



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μηχανισμοί διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών
κυττάρων προς κυτταρικούς τύπους μεσοδερμικής προέλευσης**

ΜΑΛΤΑΜΠΕ Α. ΒΙΟΛΕΤΤΑ
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μηχανισμοί διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών
κυττάρων προς κυτταρικούς τύπους μεσοδερμικής προέλευσης**

ΜΑΛΤΑΜΠΕ Α. ΒΙΟΛΕΤΤΑ
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μαλταμπέ Βιολέτας: 28-1-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 635/15-4-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κούκλης Παναγιώτης Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φώτης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Λαζαρίδης Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 6-6-2008

«Μηχανισμοί διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς κυτταρικούς τύπους μεσοδερμικής προέλευσης»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 780^α/2-7-2015

Κωλέττης Θεόφιλος	Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αγαθόπουλος Συμεών	Αναπληρωτής Καθηγητής Τεχνολογίας Κεραμικών Υλικών του Τμήματος Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωλέττας Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής –Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λαζαρίδης Ιωάννης	τ. Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις **6-10-2015**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



MARIA ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην πολυαγαπημένη μου , Ελένη

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Φτάνοντας στο τέλος της επίπονης, αλλά ταυτόχρονα άκρως γοητευτικής πορείας του διδακτορικού, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους αυτούς που με τον τρόπο τους με βοήθησαν, άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωση της.

Πρώτον απ' όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διατριβής μου, το Δρ. Παναγιώτη Κούκλη, ο οποίος με μύησε από τα προπτυχιακά μου ακόμα χρόνια στο θελκτικό πεδίο των βλαστικών κυττάρων, για την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγηση και την επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη του καθ' όλη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή, Δρ. Θεόδωρο Φώτση και τον Αναπληρωτή Καθηγητή, Δρ Ιωάννη Λαζαρίδη για τις καίριες υποδείξεις και την άποψη συνεργασία τους, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τους Καθηγητές, Δρ. Θεόφιλο Κωλέττη, Δρ. Σάββα Χριστοφορίδη, Δρ. Ευάγγελο Κωλέττα και Δρ. Συμεών Αγαθόπουλο για την τιμή που μου έκαναν.

Ιδιαίτερα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή, κ. Θεόφιλο Κωλέττη για την πολύτιμη συμβολή και καθοδήγηση του στην διεξαγωγή των *in vivo* πειραματικών μεθόδων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου του Αναπληρωτή Καθηγητή κ Συμεών Αγαθόπουλου, υποψήφιος διδάκτορες Ελεονόρα Μάρκα και Μαίρη Ρούμπη για τη συμβολή τους στα πειράματα *in vivo* καθώς και για την άποψη συνεργασία μας και για το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, τον διευθυντή του εργαστηρίου Βιολογίας Καθηγητή, Δρ. Σπύρο Γεωργάτο για το ενδιαφέρον και τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, όλα τα μέλη, παλιά και νέα, αρχικά του εργαστηρίου Βιολογίας καθώς και τα μέλη των εργαστηρίων της Βιολογικής Χημείας, του ΙΤΕ/ΙΒΕ και της Γενετικής για την άποψη συνεργασία και αλληλοϋποστήριξη καθώς και για το φιλικό περιβάλλον. Ιδιαίτερα ένα ευχαριστώ στη συνάδελφο, παλιότερο μέλος του εργαστηρίου μας, διδάκτορα Αλέκα Ντουχανιάρη για τη βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες προς την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την υποστήριξη και την ανοχή που έδειξαν στις προτεραιότητες που επέβαλε αυτή η προσπάθεια όλα αυτά τα χρόνια. Πάνω απ' όλα, ένα μεγάλο ευχαριστώ και ευγνωμοσύνη στους πολυαγαπημένους γονείς μου, Απόστολο, ο οποίος δεν βρίσκεται πια κοντά μας και Ελένη, για την ολόψυχη αγάπη, ενθάρρυνση, εμπιστοσύνη και οικονομική και ηθική υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Μαλταμπέ Α. Βιολέττα

Ιωάννινα, 2015

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	7
1.1 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ως μοντέλο για τη μελέτη των σταδίων της <i>in vitro</i> διαφοροποίησης.....	9
1.1.1 Εμβρυική ανάπτυξη	9
1.1.2 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα- χαρακτηριστικά, ιδιότητες.....	11
1.1.3 <i>In vitro</i> διαφοροποίηση Εμβρυονικών Βλαστικών Κυττάρων	12
1.2 Σχηματισμός Καρδιαγγειακού Συστήματος.....	16
1.2.1 Ανάπτυξη του καρδιακού ιστού: Από ένα κοινό πρόγονο στο σχηματισμό της ώριμης καρδιάς	17
1.2.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt κατά την καρδιακή διαφοροποίηση και την ανάπτυξη.....	27
1.2.3 Σχηματισμός ενδοθηλιακών κυττάρων	29
1.3 Ο ρόλος των συνδέσμων προσκόλλησης στη διαφοροποίηση.....	37
1.3.1 Σύνδεσμοι προσκόλλησης (Adherens junctions, AJs).....	37
1.3.2 Η οικογένεια των Καδερινών	38
1.3.3 Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης.....	39
1.3.4 Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά τη γαστριδίωση.	40
1.3.5 Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά τον πρώιμο σχηματισμό της καρδιάς και κατά την ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος.....	41
1.4 Μέθοδοι Αναγεννητικής ιατρικής στην καρδιά	44
1.4.1 Α) Επαγωγή των καρδιομυοκυττάρων να επανενταχθούν στο κυτταρικό κύκλο	45
1.4.2 Β) Βλαστικά κύτταρα και κυτταρική θεραπεία.....	46
1.4.3 Γ) Επαγωγή της αναγεννητικής ικανότητας των ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων.....	51
1.4.4 Δ) Άμεσος επαναπρογραμματισμός ινοβλαστών σε καρδιομυοκύτταρα.....	51
1.4.5 Μηχανική ιστών (tissue engineering)	52
1.4.6 Αλγινικό οξύ	53
1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	55

2. Υλικά και μέθοδοι	57
2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων.....	59
2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	59
2.1.2 <i>In vitro</i> διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.....	61
2.1.3 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων	62
2.1.4 Διαμόλυνση ESC κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation).....	63
2.1.5 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πολυ-αιθυλενιμίνη και με το Xfect πολυμερές ..	63
2.2 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής.....	64
2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασχηματισμό.....	64
2.2.2 Ανάπτυξη βακτηρίων	65
2.2.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων	65
2.2.4 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA	65
2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	66
2.2.6 Απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτή αгарόζης.....	66
2.2.7 Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών pPY2549puro-pTKHygro και pPY2549-EGFP-puro-pTKHygro	66
2.3 Μέθοδοι μοριακής βιολογίας.....	68
2.3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα	68
2.3.2 Απομόνωση ολικού RNA από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και από εμβρυοειδή σωμάτια	68
2.3.3 Απομόνωση ολικού RNA από καρδιακό ιστό	68
2.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός RNA.....	69
2.3.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	69
2.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	70
2.3.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)	70
2.4 Βιοχημικές μέθοδοι	72
2.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με τη χρήση πηκτής ακρυλαμιδίου	72
2.4.2 Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου	72
2.4.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	72
2.5 Μορφολογικές μέθοδοι.....	73
2.5.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.....	73

2.5.2	Έμμεσος ανοσοφθορισμός εμβρυοειδών σωματίων	74
2.5.3	Έμμεσος ανοσοφθορισμός εμβρυοειδών σωματίων σε εναιώρημα (whole mount) ..	74
2.5.4	Ανοσοϊστοχημεία	75
2.5.5	Συνεστιακή μικροσκοπία	77
2.5.6	Μελέτη της ενεργότητας του υποκινητή της VE-Cadherin στις σταθερές κυτταρικές σειρές pNec-EGFP μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS).....	77
2.6	Πειραματόζωα	78
2.6.1	Εμφύτευση κυττάρων στο μυοκάρδιο πειραματόζωνων (επίμυες)	78
2.6.2	Απομόνωση /αφαίρεση καρδιάς από επίμυες.....	79
2.6.3	Προετοιμασίας δειγμάτων για τομές	80
2.7	Στατιστική ανάλυση	80

3. Αποτελέσματα.....81

3.1	Διαφοροποίηση ESCs προς κύτταρα του καρδιαγγειακού συστήματος <i>in vitro</i>	83
3.2	Το είδος των συνδέσμων προσκόλλησης (Adherens Junctions) μεταξύ των προγονικών ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων	89
3.3	Ο υποκινητής της VE-cadherin ενεργοποιείται σε έναν υποπληθυσμό των Isl1 καρδιακών προγονικών κυττάρων.	92
3.4	Η έκφραση ενός μεταλλάγματος με αρνητικώς επικρατούσα δράση cadherin υπό τον έλεγχο του υποκινητή της VE-cadherin διαρρηγνύει τους ενδοθηλιακούς συνδέσμους προσκόλλησης...	96
3.5	Η εξειδίκευση των Isl1+ κυττάρων αναστέλλεται στα μεταλλαγμένα EBs	103
3.6	Μερική αποκατάσταση των συνδέσμων προσκόλλησης και επαναφορά της καρδιακής διαφοροποίησης σε υβριδικά EBs που προέρχονται από μεταλλαγμένα και αγρίου τύπου ESCs108	
3.7	Απομόνωση και χαρακτηρισμός προγονικών κυττάρων στα οποία είναι ενεργός ο ιστοειδικός υποκινητής της VE-cadherin (Pvec) κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης.	113
3.8	Έκπτυξη/ πολλαπλασιασμός των επιλεχθέντων κυττάρων υπό τον υποκινητή της VE- cadherin, pVEC.....	117
3.9	<i>In vitro</i> διαφοροποίηση των CEDPs	121
3.10	<i>In vivo</i> διαφοροποίηση των CEDPs έπειτα από εμφύτευση τους σε υγιείς και εμφραγματικούς επίμυες.	123

4. Συζήτηση.....135

4.1	Τα πλειοδύναμα Isl1+ καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα σχηματίζουν N-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης, ενώ ένας υποπληθυσμός αυτών εκφράζει επιπρόσθετα και VE- cadherin.	137
-----	--	-----

4.2	Η έκφραση ενός μεταλλάγματος cadherin με αρνητικώς επικρατούσα δράση, υπό τον Pvec διαρρηγνύει την ακεραιότητα του ενδοθηλίου και παράλληλα αναστέλλει την εξειδίκευση των Isl1+ κυττάρων σε μεταλλαγμένα EBs.	138
4.3	Μερική αποκατάσταση των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης και επαναφορά της καρδιακής διαφοροποίησης σε υβριδικά EBs.....	142
4.4	Ταυτόχρονη απομόνωση και έκπτυξη ενδοθηλιακών και καρδιακών προγονικών κυττάρων (CEDPs) προερχόμενων από διαφοροποίηση ESCs.....	143
4.5	Διαφοροποίηση <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> των CEDPs.....	146
5. Περίληψεις.....		149
5.1	Περίληψη	151
5.2	Summary	153
6. Ευρετήριο Ακρωνυμίων.....		155
7.. Βιβλιογραφία		157

1. Εισαγωγή

1.1 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ως μοντέλο για τη μελέτη των σταδίων της *in vitro* διαφοροποίησης.

1.1.1 Εμβρυική ανάπτυξη

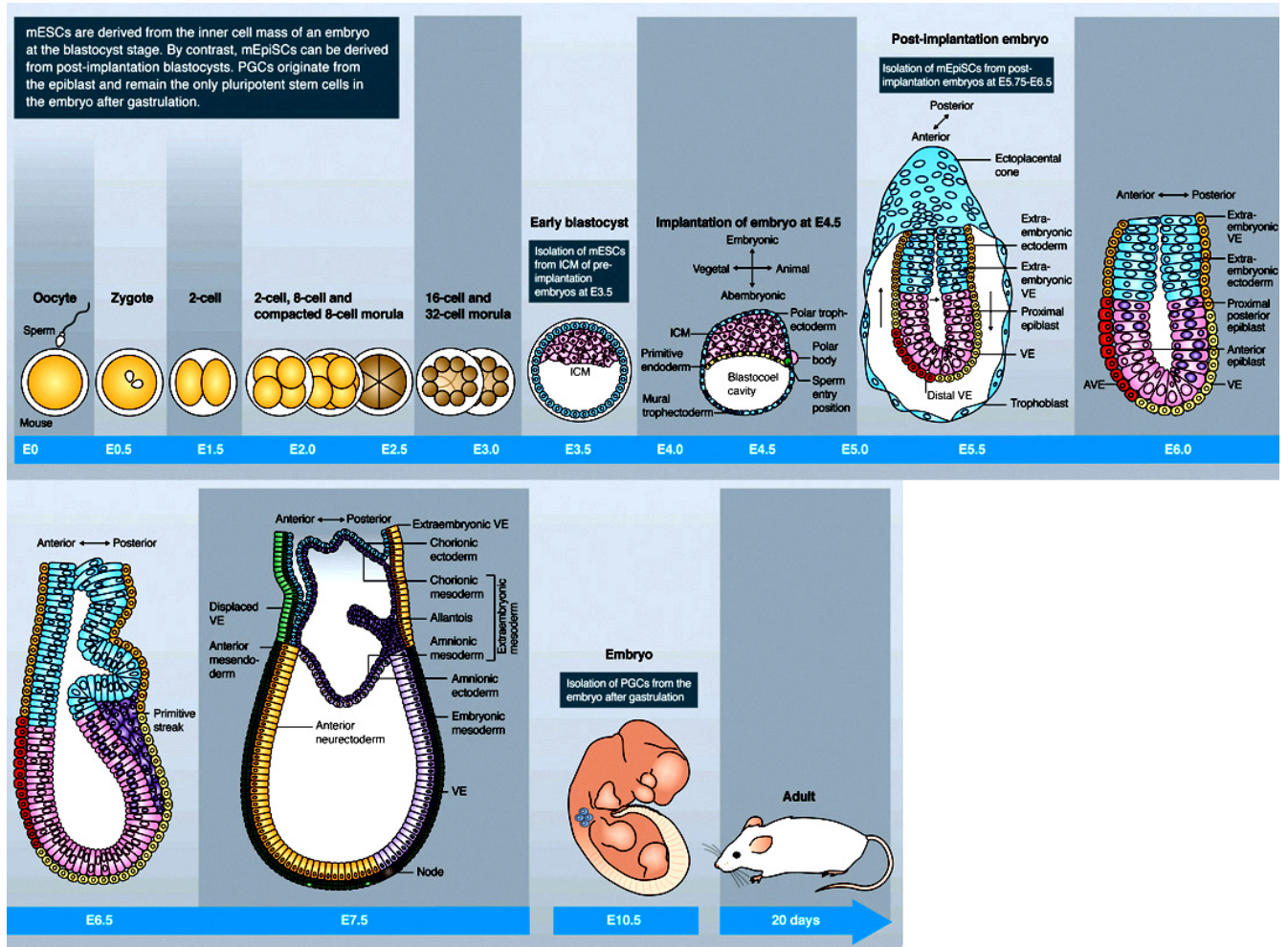
Η ανάπτυξη του μύος ξεκινάει με τη γονιμοποίηση του ωαρίου, από το οποίο θα δημιουργηθεί το έμβρυο και οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί, που είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη του εμβρύου. Το γονιμοποιημένο ωάριο υφίσταται συνέχεις κυτταρικές διαιρέσεις οι οποίες καλούνται αυλάκωση. Κατά την αυλάκωση κάθε θυγατρικό κύτταρο κληρονομεί όλα τα χρωμοσώματα από το αρχικό κύτταρο, έτσι κάθε θυγατρικό κύτταρο είναι πανομοιότυπο με το αρχικό. Τα θυγατρικά κύτταρα ονομάζονται βλαστομερίδια. Μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων το σχήμα των βλαστομεριδίων παραμένει ευδιάκριτο. Λίγο αργότερα όμως, παρατηρείται συμπίεση των βλαστομεριδίων με ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των διακυτταρικών επαφών. Το φαινόμενο αυτό καλείται σύμπτυξη (compaction). Από τη σύμπτυξη μέχρι το στάδιο των 32 κυττάρων περίπου το έμβρυο καλείται μορίδιο (morula). Σε κάθε κυτταρική διαίρεση, τα βλαστομερίδια μειώνονται σε μέγεθος αλλά είναι ικανά να δημιουργήσουν όλους τους εμβρυικούς αλλά και τους εξωεμβρυικούς κυτταρικούς τύπους γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα (totipotent). Η ολοδύναμη κατάσταση διατηρείται από το στάδιο του ζυγώτη μέχρι την πρώιμη βλαστοκύστη (4). Από αυτή τη χρονική στιγμή και μετά τα κύτταρα σταδιακά χάνουν την αναπτυξιακή τους ικανότητα και υποβάλλονται σε λειτουργική εξειδίκευση (5), (6). Όταν ο αριθμός των βλαστομεριδίων προσεγγίζει τα 32 κύτταρα δημιουργείται μια σφαιρική κοιλότητα που ονομάζεται βλαστοκύστη (7).

Η βλαστοκύστη αποτελείται από δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων: α) ένα εξωτερικό πολωμένο επιθηλιακό μονόστιβο, το τροφοεξώδερμα (TE) και β) ένα εσωτερικό συσσωμάτωμα μη πολωμένων πολυδύναμων κυττάρων, που ονομάζονται εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass –ICM). Τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας βρίσκονται στο εσωτερικό, προσκολλημένα μεταξύ τους και συνδέονται με τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος. Τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος δημιουργούν τον πλακούντα. Από τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, σχηματίζονται τα κύτταρα της επιβλάστης και τα κύτταρα της υποβλάστης που με τη σειρά τους διακλαδίζονται προς κύτταρα του πρωτογενούς και του σπλαχνικού ενδοδέρματος (Primitive Endoderm - PE, Visceral Endoderm – VE). Από το πρωτογενές ενδοδέρμα θα προκύψουν οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί, ο λεκιθικός σάκος, η αλλαντοΐδα και το άμνιο. Κατά την εμβρυική ημέρα 3.5 (E3.5), το

έμβρυο αποτελείται από τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος, του πρωτογενούς ενδοδέρματος και της εσωτερικής κυτταρικής μάζας από τα οποία απομονώνονται τα πολυδύναμα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.

Η επιβλάστη μετά την εμφύτευση (~ E4.5) διαφοροποιείται κατά τη γαστριδίωση και σχηματίζονται οι τρεις βλαστικές στιβάδες: ενδόδερμα, μεσόδερμα και νευροεξώδερμα από τις οποίες θα προκύψουν στη συνέχεια οι ιστοί του ενήλικα μυός. Μετά την γαστριδίωση, η μοναδική πηγή πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων στο έμβρυο είναι τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (PGCs) τα οποία προέρχονται από την επιβλάστη (8). Κατά την έναρξη της γαστριδίωσης, τα κύτταρα της επιβλάστης σχηματίζουν μια δομή που έχει ονομαστεί πρωτογενής λωρίδα (Primitive Streak, PS) στην περιοχή από την οποία θα προκύψει το οπίσθιο μέρος του εμβρύου. Κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης, τα επιθηλιακού τύπου κύτταρα της επιβλάστης διασχίζουν την πρωτογενή λωρίδα και μετατρέπονται σε κύτταρα μεσέγχυματικού τύπου (9). Από αυτά τα κύτταρα προκύπτουν το μεσόδερμα και το οριστικό ενδόδερμα.

Ο διαχωρισμός των υποπληθυσμών του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος είναι ελεγχόμενος χρονικά και χωρικά. Τα πρώτα μεσοδερμικά κύτταρα προέρχονται από τα κύτταρα της επιβλάστης που κινούνται στην πιο πίσω περιοχή της πρωτογενούς λωρίδας και σχηματίζουν το εξωεμβρυικό μεσόδερμα. Τα κύτταρα αυτά αποικίζουν το λεκιθικό σάκο και δημιουργούν τα αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα των νησιδίων αίματος (blood islands) (10). Τα κύτταρα που διασχίζουν την λωρίδα σε πιο πρόσθια θέση αργότερα θα σχηματίσουν το καρδιακό μεσόδερμα και το παραξονικό μεσόδερμα. Τέλος, από τα κύτταρα που διαπερνούν την πιο πρόσθια θέση της πρωτογενούς λωρίδας δημιουργείται το ενδόδερμα και το αξονικό μεσόδερμα από το οποίο προκύπτει η νωτοχορδή. Τα κύτταρα από την περιοχή της επιβλάστης τα οποία δεν διαπερνούν την πρωτογενή λωρίδα, δημιουργούν το εξώδερμα (11).



Εικόνα 1. Εμβρυογένεση στον μν. Από τη γονιμοποίηση του ωαρίου στον ενήλικα οργανισμό (Pauklin et al., 2011)

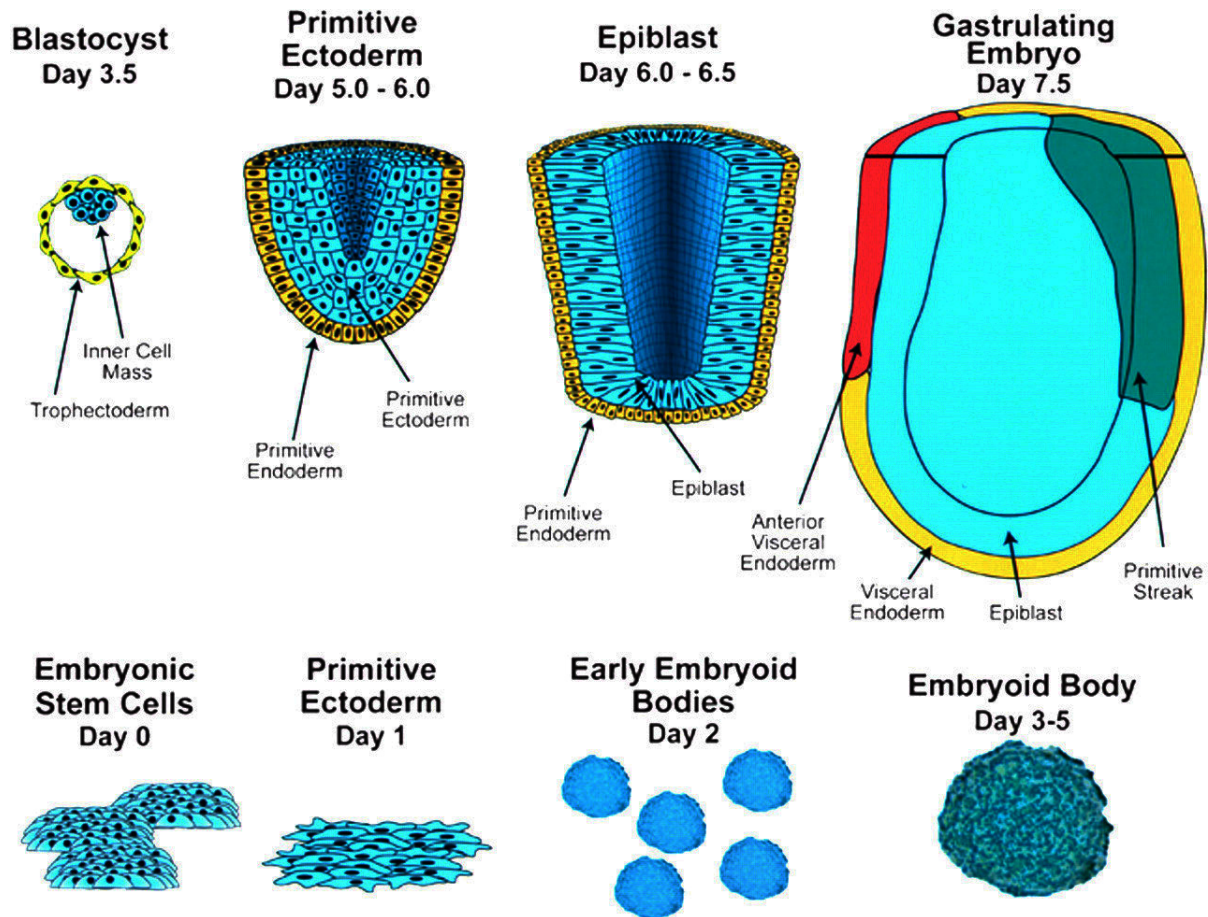
1.1.2 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα- χαρακτηριστικά, ιδιότητες

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, συγκεκριμένα από την επιβλάστη. Χαρακτηρίζονται από δύο βασικές ιδιότητες: το υψηλό δυναμικό αυτό-ανανέωσης και την πολυδυναμία. Επίσης, εμφανίζουν την ικανότητα να αναπτύσσουν ισοδύναμους κλώνους επιβεβαιώνοντας έτσι, ότι τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα υπόκεινται σε συμμετρική αυτό-ανανέωση. Η ανάπτυξη τους μπορεί να συνεχίζεται απεριόριστα και να αναγεννούν πολύ γρήγορα μεγάλους πληθυσμούς από ανθεκτικές καθαρές αποικίες εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Παρόλα αυτά τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα δεν έχουν υποστεί αθανатоποίηση ή μετασχηματισμό καθώς επίσης δεν εμφανίζουν σημάδια γήρανσης σε αντίθεση με άλλες πρώιμες καλλιέργειες. Έχουν σταθερό διπλοειδικό καρυότυπο και απουσιάζει η

απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από θηλυκά έμβρυα. Τέλος εμφανίζουν απουσία σημείου ελέγχου στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (12).

1.1.3 *In vitro* διαφοροποίηση Εμβρυονικών Βλαστικών Κυττάρων

Η *in vitro* διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ESCs) πραγματοποιείται με την απομάκρυνση των παραγόντων που διατηρούν την αδιαφοροποίητη κατάσταση τους. Κατά την έναρξη της *in vitro* διαφοροποίησης των ESCs δημιουργούνται αυθόρμητα και οι τρεις βλαστικές στιβάδες, ενώ υπό κατάλληλες συνθήκες, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα οδηγούνται στη συνέχεια σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους (13) (14).



Εικόνα 2. Μοντέλο της πρώιμης ανάπτυξης. Σχηματικό μοντέλο κατά το οποίο συγκρίνονται τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και των ES/EBs (Keller et al., 2005).

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί τρεις μέθοδοι διαφοροποίησης των ESCs:

- α) Ο σχηματισμός τρισδιάστατων κυτταρικών συσσωματωμάτων γνωστών ως εμβρυοειδή σωματίδια (Embryoid Bodies, EBs). Κατά τη δημιουργία τους, σχηματίζεται εξωτερικά ένα στρώμα από ενδοδερμικά κύτταρα, ενώ κατά την πάροδο ολίγων ημερών ακολουθεί ο σχηματισμός ενός εξωδερμικού «δακτυλίου» και ακολούθως η εξειδίκευση των μεσοδερμικών κυττάρων. Καταυτό τον τρόπο προκύπτουν κύτταρα με διαφορετική μορφολογία και εκφράζουν δείκτες του εξωδέρματος, του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος.
- β) Η διαφοροποίηση των ESCs επάνω σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (π.χ. collagen IV, matrigel κ.α.)
- γ) Η διαφοροποίηση των ESCs απευθείας επάνω σε κύτταρα στρώματος (Feeder Cells), τα οποία εκκρίνουν κάποιο μείγμα αυξητικών παραγόντων.

Αν και οι τρεις μέθοδοι είναι αποτελεσματικές, καθεμία παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου διαφοροποίησης μέσω της δημιουργίας των EBs είναι ο σχηματισμός τρισδιάστατων δομών ο οποίος επιτρέπει την πιστή αναπαραγωγή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια των αναπτυξιακών προγραμμάτων. Ωστόσο, είναι δύσκολο να χειραγωγηθεί η διαφοροποίηση μέσω προσθήκης κυτοκινών και επαγωγικών παραγόντων εντός αυτών των δομών, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαφοροποίηση. Όσον αφορά τη δεύτερη μέθοδο, το βασικό πλεονέκτημα κατά τη χρήση εξωκυττάριας μήτρας αποτελεί η εύκολη πρόσβαση των αυξητικών παραγόντων που επάγουν την κατευθυνόμενη ιστική διαφοροποίηση σε σχέση με το σύστημα καλλιέργειας των εμβρυοειδών σωματίων. Επίσης, με αυτή τη μέθοδο αποφεύγονται οι αλληλεπιδράσεις με στρωματικά κύτταρα. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας μπορεί να έχουν ανεπιθύμητες επιδράσεις επηρεάζοντας τη γένεση και την επιβίωση ορισμένων αναπτυσσόμενων κυτταρικών τύπων. Η τρίτη μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για την επαγωγή της διαφοροποίησης ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής, είναι η δυσκολία διαχωρισμού των κυττάρων, που έχουν προέλθει από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, από τα κύτταρα του στρώματος.

1.1.3.1 Διαφοροποίηση προς ενδόδερμα

Το πάγκρεας και το ήπαρ είναι από τα βασικά παράγωγα του οριστικού ενδοδέρματος. Τα παγκρεατικά β-κύτταρα καθώς και τα ηπατικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για την θεραπεία της ηπατικής ανεπάρκειας αλλά και του σακχαρώδους διαβήτη, τύπου I. Χαρακτηριστικοί δείκτες του τελικού ενδοδέρματος είναι το Foxa2, GATA4 και Sox17, του πρώιμου ήπατος η α-fetoprotein και η albumin ενώ του πρώιμου παγκρέατος το Pdx1 και η ινσουλίνη. Έχει διαπιστωθεί ότι κατά τη διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ανθρώπου και μυός, δημιουργούνται κύτταρα τα οποία κατέχουν τα βασικά χαρακτηριστικά των ηπατοκυττάρων. Επίσης έχειδειχθεί ότι τα σχηματιζόμενα ηπατοκύτταρα μπορούν να ενσωματωθούν και να λειτουργήσουν έπειτα από μεταμόσχευση τους στο ήπαρ ενός ξενιστή. Παράλληλα, υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές και πρωτόκολλα για τη δημιουργία ενδοκρινών κυττάρων του παγκρέατος τα οποία παράγουν ινσουλίνη κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Το ποσοστό όμως των κυττάρων αυτών, παραμένει πολύ μικρό (2-3%). Η επαγωγή του τελικού ενδοδέρματος επιτυγχάνεται με υψηλά επίπεδα του σηματοδοτικού μονοπατιού activin/Nodal (15),(11).

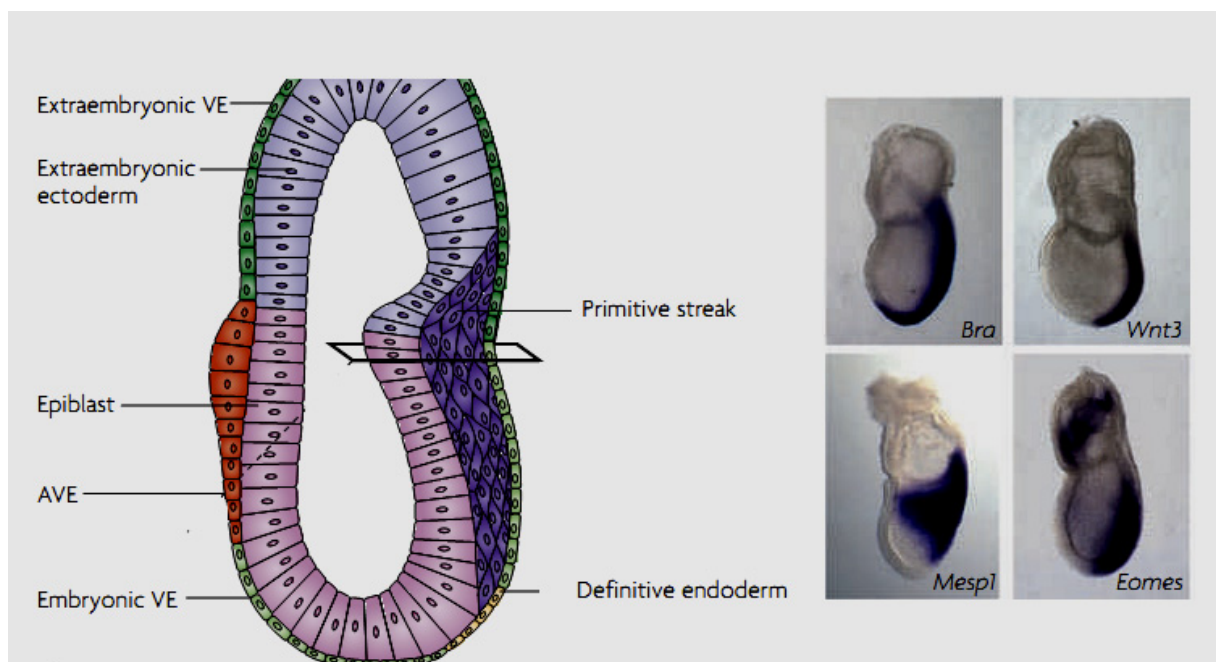
1.1.3.2 Διαφοροποίηση προς νευροεξώδερμα

Το νευροεξώδερμα είναι η βλαστική στιβάδα από την οποία προκύπτουν ποικίλες κυτταρικές σειρές εκ των οποίων χαρακτηριστικές είναι το περιφερικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα καθώς και τα επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας. Η δημιουργία νευρικών κυττάρων από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα έχει μελετηθεί και χαρακτηριστεί εκτενέστατα. Έχει επισημανθεί ότι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πρωτόκολλα διαφοροποίησης μπορούν να δημιουργηθούν αλλά και να απομονωθούν και οι τρεις βασικοί τύποι κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος, νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Χαρακτηριστικοί δείκτες κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων είναι η πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων nestin και ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2, οι οποίοι εκφράζονται σε ολιγοδύναμα νευρικά κύτταρα, ενώ κατά την τελική τους διαφοροποίηση ανιχνεύονται οι δείκτες Tuj1, NeuN, MAP-2, TH, GFAP και αρκετοί άλλοι. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του FGF επάγει το σχηματισμό του νευροεξωδέρματος αντίθετα με τα σηματοδοτικά μονοπάτια BMP, Wnt activin/Nodal που δεν φαίνεται να έχουν ενεργό ρόλο (16), (11).

Η διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας έχει μελετηθεί εκτενώς και καθορίζεται από την έκφραση των ενδιάμεσων ινιδίων κερατίνης καθώς επίσης και από τον ειδικό δείκτη των κερατινοκυττάρων *involucrin*. Έχει διαπιστωθεί ότι κατά τη διαφοροποίηση ESCs εκφράζονται όψιμοι δείκτες της επιδερμίδας καθώς και δείκτες ινοβλαστών, δεδομένα τα οποία συνηγορούν ότι τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα ανασύστασης διαφοροποιημένης επιδερμίδας *in vitro*. (17),(13).

1.1.3.3 Διαφοροποίηση προς μεσόδερμα

Το μεσόδερμα είναι η βλαστική στιβάδα από την οποία προκύπτουν οι μύες, τα οστά, οι χόνδροι, το αίμα, το καρδιαγγειακό σύστημα, ο συνδετικός και ο λιπώδης ιστός. Έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Brachyury (ή αλλιώς T) προσδιορίζει τον σχηματισμό του μεσοδέρματος κατά τη διάρκεια της γαστρίδωσης (18). Ο Brachyury είναι βασικό μέλος της οικογένειας γονιδίων T-box, οι οποίοι κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που κατέχουν βασικό ρόλο κατά την ανάπτυξη. Η έκφραση του Brachyury είναι παροδική στο νεο-σχηματιζόμενο μεσόδερμα καθώς και στα μεσοδερμικά κύτταρα που μεταναστεύουν ενώ μειορρυθμίζεται γρήγορα στο παραξονικό, στο πλευρικό και στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα καθώς επίσης μειώνεται και στη πρωτογενή λωρίδα. Πειράματα σε μύς κατέδειξαν ότι έμβρυα στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο του Brachyury πεθαίνουν λόγω προβλημάτων στο σχηματισμό της πρωτογενούς λωρίδας, της νωτοχορδής και της αλλαντοΐδας (19). Για την επαγωγή του μεσοδέρματος είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών Wnt και BMP. Κατά το σχηματισμό του μεσοδέρματος και της πρωτογενούς λωρίδας σημαντικό ρόλο κατέχει επίσης, ο T- box μεταγραφικός παράγοντας Eomesodermin. Συγκεκριμένα είναι απαραίτητος για την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT), για τη μετανάστευση των μεσοδερμικών κυττάρων καθώς και για την εξειδίκευση του καρδιακού μεσοδέρματος (20).



Εικόνα 3. Σχηματισμός του μεσοδέρματος κατά τη γαστριδίωση. Τα κύτταρα της επιβλάστης (ροζ) συγκλίνουν προς το οπίσθιο τμήμα του εμβρύου και εισέρχονται στην πρωτογενή λωρίδα για να σχηματίσουν το πρωτογενές μεσόδερμα (μωβ). RNA *in situ* υβριδισμός καταδεικνύει την τοπολογία της έκφρασης των σηματοδοτικών μορίων και των μεταγραφικών ρυθμιστών κατά τη γαστριδίωση. Την εμβρυική ημέρα E7.5, το Wnt3 περιορίζεται στην οπίσθια πλευρά του εμβρύου. Ο μεταγραφικός παράγοντας Brachyury εκφράζεται καθ' όλη την έκταση της πρωτογενούς λωρίδας καθώς και στη νωτοχορδή ενώ η Eomesodermin περιορίζεται στην εμπρόσθια πλευρά της πρωτογενούς λωρίδας και στο χόριον (3).

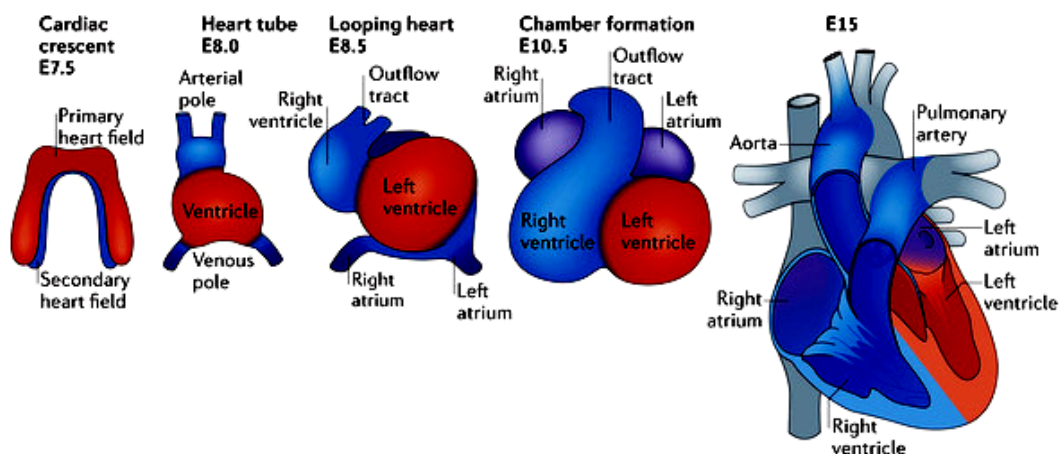
1.2 Σχηματισμός Καρδιαγγειακού Συστήματος.

Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι το πρώτο λειτουργικό όργανο που σχηματίζεται κατά την εμβρυογένεση στα θηλαστικά. Αποτελεί θεμελιώδες σύστημα κατά την εμβρυική ανάπτυξη αλλά και κατά την ενήλικη ζωή καθώς είναι απαραίτητο για τη διανομή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα του οργανισμού. Γι' αυτό το λόγο προηγείται του σχηματισμού των υπόλοιπων οργάνων. Αρχικά, περίπου την εμβρυική ημέρα E6.5, σχηματίζονται τα αιμοποιητικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, στο λεκιθικό σάκο, ενώ την εμβρυική ημέρα E7.5, σχηματίζεται το καρδιαγγειακό σύστημα στο έμβρυο. Το γονίδιο Flk1, το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα του VEGF-A, εκφράζεται στο πλευρικό μεσόδερμα στο στάδιο της πρωτογενούς λωρίδας και είναι δείκτης των αιμοποιητικών, των ενδοθηλιακών καθώς και των καρδιαγγειακών προγονικών κυττάρων. Κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των ESCs διαπιστώθηκε ότι εμφανίζονται δύο ξεχωριστοί κυτταρικοί πληθυσμοί

Brachyury+/Flk1+. Ο πρώτος συμβάλει στη δημιουργία της αιμαγγειοβλάστης, ενώ στη συνέχεια ο δεύτερος εμφανίζει δυναμικό διαφοροποίησης προς ενδοθηλιακά κύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα (21), (22).

1.2.1 Ανάπτυξη του καρδιακού ιστού: Από ένα κοινό πρόγονο στο σχηματισμό της ώριμης καρδιάς

Ο σχηματισμός της καρδιάς των σπονδυλωτών κατά την εμβρυογένεση μπορεί να διαχωριστεί σε διακριτά και μερικώς επικαλυπτόμενα στάδια τα οποία περιλαμβάνουν την εξειδίκευση των καρδιακών προγονικών κυττάρων, το σχηματισμό του πρωτογενούς καρδιακού σωλήνα μέσω κυτταρικής μετανάστευσης και μορφογενετικών κινήσεων, την καρδιακή αναδίπλωση (cardiac looping), το σχηματισμό των καρδιακών θαλάμων, τη διαφραγματοποίηση και τελικώς την ωρίμανση. Ο σχηματισμός της ώριμης καρδιάς, με τους τέσσερις θαλάμους απαιτεί τη συμμετοχή διαφορετικών κυτταρικών τύπων με εξειδικευμένες λειτουργίες. Τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα εξειδικεύονται για να σχηματίσουν τα καρδιομυοκύτταρα των κόλπων και των κοιλιών καθώς επίσης και το σύστημα αγωγιμότητας. Τα λεία μυϊκά κύτταρα σχηματίζουν την φλεβική και αρτηριακή αγγείωση ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα δημιουργούν το ενδοκάρδιο και τις βαλβίδες. Τέλος, το επικάρδιο λειτουργεί σαν πηγή πρόδρομων κυττάρων για τη στεφανιαία κυκλοφορία (23).



Εικόνα 4. Ανάπτυξη της καρδιάς. Τα αναπτυξιακά στάδια της εμβρυϊκής καρδιάς στον μυ (1).

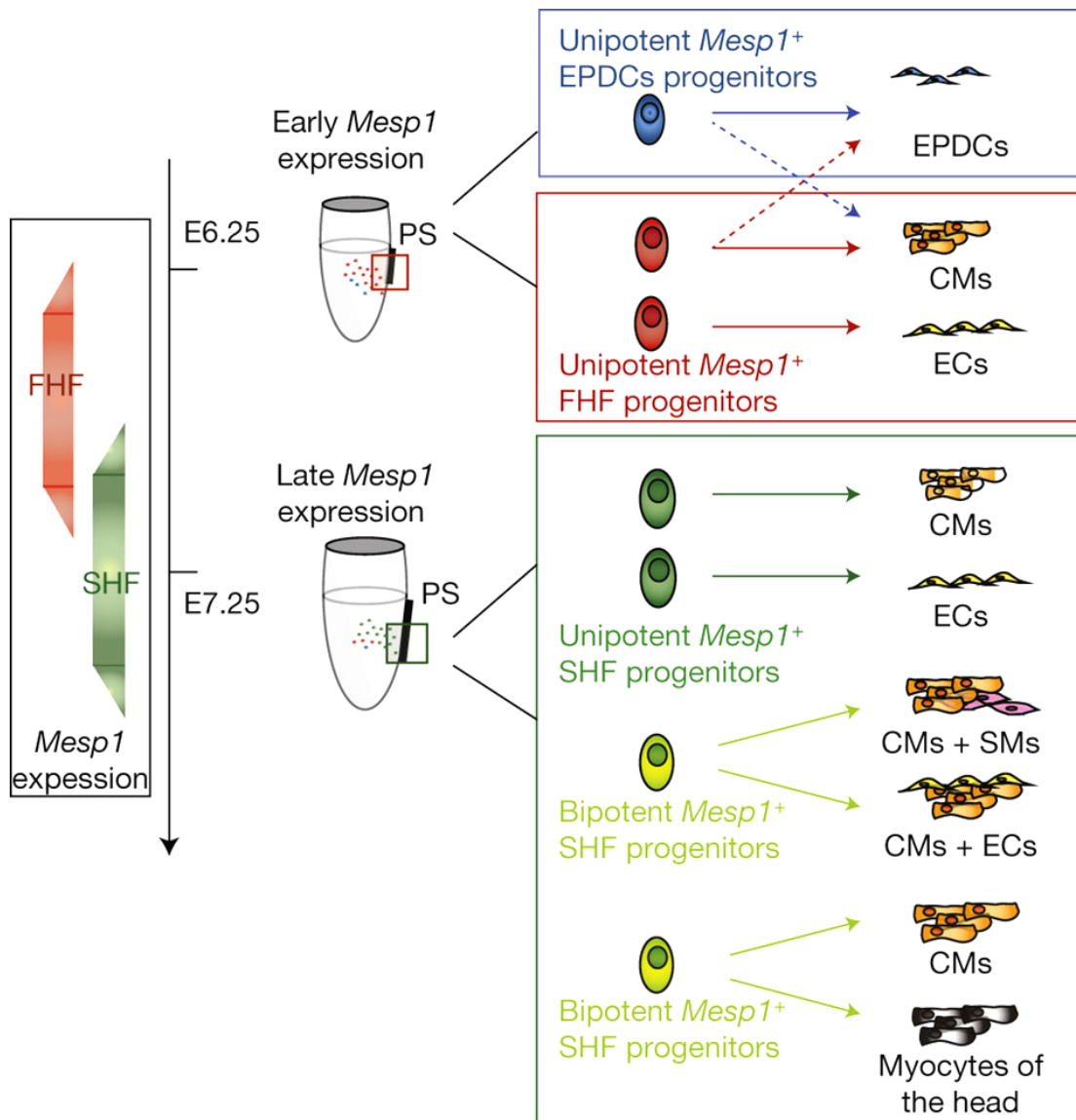
1.2.1.1 Καρδιακό μεσόδερμα - Ο μεταγραφικός παράγοντας Mesp1

Το καρδιακό μεσόδερμα προέρχεται από το πρόσθιο τμήμα της πρωτογενούς λωρίδας. Ο μεταγραφικός παράγοντας Mesp1, ο οποίος εκφράζεται ήδη από την εμβρυική ημέρα 6.5 κατά μήκος της πρωτογενούς λωρίδας, κατέχει σημαντικό ρόλο κατά την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή, επιτρέποντας στα κύτταρα του μεσοδέρματος να διεισδύσουν κάτω από την επιβλάστη καθώς επίσης, διαμεσολαβεί στην αποκόλληση και μετανάστευση των καρδιαγγειακών κυττάρων από την πρωτογενή λωρίδα (24). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα της καρδιάς προέρχονται από δυο ξεχωριστούς προγονικούς κυτταρικούς πληθυσμούς ή πεδία: το πρωτογενές καρδιακό πεδίο (FHF) και το δευτερογενές καρδιακό πεδίο (SHF), τα οποία προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο κατά τη γαστριδίωση. Τα κύτταρα του FHF, προέρχονται από το πρόσθιο σπλαγχνικό μεσόδερμα και δημιουργούν την καρδιακή ημισέληνο (cardiac crescent). Αυτός ο πληθυσμός συμβάλλει στο σχηματισμό της αριστερής κοιλίας και του αριστερού κόλπου. Τα κύτταρα του SHF προέρχονται από το φαρυγγικό μεσόδερμα (pharyngeal mesoderm) το οποίο βρίσκεται δίπλα στην περιοχή της καρδιακής ημισελήνου και συμμετέχουν πρωταρχικώς στο σχηματισμό της δεξιάς κοιλίας και του σωλήνα εκροής (outflow tract) του αρτηριακού πόλου (25). Η έκφραση του Mesp1 καθορίζει τον πληθυσμό του καρδιακού μεσοδέρματος από τον οποίο θα προκύψουν τα προγονικά κύτταρα του πρωτογενούς και το δευτερογενούς καρδιακού πεδίου. Η ενεργοποίηση του, πραγματοποιείται μέσω του Brachyury και της Eomesodermin (26, 27).

Η υπερέκφραση του Mesp1 στο σύστημα των εμβρυοειδών σωματιδίων επάγει μια ομάδα καρδιογενών μεταγραφικών παραγόντων και προάγει την καρδιαγγειακή διαφοροποίηση. Η έκφραση του είναι άκρως παροδική καθώς μειορρυθμίζεται κατά τη διαφοροποίηση των προγονικών καρδιαγγειακών κυττάρων. Κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων με τη δημιουργία εμβρυοειδών σωματιδίων έχειδειχθεί ότι πρωτοεμφανίζεται την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης. Η έκφρασή του κορυφώνεται την τέταρτη ενώ την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης μειορρυθμίζεται ταχύτατα. Επιπρόσθετα, έχει σημειωθεί ότι εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί απαλοιφή του Mesp1/ Mesp2 (μεταγραφικός παράγοντας που κατέχει πανομοιότυπο bHLH με το Mesp1 και κατέχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του καρδιακού μεσοδέρματος αλλά και στη σωματογένεση) αποτυγχάνουν να συμμετέχουν στον σχηματισμό της καρδιάς (28). Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο Mesp1 είναι υπεύθυνος για την εξειδίκευση των κυττάρων προς την καρδιαγγειακή πορεία εντός του μεσοδέρματος και δρα ως ο κύριος ρυθμιστής στην κορυφή της ιεραρχίας των

καρδιακών μεταγραφικών παραγόντων (29), (30), (31), (32). Κατά τη διαφοροποίηση, τα *Mesp1*⁺ καρδιακά προγονικά κύτταρα αρχίζουν να εκφράζουν τους πρώιμους καρδιακούς μεταγραφικούς παράγοντες *GATA4*, *Nkx2.5* και *Isl1*.

Προσφάτως καθορίστηκε με κλωνογενή ανάλυση, ότι ο *Mesp1*⁺ προγονικός πληθυσμός δεν είναι κοινός για τα δύο καρδιακά πεδία αλλά αποτελείται από δύο χρονικά ξεχωριστές πηγές *Mesp1*⁺ προγονικών κυττάρων, οι οποίες εξειδικεύονται είτε προς το πρωτογενές είτε το δευτερογενές καρδιακό πεδίο (33). Επίσης, πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι ο *Mesp1* συμμετέχει στην εξειδίκευση πολλαπλών μεσοδερμικών κυτταρικών τύπων, ανάλογα με το πλαίσιο/ πρότυπο έκφρασης του. Συγκεκριμένα, πέρα από τους καρδιακούς κυτταρικούς τύπους, έχειδειχθεί ότι καθοδηγεί την εξειδίκευση των αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και των μυϊκών σκελετικών κυτταρικών τύπων (34).

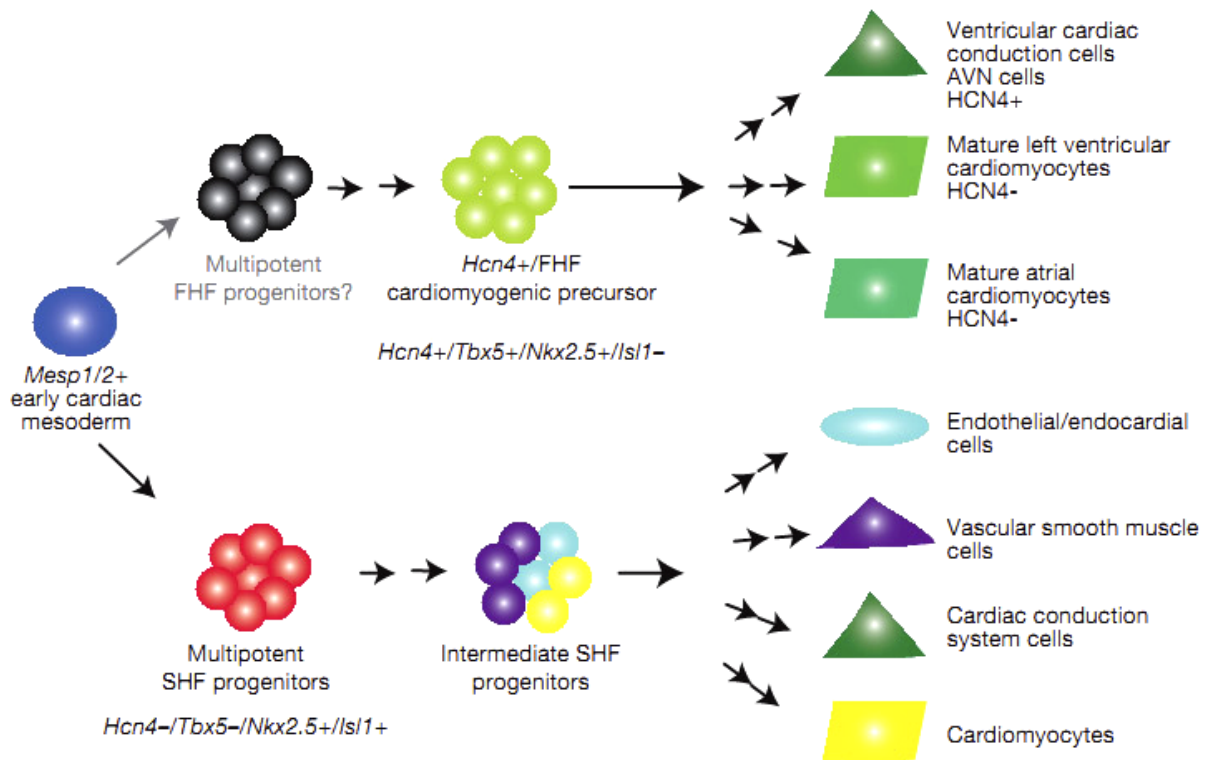


Εικόνα 5. Μοριακή και κλωνογενής ανάλυση των *Mesp1* προγονικών κυττάρων αποδεικνύει την ύπαρξη χρονικά ξεχωριστών *Mesp1* προγονικών κυττάρων τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη της καρδιάς. Αρχικά, τα *Mesp1*⁺ κύτταρα δημιουργούν το πρωτογενές καρδιακό πεδίο (FHF, κόκκινο χρώμα) και στη συνέχεια το δευτερογενές καρδιακό πεδίο (SHF, πράσινο χρώμα) παρουσιάζοντας ταυτόχρονα μια επικαλυπτόμενη έκφραση του *Mesp1* στους δύο πληθυσμούς την εμβρυική ημέρα 6.75. Τα προγονικά κύτταρα του FHF είναι μονοδύναμα, δηλαδή δημιουργούν είτε καρδιομυοκύτταρα είτε ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ τα προγονικά κύτταρα του SHF είναι μονοδύναμα είτε διδύναμα. Τα κύτταρα του επικαρδίου και τα κύτταρα που προέρχονται από αυτό (EPDCs) δημιουργούνται ανεξάρτητα από τους *Mesp1*⁺ κυτταρικούς πληθυσμούς κατά τα πρώιμα χρονικά σημεία της ανάπτυξης. (PS: πρωτογενή λωρίδα) (Lescroart et al., 2014).

1.2.1.2 Πρωτογενές καρδιακό πεδίο (FHF)

Ο βασικός ρόλος του πρωτογενούς καρδιακού πεδίου είναι ο σχηματισμός του πρώιμου καρδιακού σωλήνα και η υποστήριξη της συσταλτικής του λειτουργίας. Στη συνέχεια, από τα κύτταρα αυτά σχηματίζεται η αριστερή κοιλία της καρδιάς. Κατά τη δημιουργία της καρδιακής ημισελήνου (των κυττάρων του πρωτογενούς καρδιακού πεδίου) ενεργοποιείται ένα ρυθμιστικό δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων (Nkx2-5, Tbx5, Tbx20, και Gata4) το οποίο απαιτείται για την σωστή ανάπτυξη της καρδιάς. Τα κύτταρα από την καρδιακή ημισέληνο μεταναστεύουν εσωτερικά και σχηματίζουν τον πρωτογενή καρδιακό σωλήνα, ο οποίος αποτελείται από δύο στιβάδες: εσωτερικά από ενδοκαρδιακά ενδοθηλιακά κύτταρα και εξωτερικά από κύτταρα του μυοκαρδίου. Η συνεχής έκφραση του Nkx2-5 και του Gata4 είναι απαραίτητη για τη δημιουργία και τη διαφοροποίηση του. Ο πρωτογενής καρδιακός σωλήνας, ο οποίος προέρχεται από το πρωτογενές καρδιακό πεδίο λειτουργεί ως βάση για την μετέπειτα ανάπτυξη της καρδιάς. Η προς τα δεξιά αναδίπλωση του καρδιακού σωλήνα παράλληλα με το αναπτυξιακό δυναμικό διαφοροποίησης των εσωτερικών καμπυλοτήτων οδηγεί τελικά στην ώριμη καρδιά (35).

Αντίθετα με το δευτερογενές καρδιακό πεδίο, το πρωτογενές καρδιακό πεδίο δεν έχει χαρακτηριστεί εκτενώς λόγω έλλειψης χαρακτηριστικών μοριακών δεικτών. Ο HCN4, ενώ είναι δείκτης του καρδιακού συστήματος αγωγιμότητας, βρέθηκε να εκφράζεται στο καρδιακό μεσόδερμα και στη καρδιακή ημισέληνο την εμβρυική ημέρα 6.5 και 7.5 αντίστοιχα σε έμβρυα μύος έπειτα από RNA in situ υβριδισμό, ενώ μειορρυθμίζεται έπειτα από το σχηματισμό του πρωτογενούς καρδιακού σωλήνα. Η σύγκριση της έκφρασής του με άλλους καρδιακούς προγονικούς δείκτες έδειξε ότι υπάρχει συνέκφραση με το μεταγραφικό παράγοντα Nkx2.5, ο οποίος εκφράζεται και στα δύο καρδιακά πεδία, ενώ κατά κύριο λόγο δεν συνεκφράζεται με τον Isl1. Παράλληλα, βρέθηκε μεγάλη συνέκφραση με το Tbx5, ο οποίος εκφράζεται κατά την καρδιακή ημισέληνο. Συμπερασματικά, ο HCN4 έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης του πρωτογενούς καρδιακού, από το οποίο προκύπτουν κυρίως καρδιομυογενείς κυτταρικοί τύποι (36),(37).



Εικόνα 6. Προτεινόμενο μοντέλο καρδιομυογένεσης. Τα HCN4+/FHF κύτταρα είναι καθορισμένα από τα αρχικά στάδια προς το σχηματισμό καρδιομυογενών κυτταρικών τύπων, ενώ τα κύτταρα του SHF είναι πλειοδύναμα (multipotent) καρδιακά προγονικά κύτταρα. (Spatar et al., 2013)

1.2.1.3 Δευτερογενές καρδιακό πεδίο (SHF)

Το δευτερογενές καρδιακό πεδίο χαρακτηρίζεται από την έκφραση των ειδικών παραγόντων *Isl1*, *Fgf10*, *Hand2* καθώς και των *Tbx5*, *Nkx2-5* και *Gata4*, οι οποίοι εκφράζονται και στα δύο καρδιακά πεδία. Από τα κύτταρα του SHF μπορούν να προκύψουν καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ενδοκαρδιακά κύτταρα καθώς και λεία μυϊκά κύτταρα. Σύμφωνα με πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης, όλοι οι παραπάνω κυτταρικοί τύποι προέρχονται από έναν προγονικό πληθυσμό που εκφράζει τον LIM-μεταγραφικό παράγοντα *Isl1*. Παρόλο που η έκφραση του *Isl1* είναι χαρακτηριστικός δείκτης του SHF, έχει ανιχνευθεί έκφραση του και στο coelomic μεσόδερμα από το οποίο θα προκύψουν το πρωτογενές και το δευτερογενές καρδιακό πεδίο (38). Περαιτέρω πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης με *Isl1-Cre* και με «ευαίσθητες» μεθόδους αναφοράς (FLAP reporter, Rosa26 reporter) κατέδειξαν ότι το *Isl1* εκφράζεται ευρέως κατά το σχηματισμό της καρδιάς, σε σύγκριση με παλαιότερες μελέτες, αλλά παρόλα αυτά ένα μέρος της αριστερής κοιλίας παραμένει αρνητικό ως προς την έκφραση του (39),(40). Απαλοιφή

του Isl1 οδηγεί πρωτίστως σε φαινότυπο με δυσλειτουργίες στις περιοχές που προέρχονται από το SHF δηλαδή στη δεξιά κοιλία και στο σωλήνα εκροής (outflow tract) του αρτηριακού πόλου (41). Συνοψίζοντας τα παραπάνω, ο μεταγραφικός παράγοντας Isl1, παρόλο που εκφράζεται παροδικά στο καρδιακό μεσόδερμα, στο πρωτογενές καρδιακό πεδίο άλλα και σε άλλους μη καρδιακούς κυτταρικούς τύπους, κατέχει βασικό ρόλο στο δευτερογενές καρδιακό πεδίο και έχει καταδειχθεί ως βασικός δείκτης των καρδιακών προγονικών κυττάρων καθώς η έκφραση του μειορρυθμίζεται όταν ξεκινά η έκφραση μορίων της τελικής καρδιακής διαφοροποίησης. Έτσι, ο Isl1+ πληθυσμός έχει χαρακτηριστεί ως πλειοδύναμος (multipotent) καρδιαγγειακός προγονικός πληθυσμός (42) και έχει απομονωθεί κατά τη διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων *in vitro* αλλά και από εμβρυϊκές καρδιές μυών *in vivo*. Ο πληθυσμός αυτός αυτοανανεώνεται κατά την *in vitro* έκπτυξη του αλλά και διαφοροποιείται προς όλους τους κυτταρικούς τύπους της καρδιάς (καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ενδοκαρδιακά κύτταρα καθώς και λεία μυϊκά κύτταρα). Αντίστοιχος πληθυσμός έχει βρεθεί και απομονωθεί από ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα (43). Αξιοσημείωτο είναι ότι ένας υποπληθυσμός αδιαφοροποίητων Isl1+ καρδιαγγειακών προγονικών κυττάρων παραμένει στην εμβρυϊκή καρδιά και μετά τον τελικό σχηματισμό της, ενώ ελάχιστα και σπάνια Isl1+ κύτταρα ανιχνεύονται αμέσως μετά την γέννηση του εμβρύου για πολύ μικρό χρονικό διάστημα (44). Τα Isl1+ κύτταρα εκφράζουν Nkx2.5 αλλά όχι c-kit ή Sca-1.

Παράλληλα με τις μελέτες για τον Isl1+ πληθυσμό, έχει απομονωθεί επίσης ο Nkx2.5+ καρδιακός προγονικός πληθυσμός, *in vivo* από εμβρυϊκές καρδιές μυών (την εμβρυϊκή ημέρα E9.5 καθώς και κατά τη διαφοροποίηση των ESCs *in vitro*. Κατά την απομόνωση τους, τα Nkx2.5+ κύτταρα εμφανίζουν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και μέτρια έκφραση των c-kit και Sca-1 αλλά δεν εκφράζουν ενδοθηλιακούς δείκτες (45). Ο Nkx2.5+ πληθυσμός κατέχει διπλό δυναμικό διαφοροποίησης, προς καρδιομυοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μελέτες με πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης στους μύες οι οποίες καταδεικνύουν ότι τα περισσότερα, αν όχι όλα τα κύτταρα του ενδοκαρδίου προέρχονται από Nkx2.5 προγονικά κύτταρα.

Το δευτερογενές καρδιακό πεδίο μπορεί να διαχωριστεί σε υποκατηγορίες οι οποίες διακρίνονται ανάλογα με την έκφραση χαρακτηριστικών γονιδίων αλλά και από τη συμβολή τους στο σχηματισμό της καρδιάς. Το εμπρόσθιο δευτερογενές καρδιακό πεδίο χαρακτηρίζεται από την έκφραση των Fgf8, Fgf10, Tbx1 και Mef2c (46), (47), (48). Τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται τα παραπάνω γονίδια δημιουργούν τον αρτηριακό πόλο της καρδιάς καθώς και τη δεξιά κοιλία και το σωλήνα εκροής. Το οπίσθιο δευτερογενές

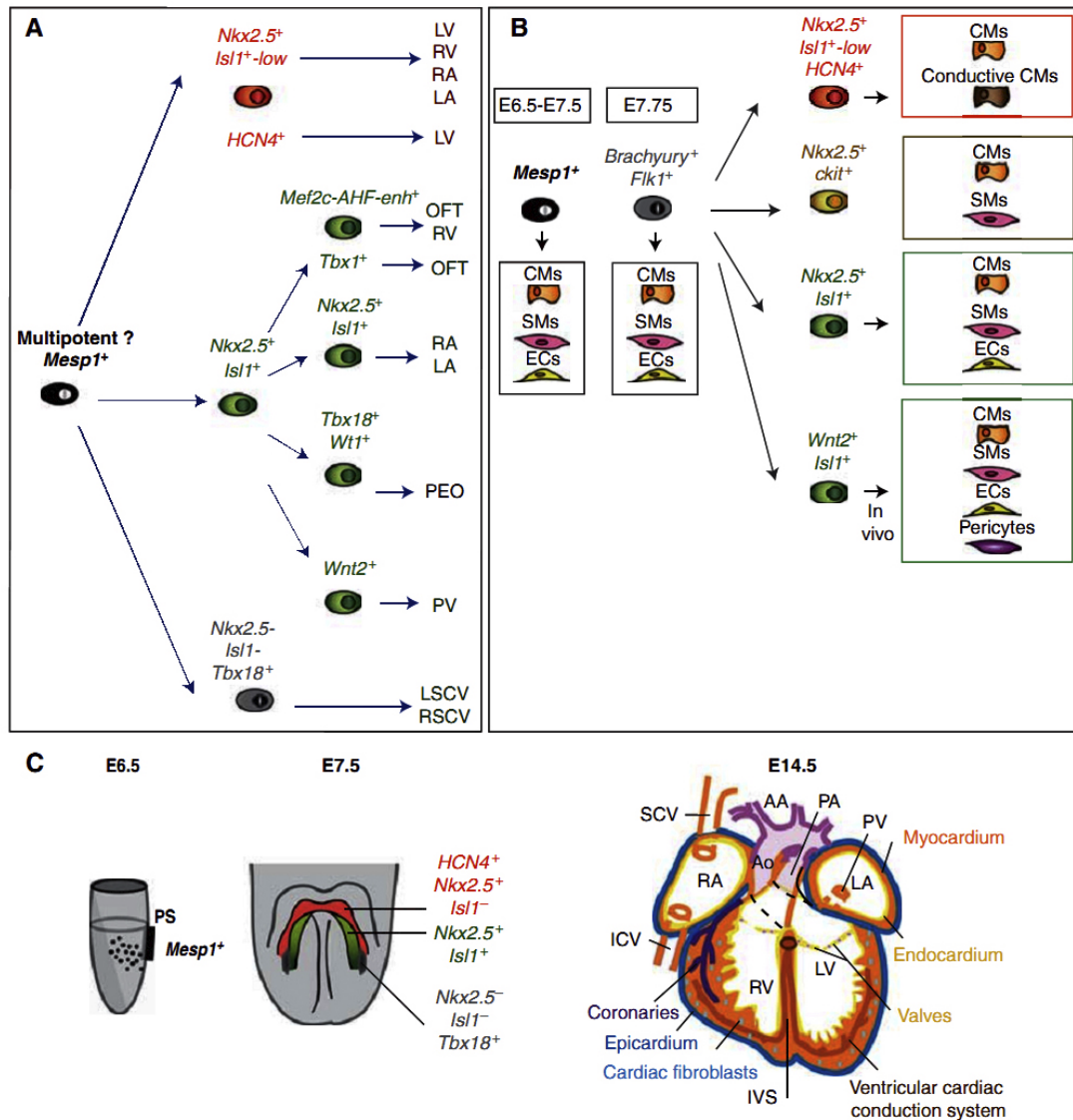
καρδιακό πεδίο συμβάλει στους κόλπους, στο φλεβικό πόλο της καρδιάς και χαρακτηρίζεται από την έκφραση του *Isl1* άλλα όχι των παραπάνω δεικτών. Ο καθορισμός του οπίσθιου πεδίου εξαρτάται από τη σηματοδότηση του *Wnt2*, το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση του *GATA6*. Ο καθορισμός του εμπρόσθιου ή του οπίσθιου δευτερογενούς καρδιακού πεδίου καθορίζεται από τη σηματοδότηση μέσω ρετινοϊκού οξέος (49), (50).

1.2.1.4 Προ-επικαρδιακό όργανο

Το προ-επικαρδιακό όργανο (PEO) είναι μια παροδική δομή, η οποία σχηματίζεται στο φλεβικό πόλο του καρδιακού σωλήνα. Τα κύτταρα από το PEO μεγαλώνουν πάνω από το μυοκάρδιο του σωλήνα για να σχηματίσουν το εξωτερικό στρώμα του επικαρδίου. Μερικά από τα κύτταρα του επικαρδίου υπόκεινται σε επιθήλιο-μεσεγχυματική μετατροπή και εισέρχονται στην καρδιά όπου και συμβάλλουν στη δημιουργία λείων μυϊκών κυττάρων των στεφανιαίων αγγείων καθώς επίσης απαρτίζουν τον πληθυσμό των καρδιακών ινοβλαστών.

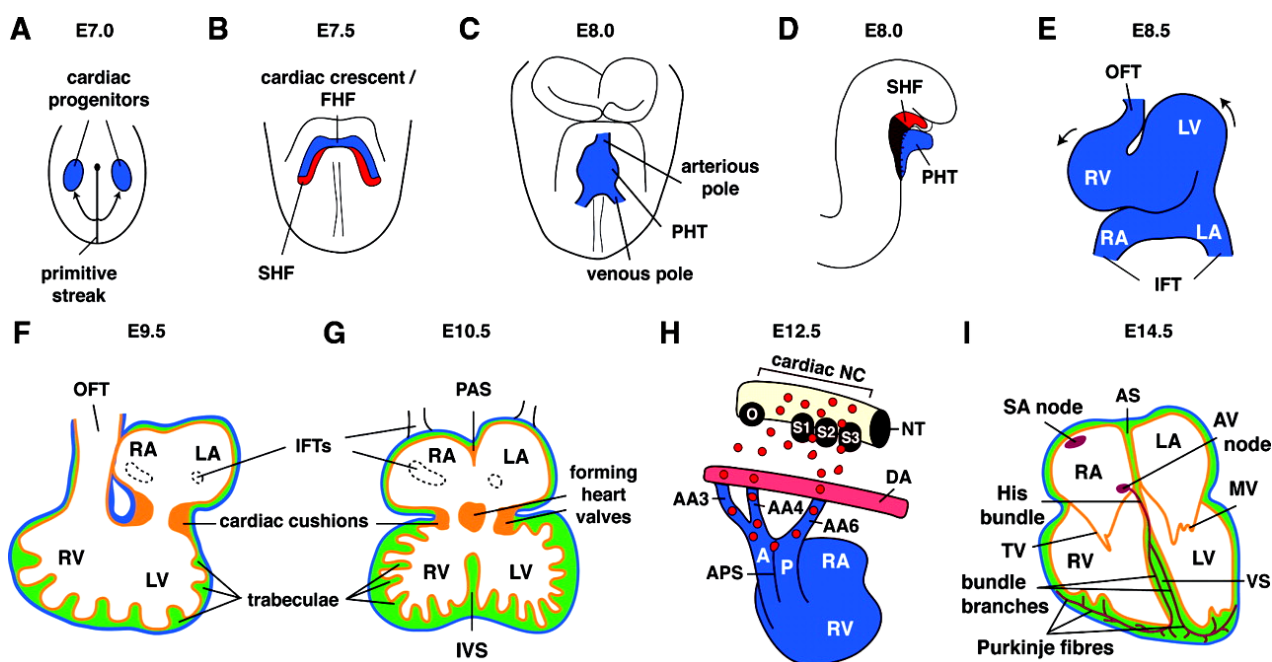
Αρχικά, θεωρείτο ότι το PEO προέρχεται από το coelomic μεσέγχυμα και όχι από το δευτερογενές καρδιακό πεδίο αλλά η ακριβής σχέση του με το δευτερογενές καρδιακό πεδίο δεν έχει ξεκαθαριστεί ιδίως επειδή κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, το coelomic μεσέγχυμα εκφράζει *Isl1*. Το ίδιο ισχύει και για το PEO και ακολούθως για το επικάρδιο αλλά και για τα στεφανιαία αγγεία σύμφωνα με πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης *Isl1-Cre*. Αντίστοιχα πειράματα με *Nkx2.5-Cre* κατέδειξαν ότι σημαίνονται τα ίδια κύτταρα. Επιπρόσθετα, το *Nkx2.5* είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του PEO, αντίθετα με το *Isl1*. Χαρακτηριστικοί δείκτες του PEO και του επικαρδίου είναι το *Wt1*, το *Tbx18*, το *Scx* και το *Sema3D* (51), (52). Μέχρι προσφάτως, υπήρχε η αντίληψη ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των στεφανιαίων αγγείων προέρχονται από το επικάρδιο όπως και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Η θεωρία αυτή καταρρίφθηκε, σύμφωνα με πρόσφατα πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης τα οποία κατέδειξαν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των στεφανιαίων φλεβών και των τριχοειδών αγγείων προέρχονται από το φλεβικό πλέγμα στο *sinus venosus*, τα οποία εισβάλλουν στην καρδιά μετά από το σχηματισμό του επικαρδίου (53). Επιπρόσθετα, πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης έδειξαν ότι οι στεφανιαίες αρτηρίες προέρχονται από το ενδοκάρδιο (54).

Παραμένει ωστόσο αδιευκρίνιστο, εάν τα κύτταρα που προέρχονται από το ΡΕΟ συμμετέχουν στην δημιουργία των καρδιομυοκυττάρων. Είναι πιθανόν οι καρδιακοί ινοβλάστες, οι οποίοι προέρχονται από το επικάρδιο, να λειτουργούν ως μια εν δυνάμει πηγή καρδιακών βλαστικών κυττάρων (49).



Εικόνα 7. Γενετική υπογραφή των καρδιακών προγονικών κυττάρων. (Α) Γενετική προέλευση όλων των συμμετεχόντων στην καρδιά. Παρουσιάζονται τα συνοπτικά αποτελέσματα, έπειτα από πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης σε επίπεδο πληθυσμού. (Β) Το δυναμικό της *in vitro* διαφοροποίησης των καρδιακών προγονικών κυττάρων. Παρουσιάζονται τα συνοπτικά αποτελέσματα, έπειτα από κυτταρική επιλογή και μεθόδους κλωνογούς διαφοροποίησης των ESCs ή προ καρδιακών μεσοδερμικών κυττάρων. (C) Σχηματική αναπαράσταση των *Mesp1*⁺ κυττάρων τα οποία εγκαταλείπουν την πρωτογενή λωρίδα (E6.5) συμμετέχοντας στο σχηματισμό των καρδιακών πεδίων (E7.5) καθώς και στους ιστούς της ώριμης καρδιάς (14.5) (Meilhac et al., 2015).

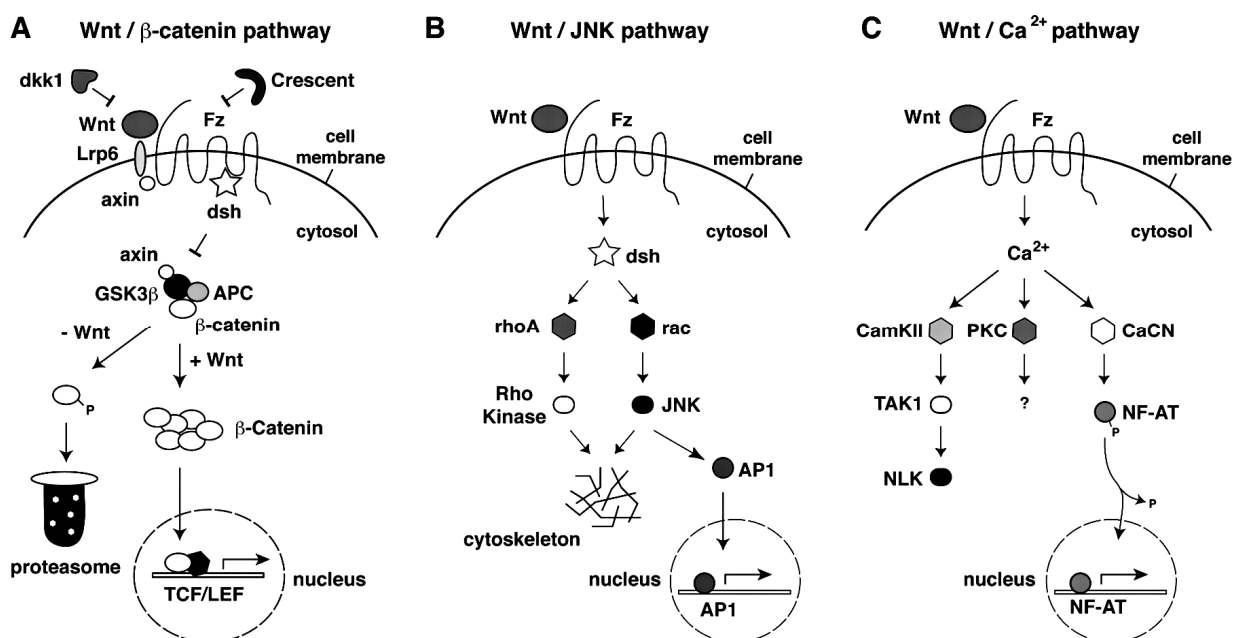
1.2.1.5 Σχηματική αναπαράσταση του σχηματισμού της καρδιάς κατά την εμβρυογένεση.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης της καρδιάς κατά την εμβρυογένεση στο μυ. Α-Ε Η εμπρόσθια πλευρά βρίσκεται στην κορυφή και η οπίσθια στη βάση. **Α.** Την E7.0, τα καρδιακά προγονικά κύτταρα μεταναστεύουν μέσα από την πρωτογενή λωρίδα και σχηματίζουν στην πρόσθια πλευρά του εμβρύου δύο πληθυσμούς. **Β.** Την E7.5, δημιουργούνται τα δύο καρδιακά πεδία, το πρωτογενές (FHF, καρδιακή ημισέληνος) και το δευτερογενές (SHF). **Γ- Δ.** Την E8.0, τα κύτταρα του FHF σχηματίζουν τον πρωτογενή καρδιακό σωλήνα ενώ τα κύτταρα του SHF μεταναστεύουν στον πρωτογενή καρδιακό σωλήνα και από τις δύο πλευρές τις καρδιάς. **Ε.** Την E8.5, ξεκινάει η καρδιακή αναδίπλωση (looping) προς τα δεξιά. Ο σωλήνας εκροής (OFT) δημιουργείται στον αρτηριακό πόλο ενώ ο σωλήνας εκροής (IFT) στον φλεβικό πόλο. **Φ- Γ.** Τομές στην καρδιά τις εμβρυικές ημέρες (F) E9.5 και (G) E10.5. Η καρδιά αναδιπλώνεται προς τα δεξιά και αποτελείται από το επικάρδιο (μπλε), το μυοκάρδιο (πράσινο), το ενδοκάρδιο και το cardiac jelly (πορτοκαλί). Τα κύτταρα του cardiac jelly δημιουργούνται από τα ενδοκαρδιακά κύτταρα τα οποία υπόκεινται σε επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή και αναπαριστούν ένα λεπτό στρώμα μεταξύ ενδοκαρδίου και μυοκαρδίου. Το ενδοκάρδιο και το cardiac jelly επεκτείνονται στον καρδιακό αυλό σχηματίζοντας στην συνέχεια τα cardiac cushions και τις καρδιακές βαλβίδες. **Η.** Η συμμετοχή της νευρικής ακρολοφίας κατά την καρδιακή ανάπτυξη. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τη διαφραγματοποίηση του OFT στην πνευμονική αρτηρία. **Ι.** Ανάπτυξη των καρδιακών βηματοδοτών και του συστήματος αγωγιμότητας (55).

1.2.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt κατά την καρδιακή διαφοροποίηση και την ανάπτυξη.

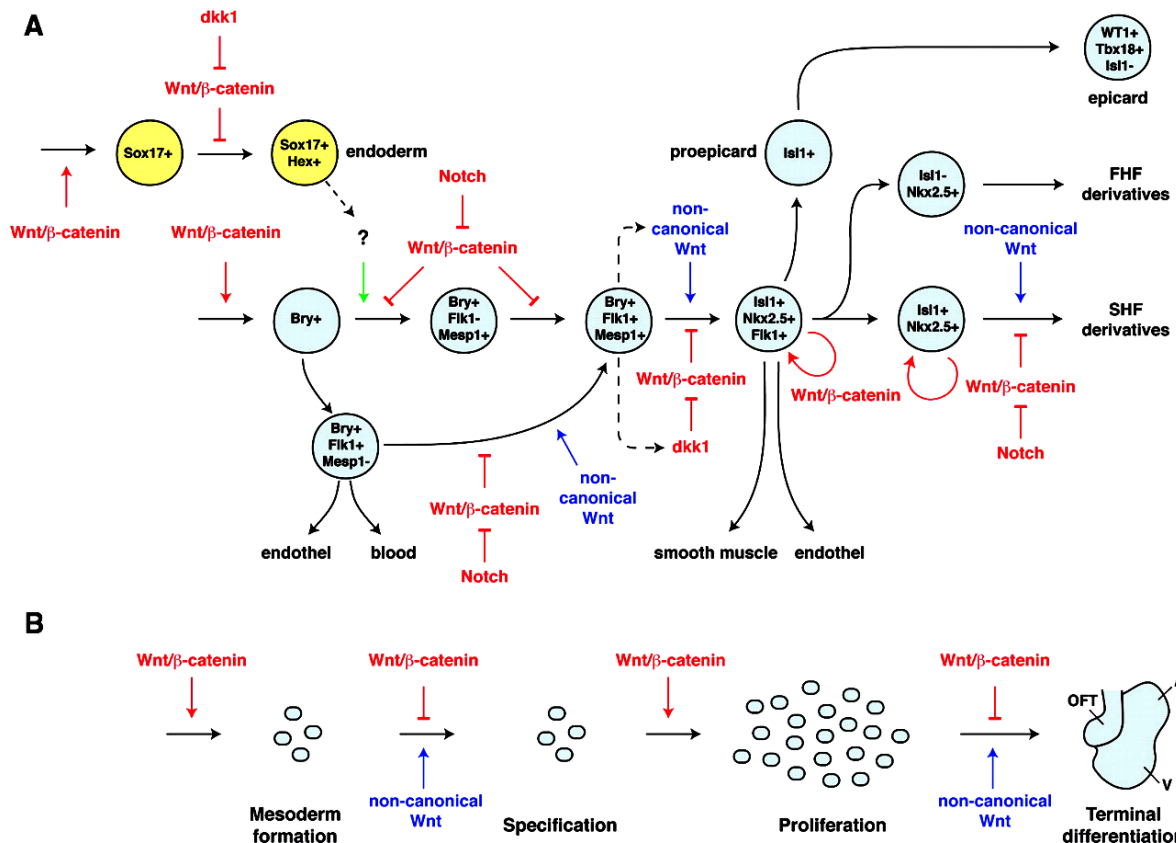
Το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT κατέχει σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυογένεση. Οι πρωτεΐνες WNT προσδένονται στους υποδοχείς τους για να μεταβιβαστεί το σήμα ακολουθώντας τρεις ξεχωριστές πορείες: το κανονικό WNT/ β -catenin μονοπάτι, το WNT/ Ca^{2+} μονοπάτι και το μονοπάτι κυτταρικής πολικότητας (planar cell polarity pathway). Όταν δεν υπάρχει πρόσδεση των πρωτεϊνών WNT με τους υποδοχείς, η β -catenin, η οποία αποτελεί καθοδικό μόριο του μονοπατιού, φωσφορυλιώνεται από την GSK3 β και οδηγείται προς αποδόμηση. Όταν υπάρχει πρόσδεση των πρωτεϊνών WNT στους υποδοχείς τους, Frizzled/Lrp, ενεργοποιείται το Dishevelled το οποίο αναστέλλει την GSK3 β και έτσι απελευθερώνεται η β -catenin από το μονοπάτι αποδόμησης και μεταφέρεται στον πυρήνα.



Εικόνα 9. Συνοπτική παρουσίαση των σηματοδοτικών μονοπατιών Wnt. A. Το κανονικό Wnt ή Wnt/ β -catenin μονοπάτι: Στην απουσία του Wnt, η β -catenin συνδέεται στο σύμπλοκο axin, APC και GSK3 β και φωσφορυλιώνεται. Αυτό οδηγεί στην αποδόμηση της β -catenin στο πρωτεάσωμα. Στην παρουσία του Wnt, το Wnt αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο των υποδοχέων Fz και Lrp6. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του dsh και την απομάκρυνση της axin από το σύμπλοκο «καταστροφής». Η β -catenin συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, μεταφέρεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων μέσω της αλληλεπίδρασης της με τα σημεία πρόσδεσης TCF/LEF. Το Dkk1 και το Crescent είναι εξωκυτταρικοί αναστολείς του μονοπατιού Wnt/ β -catenin. **B. Το μη κανονικό Wnt/ JNK μονοπάτι:** Η αλληλεπίδραση του Wnt με το Fz οδηγεί στην ενεργοποίηση του dsh στο κύτταρο. Το dsh μπορεί να ενεργοποιήσει τις μικρές GTPases rhoA και rac, οι οποίες ενεργοποιούν τις Rho κινάσες και το JNK. Το JNK μπορεί να ενεργοποιήσει το AP1, το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση μεταγραφής γονιδίων. **C. Το Wnt/ Ca^{2+} μονοπάτι:** Σε αυτό το

μονοπάτι, η σύνδεση του Wnt στον υποδοχέα Fz έχει σαν αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική αύξηση του Ca^{2+} . Το Ca^{2+} μπορεί να ενεργοποιήσει τα CaMKII, PKC και CaCN. Το CaCN ενεργοποιεί τη ρύθμιση του NF-AT, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική σύνδεση (Gessert et al., 2010).

Ο σχηματισμός του μεσοδέρματος εξαρτάται από το κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. (56), (57). Για να επιτευχθεί η μετέπειτα εξειδίκευση των κυττάρων του καρδιακού μεσοδέρματος (Brachyury+/Flk1+/Mesp1+) έχειδειχθεί ότι είναι απαραίτητη η καταστολή του κανονικού μονοπατιού Wnt. Διαρκής ενεργοποίηση της β -catenin σε αυτό τον κυτταρικό πληθυσμό έχει σαν αποτέλεσμα να μη δημιουργείται ο πρωτογενής καρδιακός σωλήνας σε έμβρυα μυός ενώ η προσθήκη του αναστολέα Dkk1 δίνει το έναυσμα να ξεκινήσει η καρδιογένεση (58), (29). Επιπρόσθετα έχειδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του Notch4 σε αυτά τα κύτταρα αυξορρυθμίζει τα μόρια που απενεργοποιούν το Wnt/ β -catenin μονοπάτι. Κατά την καρδιακή εξειδίκευση το μη- κανονικό μονοπάτι Wnt κατέχει σημαντικό ρόλο μέσω των Wnt11 και Wnt5a. Στη συνέχεια, το σηματοδοτικό κανονικό μονοπάτι Wnt ελέγχει την κλωνογενή έκπτυξη του αδιαφοροποίητου Isl1+ πλειοδύναμου καρδιαγγειακού προγονικού πληθυσμού και έχει θετική επιρροή κατά την ανάπτυξη των δομών που προέρχονται από το δευτερογενές καρδιακό πεδίο στην ώριμη καρδιά (59). Περαιτέρω για την τελική διαφοροποίηση των καρδιακών προγονικών κυττάρων, το Wnt/ β -catenin μειορρυθμίζεται, ενώ το μη κανονικό μονοπάτι Wnt κατέχει πάλι βασικό ρόλο (55), (60).



Εικόνα 10. Οι πολλαπλές φάσεις του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt κατά την πρώιμη καρδιακή ανάπτυξη. Α. Το Wnt είναι απαραίτητο για την πρώιμη καρδιακή ανάπτυξη. Το κανονικό μονοπάτι Wnt αναπαριστάται με κόκκινο ενώ το μη κανονικό μονοπάτι με μπλε. Οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι με γκρι. **Β.** Τα τέσσερα στάδια της πρώιμης καρδιακής ανάπτυξης. Δημιουργία μεσοδέρματος, εξειδίκευση, πολλαπλασιασμός και τελική διαφοροποίηση. (Gessert et al., 2010).

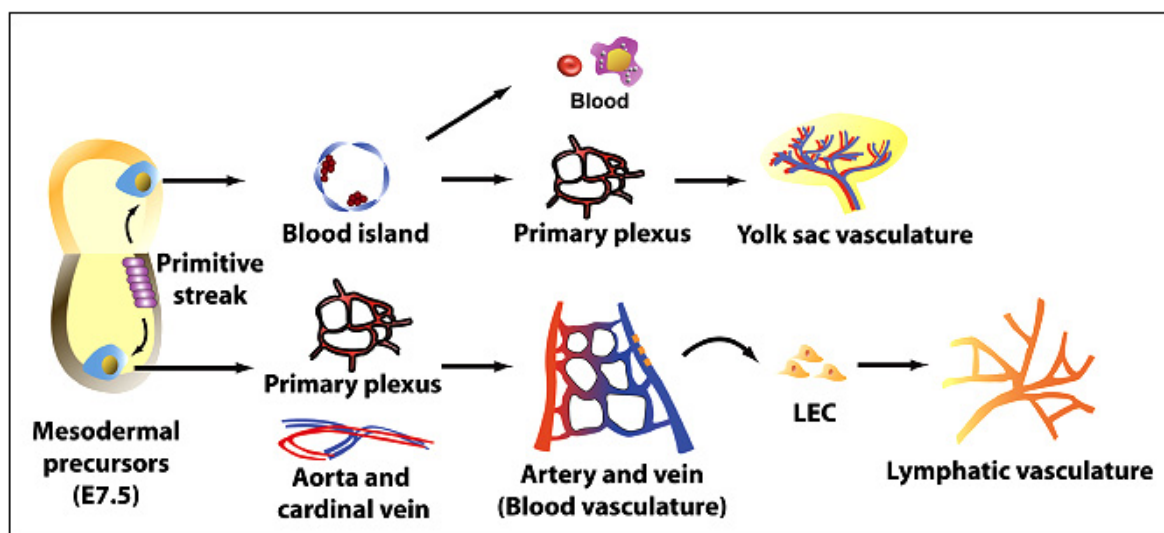
1.2.3 Σχηματισμός ενδοθηλιακών κυττάρων

1.2.3.1 Σχηματισμός ενδοθηλιακών κυττάρων/ Εγκαθίδρυση του αγγειακού συστήματος

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια ολόκληρου του αγγειακού συστήματος, σχηματίζοντας φράγμα μεταξύ του κυκλοφορούντος αίματος και των τοιχωμάτων των αγγείων. Είναι απαραίτητα για την πρόληψη της θρόμβωσης καθώς επίσης και για τον έλεγχο της αρτηριακής λειτουργίας ρυθμίζοντας και ελευθερώνοντας αγγειοενεργά μόρια. Το ενδοθήλιο θεωρείται ως ένα δυναμικό και ετερογενές όργανο καθώς κατέχει πολλαπλές εκκριτικές, συνθετικές, μεταβολικές και ανοσολογικές λειτουργίες.

Στα θηλαστικά, δύο διαδικασίες εμπλέκονται στην εγκαθίδρυση των αιμοφόρων αγγείων. Αρχικά, η *de novo* αγγειογένεση (vasculogenesis), με την οποία δημιουργείται το

πρωτογενές αγγειακό πλέγμα μέσω του σχηματισμού ενδοθηλιακών κύτταρων προερχόμενα από προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα που ονομάζονται αγγειοβλάστες. Και μετέπειτα, η αγγειογένεση (angiogenesis) κατά την οποία λαμβάνει χώρα η επέκταση των προϋπαρχόντων αγγείων, ο πολλαπλασιασμός και η διακλάδωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η de novo αγγειογένεση κατέχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των «νησίδιων αίματος», της ραχιαίας αορτής, του ενδοκαρδίου καθώς και των λεκιθικών αγγείων στο έμβρυο, ενώ η αγγειογένεση παρουσιάζει κυρίαρχη σημασία στην αγγείωση όλων των οργάνων. Ενώ αρχικά, η de novo αγγειογένεση θεωρείτο ότι πραγματοποιείται μόνο κατά την εμβρυική ανάπτυξη, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι συμβαίνει και κατά την αγγειακή αποκατάσταση μέσω διαφοροποίησης ενδοθηλιακών κυττάρων στην ενήλικη ζωή (61). Το αίμα και ο σχηματισμός αγγείων παρατηρούνται για πρώτη φορά κατά το στάδιο της γαστριδίωσης την εμβρυική ημέρα 7.5 στο λεκιθικό σάκο στα νησίδια αίματος και ονομάζεται πρώιμη αιμοποίηση. Τα αιμοφόρα αγγεία «στα νησίδια αίματος» καλύπτονται από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία αιματώνονται από τα πρωτογενή εμπύρνηνα ερυθροκύτταρα. Στη συνέχεια, τα νησίδια αίματος συγχωνεύονται για να δημιουργηθεί το πρωτογενές πλέγμα, ένα πρώιμο αγγειακό δίκτυο. Ακολούθως, πραγματοποιείται αγγειακή αναδιαμόρφωση η οποία οδηγεί στη δημιουργία του συμπλέγματος αγγείωσης στο λεκιθικό σάκο.



Εικόνα 11. Σταδιακή ανάπτυξη των αγγείων. Εξωεμβρυικά, στο λεκιθικό σάκο, μεσοδερμικά προγονικά κύτταρα συναθροίζονται για το σχηματισμό των νησιδίων αίματος, στα οποία αναπτύσσονται ενδοθηλιακά κύτταρα και πρώιμα αιμοποιητικά κύτταρα. Εντός των νησιδίων αίματος, τα κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο γίνονται πρωτογενή αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ τα εξωτερικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στη συνέχεια σχηματίζουν το πρωτογενές πλέγμα, το οποίο αναδιαμορφώνεται και δημιουργείται η αγγείωση του λεκιθικού σάκου. Αντίστοιχα, στο έμβρυο, μεσοδερμικοί προγονικοί πληθυσμοί σχηματίζουν το πρώιμο αγγειακό πλέγμα καθώς και την κύρια αορτή και φλέβα. Στη συνέχεια τα αρτηριακά και φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα εξειδικεύονται και σχηματίζουν το σύμπλεγμα των αιμοφόρων αγγείων. Την E9.5 ένας υποπληθυσμός των ενδοθηλιακών κυττάρων εξειδικεύεται προς λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα και εν συνεχεία αναπτύσσονται τα λεμφικά αγγεία (62).

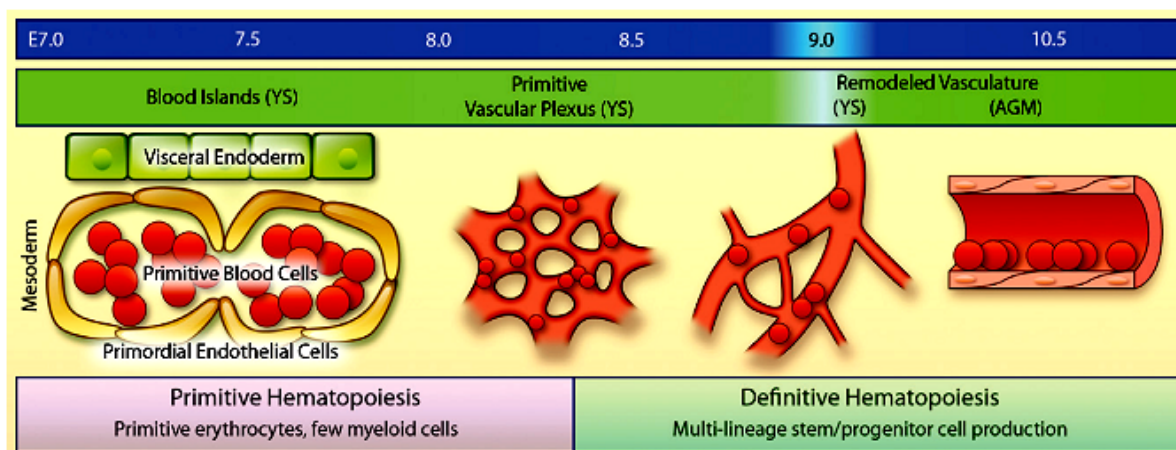
Η εμφάνιση των αγγειοβλαστών προηγείται του σχηματισμού των αγγείων στο έμβρυο, την εμβρυική ημέρα 7.5. Οι αγγειοβλάστες είναι προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την *de novo* αγγειογένεση κατά την εμβρυογένεση. Εγκαθιδρύουν την αγγείωση ενδοεμβρυϊκών περιοχών εκ των οποίων την πλευρική αορτή, τα λεκιθικά αγγεία και τα πρωτογενή πλέγματα του πνεύμονα, του σπλήνα και της καρδιάς (62).

Η πιο σύνθετη φάση κατά τη δημιουργία των αγγειακών δικτύων λαμβάνει χώρα κατά την αγγειογένεση, κατά την οποία τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων, αρχικά μεταξύ τους, μέσω ενδοθηλιακών πρωτεϊνών σύνδεσης καθώς και με αγγειακά μυϊκά κύτταρα, περικύτταρα και με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (63), (64), (65). Η εξειδίκευση των ενδοθηλιακών κυττάρων για την απόκτηση αρτηριακής ή φλεβικής πορείας θεωρείται ότι συμβαίνει πριν τη δημιουργία των αρτηριών και φλεβών μέσω έκφρασης του προσδέτη *Efnb2* και του υποδοχέα *Ephb4* αντίστοιχα (66).

1.2.3.2 Αιμαγγειοβλάστη/ Αιμοποιητικό Ενδοθήλιο.

Η αγγειογένεση και η αιμοποίηση (η δημιουργία αιμοποιητικών κυττάρων) είναι δύο στενά συνδεδεμένες διαδικασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα στις ίδιες περιοχές κατά την εμβρυική ανάπτυξη και χρησιμοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και σηματοδοτικά μόρια, συχνά επικαλυπτόμενα. Συνεπώς, είχε υποτεθεί ότι τα αιμοποιητικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο, γνωστό ως αιμαγγειοβλάστη. Αρχικές ενδείξεις για την ύπαρξη της αιμαγγειοβλάστης προήλθαν από *in vitro* μελέτες σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ανθρώπου και μύος, οι οποίες κατέδειξαν ότι ο πληθυσμός Brachyury+/Flk1+ που εμφανίζεται την τρίτη ημέρα της διαφοροποίησης, παρουσιάζει την ικανότητα διαφοροποίησης σε αιμοποιητικά αλλά και ενδοθηλιακά κύτταρα (67), (68), (69), (70). Ο πληθυσμός αυτός είναι παροδικός (ονομάζεται επίσης blast colony forming cells) και επάγεται από τον VEGF. Αντίστοιχες μελέτες σε έμβρυα μύων έδειξαν ότι παρόμοιος πληθυσμός ανιχνεύεται την εμβρυική ημέρα 7.5 (71). Πέρα, από τις παραπάνω μελέτες που υποστηρίζουν την ύπαρξη της αιμαγγειοβλάστης, υπάρχουν και αντικρουόμενες απόψεις. Πειραματικές μελέτες κατά την εμβρυική ανάπτυξη του μύος έδειξαν ότι παρατηρείται διαφορετική κινητική κατά τη δημιουργία των ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων. Αγγειοβλάστες ανιχνεύονται από την εμβρυική ημέρα 5.5 ενώ αιμοποιητικά από την 6.5. Παρόλα αυτά τα παραπάνω αποτελέσματα δεν αποκλείουν την ύπαρξη ενός κοινού προγονικού πληθυσμού (72). Πιθανή εξήγηση είναι ότι η δημιουργία των αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων είναι μια στοχαστική διαδικασία, δηλαδή μπορεί να προέρχονται από ένα κοινό προγονό αλλά η δημιουργία τους να ακολουθεί διαφορετικές πορείες.

Επιπρόσθετα, ανακαλύφθηκε ένας μεσοδερμικής προέλευσης ενδοθηλιακός πληθυσμός, ο οποίος έχει την ιδιότητα να δημιουργεί αιμοποιητικά κύτταρα. Ο πληθυσμός αυτός από τον οποίο προέρχεται η οριστική φάση της αιμοποίησης, βρίσκεται στην περιοχή AGM του εμβρύου, χαρακτηρίζεται από την παροδική έκφραση της VE-cadherin και ονομάστηκε αιμοποιητικό ενδοθήλιο (73), (74), (75), (76). Πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης κατέδειξαν ότι τα περισσότερα αιμοποιητικά κύτταρα ($\geq 95\%$) προέρχονται από VE-cadherin+ κύτταρα (77). Άλλος ένας χαρακτηριστικός δείκτης που εκφράζεται στο αιμοποιητικό ενδοθήλιο είναι το c-kit. Η έκφραση της VE-cadherin ενώ έχει δείχθει ότι είναι απαραίτητη για την αιμοποιητική δυνατότητα των κυττάρων, δεν φαίνεται να χρειάζεται για τη λειτουργία των αιμοποιητικών ενδοθηλιακών κυττάρων στο λεκιθικό σάκο των εμβρύων ποντικών (78).



Εικόνα 12. Παράλληλη ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων και του αίματος κατά την εμβρυογένεση στα σπονδυλωτά. Στο λεκιθικό σάκο (YS), την εμβρυική ημέρα E7, συσσωματώματα από μεσοδερμικά κύτταρα σχηματίζουν τα νησίδια αίματος, τα οποία αποτελούνται από πρόιμα αιμοποιητικά κύτταρα και αγγειοβλάστες. Αμέσως μετά, δημιουργείται το πρωτογενές αγγειακό πλέγμα από τη συνένωση των νησιδίων αίματος ενώ από αυτή τη χρονική στιγμή πραγματοποιείται η έναρξη της τελικής αιμοποίησης (E8.25). Ταυτόχρονα, ξεκινά η αναδιαμόρφωση του αγγειακού πλέγματος. Η τελική αιμοποίηση χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία πολλαπλών αιμοποιητικών κυτταρικών τύπων τα οποία προέρχονται από το αιμοποιητικά ενδοθηλιακά κύτταρα, αρχικά στο YS και στη συνέχεια στην περιοχή AGM (περίπου την E9.5). (Marcello et al., 2013)

1.2.3.3 Δείκτες των ενδοθηλιακών κυττάρων

Ο προσδιορισμός ειδικών δεικτών είναι κρίσιμος για τον καθορισμό της ενδοθηλιακής διαφοροποίησης και για το διαχωρισμό από άλλες κυτταρικές σειρές. Η στενή σχέση ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών κύτταρων, οδήγησε στην ανίχνευση της ύπαρξης ενός κοινού διδύναμου προγονικού πληθυσμού της αιμαγγειοβλάστης, από την οποία μπορούν να προκύψουν αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο βασικός δείκτης είναι ο VEGFR-2 (Flk1) και ποίο συγκεκριμένα ο πληθυσμός Brachyury+/Flk1+. Στο σύστημα των εμβρυοειδών σωματιδίων ο πληθυσμός αυτός ανιχνεύεται την d3.5 ημέρα διαφοροποίησης. Ενώ η έκφραση του Flk1 την d4.5 ημέρα της διαφοροποίησης, αντιστοιχεί στον πολυδύναμο προγονικό καρδιαγγειακό πληθυσμό. Η έκφραση του Flk1 προηγείται όλων των άλλων ενδοθηλιακών δεικτών. Στη συνέχεια, ακολουθεί η έκφραση των δεικτών PECAM-1, Tie2 και VE-cadherin τις d4 και d5 ημέρες διαφοροποίησης. Άλλα μόρια που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι η P-selectine, ο von Willebrand factor (vWF), η ACE (Angiotensin converting enzyme) και το CD34 καθώς και η

απορρόφηση της Dil-Ac-LDL. Τα μόρια ACE, PECAM-1, P-selectine και CD34 εκφράζονται επίσης στα μεγακαρυοκύτταρα καθώς και σε άλλους αιμοποιητικούς τύπους κυττάρων (79).

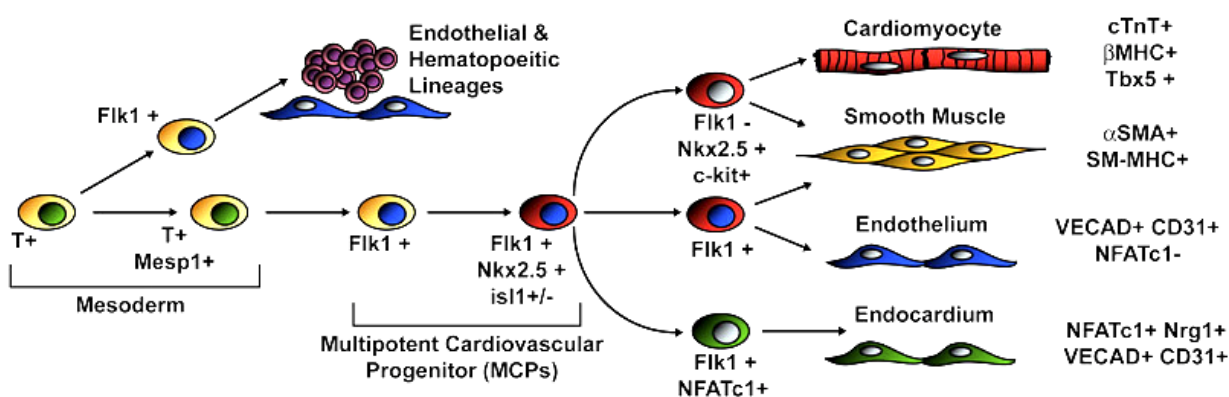
1.2.3.4 Εμβρυικό Ενδοκάρδιο- Ενδοκαρδιακή διαφοροποίηση και ανάπτυξη

Το ενδοκάρδιο αποτελεί την εσωτερική επιφάνεια της καρδιάς και συντίθενται από ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατά την ανάπτυξη, συνιστά ένα ξεχωριστό κυτταρικό πληθυσμό ο οποίος συμμετέχει στην καρδιακή μορφογένεση και αποτελεί έναν από τους πρώιμους κυτταρικούς τύπους που αναπτύσσονται κατά την εμβρυογένεση. Η έναρξη της ενδοκαρδιογένεσης λαμβάνει χώρα την εμβρυική ημέρα 7.5. Τα προγονικά κύτταρα του ενδοκαρδίου διαχωρίζονται από αυτά του μυοκαρδίου μέσω μειορρύθμισης της N-cadherin. Με αυτό τον τρόπο αναδύονται προς την κοιλιακή επιφάνεια του καρδιακού μεσοδέρματος στην περιοχή μεταξύ μυοκαρδίου και πρόσθιου σπλαχνικού ενδοδέρματος, η οποία είναι εμπλουτισμένη με φιμπρονεκτίνη (Linask, 1992). Τα ενδοκαρδιακά προγονικά κύτταρα εκφράζουν διάφορους αγγειακούς δείκτες όπως Flk1, Tal1 και PECAM-1. Καθώς τα ενδοκαρδιακά κύτταρα εδραιώνονται στα ενδοθηλιακά αγγεία και ενσωματώνονται στον πρωτογενή καρδιακό σωλήνα την εμβρυική ημέρα 8.5, η έκφραση του Tal1 χάνεται, ενώ αυξάνεται η έκφραση της VE-cadherin και του Tie2 (80).

Το ενδοκάρδιο είναι ξεχωριστός πληθυσμός από το ενδοθήλιο και κατέχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των βαλβίδων και κατά τη δοκίδωση (trabeculation). Ο μοναδικός ειδικός δείκτης του ενδοκαρδίου είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Nfatc1, ο οποίος εκφράζεται από τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης τους και δεν ανιχνεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Πειράματα ανίχνευσης γενεαλογικής προέλευσης των κυτταρικών πληθυσμών Nkx2.5+, Isl1+ και Mef2c+ με τα οποία σημαίνεται το μυοκάρδιο κατέδειξαν παράλληλα σήμανση και του ενδοκαρδίου (81), (41), (82), (39), (40). Αυτό υποδηλώνει ότι οι δύο πληθυσμοί εμφανίζουν κοινή προέλευση.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Nkx2.5 είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του Etv2, ο οποίος κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για την εξειδίκευση των ενδοκαρδιακών κυττάρων. Απουσία του Etv2, τα κύτταρα που θα το εξέφραζαν διαφοροποιούνται προς άλλους μυοκαρδιακούς τύπους κυττάρων εκ των οποίων και σε μυοκάρδιο (83). Μελέτες έχουν δείξει ότι η απομόνωση και η διαφοροποίηση του πρώιμου καρδιακού πληθυσμού Brachyury+/Flk1+ αλλά και του μετέπειτα Isl1+/ Nkx2.5+/ Flk1+

πολυδύναμο καρδιακού πληθυσμού κατά την *in vitro* διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων αλλά και από έμβρυα μυός οδηγεί στην δημιουργία ενδοθηλιακών, ενδοκαρδιακών κυττάρων, καρδιομυοκυττάρων καθώς και λείων μυϊκών κυττάρων. Περαιτέρω ανάλυση κατά την *in vitro* διαφοροποίηση με τη χρήση του ειδικού δείκτη *Nfatc1* έδειξε ότι τα κύτταρα του ενδοκαρδίου προέρχονται από τον *Flk1*⁺ πολυδύναμο καρδιαγγειακό πληθυσμό, όπως και τα κύτταρα του μυοκαρδίου. Παρόλα αυτά, δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως πως επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του ενδοκαρδίου και του μυοκαρδίου κατά την εμβρυογένεση λόγω έλλειψης χαρακτηριστικών δεικτών του πρώιμου ενδοκαρδίου (84), (49).



Εικόνα 13. Ανάπτυξη καρδιαγγειακών κυττάρων από ένα κοινό πρόγονο. Μοντέλο της εξειδίκευσης των καρδιαγγειακών σειρών από μεσοδερμικά προγονικά κύτταρα (Milstelf et al., 2009).

1.2.3.5 Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών κατά τη ρύθμιση ενδοθηλιακών παραγόντων και κατά την αγγειακή ανάπτυξη.

A. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF

Η ενεργοποίηση του VEGF αποτελεί το βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι για τη ρύθμιση πολλαπλών πτυχών της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων εκ των οποίων η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η αγγειακή διαπερατότητα (85),(86). Κατά τη πρόσδεση του VEGF στον υποδοχέα του, *Flk-1*, μεταφέρονται σήματα μέσω πολλαπλών καθοδικών μορίων όπως είναι *MAPK-ERK*, *p38-MAPK*, φωσφολιπάση C και η κινάση της φωσφατιδοινοσιτόλης-3 για να ρυθμιστεί η ενδοθηλιακή λειτουργία. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αγγείων κατά την εμβρυογένεση. Η απαλοιφή του VEGF σε έμβρυα μυός είναι θανατηφόρα εξαιτίας

ελαττωμάτων κατά την ενδοθηλιακή και αιμοποιητική ανάπτυξη (87), (88). Επίσης, ο VEGF κατέχει σημαντικό ρόλο κατά την ενδοθηλιακή εξειδίκευση σε αρτηρίες και φλέβες προάγοντας την αρτηριακή εξειδίκευση.

B. Σηματοδοτικό μονοπάτι Notch

Το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι κατέχει βασικό ρόλο στη αρτηριακή εξειδίκευση κατά την αγγειακή ανάπτυξη. Τέσσερες υποδοχείς του Notch (1-4) και πέντε προσδέτες (Jagged1,2 Dll1, 3 και 4) έχουν ανιχνευθεί στα θηλαστικά (89). Η πρόσδεση υποδοχέα και προσδέτη επάγει τη πρωτεολυτική διάσπαση του υποδοχέα του Notch, έχοντας σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενδοκυτταρικών μορφών και τη μεταφορά τους στον πυρήνα, επάγοντας καθοδικούς τους στόχους HEY1 και HEY2 (90), (91). Μελέτες έχουν δείξει ότι μύς στους οποίους λείπει το ένα αλληλίο του Dll4 παρουσιάζουν σοβαρά προβλήματα κατά την αναδιαμόρφωση των αγγείων στο λεκιθικό σάκο καθώς και μικρότερη σε μέγεθος πλευρική αορτή (92). Αντίστοιχα η υπερέκφραση του Dll4 προκαλεί μη φυσιολογική ανάπτυξη των αγγείων, και ενίσχυση της δημιουργίας αρτηριών σε σύγκριση με τη δημιουργία φλεβών (93).

Γ. Σηματοδότηση μέσω BMPs

Οι υπερικογένεια των BMPs ρυθμίζει πολλαπλές βιολογικές διεργασίες, εκ των οποίων και ο σχηματισμός των αγγείων κατά την ανάπτυξη. Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί περίπου 20 BMPs τα οποία λειτουργούν μέσω υποδοχέων κινάσης σερίνης/θρεονίνης στοιχειοθετώντας τις μορφές τύπου I και τύπου II. Κατά την πρόσδεση των BMPs, ο υποδοχέας τύπου II, ο οποίος είναι μια συνεχώς ενεργοποιημένη κινάση, ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I μέσω ειδικής φωσφορυλίωσης των καταλοίπων σερίνης/θρεονίνης (94). Ο ενεργός τύπου I, με τη σειρά του φωσφορυλιώνει τις SMADs (SMAD 1,5,8) μεταδίδοντας το σήμα των BMPs. Στη συνέχεια οι φωσφορυλιωμένες SMADs αλληλεπιδρούν με τη SMAD4 και μεταφέρονται στον πυρήνα για να επάγουν την έκφραση γονιδίων, όπως είναι το ID (95). Μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο BMP4 μέσω της σηματοδότησης των SMAD1/5 επάγει τη δημιουργία Flk1+ κυττάρων κατά τη διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων μύς κατά την καλλιέργεια τους απουσία ορού (96). Επίσης, επαγωγή των Flk1+ κυττάρων μέσω BMP4, διαμεσολαβείτε μέσω των μεταγραφικών παραγόντων ER71/ETV2.

Δ. Σηματοδοτικό μονοπάτι WNT

Το κανονικό μονοπάτι WNT έχει μελετηθεί εκτενώς και παίζει εξέχοντα ρόλο κατά την αγγειακή ανάπτυξη. Έχει διαπιστωθεί από μελέτες ότι η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT προκαλεί μείωση της δημιουργίας των Flk1+ κυττάρων (97). Έχει προταθεί ότι το WNT/ β -catenin μονοπάτι έχει ένα υποστηρικτικό ρόλο στην αγγειακή (vascular) ανάπτυξη παράλληλα με τη σηματοδότηση μέσω BMPs . Οι έως τώρα μελέτες συνηγορούν ότι το WNT έχει βασικό ρόλο στην αγγειακή ενδοθηλιακή εξειδίκευση μέσω ID1, GATA2 και ER71/ETV2 αλλά δεν έχει αποσαφηνιστεί πως το καθένα από αυτά ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου του Flk1. Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί ότι η β -catenin, συνδέεται άμεσα με τον υποδοχέα της Dll4, επάγοντας το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι (98). Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι το WNT/ β -catenin μονοπάτι κατέχει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη των αγγείων.

1.3 Ο ρόλος των συνδέσμων προσκόλλησης στη διαφοροποίηση

1.3.1 Σύνδεσμοι προσκόλλησης (Adherens junctions, AJs)

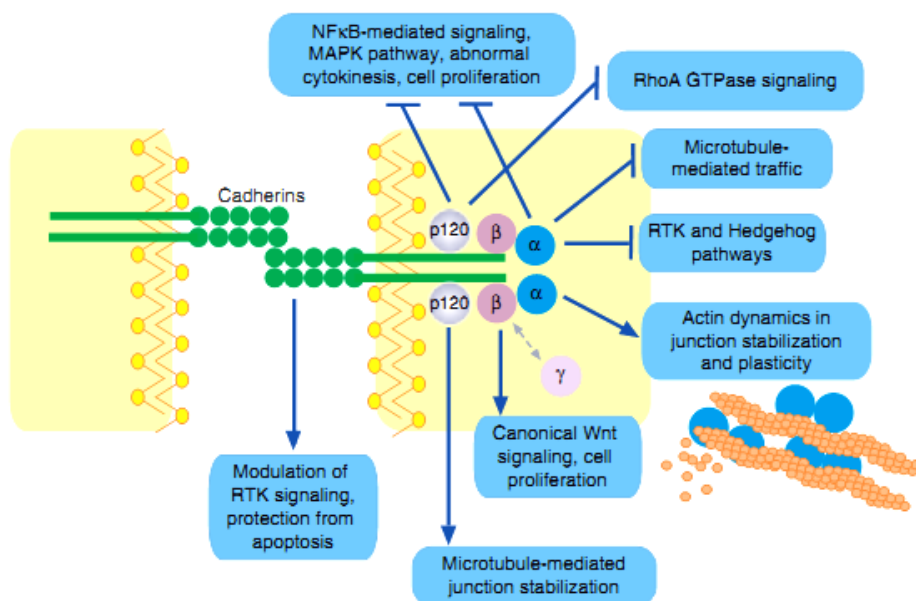
Η σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους επιτυγχάνεται με μόρια προσκόλλησης που λειτουργούν είτε αυτόνομα είτε με το σχηματισμό δομών προσκόλλησης που αποτελούνται από σύμπλοκα πρωτεϊνών. Η ρύθμιση της έκφρασης και η εξειδίκευση της ισχύος προσκόλλησης αποτελούν βασικές ιδιότητες των διακυτταρικών συνδέσεων, γεγονός που τις καθιστά δυναμικές δομές απαραίτητες για την ανάπτυξη όλων των πολυκύτταρων οργανισμών. Η προσκόλληση μεταξύ κυττάρων παρέχει ένα φυσικό σύστημα αγκυροβόλησης το οποίο είναι απαραίτητο για τη δημιουργία οργανωμένων ιστών. Η διακυτταρική επαφή είναι απαραίτητη για τη σωστή επικοινωνία η οποία εξασφαλίζει την ομοιοστάση καθώς και την επιβίωση των οργανισμών. Ένας μεγάλος αριθμός βασικών αναπτυξιακών διαδικασιών, όπως είναι η εμβρυική σύμπτυξη και η κυτταρική εξειδίκευση κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και σε μετέπειτα στάδια, ο σχηματισμός των ιστών και η οργανογένεση, βασίζεται στην δυναμική ισορροπία μεταξύ κυτταρικής προσκόλλησης και μετανάστευσης. Στις παραπάνω διαδικασίες, σημαντικό ρόλο κατέχουν οι σύνδεσμοι προσκόλλησης (AJs), ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο βασίζεται στην σύνδεση καδερίνης-κατενίνης. Οι σύνδεσμοι προσκόλλησης έχουν ενεργή συμμετοχή κατά την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή και αντίστροφα, διατηρώντας έτσι την πλαστικότητα των ιστών κατά την ανάπτυξη. Επίσης, μέλη του συμπλόκου καδερίνης-κατενίνης συνδέονται με

σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά προσδίδουν στους συνδέσμους προσκόλλησης εξέχοντα ρόλο κατά την ανάπτυξη των σπονδυλωτών (99).

1.3.2 Η οικογένεια των Καδερινών

Αποτελούν μια μεγάλη υπέρ-οικογένεια με περισσότερα από 100 μέλη, η οποία διαιρείται σε υπό-οικογένειες με βάση τη πρωτοταγή τους δομή και τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Οι καδερίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που το εξωκυττάριο τμήμα τους αποτελείται από ένα ή περισσότερα συντηρημένα μοτίβα περίπου 110 αμινοξέων, τα οποία ονομάζονται «επαναλήψεις καδερίνης» (cadherin repeats) και εμπλέκονται στην πρόσδεση ασβεστίου. Οι καδερίνες κλασσικού τύπου χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα να συνδέονται με μόρια κατενίνης και αποτελούνται από τις υπό-οικογένειες τύπου I (π.χ. E-, N-, P-, R) και τύπου II (π.χ. VE-). Οι καδερίνες διαμεσολαβούν στη σύνδεση των κυττάρων μέσω του εξωκυττάριου τμήματος τους και της σύνδεσης τους με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης δια μέσω της οικογένειας των κατενινών, α-, β-, γ- (πλακογλοβίνης) και p120-κατενίνης μέσω του κυτταροπλασματικού τους τμήματος (100), (101), (102). Η ικανότητα των μελών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των συνδέσμων προσκόλλησης να αναδιοργανώνουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης καθιστά τη συνδεσμολογία του συμπλόκου καδερίνης-κατενίνης μια δυναμική διαδικασία η οποία επιτρέπει την αναδιοργάνωση των κυττάρων κατά την εμβρυογένεση. (Stepniak et al., 2009).

Τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τυπικά E-cadherin ενώ τα μεσεγχυματικά κύτταρα εκφράζουν διάφορους τύπους cadherins όπως είναι η N-cadherin, R-cadherin και η cadherin-11. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν VE-cadherin, η οποία είναι ιστοειδική για το ενδοθήλιο και αποτελεί το βασικό μόριο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης καθώς και N-cadherin, η οποία δεν συμμετέχει στις ενδοθηλιακές συνδέσεις αλλά στις διακυτταρικές συνδέσεις μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων με άλλους κυτταρικούς τύπους (περικύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα). Οι καδερίνες πέρα από τη μηχανική τους λειτουργία, επηρεάζουν σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη κινητικότητα των κυττάρων, στην επιβίωση και στην ομοιοστάση των ιστών. Είναι σημαντικές στην εγκαθίδρυση της πολικότητας των κυττάρων καθώς και στην κυτταρική επιλογή/ εξειδίκευση κατά την εμβρυική ανάπτυξη (103), (104).



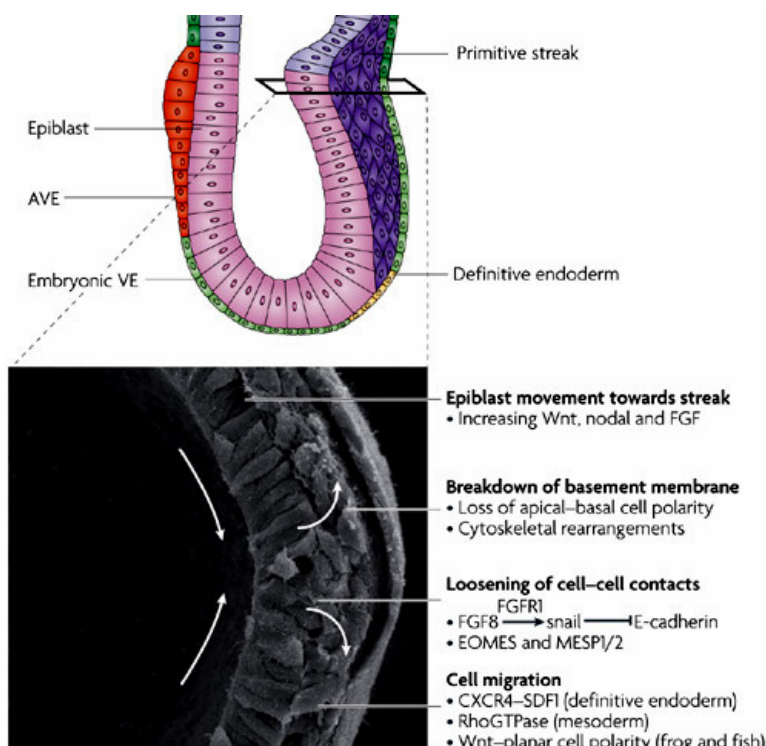
Εικόνα 14. Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο καδερίνης-κατενίνης και η σχέση του με τα αναπτυξιακά σηματοδοτικά μονοπάτια. Το διάγραμμα απεικονίζει τις βασικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται κατά το σχηματισμό των συμπλόκων καδερίνης, α -, β -, γ - και p120- κατενίνης στην κυτταρική μεμβράνη μεταξύ δύο κυττάρων. Αν και οι καδερίνες εμπλέκονται στη ρύθμιση των RTKs (Receptor Tyrosin Kinases) και στην προστασία των κυττάρων από την απόπτωση, οι κατενίνες έχουν πολλαπλές επικαλυπτόμενες αλλά και διαφορετικές λειτουργίες. Η p120- και η α -κατενίνη ρυθμίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF κ b και του MAPK, την κυττοκίνηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η λειτουργία της p120 σχετίζεται με τον έλεγχο της σηματοδότησης μέσω RhoA, ενώ η β -κατενίνη με το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. (Stepniak et al., 2009).

1.3.3 Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης.

Κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη, σημαντικές ποσότητες E-cadherin και α E-catenin παρέχονται από τη μητέρα (ωάριο) διαμεσολαβώντας στη σύνδεση των βλαστομεριδίων κατά τη εμβρυική σύμπτυξη (105), (106). Συγκεκριμένα έχει καταδειχτεί ο βασικός ρόλος των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης στην προώθηση της διαίρεσης στο στάδιο των 8-κυττάρων καθώς επίσης και στην δημιουργία των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (107). Αργότερα κατά την εμβρυογένεση, η E-cadherin εκφράζεται από το έμβρυο και είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη. Έμβρυα στα οποία έχει απαλειφθεί η E-cadherin αποτυγχάνουν να σχηματίσουν τροφοεξωδερμικό επιθήλιο καθώς και την κοιλότητα της βλαστοκύστης (108), (109).

1.3.4 Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά τη γαστρίδωση.

Κατά τη γαστρίδωση, η μορφολογία του εμβρύου αναδιαμορφώνεται δραματικά για να σχηματιστούν οι τρεις βλαστικές στιβάδες (ενδόδερμα, μεσοδερμα, εξώδερμα). Κατά την έναρξη της γαστρίδωσης, τα κύτταρα της επιβλάστης μεταναστεύουν μέσω της πρωτογενούς λωρίδας για να σχηματιστούν οι τρεις βλαστικές στιβάδες. Οι μορφογενετικές αυτές κινήσεις πραγματοποιούνται μέσω της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) κατά την οποία οι σύνδεσμοι προσκόλλησης κατέχουν εξέχοντα ρόλο. Κατά τη γαστρίδωση στον μυ, η E-cadherin μειορρυθμίζεται στην πρωτογενή λωρίδα καθώς τα κύτταρα υπόκεινται σε EMT, διαδικασία απαραίτητη για το σχηματισμό του μεσοδέρματος. Η μειορρύθμιση της E-cadherin ελέγχεται σε μεταγραφικό επίπεδο από το Snail (110), και σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο μέσω της p38-MAP κινάσης και της πρωτεΐνης FERM (EPB41L5) η οποία αποδιοργανώνει το σύμπλοκο καδερίνης-κατενίνης (111), (112), (113). Τα κύτταρα του μεσοδέρματος που σχηματίζονται ξεκινούν να εκφράζουν N-cadherin. Η έκφραση της διατηρείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του αυξητικού παράγοντα PDGF και είναι απαραίτητη για τη σωστή μετανάστευση των κυττάρων του μεσοδέρματος.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικόνα 15. Επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή στην πρωτογενή λωρίδα κατά τη γαστρίδωση. Η δημιουργία του μεσοδέρματος είναι αποτέλεσμα της EMT και της κυτταρικής μετανάστευσης. Τα κύτταρα στην πρωτογενή λωρίδα αποκολλώνται από τη βασική μεμβράνη, υπόκεινται σε γρήγορη και δυναμική αναδιάρθρωση του κυτταροσκελετού, η οποία τους επιτρέπει την μετανάστευση τους. Ένας σηματοδοτικός καταρράκτης, ο οποίος εμπεριέχει τον FGF8 και το snail, έχει σαν αποτέλεσμα την μειορρύθμιση της E-cadherin από τους συνδέσμους προσκόλλησης, επιτρέποντας έτσι τη μετανάστευση των μεσοδερμικών κυττάρων από την πρωτογενή λωρίδα. Επιπρόσθετα, οι μεταγραφικοί παράγοντες Eomes, Mesp1 και Mesp2 είναι απαραίτητοι για τη μειορρύθμιση της E-cadherin και για την EMT (3).

1.3.5 Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά τον πρώιμο σχηματισμό της καρδιάς και κατά την ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος

Η N- cadherin έχει λειτουργικό ρόλο κατά την μορφογένεση της καρδιάς σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Έμβρυα μυών στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο της N- cadherin πεθαίνουν την E10 της κύησης λόγω σοβαρών αναπτυξιακών ανωμαλιών μεταξύ των οποίων και σοβαρά καρδιαγγειακά προβλήματα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε δραματική καταστροφή των συνδέσμων προσκόλλησης στο μυοκάρδιο το οποίο είχε σαν αποτέλεσμα την αποδιάταξη του πρωτογενούς καρδιακού σωλήνα (114).

Περαιτέρω μελέτες, έδειξαν ότι η ιστοειδική απαλοιφή της N- cadherin σε ενήλικες καρδιές μυών οδήγησε στο θάνατο των περισσότερων ζώων μέσα σε διάστημα δύο μηνών, λόγω της αποσυναρμολόγηση των δομών των εμβόλιμων δίσκων (ή κλιμακωτής ταινίας) καθώς και της απώλειας ηλεκτρικής αγωγιμότητας (115). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι μερική επαναφορά του καρδιακού φαινοτύπου μπορεί να επιτευχθεί από την έκφραση της N- cadherin, αλλά επίσης και από την έκτοπη έκφραση της E- cadherin υπό τον έλεγχο του υποκινητή της MHC μέχρι το στάδιο της καρδιακής αναδίπλωσης (cardiac looping). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η λειτουργική ικανότητα της E-cadherin μπορεί να αντικαταστήσει με “πλεονασματικό” (redundant) τρόπο την αντίστοιχη της N-cadherin, μέχρι ενός σημείου (116, 117). Επίσης, οι σύνδεσμοι προσκόλλησης της N- cadherin είναι σημαντικοί για τη διατήρηση των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων στους ιστούς οι οποίοι υποβάλλονται σε κυτταρική αναδιάταξη και αυξημένο μηχανικό στρες (όπως συμβαίνει στην πρωτογενή καρδιά) (Kostetskii et al., 2005). Επιπρόσθετα η N- cadherin εμπλέκεται στη μετανάστευση των καρδιομυοκυττάρων προς το ενδοκάρδιο κατά τη διαδικασία της δοκίδωσης κατά την οποία πραγματοποιείται η επέκταση των καρδιακών θαλάμων (118). Η N- cadherin εμπλέκεται επιπλέον σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων κατά το σχηματισμό της καρδιάς. Τυχόν απώλειά της από το επικάρδιο έχει σαν αποτέλεσμα τη διάρρηξη των συνδέσεων μεταξύ επικαρδίου και μυοκαρδίου δημιουργώντας ένα λεπτότερο κοιλιακό μυοκάρδιο (119).

Η υπό συνθήκη αδρανοποίηση της N- cadherin στα ενδοθηλιακά κύτταρα, υπό τον υποκινητή tie-2 κατέδειξε ότι έχει λειτουργικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος (120). Ο φαινότυπος των συγκεκριμένων εμβρύων παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τα έμβρυα στα οποία έχει απαλειφθεί η VE- cadherin (KO). Η στοχευμένη

απαλοιφή της N- είτε της VE- cadherin ειδικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα το μη φυσιολογικό σχηματισμό του αγγειακού πλέγματος και την αναστολή της de novo αγγειογένεσης. Παράλληλα γενική απαλοιφή είτε της N- ή της VE- cadherin οδηγεί σε καρδιαγγειακές ανωμαλίες κατά την εμβρυογένεση. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται ελαττωματικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης στο μυοκάρδιο, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι η σηματοδότηση του μυοκαρδίου και του ενδοκαρδίου είναι εξαρτώμενη από τους διακυτταρικούς συνδέσμους προσκόλλησης (87), (120). Η VE- cadherin κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος, όχι μόνο μέσω μηχανικών αλλά και μέσω σηματοδοτικών λειτουργιών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα οποία έχει απαιρεθεί η VE- cadherin αποτυγχάνουν να υποστηρίξουν την αναδιαμόρφωση και την ωρίμανση των αγγείων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Στα κύτταρα αυτά, παρουσιάζεται καθοριστική μείωση του σήματος VEGFR-2-PI3K με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε απόπτωση (87). Είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ η VE- cadherin είναι απαραίτητη για τη θετική ρύθμιση του VEGFR-2-PI3K σήματος και της κυτταρικής επιβίωσης, έχει αντίθετη επιρροή στο VEGFR-2-MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι η VE- cadherin κατέχει βασικό ρόλο στη μετάδοση σήματος μέσω του υποδοχέα VEGFR-2 και τη διέγερση του σηματοδοτικού μονοπατιού VEGFR-2-MAPK μέσω του ενδοσωμικού διαμερίσματος (121). Επιπλέον, η VE-cadherin συνδέεται με τους υποδοχείς VEGFR2 και VEGFR3, μέσω του κυτταροπλασματικού της τμήματος, δημιουργώντας ένα σηματοδοτικό, μηχανο-αισθητήριο σύμπλοκο, το οποίο ενεργοποιείται μέσω της αγγειακής ροής (122).

Είναι ενδιαφέρον ότι η απαλοιφή της N- cadherin στο εμβρυικό ενδοθήλιο διαταράσσει την έκφραση της VE- cadherin, ενώ το αντίθετο δεν φαίνεται να ισχύει (87), (120). Αυτό είναι το μοναδικό γνωστό παράδειγμα στο οποίο μια καδερίνη ελέγχει την έκφραση μιας άλλης το οποίο μπορεί να αντικατοπτρίζει τη σύνθετη και δυναμική κυτταρική αναδιάταξη που συμβαίνει στην λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού.

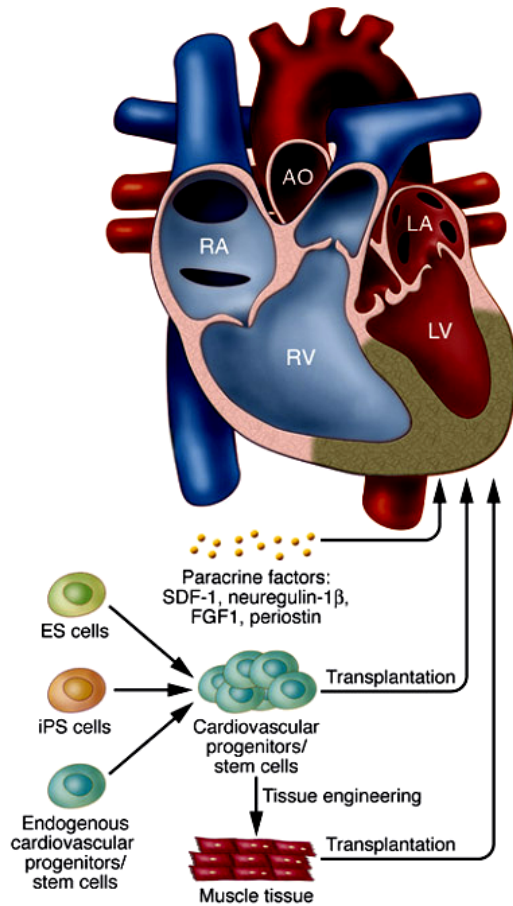
ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Λειτουργίες των cadherins στο καρδιαγγειακό σύστημα (123).

Καδερίνες	Έκφραση στο καρδιαγγειακό σύστημα	Λειτουργίες-Ρόλος
VE- cadherin	Ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοποιητικό ενδοθήλιο (hemogenic endothelium)	Δημιουργεί συνδέσεις διακυτταρικής προσκόλλησης μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων, ελέγχει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα, τη διαπίδυση των λευκοκυττάρων, την de novo αγγειογένεση και την αγγειογένεση
N- cadherin	Καρδιομυοκύτταρα, Λεία μυϊκά κύτταρα, Ενδοθηλιακά κύτταρα	Διακυτταρικές συνδέσεις μυοκαρδίου, ρύθμιση της μυοκαρδιακής ανάπτυξης , διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων, δημιουργία των εμβόλιμων δίσκων Σύνδεση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, ρύθμιση της κυτταρικής εξάπλωσης, κινητικότητας, ανάπτυξης και επιβίωσης Δημιουργία συνδέσμων προσκόλλησης μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων με αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα ή περικύτταρα, προάγει την αγγειογένεση και την ωρίμανση των αγγείων
H- cadherin ή cadherin 13	Λεία μυϊκά κύτταρα- Ενδοθηλιακά κύτταρα	Ρυθμίζει τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αγγειογένεση, λειτουργεί ως υποδοχέας για τους ετεροφυλικούς προσδέτες (λιποπρωτεΐνες, αδιπνεκτίνη)
R- cadherin	Λεία μυϊκά κύτταρα	Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό

1.4 Μέθοδοι Αναγεννητικής ιατρικής στην καρδιά

Η καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί ένα από τα βασικότερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας καθώς υπολογίζεται ότι σε μερικά χρόνια, ενώ ο πληθυσμός μεγαλώνει, θα φτάσει τα όρια της επιδημίας. Τα περισσότερα προβλήματα καρδιακής ανεπάρκειας προκαλούνται λόγω βλάβης στα καρδιομυοκύτταρα. Η ανθρώπινη αριστερή κοιλία αποτελείται από 2-4 δισεκατομμύρια καρδιομυοκύτταρα, και κατά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου εξαλείφεται το 25% περίπου μέσα σε λίγες ώρες. Η μαζική απώλεια των καρδιομυοκυττάρων αντικαθίσταται από ινώδη ιστό και δημιουργία ουλής. Παράλληλα, τα καρδιομυοκύτταρα αποθνήσκουν αργά στο πέρασμα του χρόνου κατά τις καρδιομυοπάθειες και καρδιαγγειακές παθήσεις, ενώ κατά τη γήρανση υγιούς καρδιάς παρατηρείται ετήσια μείωση του μυοκαρδίου κατά 1g περίπου, το οποίο περιέχει ~1 εκατομμύριο καρδιομυοκύτταρα. Για χρόνια, επικρατούσε η άποψη ότι η καρδιά είναι μετά-μιτωτικό όργανο καθώς δεν παρουσιάζει σημαντική μυοκαρδιακή αναγεννητική ικανότητα σε σχέση με άλλους ιστούς και σπάνια παρουσιάζονται πρωτογενείς όγκοι μυοκαρδιακής προέλευσης. Παρόλα ταύτα, οι παραπάνω αντιλήψεις αναθεωρήθηκαν μετά από μελέτες όπου μετρήθηκε με καινοτόμες μεθόδους κυτταρικής χρώσης η ικανότητα και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρδιομυοκυττάρων (124), (125). Συμπερασματικά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ενήλικη καρδιά εμφανίζει πλαστικότητα και ότι τα καρδιομυοκύτταρα διαιρούνται ή δημιουργούνται από προγονικά κύτταρα αλλά με πολύ αργούς ρυθμούς.

Οι βασικές στρατηγικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση του μυοκαρδίου είναι οι εξής: Α) η επαγωγή των καρδιομυοκυττάρων ώστε να επανενταχθούν στο κυτταρικό κύκλο Β) η κυτταρική θεραπεία είτε με απομονωμένα ενδογενή καρδιακά προγονικά κύτταρα και έκπτυξη τους *ex vivo*, είτε με διαφοροποιημένα καρδιακά κύτταρα που προέρχονται από ESCs ή iPSCs, είτε με μεταμόσχευση κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών Γ) η επαγωγή της αναγεννητικής ικανότητας των ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων Δ) ο άμεσος επαναπρογραμματισμός ενηλίκων κυττάρων σε καρδιομυοκύτταρα.



Εικόνα 16. Πιθανοί τρόποι αναγεννητικής ιατρικής στην καρδιά. Καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από ανθρώπινα ESCs ή από iPSCs ασθενών θα μπορούν ιδανικά να χρησιμοποιηθούν για την εφαρμογή τους στην αναγεννητική ιατρική. Μπορούν να μεταμοσχευθούν απευθείας στην καρδιά ή να ενσωματωθούν σε κάποιο ικρίωμα, κατασκευάζοντας έτσι καρδιομυϊκό ιστό. Εναλλακτικά, παράγοντες όπως NRG1 μπορούν να διεγείρουν ενδογενώς την αναγεννητική ικανότητα (2).

1.4.1 Α) Επαγωγή των καρδιομυοκυττάρων να επανενταχθούν στο κυτταρικό κύκλο

Έχει αναφερθεί ότι τα σηματοδοτικά μόρια periostin, FGF-1 και NRG1 έχουν μιτογόνα δράση στα ενήλικα κοιλιακά καρδιακά μυϊκά κύτταρα και ασκούν ευεργετικά αποτελέσματα στη δομή της καρδιάς καθώς και στη λειτουργία της έπειτα από έμφραγμα του μυοκαρδίου (126), (127), (128). Απλή έγχυση του αυξητικού παράγοντα NRG1 στη συστηματική κυκλοφορία ενήλικων μυών ενίσχυσε την συρρίκνωση της σχηματιζόμενης ουλής στην εμφραγματική περιοχή και παράλληλα βελτίωσε τη μηχανική λειτουργία της καρδιάς.

1.4.2 Β) Βλαστικά κύτταρα και κυτταρική θεραπεία

1.4.2.1 Καρδιακά Βλαστικά κύτταρα ενηλίκου

Ο καθορισμός ειδικών δεικτών που θα επιτρέπουν την απομόνωση καρδιακών βλαστικών και προγονικών κυτταρικών πληθυσμών από εμβρυϊκούς και ενήλικες ιστούς αποτελεί κύριο στόχο στο πεδίο της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων. Η εκτενής μελέτη της ανάπτυξης της καρδιάς κατά την εμβρυογένεση απέφερε πλήθος πληροφοριών σχετικά με τις ιδιότητες και την προέλευση των προγονικών καρδιομυοκυττάρων. Παράλληλα μελέτες στην ενήλικη καρδιά, οδήγησαν στον καθορισμό ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων (CPCs), τα οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση δεικτών κυτταρικής επιφανείας, όπως τον υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης c-kit και τον Sca-1. Επίσης, απομονώθηκαν βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τον παράπλευρο πληθυσμό (SP) και από καρδιοσφαίρες (CDCs). Αρχικά είχε προταθεί ότι υπάρχουν διαφορετικοί καρδιακοί προγονικοί πληθυσμοί, λόγω τις πληθώρας των δεικτών που τους χαρακτηρίζουν και της ελάχιστης επικάλυψης που παρουσιάζουν μεταξύ τους. Προσφάτως όμως, έχει καταδειχθεί ότι οι περισσότεροι προγονικοί τύποι στην πραγματικότητα αποτελούν ένα τύπο CPCs σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης και/ ή ωρίμανσης, τα οποία αποτελούν λιγότερο από το 1% των κυττάρων της ενήλικη καρδιά μυός (129).

A) c-kit⁺ καρδιακά βλαστικά/προγονικά κύτταρα

Ο c-kit⁺ πληθυσμός αποτελεί τον πλέον εκτενώς μελετημένο πληθυσμό των CPCs. Στον ενήλικα το c-kit εκφράζεται στα ενδιάμεσα κύτταρα του Cajal, στο θυμικό επιθήλιο και στα ώριμα κυκλοφορούντα κύτταρα όπως είναι τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και στα μαστοκύτταρα. Επίσης έχει βρεθεί ότι κατά την εμβρυογένεση, πρώιμα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν c-kit. Αντίστοιχα, στην ενήλικη ανθρώπινη καρδιά έχουν ανιχνευθεί μικρά στρογγυλά κύτταρα που εκφράζουν c-kit στο περιαγγειακό τμήμα της και ο πληθυσμός αυτός αυξάνεται κατά την καρδιακή ανεπάρκεια. Τα c-kit⁺ CPCs, έπειτα από την απομόνωση τους από ενήλικες καρδιές επιμυών και ανθρώπων, έχουν την ικανότητα να δημιουργούν καρδιομυοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* και *in vivo* (130), (131), (132). Βασικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων είναι ότι αυτοανανεώνονται, είναι κλωνογενή και πλειοδύναμα (multipotent). Κατά τη μεταμόσχευση τους σε καρδιές τρωκτικών έπειτα από έμφραγμα του μυοκαρδίου έχει αναφερθεί ότι συμμετέχουν σε σημαντικό βαθμό στη δημιουργία νέων καρδιομυοκυττάρων και αιμοφόρων αγγείων (132). Ταυτόχρονα όμως άλλες μελέτες

δείχνουν μετριότερα αποτελέσματα (133) ενώ άλλες αδυνατούν να ανιχνεύσουν μυογένεση προερχόμενη από τα μεταμοσχευμένα c-kit⁺ κύτταρα (134), (135). Τα παραπάνω αντικρουόμενα αποτελέσματα υπογραμμίζουν ότι είναι απαραίτητος ο περαιτέρω χαρακτηρισμός της λειτουργίας των c-kit⁺ CPCs τόσο στη φυσιολογική όσο και στην εμφραγματική καρδιά.

B) Sca-1⁺ καρδιακά προγονικά κύτταρα

Το 2003, προτάθηκε η ύπαρξη ενός διαφορετικού προγονικού πληθυσμού, ο οποίος βασίζεται στην έκφραση του Sca-1 (136). Αυτά τα κύτταρα επάγονται σε μύες 6 και 12 εβδομάδων με 5'-azacytidine και μπορούν να διαφοροποιηθούν στη συνέχεια προς καρδιομυοκύτταρα. Τα Sca-1⁺ κύτταρα έχουν απομονωθεί και από ανθρώπινες καρδιές ενηλίκων και εμφανίζουν ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης προς καρδιομυοκύτταρα καθώς και προς ενδοθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν αγγειακές δομές. Μεταμόσχευση τους σε εμφραγματικούς μύες έδειξε ότι διαφοροποιούνται προς κύτταρα με φαινότυπο παρόμοιο των καρδιομυοκυττάρων (137).

Γ) Καρδιακός Πλευρικός Κυτταρικός Πληθυσμός (SP)

Τα SP κύτταρα απομονώθηκαν μέσω της φυσικής τους ιδιότητας να απεκκρίνουν τη χρωστική ουσία Hoechst (138). Η ύπαρξη τους έχει επιβεβαιωθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες και περιέχουν προγονικά κύτταρα τα οποία μπορούν να ανανεώσουν τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα κατά την ανάπτυξη αλλά και κατά την καρδιακή ανεπάρκεια. Το 80-90% των SP κυττάρων εκφράζει Sca-1, ενώ αποτελούν μόνο το 1% των Sca-1⁺ κυττάρων της ενήλικης καρδιάς. Σύμφωνα με αυτό, έχει προταθεί ότι ο SP πληθυσμός αποτελεί τον υποπληθυσμό των Sca-1⁺ κυττάρων που έχει αναγεννητική ικανότητα (139).

Δ) Κύτταρα που προέρχονται από Καρδιοσφαίρες (Cardiospheres Derived Cells - CDCs)

Η πρώτη απομόνωση των CDCs πραγματοποιήθηκε το 2004, με βάση την ικανότητα τους να μεταναστεύουν έξω από τον καρδιακό ιστό κατά την καλλιέργεια του και να σχηματίζουν σφαιροειδείς δομές σε συνθήκες εναιωρήματος. Τα συσσωματώματα αυτά αποτελούνται από μείγμα προγονικών και διαφοροποιημένων κυττάρων, που ομοιάζουν στα καρδιομυοκύτταρα και/ ή στα αγγειακά κύτταρα (140). Τα CDCs αποτελούνται από ολιγοδύναμους, κλωνογενείς πληθυσμούς και έχουν απομονωθεί από ενήλικες καρδιές

ανθρώπων και μυών. Εκφράζουν τους βλαστικούς δείκτες c-kit και Sca-1 και μπορούν να εκπτυχθούν *in vitro* καθώς διατηρούν ιδιότητες αυτοανανέωσης (141)

1.4.2.2 Κύτταρα του μυελού των οστών

Αρχικά υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για την αποκατάσταση της καρδιακής ανεπάρκειας μέσω των κυττάρων που προέρχονται από τον μυελό των οστών (142). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι έπειτα από την μεταμόσχευση τους, τα αιμοποιητικά κύτταρα δεν διαφοροποιούνται προς καρδιομυοκύτταρα αλλά προς ώριμα αιμοποιητικά κύτταρα (143), (144). Παρόλα αυτά, μελέτες με πειραματικά μοντέλα ζώων κατέδειξαν βελτίωση της κοιλιακής λειτουργίας της καρδιάς έπειτα από την εμφύτευση τους στην εμφραγματική περιοχή. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο βασικός μηχανισμός δράσης των κυττάρων αυτών είναι μέσω παρακρινικής σηματοδότησης.

Πειράματα με μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού (MSCs) είχαν παρόμοια αποτελέσματα (145). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι έπειτα από την εμφύτευση τους στην εμφραγματική περιοχή τα περισσότερα MSCs πεθαίνουν σε διάστημα λίγων ημερών ή εβδομάδων, άλλα τα ευεργετικά τους αποτελέσματα μπορούν να ανιχνευθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Πιθανολογείται ότι τα MSCs ρυθμίζουν αρκετούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. Παράλληλα μεταμόσχευση τους σε εμφραγματική καρδιά χοίρου οδηγεί αρχικά σε διέγερση των ενδογενών CPCs τα οποία στη συνέχεια συμμετέχουν στην επούλωση της εμφραγματικής περιοχής (146) .

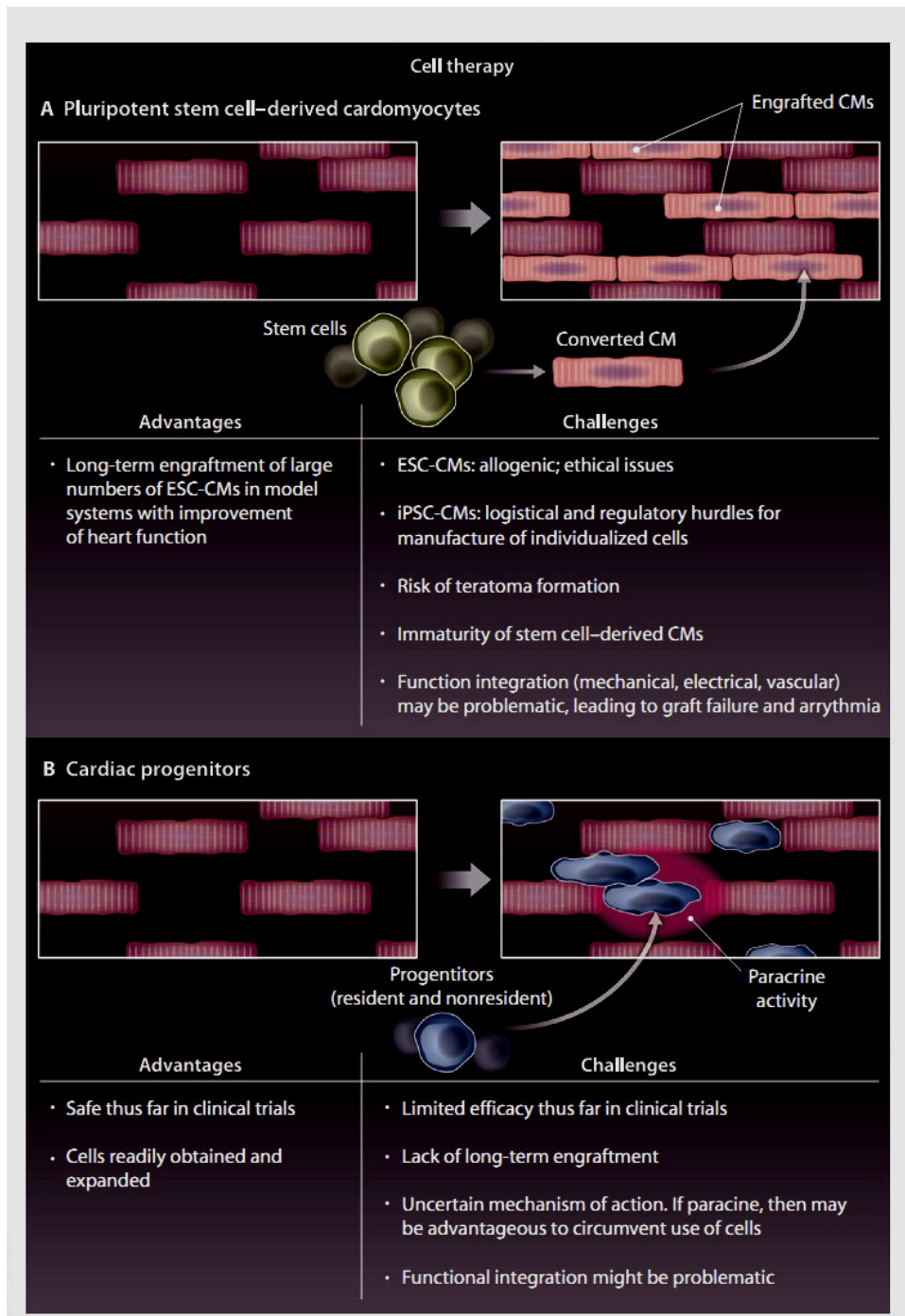
Ως τώρα, οι κλινικές δοκιμές έχουν επικεντρωθεί στη μεταφορά μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών μέσω της στεφανιαίας αρτηρίας. Η παραπάνω μεθοδολογία παρόλο που είναι τεχνικώς εφικτή και ασφαλής δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, τα κύτταρα του μυελού των οστών δεν διαφοροποιούνται προς καρδιομυοκύτταρα αλλά ο τρόπος δράσης τους είναι έμμεσος. Αρκετοί ερευνητές, θεωρούν ότι τα κύτταρα του μυελού συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση, η οποία λαμβάνει χώρα έπειτα από το έμφραγμα και ρυθμίζει την αγγειογένεση, την επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων και την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας (129).

1.4.2.3 Πολυδύναμα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs)

Τα ενδογενή βλαστικά κύτταρα δεν μπορούν να σχηματίσουν μεγάλους αριθμούς καρδιομυοκυττάρων απαραίτητων για τη θεραπεία της καρδιάς. Αντίθετα, στοχευμένη διαφοροποίηση ESCs και iPSCs προς καρδιακούς κυτταρικούς τύπους μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μεγάλων αριθμών κυττάρων. Βασικό σημείο έρευνας αποτελεί η βελτίωση των συνθηκών διαφοροποίησης με στόχο το σχηματισμό ώριμων και λειτουργικών καρδιομυοκυττάρων (147), (148).

Πειραματικά μοντέλα μεταμόσχευσης ανθρώπινων αδιαφοροποίητων ESCs σε μοντέλα τρωκτικών με καρδιακή ανεπάρκεια (149) κατέδειξαν τους βασικούς περιορισμούς της τεχνικής αυτής οι οποίοι είναι: μη αποδοτική διαφοροποίηση προς καρδιομυοκύτταρα, η ελάχιστη επιβίωση τους, η τάση να φτιάχνουν τερατώματα και η πιθανότητα ανοσολογικής απόρριψης (150). Αντίθετα, εμφύτευση διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων, προερχόμενων από ESCs μυών σε καρδιές μυών, βελτίωσε την λειτουργία εμφραγματικής καρδιάς (151). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται έπειτα από εμφύτευση ανθρώπινων διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων σε καρδιές επιμυών (147), ενώ έχει διαπιστωθεί ενσωμάτωση τους σε εμφραγματικό μυοκάρδιο ινδικών χοιριδίων (152). Τα διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν Nkx2.5, καθώς και χαρακτηριστικές δομικές πρωτεΐνες των σαρκομερών, αλλά παρόλα αυτά παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε σχέση με τα ενήλικα καρδιομυοκύτταρα. Εμφύτευση των διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων παράλληλα με μίγμα παρακρινικών παραγόντων, καθώς και η ενσωμάτωση τους σε μικροπεριβάλλον ικτριωμάτων παρουσία ενδοθηλιακών κυττάρων, μπορεί να αυξήσει την επιβίωση, την αγγείωση και την ωρίμανση των καρδιομυοκυττάρων (153), (154), (155). Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί η απομόνωση ενός καρδιογενούς προγονικού πληθυσμού ο οποίος έχει τη δυνατότητα να αυτοανανεώνεται και να διαφοροποιείται έπειτα από μεταμόσχευση (43), (156).



Εικόνα 17. Καρδιακή αναγέννηση μέσω κυτταρικής θεραπείας. Α) Καρδιομυοκύτταρα που προέρχονται από ESCs ή από iPSCs δημιουργούνται *in vitro* και διανέμονται στο μυοκάρδιο. **Β)** Ενδογενή και μη καρδιακά προγονικά κύτταρα απομονώνονται, εκπύσσονται *in vitro* και διανέμονται στο μυοκάρδιο (157).

1.4.3 Γ) Επαγωγή της αναγεννητικής ικανότητας των ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων

Μια άλλη μέθοδος κυτταρικής θεραπείας είναι η προώθηση της αναγεννητικής ικανότητας των ενδογενών καρδιακών βλαστικών κυττάρων. Τα ως τώρα δεδομένα δείχνουν ότι τα καρδιακά προγονικά κύτταρα δεν διαφοροποιούνται κατά την ομοιόσταση, ενώ κατά τον μυοκαρδιακό τραυματισμό δημιουργούν καρδιομυοκύτταρα (158). Έχει δειχθεί ότι τα c-kit⁺ CPCs εκφράζουν τους υποδοχείς για τους παράγοντες HGF και IGF-1 (131). Ο HGF δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας που επάγει την μετανάστευση των c-kit⁺ κυττάρων προς το σημείο τραυματισμού ενώ ο IGF-1 αυξάνει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο συνδυασμός λοιπόν των δύο κινητοποιεί και πολλαπλασιάζει τα c-kit⁺ CPCs και βελτιώνει το μυοκάρδιο έπειτα από το έμφραγμα. Επίσης, έχει σημειωθεί ότι παρακρινικοί εκκρινόμενοι παράγοντες, όπως η thymosin B4, ρυθμίζουν τα επικαρδιακά προγονικά κύτταρα να ενεργοποιήσουν την καρδιογενετική τους ικανότητα έπειτα από το έμφραγμα του μυοκαρδίου (159).

1.4.4 Δ) Άμεσος επαναπρογραμματισμός ινοβλαστών σε καρδιομυοκύτταρα

Η μετατροπή ενός διαφοροποιημένου κυτταρικού τύπου σε έναν άλλο χωρίς αυτός να περάσει από το ενδιάμεσο στάδιο της πολυδυναμίας ονομάζεται άμεσος επαναπρογραμματισμός. Ο επαναπρογραμματισμός ινοβλαστών σε καρδιομυοκύτταρα (Induced Cardiomyocytes, iCMs) είναι πειραματικά δυνατός και επιτυγχάνεται μέσω ρετροϊκής μεταφοράς καρδιακών μεταγραφικών παραγόντων όπως Tbx5, Mef2c και GATA4 (160). Σχετικές μελέτες σε μύες απέδειξαν ότι ο άμεσος επαναπρογραμματισμός στην περιοχή του εμφράγματος οδηγεί σε μείωση της εμφραγματικής περιοχής και βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (161). Η βελτιστοποίηση της μεθόδου του άμεσου επαναπρογραμματισμού στην περιοχή του εμφραγματικού μυοκαρδίου ανθρώπου αποτελεί μεγάλη πρόκληση στην κλινική. Απομένει να βελτιωθούν τεχνικές συνθήκες οι οποίες θα μεγιστοποιούν την αποδοτικότητα του επαναπρογραμματισμού σε αριθμό iCMs, θα βελτιστοποιούν την ωρίμανση των iCMs ως προς τη λειτουργικότητα και θα αντικαταστήσουν τη χρήση των ιών με αβλαβείς φαρμακολογικούς παράγοντες.

1.4.5 Μηχανική ιστών (tissue engineering)

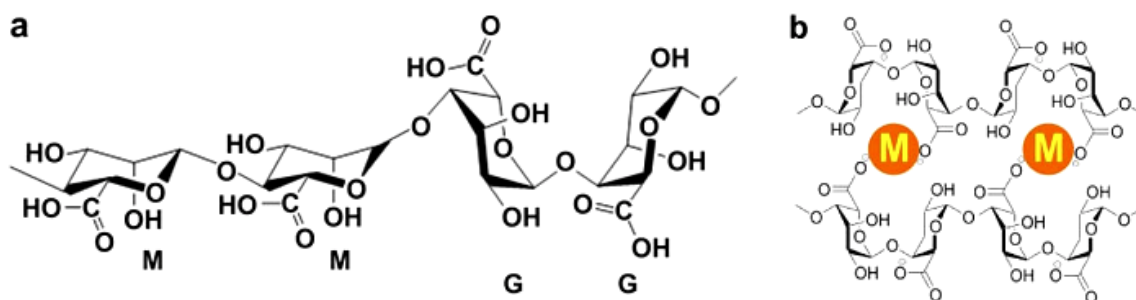
Η μηχανική ιστών διερευνά μεθόδους και υλικά για την έκπτυξη κυτταρικών τύπων σε τρεις διαστάσεις *in vitro*, με σκοπό τη δημιουργία βιολογικών κατασκευών που προσομοιάζουν σε ιστούς. Για την αναγέννηση της καρδιάς, καρδιομυοκύτταρα ή βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με κάποιο υποστηρικτικό ικρίωμα. Τα ικρίωματα λειτουργούν σαν τεχνητή εξωκυττάρια μήτρα, παρέχοντας προσωρινά ένα περιβάλλον το οποίο μπορεί να υποστηρίξει τη διείσδυση, τη σύνδεση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ειδικότερα, στην εμφραγματική περιοχή, έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα τα οποία εγχέονται δεν επιτυγχάνουν ικανοποιητικό ρυθμό ενσωμάτωσης. Απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της ποσότητας οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών και ελευθέρωση αποπτωτικών κυτοκινών και ROS. Οι παραπάνω παράγοντες δημιουργούν έτσι αντίξοο περιβάλλον στην καρδιά το οποίο προκαλεί τη μείωση της βιωσιμότητας των μεταμοσχευμένων κυττάρων. Με τη χρήση ικριωμάτων αποτρέπεται η απώλεια των κυττάρων καθώς παρέχεται ένα προστατευτικό περιβάλλον μέσα στην εμφραγματική καρδιά και βελτιώνεται σημαντικά ο ρυθμός ενσωμάτωσής τους. Επιπρόσθετα, παρέχουν μηχανική στήριξη αμβλύνοντας την τοιχωματική τάση που αυξάνεται κατά την απώλεια των καρδιομυοκυττάρων στο καρδιακό τοίχωμα καθώς επίσης περιορίζουν τη μεταβολή του σχήματος της αριστερής κοιλίας, οδηγώντας στη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (162).

Τα ιδανικά χαρακτηριστικά που πρέπει να κατέχει το υλικό του ικριώματος είναι η βιοσυμβατότητα, επιθυμητή μηχανική αντοχή, κατάλληλο σχηματισμό μικροδομών, ευνοϊκό ρυθμό αποικοδόμησης καθώς και να υποστηρίζεται η ανάπτυξη των κυττάρων και να επιτρέπεται η διατήρηση των μεταβολικών λειτουργιών τους (163), (164). Ποικίλα συνθετικά και φυσικά βιοϋλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως ικρίωματα κατά την αναγεννητική μηχανική στην καρδιά. Τα συνθετικά βιοϋλικά παρουσιάζουν πλεονέκτημα στην ευκολία και την επαναληψιμότητα κατασκευής τους και έχουν χαμηλό κόστος. Το βασικό τους μειονέκτημα είναι ότι έχουν χαμηλή βιοσυμβατότητα, γεγονός που κάποιες φορές οδηγεί στη δημιουργία τοξικών προϊόντων αποικοδόμησης και ανοσολογική απόρριψη. Χαρακτηριστικά τεχνητά βιοϋλικά είναι τα poly(ethylene glycol) (PEG), polylactide (PLA), polylactide-glycolic acid (PLGA), polycaprolactone (PCL), polyacrylamide (PAAm), και polyurethane (PU). Αντίθετα τα φυσικά βιοϋλικά εμφανίζουν παρόμοια ή ταυτόσημη δομή με τα μόρια των βιολογικών οργανισμών και μειώνουν την πιθανότητα της ανοσολογικής απόρριψης όταν

μεταμοσχεύονται *in vivo*. Χαρακτηριστικά φυσικά ικρίωματα είναι το κολλαγόνο, η ζελατίνη, η λαμινίνη, το matrigel, το υαλουρονικό οξύ και το αλγινικό οξύ (165). Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το αλγινικό οξύ.

1.4.6 Αλγινικό οξύ

Το αλγινικό οξύ είναι ένας φυσικός ανιονικός και υδρόφιλος πολυσακχαρίτης, ο οποίος προέρχεται από κυανοφύκη. Είναι ένα γραμμικό (1,4) διασταυρωμένο συμπολυμερές αποτελούμενο από τα μονομερή β-D μαννουρονικού οξέος (β-D mannuronic acid) (M) και α-L-γουλουρονικού οξέος (α-L-guluronic acid) (G). Αυτά τα μονομερή διευθετούνται ως αλληλουχίες σε αλυσίδα, επομένως η κάθε δομική μονάδα (M, G και MG block) εναλλάσσεται της άλλης με τυχαίο τρόπο, σχηματίζοντας την πολυμερική αλυσίδα του αλγινικού οξέος.



Εικόνα 18. α) Χημική δομή του αλγινικού οξέος. **β)** Μηχανισμός ιονικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του αλγινικού οξέος και των δισθενών κατιόντων (166).

Η σύνθεση, η διάταξη και το μοριακό βάρος καθορίζουν τις φυσικές ιδιότητες των αλγινικών οξέων. Το μοριακό βάρος επηρεάζει το ρυθμό αποικοδόμησης καθώς και τις μηχανικές ιδιότητες. Το αλγινικό οξύ βρίσκει ευρεία απήχηση σε ένα πλήθος εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων καθώς και στη βιοϊατρική, χάρις των ξεχωριστών ιδιοτήτων του εκ των οποίων βασικότερες είναι η βιοσυμβατότητα, η βιοδιάσπαση, η μη αντιγονικότητα, η ικανότητα χηλικοποίησης και η αφθονία του. Χρησιμοποιείται ως μήτρα για την ακινητοποίηση φαρμάκων, μακρομορίων και βιολογικών κυττάρων αλλά και ως σύστημα διανομής στην ιστική θεραπεία και στην αναγεννητική ιατρική. Ως τώρα έχει

χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε διάφορους ιστούς και όργανα όπως είναι το δέρμα, οι χόνδροι, τα οστά και η καρδιά. Συγκεκριμένα, κατά τη χρήση του αλγινικού οξέως στην αναγεννητική ιατρική της καρδιά σε εμφραγματικά μοντέλα ζώων, έχειδειχθεί ότι ασκεί ευνοϊκή επίδραση στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας σε επιμύες και σε χοίρους (167), (168).

Το αλγινικό οξύ μπορεί να δημιουργεί διάφορες μορφές όπως είναι η υδρογέλη, μικροσφαιρίδια και πορώδες ικρίωμα. Ο σχηματισμός της υδρογέλης αλγινικού οξέος επιτυγχάνεται με την παρουσία δισθενών κατιόντων (όπως Ca^{2+} , Ba^{2+} ή Sr^{2+}). Συνήθως χρησιμοποιούνται τα δισθενή ιόντα Ca^{2+} για την ιοντική δέσμευση και συγκεκριμένα το διάλυμα CaCl_2 . Η ζελατινοποίηση συμβαίνει όταν τα δισθενή κατιόντα λαμβάνουν μέρος στην ιοντική δέσμευση μεταξύ των G block στην πολυμερική αλυσίδα, δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο δίκτυο. Η ταχύτητα σχηματισμού της υδρογέλης δεν μπορεί να ελεγχθεί λόγω της υψηλής διαλυτότητας του CaCl_2 στην υδατική φάση, περιορίζοντας έτσι την χρήση του ως ενέσιμο ικρίωμα. Ωστόσο, για την εφαρμογή του στον καρδιακό ιστό έχει διαπιστωθεί ότι αρχικά σχηματίζεται διάλυμα αλγινικού οξέος *in vitro* στο οποίο προστίθενται τα κύτταρα ή οι πρωτεΐνες άλλα έπειτα από την εμφύτευση του στο εσωτερικό του μυοκαρδίου *in vivo*, διασυνδέεται με τα ιόντα ασβεστίου και υφίσταται μετάβαση σε παχύρευστο ικρίωμα (169). Για να επιτευχθεί ο σχηματισμός της υδρογέλης σε πιο αργό και ελεγχόμενο ρυθμό χρησιμοποιούνται τα διαλύματα CaSO_4 και CaCO_3 , τα οποία έχουν χαμηλότερη διαλυτότητα.

1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων είναι απαραίτητες κατά την ανάπτυξη της καρδιάς. Παραμένει ασαφές ωστόσο σε ποιο χρονικό σημείο της διαφοροποίησης καθώς και με ποιο τρόπο τα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγουν τη διαφοροποίηση των καρδιακών κυττάρων. Περαιτέρω, οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατέχουν εξέχοντα ρόλο στη δημιουργία των ιστών κατά την εμβρυογένεση. Η μελέτη τους ως τώρα, έχει πραγματοποιηθεί με πειράματα κατά τα οποία πραγματοποιείται απαλοιφή ενός μορίου από το σύμπλεγμα των συνδέσμων προσκόλλησης, παρόλα ταύτα, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος τους στα ενδοθηλιακά και καρδιακά προγονικά κύτταρα τα οποία δημιουργούνται αμέσως μετά το σχηματισμό του καρδιακού μεσοδέρματος. Η παρούσα μελέτη αφορά τη μελέτη των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης κατά τη δημιουργία του καρδιαγγειακού συστήματος καθώς και τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων μυός (mESCs).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν:

- Οι σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά την εξειδίκευση των καρδιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων κατά το σχηματισμό του καρδιαγγειακού συστήματος στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης.
- Η σχέση του ενδοθηλίου με τα καρδιακά κύτταρα κατά τα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης στο σύστημα των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, κατά τη διαφοροποίησή τους με τη μέθοδο των εμβρυοειδών σωματιδίων (EBs).
- Η διάρρηξη των συνδέσμων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα με μια αρνητικώς επικρατούσα μορφή cadherin με σκοπό να μελετηθεί η ενδοθηλιακή και η καρδιακή ακεραιότητα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης.
- Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός προϊόντων διαφοροποίησης mESCs στα οποία ενεργοποιείται ο ιστοειδικός υποκινητής της VE-cadherin (ενδοθηλιακή cadherin) και η περαιτέρω χρήση τους σε μοντέλα ζώων.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs)

A) E14T

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού E14T (εκφράζουν το L-T αντιγόνου του ιού SV40) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία ήταν ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Καθηγητή A.Smith και του Dr I.Chambers (MRC Centre for Regenerative Medicine, Edinburgh, UK). Τα ES κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο GMEM (Glasgow modified Eagle's medium) εμπλουτισμένο με 15% ορός εμβρύου βοός (FBS), 2mM L-γλουταμίνη, 0.1mM απαραίτητα αμινοξέα, 1mM πυροσταφυλικό νάτριο και 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Επίσης, στην καλλιέργεια των κυττάρων προστίθεται β-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 1μM και LIF (Leukemia Inhibitor Factor) τα οποία είναι απαραίτητα για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των ES κυττάρων. Για τη παρασκευή του LIF, υπερεκφράστηκε το αντίστοιχο DNA σε COS κύτταρα και συλλέχθηκε η εκκρινόμενη πρωτεΐνη από το καλλιεργητικό μέσο. Η καλλιέργεια των E14T δεν απαιτεί συν-καλλιέργεια με τροφικά κύτταρα για την διατήρηση της αυτοανανέωσης και της πολυδυναμίας τους. Απαιτείται μόνο επίστρωση των τρυβλίων με 0.1% διάλυμα ζελατίνης.

B) Ds-red-MST ES cells

Τα Ds-red MST εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Vintersten et al.,2004) αναπτύσσονται στο θρεπτικό μέσο που προαναφέρθηκε. Η καλλιέργεια τους απαιτεί τη συν-καλλιέργεια με μιτωτικώς ανενεργούς εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (MEFs).

MEFs (Εμβρυονικοί Ινοβλάστες Ποντικού)

Τα MEFs καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (4.5 g/L), 10% (v/v) FBS, 2 mM L- γλουταμίνη, 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο, 50 U/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα μετατρέπονται σε μιτωτικώς ανενεργά στρωματικά κύτταρα με τη χρήση του αντιβιοτικού mitomycin-C (10μg/ml) (αντιβιοτικό το οποίο προσδένει το DNA και αναστέλλει την σύνθεση του) τα οποία υποστηρίζουν την καλλιέργεια των ES, τροφοδοτώντας τα με απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες για την ανάπτυξη και αυτοανανέωση τους.

Cos-7 (κυτταρική σειρά με μορφολογία ινοβλαστών, προερχόμενη από μετασχηματισμό κυττάρων CV1 με μεταλλαγμένο στέλεχος του ιού SV40)

Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 U/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM L-γλουταμίνη.

Ανθρώπινα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (HMEC-1, Human Microvascular Endothelial Cells).

Τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, 50 ng/ml υδροκορτιζόνη (Sigma) και 0,01 µg/ml EGF (Immunotools).

Ανθρώπινα πνευμονικά μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (HPMEC, Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 (Gibco) εμπλουτισμένο με 20% FBS, 50 µg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS, Upstate), 50 µg/ml ηπαρίνη (Sigma), 100 U/ml πενικιλίνη (Gibco) και 100 U/ml στρεπτομυκίνη (Gibco) και 2 mM Glutamax (Invitrogen).

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)

Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου HUVEC απομονώθηκαν στο εργαστήριο του κ. Χριστοφορίδη και χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση κάποιων πειραμάτων στην παρούσα μελέτη. Καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 (με L-γλουταμίνη και Earle's, Invitrogen), εμπλουτισμένο με 20 % FBS, 50 µg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS, Sigma), 10 units/µl ηπαρίνη (Sigma), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 U/ml στρεπτομυκίνη, 2 mM L-γλουταμίνη. Τα τρυβλία και οι καλυπτρίδες στα οποία καλλιεργήθηκαν τα HUVEC και τα HPMEC είχαν υποστεί επεξεργασία προηγουμένως με διάλυμα ζελατίνης 0,2%

Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έλαβαν χώρα εντός εστίας νηματικής ροής (AURA 200 MAC, BioAir Instruments,

HeraSafeTM). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific, CO₂ Water-jacketed Incubator, HeraCellTM) σταθερής θερμοκρασίας, κάτω από κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% CO₂.

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιούνται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) (Invitrogen). Η αποκόλληση των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης / EDTA (trypsin / EDTA solution, Invitrogen 0,05% / 0,02% w/v).

2.1.2 *In vitro* διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

Η διαφοροποίηση των ESCs προς μεσόδερμα πραγματοποιείται με το σχηματισμό εμβρυοειδών σωματιδίων (Embryoid Bodies, EBs) με τις εξής μεθόδους:

A) Διαφοροποίηση σε ημι-στερέο θρεπτικό μεθυλο-σελλουλόζης: Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μεθυλο-σελλουλόζης που περιέχει ES-Cult M3120 (StemCellTechnologies), Iscove's modified Dulbecco's medium IMDM (Sigma), 15% FBS (Biochrom), 450 mmol/L μονοθειογλυκερόλη, (MTG, Sigma), 50 ng/ml human VEGF, 100 ng/ml human bFGF και 10 ng/ml murine IL-6 (Immunotools), 2u/ml human EPO (ευγενική χορηγία του Dr Βαρθολομάτου, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων), 10 μg/ml human ινσουλίνη (Sigma), 2 mM L-γλουταμίνη, 100 u/ml πενικιλίνη και 0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη (Invitrogen). Τα κύτταρα επιστρώνονται σε βακτηριακά τρυβλία, 2000 κύτταρα/30mm τρυβλίο Petri.

B) Διαφοροποίηση με τη μέθοδο κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop method): Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο IMDM, 15% FBS, 450 mmol/L μονοθειογλυκερόλη, 50 ng/ml VEGF, 100 ng/ml bFGF and 10 ng/ml IL-6, 2u/ml ερυθροποιητίνη, 10 μg/ml human ινσουλίνη, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 u/ml πενικιλίνη and 0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη. Πιο συγκεκριμένα, 500 μονήρη κύτταρα ανά 20μl θρεπτικού μέσου αφέθηκαν υπό μορφή «κρεμάμενων» σταγόνων (hanging drops) για διάστημα δυο ημερών ώστε να σχηματίσουν εμβρυοειδή σωματίδια. Τα σχηματιζόμενα σωματίδια μεταφέρθηκαν σε 30mm βακτηριολογικά τρυβλία για περαιτέρω διαφοροποίηση. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται μετά την πέμπτη ημέρα ανά δυο ημέρες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Γ) Διαφοροποίηση με τη μέθοδο μαζικής καλλιέργειας (Mass culture): Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο IMDM εμπλουτισμένο με 15% FBS, 450 mmol/L μονοθειογλυκερόλη, 5ng/ml VEGF, 30ng/ml bFGFF, 5μg/ml ασκορβικό οξύ, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 u/ml πενικιλίνη και 0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα / 10ml θρεπτικού μέσου και επιστρώνονται σε 100mm βακτηριακά τρυβλία.

Δ) Διαφοροποίηση CEDPs (Cardiac/ Endothelial Dual Progenitors) σε μικροσφαιρίδια αλγινικού οξέος: Τα CEDPs θρυψινοποιούνται και επαναδιαλύονται σε διάλυμα 1,1 % αλγινικού οξέως (170) σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα / ml διαλύματος. Στη συνέχεια, με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης προστίθεται στάγδην το μίγμα κυττάρων/αλγινικού σε διάλυμα 1M CaCl_2 ώστε να σχηματιστούν τα μικροσφαιρίδια αλγινικού οξέως στα οποία έχουν ενκαψιδιωθεί τα CEDPs. Εν ακολούθως, πραγματοποιούνται εκπλύσεις των μικροσφαιριδίων με διάλυμα 0.9% NaCl και οι σχηματιζόμενες μικροσφαίρες μεταφέρονται σε 30mm βακτηριολογικά τρυβλία για διαφοροποίηση σε θρεπτικό μέσο IMDM εμπλουτισμένο με 15% FBS, 450 mmol/L μονοθειογλυκερόλη, 10ng/ml VEGF, 30ng/ml bFGFF, 5μg/ml ασκορβικό οξύ, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 u/ml πενικιλίνη και 0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη.

2.1.3 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

Για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα αντίστοιχα πλασμίδια και διαμοιράστηκαν σε τρυβλίο έξι φρεατίων. Μετά από 24 ώρες από τη διαμόλυνση χορηγείται στα κύτταρα αντιβιοτικό επιλογής, υγρομυκίνη (150μg/ml-120μg/ml) για 12-15 ημέρες έως ότου σχηματιστούν κλωνογενείς αποικίες ικανοποιητικού μεγέθους. Οι σχηματιζόμενες αποικίες συλλέχτηκαν και καθεμία μεταφέρθηκε σε φρεάτιο τρυβλίου 96 φρεατίων και αναπτύσσονται κλωνογενώς ή συλλέγονται και εκπύσσονται μαζικά για τη δημιουργία μαζικών κλώνων (pool). Πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου και προσθήκη αντιβιοτικού καθημερινά. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν αρκετά, ώστε να καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, μεταφέρονται διαδοχικά σε τρυβλίο 24 φρεατίων, 12 φρεατίων, 6 φρεατίων και τελικώς σε τρυβλίο 60mm. Οι κλώνοι ελέγχθηκαν για την παρουσία του αντίστοιχου πλασμιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (με χρήση πριμοδοτικών αλληλουχιών οι οποίες καλύπτουν το ένθεμα).

2.1.4 Διαμόλυνση ESC κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation)

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ώστε να διαταραχθεί προσωρινά η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα πολικά μόρια (όπως τα νουκλεϊκά οξέα) να εισέλθουν στο κύτταρο. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή BTX ECM 630-Harvard Apparatus και οι αντίστοιχες ειδικές κυψελίδες, 0.4-cm (cuvettes-BTX 640). 5×10^6 κύτταρα και 20 μ g πλασμιδίου αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 600 μ l PBS και υπέστησαν ηλεκτροδιαπίδυση υπό τις ακόλουθες συνθήκες: 200V (ισχύς ρεύματος), 950 μ F (χωρητικότητα) και 0 Ω (αντίσταση).

2.1.5 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πολυ-αιθυλενιμίνη και με το Xfect πολυμερές

Για τη διαμόλυνση των COS-7 κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές, η διαμόλυνση με πολυ-αιθυλενιμίνη (SIGMA) και η διαμόλυνση με το Xfect πολυμερές (Clontech).

Η πολυ-αιθυλενιμίνη (Poly-ethylenimine, PEI) είναι ένα συνθετικό, πολυμερές κατιόν με ιδιότητα να συμπυκνώνει το DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά συνδέονται με ανιονικά κατάλοιπα της επιφάνειας του κυττάρου και εισέρχονται σε αυτό με ενδοκύτωση. Στη τεχνική της διαμόλυνσης με τη χρήση της ουσίας πολυαιθυλενιμίνης πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση των κυττάρων την προηγούμενη της διαμόλυνσης, έτσι ώστε την επομένη μέρα να παρουσιάζουν πυκνότητα ταπητίου 50%. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αντίδρασης που προέκυψε από αραιώση 1:100 του συμπυκνωμένου διαλύματος αντίδρασης (25% PEI) σε απεσταγμένο νερό. Για ένα τρυβλίο 100 mm χρησιμοποιήθηκαν 4,5 μ l διαλύματος αντίδρασης σε 300 μ l θρεπτικού μέσου απουσία ορού. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν 10 μ g DNA εντός 50 μ l θρεπτικού μέσου απουσία ορού. Ακολούθησε προσθήκη του διαλύματος PEI στο θρεπτικό μέσο που περιέχει DNA, ακολούθησε vortex και στη συνέχεια το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα που καλύπτονται με 3 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα επωάστηκαν με αυτό για 3-5 ώρες και το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε στη συνέχεια με φρέσκο θρεπτικό υλικό.

Το Xfect αντιδραστήριο είναι ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές με χαμηλή κυτταροτοξικότητα και υψηλή απόδοση διαμόλυνσης. Ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Εν συντομία, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν μια ημέρα πριν, ώστε να έχουν πυκνότητα 50-70% την επόμενη ημέρα. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιείται 0.3μl από το Xfect για 1μg πλασμιδιακού DNA. Για ένα 100mm τρυβλίο αναμιγνύεται 30μg πλασμιδιακό DNA με 600μl αντιδραστηρίου Xfect και 9μl πολυμερούς με 600μl αντιδραστηρίου Xfect. Αναμιγνύεται το διάλυμα του πολυμερούς με το διάλυμα του DNA, ακολουθήθηκε vortex και στη συνέχεια το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Το μίγμα προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα που καλύπτονται με 9 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα επώαστηκαν με αυτό για 3-5 ώρες και το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε στη συνέχεια με φρέσκο θρεπτικό υλικό.

2.2 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής

2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασχηματισμό

Τα βακτήρια ανασύρθηκαν από βακτηριακό μητρικό απόθεμα (στοκ) διαλύματος γλυκερόλης και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο στερεού άγαρ. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση σε θερμοκρασία 37°C. Κατόπιν, μία μονή αποικία επιλέχθηκε για εμβολισμό 3ml Luria Broth και αφέθηκε για ολονύχτια ανάπτυξη. Από την παραπάνω καλλιέργεια 2.5ml εμβολιάστηκαν σε 250ml LB και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα, στα 600 nm, να προσεγγίσει τις 0.6 μονάδες. Στη συνέχεια, τα βακτήρια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στα 4000g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 ml παγωμένου διαλύματος TFB I (100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM οξικό κάλιο, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH5.8). Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 1.5 ώρα και φυγοκέντρωση στα 4000g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4⁰ C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml παγωμένου διαλύματος TFB II (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH6.8). Τέλος, το αιώρημα διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια τα οποία ψύχθηκαν για 15 δευτερόλεπτα σε υγρό άζωτο και εν συνεχεία τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80⁰ C.

2.2.2 Ανάπτυξη βακτηρίων

Ως θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το 2YT (Sigma). Τα στερεά θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη 1,5 % άγαρ στο υγρό θρεπτικό υλικό. Η ανάπτυξη των βακτηρίων έγινε στους 37° C σε τροχιακό επωαστήρα (Model G25 incubator shaker, New Brunswick) υπό ανακίνηση στις 200 rpm. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αμπικιλίνη (Sigma) σε συγκέντρωση 75 µg/ml και καναμυκίνη (Sigma) σε συγκέντρωση 50 µg/ml.

2.2.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Για τον μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων αναμίχθηκε 1ng πλασμιδιακού DNA με 100 µl κυττάρων. Το μίγμα επώαστηκε στον πάγο για 20 λεπτά, μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο των 42° C για 1,5 λεπτό και αμέσως στον πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν στο μίγμα κυττάρων και DNA όσα µl θρεπτικού υλικού 2YT χωρίς αντιβιοτικό χρειάζεται ώστε να συμπληρωθεί 1 ml τελικός όγκος, επώασθηκαν στους 37° C για 1 ώρα και τέλος επιστρώθηκαν σε τρυβλία στερεού 2YT με αμπικιλίνη. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα δημιουργήσαν αποικίες ύστερα από ολονύκτια επώαση στους 37° C, οι οποίες και συλλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

2.2.4 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA

Σε μικρή κλίμακα: Για την απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων ως εξής: Μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιείχαν 2 ml 2YT και κατάλληλο αντιβιοτικό και επώασθηκαν ολονύκτια υπό ανάδευση στους 37°C. Στη συνέχεια 1,2 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 g για 1,5 λεπτό. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 µl διαλύματος I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA), 200 µl διαλύματος II (0.2 N NaOH, 1% w/v SDS), 150 µl διαλύματος III (2.5 M CH₃COONa) και μετά από ήπια ανάδευση ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 13.500 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα όπου πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση του DNA με 2,5 όγκους κρύας αιθανόλης 100% , ακολούθησε vortex και φυγοκέντρωση στις 13.500 rpm για 15 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 150 µl κρύας αιθανόλης 70%. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση, το ίζημα αποξηράνθηκε και επαναιωρήθηκε σε 30 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

Σε μεγάλη κλίμακα : Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Nucleobond PC 100 (Machey – Nagel). Το παραπάνω πρωτόκολλο αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο της αλκαλικής λύσης βακτηρίων.

2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Θραύσματα DNA αναλύθηκαν σε πηκτές 0.8-1.5% αγαρόζης, ανάλογα με το μέγεθος των θραυσμάτων DNA προς ανάλυση. Η σκόνη αγαρόζης διαλύθηκε κατόπιν βρασμού σε διάλυμα 1xTAE και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 1xTAE. Οι πηκτές αγαρόζης περιείχαν 0.5mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου ώστε τα θραύσματα του DNA να είναι ορατά μετά από έκθεση σε υπεριώδες φως.

2.2.6 Απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για να απομονωθεί το θραύσμα DNA από πηκτή αγαρόζης είναι η εξής: Αποκόπηκε από την πηκτή η ζώνη που αντιστοιχεί στο φορέα και τοποθετήθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο το οποίο στον πυθμένα του περιείχε υαλοβάμβακα και μια οπή από όπου διήλθε η πηκτή μετά από φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το προκύπτον διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 30 δευτερόλεπτα σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο που περιέχει φίλτρο και είναι γνωστό ως SpinX. Ακολούθησε εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και καταβύθιση του DNA με 2,5 όγκους κρύας αιθανόλης 100% στους -80°C για 20 λεπτά. Μετά από τη φυγοκέντρωση στις 13000 rpm στους 4° C για 30 λεπτά, το ίζημα εκπλύθηκε με 50 μl κρύας αιθανόλης 70%. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20 μl TE.

2.2.7 Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών pPY2549puro-pTKHygro και pPY2549-EGFP-puro-pTKHygro

Για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pPY2549puro-pTKHygro χρησιμοποιήθηκαν οι προϋπάρχουσες πλασμιδιακές κατασκευές pPY2549GIP και pPvec-VEC-ΔEXD (κατασκευάστηκαν από την κ. Άννα Μελιδώνη). Συγκεκριμένα το πλασμίδιο pPvec-VEC-ΔEXD (από το οποίο θα προκύψει το ένθεμα pTK-Hygromycin cassette-pTkrolyA) επώασθηκε με το περιοριστικό ένζυμο HindIII και το πλασμίδιο pPY2549GIP επώασθηκε με το περιοριστικό ένζυμο NheI. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση

Klenow για την συμπλήρωση των υπολειπόμενων 3' άκρων και στα δύο θραύσματα DNA σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή (TAKARA, Clontech) και ακολούθησε καθαρισμός φαινόλης/χλωροφορμίου. Στη συνέχεια το θραύσμα του pVec-VEC-ΔEXD επώασθηκε με το περιοριστικό ένζυμο XhoI ενώ το θραύσμα του pPY2549GIP με το περιοριστικό ένζυμο SalI. Το προκύπτον θραύσμα μεγέθους 2631 bp από το πλασμίδιο pVec-VEC-ΔEXD και 8101 bp από το πλασμίδιο pPY2549GIP απομονώθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,8% και αποτέλεσε το 1^ο το ένθεμα για τη δημιουργία της νέας πλασμιδιακής κατασκευής ενώ το 2^ο αποτέλεσε τον φορέα. Η δημιουργία της κατασκευής πραγματοποιήθηκε με επώαση του ενθέματος και του φορέα σε αναλογία 1:1 παρουσία T4 DNA λιγάσης (Invitrogen, Life Technologies) η οποία καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 16 ώρες στους 4^ο C. Τέλος, επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα DH10b μετασχηματίστηκαν με το μίγμα που προέκυψε από την αντίδραση λιγάσης.

Για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pPY2549-EGFP-puro-pTKHygro χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές pPY2549puro-pTKHygro και ο φορέας pEGFP-N1. Το φορέα pEGFP-N επώασθηκε με τα ένζυμα XhoI/ NotI. Προέκυψε θραύσμα μεγέθους 788 bp, το οποίο απομονώθηκε σε πηκτή αгарόζης και αποτέλεσε το ένθεμα για τη νέα κατασκευή. Ακολούθησε πέψη του πλασμιδίου pPY2549puro-pTKHygro με τα ένζυμα XhoI/ NotI. Απομονώθηκε θραύσμα μεγέθους 10352 bp που αποτέλεσε το φορέα. Ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης όπου επώασθηκε φορέας και ένθεμα σε αναλογία 3:1 σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Επιδεκτικά κύτταρα DH10β μετασχηματίστηκαν με το μίγμα που προέκυψε από την αντίδραση λιγάσης.

Η λιγάση και τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρείες Fermentas και New England Biolabs. Η χρήση των παραπάνω ενζύμων έγινε σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Η κατασκευή των νέων πλασμιδίων ελέγχθηκαν με πέψη με περιοριστικά ένζυμα.

2.3 Μέθοδοι μοριακής βιολογίας

2.3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα

Ο έλεγχος των σταθερών κυτταρικών κλώνων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων για την παρουσία του αντίστοιχου πλασμιδίου, πραγματοποιήθηκε με απομόνωση DNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση ειδικών για το ένθεμα πριμοδοτικών αλληλουχιών. Η απομόνωση DNA πραγματοποιείται από κύτταρα που μεγαλώνουν σε τρυβλίο 24 φρεατίων. Αφαιρείται το καλλιεργητικό μέσο, τα κύτταρα ξεπλένονται 2-3 φορές με ισοτονικό διάλυμα (PBS) και προστίθεται 500μl διάλυμα λύσης (0.2M NaCl₂, 10mM EDTA, 40mM Tris-HCl pH8.0, 0.5% SDS) που περιέχει 0.5mg/ml Πρωτεΐνάση K. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37⁰ C για 6-12 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται στα ομογενοποιημένα κύτταρα ίση ποσότητα ισοπροπανόλης. Ακολουθεί καλή ανακίνηση για να σχηματιστεί το ίζημα του DNA και φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 5 min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο προσεχτικά και στη συνέχεια προστίθεται 100μl 70% αιθανόλης. Ακολουθεί vortex και φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 5 min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο προσεχτικά αποξηραίνεται το ίζημα και προστίθεται ddH₂O ώστε να επαδιαλυθεί το DNA.

2.3.2 Απομόνωση ολικού RNA από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και από εμβρυοειδή σωματίδια

Ολικό RNA από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και από εμβρυοειδή σωματίδια απομονώθηκαν με τη χρήση του πακέτου (kit) RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.3.3 Απομόνωση ολικού RNA από καρδιακό ιστό

Μετά τη θανάτωση του επιμύος, ο καρδιακός ιστός αφαιρείται από το ζώο, μεταφέρεται απευθείας και ψύχεται σε υγρό N₂ προκειμένου να ανασταλεί η δράση των ενδογενών RNAσών. Στη συνέχεια, ο ιστός ομογενοποιείται σε παγωμένο γουδί πορσελάνης μέχρι να κονιορτοποιηθεί πλήρως σε ψυχρό θάλαμο 4⁰ C. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας λαμβάνει χώρα ψύξη του ιστού σε υγρό N₂. Ο κονιορτοποιημένος ιστός μεταφέρεται σε eppendorf και προστίθεται 1ml TRIZOL. Το αντιδραστήριο TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies) είναι ένα μονοφασικό διάλυμα ισοθειοκυανικής φαινόλης και γουανιδίνης, το οποίο προκαλεί λύση των κυττάρων και διαχωρισμό των κυτταρικών

στοιχείων από το πυρηνικό οξύ, διατηρώντας ακέραιο το RNA. Για την πλήρη ομογενοποίηση του δείγματος χρησιμοποιείται σύριγγα 20G (διαμέτρου 0.9mm) και αναδεύεται καλά. Το δείγμα επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται 200μl χλωροφορμίου και γίνεται έντονη ανάδευση. Το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό του διαλύματος σε 3 φάσεις. Η άνω φάση περιέχει αποκλειστικά το RNA, η ενδιάμεση περιέχει το DNA και κάτω η ανόργανη φάση φαινόλης χλωροφορμίου. Το δείγμα επωάζεται για 2-3 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 12000g για 15min στους 4° C. Αναρροφάται προσεκτικά η άνω φάση και μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο eppendorf. Στη συνέχεια ακολουθεί η κατακρήμνιση του RNA με την προσθήκη 500μl ισοπροπανόλη και επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα έπειτα φυγοκεντρείται στις 12000g για 15min σε στους 4° C. Αφαιρείται το υπερκείμενο. Το RNA σχηματίζει ένα διάφανο ίζημα στο κατώτερο τοίχωμα του eppendorf. Τέλος γίνεται έκπλυση του RNA με 1ml 75% αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 7500g για 5min στους 4° C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και στεγνώνεται το ίζημα. Το RNA επαναδιαλύεται σε 30μl H₂O RNase-free. Το ολικό RNA διατηρείται στους -80° C.

2.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός RNA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας από τις βάσεις των ριβονουκλεοτιδίων του, σε μήκος κύματος 260nm και 280nm, με τη χρήση του NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Σε μήκος κύματος 260nm ελέγχθηκε η περιεκτικότητα σε DNA, ενώ σε μήκος κύματος 280nm ελέγχθηκε η πρόσμιξη σε πρωτεΐνες. Η εκτίμηση της καθαρότητας έγινε με τον προσδιορισμό του λόγου των μετρήσεων στα 260nm και στα 280nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀). Το καθαρό RNA δίνει λόγω ίσο με 2.

2.3.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η διαδικασία σύνθεσης cDNA από RNA ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν 0.8μg RNA από τα δείγματα των ESCs και των EBs και 1μg RNA από τα δείγματα του καρδιακού ιστού σε αντίδραση με τελικό όγκο 20μl. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με τη χρήση του πακέτου (kit) QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) αποτελεί μία δυναμική μέθοδο εκθετικής ενίσχυσης συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (ή cDNA). Η διαδικασία ενίσχυσης επιτυγχάνεται μέσω διαδοχικών κύκλων *in vitro* διπλασιασμού με την βοήθεια μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (KAPA Taq PCR Kit, KAPA Biosystems) και 2 αντιπαράλληλων εκκινητών (primers) που οριοθετούν την αλληλουχία ενδιαφέροντος. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης ήταν: 1.5mM MgCl₂, 0.25mM dNTPs, 10pmol 5'πριμοδοτικό μόριο, 10pmol 3' πριμοδοτικό μόριο, 1.5U Taq polymerase, εκμαγείο DNA (DNA template) 400-500ng σε τελικό όγκο 25μl.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα PTC-200 Peltier Thermal Cycler υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

Αποδιάταξη για 4 λεπτά στους 95°C ακολουθούμενη από 30-35 κύκλους με το εξής πρόγραμμα: Αποδιάταξη για 30 δευτερόλεπτα στους 95°C, προσαρμογή των εκκινητών στο DNA ή cDNA εκμαγείο για 30 δευτερόλεπτα στους 59° C έως 63° C (ανάλογα με τους εκκινητές) και επιμήκυνση για 2 λεπτά στους 72° C.

2.3.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)

Οι αντιδράσεις ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκαν με το ένα δωδέκατο του cDNA με τη χρήση του πακέτου (kit) Maxima SYBR Green Mix (Fermentas) στο μηχάνημα Roche Lightcycler 2.0 για 35 κύκλους. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων επιλέχθηκαν τα γονίδια GAPDH και actin σύμφωνα με τη βιβλιογραφία για τη διαφοροποίηση ESC κυττάρων. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα qbasePLUS (Bio gazelle). Οι αλληλουχίες των πριμοδοτικών μορίων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν, σχεδιάστηκαν σε διαφορετικά εξόνια για την αποφυγή ενίσχυσης γενωμικού DNA.

Πίνακας 2. Εκκινητές

Όνομα Γονιδίου	Είδος	Παράλληλος εκκινητής 5'-3	Αντιπαράλληλος εκκινητής 5'-3	Προϊόν Αντίδρασης cDNA
VE-Cadherin	Mm	GTAACCCTGTAGGGAAAGA GTCCATT	GCATGCTCCCGATTAAACT GCCATA	260bp
FLAG-ΔEXD-VEC	mutant specific	GAGTCGCAAGAATGCCGACT ACAAGGACGACGATGACAA GACCTTCTGCGAGGATATGG	AAGGAAGTCGTAATCCACG TCAG	560bp
Isl-1	Mm	GCAGCTCCAGCAGCAGCAAC CCA	TGGGAGCTGCGAGGACATC GATGC	277bp
Nkx2.5	Mm	AGCCGCCCCCACATTTTACC CG	GCGAGAAGAGCACGCGTG GCT	178bp
Brachyury (T)	Mm	GGAACAGCTCTCCAACCTAT GCG	CTGAGCTCCCAGCCCGTTG GAC	212bp
Mesp-1	Mm	GCAGTCGCTCGGTCCCCGTT	CTGCGGCGGCGTCCAGGTT T	223bp
MLC-2v	Mm specific	ACTTCACCGTGTCCTCACG ATGT	TCCGTGGGTAATGATGTGG ACCAA	254bp
actin	Mm	GTGACGTTGACATCCGTAAA G	GCCGGACTCATCGTACTC	244bp
gapdh	Mm	AGGTCGGTGTGAACGGATTT G	GGGGTCGTTGATGGCAACA	94bp

2.4 Βιοχημικές μέθοδοι

2.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με τη χρήση πηκτής ακρυλαμιδίου

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προέκυψαν μετά απο λύση των κυττάρων με το διάλυμα RIPA [50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0,5% deoxycholate, 1mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (Roche). Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με τη χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου, υπό αναγωγικές συνθήκες, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli, 1970. Στα προς ανάλυση δείγματα προστέθηκε, πριν τη χρήση τους, 4 φορές συγκεντρωμένο διάλυμα Laemmli (Tris-HCl (pH 7), 9,2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0.2% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης και 100 mM DTT). Ακολούθησε η θέρμανση τους στους 95°C για 5 λεπτά. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 8%, 10%, 12% και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα που είχε 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris base και 0,1% SDS.

2.4.2 Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, έγινε χρώση των πηκτών σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 12% οξικού οξέος και 0,1% Coomassie Blue G250. Απομακρύνθηκε η περίσσεια της χρωστικής και ακολούθησε επώαση σε διάλυμα 10-40% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος έως ότου οι ζώνες των πρωτεϊνών γίνουν ορατές.

2.4.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Τα δείγματα αναλύθηκαν πρώτα με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (Whatman), υπό σταθερή τάση 50 V για 1 ώρα και 30 λεπτά. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-Base, 0,1% SDS και 20% μεθανόλη. Οι μεμβράνες επώασθηκαν με διάλυμα πλύσης (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 155 mM NaCl, 0,05% Tween 20) όπου είχε προστεθεί 1% ζελατίνης από δέρμα ιχθύος (Fish skin gelatin, Sigma) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση για 1 ώρα για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Η επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα πλύσης με 1% ζελατίνης είτε στους 4°C ολονυκτίως είτε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες υπό ανάδευση. Έπειτα οι μεμβράνες πλύθηκαν 4 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα πλύσης παρουσία ζελατίνης και επώασθηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse

Raddish Peroxidase, HRP) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η ραφανιδική υπεροξειδάση είναι υπεύθυνη για την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα πλύσης, επώαση για 5 λεπτά με αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρείας (LumiSensor, GenScript) και εμφάνιση του σήματος με το μηχάνημα Imaging System ChemiDoc XRS (Biorad). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι FLAG (M2, Sigma), VE-Cadherin (Santa Cruz) και tubulin (Sigma). Η tubulin χρησιμοποιήθηκε για την ισοφόρτωση των δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών που συνδέθηκαν με το αντίσωμα στην ανοσοαποτύπωση κατά Western έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Quantity One της εταιρείας Biorad.

2.5 Μορφολογικές μέθοδοι

2.5.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.

Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που αναπτύχθηκαν προσκολλούμενα σε καλυπτρίδες εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 3,7% για 10 λεπτά. Τα μονιμοποιηθέντα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με PBS και στη συνέχεια επώαστηκαν με διάλυμα χρώσης A και B σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά για το καθένα. Το διάλυμα χρώσης A αποτελείται από ισοτονικό διάλυμα PBS που περιέχει 0,1% Triton X-100 και 0,2% ζελατίνη από δέρμα ιχθύος ενώ το B περιέχει τα ίδια διαλύματα με τη μόνη διαφορά 0.5% TX100. Το Triton X-100 διαλυτοποιεί τα μεμβρανικά λιπίδια και χρησιμοποιείται για να γίνουν τα κύτταρα διαπερατά στα αντισώματα. Ακολούθησε η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος σε κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα χρώσης A και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα χρώσης A και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για 1 ώρα. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα χρώσης A για 5 λεπτά ακολούθησε η χρώση των πυρήνων με DAPI (40ng/ml σε PBS) για 5 λεπτά. Τέλος τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS και οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση 10μl διαλύματος 1 mg/ml p-φαινυλενεδιαμίνης (Sigma), αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του φθορισμού (anti-fade).

2.5.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός εμβρυοειδών σωματίων

Τα εμβρυοειδή σωματίδια αφέθηκαν να κολλήσουν και να αναπτυχθούν σε 12mm καλυπτρίδες επιστρωμένες με ζελατίνη ή φιμπρονεκτίνη σε τρυβλία 24 φρεατίων, 2 ημέρες πριν τον ανοσοφθορισμό. Οι καλυπτρίδες με τα εμβρυοειδή σωματίδια εκπλύθηκαν τρεις φορές με TBS και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 3,7% για 30 λεπτά και στη συνέχεια επώσθηκαν για 45 λεπτά με το διάλυμα χρώσης A (TBS, 3% BSA, 0.2% TX100, 2mM MgCl₂, 0.2mM EGTA) και για 15 λεπτά με το διάλυμα χρώσης B (TBS, 3% BSA, 0.5% TX100, 2mM MgCl₂, 0.2mM EGTA) (για αντίσωμα που έχουν παρασκευαστεί σε κατσίκα χρησιμοποιήθηκε BSA IgG free, (Jackson Immunoresearch). Το πρωτεύον αντίσωμα αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση σε διάλυμα χρώσης A, προστέθηκε στις καλυπτρίδες και ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 4° C σε θάλαμο υψηλής υγρασίας. Ακολούθησαν 5 πλύσεις των 10 λεπτών με TBS και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για 1 ώρα. Τα EBs ξεπλύθηκαν 5 φορές με TBS για 10 λεπτά ακολούθησε η χρώση των πυρήνων με DAPI (40ng/ml σε PBS) για 20 λεπτά. Τέλος, τα EBs εκπλύθηκαν 5 φορές με TBS για 10 λεπτά και οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση 10μl διαλύματος 1 mg/ml p-φαινυλενεδιαμίνης ή Vectashield.

2.5.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός εμβρυοειδών σωματίων σε εναιώρημα (whole mount)

Τα EBs απομακρύνονται από την καλλιέργεια, αφαιρείται το θρεπτικό διαφοροποίησης, ξεπλένονται με PBS και μονιμοποιούνται με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3,7% για 1 ώρα. Η διαδικασία του ανοσοφθορισμού πραγματοποιείται σε τρυβλία 24 φρεατίων. Ακολουθείτε το ίδιο πρωτόκολλο με τα προσκολλημένα EBs με τη μόνη διαφορά ότι η επώαση με το διάλυμα χρώσης A γίνεται για 1-2 ώρες. Σε κάποια πειράματα απαιτείται ήπιος διαχωρισμός των EBs με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης / EDTA για 1-3 λεπτά και στη συνέχεια τα συσσωματώματα ή τα μονήρη κύτταρα αφέθηκαν να κολλήσουν σε ειδικά γυάλινα ή πλαστικά πολυτρυβλία (Lab Tek, Permanox slides, Nunc) επιστρωμένα με φιμπρονεκτίνη, μια ή δύο ημέρες πριν την διαδικασία του ανοσοφθορισμού.

2.5.4 Ανοσοϊστοχημεία

Οι τομές είτε ολόκληρου εμβρύου είτε καρδιάς τεμαχίζονται στο κρυοτόμο και τοποθετούνται σε πλάκες μικροσκοπίου Super frost Plus. Την ημέρα της μονιμοποίησης, οι τομές τοποθετούνται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε διάλυμα παγωμένης μεθανόλης για 10 λεπτά στους -20°C . Μετέπειτα ακολούθησαν 2-3 πλύσεις για 10 λεπτά με PBS για την απομάκρυνση περίσσειας μεθανόλης και O.C.T. Οι αντικειμενοφόροι απομακρύνονται από το PBS και σκουπίζονται καλά και προσεκτικά με απορροφητικό χαρτί γύρω από την τομή. Χρησιμοποιώντας ειδικό «στυλό», rap-rem, γίνεται ένα περίγραμμα γύρω από την τομή, δημιουργώντας ένα «τείχος» ικανό να συγκρατήσει επάνω στην τομή τα διαλύματα που ακολούθως θα τοποθετηθούν. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα χρώσης A για 10 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια με διάλυμα χρώσης B για επιπλέον 10 λεπτά (βλ. για διαλύματα ανοσοφθορισμός σε Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα). Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το πρωτογενές αντίσωμα. Στη συνέχεια οι τομές εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα χρώσης A ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος και ακολουθεί η προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με PBS και χρώση των πυρήνων με διάλυμα DAPI για 10 λεπτά. Τέλος, οι τομές εκπλένονται 3 φορές με PBS και επικαλύπτονται με τετράγωνες καλυπτρίδες με 1 mg/ml p-φαινυλενεδιαμίνης.

Πίνακας 3. Αντισώματα

Αντίσωμα	Συγκέντρωση	Εταιρία
Oct4 mouse monoclonal	1:40	Santa Cruz Biotechnology
Nanog rabbit	1:250	Abcam
E-Cadherin rat	1:100	Santa Cruz Biotechnology
N- Cadherin mouse	1:100	BD Biosciences
VE-Cadherin rat	1:50	BD Biosciences
VE-Cadherin goat	1:50	Santa Cruz Biotechnology
PECAM-1 rat monoclonal	1:20	Santa Cruz Biotechnology
MECA-32 rat		Developmental Studies Hybridoma Bank, IOWA
Flk1 rabbit	1:100	Cell Signaling Technology
Isl-1 mouse	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, IOWA
Isl-1 goat	1:150	Immune System Ltd
Isl1 rabbit	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Mef2c rabbit	1:400	Cell Signaling Technology
Gata-4 goat	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Nkx2.5 goat	1:50	Santa Cruz Biotechnology
cTnT mouse	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, IOWA
Ds-red	1:500	
GFP rabbit	1:1500	Ευγενική χορηγία από την Δρ Χαραλαμπία Μπολέτη – Ινστιτούτο Pasteur
EGFP goat	1:1200	
SMA mouse	1:2	Novocastra
Lamin B rabbit	1:1500	Ευγενική χορηγία από το εργαστήριο του Καθηγητή Σ.Γεωργιάτου
Lamin A rabbit	1:1500	Ευγενική χορηγία από το εργαστήριο του Καθηγητή Σ.Γεωργιάτου

Nucleoporin mouse	1:500	Abcam
Bry goat	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Flag M2 biotynilated	1:300	SIGMA
SOX17	1:50	Santa Cruz Biotechnology (V-20)
HNF3b	1:50	Santa Cruz Biotechnology (P-19)
Vimentin av2 rabbit	1:30	
Desmin rabbit	1:50	Ευγενική χορηγία από το εργαστήριο του Καθηγητή Σ.Γεωργάτου

2.5.5 Συνεστιακή μικροσκοπία

Τα δείγματα εξετάσθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP1 και Leica SP5 TCSII ενώ οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με χρήση των λογισμικών Fiji (NIH Image), LAS AF Lite (Leica) ή Adobe Photoshop (Adobe) Software.

2.5.6 Μελέτη της ενεργότητας του υποκινητή της VE-Cadherin στις σταθερές κυτταρικές σειρές pRvec-EGFP μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS).

Πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη EGFP κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Πραγματοποιείται συλλογή των EBs, αφαιρείται το θρεπτικό διαφοροποίησης, ακολουθούν εκπλύσεις με PBS και προστίθεται διάλυμα τρυψίνης / EDTA για 1-3 λεπτά ώστε να διασπασθούν τα EBs και τα κύτταρα να είναι μονήρη. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή Partec - CyFlow M. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό FCS Express 4 Flow, Research Edition.

2.6 Πειραματόζωα

2.6.1 Εμφύτευση κυττάρων στο μυοκάρδιο πειραματόζωων (επίμυες)

Η πραγματοποίηση των πειραμάτων με επίμυες έγινε στο Πειραματικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με τον Καθηγητή, Θεόφιλο Κωλέττη. Αρχικά, 24 ώρες πριν την μεταμόσχευση τα ζώα ζυγίζονται και αναισθητοποιούνται. Η αναισθητοποίηση γίνεται με χρήση ισοφλουράνης, σε μορφή ατμού μέσω μιας μάσκας που τοποθετείται πάνω από τη μύτη και το στόμα του πειραματόζωου πριν από την έναρξη της διαδικασίας. Ακολουθεί ανοσοκαταστολή με χρήση κυκλοσπορίνης (Neoral) 10 mg/kg/ημέρα μέσω οισοφάγου. Με το πέρας των 24 ωρών, τα πειραματόζωα αναισθητοποιούνται ξανά με ενδοτράχηλο σωλήνα εισαγωγής ισοφλουράνης και μηχανικού εξαερισμού. Πραγματοποιείται θωρακοτομή για πρόσβαση στα θωρακικά όργανα (πνεύμονες, καρδιά). Στις χειρουργικές τομές χρησιμοποιήθηκε ένας "διαστολέας πλευρών", προκειμένου να είναι ορατή η καρδιά. Έπειτα, απομακρύνεται ο ινώδης σάκος (περικάρδιο) που περιβάλλει την καρδιά. Με χρήση ράμματος κορυφής η καρδιά εξωθείται προκειμένου να γίνει η εμφύτευση των κυττάρων στην αριστερή κοιλία. Τα κύτταρα ενσωματώνονται σε διάλυμα 1,1% αλγινικού οξέως (Sigma) *in vitro*, ενώ έπειτα από την ενδο-μυοκαρδιακή τους εμφύτευση *in vivo*, πραγματοποιείται σύνδεση με Ca^{2+} και μετατρέποντας το σε παχύρευστο ικρίωμα, σύμφωνα με τους Rowley et al., 1999. Τα κύτταρα παραμένουν στο μυοκάρδιο και δεν διαφεύγουν στην συστηματική κυκλοφορία. Τέλος, η καρδιά επανέρχεται στη θέση της και η τομή συρράφεται, τα πειραματόζωα φυλάσσονται για χρονικά διαστήματα έως 14 μέρες. Μετά το πέρας της επέμβασης και σε όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ζώα ζυγίζονται κάθε τρεις μέρες, ανοσοκατεστρέλονται και τους χορηγείται ενδομυϊκά, καθημερινά αντιβιοτικό (Ciproflaxin ή ciprovan). Το πειραματικό μοντέλο πρόκλησης εμφράγματος σε επίμυες πραγματοποιήθηκε με μόνιμη απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας (171).

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 45 επίμυες τύπου Wistar βάρους 200- 300 gr (περίπου 2 μηνών) οι οποίοι διαχωρίστηκαν στις εξής ομάδες:

- (Α) Ομάδα εμφύτευσης των ενσωματωμένων CEDPs στο αλγινικό οξύ σε φυσιολογικές καρδιές ανοσοκατεσταλμένων επιμυών (n=23)
- (Β) Ομάδα εμφύτευσης PBS σε φυσιολογικές καρδιές ανοσοκατεσταλμένων επιμυών (ομάδα ελέγχου) (n=7)

(C) Ομάδα εμφύτευσης των ενσωματωμένων CEDPs στο αλγινικό οξύ σε εμφραγματικές καρδιές ανοσοκατεσταλμένων επιμυών (n=15) εκ των οποίων λόγω του εμφράγματος και τεχνικών δυσκολιών επέζησαν τέσσερεις (n=4) επίμυες.



Εικόνα 20. Εμφύτευση του ικριώματος στην αριστερή κοιλία του μυοκαρδίου ανοσοκατεσταλμένου επίμου.

2.6.2 Απομόνωση /αφαίρεση καρδιάς από επίμυες.

Τα ζώα αναισθητοποιούνται με χρήση ισοφλουράνης και θυσιάζονται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα με αυχενική εξάρθρωση σύμφωνα με σχετικά εγκεκριμένα πρωτόκολλα ευθανασίας. Τα ζώα ακινητοποιούνται και ακολουθεί η απομόνωση της καρδιάς. Γίνεται τομή, στο επίπεδο της κοιλιακής χώρας, γίνεται διάρρηξη του διαφράγματος και κόβονται προσεκτικά κάποιες πλευρές για να αποκαλυφθεί η καρδιά. Όσο η καρδιά συνεχίζει να πάλλεται, χορηγούμε αποστειρωμένο διάλυμα PBS με σύριγγα ινσουλίνης στην δεξιά κοιλία προκειμένου να καθαριστεί ο ιστός από το κυκλοφορούν αίμα. Στη συνέχεια, αφαιρείται προσεκτικά η καρδιά αφού κοπούν τα μεγάλα αγγεία που τη συγκρατούν. Ο ιστός μεταφέρεται άμεσα σε τρυβλίο το οποίο βρίσκεται πάνω σε πάγο και φέρει αποστειρωμένο PBS. Στη συνέχεια με χρήση πεταλούδας και σύριγγα των 5ml χορηγούμε 3 φορές PBS από την κεντρική αορτή πιέζοντας την καρδιά ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατόν καλύτερα από το αίμα και να απομακρυνθούν πιθανοί θρόμβοι. Αφαιρούνται προσεκτικά υπολείμματα αγγείων και λιπώδους ιστού εάν υπάρχουν. Ο ιστός παγώνεται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύεται στους -80°C . Τέλος ακολουθεί σκλήνωση του ιστού σε κρυοπροστατευτικό μέσο ή απομόνωση RNA.

2.6.3 Προετοιμασίας δειγμάτων για τομές

Προκειμένου να γίνει η σκλήνωση των ιστών (καρδιές) που φυλάσσονται σε συνθήκες κατάψυξης -80°C , αρχικά ξεπαγώνουν. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, προκειμένου να απομακρυνθεί όσο πιθανόν αίμα έχει απομείνει. Έπειτα, ακολουθεί η μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη (3,7%) για μιάμιση ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν πλύσεις με PBS και προστίθεται διάλυμα σουκρόζης 30% για 16 ώρες στους 4°C , ώστε να επιτευχθεί αφυδάτωση του ιστού. Την επομένη, ακολουθεί η σκλήνωση με O.C.T. (κρυοπροστατευτικό μέσο) και το δείγμα τοποθετείται για 10 min στους -80°C . Με την διαδικασία αυτήν επιφέρεται η εμπότιση του ιστού με O.C.T. που εισχωρεί σε όλα τα μεσοκυττάρια διαστήματα και στα κύτταρα καθιστώντας τους ιστούς δύσκαμπτους και ανθεκτικούς, γεγονός απαραίτητο για τη διαδικασία τεμαχισμού σε κρυοτόμο. Ακολουθεί τεμαχισμός των καρδιών σε κρυοτόμο, ο οποίος αποτελείται από έναν μικροτόμο που διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία (περίπου -20°C) μέσω κατάλληλου συστήματος ψύξης και επιτρέπει τη δημιουργία τομών πάχους 7-20 microns. Οι τομές πραγματοποιήθηκαν σε μέγεθος 10 microns.

2.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 Software. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως το μέσο όρο $\pm$ τη μέση διακύμανση (mean $\pm$ SD). Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς των δειγμάτων καθορίστηκε από one-way ANOVA ακολουθούμενη από Tukey's Δοκιμασία για πολλαπλές συγκρίσεις για τα πειράματα των εικόνων 26E, 38B, 31C, 33C 38D και 40C. Τα αποτελέσματα από τις εικόνες 33A και 38F υπολογίστηκαν με επαναλαμβανόμενες-μετρήσεις two-way ANOVA, ακολουθούμενη από Bonferroni post-hoc ανάλυση για πολλαπλές συγκρίσεις. Η τιμή Pvalue <0.05 θεωρήθηκε στατιστικώς σημαντική.

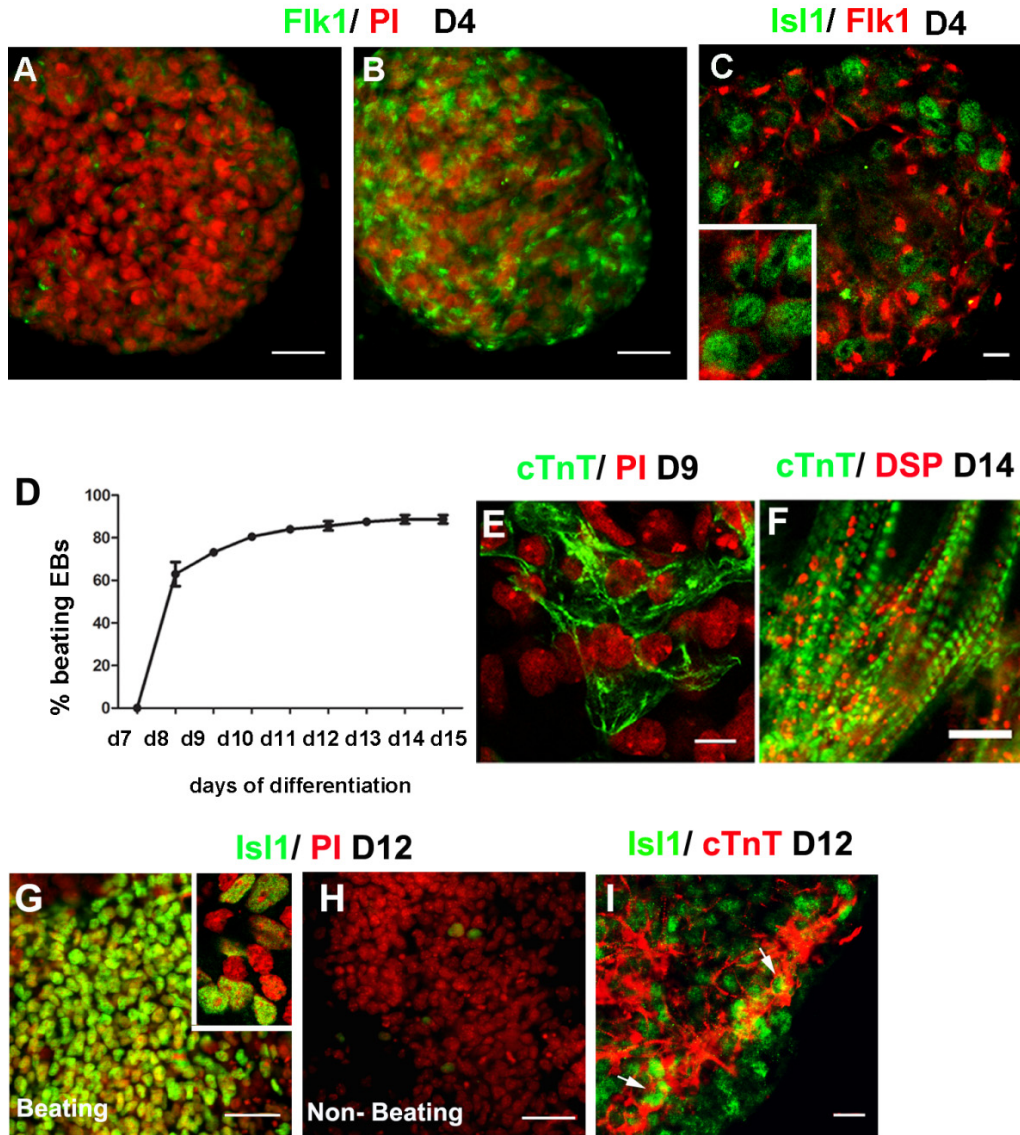
3 Αποτελέσματα

3.1 Διαφοροποίηση ESCs προς κύτταρα του καρδιαγγειακού συστήματος *in vitro*

Το ενδοθήλιο, εκτός από το ρόλο που έχει για τη δομική ακεραιότητα των αιμοφόρων αγγείων, κατέχει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των ιστών στον ενήλικα καθώς και στη δημιουργία άλλων ιστών κατά την εμβρυογένεση (172). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων με τα καρδιομυοκύτταρα είναι απαραίτητες για την επιβίωση, την ανάπτυξη καθώς και για τη διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων (173). Ωστόσο, οι λειτουργικές αυτές αλληλεπιδράσεις κατά την πρόιμη εξειδίκευση των καρδιομυοκυττάρων δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Για να προσδιορισθούν οι αλληλεπιδράσεις ενδοθηλιακών και καρδιακών προγονικών κυττάρων στην εμβρυογένεση χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο η *in vitro* διαφοροποίηση ESCs μέσω σχηματισμού εμβρυοειδών σωματιδίων (EBs). Η διαφοροποίηση πραγματοποιήθηκε είτε με τη μέθοδο κρεμάμενης σταγόνας (Hanging drop method) είτε σε ημιστερέο θρεπτικό μέσο μεθυλο-σελλουλόζης (methylcellulose medium), παρουσία αυξητικών παραγόντων που προάγουν το σχηματισμό του ενδοθηλίου. Αρχικά ελέγχθηκε η έκφραση του Flk-1, ο οποίος εκφράζεται στα προγονικά μεσοδερμικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι υπό την παρουσία αυξητικών παραγόντων που προάγουν το σχηματισμό του ενδοθηλίου ο αριθμός των Flk-1+ κυττάρων, παρουσιάζεται αυξημένος την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης σε σχέση με τη διαφοροποίηση χωρίς αυξητικούς παράγοντες (Εικόνες 20A , 20B).

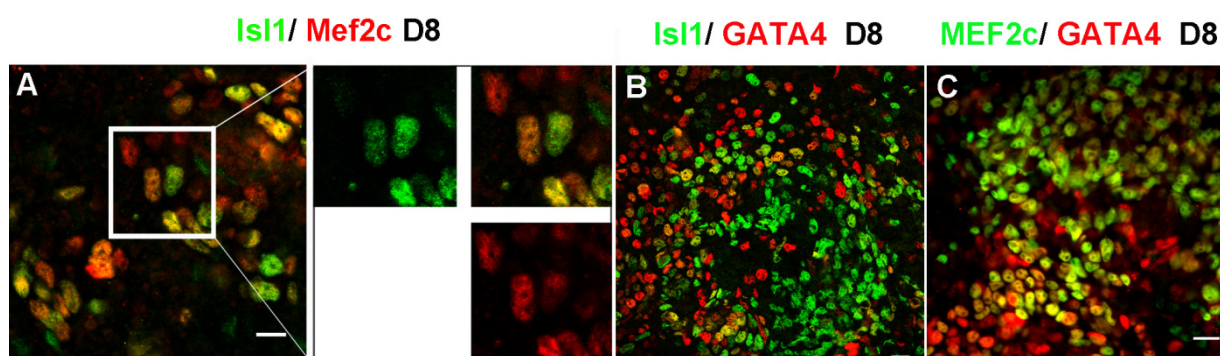
Στη συνέχεια, μελετήθηκε αν η διαφοροποίηση προς καρδιακούς τύπους κυττάρων είναι εξίσου αποδοτική υπό αυτές τις συνθήκες. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με καρδιακούς δείκτες που εκφράζονται σε διαφορετικά σημεία της εμβρυογένεσης με ανοσοφθορισμό. Ο μεταγραφικός παράγοντας Isl1 έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης των πλειοδύναμων προγονικών κυττάρων του δευτερογενούς καρδιακού πεδίου και ο Flk1+/Isl1+ κυτταρικός πληθυσμός χαρακτηρίζεται ως καρδιαγγειακός πλειοδύναμος προγονικός κυτταρικός πληθυσμός. Στην έναρξη της καρδιογένεσης, η οποία συμβαίνει κατά την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης, ο Isl1 ανιχνεύθηκε να συν-εκφράζεται με τον Flk1 σε μεγάλο βαθμό (Εικόνα 20C) . Στη συνέχεια μετρήθηκε το ποσοστό των «παλλόμενων» EBs (γεγονός το οποίο δηλώνει παρουσία ώριμων καρδιομυοκυττάρων) κατά τις ημέρες διαφοροποίησης εφτά έως δεκαπέντε (174). Παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των EBs (~ 90%) εμφανίζουν μεγάλες περιοχές από καρδιομυοκύτταρα που συσπώνται (Εικόνα 20D). Παράλληλα παρατηρήθηκαν συστάδες κυττάρων που εκφράζουν την καρδιακή τροπονίνη T

(cTnT) στο μεγαλύτερο ποσοστό των EBs την ένατη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 20Ε). Η cTnT βρίσκεται στα σαρκομερή και είναι απαραίτητη για τη σύσπαση της καρδιάς. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι τα «παλλόμενα» καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν τη δεσμοσωμική πρωτεΐνη δεσμοπλακίνη (desmoplakin, DSP) τη δέκατη τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης, γεγονός που υποδηλώνει τον σχηματισμό της δομής εμβόλιμου δίσκου (Εικόνα 20F). Στη συνέχεια έγινε ανοσοφθορισμός σε «παλλόμενα» και μη EBs, ο οποίος κατέδειξε ότι ως επί το πλείστον, μόνο τα «παλλόμενα» EBs περιέχουν μεγάλο αριθμό Isl1+ κυττάρων την δωδέκατη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνες 20G, 20H). Επιπρόσθετα αυτά φαίνεται να γειτνιάζουν με cTnT+ κύτταρα και σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει συν-έκφραση των δύο (Εικόνα 20I). Η συν-έκφραση των δύο δεικτών έχει χαρακτηριστεί ως σπάνια και παροδική και έχει ανιχνευθεί στο σημείο της κοιλιακής εκροής (ventricular outflow tract) (175).



Εικόνα 20. Έλεγχος της διαφοροποίησης προς καρδιακούς τύπους κυττάρων. (A-B) Whole mount ανοσοφθορισμός σε EBs την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης έναντι της πρωτεΐνης Flk-1 απουσία (ορός μόνο) (A) ή παρουσία (B) αυξητικών παραγόντων. (C) Συν-έκφραση του μεταγραφικού δείκτη Isl1 με Flk1+ κύτταρα την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης. (D) Στατιστική ανάλυση των «παλλόμενων» EBs κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης τις ημέρες 7-15. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν τον μέσο όρο $\pm$ τη μέση διακύμανση ($\text{mean} \pm \text{SD}$) ($n > 3$). (E) Έκφραση της cTnT την ένατη ημέρα διαφοροποίησης σε EBs. Οι πυρήνες απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα ύστερα από χρώση με ιωδιούχο προπύδιο (PI). (F) Έμμεσος ανοσοφθορισμός «παλλόμενων» EBs τη δέκατη ημέρα διαφοροποίησης έναντι των πρωτεϊνών cTnT και δεσμοπλακίνη (desmoplakin, DSP). (G-H) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον μεταγραφικό παράγοντα Isl1 σε «παλλόμενα» (G) και μη (H) EBs την δωδέκατη ημέρα διαφοροποίησης. Isl1+ κύτταρα παρατηρούνται μόνο στα EBs που συσπώνται. (I) Τα Isl1+ κύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή με τα cTnT+ κύτταρα, ενώ σε μερικά κύτταρα παρατηρείται συν-έκφραση των δύο (βέλος). Μπάρες: (A-B, G-H) 40 μm , (C,E-F) 10 μm , (I) 20 μm . Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από $n > 4$ πειράματα διαφοροποίησης.

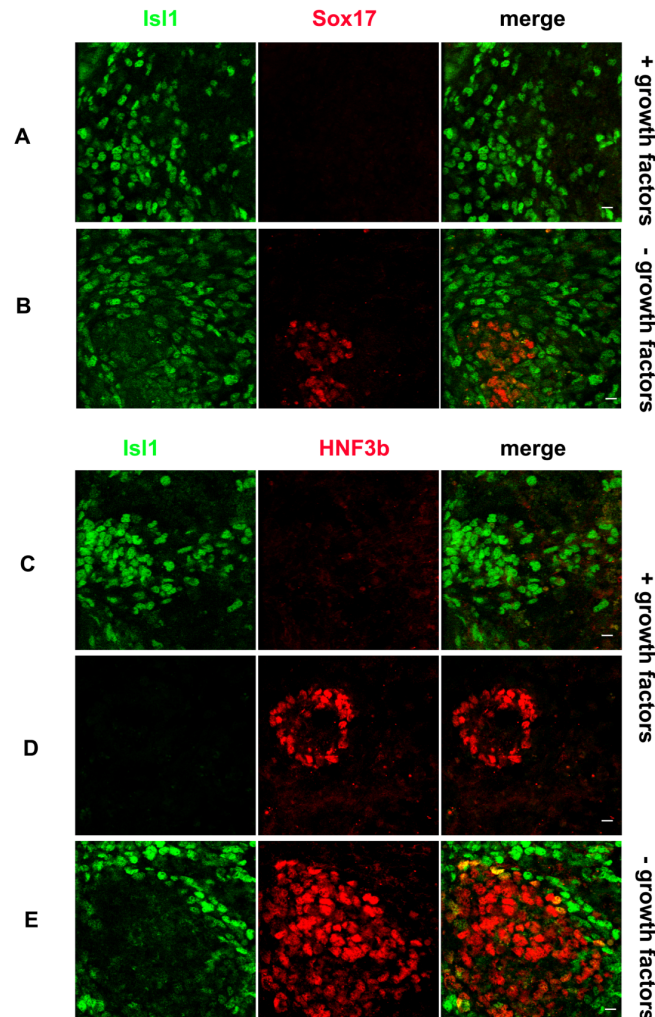
Στη συνέχεια, εξετάσθηκε η έκφραση καρδιακών δεικτών σε προηγούμενα στάδια της διαφοροποίησης. Αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Mef2c, ο οποίος έχει βασικό ρόλο στο σχηματισμό του εμπρόσθιου καρδιακού πεδίου (AHF) και ρυθμίζεται απευθείας από τον μεταγραφικό παράγοντα Isl1 (48). Πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες έδειξαν έκφραση του Mef2c την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης και μερική συν-έκφραση του με τον Isl1 (Εικόνα 21A). Ο Mef2c+/ Isl1+ πληθυσμός χαρακτηρίζει τον καρδιακό προγονικό πληθυσμό που προέρχεται από το δευτερογενές καρδιακό πεδίο (SHF) και έχει χαρακτηριστεί ως εμπρόσθιο καρδιακό πεδίο (176). Ορισμένα από τα Isl1+/Mef2c+ κύτταρα παρουσιάζουν υψηλή έκφραση του ενός και χαμηλή έκφραση του άλλου και αντίστροφα. Επίσης μελετήθηκε ο κυτταρικός πληθυσμός που εκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα GATA4. Ο GATA4, ο οποίος εκφράζεται και στα δύο καρδιακά πεδία, είναι βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη της καρδιάς και απαραίτητος για την σωστή ανάπτυξη του εμβρύου. Παρατηρήθηκε άμεση γειτνίαση του GATA4+ με τους Isl1+ και Mef2c+ πληθυσμούς καθώς και μερική συν-έκφραση και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνες 21B, 21C).



Εικόνα 21. Χαρακτηρισμός της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Isl1, Mef2c και GATA4 την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης (A-C) Συν-έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Isl1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Mef2c (A) (Στις μικρές εικόνες απεικονίζεται η μεγέθυνση της συν-έκφρασης των δύο παραγόντων) και GATA4 (B) την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης. (C) Συν-έκφραση του GATA4 με τον Mef2c την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης. Μπάρες: 20μm. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από n>4 πειράματα διαφοροποίησης.

Σε πειράματα ελέγχου, μελετήθηκε η διαφοροποίηση των ESCs προς το ενδόδερμα υπό τις ίδιες συνθήκες διαφοροποίησης. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού την ένατη ημέρα διαφοροποίησης έναντι των μεταγραφικών παραγόντων SOX17 και HNF3b οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη δημιουργία και τη διατήρηση του οριστικού ενδοδέρματος (definitive endoderm). Παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση των δύο δεικτών υπό τους αυξητικούς παράγοντες σε σχέση με τη διαφοροποίηση χωρίς αυξητικούς παράγοντες. Το

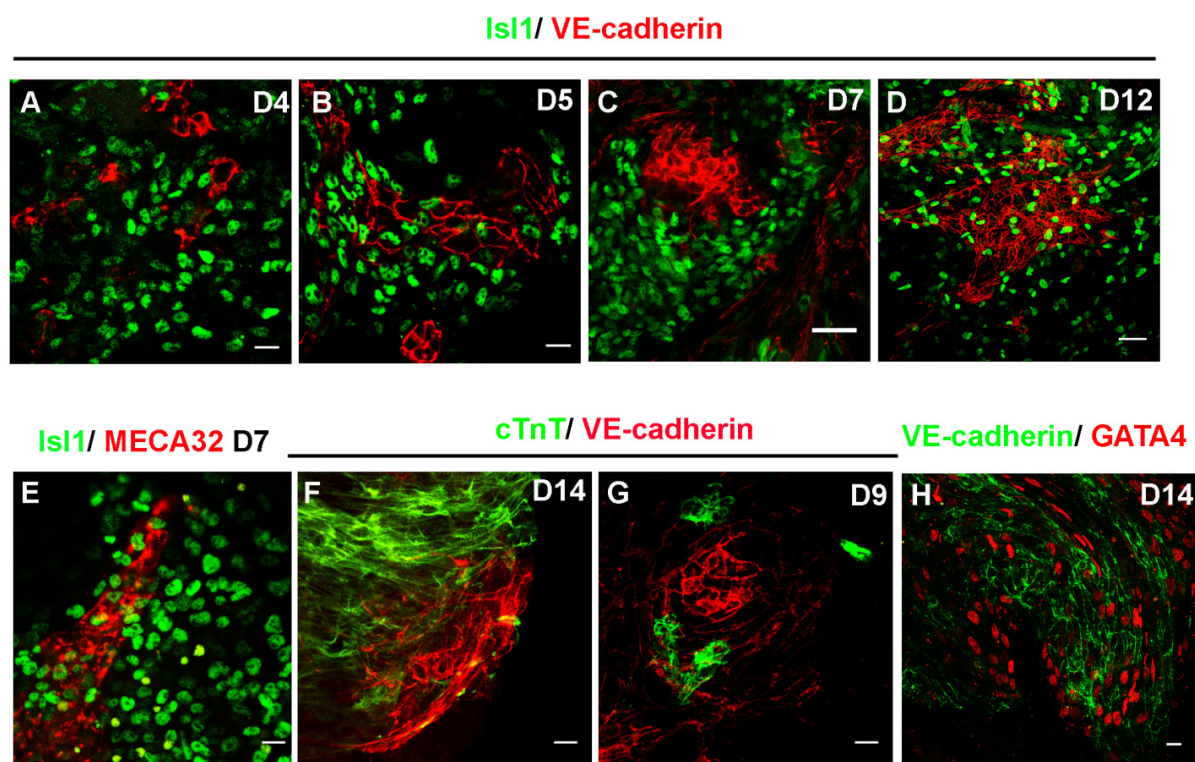
γεγονός αυτό υποδηλώνει, ότι η παρουσία αυξητικών παραγόντων που προάγουν το σχηματισμό ενδοθηλίου ευνοεί παράλληλα την καρδιακή διαφοροποίηση, ενώ μειώνει τη διαφοροποίηση προς ενδόδερμα.



Εικόνα 22. Η διαφοροποίηση προς ενδόδερμα αναστέλλεται παρουσία αυξητικών παραγόντων οι οποίοι προάγουν το σχηματισμό μεσοδέρματος. (Α-Β) Έμμεσος ανοσοφθορισμός των EBs την ένατη ημέρα διαφοροποίησης έναντι των μεταγραφικών παραγόντων SOX17 και Isl1 Α) παρουσία ή Β) απουσία αυξητικών παραγόντων (μόνο ορός). (C-E) Έμμεσος ανοσοφθορισμός των EBs την ένατη ημέρα διαφοροποίησης έναντι των μεταγραφικών παραγόντων HNF3b και Isl1 Α) υπό την παρουσία ή Β) απουσία αυξητικών παραγόντων (μόνο ορός). Στην εικόνα (C) και (D) παρουσιάζονται δύο τυπικές περιοχές EBs που διαφοροποιούνται παρουσία αυξητικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από δύο διαφορετικά πειράματα διαφοροποίησης και μετρήθηκαν πάνω από 50 EBs. Μπάρες (Α-Ε) 10μm.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η σχέση του ενδοθηλίου με τα καρδιακά κύτταρα χωροχρονικά χρησιμοποιώντας ιστοειδικούς δείκτες σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Για τον έλεγχο του ενδοθηλίου χρησιμοποιήθηκε η VE-cadherin, η οποία

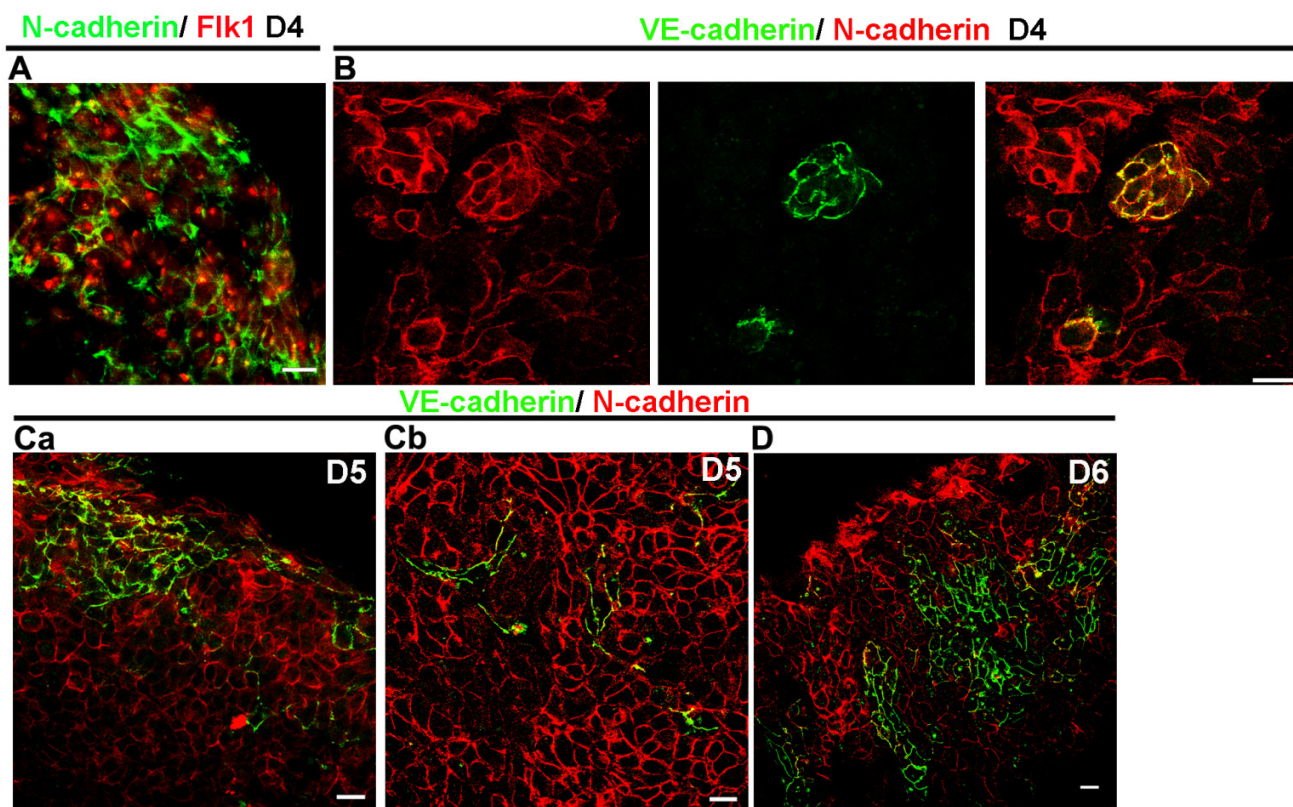
χαρακτηρίζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τη εμφάνισή τους και μετά και η γλυκοπρωτεΐνη MECA32, η οποία εκφράζεται αργότερα. Παρατηρήθηκε, ότι τα Isl1+ κύτταρα βρίσκονται σε στενή γειτνίαση με τα VE-cadherin+ κύτταρα κατά τις ημέρες διαφοροποίησης τέσσερα, πέντε, επτά και δώδεκα (Εικόνες 23Α- 23D). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τον MECA32 την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 23Ε). Σε επόμενα στάδια (ένατη και τη δωδέκατη ημέρα της διαφοροποίησης) τα καρδιομυοκύτταρα βρίσκονται δίπλα στο ενδοθήλιο στην πλειοψηφία των EBs που αναλύθηκαν (n>500) σύμφωνα με την έκφραση των cTnT και VE-cadherin (Εικόνες 23F, 23G). Σε συμφωνία, παρατηρήθηκε στενή γειτνίαση μεταξύ του GATA4+ με τον VE-cadherin+ πληθυσμό την δέκατη τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 23Η). Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι δύο κυτταρικοί τύποι βρίσκονται σε στενή γειτνίαση από τη δημιουργία τους και κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της διαφοροποίησης τους.



Εικόνα 23. Κατά τη διαφοροποίησης σε EBs, υπό τις ίδιες συνθήκες, παρατηρείται γειτνίαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα καρδιακά κύτταρα. Το ενδοθήλιο το οποίο χαρακτηρίζεται από την έκφραση της VE-cadherin βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση με τα καρδιακά προγονικά κύτταρα που εκφράζουν Isl1 κατά τις ημέρες διαφοροποίησης τέσσερα (Α), πέντε (Β), επτά (C) και δώδεκα (D) καθώς και με καρδιομυοκύτταρα που εκφράζουν cTnT κατά την ένατη (G) και δέκατη τέταρτη (F) ημέρα διαφοροποίησης μετά από πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού. (Ε) Έμμεσος ανοσοφθορισμός έναντι των πρωτεϊνών MECA32 και Isl1. (Η) Έμμεσος ανοσοφθορισμός έναντι των πρωτεϊνών GATA4 και VE-cadherin τη δέκατη τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης. Μπάρες (Α-Η) 20μm.

3.2 Το είδος των συνδέσμων προσκόλλησης (Adherens Junctions) μεταξύ των προγονικών ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων

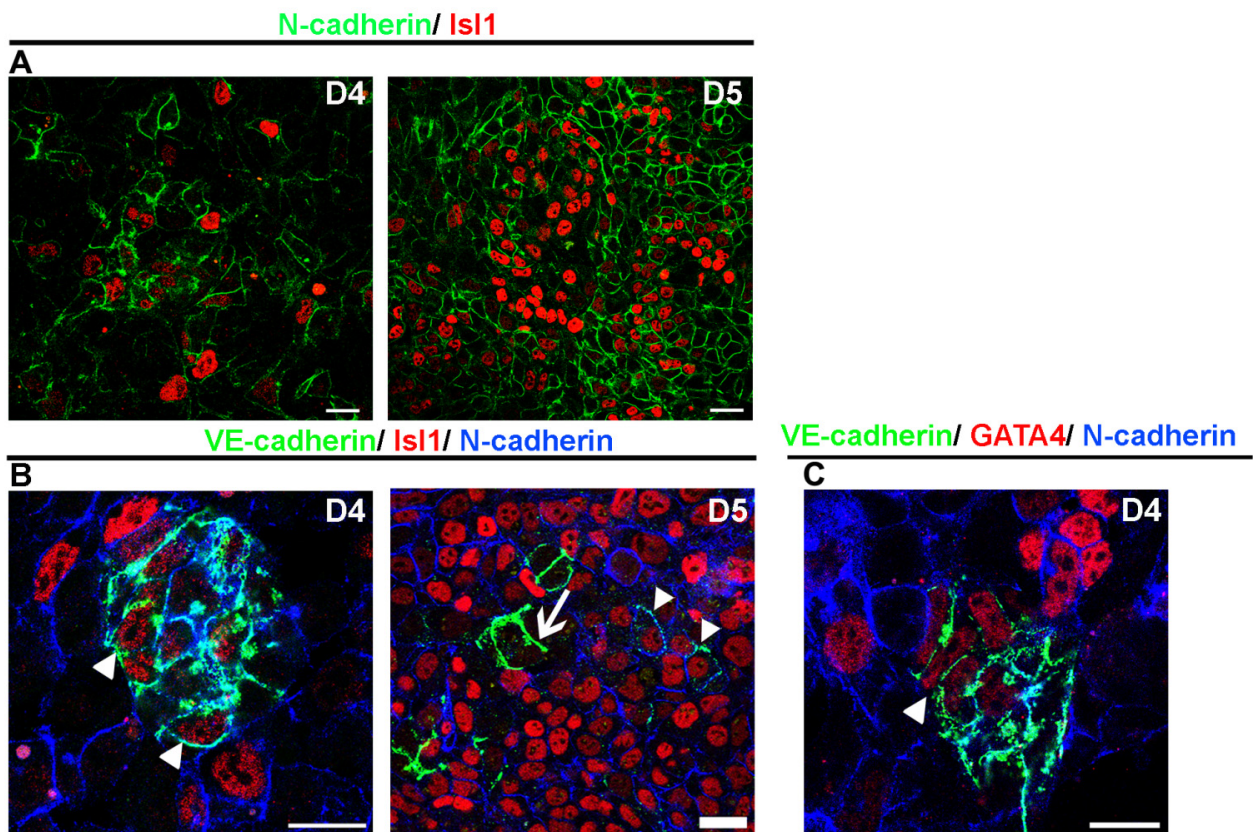
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν μεσοδερμική προέλευση και χαρακτηρίζονται από την έκφραση της VE-cadherin, η οποία αποτελεί το βασικό μόριο για τη δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης. Η μετάβαση από το επιθήλιο σε μεσέγγχυμα είναι κεντρικής σημασίας διαδικασία για τη δημιουργία του μεσοδέρματος, κατά την οποία οι σύνδεσμοι προσκόλλησης αλλάζουν το πρότυπο έκφρασης από E-cadherin σε N-cadherin και αργότερα σε VE-cadherin σε καθορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (Cadherin switch). Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν η VE-cadherin συν-εκφράζεται με την N-cadherin ή πραγματοποιείται αλλαγή έκφρασης από N-cadherin σε VE-cadherin. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε το πρότυπο έκφρασης της N- και VE-cadherin κατά τα πρώιμα στάδια δημιουργίας των μεσοδερμικών κυτταρικών πληθυσμών. Αρχικά, την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης τα Flk1+ κύτταρα εκφράζουν N-cadherin (Εικόνα 24A). Την ίδια χρονική στιγμή παρατηρήθηκε συν-έκφραση των δύο μορίων κατά την οποία ανιχνεύονται τα πρώτα VE-cadherin+ κύτταρα (Εικόνα 24B). Κατά την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης, ενώ ο VE-cadherin+ πληθυσμός αυξάνεται (Εικόνα 24Ca), παρατηρούνται ελάχιστα κύτταρα που συν-εκφράζουν τα δύο μόρια (Εικόνα 24Cb), ενώ την έκτη ημέρα οι δύο πληθυσμοί έχουν διαχωριστεί (Εικόνα 24D).



Εικόνα 24. (A-D) Οι σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά την πρώιμη διαφοροποίηση των μεσοδερμικών πληθυσμών. (A) Δημιουργία N-cadherin συνδέσμων προσκόλλησης μεταξύ των Flk1+ κυττάρων την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης σε EBs. (B-D) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε EBs έναντι των πρωτεϊνών VE-cadherin και N-cadherin τις ημέρες διαφοροποίησης 4 (B), 5 (C) και 6 (D). Παρατηρήθηκε συν-έκφραση των δύο πρωτεϊνών σε μικρές συστάδες κυττάρων την τέταρτη (B) αλλά και την πέμπτη (Ca και Cb) ημέρα (κίτρινο χρώμα). Στις εικόνες B, Cb και D τα EBs έχουν υποστεί τρυψινοποίηση και τα κύτταρα αναπτύσσονται σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με φιμπρονεκτίνη. Μπάρες 20μm

Κατόπιν μελετήθηκαν οι σύνδεσμοι προσκόλλησης στα Isl1+ κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι κατά την εμφάνιση των Isl1+ κυττάρων, την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης, αυτά εκφράζουν N-cadherin. Το ίδιο ισχύει επίσης και κατά την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 25A). Επειδή οι διακυτταρικές συνδέσεις VE-cadherin ανιχνεύονται ήδη από τη τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης εξετάστηκε εάν η VE-cadherin συμμετέχει στους συνδέσμους προσκόλλησης μεταξύ των προγονικών Isl1+ κυττάρων μαζί με την N-cadherin. Πειράματα τριπλού ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι διακυτταρικές συνδέσεις σχηματίζονται από τους δύο τύπους cadherins σε έναν υποπληθυσμό των Isl1+ κυττάρων την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης. Αυτό το φαινόμενο είναι παροδικό γεγονός γιατί την πέμπτη ημέρα η συν-έκφραση παρατηρείται σε μικρό αριθμό κυττάρων, ενώ την έκτη ημέρα απουσιάζει (Εικόνα 25B). Ανάλυση σε μετέπειτα ημέρες δεν επετεύχθη λόγω τεχνικών δυσκολιών.

Άρα, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι σε ένα χρονικά περιορισμένο αναπτυξιακό στάδιο (περίπου 24 ώρες) ένας υποπληθυσμός των Isl1+ κυττάρων εκφράζει VE-cadherin. Περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τη συμμετοχή της VE-cadherin στους διακυτταρικούς συνδέσμους προσκόλλησης του GATA4+ κυτταρικού πληθυσμού. Παρόμοια με τον Isl1+ πληθυσμό ένας υποπληθυσμός των GATA4+ κυττάρων σχηματίζει διακυτταρικές συνδέσεις αποτελούμενες και από τους δύο τύπους cadherins, την N- και VE-cadherin κατά την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 25C).

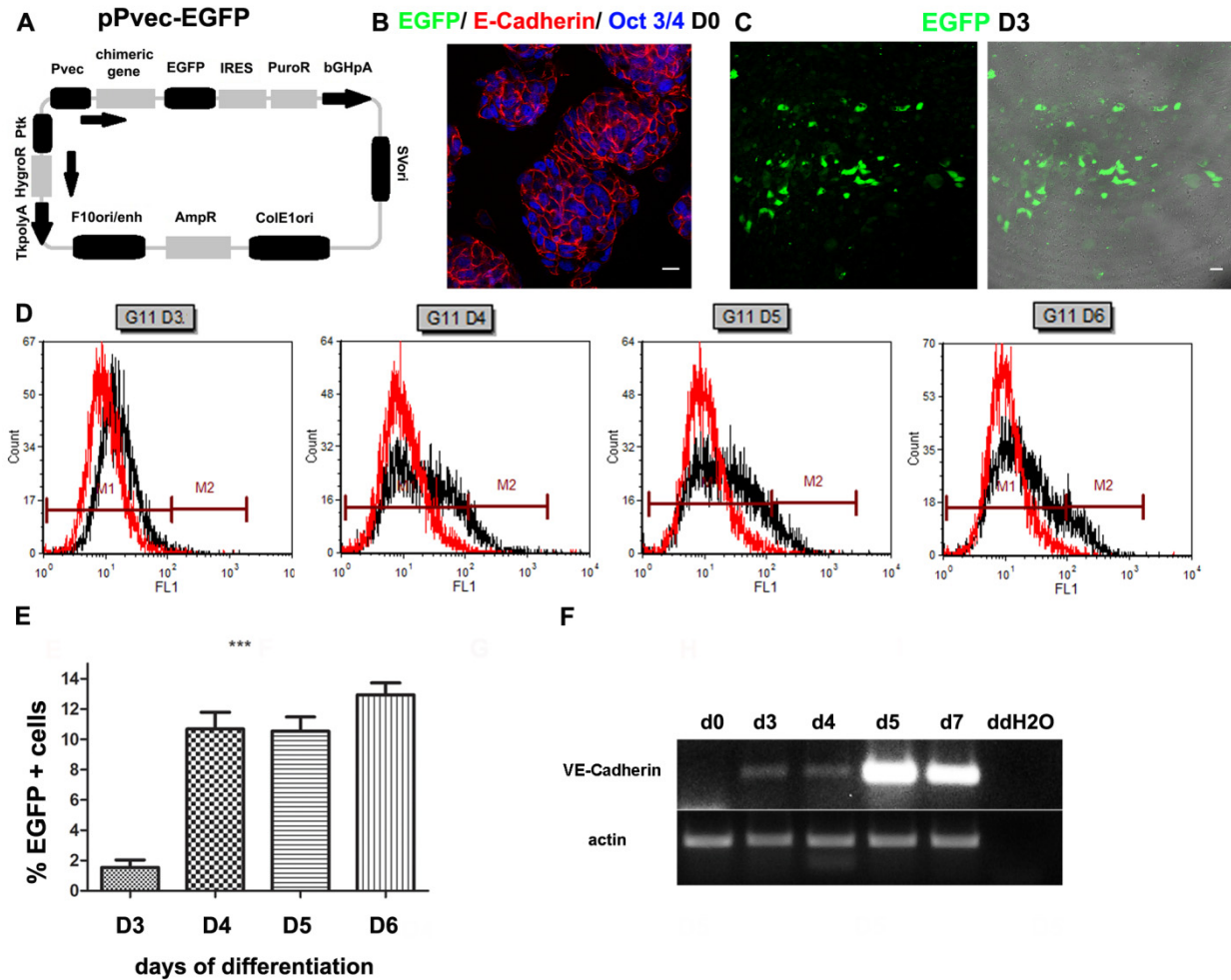


Εικόνα 25. Οι διακυτταρικές συνδέσεις μεταξύ Isl1+ και GATA4+ κυττάρων σχηματίζονται από N- και VE-cadherin. (A-C) Τα EBs έχουν υποστεί τρυψινοποίηση και τα κύτταρα αναπτύσσονται σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με φιμπρονεκτίνη. (A) Η πλειοψηφία των Isl1+ κυττάρων σχηματίζουν N-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης την τέταρτη και την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης. (B) Μικρές συστάδες Isl1+ κυττάρων σχηματίζουν επιπρόσθετα με την N-cadherin και VE-cadherin διακυτταρικές συνδέσεις (V) την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης σύμφωνα με τριπλό ανοσοφθορισμό ενώ κατά την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης η έκφραση της VE-cadherin παρατηρείται σε ελάχιστα Isl1+ κύτταρα (V). Τα κύτταρα που εμφανίζουν υψηλή έκφραση VE-cadherin δεν εκφράζουν Isl1(↑). (C) Μικρές συστάδες GATA4+ κυττάρων σχηματίζουν επιπρόσθετα με την N-cadherin και VE-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης σύμφωνα με τριπλό ανοσοφθορισμό (V). Μπάρες 20μm. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από τέσσερα διαφορετικά πειράματα διαφοροποίησης.

3.3 Ο υποκινητής της VE-cadherin ενεργοποιείται σε έναν υποπληθυσμό των Isl1 καρδιακών προγονικών κύτταρων.

Τα Isl1+/ VE-cadherin+ κύτταρα αντιπροσωπεύουν ένα μικρό υποπληθυσμό των Isl1+ κυττάρων. Παρόλα ταύτα, κύτταρα με χαμηλή έκφραση της VE-cadherin (κυρίως κυτταροπλασματική) είναι δύσκολο να ανιχνευθούν με τεχνικές ανοσοφθορισμού. Για να μελετήσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε την έκφραση της VE-Cadherin στα Isl1+ κύτταρα με ευαισθησία, δημιουργήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pPvec-EGFP, η οποία βασίζεται στον επισωματικό φορέα pPYCAGIP και εκφράζει την φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP, υπό τον έλεγχο του ιστοειδικού υποκινητή (2.5kb) της VE-Cadherin (-2486+24) (Pvec) κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (Εικόνα 26A). Δημιουργήθηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές γενετικά τροποποιημένων ESCs, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως προς την πολυδυναμία. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν δύο κλώνοι (G11 και G8) για περαιτέρω ανάλυση σε πειράματα διαφοροποίησης.

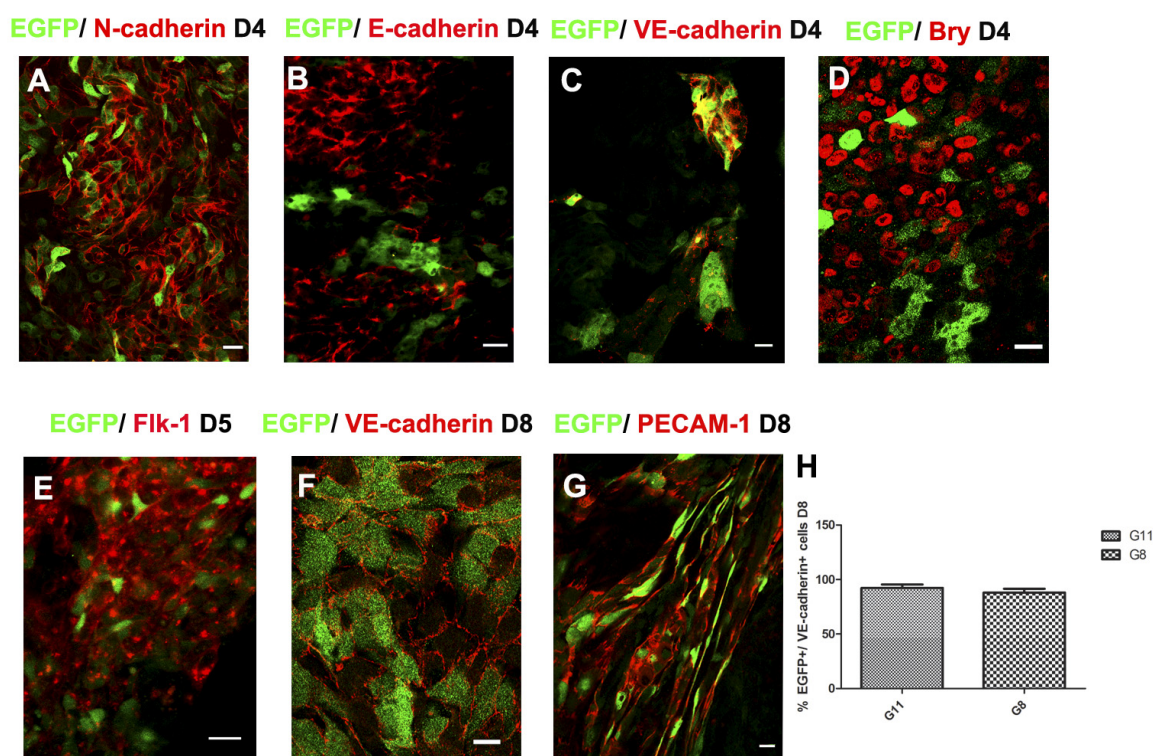
Αρχικά, ελέγχθηκε η ενεργότητα του Pvec στους αδιαφοροποίητους κλώνους μέσω ανοσοφθορισμού και παρατηρήθηκε ότι αυτοί δεν εμφανίζουν έκφραση EGFP όπως αναμενόταν (Εικόνα 26B). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής (FACS) για να ελεγχθεί η ενεργότητα του Pvec κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι η ενεργότητα του Pvec ξεκινά την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης στο 1% των κυττάρων ενώ κατά τις ημέρες 4,5 και 6 αυξάνεται περίπου στο 10% (Εικόνες 26C, 26D). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με ημι-ποσοτικά πειράματα rt-pcr που πραγματοποιήθηκαν για τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς VE-cadherin, η οποία ανιχνεύεται κατά την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης και αυξάνεται τις ημέρες πέντε με εφτά (Εικόνα 26E).



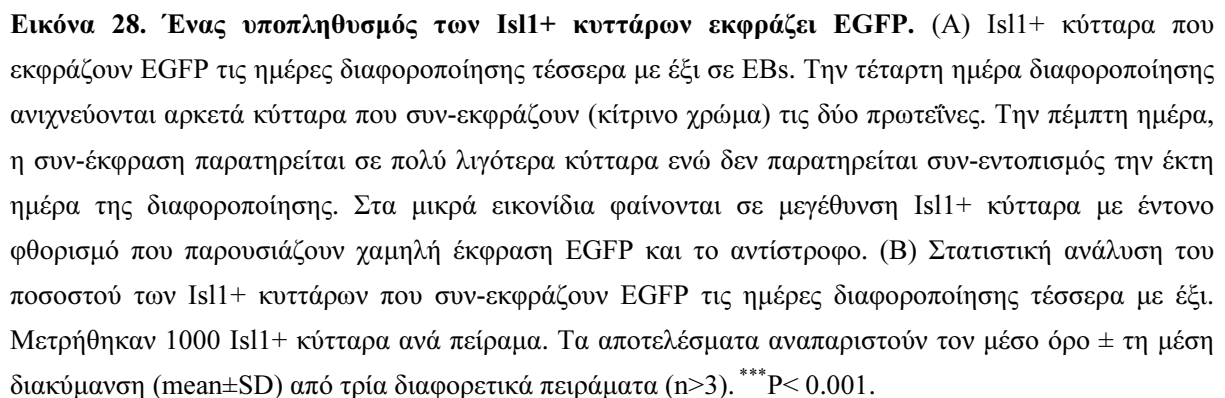
Εικόνα 26. Η ενεργότητα του υποκινητή της VE-cadherin κατά τη διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων μυός. (Α) Σχηματική αναπαράσταση του επισωματικού πλασμιδίου pPvec-EGFP που χρησιμοποιήθηκε κατά τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν EGFP υπό τον pVEC. (Β) Αδιαφοροποίητα κύτταρα (D0) του κλώνου G11 εκφράζουν τους δείκτες πολυδυναμίας E-cadherin και Oct3/4 αλλά όχι EGFP. (C) Την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης ανιχνεύεται η έκφραση της πρωτεΐνης EGFP (D) Ποσοτική ανάλυση των EGFP+ κυττάρων του κλώνου G11 τις ημέρες διαφοροποίησης τρία με έξι με κυτταρομετρία ροής. Παρατίθενται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα. (Ε) Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής από τρία διαφορετικά πειράματα. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν τον μέσο όρο $\pm$ τη μέση διακύμανση (mean $\pm$ SD) (n>3). *** P< 0.001. (F) Ημι-ποσοτική ανάλυση rt-pcr για την ενδογενή VE-cadherin κατά τις ημέρες διαφοροποίησης 0, 3, 4, 5 και 7.

Πειράματα ελέγχου για την ενεργότητα του Pvec έδειξαν ότι ανιχνεύεται ειδικά στα N-cadherin+ κύτταρα (μεσόδερμα) και όχι στα E-cadherin+ κύτταρα την τέταρτη ημέρα της διαφοροποίησης (Εικόνες 27A,27B). Έκφραση EGFP ανιχνεύθηκε στα πρώτα VE-cadherin+ κύτταρα που σχηματίζονται (Εικόνα 27C) ενώ παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα ενεργότητας του Pvec σε προγονικά κύτταρα με χαμηλή έκφραση Brachyury (Bry) (Εικόνα 27D). Από τα

παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η ενεργοποίηση του Pvec συμπίπτει με το τελικό στάδιο της ύπαρξης του Bry+ πληθυσμού. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι ο υποκινητής είναι ενεργός στα Flk1+ κύτταρα την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 27E). Την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης, η ενεργότητα του υποκινητή περιορίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως φαίνεται από τη συν-έκφραση του EGFP με τους ενδοθηλιακούς δείκτες VE-cadherin και PECAM-1 (Εικόνες 27F, 27G). Περαιτέρω ανάλυση των EBs στην ίδια χρονική στιγμή έδειξε ότι >90% των EGFP+ κυττάρων είναι ταυτόχρονα και VE-cadherin+, ένδειξη που συνηγορεί για την ιστοειδικότητα του υποκινητή της VE-cadherin (Εικόνα 27H).

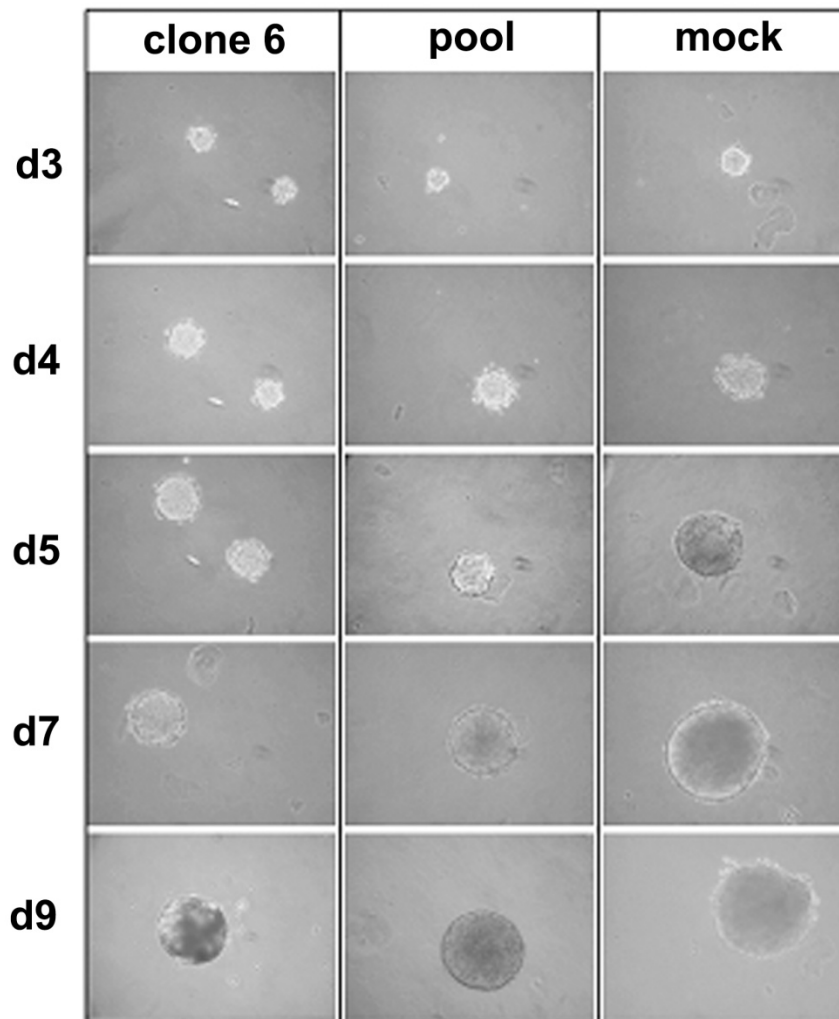


Εικόνα 27. Χαρακτηρισμός της έκφρασης της πρωτεΐνης EGFP κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. (A-B) Τα EGFP+ κύτταρα εκφράζουν N-cadherin (A) αλλά όχι E-cadherin (B) την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης. (C) Έκφραση της πρωτεΐνης EGFP σε VE-cadherin+ κύτταρα την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης. (D) Έκφραση της πρωτεΐνης EGFP παρατηρήθηκε σε κύτταρα με χαμηλή έκφραση Bry. (E-G) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε EBs την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης έναντι των πρωτεϊνών VE-cadherin, PECAM-1, EGFP. (H) Στατιστική ανάλυση του ποσοστού των EGFP + κυττάρων που συν-εκφράζουν VE-cadherin την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης.



3.4 Η έκφραση ενός μεταλλάγματος με αρνητικώς επικρατούσα δράση cadherin υπό τον έλεγχο του υποκινητή της VE-cadherin διαρρηγνύει τους ενδοθηλιακούς συνδέσμους προσκόλλησης

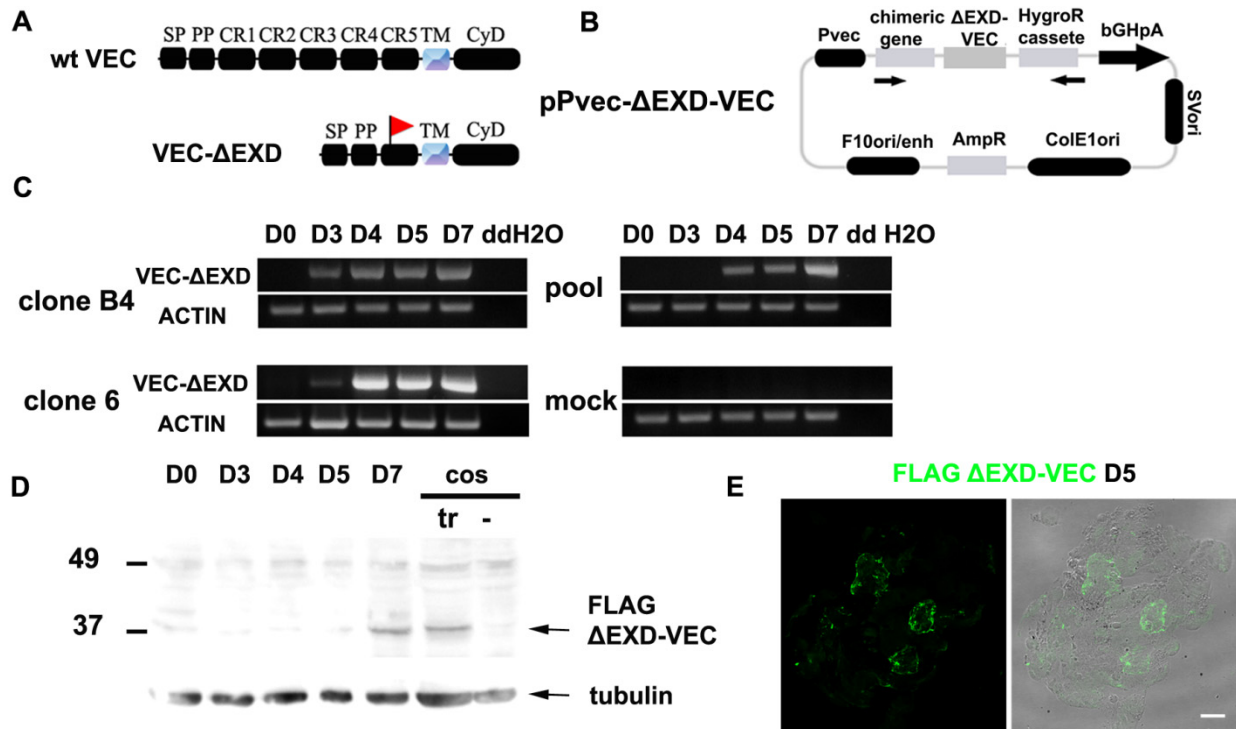
Το πρότυπο ενεργότητας του Pvec κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ESCs, παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου που έχουν οι σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά τα πρώτα στάδια της γαστριδίωσης. Στόχος μας είναι να μελετήσουμε τις συνέπειες που πιθανόν έχει η απουσία λειτουργικού ενδοθηλίου στο σχηματισμό του καρδιακού ιστού. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε ένα σύστημα με το οποίο διαρρηγνύονται οι σύνδεσμοι προσκόλλησης, εξαρτώμενοι από όλες τις κλασσικές καδερίνες, μέσω της έκφρασης μιας αρνητικώς επικρατούσας μεταλλαγμένης μορφής cadherin υπό τον ιστοειδικό έλεγχο του Pvec. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα διαφοροποίησης γενετικώς τροποποιημένων ESCs τα οποία εκφράζουν το κυτταροπλασματικό τμήμα (ΔEXD-VEC) της VE-cadherin, υπό τον Pvec (Εικόνες 30A, 30B). Το κυτταροπλασματικό τμήμα της cadherin έχειδειχθεί ότι παρεμποδίζει γενικώς το σχηματισμό διακυτταρικών συνδέσεων. Δημιουργήθηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές και πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαφοροποίησης σε δύο κλώνους (κλώνος 6 και B4) καθώς και σε μαζικούς ανθεκτικούς κλώνους (pool). Ως κυτταρική σειρά ελέγχου χρησιμοποιήθηκε μια σειρά που περιέχει την πλασμιδιακή κατασκευή χωρίς ένθεμα. Όταν τα μεταλλαγμένα EBs συγκρίθηκαν με mock EBs παρουσίασαν το ίδιο μέγεθος και σχήμα μέχρι και την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης. Από την τέταρτη ημέρα και μετά, η ανάπτυξη των μεταλλαγμένων EBs (κλώνος 6 και pool) αναστέλλεται, όπως προκύπτει από το μικρότερο μέγεθός τους σε σχέση με τα mock.



Εικόνα 29. Τα EBs που εκφράζουν το κυτταροπλασματικό τμήμα της VE-cadherin (ΔEXD-VEC) υπό τον Pvec παρουσιάζουν αναστολή στην ανάπτυξη τους από την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης και μετά. Παρατίθενται τυπικές εικόνες από ζωντανά μεταλλαγμένα (κλώνος 6 και pool) και mock EBs κατά τις ημέρες διαφοροποίησης 3 έως 9 (αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από > 15 πειράματα και > 500 EBs). Να σημειωθεί ότι τα EBs που προέρχονται από τον κλώνο 6 παρουσιάζουν μικρότερο μέγεθος σε σχέση με τα pool EBs. Οι φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου έχουν ίδια μεγέθυνση.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση του ΔEXD-VEC κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Βρέθηκε ότι έκφραση του μεταλλάγματος ανιχνεύεται για πρώτη φορά την τρίτη ημέρα της διαφοροποίησης και τα επίπεδα έκφρασης του, μεταξύ των EBs του κλώνου 6 και του κλώνου B4 είναι συγκρίσιμα, μετά από πειράματα ημι-ποσοτικού rt-pcr. Ωστόσο, στα pool EBs τα επίπεδα mRNA του μεταλλάγματος είναι χαμηλότερα και ανιχνεύεται για πρώτη φορά την ημέρα τέσσερα (Εικόνα 30C). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι, η έκφραση του ΔEXD-VEC σε επίπεδο πρωτεΐνης είναι ανιχνεύσιμη την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης

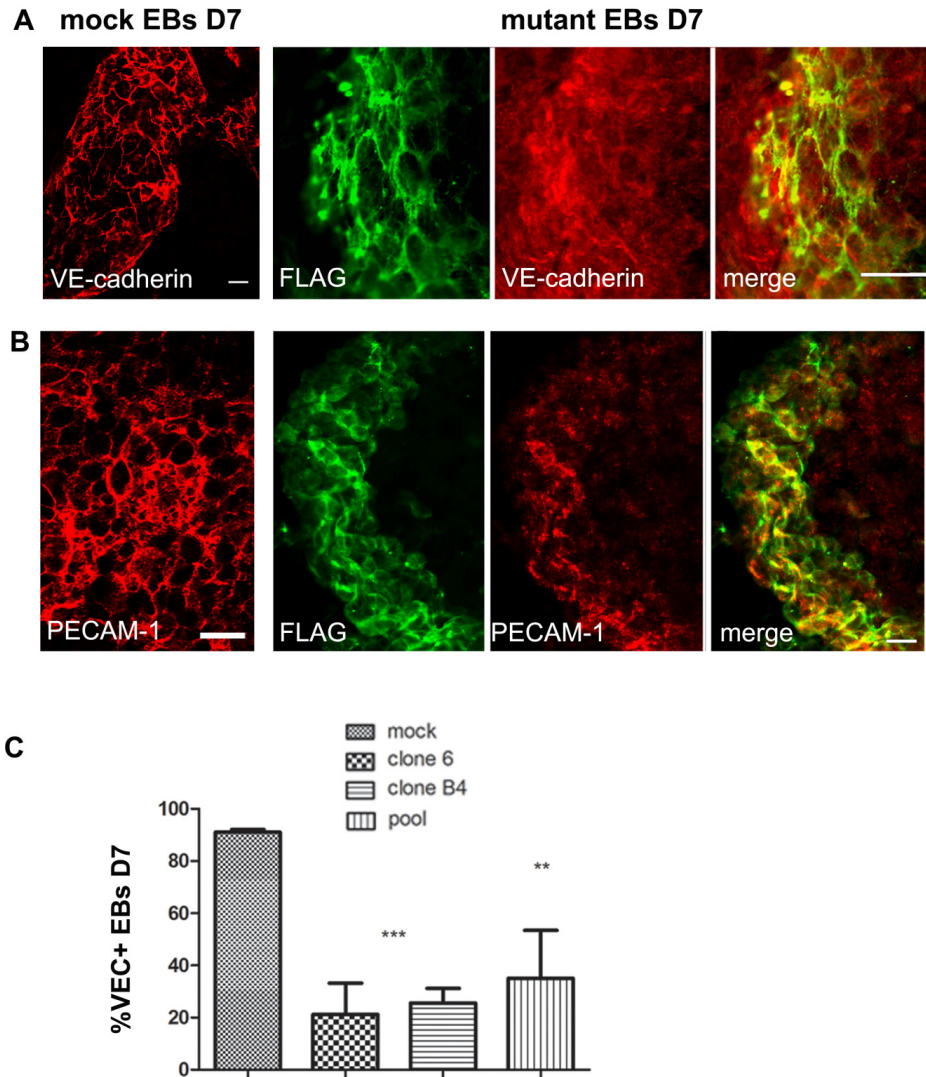
μετά από ανοσοφθορισμό (Εικόνα 30Ε) και την έβδομη ημέρα μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 30D). Αυτή τη χρονική στιγμή φαίνεται ότι η ενεργότητα του Pvec φθάνει στο μέγιστο.



Εικόνα 30. Δημιουργία και χαρακτηρισμός γενετικών τροποποιημένων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία εκφράζουν τη μεταλλαγμένη VE-cadherin.(A) Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου (wt) VE-cadherin και του μεταλλάγματος της (ΔEXD-VEC) η οποία εκφράζει τον επίτοπο του FLAG για ανίχνευση (SP: αλληλουχία σηματοδοτικού πεπτιδίου, PP: αλληλουχία προ-πεπτιδίου, TM: δια-μεμβρανικός τομέας, CR: επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες cadherin). (B) Σχηματική αναπαράσταση της επισωματικής πλασμιδιακής κατασκευής pPvec-ΔEXD-VEC που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του ΔEXD-VEC. (C) Πρότυπο έκφρασης του ΔEXD-VEC στους κλώνους 6, B4, pool και mock τις ημέρες διαφοροποίησης 0, 3, 4, 5 και 7 με πειράματα rt-pcr. (D) Ανοσοαποτύπωση κατά Western στα ίδια χρονικά σημεία στον κλώνο B4 . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεΐνης από κύτταρα Cos τα οποία είχαν διαμολυνθεί με πλασμιδιακή κατασκευή η οποία εκφράζει το ΔEXD-VEC υπό τον υποκινητή του CMV (Cos-tr). Η έκφραση της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την ισοφόρτωση των πρωτεϊνών. (E) Η έκφραση του ΔEXD-VEC ανιχνεύθηκε την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Μπάρα 20μm.

Κατά την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης, το ενδοθήλιο στα mock EBs, έχει δημιουργήσει εμφανείς συστάδες κυττάρων, οι οποίες σχηματίζουν πλακώδεις δομές που χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό VE-cadherin συνδέσμων προσκόλλησης. Στα μεταλλαγμένα EBs, δεν παρατηρούνται χαρακτηριστικές ενδοθηλιακές δομές, ενώ οι VE-cadherin σύνδεσμοι προσκόλλησης έχουν εμφανώς διαρραγεί (Εικόνα 32B). Την ίδια χρονική στιγμή, η έκφραση του ΔEXD-VEC ανιχνεύεται στη μεμβράνη των VE-cadherin+ κυττάρων έπειτα από ανοσοφθορισμό με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του εξωκυττάριου τμήματος (που αναγνωρίζει την ενδογενή VE-cadherin) και του επιτόπου FLAG (που αναγνωρίζει το μετάλλαγμα) (Εικόνα 31A). Παρόμοια πειράματα για την πρωτεΐνη PECAM-1, έδειξαν συνεντοπισμό στη μεμβράνη με το ΔEXD-VEC και καταστροφή των συνδέσεων PECAM-1 (Εικόνα 31B). Τα αποτελέσματα έκφρασης του ΔEXD-VEC βρίσκονται σε συμφωνία με το πρότυπο έκφρασης του pVEC-EGFP επιβεβαιώνοντας περαιτέρω ότι ο υποκινητής της VE-cadherin ενεργοποιείται στα ενδοθηλιακά κύτταρα την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα whole-mount ανοσοφθορισμού σε μεταλλαγμένα EBs για την ενδογενή VE-cadherin και υπολογίστηκε το ποσοστό των EBs στα οποία ανιχνεύονται VE-cadherin+ κύτταρα σε σύγκριση με τα mock EBs. Παρατηρήθηκε ότι η VE-cadherin απουσιάζει στο μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλαγμένων EBs, ενώ όταν εκφράζεται ανιχνεύεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα. Αναλυτικά, μόνο το 20% των EBs του κλώνου 6, το 26% των EBs του κλώνου B4 και το 35% των EBs του pool εμφανίζουν VE-cadherin σε σύγκριση με το >90% των EBs που προέρχονται από το mock ((Εικόνα 31C).

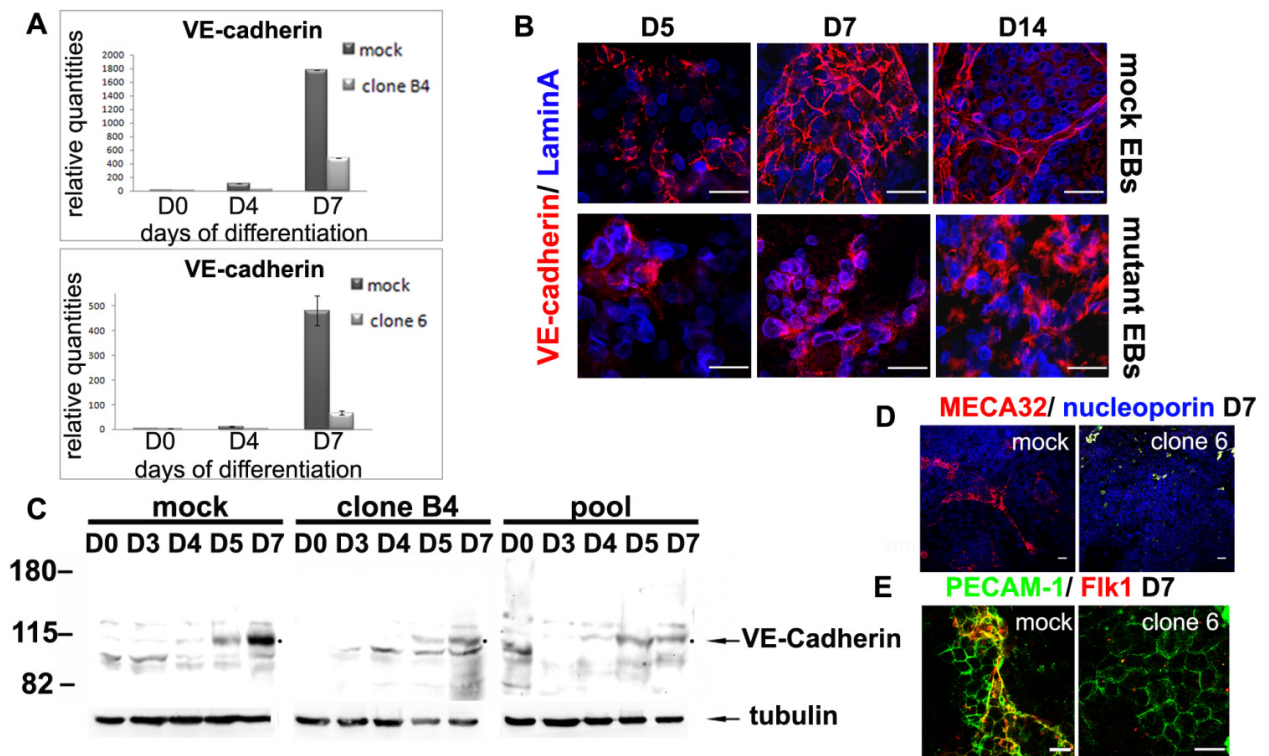


Εικόνα 31. Η έκφραση του ΔEXD-VEC διαρρηγνύει την οργάνωση του ενδοθηλίου στα μεταλλαγμένα EBs. (A) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για το ΔEXD-VEC και για την ενδογενή VE-cadherin στα μεταλλαγμένα EBs. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του επίτοπου του FLAG και για το εξωκυττάριο τμήμα της VE-cadherin, αντίστοιχα. Η έκφραση του ΔEXD-VEC παρατηρείται στην μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων των μεταλλαγμένων EBs. Να σημειωθεί η διάχυτη χρώση της ενδογενούς VE-cadherin στα μεταλλαγμένα EBs σε σύγκριση με τα mock EBs. Μπάρες: 20μm (mock EBs), 40μm (μεταλλαγμένα EBs). (B) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για το ΔEXD-VEC και για την πρωτεΐνη PECAM-1. Παρατηρήθηκε διαφορά στο σχηματισμό του PECAM-1 μεταξύ mock και μεταλλαγμένων EBs. Μπάρες: 20μm (C) Στατιστική ανάλυση των VE-cadherin+ μεταλλαγμένων EBs την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης έπειτα από whole-mount ανοσοφθορισμό. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν τον μέσο όρο $\pm$ τη μέση διακύμανση (mean $\pm$ SD) από τρία διαφορετικά πειράματα (n>3). Ο αριθμός των EBs που μετρήθηκαν είναι: mock: 532, κλώνος B4: 290, κλώνος 6: 371 και pool: 363. ***P<0.001, **P<0.005 vs mock.

Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν ότι η έκφραση του ΔEXD-VEC έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή έλλειψη των ενδοθηλιακών δομών την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης. Για να ποσοτικοποιηθεί η μείωση της ενδογενούς VE-cadherin πραγματοποιήθηκαν πειράματα real-time qPCR σε EBs από τους κλώνους 6 και B4 τα οποία έδειξαν ότι η έκφραση της VE-cadherin μειώνεται σε μεταγραφικό επίπεδο κατά 7.2 και 3.7- φορές αντίστοιχα σε σχέση με τα mock EBs την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 32A). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση που έχει η έκφραση του μεταλλάγματος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης, οι VE-cadherin σύνδεσμοι προσκόλλησης μόλις ανιχνεύονται στα μεταλλαγμένα EBs, σε αντίθεση με τα mock EBs στα οποία παρατηρούνται εκτεταμένες ενδοθηλιακές περιοχές (Εικόνα 32B). Πειράματα real-time qPCR σε EBs από τους κλώνους 6 και B4 έδειξαν μείωση της ενδογενούς VE-cadherin κατά 6.6 και 4.22 - φορές αντίστοιχα σε σχέση με τα mock EBs την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 32A). Σε μετέπειτα στάδια της διαφοροποίησης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα δημιουργούν αγγειακές δομές στα mock EBs, ενώ στα μεταλλαγμένα EBs δεν παρατηρείται οργανωμένο ενδοθήλιο (Εικόνα 32B).

Περαιτέρω πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξαν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς VE-cadherin στα μεταλλαγμένα EBs σε σύγκριση με τα mock EBs τις ημέρες διαφοροποίησης τρία, τέσσερα, πέντε και εφτά (Εικόνα 32C). Για να διαπιστωθεί αν υπό την έκφραση του ΔEXD-VEC έχει διαταραχθεί η ακεραιότητα του ενδοθηλίου γενικότερα και όχι μόνο των διακυτταρικών συνδέσμων, ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης MECA32, ενός ενδοθηλιακού δείκτη που δεν σχετίζεται με τους συνδέσμους προσκόλλησης στα μεταλλαγμένα και στα mock EBs. Σε αντίθεση με τα mock EBs, έκφραση του MECA32 δεν ανιχνεύθηκε στα μεταλλαγμένα EBs την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 32D). Την ίδια χρονική στιγμή παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα για τον υποδοχέα Flk-1. Οι παραπάνω ενδείξεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει αναστολή της δημιουργίας των ενδοθηλιακών δομών στα μεταλλαγμένα EBs. Εντούτοις, ανιχνεύονται PECAM-1+ κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαφοροποίηση μη ενδοθηλιακών PECAM+ κυτταρικών τύπων δεν επηρεάζεται στα μεταλλαγμένα EBs (Εικόνα 32E).

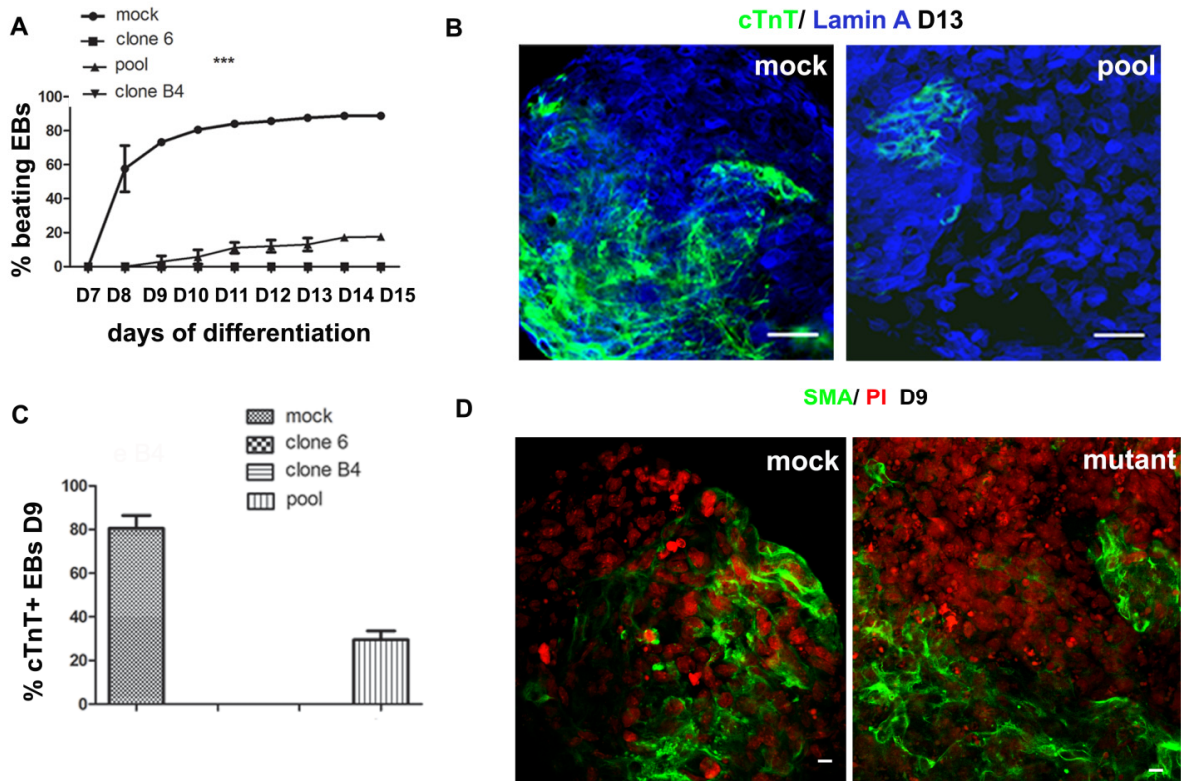
Συμπερασματικά, η έκφραση του ΔEXD-VEC υπό τον υποκινητή της VE-cadherin κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της ενδογενούς VE-cadherin, την καταστροφή των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης και την έλλειψη ενδοθηλιακών δομών.



Εικόνα 32. Διαφοροποίηση των γενετικώς τροποποιημένων ES κλώνων που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη VE-cadherin (ΔEXD-VEC). (A) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA της ενδογενούς VE-cadherin με πειράματα real-time qPCR τις ημέρες διαφοροποίησης μηδέν, τέσσερα και επτά. (B) Μορφολογική ανάλυση των ενδοθηλιακών δικτύων που σχηματίζονται στα μεταλλαγμένα και στα mock EBs τις ημέρες διαφοροποίησης πέντε, επτά και δεκατέσσερα. Διπλός έμμεσος ανοσοφθορισμός για την πρωτεΐνη VE-cadherin και για την πρωτεΐνη LaminA που αναπαριστά τους πυρήνες. Μπάρες: 40μm (C) Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της ενδογενούς VE-cadherin με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε EBs από τον κλώνο B4, από το pool και από το mock. Η έκφραση της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την ισοφόρτωση των πρωτεϊνών. (D) Έλλειψη MECA32+ κυττάρων στα μεταλλαγμένα EBs σε σύγκριση με τα mock EBs την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την πρωτεΐνη MECA32 και για την πυρηνική πρωτεΐνη νουκλεοπορίνη (nucleoporin) που αναπαριστά τους πυρήνες. (E) Έκφραση του PECAM-1 στα μεταλλαγμένα και στα mock EBs αλλά όχι της πρωτεΐνης Flk1 την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης. Μπάρες 20μm

3.5 Η εξειδίκευση των Isl1+ κύτταρων αναστέλλεται στα μεταλλαγμένα EBs

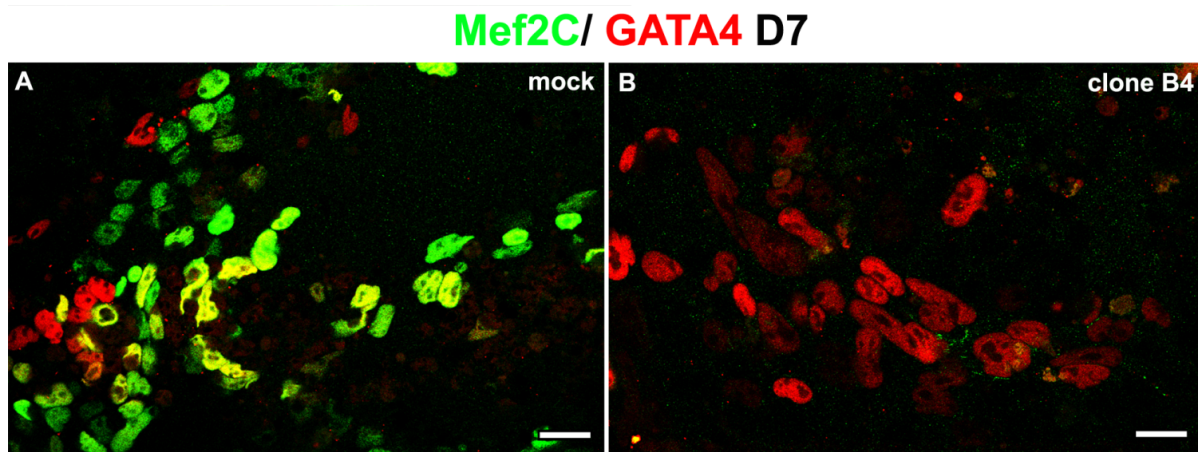
Στη συνέχεια, μελετήθηκε αν η διάρρηξη των ενδοθηλιακών δομών επηρεάζει παράλληλα τη διαφοροποίηση προς καρδιακούς τύπους κυττάρων στα μεταλλαγμένα EBs. Αρχικά, μετρήθηκε το ποσοστό των «παλλόμενων EBs» τις ημέρες διαφοροποίησης εφτά έως δεκαπέντε. Αξιοσημείωτο ήταν ότι στους κλώνους 6 και B4 απουσιάζουν τα «παλλόμενα EBs» ενώ στο pool μόνο το 20% των EBs πάλλονται σε σύγκριση με τα mock EBs που το ποσοστό των «παλλόμενων» EBs ξεπερνά το 90% (Εικόνα 33A). Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα cTnT+ κύτταρα είναι εμφανώς μειωμένα στα pool EBs σε σύγκριση με τα mock EBs, ενώ απουσιάζουν από τα EBs προερχόμενα από τους κλώνους 6 και B4 την δέκατη τρίτη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 33B). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση της cTnT την ένατη ημέρα διαφοροποίησης σε πειράματα ανοσοφθορισμού whole mount και μετρήθηκε το ποσοστό των EBs που περιέχουν cTnT+ κύτταρα. Έκφραση της cTnT παρατηρήθηκε μόνο στο 30% των pool EBs ενώ δεν ανιχνεύθηκε στους κλώνους 6 και B4 σε σύγκριση με το 80% των mock EBs (Εικόνα 33C). Περαιτέρω πειράματα ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο της έκφρασης της SMA στα EBs, έδειξαν ότι τα SMA+ κύτταρα δημιουργούνται στα μεταλλαγμένα EBs, ένα αποτέλεσμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν επηρεάζεται η διαφοροποίηση τουλάχιστον των λεϊών μυϊκών κυττάρων (Εικόνα 33D).



Εικόνα 33. Διαφοροποίηση προς καρδιακούς τύπους κυττάρων στα μεταλλαγμένα EBs. (A) Στατιστική ανάλυση των «παλλόμενων» EBs τις ημέρες διαφοροποίησης 7-15 στους κλώνους 6, B4, pool και mock. Ένα EB θεωρείται «παλλόμενο» αν περιέχει έστω μία περιοχή που «πάλλεται». Τα αποτελέσματα αναπαριστούν τον μέσο όρο $\pm$ τη μέση διακύμανση (mean $\pm$ SD) από τρία διαφορετικά πειράματα. Ο αριθμός των EBs που μετρήθηκαν είναι : mock: 260, κλώνος B4: 185, κλώνος 6: 210 και pool: 217. ***P<0.0001 vs mock. Όλες οι χρονικές στιγμές των mock EBs (εκτός από την ημέρα εφτά) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τα μεταλλαγμένα EBs. (B) Διπλός whole mount ανοσοφθορισμός στα pool και mock EBs για την cTnT και την LaminA η οποία χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης των πυρήνων, την δέκατη τρίτη ημέρα διαφοροποίησης. Μπάρα 40μm. (C) Στατιστική ανάλυση των cTnT+ μεταλλαγμένων EBs την ένατη ημέρα διαφοροποίησης έπειτα από whole-mount ανοσοφθορισμό. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν τον μέσο όρο $\pm$ τη μέση διακύμανση (mean $\pm$ SD) από τρία διαφορετικά πειράματα. Ο αριθμός των EBs που μετρήθηκαν είναι: mock: 193, κλώνος B4: 198, κλώνος 6: 185 και pool: 210. ***P<0.001 vs mock. (D) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την πρωτεΐνη SMA και PI σε μεταλλαγμένα και mock EBs την ένατη ημέρα διαφοροποίησης. Οι φωτογραφίες είναι αντιπροσωπευτικές έπειτα από ανάλυση 49 mock και 71 μεταλλαγμένων EBs από δύο διαφορετικά πειράματα. Μπάρα 20μm.

Για να προσδιορισθεί το αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο διαταράσσεται η διαφοροποίηση των καρδιακών κυτταρικών τύπων στα μεταλλαγμένα EBs εξετάστηκαν καρδιακοί προγονικοί πληθυσμοί που χαρακτηρίζονται από την έκφραση των μεταγραφικών

παραγόντων Isl1, Nkx2.5, Mef2c και GATA4. Πραγματοποιήθηκε διπλός ανοσοφθορισμός για τους μεταγραφικούς παράγοντες Mef2c και GATA4 σε EBs την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης. Παρατηρήθηκε ότι Mef2c⁺ κύτταρα απουσιάζουν από τα μεταλλαγμένα EBs σε αντίθεση με τα mock EBs, ενώ GATA4⁺ κύτταρα μπορούν να ανιχνευθούν στα μεταλλαγμένα EBs, πιθανώς σε μη καρδιακούς κυτταρικούς τύπους όπως αυτούς του ενδοδέρματος.

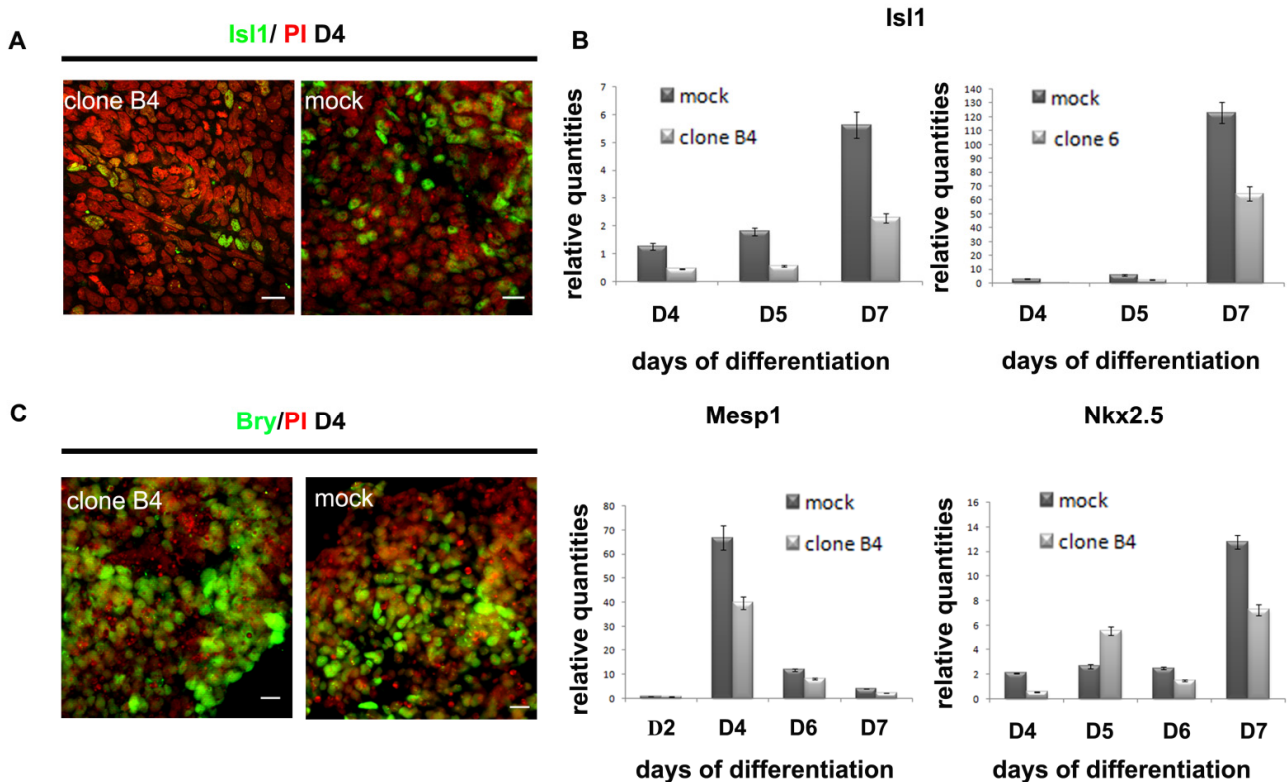


Εικόνα 34. Απουσία Mef2c⁺ κυττάρων στα μεταλλαγμένα EBs ενώ ανιχνεύονται GATA4⁺ κύτταρα. Διπλός ανοσοφθορισμός για τους μεταγραφικούς παράγοντες Mef2c και GATA4 σε mock (A) και σε μεταλλαγμένα EBs (B) την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης. Μπάρα 20μm. Με κίτρινο χρώμα παρατηρείται η συν-έκφραση των δύο μεταγραφικών παραγόντων στα mock EBs.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Isl1. Πειράματα whole mount ανοσοφθορισμού την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης σε EBs έδειξαν ότι τα Isl1⁺ κύτταρα είναι μειωμένα ή απουσιάζουν στα μεταλλαγμένα EBs σε σύγκριση με τα mock (Εικόνα 35A). Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα real-time qPCR για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Isl1 κατά τις ημέρες διαφοροποίησης τέσσερα, πέντε και εφτά στους κλώνους B4 και 6 και συγκρίθηκαν με τα mock EBs. Παρατηρήθηκε μείωση κατά 2.7, 3.1, 2.4 –φορές αντίστοιχα στα EBs από τον κλώνο B4 και 5.2, 2.4, 2.02 –φορές στα EBs από τον κλώνο 6. Παρόμοια πειράματα για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Nkx2.5 τις ημέρες διαφοροποίησης τέσσερα, έξι και εφτά σε EBs από τον κλώνο B4 έδειξαν μείωση κατά 3.6, 1.64, 1.7 –φορές αντίστοιχα, ενώ προς έκπληξη, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση κατά 0.48 –φορές την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης σε σχέση με τα mock EBs (Εικόνα 35B).

Ακολούθως, εξετάσθηκε αν επηρεάζεται η εξειδίκευση και η επιβίωση των Bry⁺ και Mesp1⁺ πληθυσμών, που προηγούνται το σχηματισμό του Isl1, στα μεταλλαγμένα EBs. Έμμεσος whole mount ανοσοφθορισμός σε EBs έδειξε ότι η ποσότητα και η μορφολογία των Bry⁺ κυττάρων είναι συγκρίσιμη μεταξύ μεταλλαγμένων και mock EBs (Εικόνα 35C). Αντίστοιχα πειράματα για τον Mesp1 δεν επετεύχθη λόγω έλλειψης ειδικού εμπορικού αντισώματος κατάλληλου για τεχνικές ανοσοφθορισμού. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα real-time qPCR για να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης του Mesp1 κατά τις ημέρες διαφοροποίησης δύο, τέσσερα, έξι και επτά σε EBs από τον κλώνο B4 σε σύγκριση με τα mock EBs. Παρατηρήθηκε μικρή μείωση κατά 1.3 έως 1.7 –φορές στα μεταλλαγμένα EBs σε σχέση με τα mock EBs (Εικόνα 35A).

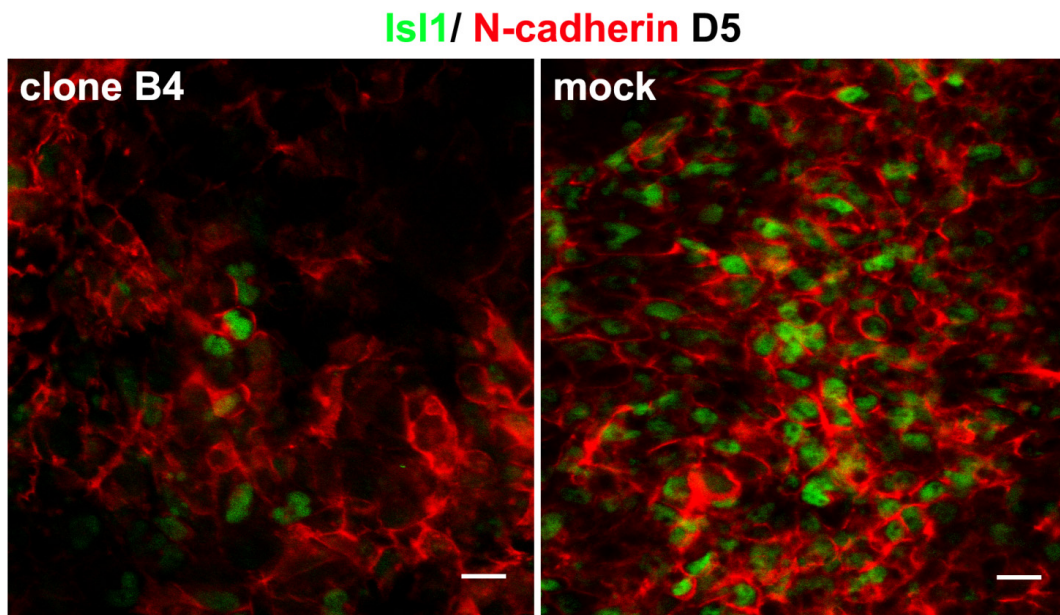
Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η έκφραση ενός μεταλλάγματος με αρνητικώς επικρατούσα δράση cadherin υπό τον ιστοειδικό έλεγχο του Pvec αναστέλλει την εξειδίκευση των κυττάρων μεταξύ των σταδίων της καρδιακής διαφοροποίησης που χαρακτηρίζονται από την έκφραση του Mesp1 και του Isl1. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης του Isl1 ήδη από την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης στα μεταλλαγμένα EBs, όταν τα Isl1⁺ κύτταρα εμφανίζονται για πρώτη φορά, θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην ανεπιτυχή εξειδίκευση είτε στην ελαττωματική επιβίωση και πολλαπλασιασμό του Isl1⁺ πληθυσμού.



Εικόνα 35. Έλεγχος των μεταγραφικών παραγόντων *Isl1*, *Nkx2.5*, *Mesp1* και *Bry* κατά τη διαφοροποίηση των μεταλλαγμένων EBs. (A) Ανοσοφθορισμός whole mount σε EBs από τον κλώνο B4 και από το mock για την πρωτεΐνη *Isl1* την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης. Οι πυρήνες απεικονίζονται έπειτα από χρώση με PI. Παρατηρείται μείωση των *Isl1*⁺ κυττάρων στα μεταλλαγμένα EBs. Μπάρα 20μm. (B) (*Isl1*) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του *Isl1* με πειράματα real-time qPCR τις ημέρες διαφοροποίησης τέσσερα, πέντε και επτά στους κλώνους B4, 6 και mock. (*Nkx2.5*) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του *Nkx2.5* τις ημέρες διαφοροποίησης τέσσερα, έξι και επτά στους κλώνους B4 και mock. (*Mesp1*) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του *Mesp1* τις ημέρες διαφοροποίησης δύο, τέσσερα, έξι και επτά στους κλώνους B4 και mock. (C) Ανοσοφθορισμός whole mount σε μεταλλαγμένα και mock EBs για την πρωτεΐνη Brachyury (*Bry*). Οι πυρήνες απεικονίζονται έπειτα από χρώση με PI. Οι φωτογραφίες είναι αντιπροσωπευτικές έπειτα από ανάλυση 83 mock και 75 μεταλλαγμένων EBs από δύο διαφορετικά πειράματα. Μπάρα 20μm.

3.6 Μερική αποκατάσταση των συνδέσμων προσκόλλησης και επαναφορά της καρδιακής διαφοροποίησης σε υβριδικά EBs που προέρχονται από μεταλλαγμένα και αγρίου τύπου ESCs

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα Isl1+ κύτταρα σχηματίζουν N-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης. Γνωρίζοντας ότι ο Pvec είναι ενεργός σε έναν υποπληθυσμό των Isl1+ κυττάρων, έκφραση του ΔEXD-VEC στον ίδιο υποπληθυσμό αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα τη διάρρηξη των N-cadherin συνδέσμων προσκόλλησης. Ανάλυση της N-cadherin στα Isl1+ κύτταρα κατέδειξε ότι οι N-cadherin σύνδεσμοι προσκόλλησης έχουν πράγματι διαρραγεί στα μεταλλαγμένα EBs. Αδυναμία σχηματισμού συνδέσμων προσκόλλησης είναι μια πιθανή αιτία της αναστολής της καρδιακής εξειδίκευσης ή/και του πολλαπλασιασμού του Isl1+ πληθυσμού.

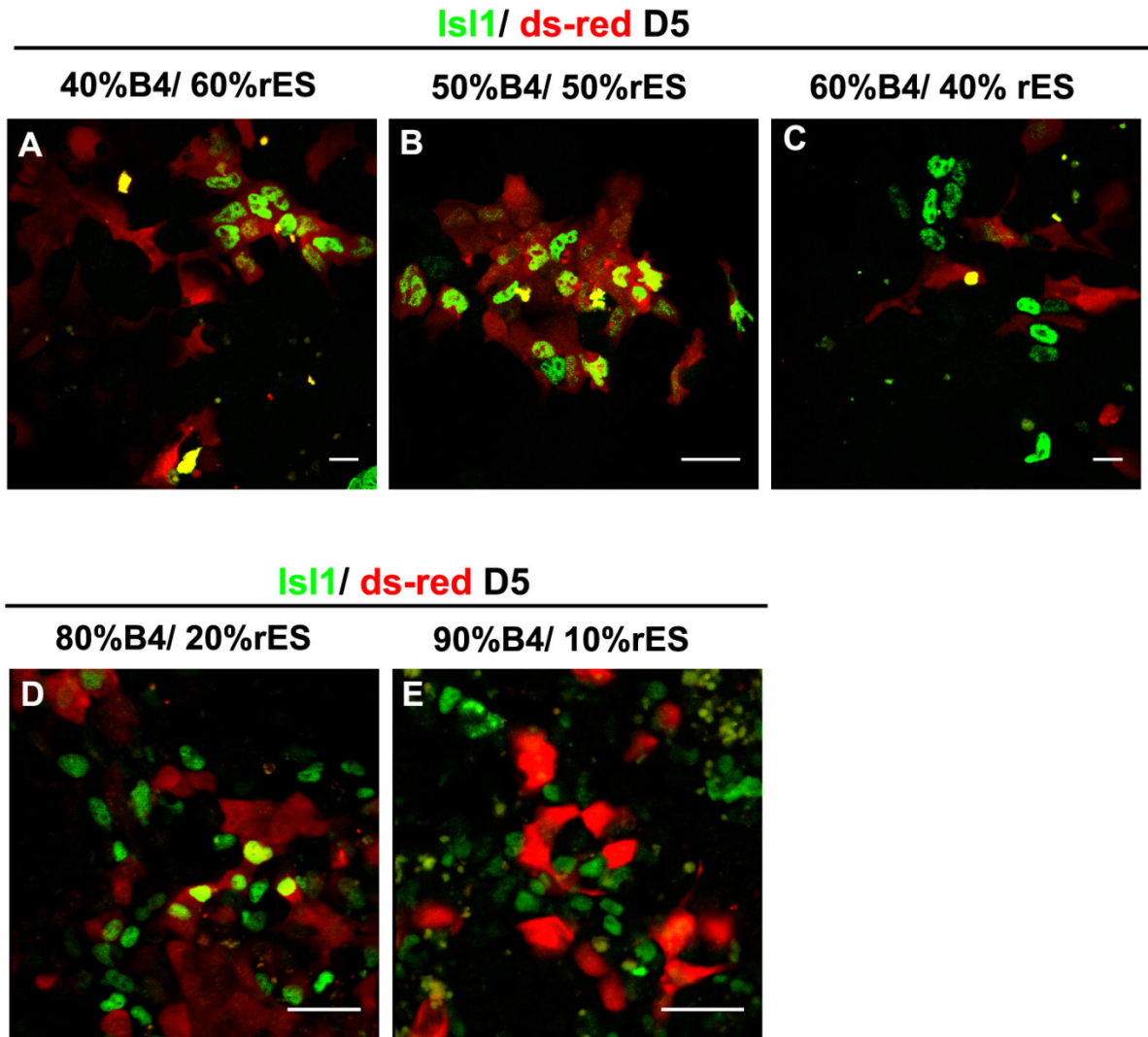


Εικόνα 36. Στα μεταλλαγμένα EBs, οι N-cadherin σύνδεσμοι προσκόλλησης έχουν διαρραγεί στα Isl1+ κύτταρα. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε μεταλλαγμένα και mock EBs για τις πρωτεΐνες Isl1 και N-cadherin την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης. Μπάρα 20μm.

Για να μελετηθεί αν είναι δυνατή η αποκατάσταση της καρδιακής διαφοροποίησης δημιουργήθηκαν υβριδικά EBs, τα οποία προέρχονται από ανάμιξη μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου ESCs. Ως αγρίου τύπου ESCs επιλέχθηκε η σειρά MST-ds-red, η οποία εκφράζει διαρκώς την πρωτεΐνη ds-red και ονομάζεται στο εξής, χάριν συντομίας rES (177). Ανάλυση της διαφοροποίησης των rES EBs κατέδειξε ότι διαφοροποιούνται φυσιολογικά και

το ποσοστό των «παλλόμενων» EBs είναι συγκρίσιμο με αυτό των E14T EBs. Παράλληλα, τα προϊόντα διαφοροποίησης τους μπορούν να διαχωρισθούν από αυτά άλλων σειρών ESCs γιατί εκφράζουν διαρκώς την πρωτεΐνη ds-red στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα έως και τη δωδέκατη ημέρα διαφοροποίησης.

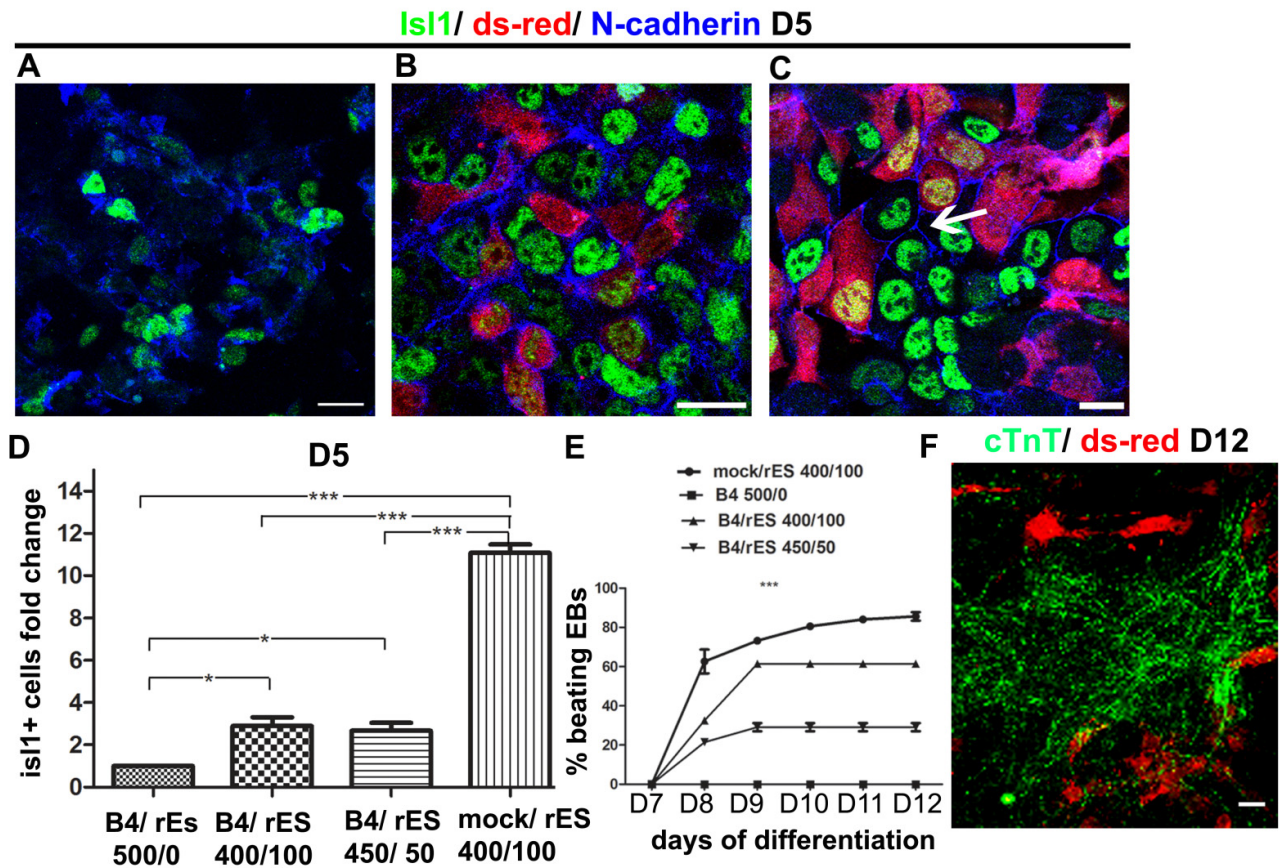
Αρχικά, αναμίχθηκαν rES με mock E14T (mock/ rES) και δημιουργήθηκαν υβριδικά EBs (mock/ rES) με τη μέθοδο κρεμάμενης σταγόνας. Ανάλυση των N-cadherin συνδέσμων προσκόλλησης στα Isl1+ κύτταρα κατέδειξε ότι σχηματίζονται κανονικά την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης στα mock/ rES EBs (Εικόνα 38B). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η διαφοροποίηση των υβριδικών EBs. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αναλογίες κυττάρων από τα μεταλλαγμένα ES (κλώνος 6 και κλώνος B4) και από τα rES κύτταρα και μετρήθηκε το ποσοστό των Isl1+ κυττάρων. Οι αναλογίες που δοκιμάστηκαν είναι οι εξής: 60% rES-40% μεταλλαγμένα ES, 50% rES-50% μεταλλαγμένα ES, 40% rES-60% μεταλλαγμένα ES, 20% rES-80% μεταλλαγμένα ES και 10% rES-90% μεταλλαγμένα ES. Η ευνοϊκότερη αναλογία ως προς την αύξηση του ποσοστού των Isl1+ κυττάρων είναι 20% rES-80% μεταλλαγμένα ES, η οποία χρησιμοποιήθηκε σε περαιτέρω πειράματα με τον κλώνο B4.



Εικόνα 37. Δημιουργία υβριδικών EBs με διαφορετικές αναλογίες μεταλλαγμένων και wt κυττάρων. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες Isl1 και ds-red την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης σε EBs τα οποία έχουν διασπαστεί με θρυψινοποίηση την τέταρτη ημέρα της διαφοροποίησης και έχουν αφεθεί να προσκολληθούν σε τρυβλία με επίστρωση φιμπρονεκτίνης.(A) 60% rES-40% κλώνος B4 (B) 50% rES-50% κλώνος B4 (C) 40% rES-60% κλώνος B4 (D) 80% rES-20% κλώνος B4(E) 90% rES-10% κλώνος B4.

Ακολούθως, μελετήθηκαν οι N-cadherin σύνδεσμοι προσκόλλησης στον Isl1+ πληθυσμό. Παρατηρήθηκε μερική αποκατάσταση των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 38C) ενώ η μορφολογία τους ομοιάζει με αυτή των mock/ rES EBs.

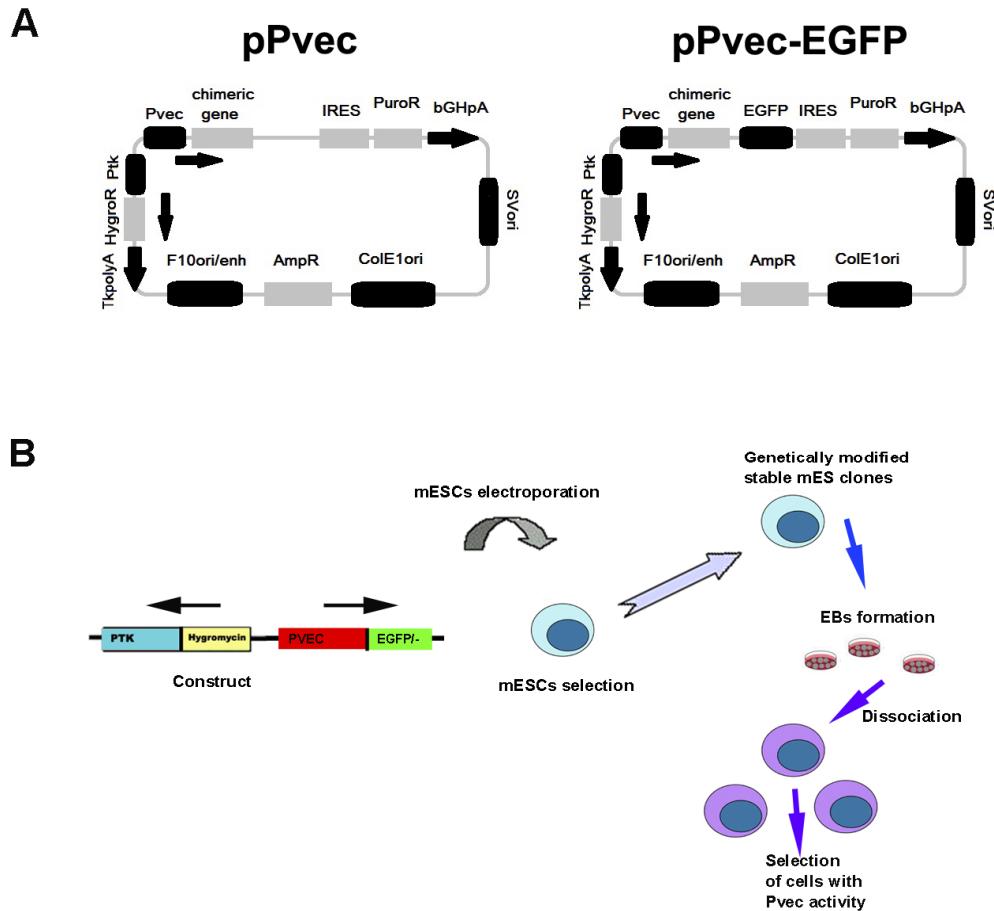
Από μετρήσεις του αριθμού των Isl1+ κυττάρων την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης, προέκυψε ότι αυξάνονται κατά 2.2 φορές στα B4/rES EBs σε σύγκριση με τον αριθμό των Isl1+ κυττάρων που προέρχονται από τα EBs του κλώνου B4, ενώ παραμένει 2.3 φορές μικρότερος σε σχέση με τα mock/ rES EBs (Εικόνα 38D). Σε συνδυασμό με την αύξηση του αριθμού των Isl1+ κυττάρων στα B4/rES EBs, παρατηρήθηκαν 10-30% «παλλόμενα» EBs τις ημέρες διαφοροποίησης οκτώ με εννιά και περίπου ~60% τις ημέρες διαφοροποίησης δέκα με δώδεκα, σε σύγκριση με 0% των μεταλλαγμένων EBs στα ίδια χρονικά σημεία (Εικόνα 38E). Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, η πρωτεΐνη cTnT εκφράζεται σε εκτεταμένες περιοχές των B4/rES EBs και συγκεκριμένα σε κύτταρα που προέρχονται από τον κλώνο B4 (Εικόνα 38F). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν ότι η αποκατάσταση των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης στα Isl1+ κυττάρων συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό τους και την καρδιακή διαφοροποίηση.



Εικόνα 38. Μερική αποκατάσταση του σχηματισμού των συνδέσμων προσκόλλησης και της καρδιακής διαφοροποίησης στα υβριδικά EBs. (A-C) Τριπλός ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες N-cadherin, ds-red και Isl1 σε EBs από τον κλώνο B4 (A), mock/ rES (B) και B4/ rES (C) την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης. Τα EBs έχουν διασπαστεί με ήπια θρυψινοποίηση την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης και τα κύτταρα προσκολλώνται και αναπτύσσονται σε μονόστιβο σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας με επίστρωση φιμπρονεκτίνης. Μπάρα 20μm. Να σημειωθεί ότι ο αριθμός των Isl1+ κυττάρων στα B4/ rES EBs έχει ουσιαστικά αυξηθεί σε σύγκριση με τα EBs του κλώνου B4 και ότι σχηματίζουν εκτεταμένους δια-κυτταρικούς συνδέσμους προσκόλλησης συγκρίσιμους με τα mock/ rES EBs. (D) Επίπεδα αλλαγής του αριθμού των Isl1+ κυττάρων μεταξύ του μεταλλαγμένου κλώνου B4 και των υβριδικών EBs B4/ rES και mock/ rES στις διάφορες αναλογίες. Για το παραπάνω πείραμα φωτογραφήθηκαν 10 τυχαία πεδία και μετρήθηκε ο αριθμός των Isl1+ κυττάρων σε κάθε περίπτωση. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα και μετρήθηκαν περίπου 400 κύτταρα ανά πεδίο σε κάθε περίπτωση. Η στατιστική ανάλυση δείχνει τις αλλαγές (fold-change) των Isl1+ κυττάρων σε σύγκριση με τον κλώνο B4 που έχει οριστεί ως ένα. *P<0.05, ***P<0.001. (E) Στατιστική ανάλυση των «παλλόμενων» EBs τις ημέρες διαφοροποίησης 7-12. Όλα τα χρονικά σημεία είναι στατιστικώς σημαντικά εκτός της ημέρα εφτά. ***P<0.001. (F) Αποκατάσταση της έκφρασης της πρωτεΐνης cTnT στα υβριδικά EBs (B4/ rES 400/100) τη δωδέκατη ημέρα διαφοροποίησης (Μέγιστη προβολή των εικόνων από το confocal). Μπάρα 20μm.

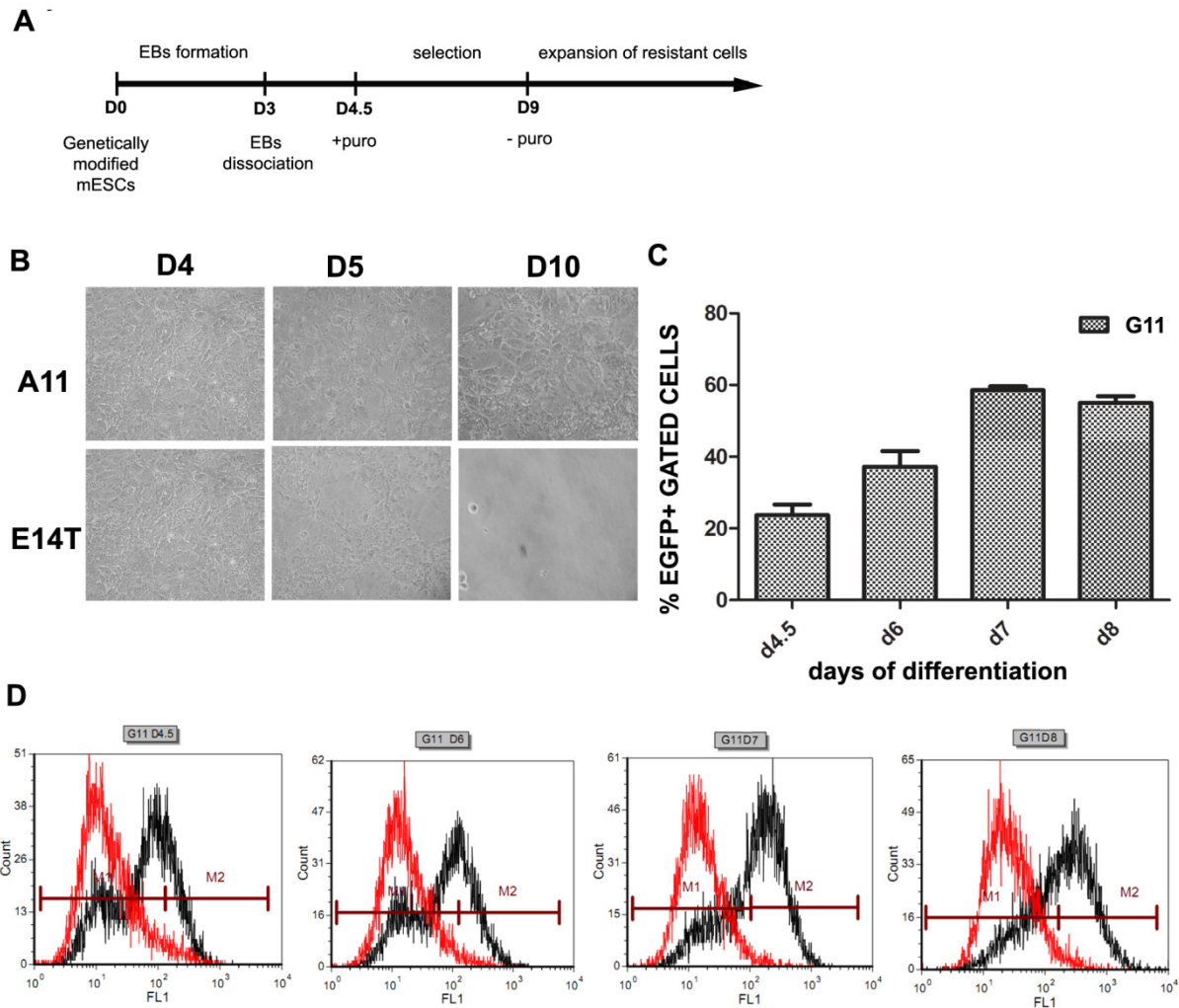
3.7 Απομόνωση και χαρακτηρισμός προγονικών κυττάρων στα οποία είναι ενεργός ο ιστοειδικός υποκινητής της VE-cadherin (Pvec) κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι συνθήκες διαφοροποίησης μας προάγουν σε μεγάλο βαθμό τον σχηματισμό των καρδιαγγειακών κυττάρων. Επίσης, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι υποπληθυσμοί των Isl1+ και GATA4+ κυττάρων εκφράζουν VE-cadherin. Το πρότυπο ενεργότητας του υποκινητή της VE-cadherin έδειξε ότι, ο Pvec είναι ενεργός περίπου στο ένα τρίτο των Isl1+ κυττάρων, ενώ αργότερα ανιχνεύεται μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω ευρήματα στόχος μας ήταν η απομόνωση των κυττάρων στα οποία είναι ενεργός ο Pvec. Δημιουργήθηκαν δύο πλασμιδιακές κατασκευές η pPvec (pPvec- puro^R) και η pPvec-EGFP (pPvec-EGFP-puro^R), οι οποίες βασίζονται στον επισωματικό φορέα pPYCAGIP και σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να εκφράζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας της πουρομυκίνης υπό τον ιστοειδικό έλεγχο (Pvec) κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Η δεύτερη πλασμιδιακή κατασκευή εκφράζει επίσης την φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP υπό τον Pvec. Τα δυο πλασμίδια περιέχουν επίσης το γονίδιο ανθεκτικότητας της υδρομυκίνης υπό τον υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης (pTK), η οποία είναι ενεργή σε όλα τα ζωντανά κύτταρα, για επιλογή των γενετικά τροποποιημένων ESCs (Εικόνα 39A). Δημιουργήθηκαν έτσι ESC κυτταρικές σειρές ανθεκτικές στο αντιβιοτικό υδρομυκίνη και απομονώθηκαν οχτώ κλώνοι με την πλασμιδιακή κατασκευή pPvec- και έξι με τη pPvec-EGFP, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν για την πολυδυναμία τους. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν οι κλώνοι A11 και A12 με την πλασμιδιακή κατασκευή pPvec και οι G11 και G8 με την pPvec-EGFP για περαιτέρω πειράματα. Για την απομόνωση πραγματοποιήθηκε διαφοροποίηση των κλώνων με σχηματισμό EBs με τη μέθοδο μαζικής καλλιέργειας παρουσία καλλιεργητικού μέσου διαφοροποίησης που προάγει ταυτόχρονα σχηματισμό ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για τη παραγωγή μεγάλου αριθμού διαφοροποιημένων κυττάρων. Αρχικά, δοκιμάστηκε η προσθήκη αντιβιοτικού στα EBs αλλά δεν ήταν δυνατή η απομόνωση και η επιβίωση των επιλεχθέντων κυττάρων. Για το λόγο αυτό, τα EBs θρυψινοποιούνται την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης και συνεχίζεται η διαφοροποίηση σε μονόστιβο (Εικόνα 39B).



Εικόνα 39. Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών για την επιλογή και απομόνωση των κύτταρων στα οποία είναι ενεργός ο υποκινητής της VE-cadherin. (A-B) Σχηματική αναπαράσταση των επισωματικών πλασμιδίων pPvec και pPvec-EGFP που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών. (C) Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας των σταθερών κυτταρικών σειρών και της μεθόδου διαφοροποίησης και επιλογής των κυττάρων με ενεργότητα pVEC.

Ακολούθως, προστίθεται αντιβιοτικό τις ημέρες διαφοροποίησης τεσσεράμισι έως οκτώ και επιλέγονται τα κύτταρα στα οποία είναι ενεργός ο Pvec. Υπό αυτές τις συνθήκες, μετά το πέρας της επιλογής παρατηρούνται επιζόντα ανθεκτικά κύτταρα σε αντίθεση με κύτταρα E14T τα οποία έχουν εξαλειφθεί (Εικόνα 40B). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η διαδικασία απομόνωσης των ανθεκτικών κυττάρων. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία προσδιορίστηκε το ποσοστό των EGFP⁺ κυττάρων που προκύπτουν κατά τη διαφοροποίηση/επιλογή του κλώνου G11. Ως κύτταρα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα διαφοροποιημένα/ επιλεχθέντα κύτταρα από τον κλώνο A11, ο οποίος δεν περιέχει το γονίδιο για την EGFP. Παρατηρήθηκε ότι την ημέρα τεσσεράμισι (πριν ξεκινήσει η διαδικασία επιλογής) το ποσοστό των EGFP⁺ κυττάρων είναι ~25%. Ενώ, κατά τη διάρκεια της επιλογής αυξάνεται φθάνοντας στο ~60%, τις ημέρες διαφοροποίησης εφτά και οκτώ (Εικόνες 40C, 40D).

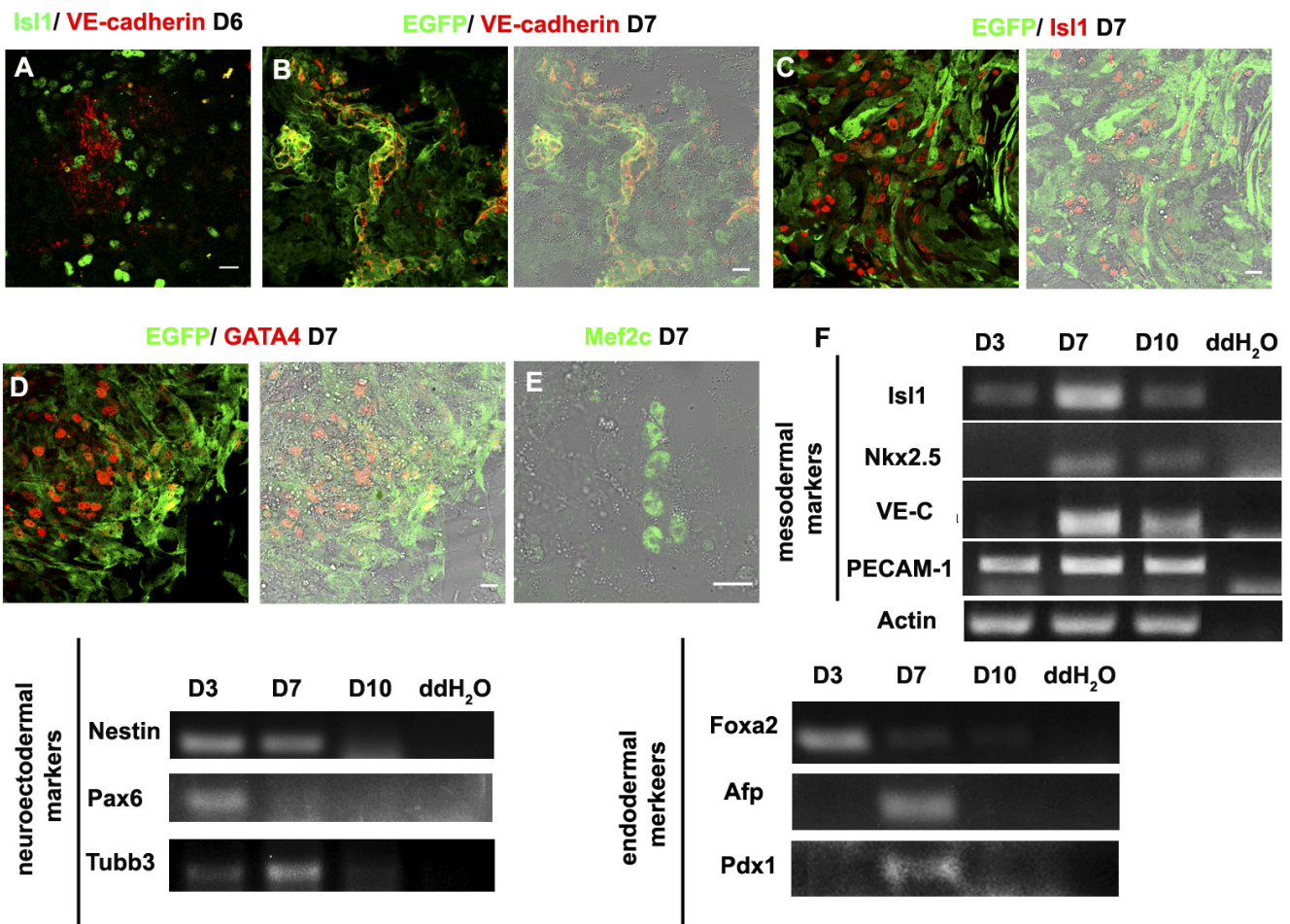


Εικόνα 40. Επιλογή των κυττάρων με ενεργότητα του Pvec (A) Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου απομόνωσης προγονικών κυττάρων με ενεργότητα Pvec. (B) Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης και επιλογής των κυττάρων από τον κλώνο A11 και από κύτταρα ελέγχου wt/E14T τις ημέρες διαφοροποίησης/επιλογής τέσσερα, πέντε και δέκα. (C) Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής από τρία διαφορετικά πειράματα. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν τον μέσο όρο $\pm$ τη μέση διακύμανση ($\text{mean} \pm \text{SD}$) από τρία ανεξάρτητα πειράματα. (D) Ποσοτική ανάλυση των EGFP+ κυττάρων κατά την διαφοροποίηση και επιλογή των κυττάρων από τον κλώνο G11 τις ημέρες διαφοροποίησης τεσσσεράμισι, έξι, επτά και οκτώ με κυτταρομετρία ροής. Παρατίθενται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης με σκοπό το χαρακτηρισμό των επιλεχθέντων κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι υπό τις παραπάνω συνθήκες απομονώνεται ένας μικτός ενδοθηλιακός και καρδιακός πληθυσμός. Συγκεκριμένα οι κυτταρικοί πληθυσμοί που επιβιώνουν είναι VE-cadherin+, Isl1+ και GATA4+ κύτταρα, ενώ ανιχνεύονται επίσης και ελάχιστα Mef2c+ κύτταρα (Εικόνες 41A -41 E). Ανάλυση με πειράματα rt-pcr κατά την επιλογή, τις ημέρες διαφοροποίησης τρία έως

δέκα παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα. Ανιχνεύεται έκφραση των γονιδίων: *Isl1*, *Nkx2.5*, *VE-cadherin*, *PECAM-1* και *Flk1*, επιβεβαιώνοντας την απομόνωση ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων. Σε αντιδιαστολή απουσιάζουν χαρακτηριστικοί δείκτες του νευροεξωδέρματος όπως είναι: νεστίνη, τουμπουλίνη b3 και ο μεταγραφικός παράγοντας *rax6*, καθώς και του ενδοδέρματος όπως είναι: *Foxa2*, α-φετοπρωτεΐνη και *rdx1*. Παρόλα ταύτα, σημειώθηκε αναστολή ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των επιλεγθέντων κυττάρων κατά τη δωδέκατη ημέρα ενώ δεν επιβιώνουν περαιτέρω της δέκατης τέταρτης ημέρας διαφοροποίησης (Εικόνα 41F).

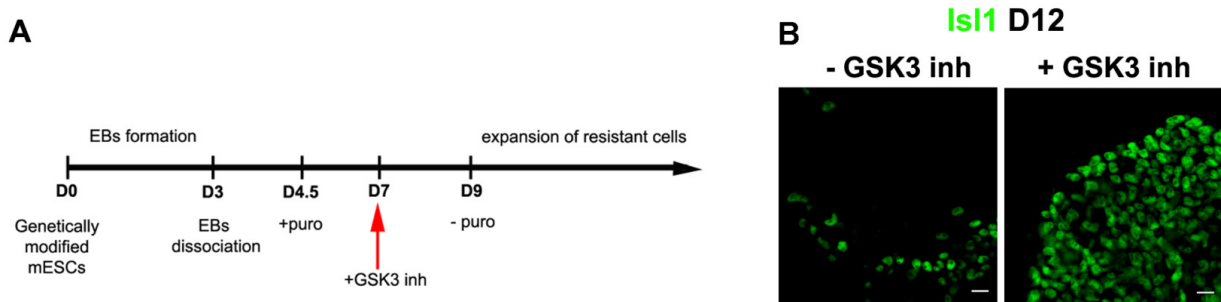
Συμπερασματικά, το πειραματικό μοντέλο διαφοροποίησης και επιλογής έχει σαν αποτέλεσμα την απομόνωση ενός μικτού ενδοθηλιακού και καρδιακού πληθυσμού.



Εικόνα 41. Χαρακτηρισμός των κυττάρων που επιβιώνουν κατά τη διάρκεια της επιλογής υπό τον υποκινητή *Pvec*. (A) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες *Isl1* και *VE-cadherin* την έκτη ημέρα διαφοροποίησης (μιάμιση ημέρα μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού πουρομυκίνης) (B-E) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες *VE-cadherin*, *Isl1*, *GATA4* και *EGFP* την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης. (F) Ημι-ποσοτική ανάλυση rt-pcr για χαρακτηριστικούς δείκτες του μεσοδέρματος, ενδοδέρματος και εξωδέρματος τις ημέρες διαφοροποίησης τρία, επτά και δέκα. Μπάρες 20μm.

3.8 Έκπτυξη/ πολλαπλασιασμός των επιλεχθέντων κυττάρων υπό τον υποκινητή της VE-cadherin, pVEC

Για την αποκατάσταση της ανάπτυξης/ πολλαπλασιασμού των καρδιακών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε ο παράγοντας SB-216763 (178) ο οποίος αναστέλλει την GSK3 ενεργοποιώντας το μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνη. Το μονοπάτι Wnt είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό και την αυτό-ανανέωση των Isl1+ κυττάρων (59). Αρχικά, το SB-216763 προστέθηκε σε διαφορετικές ημέρες κατά τη διαφοροποίηση (τρία με οκτώ) και μελετήθηκε η επίδραση του στον καρδιακό πληθυσμό. Όταν το SB-216763 προστίθεται την τρίτη και τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης τα κύτταρα δεν επιζούν κατά την επιλογή. Αποτέλεσμα το οποίο συνάδει με το χρονικό σημείο κατά το οποίο το μονοπάτι Wnt πρέπει να κατασταλεί για την περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων του καρδιακού μεσοδέρματος. Αντίθετα, όταν το SB-216763 προστίθεται την πέμπτη με την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης/ επιλογής, προκαλεί την αύξηση του Isl1+ κυτταρικού πληθυσμού την δωδέκατη ημέρα διαφοροποίησης (Εικόνα 42B). Πειράματα ανοσοφθορισμού στα επιλεχθέντα κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί ή όχι ο παράγοντας SB δείχνουν την αύξηση του πληθυσμού παρουσία του SB-216763. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα κύτταρα μεγαλώνουν αργά, αλλά μπορούν να επιβιώνουν μέχρι και τέσσερις ανακαλλιέργειες για περισσότερες από εικοσιπέντε ημέρες ενώ μπορούν να παγώσουν και να ξεπαγώσουν διατηρώντας τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες τους.

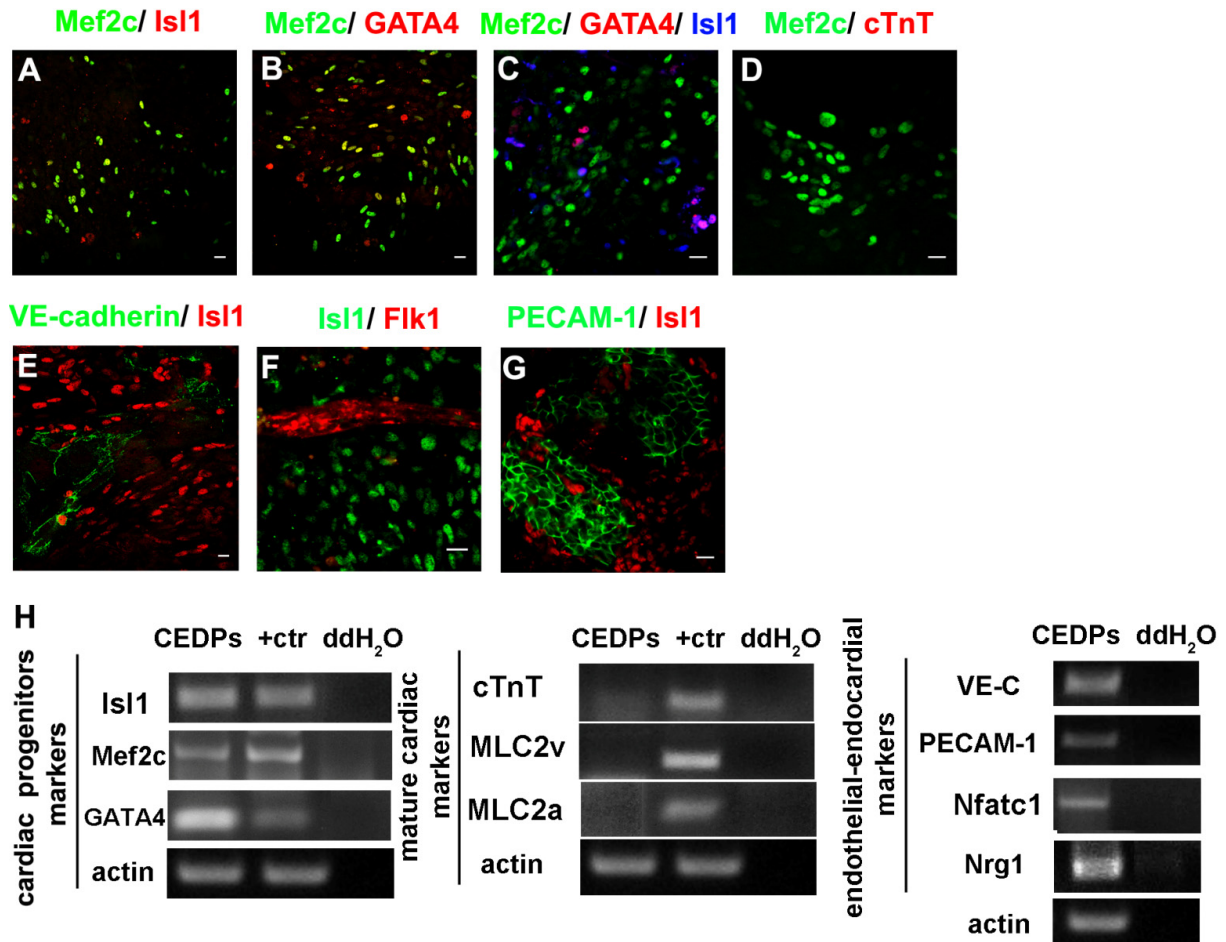


Εικόνα 42. Πολλαπλασιασμός των επιλεχθέντων κυττάρων. (A) Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ανάπτυξης/ καλλιέργειας των επιλεχθέντων κυττάρων. (B) Ανοσοφθορισμός παρουσία και απουσία του παράγοντα SB-216763 για την πρωτεΐνη Isl1. Μπάρα 20μm.

Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκε περαιτέρω, ο απομονωμένος κυτταρικός πληθυσμός. Πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν την ύπαρξη και αύξηση των Mef2c⁺ κυττάρων, σε σύγκριση με τον μικρό αριθμό Mef2c⁺ κυττάρων που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της επιλογής, απουσία του παράγοντα το SB-216763. Ανιχνεύθηκε, επίσης ένας Isl1⁺/ Mef2c⁺/ GATA4⁺ πληθυσμός που αντιστοιχεί στο δευτερογενές εμπρόσθιο καρδιακό πεδίο (Εικόνες 43Α -43C). Έλεγχος για την έκφραση της cTnT, έδειξε ότι απουσιάζει από τα επιλεχθέντα κύτταρα, αποδεικνύοντας ότι ο προγονικός καρδιακός πληθυσμός δεν διαφοροποιείται παρουσία του παράγοντα SB-216763 (Εικόνα 43D). Περαιτέρω πειράματα rt-pcr έδειξαν ότι απουσιάζουν επίσης οι MLC2v και MLC2a που αποτελούν δείκτες των ώριμων κοιλιακών και κολπικών καρδιομυοκυττάρων αντίστοιχα. Μελετήθηκαν επίσης οι ενδοθηλιακοί δείκτες VE-cadherin, PECAM-1 και Flk1 με πειράματα ανοσοφθορισμού(Εικόνες 43Ε -43G) και rt-pcr και παρατηρήθηκε η έκφρασή τους σε μεταγραφικό και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Παράλληλα ανιχνεύθηκε έκφραση δεικτών του ενδοκαρδίου: του Nfatc1, μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος δεν ανιχνεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι απαραίτητος για τη δημιουργία των βαλβίδων και της neuregulin1 (Nrg1), η οποία είναι απαραίτητη κατά το στάδιο της δοκίδωσης (Εικόνα 43Η)

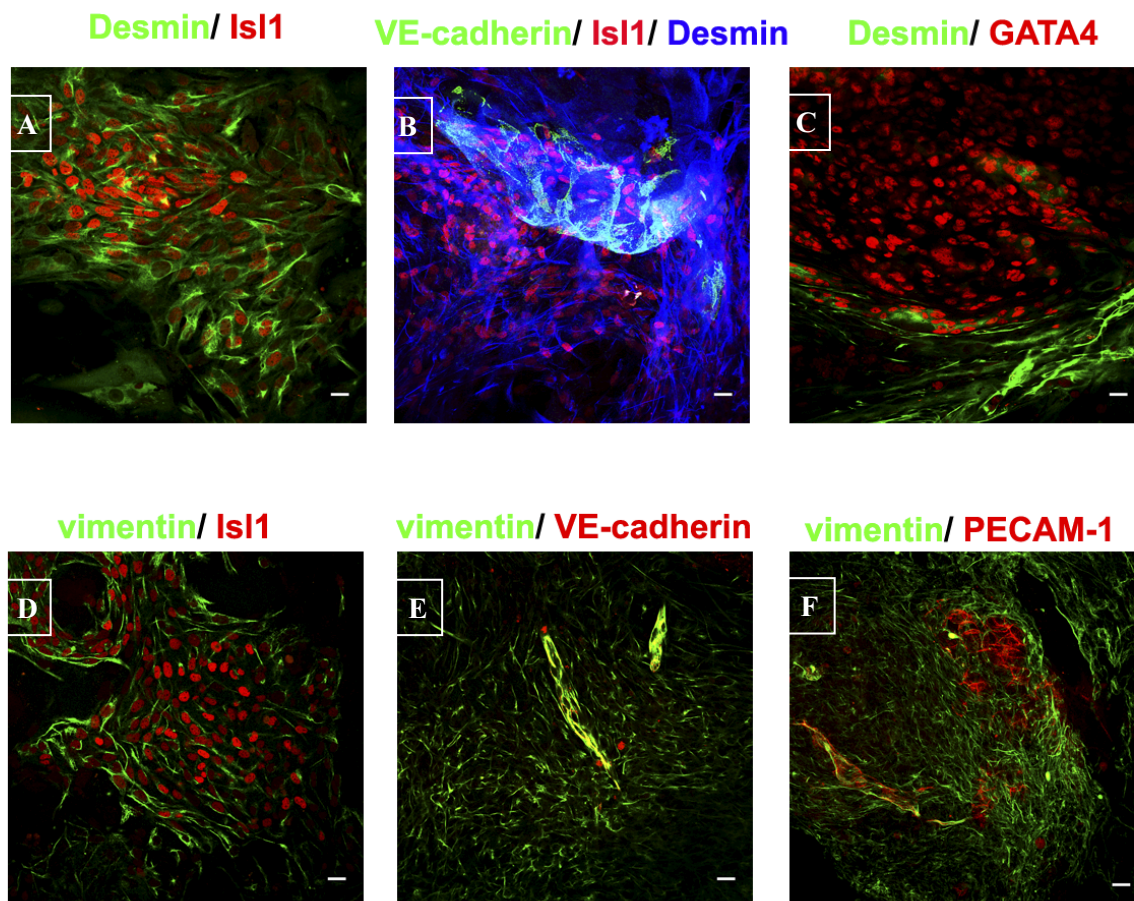
Σύμφωνα με τα παραπάνω παρατηρείται ότι κατά την ανάπτυξη των επιλεχθέντων κυττάρων τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται παράλληλα με τα καρδιακά. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην παρουσία του παράγοντα SB-216763 είτε στη διαφοροποίηση των Isl1⁺ καρδιαγγειακών προγονικών κυττάρων από τα οποία μπορούν να προκύψουν και ενδοθηλιακά κύτταρα άλλα ταυτόχρονα μπορούν να ισχύουν και οι δύο υποθέσεις.

Άρα, συμπερασματικά υπό αυτές τις συνθήκες πολλαπλασιάζεται και αναπτύσσεται ένας καρδιακός/ ενδοθηλιακός διπλός προγονικός πληθυσμός (Cardiac Endothelial Dual progenitors-CEDPs).



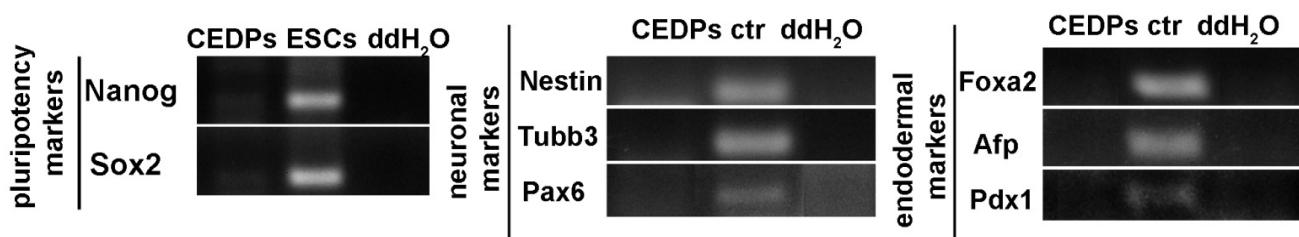
Εικόνα 43. Χαρακτηρισμός των αναπτυσσόμενων επιεχθέντων κυττάρων (Α-Γ) Ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες Mef2c, GATA4, Isl1, cTnT, VE-cadherin, Flk1, PECAM-1. Μπάρες 20μm. (Η) Ανάλυση rt-pcr για δείκτες προγονικών και ώριμων καρδιακών κυττάρων, καθώς και για ενδοθηλιακούς, ενδοκαρδιακούς δείκτες.

Ακολούθως, μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνη και βιμεντίνη στα Isl1⁺ και στα VE-cadherin⁺ κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τα Isl1⁺ κύτταρα εκφράζουν δεσμίνη, σε αντίθεση με τα VE-cadherin⁺ κύτταρα (Εικόνες 44Α, 44Β). Η δεσμίνη είναι μια υπομονάδα των ενδιάμεσων ινιδίων η οποία εκφράζεται στα καρδιομυοκύτταρα, στα σκελετικά και στα λεία μυϊκά κύτταρα. Στα καρδιακό μυϊκό ιστό, η δεσμίνη βρίσκεται στους δίσκους -Z καθώς και στους εμβόλιμους δίσκους. Επίσης έκφραση της δεσμίνης παρατηρήθηκε σε ορισμένα GATA4⁺ κύτταρα και όχι στην πλειοψηφία τους (Εικόνα 44C) Περαιτέρω μελέτη έδειξε ότι έκφραση της βιμεντίνης πέρα από τα VE-cadherin⁺ και PECAM-1⁺ ενδοθηλιακά κύτταρα, παρατηρήθηκε επίσης και στα Isl1⁺ κύτταρα (Εικόνες 44D -43F).



Εικόνα 44. Χαρακτηρισμός των επιλεγθέντων κυττάρων ως προς τις πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων. (A-F) Ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες Isl1, VE-cadherin, GATA4, PECAM-1., δεσμίνη και βιμεντίνη στα επιλεγθέντα αναπτυσσόμενα κύτταρα. Μπάρες 20μm

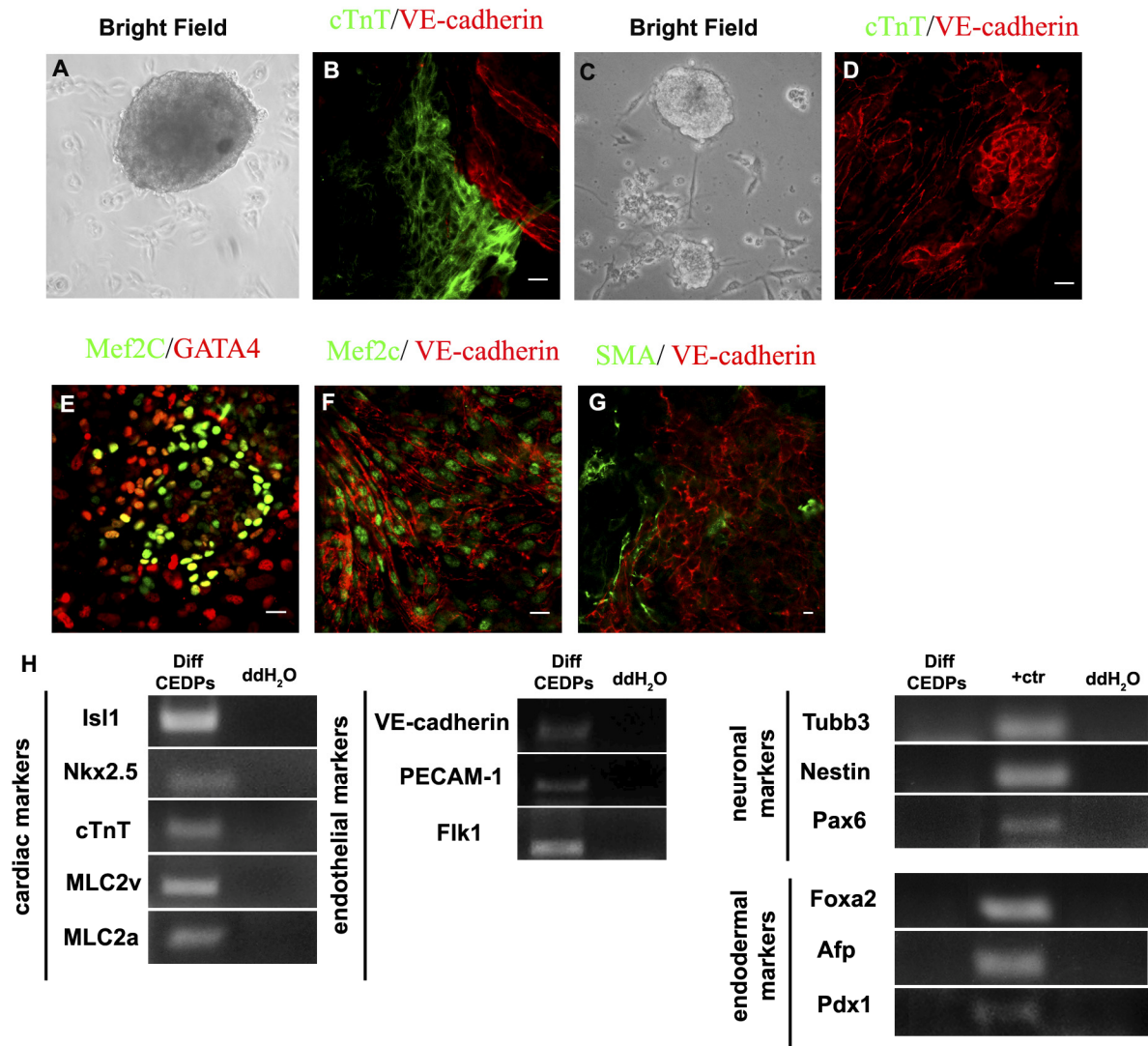
Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι η προσθήκη του SB-216763 ενεργοποιεί βλαστικά κυττάρων ή άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, πραγματοποιήθηκε έλεγχος στα CEDPs για τους δείκτες πολυδυναμίας: Nanog και Sox2, για δείκτες ενδοδέρματος: Foxa2, Afp και Pdx1 καθώς και νευροεξωδέρματος: Tubb3, nestin και pax6. Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση για κανένα από τους παραπάνω δείκτες στα CEDPs.



Εικόνα 45. Ανάλυση rt-pcr για δείκτες της πολυδυναμίας, του ενδοδέρματος καθώς και του νευροεξωδέρματος.

3.9 *In vitro* διαφοροποίηση των CEDPs

Ως τώρα έχει παρατηρηθεί ότι ενεργοποίηση του Wnt στα CEDPs προάγει τον πολλαπλασιασμό των Isl1+ κυττάρων αλλά δεν επιτρέπει την περαιτέρω διαφοροποίησή τους. Για να επιτευχθεί η επαγωγή της διαφοροποίησή τους, αφαιρέθηκε ο παράγοντας SB-216763 από το καλλιεργητικό μέσο και στη συνέχεια τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και καλλιεργήθηκαν παρουσία νέου θρεπτικού μέσου σε τρυβλία που δεν επιτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων. Τα κύτταρα αρχικά σχηματίζουν σφαίρες και περίπου δέκα ημέρες αργότερα εμφανίζουν περιοχές που «πάλλονται». Την ίδια χρονική στιγμή παρατηρούνται cTnT+ καρδιομυοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν αγγειακές δομές (Εικόνες 46A, 46B). Σε πειράματα ελέγχου όπου η προσθήκη του SB-216763 συνεχίζεται κατά το σχηματισμό και την ανάπτυξη των κυτταρικών σφαιρών, δεν παρατηρήθηκε δημιουργία «παλλόμενων» περιοχών ούτε ανίχνευση cTnT+ κυττάρων (Εικόνες 46C, 46D). Κατά τη διαφοροποίηση των CEDPs ανιχνεύθηκαν Mef2c+ και GATA4+ καρδιακοί πληθυσμοί με ένα ποσοστό των κυττάρων να συν-εκφράζει και τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 46E), ενώ ανάλυση της διαφοροποίησης με πειράματα *rt-pcr*, έδειξε έκφραση δεικτών των ώριμων καρδιομυοκυττάρων cTnT, MLC2v και MLC2a (Εικόνα 46H). Στη συνέχεια, μελετώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκε ότι οι ενδοθηλιακές συστάδες αυξάνονται σχηματίζοντας χαρακτηριστικές πλακώδης καθώς και αγγειακές δομές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, η συν-έκφραση της VE-cadherin και το Mef2C, σε έναν υπό-πληθυσμό των VE-cadherin+ κυττάρων. Επίσης ανιχνεύθηκε έκφραση της SMA σε άμεση γειτνίαση με ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνες 46F, 46I). Τέλος, για να αποκλειστεί η δημιουργία άλλων κυτταρικών τύπων κατά τη διαφοροποίηση των CEDPs πραγματοποιήθηκαν πειράματα *rt-pcr* για τον έλεγχο της έκφρασης δεικτών του ενδοδέρματος και του νευρο-εξωδέρματος. Δεν παρατηρήθηκαν κύτταρα ενδοδερμικής ή νευρο-εξωδερμικής προέλευσης (Εικόνα 46H).



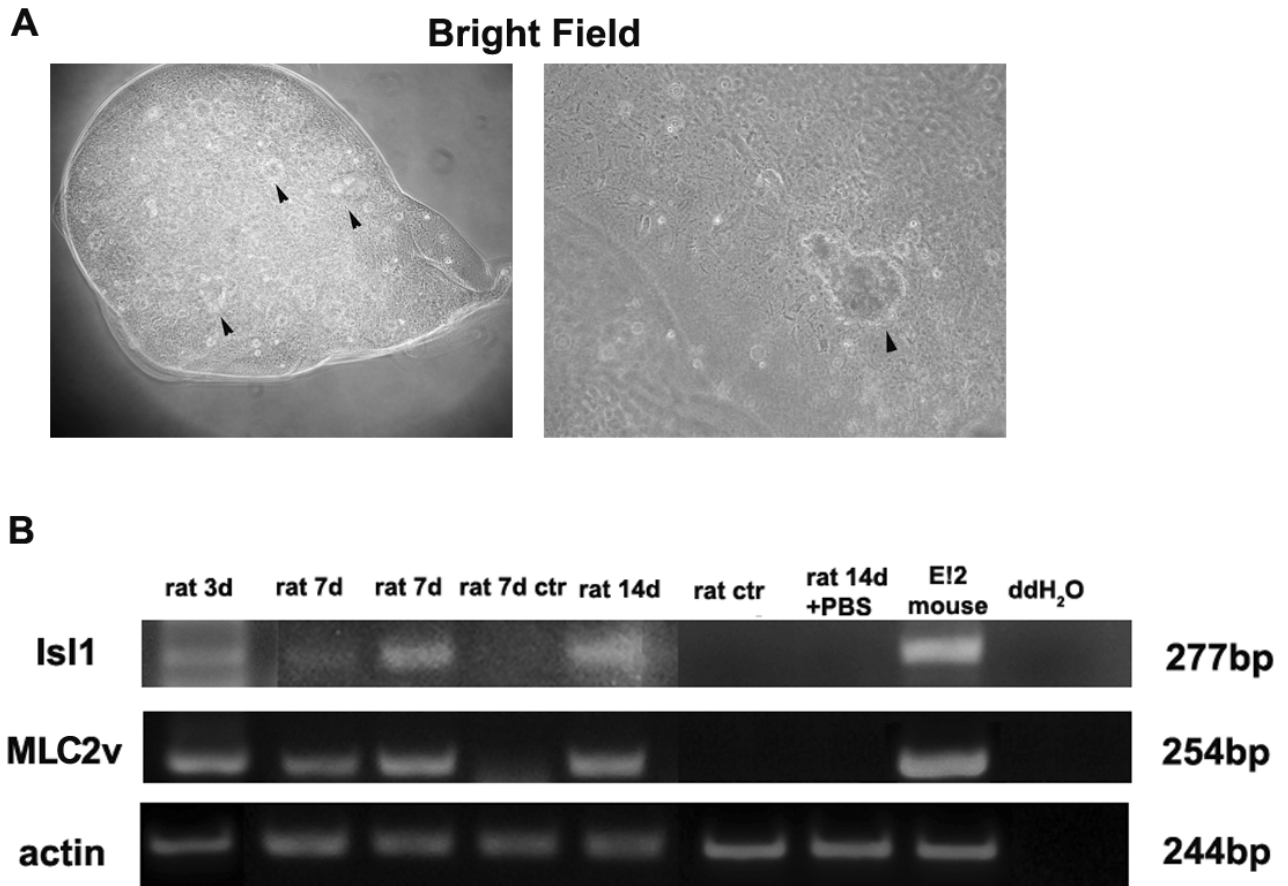
Εικόνα 46. Διαφοροποίηση *in vitro* των CEDPs. (A) Φωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου αντιπροσωπευτικής εικόνας των σφαιρών που σχηματίζονται έπειτα από τη διαφοροποίηση των CEDPs (B) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες cTnT και VE-cadherin κατά τη διαφοροποίηση των CEDPs. (C) Φωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου αντιπροσωπευτικής εικόνας των σφαιρών που σχηματίζονται έπειτα από τη διαφοροποίηση των CEDPs παρουσία του παράγοντα SB-216763. (D) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες cTnT και VE-cadherin κατά τη διαφοροποίηση των CEDPs παρουσία του παράγοντα SB-216763. (E-G) Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες Mef2C, GATA4, SMA και VE-cadherin κατά τη διαφοροποίηση των CEDPs. (H) Ανάλυση rt-pcr για δείκτες των καρδιακών προγονικών κυττάρων καθώς και των καρδιομυοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, του ενδοδέρματος καθώς και του νευρο-εξωδέρματος. Μπάρες 20μm

3.10 *In vivo* διαφοροποίηση των CEDPs έπειτα από εμφύτευση τους σε υγιείς και εμφραγματικούς επίμυες.

Γνωρίζοντας ότι τα CEDPs διαφοροποιούνται *in vitro* περαιτέρω στόχος μας ήταν η εμφύτευση των κυττάρων σε επίμυες και ο έλεγχος της *in vivo* διαφοροποίησής τους. Για να επιτευχθεί η εμφύτευση χρησιμοποιήθηκε ικρίωμα αλγινικού οξέως, ενός βιοδιασπώμενου πολυσακχαρίτη με μεγάλο αριθμό εφαρμογών στη βιοϊατρική. Αρχικά, ελέγχθηκε η επιβίωση και η διαφοροποίηση των CEDPs σε υδρογέλη αλγινικού οξέος και επιβεβαιώθηκε ότι τα CEDPs διαφοροποιούνται επιτυχώς. Συγκεκριμένα δημιουργούνται κυτταρικές σφαίρες μέσα στην υδρογέλη (Εικόνα 47Α) οι οποίες διατηρούνται μέχρι και τη δέκατη ημέρα διαφοροποίησης, όταν το βιοϋλικό αρχίζει να διασπάται. Η διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων είναι παρόμοια με αυτή σε θεραπευτικό μέσο όπως περιγράφηκε παραπάνω (κεφ.3.9), με τη διαφορά ότι οι «παλλόμενες» σφαίρες εμφανίζονται μετά την δωδέκατη ημέρα.

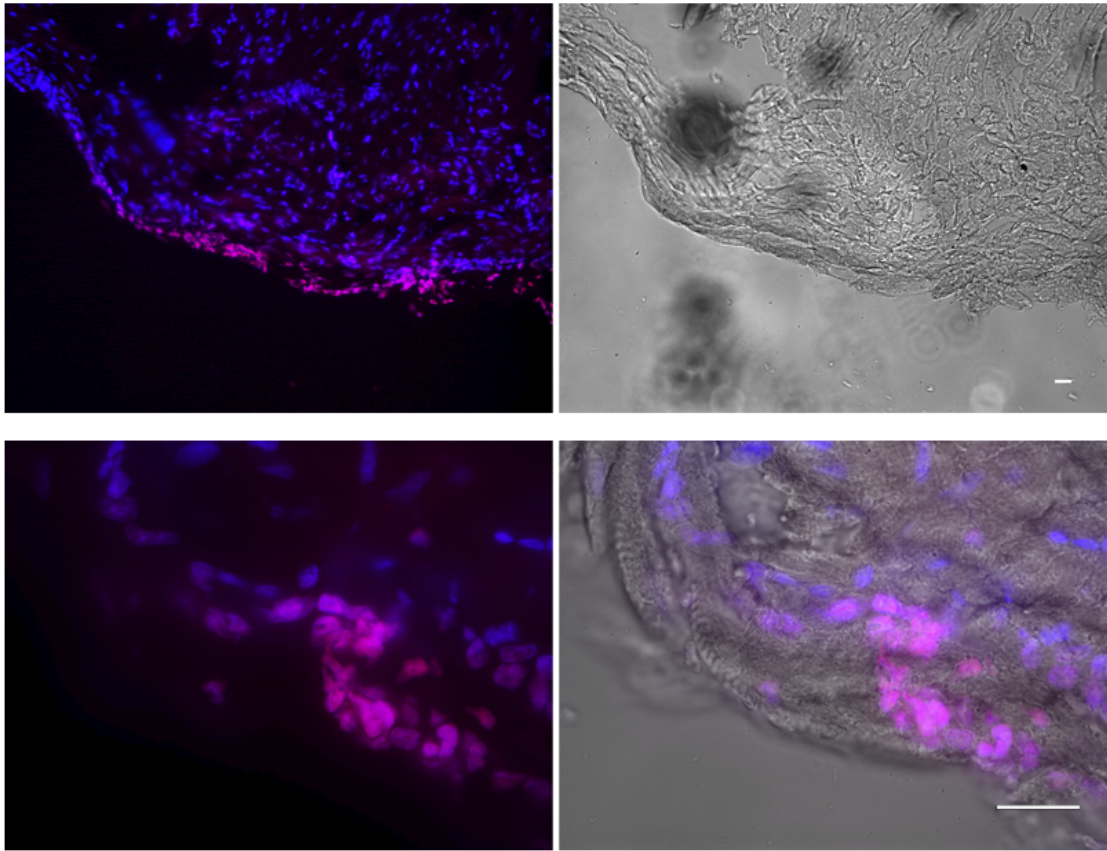
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εμφύτευση των ενσωματωμένων στο αλγινικό οξύ CEDPs στο μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας ανοσοκατασταλμένων επιμυών και παρατηρήθηκε η πορεία των κυττάρων *in vivo*. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε έγχυση ισοτονικού διαλύματος PBS σε ανοσοκατασταλμένα ζώα ελέγχου.

Οι επίμυες θυσιάστηκαν έπειτα από τρεις, επτά και δεκατέσσερις ημέρες από τη μεταμόσχευση των κυττάρων και αφαιρέθηκαν οι καρδιές τους για περαιτέρω ανάλυση. Αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση του παράγοντα Isl1, ο οποίος ανιχνεύεται στα CEDPs και στα προϊόντα διαφοροποίησής τους, ενώ απουσιάζει από την ενήλικη καρδιά. Η έκφραση του ανιχνεύθηκε μέχρι και την δέκατη τέταρτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση, ενώ αντίθετα δεν παρατηρήθηκε έκφραση του Isl1 στα ζώα ελέγχου. Το γεγονός αυτό συνηγορεί ότι τα CEDPs επιβιώνουν μετά την εμφύτευσή τους. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση του παράγοντα MLC2v, ο οποίος ανιχνεύεται μόνο κατά τη διαφοροποίηση των CEDPs και εκφράζεται επίσης στα ενήλικα ζώα. Για να επιτευχθεί η ειδική ανίχνευση του σχεδιάστηκαν εκκινητές, οι οποίοι είναι ειδικοί για τον μυ (από όπου προέρχονται τα CEDPs) και όχι για τον επιμύ σύμφωνα με ειδικό πρόγραμμα από την βάση του NCBI. Παρατηρήθηκε έκφραση του MLC2v έπειτα από τρεις, επτά και δεκατέσσερις ημέρες μετά την εμφύτευση, ενώ δεν ανιχνεύθηκε έκφραση στα ζώα ελέγχου, επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα των εκκινητών.

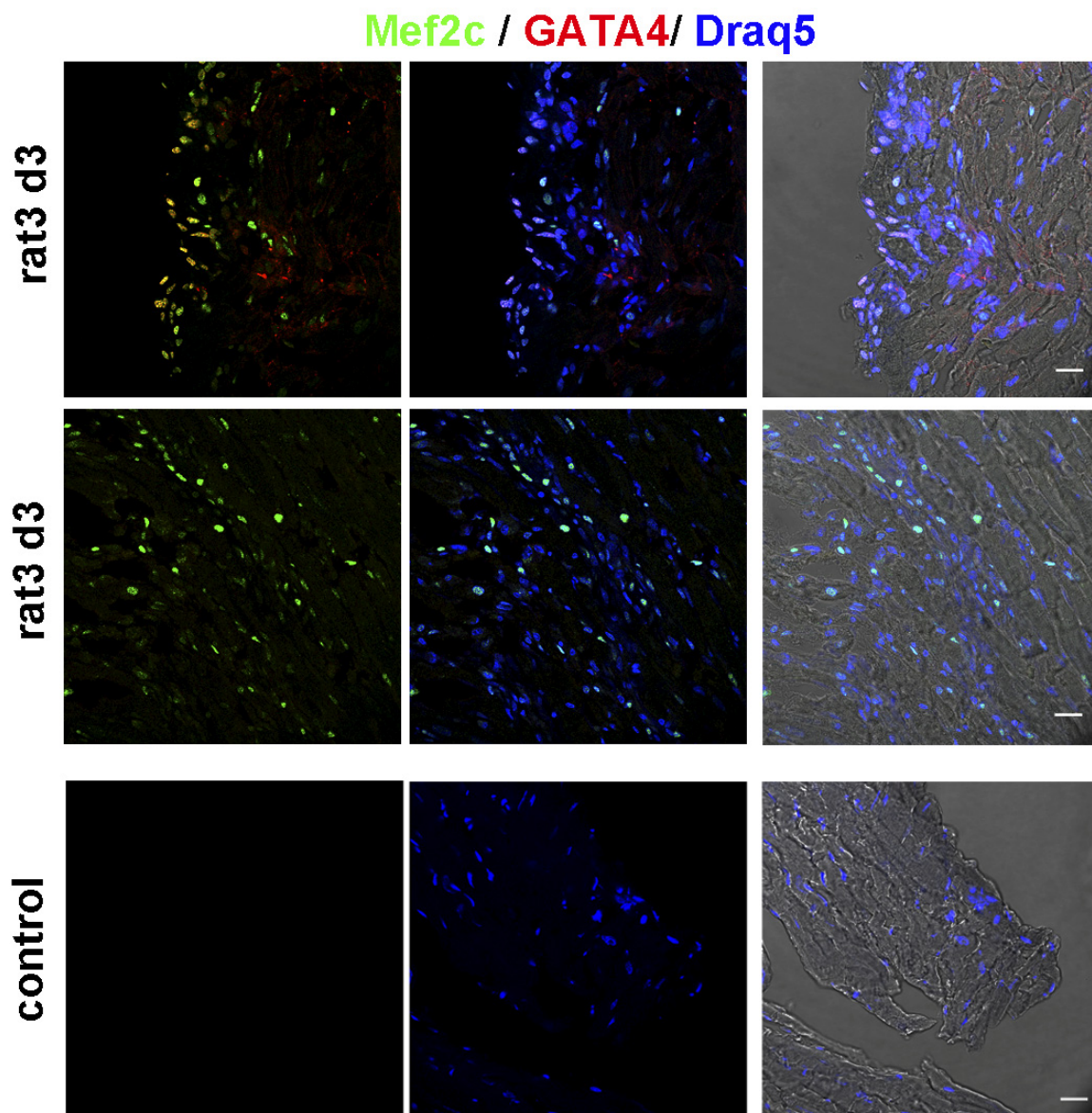


Εικόνα 47. (Α) Τα CEDPs διαφοροποιούνται σε υδρογέλη αλγινικού οξέος. Τα βέλη (↑) απεικονίζουν τις σφαίρες που δημιουργούν τα CEDPs. (Β) Ανάλυση rt-pcr για τον Isl1 καρδιακό προγονικό δείκτη καθώς και για τον MLC2v, δείκτη των καρδιομυοκυττάρων. Τα δείγματα προέρχονται από την αριστερή κοιλία όπου έγινε η εμφύτευση των CEDPs. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα από έμβryo μύος κατά την εμβρυική ημέρα δώδεκα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από ενήλικο επιμύ, από επίμυες στους οποίους έχει γίνει έγχυση PBS (ζώα ελέγχου) καθώς και δείγμα από τον δεξιό κόλπο της καρδιάς έπειτα από επτά ημέρες από την εμφύτευση των CEDPs. Οι εκκινητές της ακτίνης αναγνωρίζουν και το γονίδιο του μυ αλλά και του επιμύ.

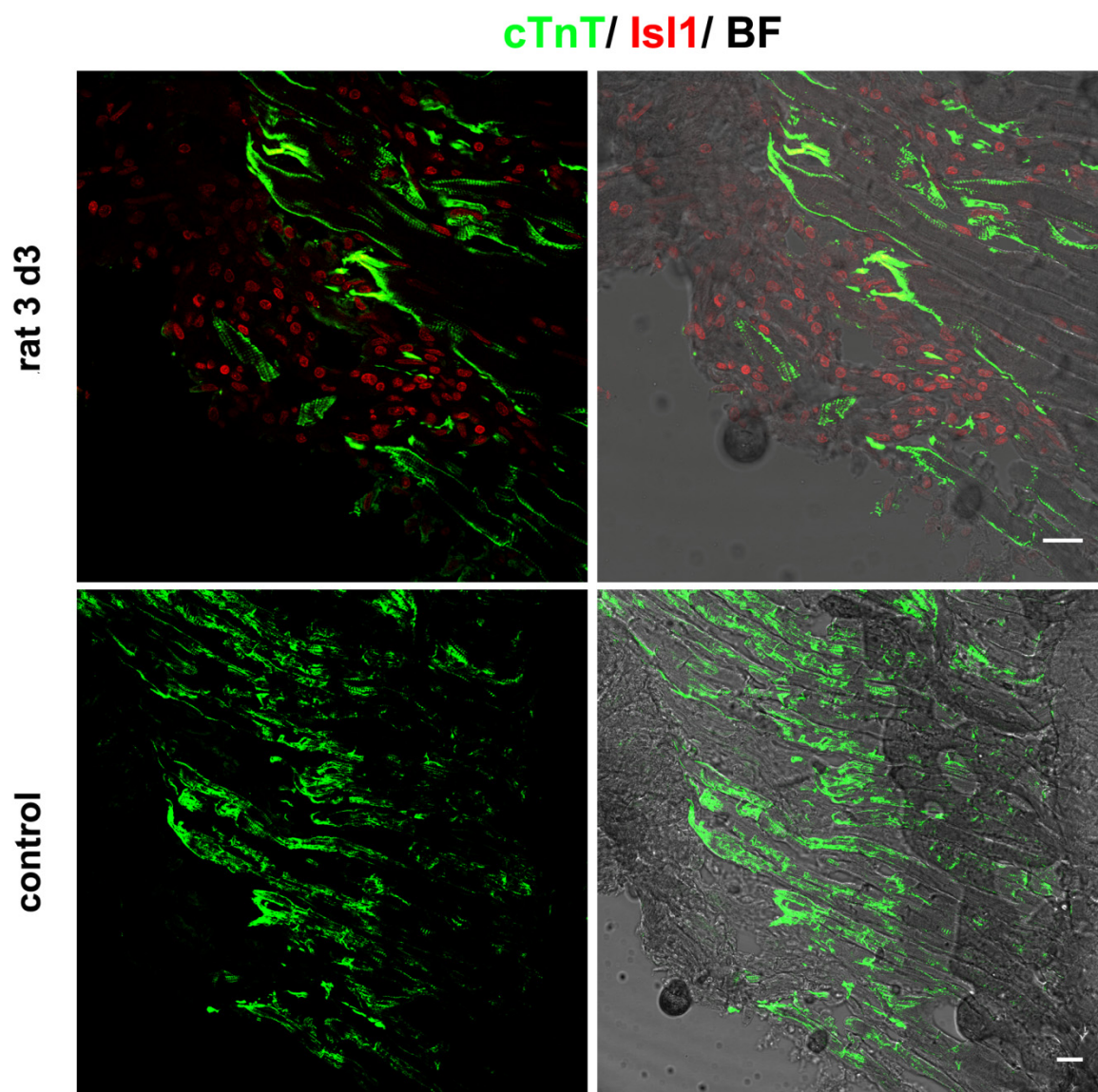
Στη συνέχεια, ανιχνεύθηκε με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ο Isl1+ πληθυσμός στους επίμυες την τρίτη ημέρα μετά την εμφύτευση, ενώ απουσιάζει από τα ζώα ελέγχου (Εικόνα 48). Παράλληλα την τρίτη ημέρα ανιχνεύεται GATA4+ καθώς και Mef2c+/GATA4+ πληθυσμός, ο οποίος απουσιάζει από τα ζώα ελέγχου (Εικόνα 49). Η συν-έκφραση του GATA4 με το Mef2c έχει παρατηρηθεί τόσο στα CEDPs καθώς και κατά την *in vitro* διαφοροποίησή τους. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που προέρχονται από τα CEDPs βρίσκονται συγκεντρωμένα σε περιοχές που δεν ανιχνεύεται έκφραση της cTnT τουλάχιστον την τρίτη ημέρα μετά την εμφύτευση (Εικόνα 50, 51).

Isl1/ DAPI /BF

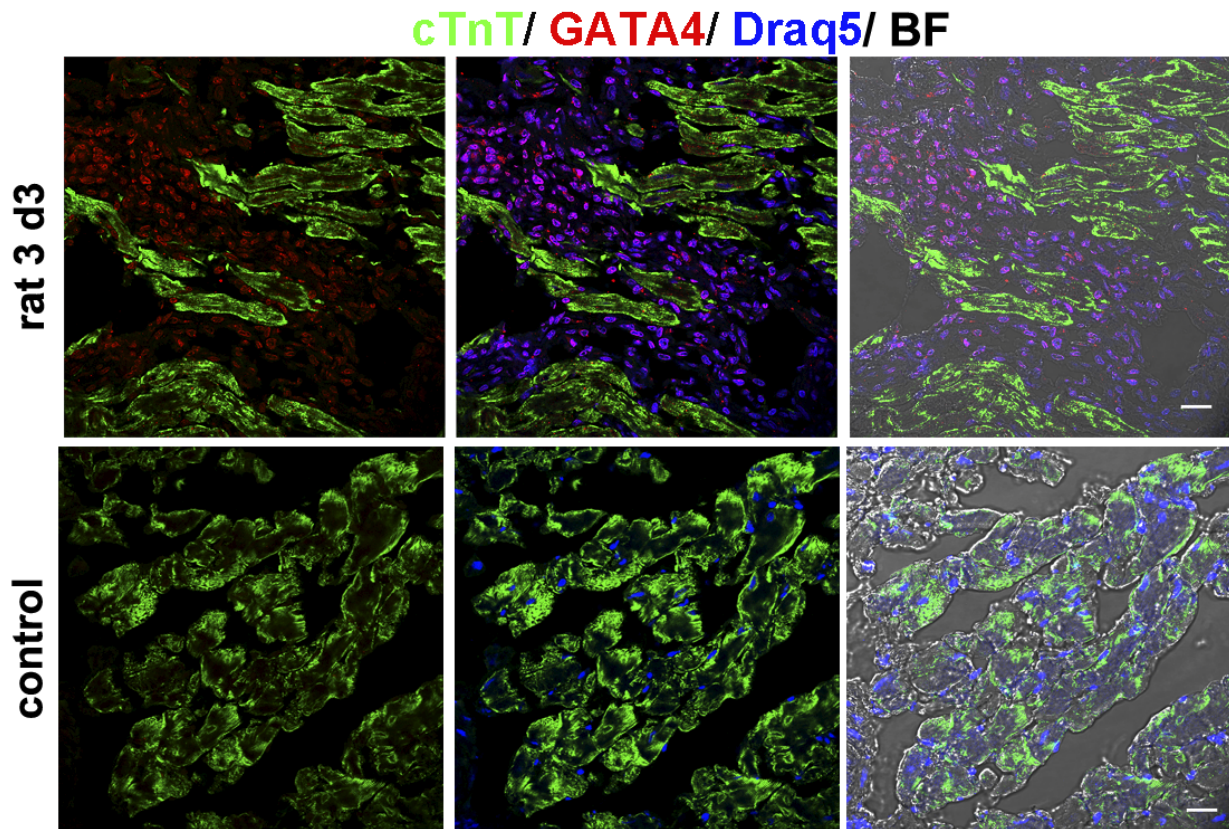
Εικόνα 48. (Α) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επιμυών την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs για την πρωτεΐνη Isl1. Πραγματοποιήθηκε χρώση με DAPI για την απεικόνιση των πυρήνων. (Β) Μεγέθυνση της περιοχής. Μπάρες 20μm.



Εικόνα 49. (A) (rat 3 d3) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επιμυών την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs για τις πρωτεΐνες GATA4 και Mef2c. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. (B) (Control) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επιμυών την τρίτη ημέρα έπειτα από την έγχυση PBS στους επίμυες ελέγχου για τις πρωτεΐνες GATA4 και Mef2c. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. Μπάρες 20μm.

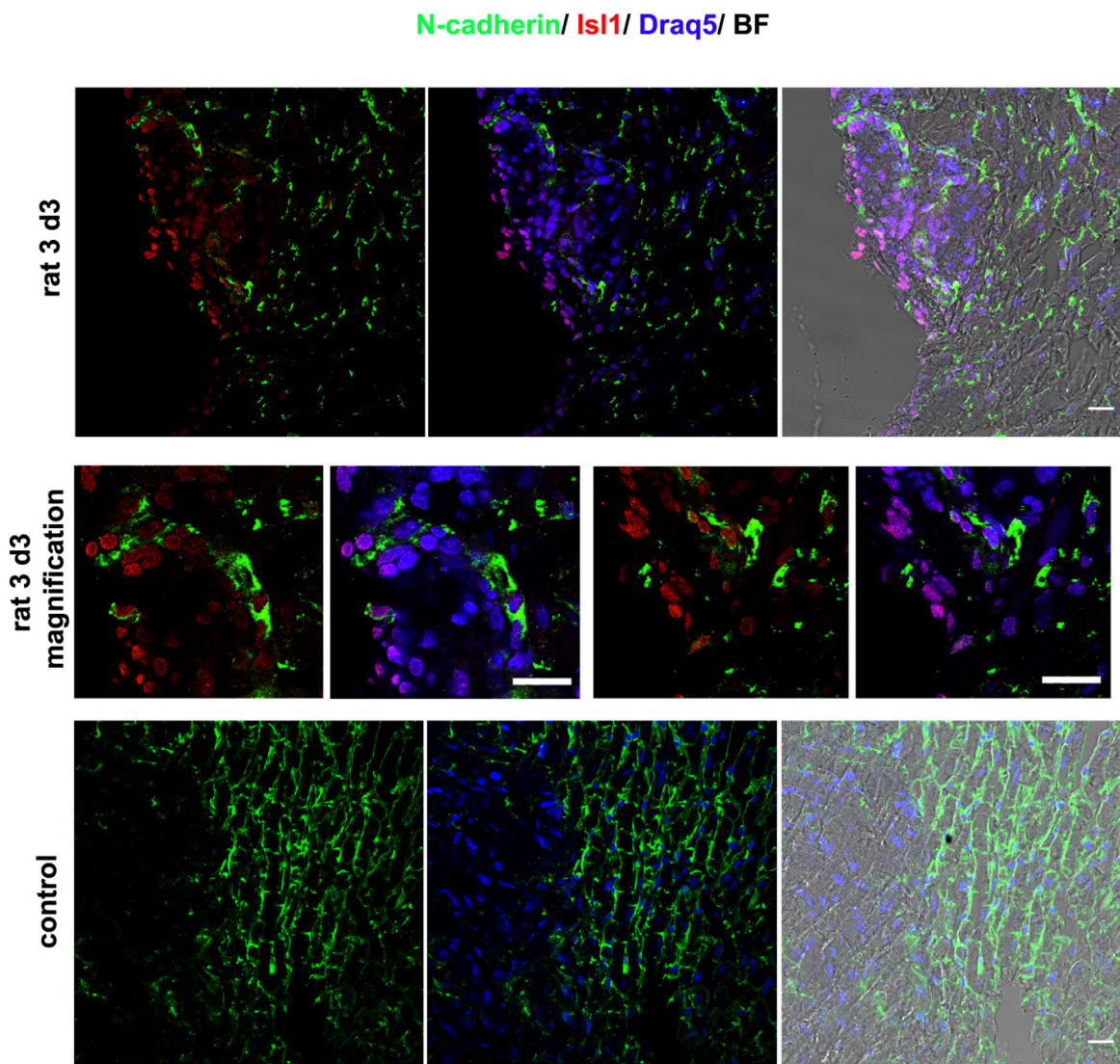


Εικόνα 50. (Α) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επίμυων την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs για τις πρωτεΐνες Isl1 και cTnT. (Β) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς την τρίτη ημέρα έπειτα από την έγχυση PBS στους επίμυες ελέγχου για τις πρωτεΐνες Isl1 και cTnT. Μπάρες 20μm.



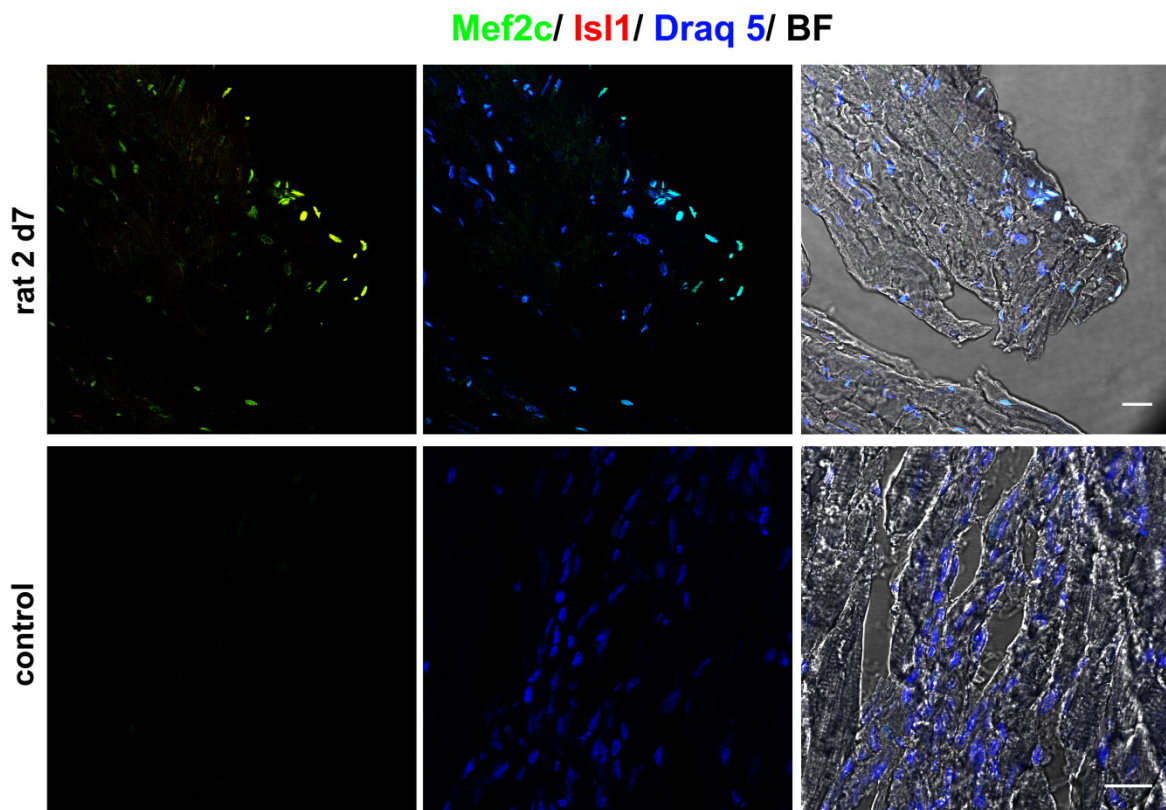
Εικόνα 51. (Α) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επίμυων την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs για τις πρωτεΐνες GATA4 και cTnT. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. (Β) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επίμυων ελέγχου την τρίτη ημέρα έπειτα από την έγχυση PBS στους επίμυες για τις πρωτεΐνες GATA4 και cTnT. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. Μπάρες 20μm.

Τα Isl1+ κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση της N-cadherin κατά την *in vitro* ανάπτυξη των CEDPs. Σε συμφωνία, πειράματα ανοσοϊστοχημείας κατέδειξαν ότι, τα Isl1+ κύτταρα αρχίζουν να δημιουργούν N-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης κατά την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs.

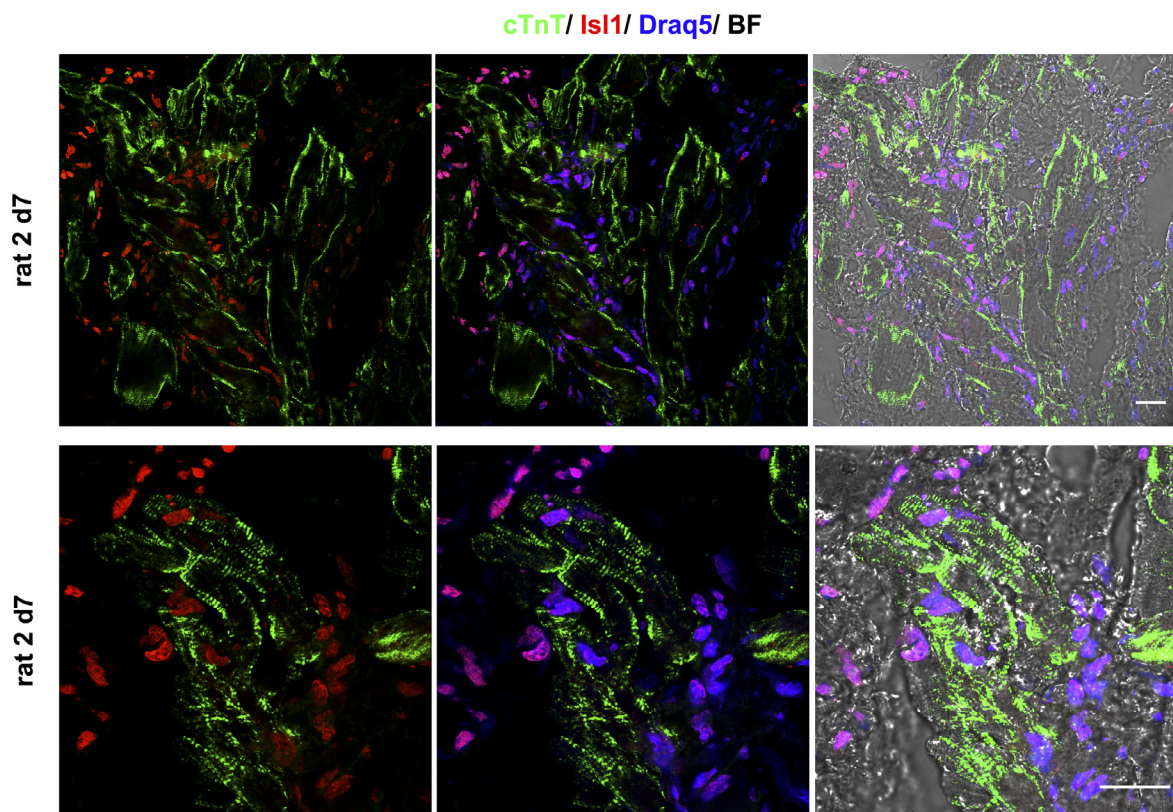


Εικόνα 52. (Α) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυστομές καρδιάς επίμυων την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs για τις πρωτεΐνες N-cadherin και Isl1. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. (Β) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυστομές καρδιάς επίμυων την τρίτη ημέρα έπειτα από την έγχυση PBS στους επίμυες ελέγχου για τις πρωτεΐνες N-cadherin και Isl1. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. Μπάρες 20μm.

Isl1+ κύτταρα προερχόμενα από τα CEDPs ανιχνεύθηκαν επίσης και κατά την έβδομη ημέρα μετά την εμφύτευση. Παρατηρήθηκε ότι ορισμένα Isl1+ κύτταρα συν-εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Mef2c (Εικόνα 53). Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι Isl1+ και GATA4+ κύτταρα ανιχνεύονται σε cTnT+ περιοχές (Εικόνα 54, 55). Λόγω της τοπολογίας όμως της cTnT και του γεγονότος ότι τα καρδιομυοκύτταρα στα θηλαστικά είναι πολυπύρηννα, δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα με ανοσοϊστοχημεία αν υπάρχει συν-έκφραση των Isl1+ ή των GATA4+ κυττάρων με την cTnT.

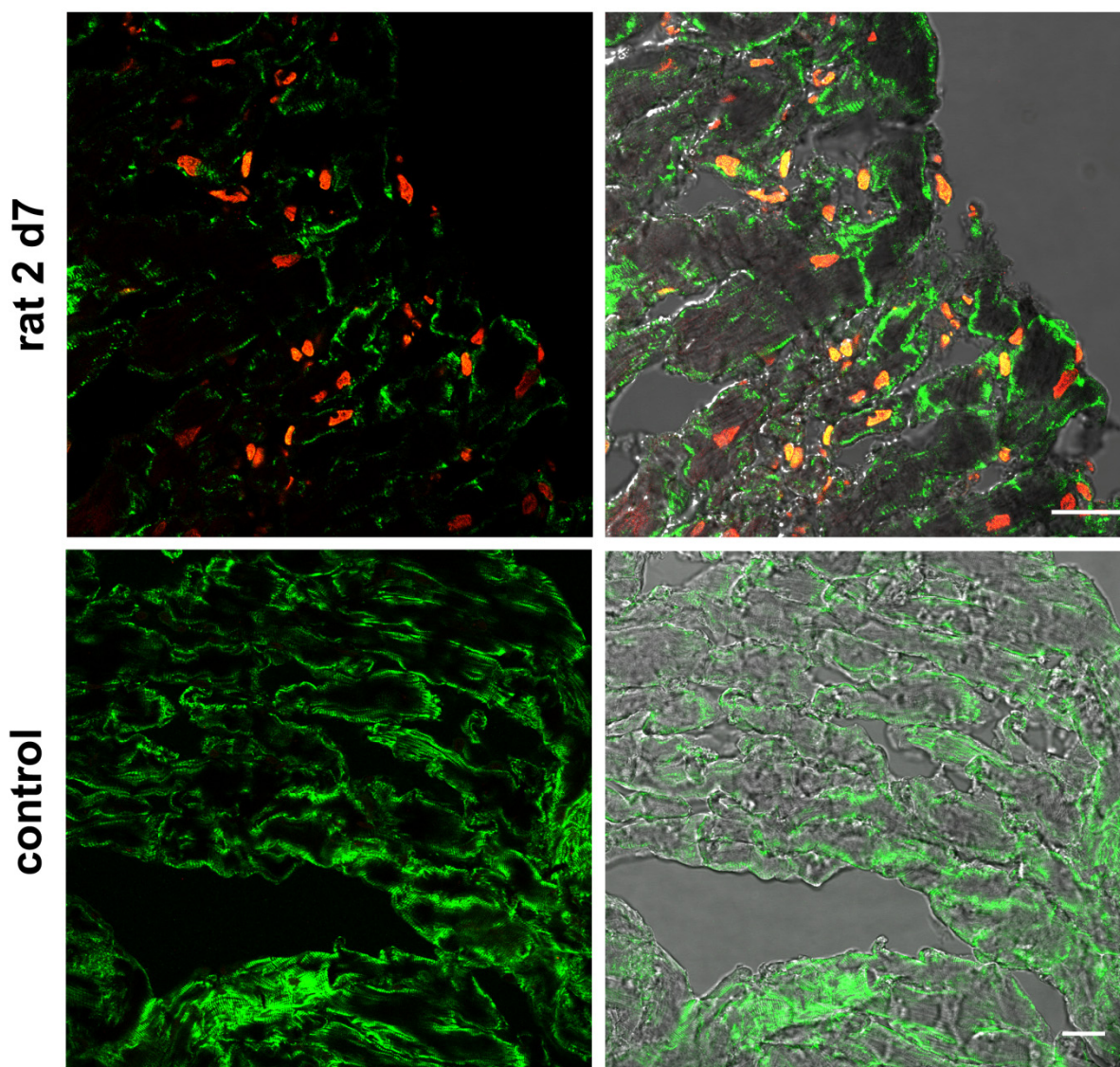


Εικόνα 53. (Α) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επίμυων την έβδομη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs για τις πρωτεΐνες Mef2C και Isl1. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων.(Β) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επίμυων την έβδομη ημέρα έπειτα από την έγχυση PBS στους επίμυες ελέγχου για τις πρωτεΐνες Mef2C και Isl1. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. Μπάρες 20μm.



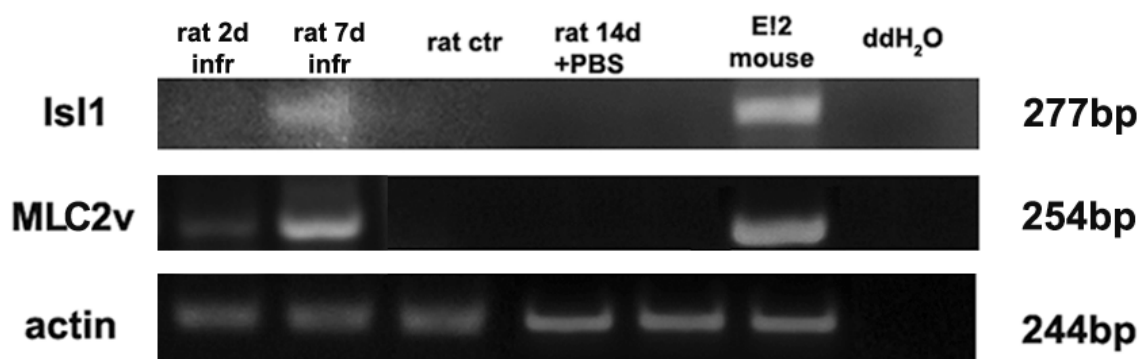
Εικόνα 54. (Α) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυοτομές καρδιάς επίμυων την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs για τις πρωτεΐνες cTnT και Isl1. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. (Β) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυοτομές καρδιάς επίμυων την τρίτη ημέρα έπειτα από την έγχυση PBS στους επίμυες ελέγχου για τις πρωτεΐνες cTnT και Isl1. Πραγματοποιήθηκε χρώση με Draq5 για την απεικόνιση των πυρήνων. Μπάρες 20μm.

cTnT/GATA4/ BF



Εικόνα 55. (Α) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επίμυων την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση των CEDPs για τις πρωτεΐνες GATA4 και Isl1 (Β) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κρυτομές καρδιάς επίμυων την τρίτη ημέρα έπειτα από την έγχυση PBS στους επίμυες ελέγχου για τις πρωτεΐνες GATA4 και Isl1. Μπάρες 20μm.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πιλοτικά πειράματα εμφύτευσης CEDPs ενσωματωμένων σε αλγινικό οξύ σε εμφραγματικές καρδιές ανοσοκατασταλμένων επίμυων και παρατηρήθηκε η πορεία τους *in vivo* με ανάλυση rt-pcr. Παρατηρήθηκε ότι τα CEDPs ανιχνεύονται έπειτα από δύο και επτά ημέρες έπειτα από την εμφύτευση τους σύμφωνα με την έκφραση των δεικτών Isl1 και MLC2v.



Εικόνα 56. Ανάλυση rt-pcr για τον Isl1 καρδιακό προγονικό δείκτη καθώς και για τον MLC2v, δείκτη των καρδιομυοκυττάρων. Τα δείγματα προέρχονται από την αριστερή κοιλία έπειτα από έμφραγμα του μυοκαρδίου όπου έγινε η έγχυση των CEDPs. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα από έμβρυο μυός κατά την εμβρυική ημέρα δώδεκα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από ενήλικο επιμύ, από επίμυες στους οποίους έχει γίνει έγχυση PBS (ζώα ελέγχου) καθώς και δείγμα από τον δεξιό κόλπο της καρδιάς έπειτα από επτά ημέρες από την εμφύτευση των CEDPs. Οι εκκινητές της ακτίνης αναγνωρίζουν και το γονίδιο του ποντικού αλλά και του επιμύ.

4 Συζήτηση

4.1 Τα πλειοδύναμα Isl1+ καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα σχηματίζουν N-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης, ενώ ένας υποπληθυσμός αυτών εκφράζει επιπρόσθετα και VE-cadherin.

Τα κύτταρα της επιβλάστης χαρακτηρίζονται από έκφραση της E-cadherin, ενώ κατά τη γαστριδίωση και τη δημιουργία του μεσοδέρματος, υπεισέρχονται σε επιθηλιο-μεσεγγυματική μετατροπή (EMT). Η EMT χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση της E-cadherin από την N-cadherin, ενώ κατά την περαιτέρω διαφοροποίηση του μεσοδέρματος εκφράζονται πρόσθετες ιστοειδικές cadherins (179). Έχει βρεθεί ότι προγονικά κύτταρα των καρδιομυοκυττάρων που προκύπτουν κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των ESCs εκφράζουν την N-cadherin (180). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι τα Isl1+ προγονικά κύτταρα της καρδιάς μύος κατά την εμβρυική ημέρα 9.5 (E9.5) σχηματίζουν N-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης (181). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι σε συμφωνία και επαυξάνουν τα παραπάνω με το εύρημα ότι τα Isl1+ προγονικά κύτταρα, σχηματίζουν N-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης από την πρώτη στιγμή της εμφάνισής τους, κατά την τέταρτη ημέρα της διαφοροποίησης. Ταυτόχρονα βρέθηκε για πρώτη φορά, ότι ένας υπό-πληθυσμός των Isl1+ κυττάρων δημιουργεί επιπρόσθετα VE-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης για μικρό και καθορισμένο χρονικό διάστημα. Η VE-cadherin, ενώ αρχικά θεωρείτο ενδοθηλιακά ιστοειδική, έχει καταδειχθεί ότι εκφράζεται παροδικά στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία έκτοτε ονομάζονται αιμοποιητικό ενδοθήλιο (hemogenic endothelium) (182). Περαιτέρω, η συν-έκφραση της VE-cadherin και του Isl1 έχει περιγραφεί πρόσφατα σε μετέπειτα στάδια της εμβρυογένεσης: σε ανθρώπινες εμβρυικές καρδιές στο σωλήνα εκροής (outflow tract, OFT) την ένατη εβδομάδα της κύησης (183) καθώς και στη ραχιαία αορτή και στην κύρια φλέβα σε έμβρυα μύων (184), (185).

4.2 Η έκφραση ενός μεταλλάγματος cadherin με αρνητικώς επικρατούσα δράση, υπό τον Pvec διαρρηγνύει την ακεραιότητα του ενδοθηλίου και παράλληλα αναστέλλει την εξειδίκευση των Isl1+ κυττάρων σε μεταλλαγμένα EBs.

Στη παρούσα διατριβή περιγράφηκε ότι τα ενδοθηλιακά και τα καρδιακά κύτταρα δημιουργούνται σε άμεση γειτνίαση κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης τους. Η λειτουργική σχέση και επικοινωνία των δύο πληθυσμών έχει αναφερθεί σε μελέτες (173), (186), (187), (188), οι όποιες καταδεικνύουν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζουν όχι μόνο την καρδιακή ανάπτυξη κατά την εμβρυογένεση αλλά και τη λειτουργία των ενήλικων καρδιομυοκυττάρων μέσω παρακρινικών σημάτων (eNOS, ενδοθηλίνη I, προσταγλαδίνες, αγγειοτενσίνη II, και η NRG-1). Συγκριμένα, το ενδοθήλιο διαδραματίζει βασικό ρόλο στη προώθηση της διαφοροποίησης των καρδιομυοκυττάρων κατά τη δημιουργία της καρδιάς μέσω EphB4 σηματοδότησης (189). Περαιτέρω, έχει καταδειχθεί ότι πλειοδύναμα Isl1+ καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα αποτελούν πηγή των ενδοθηλιακών κυττάρων του σωλήνα εκροής (outflow tract) καθώς επίσης ότι διαφοροποιούνται *in vitro* σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ενδοκαρδιακά κύτταρα (42).

Ο υποκινητής της VE-cadherin (και συγκεκριμένα το κομμάτι -2486 έως +24) έχει χαρακτηριστεί με τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων και κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (190). Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πειράματα ανίχνευσης της γενεαλογικής προέλευσης κατά τη διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial lineage tracing experiments) (176), για τη στοχευμένη /ή υπό συνθήκη αδρανοποίηση της VE-cadherin (δημιουργία ενδοθηλιακών ιστοειδικών Knock Out ή Knock down ζώων/κυττάρων) (191), για τη μελέτη ειδικών ενδοθηλιακών μεταγραφικών παραγόντων σε μεγάλη κλίμακα (192) καθώς και για την απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων (176). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε το πρότυπο ενεργότητας του υποκινητή της VE-cadherin κατά τη διάρκεια της *in vitro* διαφοροποίησης των mESCs και βρέθηκε ότι η έκφραση του ανιχνεύεται για πρώτη φορά σε χαμηλά επίπεδα την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης (περίπου στο 1% των κυττάρων) και αυξάνεται από την ημέρα τέσσερα και μετά. Σε συμφωνία με το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης, ο υποκινητής της VE-cadherin ανιχνεύθηκε ότι είναι ενεργός στα Isl1+ κύτταρα αποκλειστικά την τέταρτη και την πέμπτη ημέρα διαφοροποίησης. Την έκτη ημέρα διαφοροποίησης ανιχνεύεται σε ποσοστό μικρότερο του 1% των κυττάρων. Παρόλα ταύτα, το ποσοστό των Isl1+ κυττάρων στα οποία είναι

ενεργός ο Pvec (Isl1+/EGFP+) εμφανίζεται πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με το ποσοστό των VE-cadherin+/Isl1+ κυττάρων την ίδια χρονική στιγμή. Η διαφορά αυτή, μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης. Η έκφραση της VE-cadherin μπορεί να ανιχνευθεί αποκλειστικά μόνο μετά από το σχηματισμό των διακυτταρικών συνδέσεων, ενώ η ενεργότητα του Pvec ανιχνεύεται με την έκφραση της πρωτεΐνης EGFP. Είναι πιθανό, τα VE-cadherin+ κύτταρα με χαμηλή έκφραση ή τα μονήρη κύτταρα, τα οποία δεν μπορούν να σχηματίσουν σταθερούς δια-κυτταρικούς συνδέσμους που απαρτίζονται από το σύμπλεγμα των catenin και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, να διαφεύγουν την ανίχνευση με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού.

Έχοντας καθορίσει με ακρίβεια το παροδικό πρότυπο ενεργότητας του υποκινητή Pvec, χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για να μελετηθεί ο ρόλος των διακυτταρικών συνδέσεων στα καρδιακά και ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της πρώιμης διαφοροποίησης. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένες σειρές ESCs οι οποίες εκφράζουν την ΔEXD-VEC, μια αρνητικώς επικρατούσα μεταλλαγμένη μορφή υπό τον Pvec κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Έκφραση μεταλλαγμάτων cadherin, όπου απουσιάζει το εξωκυττάριο συνδετικό τμήμα (όπως στην περίπτωση μας το ΔEXD-VEC), έχει ως συνέπεια τη διάρρηξη των συνδέσεων προσκόλλησης ανεξάρτητα από τον τύπο cadherin στις οποίες αυτοί βασίζονται. Σε συμφωνία με αναφορές, στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί παρόμοια μεταλλάγματα, στα γενετικώς τροποποιημένα EBs που εκφράζεται το ΔEXD-VEC παρατηρήθηκε διάρρηξη των διακυτταρικών συνδέσεων και σοβαρές βλάβες στην ενδοθηλιακή διαφοροποίηση. Η στοχευμένη αδρανοποίηση της VE-cadherin (KO) σε μυσ είναι θανατηφόρα, λόγω ελαττωματικής αναδιαμόρφωσης και ωρίμανσης των καρδιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Παρόλα αυτά οι δομές μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων διατηρούνται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και το πρωτογενές πλέγμα δημιουργείται αρχικώς (193), (87). Αυτό επιτυγχάνεται πιθανώς μέσω αντισταθμιστικών μορίων που δρουν με «πλεονασματικό» τρόπο, ενώ η VE-cadherin είναι απαραίτητη σε μετέπειτα στάδια για την αγγειακή αναδιαμόρφωση καθώς και για τη σηματοδότηση μέσω του VEGF μονοπατιού (87). Η N-cadherin, η οποία εκφράζεται στα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα επιπρόσθετα με τη VE-cadherin, θα μπορούσε να είναι ένα από τα πιθανά υποψήφια μόρια που ενδεχομένως αντισταθμίζουν την έλλειψη της VE-cadherin έστω μερικώς (120), (194). Σε αυτή την υπόθεση συνηγορεί το γεγονός ότι απάλοιφή της N-cadherin στα ενδοθηλιακά κύτταρα, υπό

τον υποκινητή του Tie-2, επηρεάζει την ακεραιότητα του ενδοθηλίου και οδηγεί σε θνησιμότητα του ζώου κατά τα μέσα της κύησης (120).

Γνωρίζοντας ότι ο Pvec είναι ενεργός σε έναν Isl1+ κυτταρικό υποπληθυσμό, έκφραση του ΔEXD-VEC στον ίδιο υποπληθυσμό, αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα τη διάρρηξη των N-cadherin συνδέσμων προσκόλλησης ή άλλων cadherins με ένα παρόμοιο μηχανισμό. Πράγματι, παρατηρήθηκε όχι μόνο σοβαρή «βλάβη» των N-cadherin συνδέσμων προσκόλλησης στα Isl1+ κύτταρα αλλά και μείωση του Isl1+ πληθυσμού στους κλώνους B4 και 6 τις ημέρες διαφοροποίησης τέσσερα έως και επτά, γεγονός το οποίο ενοχοποιείται για την περαιτέρω απώλεια των cTnT+ κυττάρων καθώς και των «παλλόμενων» EBs. Στα pool EBs, όπου τα επίπεδα του μεταλλάγματος ήταν χαμηλότερα παρατηρήθηκε σχηματισμός ελάχιστων ενδοθηλιακών δικτύων, μερική ανάπτυξη του Isl1+ πληθυσμού και δημιουργία περιορισμένου αριθμού «παλλόμενων» EBs.

Περαιτέρω μελέτη των Bry+ και Mesp1+ μεσοδερμικών προγονικών πληθυσμών, οι οποίοι προηγούνται της έκφρασης του Isl1, έδειξε ότι οι πληθυσμοί αυτοί σχηματίζονται κανονικά στα γενετικώς τροποποιημένα EBs. Η μέτρια μείωση (1.7 φορές) που σημειώθηκε στο Mesp1+ πληθυσμό συνάδει με το εύρημα των Bondue et al., ότι το 50% του Mesp1+ πληθυσμού συν-εκφράζει Isl1 την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης (195). Η μείωση του Isl1+ πληθυσμού στα γενετικώς τροποποιημένα EBs από την τέταρτη κιόλας ημέρα της διαφοροποίησης μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε της δυσλειτουργίας των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης λόγω της έκφρασης του μεταλλάγματος είτε της ενδοθηλιακής αποδιοργάνωσης. Βέβαια, είναι τεκμηριωμένο από άλλες ομάδες (196) αλλά και από την παρούσα διατριβή, ότι την τέταρτη μέρα διαφοροποίησης το ενδοθήλιο μόλις ανιχνεύεται στα EBs αγρίου τύπου. Αυτό υποδηλώνει ότι σε αυτό το χρονικό σημείο της διαφοροποίησης, το ενδοθήλιο δεν φαίνεται να κατέχει βασικό ρόλο στη διεύρυνση και ανάπτυξη των Isl1+ κυττάρων. Ενώ σε μετέπειτα στάδια της διαφοροποίησης υπάρχουν ενδείξεις ότι το ενδοθήλιο επηρεάζει θετικά την διαφοροποίηση των καρδιακών κυττάρων.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προτείνεται ότι η αρνητική επίδραση του μεταλλάγματος στα καρδιακά προγονικά κύτταρα, οφείλεται σε συνδυασμό δύο διαδοχικών γεγονότων: πρώτον, στην αποσυναρμολόγηση των διακυτταρικών συνδέσεων σε έναν υπό-πληθυσμό των Isl1+ κυττάρων την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης και δεύτερον στην έλλειψη ακέραιων ενδοθηλιακών δομών. Η απαλοιφή της N-cadherin προκαλεί εμβρυική θνησιμότητα την δέκατη ημέρα της κύησης σε μύες εξαιτίας καρδιαγγειακών

ατελειών που προέρχονται από την αδυναμία συνάθροισης των καρδιομυοκυττάρων (114). Επιπρόσθετα, η υπό συνθήκη αδρανοποίηση της N-cadherin από την καρδιά ενηλίκων ποντικών, οδηγεί σε θάνατο, λόγω της διάρρηξης των εμβόλιμων δίσκων και της έλλειψης/ανεπάρκειας ηλεκτρικής αγωγιμότητας (115). Η N-cadherin έχειδειχθεί ότι δεν είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των καρδιομυοκυττάρων αλλά για την ευθυγράμμιση των μυοϊνιδίων. Ενδιαφέρον προκαλεί ότι ο καρδιακός φαινότυπος ως προς την αδυναμία καρδιακής αναδίπλωσης μπορεί να αναστραφεί μερικώς όταν η E-cadherin υποκαθιστά με «πλεονασματικό» τρόπο την N-cadherin υπό τον ειδικό καρδιακό υποκινητή α -MHC (116). Το παραπάνω παράδειγμα αποδεικνύει ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί λειτουργική υποκατάσταση μορίων cadherin μετά από έκτοπη έκφραση σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

Ο ρόλος των διακυτταρικών συνδέσεων της N- αλλά και της VE-cadherin έχει μελετηθεί έως τώρα με ανεξάρτητη απαλοιφή των δύο μορίων κατά την εμβρυική ανάπτυξη καθώς και με ιστοειδικό τρόπο σε ενήλικα ζώα. Οι παραπάνω μελέτες έχουν δείξει ότι τα μόρια αυτά δεν είναι απαραίτητα για την εξειδίκευση των προγονικών κυττάρων αλλά αργότερα κατά τη διάρκεια της δημιουργίας των ιστών. Η πειραματική προσέγγιση στην παρούσα διατριβή είναι διαφορετική, λόγω του ότι η έκφραση του Δ EXD οδηγεί στη λειτουργική αδρανοποίηση όχι μόνο των VE- και N-cadherin, αλλά του συνόλου των μορίων cadherin που μπορεί να συνεκφράζονται. Παραδείγματος χάριν, στο $Mespl+$ προγονικό πληθυσμό, πέρα από την έκφραση της N-cadherin, έχουν ανιχνευθεί η R-cadherin καθώς και η cadherin-11 (195). Οι cadherins αυτές μπορεί να λειτουργούν υποκαθιστώντας την N-cadherin σε μοντέλα ζώων στα οποία έχει γίνει απαλοιφή της. Πρέπει να σημειωθεί ότι ΚΟ της E-cadherin στο αναπτυξιακό στάδιο της βλαστοκύστης, όπου δεν εκφράζονται άλλα μόρια cadherin, προκαλεί αδυναμία σχηματισμού του τροφοεξωδερμικού επιθηλίου καθώς και της κοιλότητας της βλαστοκύστης (108).

4.3 Μερική αποκατάσταση των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης και επαναφορά της καρδιακής διαφοροποίησης σε υβριδικά EBs.

Κατά την προσπάθεια να αποκατασταθεί ο φαινότυπος των μεταλλαγμένων EBs, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVEC, HMEC, HPMEC) σε συν-καλλιέργειες με τα γενετικώς τροποποιημένα EBs. Η προσέγγιση αυτή ήταν ανεπιτυχής παρόλο που υπάρχουν μελέτες οι οποίες αναφέρουν ότι η παρουσία των HUVEC και των BMEC (μικροαγγειακά) σε EBs συμβάλλει θετικά στη δημιουργία «παλλόμενων» περιοχών (189). Αντίθετα, όταν οι μεταλλαγμένοι κλώνοι ES διαφοροποιούνται παρουσία ES κυττάρων αγρίου τύπου παρατηρείται αποκατάσταση των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης μεταξύ των Isl1+ κυττάρων στα υβριδικά EBs. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί σε αύξηση του Isl1+ πληθυσμού και το σχηματισμό cTnT+ κυττάρων το οποίο έχει σαν επακόλουθο τη μερική επαναφορά του φαινοτύπου των «παλλόμενων» EBs.

Η αποκατάσταση του φαινοτύπου αγρίου τύπου θα μπορούσε να οφείλεται, εκτός της αποκατάστασης των συνδέσμων προσκόλλησης, σε παρακρινείς παράγοντες προερχόμενους από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προϊόντων διαφοροποίησης των ES αγρίου τύπου. Αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί, αυτό δεν αποτελεί την επικρατέστερη εκδοχή κυρίως επειδή το ποσοστό των ES κυττάρων αγρίου τύπου που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των υβριδικών EBs δεν είναι ανάλογο της αποκατάστασης του Isl1+ πληθυσμού. Επίσης, όταν ο Isl1+ πληθυσμός αναπτύσσεται ταχέως, ανιχνεύονται ελάχιστες μόνο νησίδες ενδοθηλιακών κυττάρων. Συνεπώς, η αύξηση του Isl1+ πληθυσμού μπορεί να αποδοθεί στην αποκατάσταση των N-cadherin συνδέσμων προσκόλλησης. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με πρόσφατη μελέτη όπου απαλοιφή της N-cadherin, υπό τον υποκινητή του Mef2c, έχει αποτέλεσμα τον χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και την πρόωμη διαφοροποίηση του Isl1+/Mef2c+ υποπληθυσμού του δευτερογενούς καρδιακού πεδίου. Ο φαινότυπος αυτός μπορεί να αναστραφεί μερικώς με την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού κανονικού Wnt (181). Στην παρούσα διατριβή, ενεργοποίηση του κανονικού Wnt την τρίτη και την τέταρτη ημέρα διαφοροποίησης δεν οδήγησε σε αύξηση και αποκατάσταση του αριθμού των Isl1+ κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με αναφορές που υποστηρίζουν ότι το μονοπάτι κανονικού Wnt αναστέλλεται κατά την διαφοροποίηση/ εξειδίκευση του Mesp1+ πληθυσμού ενώ ενεργοποιείται μετέπειτα για τον πολλαπλασιασμό των Isl1+ κυττάρων του δευτερογενούς καρδιακού πεδίου (SHF) (55).

Το σύμπλοκο των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης αρχικά παρέχει δυνατή σύνδεση μεταξύ των κυττάρων αλλά επίσης διευκολύνει τη μετάδοση σηματοδοτικών ερεθισμάτων για τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω άμεσης ή έμμεσης σύνδεσης με σηματοδοτικούς υποδοχείς καθώς και με τους αντίστοιχους τελεστές τους. Η VE-cadherin έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με το σύμπλοκο του TGFb (197) καθώς και με τους σηματοδοτικούς υποδοχείς VEGFR2 και VEGFR3 δημιουργώντας ένα σηματοδοτικό, μηχανο-αισθητήριο σύμπλοκο, το οποίο ενεργοποιείται μέσω της αγγειακής ροής (122). Στην παρούσα διατριβή, καταδείχθηκε ότι η VE-cadherin εκφράζεται παροδικά σε έναν υποπληθυσμό των Isl1+ κυττάρων αλλά δεν έχει ακόμα αποσαφηνίσει αν ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός ακολουθεί κάποια συγκεκριμένη αναπτυξιακή πορεία. Επιπρόσθετα, επισημάνθηκε ότι οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης είναι απαραίτητοι για τον πολλαπλασιασμό και την εξειδίκευση των καρδιακών προγονικών κυττάρων. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται για τη διαλεύκανση των αλληλεπιδράσεων των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης των καρδιακών προγονικών κυττάρων με τα σημαντικά μορφογενετικά μονοπάτια που ως τώρα έχουν αναφερθεί ότι εμπλέκονται στην καρδιακή εξειδίκευση του Isl1+ πληθυσμού από τον Mesp1+ πληθυσμό όπως το μη κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt και το Notch.

4.4 Ταυτόχρονη απομόνωση και έκπτυξη ενδοθηλιακών και καρδιακών προγονικών κυττάρων (CEDPs) προερχόμενων από διαφοροποίηση ESCs.

Οι προκλήσεις που αντιμετωπίζουν οι ερευνητικές ομάδες οι οποίες χρησιμοποιούν εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα στην αναγεννητική ιατρική είναι α) η εύρεση συνθηκών που προάγουν την στοχευμένη και ελεγχόμενη διαφοροποίηση, β) η απομόνωση και ο πολλαπλασιασμός ομοιογενών λειτουργικών πληθυσμών και γ) η διατήρηση του αναπτυξιακού δυναμικού των απομονωμένων κυττάρων. Τα περισσότερα ερευνητικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση των ESCs, οδηγούν σε μερικό εμπλουτισμό κυτταρικών τύπων.

Η διαφοροποίηση και η απομόνωση ενδοθηλιακών καθώς και καρδιακών κυττάρων έχει αποτελέσει πεδίο έρευνας από πολλές ομάδες καθώς παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για πολλαπλές εφαρμογές. Για να επιτευχθεί η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ομοιογένεια κατά την απομόνωση των παραπάνω πληθυσμών έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλες μέθοδοι εκ των

οποίων η κυτταρομετρία ροής (FACS) (198), (199), η δημιουργία γενετικώς τροποποιημένων ESCs τα οποία είτε εκφράζουν ένα γονίδιο ανθεκτικότητας (200), (201) είτε την EGFP πρωτεΐνη υπό έναν ιστοειδικό υποκινητή καθώς και ο συνδυασμός των δύο (202), (203), (204). Ειδικά όσον αφορά τα καρδιομυοκύτταρα, πέρα από τις παραπάνω μεθόδους, για την απομόνωσή τους χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό η φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας διαλύματος Percoll (205). Προσφάτως, χρησιμοποιήθηκαν συνεργιστικά βιοχημικά και βιοφυσικά ερεθίσματα για την επαγωγή της εξειδίκευσης και της δημιουργίας ανθρώπινων καρδιομυοκυττάρων από hPSCs σε μικροθαλάμους οι οποίοι καθορίζουν το περιορισμένο γεωμετρικό πρότυπο (206).

Στην παρούσα εργασία, εγκαθιδρύθηκαν συνθήκες διαφοροποίησης που προάγουν ταυτόχρονα τη διαφοροποίηση ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων σε υψηλά ποσοστά. Στη συνέχεια, οι συνθήκες αυτές χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για την απομόνωση προγονικών ενδοθηλιακών και καρδιακών κυττάρων. Έχοντας μελετήσει αναλυτικά το πρότυπο ενεργότητας του Pvec κατά τη διαφοροποίηση καθώς επίσης γνωρίζοντας ότι ο Pvec, πέρα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιείται παροδικά σε έναν υπό-πληθυσμό των καρδιακών προγονικών κυττάρων, δημιουργήθηκαν γενετικώς τροποποιημένες σταθερές κυτταρικές σειρές ESCs που εκφράζουν το γονίδιο της πουρομυκίνης υπό τον Pvec.

Ο Pvec έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης από την έβδομη ημέρα και μετέπειτα (201), (207), (176). Συγκεκριμένα, οι Sahara et al., χρησιμοποιούν τον Pvec για την απομόνωση ενδοθηλιακών προγονικών πληθυσμών από ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα την έκτη και την έβδομη ημέρα διαφοροποίησης καταλήγοντας σε ένα καθαρό ενδοθηλιακό πληθυσμό. Για την απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και άλλοι υποκινητές όπως είναι ο tie-1 (201), tie-2 (208) και Flk-1 (209). Αντίστοιχα, η απομόνωση των καρδιακών προγονικών κυττάρων έχει επιτευχθεί με τους παρακάτω ειδικούς υποκινητές: είτε με το μεταγραφικό παράγοντα Nkx2.5 από τον οποίο προκύπτει διδύναμος καρδιακός κυτταρικός πληθυσμός (καρδιομυοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα) (45), (210) είτε με τον μεταγραφικό παράγοντα Isl1 (42), (43) ή με τον δείκτη επιφανείας Flk-1 (21) από τους οποίους προκύπτει πλειοδύναμος καρδιαγγειακός προγονικός πληθυσμός (καρδιομυοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοκάρδιο και ενδοθηλιακά κύτταρα). Μετέπειτα κατά τη διαφοροποίηση, η απομόνωση ώριμων καρδιομυοκυττάρων έχει επιτευχθεί με τη χρήση των υποκινητών MLC2v (211) και αMHC (212), (213). Στο πειραματικό σχήμα που ακολουθήθηκε στην

παρούσα διατριβή, το αντιβιοτικό προστίθεται στο χρονικό «παράθυρο» κατά το οποίο ο Ρνec είναι ενεργός στα ενδοθηλιακά και στα καρδιακά προγονικά κύτταρα, οδηγώντας στην απομόνωση ενός μικτού ενδοθηλιακού και καρδιακού πληθυσμού.

Η απομόνωση ενός καρδιαγγειακού πληθυσμού, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να αυτοανανεώνεται και να διαφοροποιείται παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για χρήση στην αναγεννητική ιατρική (214). Επιπρόσθετα, έχει καταδειχθεί ότι ο συνδυασμός καρδιομυοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων βελτιώνει την επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων έπειτα από τη μεταμόσχευση τους, καθώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα δημιουργούν δίκτυα τα οποία ομοιάζουν με το πρωτογενές αγγειακό πλέγμα και παρέχουν αγγείωση στην εμφραγματική περιοχή (129). Έως τώρα, υπάρχουν μελέτες κατά τις οποίες έχουν απομονωθεί ξεχωριστά πληθυσμοί καρδιακών προγονικών κυττάρων, καρδιομυοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά ταυτόχρονη απομόνωση και έκπτυξη ενδοθηλιακών και καρδιακών προγονικών κυττάρων (Cardiac Endothelial Dual Progenitors, CEDPs). Τα CEDPs απομονώνονται και πολλαπλασιάζονται σε σύντομο χρονικό διάστημα (12 ημέρες), γεγονός το οποίο τα καθιστά ευνοϊκά για θεραπευτική εφαρμογή.

Περαιτέρω, βασικό πλεονέκτημα του πρωτοκόλλου είναι ότι ο μικτός/διπλός κυτταρικός πληθυσμός CEDPs παρουσιάζει υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ β -catenin, παρέχοντας μεγάλο αριθμό κύτταρων. Η επαγωγή της αυτοανανέωσης των Isl1⁺ πλειοδύναμων καρδιαγγειακών προγονικών κυττάρων μέσω του μονοπατιού Wnt έχει καταδειχθεί στο παρελθόν καθώς και στην παρούσα διατριβή (59), (215). Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -catenin, επιπρόσθετα, είναι απαραίτητος ρυθμιστής της ενδοθηλιακής διαφοροποίησης και της αγγειακής ανάπτυξης. Είναι ανιχνεύσιμο στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία, συγκεκριμένα η ενεργότητα του ξεκινά την E9.5 της εμβρυογένεσης του μυός σε διάφορες περιοχές των σχηματιζόμενων αγγείων (98), ενώ η απαλοιφή της β -κατενίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την ανάπτυξη προκαλεί ελαττωματικό αγγειακό πρότυπο και εύθραυστες αγγειακές δομές (216). Παράλληλα, αναστολή του Wnt οδηγεί σε μείωση του Flk1⁺ πληθυσμού (97). Κατά τον χαρακτηρισμό των CEDPs, παρατηρήθηκε ότι υπό την επίδραση του Wnt τα καρδιακά προγονικά κύτταρα δεν διαφοροποιούνται αυθόρμητα και εκφράζουν τους δείκτες Isl1, Nkx2.5, Mef2c, GATA4 και Flk1 ενώ απουσιάζουν οι χαρακτηριστικοί δείκτες ώριμων καρδιομυοκυττάρων cTnT, MLC2v και MLC2a. Παράλληλα, αναπτύσσονται και τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι κατά την έκπτυξη των CEDPs

ανιχνεύονται παράλληλα και οι δείκτες του ενδοκαρδίου Nfatc-1, μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εκφράζεται στο ενδοκάρδιο αλλά όχι στα ενδοθηλιακά κύτταρα, και Nrg1 η οποία είναι απαραίτητη κατά το στάδιο της δοκίδωσης. Τα κύτταρα του ενδοκαρδίου προέρχονται από τα Isl1+ πλειοδύναμα καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα και εξειδικεύονται ως ένας ειδικός καρδιακός πληθυσμός, ανεξάρτητος από τον αγγειακό. Επιπρόσθετα το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt επάγει, πέρα από τη διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων, και τη διαφοροποίηση των ενδοκαρδιακών ενδοθηλιακών κυττάρων (84).

Επιπρόσθετα, ένα βασικό κριτήριο για την χρήση των κυττάρων που προέρχονται από ESCs στην αναγεννητική ιατρική είναι η απουσία δεικτών πολυδυναμίας, διότι σε άλλη περίπτωση εμπλέκονται στη δημιουργία πρωτογενών όγκων (2). Ανάλυση του μικτού πληθυσμού των CEDPs σε επίπεδο μεταγραφής έδειξε ότι οι δείκτες πολυδυναμίας απουσιάζουν.

4.5 Διαφοροποίηση *in vitro* και *in vivo* των CEDPs

Η *in vitro* διαφοροποίηση των CEDPs, επιτυγχάνεται με την απομάκρυνση του αναστολέα της GSK-3 και τη δημιουργία σφαιρικών κυτταρικών δομών. Διαπιστώθηκε έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών των ώριμων καρδιομυοκυττάρων cTnT, MLC2v και MLC2a, ενώ απουσιάζει η έκφραση δεικτών του ενδοδέματος και του νευροεξωδέρματος, επιβεβαιώνοντας την εξειδίκευση του απομονωμένου διπλού προγονικού πληθυσμού. Επίσης, εμφανίζονται μεγάλες χαρακτηριστικές «παλλόμενες περιοχές» ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν αγγειακές δομές, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την ωρίμανση των δύο κυτταρικών τύπων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συν-έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Mef2c με τη VE-cadherin κατά τη διαφοροποίηση των CEDPs. Ο μεταγραφικός παράγοντας Mef2c είναι ο πρώτος από τις πρωτεΐνες Mef2, μέλη της οικογένειας των MAD μεταγραφικών παραγόντων που βρέθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει προταθεί ότι η έκφραση του είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος αλλά όχι για την de novo αγγειογένεση. Απαλοιφή του Mef2c σε μύες, αποβαίνει θανατηφόρα στα μέσα της κύησης. Κύριες αιτίες αποτελούν σοβαρές καρδιακές δυσλειτουργίες, αδυναμία σχηματισμού των βασικών αγγείων και μη φυσιολογική ραχιαία αορτή (217) , (218). Ο ακριβής ρόλος των Mef2 στη ρύθμιση των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως. Έχει βρεθεί ότι η ενδοθηλιακή ρύθμιση του Mef2c γίνεται απευθείας και καθοδικά από το

σύμπλοκο Etv2/ Etsrp μέσω ενός FOX:ETS απαραίτητου μοτίβου. Το FOX: ETS μοτίβο πρόσδεσης έχει βρεθεί στον υποκινητή της VE-cadherin (66).

Για να μελετηθεί η διαφοροποίηση των CEDPs *in vivo* πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση τους σε ικρίωμα υδρογέλης αλγινικού οξέως και εμφύτευση τους σε καρδιές επιμυών. Το αλγινικό οξύ είναι ένας φυσικός υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί στην αναγεννητική ιατρική και συγκεκριμένα στην καρδιά. Κατέχει χαρακτηριστικά όπως η βιοσυμβατότητα, η μη αντιγονικότητα και το χαμηλό κόστος. Το βασικό του πλεονέκτημα είναι η ήπια δημιουργία υδρογέλης καθώς και μικροσφαιριδίων με την προσθήκη δισθενών κατιόντων. Το μοναδικό αυτό χαρακτηριστικό, επιτρέπει την ενκαψιδίωση ευαίσθητων βιομορίων καθώς και κυττάρων (219). Επιπρόσθετα, έχει καταδειχθεί ότι το αλγινικό οξύ παρουσιάζει ευνοϊκή επίδραση στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας του μυοκαρδίου σε εμφραγματικά μοντέλα επιμυών (167). Επίσης ενισχύει την επιβίωση των κυττάρων, πλεονέκτημα το οποίο το καθιστά ιδανικό για την εμφύτευση των CEDPs σε φυσιολογικές και εμφραγματικές καρδιές επιμυών. Τα ικρίωματα αποτελούν τεχνητή εξωκυττάρια μήτρα παρέχοντας στα ενσωματωμένα κύτταρα ένα προσωρινό περιβάλλον για να δημιουργήσουν συνδέσεις, να πολλαπλασιαστούν αλλά και να διαφοροποιηθούν. Η διαφοροποίηση των CEDPs ήταν εξίσου επιτυχής σε υδρογέλη και σε μικροσφαιρίδια αλγινικού οξέως. Παρατηρήθηκαν μεγάλες «παλλόμενες» περιοχές και έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών των καρδιομυοκυττάρων.

Η ανίχνευση των CEDPs έπειτα από την εμφύτευση τους στις καρδιές επιμυών, πραγματοποιήθηκε με βάση τους καρδιακούς προγονικούς δείκτες Isl1, GATA4 και Mef2c. Τα Isl1+ κύτταρα μειώνονται δραματικά κατά την εμβρυογένεση, με αποτέλεσμα να έχουν ανιχνευθεί ελάχιστα μόνο στην νεογνική καρδιά (500- 600 Isl1+ κύτταρα ανά καρδιά επιμύος) τα οποία εξαφανίζονται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη γέννηση του εμβρύου, ενώ απουσιάζουν από την ενήλικη καρδιά (44). Αντίστοιχα, οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA4 και Mef2c απουσιάζουν από την καρδιά ενήλικα ενώ εμφανίζονται και επάγονται κατά την καρδιακή υπερτροφία (220). Ο ακριβής τους ρόλος κατά την αναγέννηση της καρδιάς δεν έχει αποσαφηνισθεί, αλλά έχει προταθεί ότι η επαγωγή τους αντικατοπτρίζει την αναγεννητική ικανότητα της καρδιάς και υποδηλώνει ότι ο ιστός είναι σε θέση να ενεργοποιεί ορισμένα «εμβρυονικά προγράμματα» (214). Έπειτα από εμφύτευση των CEDPs σε φυσιολογικές καρδιές ενήλικων επιμυών ανιχνεύθηκε έκφραση των Isl1, GATA4 και Mef2c ενώ απουσιάζουν από τα ζώα ελέγχου. Περαιτέρω, δείκτες προερχόμενοι από τα CEDPs ανιχνεύθηκαν με rt-pcr μέχρι και τη δέκατη τέταρτη ημέρα μετά την εμφύτευση.

Μελετώντας την *in vivo* διαφοροποίηση των CEDPs παρατηρήθηκε έκφραση του MLC2v, ο οποίος αποτελεί δείκτης των ώριμων καρδιομυοκυττάρων, από την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση σε φυσιολογικές καρδιές επιμυών. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι διαφοροποιούνται επιτυχώς *in vivo*. Περαιτέρω ανοσοϊστοχημική ανάλυση έδειξε ότι τα CEDPs δεν ανιχνεύονται σε cTnT+ μυοκαρδιακές περιοχές του επίμυ μέχρι και την τρίτη ημέρα μετά την εμφύτευση, σε αντίθεση με την έβδομη ημέρα. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι τα CEDPs είναι ενσωματωμένα στην υδρογέλη ενώ κατά την έβδομη ημέρα το αλγινικό οξύ έχει βιοαποικοδομηθεί πλήρως (221). Τέλος, διαπιστώθηκε δημιουργία N-cadherin συνδέσμων προσκόλλησης μεταξύ των Isl1+ κυττάρων την τρίτη ημέρα έπειτα από την εμφύτευση. Η δημιουργία συνδέσεων μεταξύ των μεταμοσχευμένων κυττάρων έχει διαπιστωθεί ότι κατέχει εξέχοντα ρόλο για την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τους.

Πιλοτικά πειράματα σε μοντέλα εμφραγματικών επιμυών έδειξαν ότι τα CEDPs ανιχνεύονται και διαφοροποιούνται μέχρι και την έβδομη ημέρα μετά την εμφύτευση τους γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι επιβιώνουν στο περιβάλλον της εμφραγματικής καρδιάς. Είναι απαραίτητη περαιτέρω μελέτη και χαρακτηρισμός της επίδρασης τους στο μυοκάρδιο καθώς και στη λειτουργία της καρδιάς.

5 Περιλήψεις

5.1 Περίληψη

Μηχανισμοί διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς κυτταρικούς τύπους μεσοδερμικής προέλευσης

Μαλταμπέ Α. Βιολέττα

Ο σχηματισμός του καρδιαγγειακού συστήματος λαμβάνει χώρα κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων με τα καρδιομυοκύτταρα, είναι απαραίτητες για την επιβίωση, την ανάπτυξη καθώς και για την τελική διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων. Ωστόσο, οι λειτουργικές αυτές αλληλεπιδράσεις κατά την πρώιμη ιστική εξειδίκευση των καρδιομυοκυττάρων δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατέχουν εξέχοντα ρόλο σε πολλαπλές μορφογενετικές διαδικασίες. Παρέχουν μηχανική στήριξη στους σχηματιζόμενους ιστούς και εμπλέκονται στην εξειδίκευση ποικίλων κυτταρικών τύπων κατά τη διαφοροποίηση. Παρόλα ταύτα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος τους κατά τα πρώιμα στάδια σχηματισμού των ενδοθηλιακών και καρδιακών προγονικών κυττάρων.

Για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις ενδοθηλιακών και καρδιακών προγονικών κυττάρων καθώς και οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης κατά τη δημιουργία του καρδιαγγειακού συστήματος χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο της εμβρυογένεσης, η *in vitro* διαφοροποίηση Εμβρυονικών Βλαστικών κυττάρων μυός (mESCs) μέσω σχηματισμού εμβρυοειδών σωματιδίων (EBs). Παρουσία αυξητικών παραγόντων που προάγουν τη δημιουργία του ενδοθηλίου, επάγεται επιτυχώς η διαφοροποίηση ενδοθηλιακών αλλά και καρδιακών κυττάρων. Η εξειδίκευση των καρδιομυοκυττάρων εμφανίζεται να έχει στενή σχέση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς οι δύο κυτταρικοί τύποι διαφοροποιούνται σε άμεση γειτνίαση κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της ανάπτυξης τους. Τα πλειοδύναμα Isl1+καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα σχηματίζουν N-cadherin συνδέσμους προσκόλλησης, ενώ ένας υποπληθυσμός αυτών, εκφράζει επιπρόσθετα και VE-cadherin για καθορισμένο χρονικό διάστημα. Σε συμφωνία με το παραπάνω αποτέλεσμα, ανιχνεύθηκε παροδική ενεργότητα του υποκινητή της VE-cadherin (Pvec) σε έναν υποπληθυσμό των Isl1+ κυττάρων, επιπλέον των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Έκφραση ενός μεταλλάγματος με αρνητικώς επικρατούσα δράση cadherin υπό τον Pvec έχει σαν αποτέλεσμα την αποσυναρμολόγηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου και παράλληλα την αναστολή της εξειδίκευσης των Isl1+ κυττάρων στα μεταλλαγμένα EBs. Ο

φαινότυπος αυτός αντιστρέφεται έπειτα από μερική αποκατάσταση των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης σε υβριδικά EBs τα οποία προέρχονται από μεταλλαγμένα και αγρίου τύπου ESCs. Εν κατακλείδι, τα ενδοθηλιακά και τα καρδιακά προγονικά κύτταρα εμφανίζουν στενή σχέση από τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης τους, ενώ οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι προσκόλλησης ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση και την εξειδίκευση των καρδιαγγειακών κυττάρων.

Περαιτέρω, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη απομόνωση ενδοθηλιακών και καρδιακών προγονικών κυττάρων (CEDPs) κατά τη διαφοροποίηση γενετικώς τροποποιημένων ESCs έπειτα από επιλογή υπό τον Pvec. Τα CEDPs εκπύσσονται *in vitro* διατηρώντας την «αδιαφοροποίητη» κατάσταση τους έπειτα από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ b-catenin. Μεταμόσχευση τους σε φυσιολογικές αλλά και εμφραγματικές καρδιές επιμυών κατέδειξε ότι ο διπλός πληθυσμός επιβιώνει και διαφοροποιείται επιτυχώς.

5.2 Summary

Differentiation of Embryonic Stem Cells to mesodermal lineages

Maltabe A. Violetta

Formation of the cardiovascular system is one of the earliest differentiation events during embryogenesis. During heart development, endothelial-cardiomyocyte interactions are essential for the survival, growth and contractile activity of cardiomyocytes. However, little is known about the specific nature of the functional interaction between endothelium and cardiomyocytes during early cardiomyocyte lineage specification. Adherens junctions (AJs) are cell-cell adhesion structures pivotal to morphogenetic processes, lineage specification and proliferation. They provide not only mechanical support to forming tissues but they are also involved in segregation of various cell-types emerging during differentiation. Nonetheless, the nature of cadherin mediated junctions between endothelial and cardiac progenitor cells, before their specification into mature phenotypes, has not been investigated.

To identify the role of AJs during cardiac and endothelial lineages specification at the earliest differentiation stages of cardiovascular system formation and the functional interactions between these lineages, we use as an *in vitro* model the differentiation of mouse embryonic stem (mESCs) cells after embryoid bodies (EBs) formation in the presence of appropriate growth factors that favor endothelial differentiation. Under these conditions, cardiac differentiation was also very efficient. Cardiomyocyte lineage specification is spatially related to endothelium as these populations are in close proximity at all stages of their development. Examination of Isl1⁺ multipotent cardiovascular progenitors showed that they form mostly N-cadherin-mediated AJs. However, a percentage of them, also expresses the endothelial-specific VE-cadherin in a transient fashion. In accordance, VE-cadherin promoter (Pvec) activity pattern in genetically modified ESCs showed that it is transiently activated in a subset of Isl1⁺ progenitors, in addition to endothelial cells. Impairment of adhesive activity by a AJs dominant-negative mutant under VE-cadherin promoter disrupts endothelial integrity and inhibits Isl1⁺ cells pre-specification in mutant EBs. This phenotype was reversed after AJs formation rescue in hybrid EBs derived from wt/mutant ESCs. In conclusion, vascular and cardiac progenitors are closely related populations from the earliest stages of their development and AJs-mediated cell-cell adhesion positively regulates differentiation and specification of cardiovascular progenitors.

Using a genetic engineered approach, based on VE-cadherin promoter and drug selection, a mixed population of endothelial and cardiac progenitor cells (CEDPs) were isolated during *in vitro* differentiation of genetically modified ESCs. CEDPs were further expanded *in vitro* by activation of Wnt/b-catenin signalling, maintaining them undifferentiated. Injection of the dual population in the left ventricle of immuno-suppressed healthy rats or in acute myocardial infarction rat models, shown that CEDPs survived and differentiated efficiently *in vivo*.

6. Ευρετήριο Ακρωνυμίων

AJs	Σύνδεσμοι προσκόλλησης
BIO	6-Bromoindirubin-3'-oxime
CEDPs	Καρδιακός και Ενδοθηλιακός Διπλός Προγονικός πληθυσμός, Cardiac Endothelial Dual Progenitor Cells
D	Ημέρα διαφοροποίησης
DS-RED	Discosoma Red fluorescence protein
EBs	Εμβρυοειδή σωματίδια
ESCs	Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
KO	Στοχευμένη αδρανοποίηση, Knock-Out
rES	MST-ds-red
wt	Αγρίου τύπου
ΔEXD-VEC	Μετάλλαγμα της VE-cadherin από το οποίο λείπει το εξωκυττάριο τμήμα

7. Βιβλιογραφία

1. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Aug;14(8):529-41.
2. Yi BA, Wernet O, Chien KR. Regenerative medicine: developmental paradigms in the biology of cardiovascular regeneration. *J Clin Invest.* 2010 Jan;120(1):20-8.
3. Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Feb;10(2):91-103.
4. Tarkowski AK, Suwinska A, Czolowska R, Ozdzinski W. Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Dev Biol.* 2010 Dec 15;348(2):190-8.
5. Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest.* 2010 Apr;120(4):995-1003.
6. Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):747-62.
7. Wild AE, Fleming TP. *Cleavage and Gastrulation in Mouse Embryos.* eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
8. Pauklin S, Pedersen RA, Vallier L. Mouse pluripotent stem cells at a glance. *J Cell Sci.* 2011 Nov 15;124(Pt 22):3727-32.
9. Tam PP, Behringer RR. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev.* 1997 Nov;68(1-2):3-25.
10. Kinder SJ, Tsang TE, Quinlan GA, Hadjantonakis AK, Nagy A, Tam PP. The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development.* 1999 Nov;126(21):4691-701.
11. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell.* 2008 Feb 22;132(4):661-80.
12. Martello G, Smith A. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:647-75.
13. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005 May 15;19(10):1129-55.
14. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:435-62.
15. Lee DH, Chung HM. Differentiation into Endoderm Lineage: Pancreatic differentiation from Embryonic Stem Cells. *Int J Stem Cells.* 2011 Jun;4(1):35-42.
16. Cai C, Grabel L. Directing the differentiation of embryonic stem cells to neural stem cells. *Dev Dyn.* 2007 Dec;236(12):3255-66.
17. Liu S, Zhang H, Duan E. Epidermal development in mammals: key regulators, signals from beneath, and stem cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):10869-95.
18. Lacaud G, Keller G, Kouskoff V. Tracking mesoderm formation and specification to the hemangioblast in vitro. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 Nov;14(8):314-7.
19. Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG. Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature.* 1990 Feb 15;343(6259):657-9.
20. Costello I, Pimeisl IM, Drager S, Bikoff EK, Robertson EJ, Arnold SJ. The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of Mesp1 to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat Cell Biol.* 2011 Sep;13(9):1084-91.
21. Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell.* 2006 Nov;11(5):723-32.
22. Ishitobi H, Wakamatsu A, Liu F, Azami T, Hamada M, Matsumoto K, et al. Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse. *Development.* 2011 Dec;138(24):5357-68.
23. Kelly RG, Buckingham ME, Moorman AF. Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Oct;4(10).

24. Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 2000 Nov;10(8):345-52.
25. Garry DJ, Olson EN. A common progenitor at the heart of development. *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1101-4.
26. David R, Jarsch VB, Schwarz F, Nathan P, Gegg M, Lickert H, et al. Induction of MesP1 by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell. *Cardiovasc Res*. 2011 Oct 1;92(1):115-22.
27. van den Ameele J, Tiberi L, Bondue A, Paulissen C, Herpoel A, Iacovino M, et al. Eomesodermin induces Mesp1 expression and cardiac differentiation from embryonic stem cells in the absence of Activin. *EMBO Rep*. 2012 Apr;13(4):355-62.
28. Kitajima S, Takagi A, Inoue T, Saga Y. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development*. 2000 Aug;127(15):3215-26.
29. Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, Semeraro C, Iacovino M, Kyba M, et al. Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell*. 2008 Jul 3;3(1):69-84.
30. David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, et al. MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat Cell Biol*. 2008 Mar;10(3):338-45.
31. Lindsley RC, Gill JG, Murphy TL, Langer EM, Cai M, Mashayekhi M, et al. Mesp1 coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell Stem Cell*. 2008 Jul 3;3(1):55-68.
32. Bondue A, Blanpain C. Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circ Res*. 2010 Dec 10;107(12):1414-27.
33. Lescroart F, Chabab S, Lin X, Rulands S, Paulissen C, Rodolosse A, et al. Early lineage restriction in temporally distinct populations of Mesp1 progenitors during mammalian heart development. *Nat Cell Biol*. 2014 Sep;16(9):829-40.
34. Chan SS, Shi X, Toyama A, Arpke RW, Dandapat A, Iacovino M, et al. Mesp1 patterns mesoderm into cardiac, hematopoietic, or skeletal myogenic progenitors in a context-dependent manner. *Cell Stem Cell*. 2013 May 2;12(5):587-601.
35. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. 2005 Nov;6(11):826-35.
36. Spater D, Abramczuk MK, Buac K, Zangi L, Stachel MW, Clarke J, et al. A HCN4+ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol*. 2013 Sep;15(9):1098-106.
37. Liang X, Wang G, Lin L, Lowe J, Zhang Q, Bu L, et al. HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors. *Circ Res*. 2013 Aug 2;113(4):399-407.
38. Prall OW, Menon MK, Solloway MJ, Watanabe Y, Zaffran S, Bajolle F, et al. An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*. 2007 Mar 9;128(5):947-59.
39. Sun Y, Liang X, Najafi N, Cass M, Lin L, Cai CL, et al. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol*. 2007 Apr 1;304(1):286-96.
40. Ma Q, Zhou B, Pu WT. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev Biol*. 2008 Nov 1;323(1):98-104.
41. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. 2003 Dec;5(6):877-89.
42. Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1151-65.

43. Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*. 2009 Jul 2;460(7251):113-7.
44. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 2005 Feb 10;433(7026):647-53.
45. Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, Clapham DE, Lien CL, Schultheiss TM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1137-50.
46. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell*. 2001 Sep;1(3):435-40.
47. Xu H, Morishima M, Wylie JN, Schwartz RJ, Bruneau BG, Lindsay EA, et al. Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development*. 2004 Jul;131(13):3217-27.
48. Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, Xu SM, Black BL. Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*. 2004 Aug;131(16):3931-42.
49. Meilhac SM, Lescroart F, Blanpain C, Buckingham ME. Cardiac cell lineages that form the heart. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Feb;5(2):a026344.
50. Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol*. 2010;90:1-41.
51. Sturzu AC, Wu SM. Developmental and regenerative biology of multipotent cardiovascular progenitor cells. *Circ Res*. 2011 Feb 4;108(3):353-64.
52. Katz TC, Singh MK, Degenhardt K, Rivera-Feliciano J, Johnson RL, Epstein JA, et al. Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells. *Dev Cell*. 2012 Mar 13;22(3):639-50.
53. Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):549-53.
54. Wu B, Zhang Z, Lui W, Chen X, Wang Y, Chamberlain AA, et al. Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. *Cell*. 2012 Nov 21;151(5):1083-96.
55. Gessert S, Kuhl M. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res*. 2010 Jul 23;107(2):186-99.
56. Yamaguchi TP, Takada S, Yoshikawa Y, Wu N, McMahon AP. T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev*. 1999 Dec 15;13(24):3185-90.
57. Lindsley RC, Gill JG, Kyba M, Murphy TL, Murphy KM. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development*. 2006 Oct;133(19):3787-96.
58. Klaus A, Saga Y, Taketo MM, Tzahor E, Birchmeier W. Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 20;104(47):18531-6.
59. Qyang Y, Martin-Puig S, Chiravuri M, Chen S, Xu H, Bu L, et al. The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Stem Cell*. 2007 Aug 16;1(2):165-79.
60. Buikema J, Zwetsloot P-P, Doevendans P, Domian I, Sluijter J. Wnt/ β -Catenin Signaling during Cardiac Development and Repair. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 2014;1(1):98.
61. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*. 2011 Nov;29(11):1650-5.
62. Park C, Kim TM, Malik AB. Transcriptional regulation of endothelial cell and vascular development. *Circ Res*. 2013 May 10;112(10):1380-400.
63. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
64. Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*. 1997 Nov;173(2):206-10.
65. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*. 2004;117:3-32.

66. De Val S. Key transcriptional regulators of early vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jul;31(7):1469-75.
67. Xiong JW. Molecular and developmental biology of the hemangioblast. *Dev Dyn.* 2008 May;237(5):1218-31.
68. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998 Feb;125(4):725-32.
69. Faloon P, Arentson E, Kazarov A, Deng CX, Porcher C, Orkin S, et al. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development.* 2000 May;127(9):1931-41.
70. Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J, Choi K. Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development.* 2002 Dec;129(23):5511-20.
71. Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature.* 2004 Dec 2;432(7017):625-30.
72. Furuta C, Ema H, Takayanagi S, Ogaeri T, Okamura D, Matsui Y, et al. Discordant developmental waves of angioblasts and hemangioblasts in the early gastrulating mouse embryo. *Development.* 2006 Jul;133(14):2771-9.
73. Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, Yang Y, et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Dec 4;3(6):625-36.
74. Bertrand JY, Chi NC, Santoso B, Teng S, Stainier DY, Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):108-11.
75. Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):116-20.
76. Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):112-5.
77. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature.* 2009 Feb 12;457(7231):887-91.
78. Marcelo KL, Goldie LC, Hirschi KK. Regulation of endothelial cell differentiation and specification. *Circ Res.* 2013 Apr 26;112(9):1272-87.
79. Levenberg S, Zoldan J, Basevitch Y, Langer R. Endothelial potential of human embryonic stem cells. *Blood.* 2007 Aug 1;110(3):806-14.
80. Drake CJ, Fleming PA. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood.* 2000 Mar 1;95(5):1671-9.
81. Stanley EG, Biben C, Elefanty A, Barnett L, Koentgen F, Robb L, et al. Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene *Nkx2-5*. *Int J Dev Biol.* 2002;46(4):431-9.
82. Verzi MP, McCulley DJ, De Val S, Dodou E, Black BL. The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev Biol.* 2005 Nov 1;287(1):134-45.
83. Rasmussen TL, Kweon J, Diekmann MA, Belema-Bedada F, Song Q, Bowlin K, et al. ER71 directs mesodermal fate decisions during embryogenesis. *Development.* 2011 Nov;138(21):4801-12.
84. Misfeldt AM, Boyle SC, Tompkins KL, Bautch VL, Labosky PA, Baldwin HS. Endocardial cells are a distinct endothelial lineage derived from Flk1+ multipotent cardiovascular progenitors. *Dev Biol.* 2009 Sep 1;333(1):78-89.
85. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Apr;21(2):154-65.
86. Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res.* 2010 Jul 15;87(2):262-71.
87. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 1999 Jul 23;98(2):147-57.

88. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):439-42.
89. Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development*. 2007 Aug;134(15):2709-18.
90. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2003 Mar;194(3):237-55.
91. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 2011 Sep;138(17):3593-612.
92. Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev*. 2004 Oct 15;18(20):2469-73.
93. Trindade A, Kumar SR, Scehnet JS, Lopes-da-Costa L, Becker J, Jiang W, et al. Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1720-9.
94. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 2010 Jan;147(1):35-51.
95. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F, et al. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation*. 2002 Oct 22;106(17):2263-70.
96. Park C, Afrikanova I, Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Fong Gh G, et al. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development*. 2004 Jun;131(11):2749-62.
97. Lengerke C, Schmitt S, Bowman TV, Jang IH, Maouche-Chretien L, McKinney-Freeman S, et al. BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Hox pathway. *Cell Stem Cell*. 2008 Jan 10;2(1):72-82.
98. Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, Taketo MM, et al. The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell*. 2010 Jun 15;18(6):938-49.
99. Stepniak E, Radice GL, Vasioukhin V. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Nov;1(5):a002949.
100. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Dec;1(6):a003129.
101. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 Jun;28(1-2):15-33.
102. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*. 2013 Sep 16;26(5):441-54.
103. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Aug;6(8):622-34.
104. Harris TJ, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jul;11(7):502-14.
105. Ohsugi M, Hwang SY, Butz S, Knowles BB, Solter D, Kemler R. Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development. *Dev Dyn*. 1996 Aug;206(4):391-402.
106. De Vries WN, Evsikov AV, Haac BE, Fancher KS, Holbrook AE, Kemler R, et al. Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development*. 2004 Sep;131(18):4435-45.
107. Gonzalez S, Ibanez E, Santalo J. Influence of E-cadherin-mediated cell adhesion on mouse embryonic stem cells derivation from isolated blastomeres. *Stem Cell Rev*. 2011 Sep;7(3):494-505.
108. Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 16;91(17):8263-7.

109. Ohsugi M, Larue L, Schwarz H, Kemler R. Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin. *Dev Biol.* 1997 May 15;185(2):261-71.
110. Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell.* 2001 Jul;1(1):37-49.
111. Zohn IE, Li Y, Skolnik EY, Anderson KV, Han J, Niswander L. p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell.* 2006 Jun 2;125(5):957-69.
112. Hirano M, Hashimoto S, Yonemura S, Sabe H, Aizawa S. EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2008 Sep 22;182(6):1217-30.
113. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development.* 2012 Oct;139(19):3471-86.
114. Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol.* 1997 Jan 1;181(1):64-78.
115. Kostetskii I, Li J, Xiong Y, Zhou R, Ferrari VA, Patel VV, et al. Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ Res.* 2005 Feb 18;96(3):346-54.
116. Luo Y, Ferreira-Cornwell M, Baldwin H, Kostetskii I, Lenox J, Lieberman M, et al. Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin. *Development.* 2001 Feb;128(4):459-69.
117. Luo Y, Radice GL. Cadherin-mediated adhesion is essential for myofibril continuity across the plasma membrane but not for assembly of the contractile apparatus. *J Cell Sci.* 2003 Apr 15;116(Pt 8):1471-9.
118. Ong LL, Kim N, Mima T, Cohen-Gould L, Mikawa T. Trabecular myocytes of the embryonic heart require N-cadherin for migratory unit identity. *Dev Biol.* 1998 Jan 1;193(1):1-9.
119. Luo Y, High FA, Epstein JA, Radice GL. N-cadherin is required for neural crest remodeling of the cardiac outflow tract. *Dev Biol.* 2006 Nov 15;299(2):517-28.
120. Luo Y, Radice GL. N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 2005 Apr 11;169(1):29-34.
121. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol.* 2006 Aug 14;174(4):593-604.
122. Coon BG, Baeyens N, Han J, Budatha M, Ross TD, Fang JS, et al. Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *J Cell Biol.* 2015 Mar 30;208(7):975-86.
123. Resink TJ, Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Erne P. Cadherins and cardiovascular disease. *Swiss Med Wkly.* 2009 Mar 7;139(9-10):122-34.
124. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009 Apr 3;324(5923):98-102.
125. Kajstura J, Urbanek K, Perl S, Hosoda T, Zheng H, Ogorek B, et al. Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res.* 2010 Jul 23;107(2):305-15.
126. Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med.* 2007 Aug;13(8):962-9.
127. Engel FB, Hsieh PC, Lee RT, Keating MT. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 17;103(42):15546-51.
128. Bersell K, Arab S, Haring B, Kuhn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell.* 2009 Jul 23;138(2):257-70.
129. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):326-35.

130. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 Sep 19;114(6):763-76.
131. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3766-71.
132. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 28;104(35):14068-73.
133. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, Yuan F, Sato H, Mu J, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*. 2010 Jan 19;121(2):293-305.
134. Tallini YN, Greene KS, Craven M, Speelman A, Breitbach M, Smith J, et al. c-kit expression identifies cardiovascular precursors in the neonatal heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 10;106(6):1808-13.
135. Zaruba MM, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ. Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation*. 2010 May 11;121(18):1992-2000.
136. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12313-8.
137. Smits AM, van Laake LW, den Ouden K, Schreurs C, Szuhai K, van Echteld CJ, et al. Human cardiomyocyte progenitor cell transplantation preserves long-term function of the infarcted mouse myocardium. *Cardiovasc Res*. 2009 Aug 1;83(3):527-35.
138. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett*. 2002 Oct 23;530(1-3):239-43.
139. Unno K, Jain M, Liao R. Cardiac side population cells: moving toward the center stage in cardiac regeneration. *Circ Res*. 2012 May 11;110(10):1355-63.
140. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004 Oct 29;95(9):911-21.
141. Chimenti I, Smith RR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*. 2010 Mar 19;106(5):971-80.
142. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
143. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004 Apr 8;428(6983):664-8.
144. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004 Apr 8;428(6983):668-73.
145. Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneccchi M, Noiseux N, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 30;104(5):1643-8.
146. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010 Oct 1;107(7):913-22.
147. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*. 2007 Sep;25(9):1015-24.
148. Zhu WZ, Xie Y, Moyes KW, Gold JD, Askari B, Laflamme MA. Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res*. 2010 Sep 17;107(6):776-86.

149. van Laake LW, Passier R, Doevendans PA, Mummery CL. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and cardiac repair in rodents. *Circ Res*. 2008 May 9;102(9):1008-10.
150. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):937-42.
151. Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 Feb;125(2):361-9.
152. Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, et al. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):322-5.
153. Stevens KR, Kreutziger KL, Dupras SK, Korte FS, Regnier M, Muskheli V, et al. Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 29;106(39):16568-73.
154. Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):263-72.
155. Dvir T, Kedem A, Ruvinov E, Levy O, Freeman I, Landa N, et al. Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 1;106(35):14990-5.
156. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 2011 Feb 4;8(2):228-40.
157. Lin Z, Pu WT. Strategies for cardiac regeneration and repair. *Sci Transl Med*. 2014 Jun 4;6(239):239rv1.
158. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med*. 2007 Aug;13(8):970-4.
159. Smart N, Bollini S, Dube KN, Vieira JM, Zhou B, Davidson S, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature*. 2011 Jun 30;474(7353):640-4.
160. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010 Aug 6;142(3):375-86.
161. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012 May 31;485(7400):593-8.
162. Vunjak-Novakovic G, Lui KO, Tandon N, Chien KR. Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011 Aug 15;13:245-67.
163. Li Z, Guan J. Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering. *Polymers*. 2011;3(2):740.
164. Ruvinov E, Leor J, Cohen S. The promotion of myocardial repair by the sequential delivery of IGF-1 and HGF from an injectable alginate biomaterial in a model of acute myocardial infarction. *Biomaterials*. 2011;32(2):565-78.
165. Camci-Unal G, Annabi N, Dokmeci MR, Liao R, Khademhosseini A. Hydrogels for cardiac tissue engineering. *NPG Asia Mater*. [Review]. 2014;6:e99.
166. Sun J, Tan H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*. 2013;6(4):1285.
167. Landa N, Miller L, Feinberg MS, Holbova R, Shachar M, Freeman I, et al. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulation*. 2008 Mar 18;117(11):1388-96.
168. Mukherjee R, Zavadzka JA, Saunders SM, McLean JE, Jeffords LB, Beck C, et al. Targeted myocardial microinjections of a biocomposite material reduces infarct expansion in pigs. *Ann Thorac Surg*. 2008 Oct;86(4):1268-76.
169. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*. 1999 Jan;20(1):45-53.

170. Magyar JP, Nemir M, Ehler E, Suter N, Perriard J-C, Eppenberger HM. Mass Production of Embryoid Bodies in Microbeads. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;944(1):135-43.
171. Kolettis TM, Agelaki MG, Baltogiannis GG, Vlahos AP, Mourouzis I, Fotopoulos A, et al. Comparative effects of acute vs. chronic oral amiodarone treatment during acute myocardial infarction in rats. *Europace*. 2007 Nov;9(11):1099-104.
172. Red-Horse K, Crawford Y, Shojaei F, Ferrara N. Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult. *Dev Cell*. 2007 Feb;12(2):181-94.
173. Kado M, Lee JK, Hidaka K, Miwa K, Murohara T, Kasai K, et al. Paracrine factors of vascular endothelial cells facilitate cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 12;377(2):413-8.
174. Wallukat G, Wobus AM. Use of spontaneously beating heart muscle cells differentiating from pluripotent embryonic stem cells for testing of chronotropic agents. *Arch Toxicol Suppl*. 1991;14:136-9.
175. Musunuru K, Domian IJ, Chien KR. Stem cell models of cardiac development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010;26:667-87.
176. Sahara M, Hansson EM, Wernet O, Lui KO, Spater D, Chien KR. Manipulation of a VEGF-Notch signaling circuit drives formation of functional vascular endothelial progenitors from human pluripotent stem cells. *Cell Res*. 2015 Jan;25(1):148.
177. Vintersten K, Monetti C, Gertsenstein M, Zhang P, Laszlo L, Biechele S, et al. Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis*. 2004 Dec;40(4):241-6.
178. Kirby LA, Schott JT, Noble BL, Mendez DC, Caseley PS, Peterson SC, et al. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor, SB-216763, promotes pluripotency in mouse embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012;7(6):e39329.
179. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1438-49.
180. Honda M, Kurisaki A, Ohnuma K, Okochi H, Hamazaki TS, Asashima M. N-cadherin is a useful marker for the progenitor of cardiomyocytes differentiated from mouse ES cells in serum-free condition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 29;351(4):877-82.
181. Soh BS, Buac K, Xu H, Li E, Ng SY, Wu H, et al. N-cadherin prevents the premature differentiation of anterior heart field progenitors in the pharyngeal mesodermal microenvironment. *Cell Res*. 2014 Dec;24(12):1420-32.
182. Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*. 2009 Feb 12;457(7231):892-5.
183. Lui KO, Zangi L, Silva EA, Bu L, Sahara M, Li RA, et al. Driving vascular endothelial cell fate of human multipotent Isl1+ heart progenitors with VEGF modified mRNA. *Cell Res*. 2013 Oct;23(10):1172-86.
184. Keenan ID, Rhee HJ, Chaudhry B, Henderson DJ. Origin of non-cardiac endothelial cells from an Isl1+ lineage. *FEBS Lett*. 2012 Jun 21;586(13):1790-4.
185. Masino AM, Gallardo TD, Wilcox CA, Olson EN, Williams RS, Garry DJ. Transcriptional regulation of cardiac progenitor cell populations. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):389-97.
186. Hsieh PC, Davis ME, Lisowski LK, Lee RT. Endothelial-cardiomyocyte interactions in cardiac development and repair. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:51-66.
187. Tian Y, Morrissey EE. Importance of myocyte-nonmyocyte interactions in cardiac development and disease. *Circ Res*. 2012 Mar 30;110(7):1023-34.
188. Noireaud J, Andriantsitohaina R. Recent insights in the paracrine modulation of cardiomyocyte contractility by cardiac endothelial cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:923805.
189. Chen K, Bai H, Arzigian M, Gao YX, Bao J, Wu WS, et al. Endothelial cells regulate cardiomyocyte development from embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. 2010 Sep 1;111(1):29-39.

190. Gory S, Vernet M, Laurent M, Dejana E, Dalmon J, Huber P. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*. 1999 Jan 1;93(1):184-92.
191. Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, Harvey NL, et al. VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn*. 2006 Mar;235(3):759-67.
192. Blancafort P, Magnenat L, Barbas CF, 3rd. Scanning the human genome with combinatorial transcription factor libraries. *Nat Biotechnol*. 2003 Mar;21(3):269-74.
193. Gory-Faure S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, et al. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*. 1999 May;126(10):2093-102.
194. Giampietro C, Taddei A, Corada M, Sarra-Ferraris GM, Alcalay M, Cavallaro U, et al. Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood*. 2012 Mar 1;119(9):2159-70.
195. Bondue A, Tannler S, Chiapparo G, Chabab S, Ramialison M, Paulissen C, et al. Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol*. 2011 Mar 7;192(5):751-65.
196. Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, Menendez P, et al. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*. 2004 Jul;21(1):31-41.
197. Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani M, Corada M, Swirsding K, et al. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J*. 2008 Apr 9;27(7):993-1004.
198. Zhang K, Pang K, Wu X. Isolation and Transplantation of Corneal Endothelial Cell-Like Cells Derived from In-Vitro-Differentiated Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 2014;23(12):1340-54.
199. Bahrami SB, Veisheh M, Boudreau NJ. Isolation and Expansion of Endothelial Progenitor Cells Derived from Mouse Embryonic Stem Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2012;916:81-96.
200. Ovchinnikov DA, Hidalgo A, Yang S-K, Zhang X, Hudson J, Mazzone SB, et al. Isolation of Contractile Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem-Cell-Derived Cardiomyogenic Cultures Using a Human NCX1-EGFP Reporter. *Stem Cells and Development*. 2014 2015/01/01;24(1):11-20.
201. Marchetti S, Gimond C, Iljin K, Bourcier C, Alitalo K, Pouyssegur J, et al. Endothelial cells genetically selected from differentiating mouse embryonic stem cells incorporate at sites of neovascularization in vivo. *J Cell Sci*. 2002 May 15;115(Pt 10):2075-85.
202. Levenberg S, Ferreira LS, Chen-Konak L, Kraehenbuehl TP, Langer R. Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc*. 2010 Jun;5(6):1115-26.
203. Huber I, Itzhaki I, Caspi O, Arbel G, Tzukerman M, Gepstein A, et al. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *FASEB J*. 2007 Aug;21(10):2551-63.
204. Cagavi E, Bartulos O, Suh CY, Sun B, Yue Z, Jiang Z, et al. Functional cardiomyocytes derived from Isl1 cardiac progenitors via Bmp4 stimulation. *PLoS One*. 2014;9(12):e110752.
205. Nir SG, David R, Zaruba M, Franz WM, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. *Cardiovasc Res*. 2003 May 1;58(2):313-23.
206. Ma Z, Wang J, Loskill P, Huebsch N, Koo S, Svedlund FL, et al. Self-organizing human cardiac microchambers mediated by geometric confinement. *Nat Commun*. 2015;6:7413.
207. James D, Nam HS, Seandel M, Nolan D, Janovitz T, Tomishima M, et al. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent. *Nat Biotechnol*. 2010 Feb;28(2):161-6.

208. Souza CM, Davidson D, Rhee I, Gratton JP, Davis EC, Veillette A. The phosphatase PTP-PEST/PTPN12 regulates endothelial cell migration and adhesion, but not permeability, and controls vascular development and embryonic viability. *J Biol Chem*. 2012 Dec 14;287(51):43180-90.
209. Fraser ST, Hadjantonakis A-K, Sahr KE, Willey S, Kelly OG, Jones EAV, et al. Using a Histone Yellow Fluorescent Protein Fusion for Tagging and Tracking Endothelial Cells in ES Cells and Mice. *Genesis* (New York, NY : 2000). 2005;42(3):162-71.
210. Elliott DA, Braam SR, Koutsis K, Ng ES, Jenny R, Lagerqvist EL, et al. NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2011 Dec;8(12):1037-40.
211. Fu JD, Jiang P, Rushing S, Liu J, Chiamvimonvat N, Li RA. Na⁺/Ca²⁺ exchanger is a determinant of excitation-contraction coupling in human embryonic stem cell-derived ventricular cardiomyocytes. *Stem Cells Dev*. 2010 Jun;19(6):773-82.
212. Anderson D, Self T, Mellor IR, Goh G, Hill SJ, Denning C. Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Mol Ther*. 2007 Nov;15(11):2027-36.
213. Xu XQ, Zweigerdt R, Soo SY, Ngoh ZX, Tham SC, Wang ST, et al. Highly enriched cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Cytotherapy*. 2008;10(4):376-89.
214. Choi WY, Poss KD. Cardiac regeneration. *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:319-44.
215. Kwon C, Arnold J, Hsiao EC, Taketo MM, Conklin BR, Srivastava D. Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 26;104(26):10894-9.
216. Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A, et al. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol*. 2003 Sep 15;162(6):1111-22.
217. Lin Q, Lu J, Yanagisawa H, Webb R, Lyons GE, Richardson JA, et al. Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development*. 1998 Nov;125(22):4565-74.
218. Bi W, Drake CJ, Schwarz JJ. The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF. *Dev Biol*. 1999 Jul 15;211(2):255-67.
219. Yu J, Du KT, Fang Q, Gu Y, Mihardja SS, Sievers RE, et al. The use of human mesenchymal stem cells encapsulated in RGD modified alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in the rat. *Biomaterials*. 2010;31(27):7012-20.
220. Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2003 May 30;92(10):1079-88.
221. Daskalopoulos EP, Vilaeti AD, Barka E, Mantzouratou P, Kouroupis D, Kontonika M, et al. Attenuation of post-infarction remodeling in rats by sustained myocardial growth hormone administration. *Growth Factors*. 2015 Aug 20:1-9.