
144. **Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T and Morrison SJ.** *Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness.* Neuron (2002) 35, 657-669
145. **Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH and Weissman IL.** *Direct isolation of human central nervous system stem cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, 14720-14725
146. **Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK and Bartlett PF.** *Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain.* Nature (2001) 412: 736-739
147. **Capela A and Temple S.** *LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal.* Neuron (2002) 35, 865-875
148. **Edelberg JM, Aird WC and Rosenberg RD.** *Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human β -2 adrenergic receptor cDNA.* J. Clin. Invest. Volume 101, Number 2, January 1998, 337-343
149. **Edelberg JM, Huang DT, Josephson ME and Rosenberg R D.** *Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy.* Heart 2001;86:559-562
150. **Miake J, Marbán E and Nuss HB.** *Biological pacemaker created by gene transfer.* Nature (2002) Volume 419: 132-133
151. **Qu J, Barbuti A, Protas L, Santoro B, Cohen IS, Robinson R.** *HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes.* Circulation Research (2001). 89:e8-e14

152. **Qu J, Plotnikov AN, Danilo PJr, Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB and Rosen MR.** *Expression and function of a biological pacemaker in canine heart.* Circulation 2003;107;1106-1109; originally published online Feb 24, 2003
153. **Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovskiy EP, Liu L, Janse MJ, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB, Danilo PJ and Rosen MR.** *Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates.* Circulation. 2004;109:506-512; originally published online January 20, 2004
154. **Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo PJ, Valiunas V, Qu J, Doronin S, Zuckerman J, Shlapakova IN, Gao J, Pan Z, Herron AJ, Robinson RB, Brink PR, Rosen MR and Cohen IS.** *Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers.* Circ. Res. 2004;94:952-959; originally published online Feb 26, 2004
155. **Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapova I, Zuckerman J, Walcott B, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR and Cohen IS.** *Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions.* J Physiol 555.3 (2004) pp 617-626
156. **Doetschman T, Eistetter H, Katz M, Schmit W and 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. Morph. (1985) 87: 27-45
157. **Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner M, Rohwedel J, Guanju J, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J and Franz W.** *Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol 29, 1525–1539 (1997)
158. **Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J and Gepstein L.** *Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells.* NATURE BIOTECHNOLOGY (2004) Volume 22, pp 1282-1289
159. **Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang S, Jones SP, Marbán E, Tomaselli GF and Li RA.** *Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient pacemakers.* Circulation (2005);111;11-20

160. **Bowen MA, Aruffo AA and Bajorath J.** *Cell surface receptors and their ligands: in vitro analysis of CD6-CD166 interactions.* PROTEINS (2000): Structure, Function, and Genetics 40:420-428
161. **Aruffo A, Bowen MA, Patel DD, Haynes BF, Starling GC, Gebe JA and Bajorath J.** *CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?* Immunology today (1997), Volume 18, n°10, pp 498-504
162. **Chitteti BR, Bethel M, Kacena MA and Srour EF.** *CD166 and regulation of hematopoiesis.* Curr Opin Hematol 2013, 20:273-280
163. **Hirata H, Murakami Y, Miyamoto Y, Tosaka M, Inoue K, Nagahashi A, Jakt LM, Asahara T, Iwata H, Sawa Y, Kawamata S.** *ALCAM (CD166) is a surface marker for early murine cardiomyocytes.* Cells Tissues Organs (2006) 184, 172–180
164. **Murakami Y, Hirata H, Miyamoto Y, Nagahashi A, Sawa Y, Jakt M, Asahara T, Kawamata S.** *Isolation of cardiac cells from E8.5 yolk sac by ALCAM (CD166) expression.* Mechanisms of Development (2007) 124:830-839
165. **Rust W, Balakrishnan T, Zweigerdt R.** *Cardiomyocyte enrichment from human embryonic stem cell cultures by selection of ALCAM surface expression.* Regen. Med. (2009) 4(2):1-13
166. **Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1991).** Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48:173-182
167. **Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M and Rogers D.** *Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.* Nature (1988) 336: 688-690
168. **Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P and Schoneich J.** *Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo.* Experimental Cell Research (1984)152:212-219
169. **Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM.** *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinus-nodal, atrial and ventricular cell types.* Mechanisms of development(1993) 44:41-50
170. **Barbuti A, Crespi A, Capiluppo D, Mazzocchi N, Baruscotti M, and DiFrancesco D.** *Molecular composition and functional properties of f-channels in murine embryonic stem cell-derived pacemaker cells.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2009) 46(3):343-351

171. **Avitabile D, Crespi A, Brioschi C, Parente V, Toietta G, Devanna P, Baruscotti M, Truffa S, Scavone a, Rusconi F, Biondi A, D'Alessandra Y, Vigna E, DiFrancesco D, Pesce M, Capogrossi MC, and Barbuti A.** *Human cord blood CD34+ progenitor cells acquire functional cardiac properties through a cell fusion process.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2011) 300: H1875-H1884
172. **Garcia-Frigola C, Shi Y and Evans SM.** *Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development.* Gene Expr Patterns. (2003) 3:777-783
173. **Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, Papaioannou VE, Brown NA, Harvey RP, Moorman AF and Christoffels VM.** *Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node.* Circ Res. (2007)100:354-362
174. **Ward CM, Barrow KM and Stern PL.** *Significant variations in differentiation properties between independent mouse ES cell lines cultured under defined conditions.* Exp Cell Res. (2004) 293:229-238.
175. **Kattman SJ, Huber TL and Keller GM.** *Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages.* Dev Cell. (2006) 11:723-732
176. **Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I.** *Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes.* J Biol Chem. (2004) 279:11384-11391
177. **Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gausson V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD.** *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction.* Proc Natl Acad Sci U S A. (2003) 100:12313-12318
178. **Wei F, Wang T, Liu J, Du Y, Ma A.** *The subpopulation of mesenchymal stem cells that differentiate toward cardiomyocytes is cardiac progenitor cells.* Exp Cell Res. (2011) 317:2661-2670
179. **Brioschi C, Micheloni S, Tellez JO, Pisoni G, Longhi R, Moroni P, Billeter R, Barbuti A, Dobrzynski H, Boyett MR, DiFrancesco D and Baruscotti M.** *Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node.* J Mol Cell Cardiol. 2009;47:221-7
180. **Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J,**

- Lory P.** *Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Cav3.1/alpha1G T-type calcium channels.* Circ Res. 2006;98:1422–1430
181. **Mizuta E, Miake J, Yano S, Furuichi H, Manabe K, Sasaki N, Igawa O, Hoshikawa Y, Shigemasa C, Nanba E, Ninomiya H, Hidaka K, Morisaki T, Tajima F, Hisatome I.** *Subtype switching of T-type Ca²⁺ channels from Cav3.2 to Cav3.1 during differentiation of embryonic stem cells to cardiac cell lineage.* Circ J. 2005;69:1284–1289
182. **Mizuta E, Shirai M, Arakawa K, Hidaka K, Miake J, Ninomiya H, Kato M, Shigemasa C, Shirayoshi Y, Hisatome I, Morisaki T.** *Different distribution of Cav3.2 and Cav3.1 transcripts encoding T-type Ca²⁺ channels in the embryonic heart of mice.* Biomed Res. 2010;31:301–305
183. **Alcoléa S, Théveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, Briand JP, Moorman AF, Lamers WH, Gros DB.** *Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development.* Circ Res. 1999;84:1365–1379
184. **Stieber J, Herrmann S, Feil S, Löster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A.** *The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:15235–15240
185. **Baruscotti M, Bucchi A, Viscomi C, Mandelli G, Consalez G, Gneschi-Rusconi T, Montano N, Casali KR, Micheloni S, Barbuti A and DiFrancesco D.** *Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:1705–1710
186. **Schweizer PA, Yampolsky P, Malik R, Thomas D, Zehelein J, Katus HA, Koenen M.** *Transcription profiling of HCN-channel isoforms throughout mouse cardiac development.* Basic Res Cardiol. 2009;104:621–629
187. **Zhou YQ, Foster FS, Parkes R, Adamson SL.** *Developmental changes in left and right ventricular diastolic filling patterns in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285:H1563–H1575
188. **He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ.** *Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization.* Circ Res. 2003;93:32–39
189. **Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ, Kolaja KL, Swanson BJ, January CT.** *High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;301:H2006–H2017

190. **Yanagi K, Takano M, Narazaki G, Uosaki H, Hoshino T, Ishii T, Misaki T, Yamashita JK.** *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and T-type calcium channels confer automaticity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* Stem Cells. 2007;25:2712–2719
191. **Lin B, Kim J, Li Y, Pan H, Carvajal-Vergara X, Salama G, Cheng T, Li Y, Lo CW, Yang L.** *High-purity enrichment of functional cardiovascular cells from human iPS cells.* Cardiovasc Res. 2012;95:327–335
192. **Dubois NC, Craft AM, Sharma P, Elliott DA, Stanley EG, Elefanty AG, Gramolini A, Keller G.** *SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells.* Nat Biotechnol. 2011;29:1011–1018
193. **Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, Niwa R, Billeter R, Honjo H, Kodama I, Boyett MR.** *Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45.* Cardiovasc Res. 2006;72:271–281
194. **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;73:729–738
195. **Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P, Difrancesco D, Baruscotti M, Longhi R, Anderson RH, Billeter R, Sharma V, Sigg DC, Boyett MR, Dobrzynski H.** *Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker.* Circulation. 2009;119:1562–1575
196. **Morikawa K, Bahrudin U, Miake J, Igawa O, Kurata Y, Nakayama Y, Shirayoshi Y, Hisatome I.** *Identification, isolation and characterization of HCN4-positive pacemaking cells derived from murine embryonic stem cells during cardiac differentiation.* Pacing Clin Electrophysiol. 2010;33:290–303
197. **Kleger A, Seufferlein T, Malan D, et al.** *Modulation of calcium-activated potassium channels induces cardiogenesis of pluripotent stem cells and enrichment of pacemaker-like cells.* Circulation. 2010;122:1823–1836
198. **Wiese C, Nikolova T, Zahanich I, Sulzbacher S, Fuchs J, Yamanaka S, Graf E, Ravens U, Boheler KR, Wobus AM.** *Differentiation induction of mouse embryonic stem cells into sinus node-like cells by suramin.* Int J Cardiol. 2011;147:95–111
199. **Cho HS, Takano M, Noma A.** *The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node.* J Physiol. 2003;550:169–180

200. **Ludwig A, Budde B, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape H, Biel M and Hofmann F.** *Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2.* The EMBO Journal Vol. 22 No. 2 pp. 216-224, 2003
201. **Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A and DiFrancesco D.** *Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells.* J Neurophysiol. 1993;69(6):2129-36
202. **McCormick DA and Pape HC.** *Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones.* J Physiol. 1990;431:291-318
203. **He C, Chen F, Li B and Hu Z.** *Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations.* Progress in Neurobiology (2013) article in press
204. **Sheets PL, Suter BA, Kiritani T, Savio Chan C, Surmeier DJ and Shepherd GMG.** *Corticospinal-specific HCN expression in mouse motor cortex: I_h -dependent synaptic integration as a candidate microcircuit mechanism involved in motor control.* J Neurophysiol 106: 2216-2231, 2011
205. **Magee JC.** *Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons.* nature neuroscience (1999)• volume 2 n°6, pp 508-514
206. **Magee JC.** *Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons.* Nat. Neurosci. (1999) 2, 848
207. **Williams SR and Stuart GJ.** *Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I_h in neocortical pyramidal neurons.* The American Physiological Society (2000), 83, 3177-3182
208. **Berger T, Senn W, and Luscher HR.** *Hyperpolarization-Activated Current I_h disconnects somatic and dendritic spike initiation zones in layer V pyramidal neurons.* J Neurophysiol 90: 2428–2437, 2003
209. **Abbas SY, Ying SW and Goldstein PA.** *Compartmental distribution of Hyperpolarization- activated Cyclic-Nucleotide-gated channel 2 and Hyperpolarization-activated Cyclic-Nucleotide-gated channel 4 in thalamic reticular and thalamocortical relay neurons.* Neuroscience 141 (2006) 1811-1825
210. **Ying SW, Jia F, Abbas SY, Hofmann F, Ludwig A and Goldstein PA.** *Dendritic HCN2 channels constrain glutamate-driven excitability in reticular thalamic neurons.* The Journal of Neuroscience, August 8, (2007) 27(32):8719-8732

211. **George MS, Abbott LF and Siegelbaum SA.** *HCN hyperpolarization-activated cation channels inhibit EPSPs by interactions with M-type K⁺ channels.* Nature Neuroscience (2009), Volume 12, N°5, pp 577-584
212. **Tsay D, Dudman JT and Siegelbaum SA.** *HCN1 channels constrain synaptically evoked Ca²⁺ spikes in distal dendrites of CA1 pyramidal neurons.* Neuron (2007) 56, 1076-1089
213. **Jahnsen H and Llinas R.** *Ionic basis for the electroresponsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro.* J. Physiol. (1984), 349, pp. 227-247
214. **Llinas R and Jahnsen H.** *Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro.* Nature (1982); 297, pp:406-408
215. **Akasu T, Shoji S and Hasuo H.** *Inward rectifier and low-threshold calcium currents contribute to the spontaneous firing mechanism in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus.* Pflugers Arch (1993);425(1-2):109-116
216. **Atkinson SE, Maywood ES, Chesham JE, Wozny C, Colwell CS, Hastings MH and Williams SR.** *Cyclic AMP signaling control of action potential firing rate and molecular circadian pacemaking in the suprachiasmatic nucleus.* J Biol Rhythms (2011), (3) pp:210-220
217. **Kocsis B and Li S.** *In vivo contribution of h-channels in the septal pacemaker to theta rhythm generation.* Eur. J. Neurosci. (2004) 20, 2149-2158
218. **Xu C, Datta S, Wu M and Alreja M.** *Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons.* Eur. J. Neurosci. (2004) 19, 2299-2309
219. **Kopp-Scheinflug C, Tozer AJ, Robinson SW, Tempel BL, Hennig MH, Forsythe ID.** *The sound of silence: ionic mechanisms encoding sound termination.* Neuron (2001) 71, 911-925
220. **Aponte Y, Lien CC, Reisinger E and Jonas P.** *Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus.* J. Physiol. (2006) 574, 229-243
221. **Awatramani GB, Price GD and Trussell LO.** *Modulation of transmitter release by presynaptic resting potential and background calcium levels.* Neuron (2005) 48, 109-121
222. **Bender RA and Baram TZ.** *Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks.* Progress in Neurobiology 86 (2008) 129-140
223. **Reid CA, Berkovic SF and Petrou S.** *Mechanisms of human inherited epilepsies.* Progress in Neurobiology 87 (2009) 41-57

224. **Dube CM, Brewster AL and Baram TZ.** *Febrile seizures: Mechanisms and relationship to epilepsy.* Brain & Development 31 (2009) 366-371
225. **Dyhrfeld-Johnsen J, Morgan RJ and Soltesz I.** *Double trouble? Potential for hyperexcitability following both channelopathic up- and downregulation of I_h in epilepsy.* Front Neurosci (2009) 3:25-33
226. **Lewis AS and Chetkovich DM.** *HCN channels in behavior and neurological disease: Too hyper or not active enough?* Molecular and Cellular Neuroscience 46 (2011) 357-367
227. **Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ and Soltesz I.** *Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability.* Nat Med. 2001 March ; 7(3): 331-337
228. **Noam Y, Bernard C and Tallie Z. Baram TZ.** *Towards an integrated view of HCN channel role in epilepsy.* Curr Opin Neurobiol. (2011); 21(6): 873-879
229. **Engel JJ.** *Report of the ILAE classification core group.* Epilepsia (2006), 47(9):1558-1568
230. **Berg AT and Cross JH.** *Towards a modern classification of the epilepsies?* Lancet Neurol (2010), 9(5):459-461
231. **Heron SE, Scheffer IE, Berkovic SF, Dibbens LM and Mulley JC.** *Channelopathies in idiopathic epilepsy.* Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics (2007), Vol. 4, 295-304
232. **Helbig I, Matigian NA, Vadlamudi L, Lawrence KM, Bayly MA, Bain SM, Diyagama D, Scheffer IE, Mulley JC, Holloway AJ, Dibbens LM, Berkovic SF and Hayward NK.** *Gene expression analysis in absence epilepsy using a monozygotic twin design.* Epilepsia (2008), 49(9):1546-1554
233. **Helbig I, Scheffer IE, Mulley JC and Berkovic SF.** *Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies.* Lancet Neurol (2008); 7: 231-245
234. **Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S and Berkovic SF.** *Channelopathies as a genetic cause of epilepsy.* Curr Opin Neurol (2003) 16:171-176
235. **Turnbull J, Lohi H, Kearney JA, Rouleau GA, Delgado-Escueta AV, Meisler MH, Cossette P and Minassian BA.** *Sacred disease secrets revealed: the genetics of human epilepsy.* Human Molecular Genetics (2005) Vol. 14, No. 17 2491-2500
236. **Hirose S, Mitsudome A, Okada M and Kaneko S.** *Genetics of idiopathic epilepsies.* Epilepsia (2005), 46(Suppl. 1) pp 38-43

237. **Avanzini G, Franceschetti S and Mantegazza M.** *Epileptogenic channelopathies: Experimental models of human pathologies.* *Epilepsia* (2007), 48(Suppl. 2):51-64
238. **Catterall WA, Dib-Hajj S, Meisler MH and Pietrobon D.** *Inherited neuronal ion channelopathies: New windows on complex neurological diseases.* *The Journal of Neuroscience* (2008), 28(46):11768-11777
239. **Alkondon M and Albuquerque EX.** *The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex.* *Prog Brain Res* (2004) 145:109-120
240. **Hoda JC, Gu W, Friedli M, Phillips HA, Bertrand S, Antonarakis SE, Goudie D, Roberts R, Scheffer IE, Marini C, Patel J, Berkovic SF, Mulley JC, Steinlein OK, and Bertrand D.** *Human nocturnal frontal lobe epilepsy: pharmacogenomic profiles of pathogenic nicotinic acetylcholine receptor β -subunit mutations outside the ion channel pore.* *Mol Pharmacol* (2008) 74:379-391
241. **Bianchi MT, Song L, Zhang H and Macdonald RL.** *Two different mechanisms of disinhibition produced by GABA-A receptor mutations linked to epilepsy in humans.* *J Neurosci.* (2002), 22(13):5321-5327
242. **Krampfl K, Maljevic S, Cossette P, Ziegler E, Rouleau GA, Lerche H and Bufler J.** *Molecular analysis of the A322D mutation in the GABA receptor alpha-subunit causing juvenile myoclonic epilepsy.* *Eur J Neurosci.* (2005) 22(1):10-20
243. **Rahman S.** *Mitochondrial disease and epilepsy.* *Dev Med Child Neurol* (2012) 54(5) pp:397-406
244. **Steinlein OK.** *Genetic mechanisms that underlie epilepsy.* *Nat Rev Neurosci* (2004), (5) pp:400-408
245. **Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL , Nordli D, Plouin P and Scheffer IE.** *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009.* *Epilepsia*, 51(4):676–685, 2010
246. **McClelland S, Flynn C, Dubé C, Richichi C, Zha Q, Ghestem A, Esclapez M, Bernard C and Baram TZ.** *Neuron-restrictive silencer factor-mediated cyclic nucleotide gated channelopathy in experimental temporal lobe epilepsy.* *Ann Neurol.* 2011 September ; 70(3): 454-465
247. **Shah MM, Huang Z and Martinello K.** *HCN and K_v7 (M-) channels as targets for epilepsy treatment.* *Neuropharmacology* 69 (2013) 75-81

248. **Dugladze T, Vida I, Tort AB, Gross A, Otahal J, Heinemann U, Kopell NJ and Gloveli T.** *Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy.* PNAS (2007), vol. 104, n°44, pp: 17530-17535
249. **Tsai M, Pardoe HR, Perchyonok Y, Fitt GJ, Scheffer IE, Jackson GD and Berkovic SF.** *Etiology of hippocampal sclerosis – Evidence for a predisposing familial morphologic anomaly.* Neurology 2013;81;144-149
250. **Azakli H, Gurses C, Arikan M, Aydoseli A, Aras Y, Sencer A, Gokyigit A, Bilgic B and Ustek D.** *Whole mitochondrial DNA variations in hippocampal surgical specimens and blood samples with high-throughput sequencing: A case of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.* Gene 529 (2013) 190-194
251. **Chahine L, Abou-Khalil B, Siren A, Andermann F, Hedera P, Ge Q, Andermann E and Pandolfo M.** *A new locus for familial temporal lobe epilepsy on chromosome 3q.* Epilepsy Research (2013) 106, 338-344
252. **Tang B, Sander T, Craven KB, Hempelmann A, Escayg A.** *Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy.* Neurobiol Dis (2008) 29:59-70
253. **Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson, RB, Dixon JE, McKinnon D and Cohen IS.** *Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN)mRNA expression in cardiac tissues.* Circ. Res. (1999) 85, e1-6
254. **Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A and Ohmori H.** *Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node.* J. Biol. Chem. (1999) 274, 12835–2839
255. **Krieger J, Strobel J, Vogl A, Hanke W and Breer H.** *Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae.* Insect Biochem. Mol. Biol. (1999) 29, 255–267
256. **Marx T, Gisselmann G, Stortkuhl KF, Hovemann BT and Hatt H.** *Molecular cloning of a putative voltage- and cyclic nucleotide-gated ion channel present in the antennae and eyes of Drosophila melanogaster.* Invert. Neurosci. (1999) 4, 55–63
257. **Bucchi A, Baruscotti M, Nardini M, Barbuti A, Micheloni S, Bolognesi M and DiFrancesco D.** *Identification of the Molecular Site of Ivabradine Binding to HCN4 Channels.* Plos. One 2013; 8 (1) e53132