



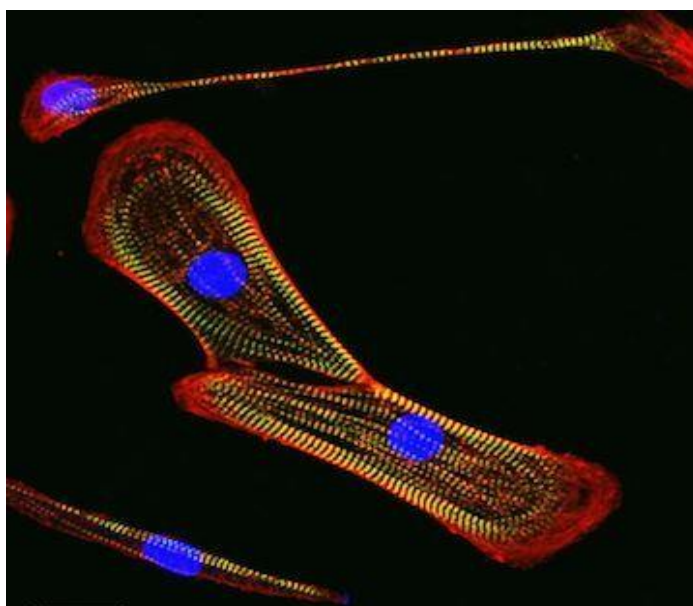
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS



Π.Μ.Σ. Βιολογία Συστημάτων
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας (ΙΙΒΕΑΑ)

Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Tbx5 στη διαφοροποίηση των πρώιμων καρδιακών κυττάρων

Μεταπτυχιακή Διατριβή



Παναγιώτα Κ. Σιάτρα

Επιβλέπων Καθηγητής: Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Γ.Π.Α

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Μπέης Δημήτριος, Ερευνητής Β'
Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, ΙΙΒΕΑΑ

Αθήνα 2020

Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Tbx5 στη διαφοροποίηση των πρώιμων καρδιακών κυττάρων

The role of transcription factor Tbx5 in differentiation of cardiac progenitor cells

Μεταπτυχιακή Διατριβή
Παναγιώτα Κ. Σιάτρα

Επιβλέπων Καθηγητής:
Πολυδεύκης Χατζόπουλος

Η ανάθεση της παρούσας διπλωματικής μελέτης έγινε σύμφωνα με την συνέλευση του Τμήματος Βιοτεχνολογίας κατά την οποία ορίστηκε το θέμα της διπλωματικής και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή.

Τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

1. Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ
2. Δρ. Δημήτριος Μπέης, Ερευνητής Β΄
3. Χρήστος Ζέρβας, Ερευνητής Γ΄

Περίληψη

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι η πρώτη παγκοσμίως αιτία θανάτου. Η κυριότερη εξ αυτών, δηλαδή το έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI), μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια των καρδιομυοκυττάρων (CMs), και τελικά σε καρδιακή ανεπάρκεια. Στα θηλαστικά, ένας τέτοιος τραυματισμός οδηγεί στον οριστικό θάνατο των καρδιομυοκυττάρων και σε μόνιμη ινώδη ουλή, αφού πρόκειται για κύτταρα μετα-μιτωτικά, τα οποία δεν αυτό-ανανεώνονται. Από την άλλη, τα αμφίβια και το zebrafish, έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τους τραυματισμένους ιστούς, συμπεριλαμβανομένης και της καρδιάς. Σήμερα είναι γνωστό ότι η εμβρυϊκή καρδιά σχηματίζεται από δύο καρδιακά πεδία, από τα πρώιμα καρδιακά κύτταρα (CPCs) του πρωτογενούς καρδιακού πεδίου (FHF) που είναι μονοδύναμα και θα δώσουν τα πρώτα διαφοροποιούμενα CMs, και τα CPCs του δευτερογενούς (SHF), που είναι κύτταρα πολυδύναμα και διαφοροποιούνται σε CMs, αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (vSMCS) και ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs). Η εμφάνιση του FHF σηματοδοτείται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Tbx5. Ωστόσο, επειδή τα αναπτυξιακά μονοπάτια της καρδιάς δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, πολλές μελέτες εστιάζουν το ενδιαφέρον τους στην *in vitro* απόκτηση και ανάλυση διαφόρων CPC πληθυσμών.

Έτσι, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, έγινε *in vitro* διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού (mESCs) προς CPCs και CMs, με χρήση της κυτταρικής σειράς Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}, για την απόκτηση του βέλτιστου πληθυσμού CPCs. Η επαγωγή και εξειδίκευση του καρδιακού μεσοδέρματος έγινε με τη χρήση των κυτταροκινών VEGF, BMP4, Activin A, bFGF και FGF10, σε καλλιέργεια μονοστιβάδας και εμβρυοειδών σωματίων. Έπειτα, από τη χορήγηση της 4-OHT καθόλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης, η κυτταροειδική έκφραση του Tbx5 σηματοδοτείται από την έκφραση της πρωτεΐνης eYFP. Από τη διαφοροποίηση αυτή προέκυψε ένας ετερογενής πληθυσμός CM, SMC και EC κυττάρων, ενώ η έκφραση του Tbx5 εντοπίστηκε μόνο στα CM, επιβεβαιώνοντας το μονοδύναμο χαρακτήρα των Tbx5⁺ κυττάρων. Η τεχνική ομοιογένεια κατά την υλοποίηση τέτοιων πρωτοκόλλων είναι αναγκαία, για την αποφυγή τεχνικών διακυμάνσεων, όπως προέκυψε από διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων της ανοσοκυτταροχημικής ανάλυσης.

Κατά την πρώιμη ανάπτυξης της καρδιάς, τα πολυδύναμα CPCs και των δύο καρδιακών πεδίων εκφράζουν στην επιφάνειά τους τις πρωτεΐνες Pdgfra και Gfra2. Μέσω μίας σειράς πειραμάτων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής-φθορισμού προέκυψε ότι ο διπλά θετικός Pdgfra⁺/Gfra2⁺ εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ της 7^{ης} και 9^{ης} ημέρας διαφοροποίησης, και φθίνει μετά τη 10^η ημέρα. Επιπλέον, ο πληθυσμός αυτός, όπως προέκυψε από τα ίδια πειράματα, κατανέμεται μεταξύ των Kdr^{low} και Kdr⁻ κυττάρων. Για το διαχωρισμό του FHF και του SHF, και την απομόνωση του πρώτου για την περαιτέρω ανάλυσή του, σημαντική ένδειξη αποτελεί η έκφραση του Tbx5. Τα κύτταρα που εκφράζουν τον Tbx5 συναντώνται την 7^η ημέρα στον πληθυσμό Kdr^{low}/Pdgfra⁺/Gfra2⁺, και φαίνεται να έχουσαν πολλαπλασιαστεί την 9^η

ημέρα, ενώ συναντώνται σε μικρότερο αριθμό στον $Kdr^{-}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$ την 7^η ημέρα, αριθμός που μειώνεται μέχρι την 9^η ημέρα. Συνοψίζοντας, η απομόνωση των $Kdr^{low}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}/Tbx5^{+}$ CPCs την 9^η ημέρα της διαφοροποίησης αποτελεί τη βέλτιστη χρονική στιγμή για την απόκτηση των CPCs του FHF.

Η συμβολή των CPCs του FHF στα πρώτα διαφοροποιούμενα καρδιομυοκύτταρα, έχει συσσωρεύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων στον μεταγραφικό παράγοντα Tbx5. Η απομόνωση και ανάλυση ενός τέτοιου πληθυσμού από το ποντίκι, κατά την εμβρυϊκή ή και κατά την ενήλικη ζωή κρίνεται αναγκαία έτσι ώστε να έρθουν στο φως νέα ευρήματα αναφορικά με τα αναπτυξιακά μονοπάτια της καρδιάς. Για το σκόπο αυτό, μέσω των διασταυρώσεων τριών γενεών F0, F1 και F2, αποκτήθηκε η F3 γενιά και το διαγονιδιακό μοντέλο $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$.

Τέλος, για την επιβεβαίωση του ρόλου του Tbx5 στην ανάπτυξη της καρδιάς, πραγματοποιήσαμε ενέσεις αντισημαινόντων ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης έναντι του *tbx5a* σε έμβρυα του ψαριού ζέβρα (zebrafish). Αυτό οδήγησε στην εμφάνιση περικαρδιακού οιδήματος, βραδυκαρδίας, αδυναμία ολοκλήρωσης της δεξιάς στροφής του μυοκαρδίου, απώλεια του οφθαλμού του θωρακικού πτερυγίου και τελικά στο θάνατο των εμβρύων μετά τις 5-6 μετά τη γονιμοποίηση, ευρήματα που βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενη βιβλιογραφία.

Λέξεις-Κλειδιά: Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού (mESCs), Πρώιμα καρδιακά κύτταρα (CPCs), Διαφοροποίηση καρδιομυοκυττάρων, Καλλιέργεια μονοστιβάδας, Εμβρυοειδή σωματίδια, Tbx5, Σύστημα Cre/loxP, Ψάρι ζέβρα, Ενέσεις αντισημαινόντων ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης

Επιστημονική περιοχή: Επιστήμες Ζωής (Ιατρική και Επιστήμες Υγείας)

Abstract

According to World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of death globally. Among the most common CVDs is myocardial infarction (MI) leading to progressive cardiomyocyte (CM) loss and eventually to fatal heart failure. In mammals, MI often results in permanent CM death followed by formation of fibrotic scar. The mammalian heart lacks the regenerative ability to replenish damaged/lost CMs. In contrast, amphibians and zebrafish maintain the capacity to regenerate injured tissues, including the heart, throughout life. The embryonic heart is formed from two sources of cardiac progenitor cells (CPCs), those that occupy the first heart field (FHF) (i.e. cardiac crescent) and those found in second heart field (SHF). Seminal studies have indicated that the earliest differentiating CMs derive from unipotent FHF CPCs, while SHF CPCs are multipotent progenitor cells, able to differentiate towards CMs, vascular smooth muscle cells (vSMCs) and endothelial cells (ECs). It is now evident that the appearance of FHF is marked by the expression of the cardinal transcription factor Tbx5, both in mammals and lower vertebrates. However, since signalling pathways of heart development are not yet fully determined, it is important to delineate how to obtain homogeneous CPC populations *in vitro* for cell-based therapies.

In this study, we established a defined *in vitro* differentiation regime of mouse embryonic stem cells (mESC) cell line carrying a tamoxifen-induced bacterial artificial chromosome (BAC) $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$ transgene towards CPCs and CMs, for the acquisition of the optimal CPC populations. In this differentiation protocol we used cytokines VEGF, BMP4, Activin A, bFGF and FGF10, for the induction and specification of cardiac mesoderm, in monolayer and embryoid body (EB) cultures. Tamoxifen administration throughout mesodermal differentiation led to the identification of cell-specific expression of Tbx5 via the expression of eYFP protein. The outcome of this differentiation was a heterogeneous population consisting of CM, SMC and EC cells, while the expression of Tbx5 was restricted to CMs, confirming the unipotent character of Tbx5⁺ CPCs. Technical uniformity was essential during the implementation of these sensitive processes in order to avoid technical fluctuations, as was suggested from differences in the results of immunocytochemical analysis.

During early stages of cardiogenesis, multipotent CPCs of both heart fields express cell surface markers Pdgfra and Gfra2. Through a series of Fluorescence-activated cell sorting (FACS) experiments, we concluded that double positive population Pdgfra⁺/Gfra2⁺ reaches a peak between differentiation days 7 and 9, and begins to decrease at differentiation day 10. This population is distributed between Kdr^{low} and Kdr⁻ cells. Segregation of FHF and SHF, as well as isolation and further analysis of FHF, is mostly based on the expression of Tbx5. Tbx5-expressing cells are detected on day 7 in Kdr^{low}/Pdgfra⁺/Gfra2⁺ population, and they seem to have expanded by day 9, while their number remained unchanged in Kdr⁻/Pdgfra⁺/Gfra2⁺ population between

days 7 and 9. In summary, isolation of $Kdr^{low}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}/Tbx5^{+}$ CPCs at differentiation days 7-9 constitutes the optimal strategy for the acquisition of CPCs.

Contribution of FHF CPCs in the first differentiating CMs has raised the interest of different research groups for Tbx5. Isolation and analysis of this population from a mouse model, during embryonic development or adult life is necessary to shed light on developmental pathways of cardiogenesis. For this purpose, we performed genetic crosses of 3 generations F0, F1 and F2, to acquire F3 generation and the transgenic model $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$.

Finally, in order to confirm the role of Tbx5 in heart development, we carried out morpholino injections in zebrafish embryos directed against the *tbx5* translational start site (tbx5-MO). This resulted in a phenotype previously described in past literature characterized by the appearance of pericardial edema, slower heart beat, failure to complete looping, absence of pectoral fin bud, and eventually the death of embryos at 5-6 days post-fertilization (dpf).

Keywords: Mouse embryonic stem cells (mESCs), Cardiac progenitor cells (CPCs), Cardiomyocyte differentiation, Monolayer culture, Embryoid bodies (EBs), Tbx5, Cre/loxP system, Zebrafish, Morpholino injections

Research field: Life Sciences (Medical and Health Sciences)

Αντί Προλόγου

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής, Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την υποστήριξη που έδειξε σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και το Δρ. Χρήστο Ζέρβα, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την επίβλεψη και την αξιολόγηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Ερευνητή Β', Δρ. Μπέη Δημήτριο για την ευκαιρία που μου παρείχε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου μελέτη στο εργαστήριό του στο ΙΙΒΕΑΑ. Η ενδιαφέρουσα διάλεξή του στα πλαίσια του Π.Μ.Σ «Βιολογία Συστημάτων» αποτέλεσε σημαντικό ερέθισμα για την ενασχόλησή μου με τον τομέα της αναπτυξιακής βιολογίας και προκάλεσε το ενδιαφέρον μου για την ενασχόληση με ένα πολλά υποσχόμενο οργανισμό μοντέλο, το ψάρι ζέβρα. Τον ευχαριστώ θερμά για την επίβλεψη και για τις καίριες συστάσεις του καθόλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον ερευνητή Ιωάννη Κοκκινόπουλο. Οι γνώσεις του πάνω σε θέματα της αναπτυξιακής βιολογίας, η καθοδήγηση, η στήριξη, η βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκτέλεση κρίσιμων πειραματικών μεθόδων και οι πολύτιμες συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου, αποτελούν για μένα χρήσιμα εργαλεία για την μετέπειτα πορεία μου στον τομέα της έρευνας.

Φυσικά τη μεγάλη ευγνωμοσύνη μου οφείλω και σε όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Μπέη για την καθοδήγηση και τη βοήθειά τους ανά πάσα στιγμή. Ευχαριστώ, λοιπόν, τις μεταδιδάκτορες Αδαμαντία Αγάλου και Βάνια Τσατά, όπως επίσης και τις υποψήφιες διδάκτορες Ματίνα Κατράκη και Παναγιώτα Γιαρδόγλου, για τις συμβουλές και τη συμπαράστασή τους, καθώς υπήρξαν συνοδοιπόροι στις καθημερινές δυσκολίες, αλλά και στις χαρές σε όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής χρονιάς.

Τέλος, πάνω από όλα, δεν μπορώ παρά να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, που βρίσκονται στο πλευρό μου σε ό,τι κάνω προσφέροντας την αμέριστη στήριξη και συμπαράστασή τους.

Πίνακας Περιεχομένων

1.	Εισαγωγή	11
1.1	Οι στιβάδες της ενήλικης καρδιάς	11
1.2	Το ερεθισματοαγωγό σύστημα της ενήλικης καρδιάς.....	13
1.3	Καρδιογενής εξειδίκευση και διαφοροποίηση	15
1.3.1	Στάδιο πλειοδύναμων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων.....	15
1.3.2	Καθορισμός καρδιακού μεσοδέρματος	17
1.3.3	Σχηματισμός καρδιακού σωλήνα	19
1.4	Εμβρυϊκά πρόδρομα καρδιακά κύτταρα (embryonic cardiac progenitors).....	20
1.5	Ανακάλυψη νέων δεικτών για την απομόνωση των CPCs	25
1.6	Τα CPCs στην ενήλικη καρδιά.....	26
1.7	Σηματοδοτικά μονοπάτια και παρακρινικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της καρδιάς.....	30
1.8	Συγγενείς ανωμαλίες της καρδιάς	35
1.9	Η Αναγέννηση της καρδιάς	38
1.9.1	Καινοτόμες θεραπείες.....	40
1.9.2	Θεραπείες βασισμένες σε βλαστικά κύτταρα.....	41
1.9.3	Πρόσδος για την απόκτηση CPC in vitro	44
1.10	Το ψάρι ζέβρα (zebrafish) ως πειραματικό μοντέλο	49
1.10.1	Γεωγραφική εξάπλωση, ενδιαίτημα και μορφολογικά χαρακτηριστικά	49
1.10.2	Πλεονεκτήματα χρήσης του zebrafish στην επιστημονική έρευνα	50
1.10.3	Αναπαραγωγή και εμβρυϊκή ανάπτυξη	53
1.10.4	Η ανάπτυξη της καρδιάς στο zebrafish	55
1.10.5	Η ανάπτυξη της κολποκοιλιακής βαλβίδας.....	58
1.10.6	Η επαγωγή του μεσενδοδέρματος στο zebrafish	60
1.10.7	Εμβρυϊκά CPCs στο zebrafish	61
2.	Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	66
3.	Υλικά και Μέθοδοι	67
3.1	Απόκτηση Πρώιμων καρδιακών κυττάρων (CPCs).....	67
3.1.1	Προέλευση της κυτταρικής σειράς mESCs που φέρει το διπλό διαγονίδιο $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$	67
3.1.2	Χορήγηση της 4-υδροξύ-ταμοξιφένης (4-OHT).....	68
3.1.3	Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$	69
3.1.4	Διαφοροποίηση των κυττάρων προς CPCs	71

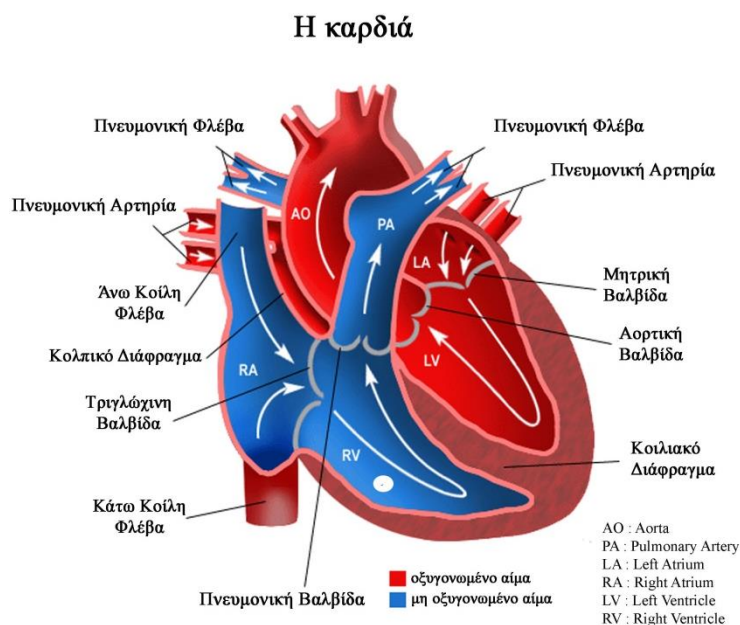
3.1.5	Απομόνωση των CPCs με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής- φθορισμού (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)	74
3.2	Ανοσοκυτταροχημική Ανάλυση.....	77
3.2.1	Μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 4% PFA	77
3.2.2	Χρώση των κυττάρων με τη χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων	78
3.3	Γονοτυπική ανάλυση για την απόκτηση των $Tbx5^{creERT2} / ROSA26^{eYFP/eYFP}$ διαγονιδιακών ποντικών 80	
3.3.1	Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών.....	80
3.3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	81
3.3.3	Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση	82
3.4	Διαβίωση και διατροφή του πειραματικού μοντέλου zebrafish	83
3.5	Διασταύρωση και χειρισμός εμβρύων.....	84
3.6	Διαγονιδιακές σειρές zebrafish	86
3.7	Μικροενέσεις αντισημειώντων ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης έναντι του μεταγραφικού παράγοντα $Tbx5$	87
3.8	Χρώση των εμβρύων zebrafish με τη φαλλοϊδίνη	89
3.8.1	Μονιμοποίηση εμβρύων με διάλυμα PFA	89
3.8.2	Χρώση φαλλοϊδίνης.....	89
3.9	Απεικονιστικές Μέθοδοι	90
4.	Αποτελέσματα	91
4.1	Μορφολογία των κυττάρων κατά τα στάδια διαφοροποίησης των mESCs προς CMs για την απόκτηση του επιθυμητού πληθυσμού CPCs.....	91
4.2	Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση των διαφοροποιημένων mESCs	93
4.3	Απόκτηση του βέλτιστου πληθυσμού CPCs από mESCs	97
4.4	Διαχωρισμός των CPC σε FHF και SHF <i>in vitro</i>	103
4.5	Γονοτύπηση ποντικών για την απόκτηση του διαγονιδιακού μοντέλου $Tbx5^{CreERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$	105
4.6	Φαινοτυπική ανάλυση της επίδρασης της αποσιώπησης του $Tbx5$ μέσω ενέσεων μορφολίνης	109
4.7	Επίδραση της απουσίας του $Tbx5$ στο σχηματισμό των βαλβίδων.....	112
5.	Συζήτηση.....	114
5.1	Τα mESCs διαφοροποιούνται σε κύτταρα και των δύο καρδιακών πεδίων, με τα CMs του FHF να εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα $Tbx5$	114
5.2	Απόκτηση του βέλτιστου πληθυσμού CPCs μεταξύ 7 ^{ης} και 9 ^{ης} ημέρας διαφοροποίησης,	115
5.3	Απομόνωση του FHF την 9η ημέρα με τον $Tbx5$ να εκφράζεται κυρίως στον $Kdr^{low}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$ πληθυσμό	118
5.4	Το διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού $Tbx5^{Cre} / ROSA26^{eYFP/eYFP}$	118

5.5	Ο Tbx5 είναι απαραίτητος για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης της καρδιάς και του θωρακικού πτερυγίου στο zebrafish.....	119
6.	Βιβλιογραφία.....	122

1. Εισαγωγή

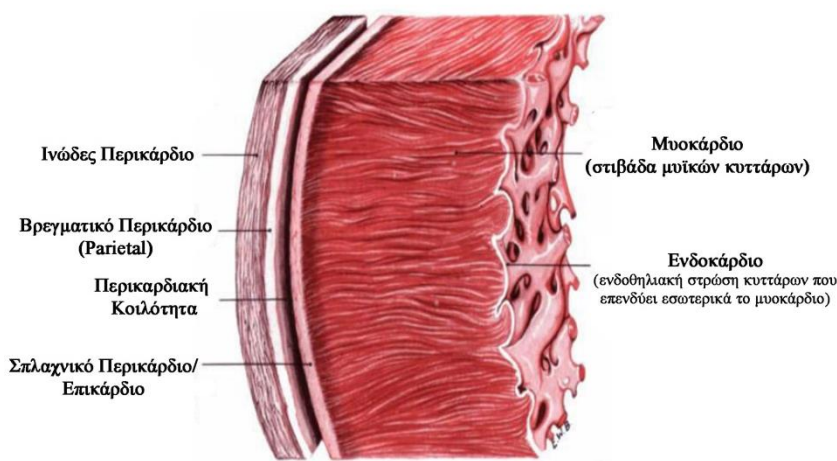
1.1 Οι στιβάδες της ενήλικης καρδιάς

Η καρδιά είναι ένας ειδικός μυς που λειτουργεί σαν αντλία και είναι υπεύθυνη για την κατανομή των θρεπτικών στοιχείων και του οξυγόνου στο έμβρυο μέσω του δικτύου των αρτηριών. Στα σπονδυλωτά, η καρδιά είναι το πρώτο όργανο που σχηματίζεται και μαζί με τα αιμοφόρα αγγεία και το αίμα, αποτελεί μέρος του κυκλοφορικού συστήματος [1]. Καθώς εμφανίζονται τα πρώτα αιμοσφαίρια στον λεκιθικό σάκο, σχηματίζονται αιμοφόρα αγγεία σε όλο το έμβρυο και αναδύεται η σωληνοειδής καρδιά από την εμβρυϊκή στιβάδα του μεσοδέρματος. Η καρδιά των ψαριών είναι ένας μυώδης σωλήνας που αποτελείται από τον καρδιακό κόλπο και την κοιλία (δίχωρη), ενώ τα αμφίβια διαθέτουν τρίχωρη καρδιά με δύο ξεχωριστούς καρδιακούς κόλπους και μία κοιλία. Τα πτηνά και τα θηλαστικά έχουν τετράχωρη καρδιά που αποτελείται από δύο κόλπους και δύο κοιλίες (Εικόνα 1.1). Συγκεκριμένα στον άνθρωπο, η ανάπτυξη της καρδιάς από το μεσόδερμα ξεκινάει περίπου τη 18^η-19^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και ξεκινά να χτυπά και να διοχετεύει αίμα την 21^η-22^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Ο σχηματισμός του καρδιακού ιστού λαμβάνει χώρα εντός της θωρακικής κοιλότητας ανάμεσα στους δύο πνεύμονες, πίσω από το στέρνο και πάνω από το διάφραγμα [2]. Το καρδιακό τοίχωμα αποτελείται από τρεις διακριτές στιβάδες από έξω προς τα μέσα: το επικάρδιο, το μυοκάρδιο και το ενδοκάρδιο, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.



Εικόνα 1.1: Η ανατομία της καρδιάς. Η τετράχωρη καρδιά των θηλαστικών αποτελείται από δύο κόλπους και δύο κοιλίες. Στην εικόνα πέρα από τους θαλάμους, απεικονίζονται οι βαλβίδες και τα σημαντικά αγγεία της καρδιάς. (τροποποιήθηκε από [3]).

➤ **Επικάρδιο:** Το επικάρδιο είναι η εξωτερική στιβάδα του τοιχώματος της καρδιάς, γνωστό και ως σπλαχνικό περικάρδιο. Περικάρδιο είναι ο ινοορογόνος σάκος που περικλείει την καρδιά. Ο χώρος ανάμεσα στο τοιχωματικό περικάρδιο και το επικάρδιο είναι η περικαρδιακή κοιλότητα, η οποία περιέχει ορώδες υγρό που προλαμβάνει την τριβή, καθώς η καρδιά συστέλλεται (Εικόνα 1.2). Το επικάρδιο βρίσκεται κάτω από το λιπώδη ιστό, και κάτω από το επικάρδιο βρίσκονται οι στεφανιαίες αρτηρίες, οι φλέβες, τα λεμφικά αγγεία και τα νεύρα. Ο σχηματισμός του επικαρδίου στην επιφάνεια των κοιλιών γίνεται εμφανής την εμβρυϊκή μέρα 10.5 (E10.5) στο ποντίκι και την 4^η εβδομάδα κύησης σε ανθρώπινα έμβρυα. Τα είδη ιστού που το αποτελούν είναι ο συνδετικός ιστός και το επιθήλιο. Πειράματα χαρτών πεπρωμένου και γενεαλογίας δείχνουν ότι κύτταρα που προέρχονται από το επικάρδιο (Epicardium-Derived Cells, EPDCs) διαφοροποιούνται σε καρδιακούς ινοβλάστες και αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (vascular Smooth Muscle Cells, vSMCs) στην ώριμη καρδιά([4]. Επιπλέον, αμφιλεγόμενη είναι η συνεισφορά των EPDCs στη δημιουργία ενδοθηλιακών κυττάρων της στεφανιαίας αρτηρίας και καρδιομυοκυττάρων (Cardiomyocytes, CMs). Η συνεισφορά αυτή, μπορεί να ελάσσονος σημασίας, ωστόσο, μελέτες δείχνουν ότι κύτταρα του επικαρδίου ($Wt1^+$, $Tbx18^+$), κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη της καρδιάς, διαφοροποιούνται σε λειτουργικά CMs τη μέρα 10.5-11.5 [5-6].



Εικόνα 1.2: Το τοίχωμα της καρδιάς. (Τροποποιήθηκε από www.arthursclipart.org/medical/circulatory/)

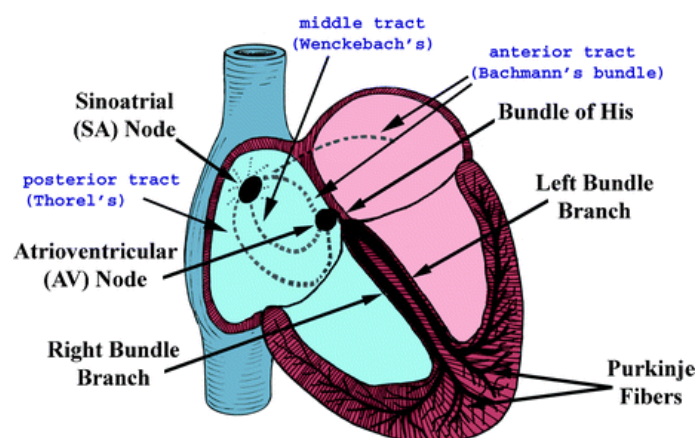
➤ **Μυοκάρδιο:** Είναι το συστατικό μέρος της καρδιάς και αποτελεί εξειδικευμένο τμήμα μυϊκού ιστού (Εικόνα 1.2). Δημιουργείται από τα καρδιομυοκύτταρα που αποτελούν το 30-40% των κυττάρων της καρδιάς των θηλαστικών, ενώ σε όγκο καταλαμβάνουν περίπου το 70-85% [7-9]. Οι παλμοί οφείλονται σε διαδοχικές συστολές και χαλαρώσεις του μυοκαρδίου. Η λειτουργία της καρδιάς συντονίζεται από εσωτερικούς φυσικούς βηματοδότες και τη συνεργασία των κυττάρων του μυοκαρδίου, τα οποία μπορούν και συσπώνται απουσία νευρικής ή ορμονικής διέγερσης (αυτορρύθμιση). Οι φυσικοί βηματοδότες της καρδιάς είναι δύο και βρίσκονται ο ένας στο τοίχωμα του δεξιού κόλπου (φλεβόκομβος-Sinoatrial Node, SA) και ο άλλος στο σημείο επαφής του μεσοκολπικού και του μεσοκοιλιακού διαφράγματος (κολποκοιλιακός κόμβος-Atrioventricular Node, AV).

➤ **Ενδοκάρδιο:** Είναι η στιβάδα που επενδύει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια της καρδιάς (Εικόνα 1.2). Η δομή και το πάχος της ποικίλουν από θάλαμο σε θάλαμο, καθώς είναι

παχύτερη στους κόλπους απ' ό,τι στις κοιλίες, όπως επίσης και στους αριστερούς θαλάμους της καρδιάς σε σχέση με τους αντίστοιχους δεξιούς. Το κοιλιακό ενδοκάρδιο αποτελείται από πέντε διακριτές στιβάδες: την ενδοθηλιακή, την εσωτερική στιβάδα συνδετικού ιστού, μία στιβάδα ελαστικού ιστού, τη στιβάδα των λείων μυϊκών κυττάρων, την εξωτερική στιβάδα συνδετικού ιστού, και τέλος την υπο-ενδοκαρδιακή στιβάδα, η οποία ενώνει το ενδοκάρδιο με το μυοκάρδιο [10]. Στο ενδοκάρδιο βρίσκονται οι νευρικές ίνες Purkinje που μεταδίδουν ένα ρυθμικό δυναμικό σε όλο το μυοκάρδιο οδηγώντας στη συστολή του. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells, ECs) που αποτελούν την εσωτερική στιβάδα του ενδοκαρδίου, ρυθμίζουν πλευρές της ομοιόστασης [11]. Υπό κανονικές συνθήκες, τα ECs είναι κύτταρα αντιθρομβωτικά, αποτρέποντας τα κύτταρα που κυκλοφορούν με τη ροή του αίματος να προσκολλώνται και κατ' επέκταση να παρεμποδίζουν την κανονική ροή του αίματος μέσα στην καρδιά και τα αγγεία. Η κανονική ροή του αίματος μέσα από την καρδιά εξαρτάται από τις βαλβίδες της καρδιάς. Οι σωστά λειτουργικές βαλβίδες λειτουργούν ως βαλβίδες μίας κατεύθυνσης, επιτρέποντας στο αίμα να ρέει είτε από τον έναν θάλαμο της καρδιάς στον άλλο μέσω των κολποκοιλιακών βαλβίδων (Atrioventricular Valves, AVVs) είτε να εξέρχεται από την καρδιά και να εισέρχεται αφενός στην πνευμονική κυκλοφορία μέσω την πνευμονικής βαλβίδας (pulmonic valve) και αφετέρου στη συστηματική κυκλοφορία μέσω της αορτικής βαλβίδας (aortic valve). Τέλος, σε ό,τι αφορά τις κολποκοιλιακές βαλβίδες, η βαλβίδα που βρίσκεται ανάμεσα στον αριστερό κόλπο και την αριστερή κοιλία ονομάζεται μητροειδής ή μητρική και είναι διγλώχινη (mitral valve), ενώ η βαλβίδα που βρίσκεται ανάμεσα στο δεξί κόλπο και τη δεξιά κοιλία ονομάζεται τριγλώχινη (tricuspid valve).[12]

1.2 Το ερεθισματοαγωγό σύστημα της ενήλικης καρδιάς

Το αγωγό σύστημα της καρδιάς είναι ένα υψηλά εξειδικευμένο δίκτυο καρδιομυοκυττάρων που παράγει και μεταδίδει παλμούς σε ολόκληρη την καρδιά με σκοπό να συντονίσει τη συστολή της. Το σύστημα αυτό αποτελείται από τους βηματοδότες της καρδιάς SA και AV και το αγωγό σύστημα της κοιλίας His-Purkinje. Το τελευταίο αποτελείται από τη δεμάτιο του His (bundle of His), τις διακλαδώσεις αυτού και τις νευρικές ίνες Purkinje (Εικόνα 1.3)[13].



Εικόνα 1.3: Το ερεθισματοαγωγό σύστημα της καρδιάς [14].

Ο ενδογενής ρυθμός παραγωγής ερεθισμάτων είναι μεγαλύτερος στο φλεβόκομβο και προοδευτικά ελαττώνεται στους κόλπους, την κολποκοιλιακή σύνδεση και το σύστημα His –

Purkinje. Σε αντίθεση με άλλα καρδιομυοκύτταρα, οι βηματοδότες δεν απαιτούν ένα εξωτερικό ερέθισμα για να ξεκινήσει η δράση τους. Είναι κύτταρα ικανά να ξεκινήσουν από μόνα τους την εκπόλωσή τους με τρόπο ρυθμικό, όταν επιτυγχάνεται το κατώτατο όριο της τάσης. Η μεμβράνη που περιβάλλει τα καρδιακά κύτταρα είναι σχεδόν μονωτική και υποβοηθά μία πιθανή πτώση του δυναμικού ανάμεσα στο εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου. Επίσης διαχωρίζει διαφόρους τύπους ιόντων τα οποία συνήθως έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωτερικά και εσωτερικά του κυττάρου. Στην επιφάνεια της μεμβράνης υπάρχουν κανάλια ιόντων, τα οποία ανοίγουν και επιτρέπουν επιλεκτικά τη διέλευση διαφόρων τύπων ιόντων. Ο ρυθμός με τον οποίο ανοίγουν και κλείνουν τα ιοντικά κανάλια επηρεάζεται από: τη διαφορά δυναμικού στη μεμβράνη, τις ιοντικές συγκεντρώσεις και το pH. Το ποσοστό των ιοντικών πυλών που είναι ανοικτές κάθε χρονική στιγμή καθορίζει το στιγμιαίο ρεύμα που διαπερνά τη μεμβράνη. Αυτό το ρεύμα μαζί με τα ρεύματα που διατρέχουν κατά μήκος το κύτταρο καθώς και τα ρεύματα που εξέρχονται από το κύτταρο καθορίζουν το διαμεμβρανικό δυναμικό. Συνήθως δυναμικό δημιουργείται από το κόμβο SA, που διεγείρει την δεξιά κοιλία και ταξιδεύει μέσα από το δεμάτιο του Bachmann για να διεγείρει και την αριστερή κοιλία. Έπειτα, το νευρικό αυτό ερέθισμα ταξιδεύει μέσα από τα ενδοκομβικά μονοπάτια που συνδέουν τους 2 κόμβους στον κόμβο Aschoff-Tawara (AV). Από εκεί, φτάνει στο δεμάτιο του His και στις διακλαδώσεις της, όπου ίνες εξειδικευμένες στην ταχύτατη μετάδοση ηλεκτρικών ερεθισμάτων μεταδίδουν το σήμα σε καθεμία από τις δύο πλευρές του ενδοκοιλιακού διαφράγματος. Κάθε διακλάδωση του πλέγματος αυτού καταλήγει στην αντίστοιχη κοιλία και οδηγεί στην εκπόλωσή της [15].

Δύο είναι οι κύριες δυνάμεις που κινούν τα ιόντα στις κυτταρικές μεμβράνες. Το χημικό δυναμικό που δημιουργείται από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης ενός ιόντος και το ηλεκτρικό δυναμικό, σύμφωνα με το οποίο ένα ιόν απομακρύνεται από ιόντα/μόρια με παρόμοιο φορτίο. Το διαμεμβρανικό δυναμικό (Transmembrane Potential, TMP) είναι η ηλεκτρική διαφορά δυναμικού που δημιουργείται μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του κυττάρου. Έτσι, όταν δημιουργείται ένα δίκτυο κίνησης ιόντων μέσα στο κύτταρο, το TMP παίρνει θετικό πρόσημο (+ve), ενώ όταν υπάρχει δίκτυο κίνησης ιόντων έξω από το κύτταρο τότε το TMP παίρνει αρνητικό πρόσημο (-ve). Τα κανάλια ιόντων διατηρούν τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων, και κατ' επέκταση τη διαφορά δυναμικού μέσα και έξω από τα καρδιομυοκύτταρα. Η συγχρονισμένη συστολή όλων των καρδιομυοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των βηματοδοτών, οφείλεται στην ηλεκτρική τους σύζευξη μέσω των διακυτταρικών τους ενώσεων [16].

Το ασβέστιο (Ca^{2+}) είναι ο σημαντικότερος διαμεσολαβητής που συνδέει το ηλεκτρικό ερέθισμα με τη συστολή, η συγκέντρωση του οποίου ανακυκλώνεται μέσα και έξω από το κυτταρόπλασμα των μυοκυττάρων ανάλογα με την αλλαγή του δυναμικού. Τα κύρια συστατικά στοιχεία των καρδιομυοκυττάρων είναι η μυοσίνη και η ακτίνη που βρίσκεται ανάμεσα στις ίνες της μυοσίνης. Το ασβέστιο προσδένεται στην τροπονίνη C (troponin C, TnC), παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την τροπονίνη I (troponin I, TnI), και οδηγώντας στην έκθεση του ενεργού σημείου

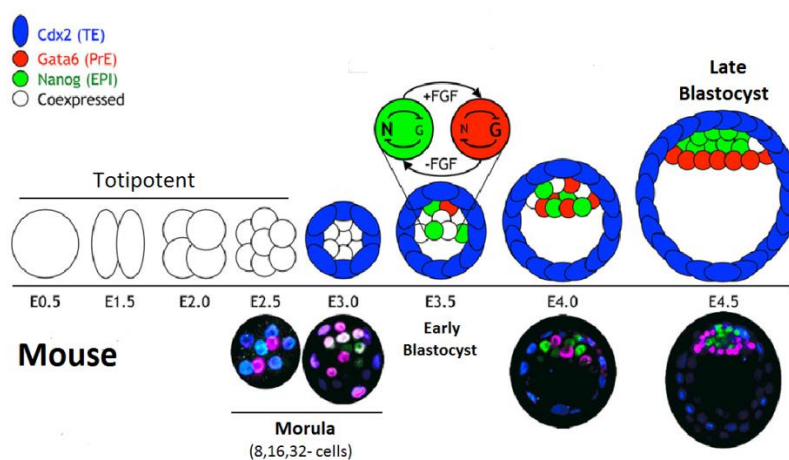
πρόσδεσης μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης. Έτσι, η μυοσίνη αλληλεπιδρά με τις ίνες της ακτίνης κι έρχονται κόντα μέσω μίας ATP-εξαρτώμενης αντίδρασης. Η υδρόλυση του ATP από την ATPase της μυοσίνης που πριν παρεμποδιζόταν από την TnI προκαλεί το σχηματισμό γέφυρας (crossbridge) μεταξύ μυοσίνης και ακτίνης. Η δύναμη της συστολής είναι ανάλογη του αριθμού τέτοιων γεφυρών που θα δημιουργηθούν [16].

1.3 Καρδιογενής εξειδίκευση και διαφοροποίηση

1.3.1 Στάδιο πλειοδύναμων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων

Καθώς η καρδιά είναι το πρώτο όργανο που σχηματίζεται κατά την εμβρυογένεση των θηλαστικών, τα πρώιμα καρδιακά κύτταρα (Cardiac Progenitor Cells, CPCs) εμφανίζονται νωρίς κατά την αναπτυξιακή διαδικασία. Έτσι, όπως υπέδειξαν μελέτες σε πρωτογενείς καλλιέργειες από ιστό εμβρύου ποντικού/όρνιθας και πειράματα χαρτών πεπρωμένου, τα CPCs εντοπίζονται στο πλευρικό οπίσθιο τμήμα της επιβλάστης, πριν τη γαστριδίωση και πριν την ανάπτυξης της αρχικής λωρίδας (Primitive Streak, PS) [17].

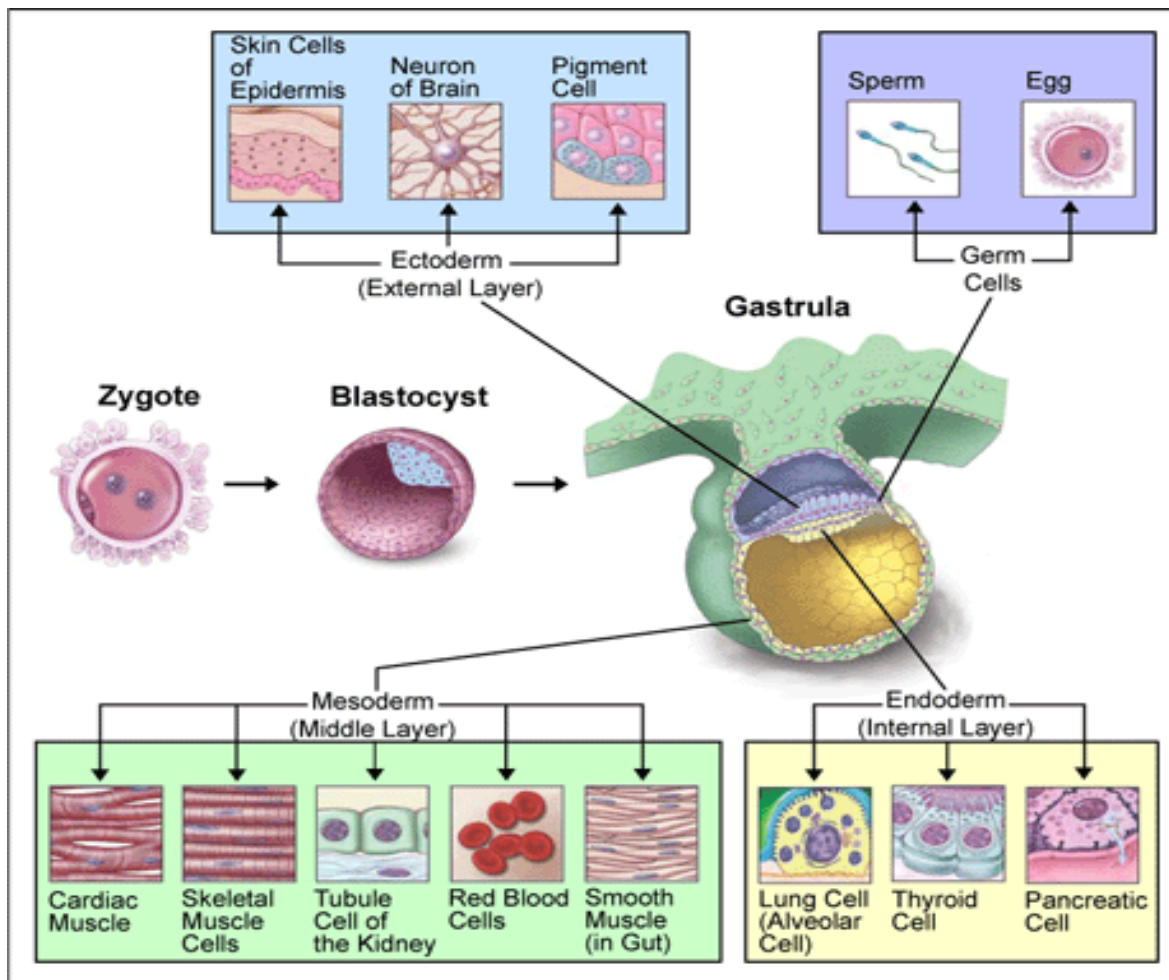
Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκονται, διακρίνονται ως προς την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Μέχρι το στάδιο των 16 κυττάρων (E2.5), στάδιο στο οποίο το έμβρυο ονομάζεται μορίδιο (morula), πριν δηλαδή την ανάπτυξη του τροφοεξωδέρματος (trophoblast), τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα (totipotent) και μπορούν να δώσουν γέννηση σε όλες τις εξωεμβρυϊκές δομές, καθώς και σε όλους τους ιστούς του σώματος, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων της γαμετικής αναπαραγωγικής σειράς. Ως ειδικά γονίδια των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων στο στάδιο των 2 κυττάρων έχουν αναγνωριστεί στο ποντίκι τα εξής: Zscan4, Dux, Eif1a, Zfp352, Tcstv1/3 και Trod1-5 [18].



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση προεμφυτευτικής περιόδου. Το ζυγώτο μετά από 3 κύκλους κυτταρικών διαιρέσεων καταλήγει στο στάδιο των 8 κυττάρων (E2.5), μέχρι το οποίο τα κύτταρα θεωρούνται ολοδύναμα. Η επομένη κυτταρική διαίρεση οδηγεί στην δημιουργία του τροφοεξωδέρματος (μπλε) και της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, τα κύτταρα της οποίας συνεκφράζουν Gata-6 και Nanog. Φτάνοντας στο στάδιο της όψιμης βλαστοκύστης

(E4.5) προκύπτουν δύο διακριτοί πληθυσμοί κυττάρων, ο ένα εκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα Nanog (πράσινο) και θα αποτελέσει την επιβλάστη και ο άλλος τον Gata-6 θα αποτελέσει το πρωτογενές ενδόδερμα. PrE: Primitive Endoderm (Πρωτογενές Ενδόδερμα), EPI: Epiblast (Επιβλάστη), TE: Trophoctoderm (Τροφοεξώδερμα) [19].

Στο στάδιο του μοριδίου, ακολουθεί ο σχηματισμός εσωτερικά μιας κοιλότητας που θα σημάνει το στάδιο της βλαστοκύστης (E3.5). Το συσσωμάτωμα κυττάρων που βρίσκεται στο εσωτερικό του εμβρύου ονομάζεται εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass, ICM) και περιβάλλεται από το τροφοεξώδερμα (trophoectoderm), στιβάδα κυττάρων με επιθηλιακή μορφολογία. Τα βλαστοκύτταρα της ICM είναι πλειοδύναμα, έχουν δηλαδή την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σχεδόν σε όλα τα κύτταρα που προέρχονται από οποιαδήποτε από τις τρεις βλαστικές στιβάδες. Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων (Transcription Factors, TFs) Nanog, Oct3/4 και Sox2 από τα κύτταρα της ICM έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της πλειοδυναμίας και αυτοανανέωσης τους [20-21]. Η περαιτέρω διαφοροποίησή τους σηματοδοτείται από τη σταδιακή μείωση και τελικά την απουσία έκφρασής τους [22]. Από την E3.5 έως την E4.5 τα κύτταρα της ICM και του τροφοεξωδέρματος διαφοροποιούνται σε δύο διακριτούς τύπους. Στην ICM ορισμένα κύτταρα σταματούν να εκφράζουν NANOG, ενώ παράλληλα ξεκινάει η έκφραση των GATA-4 και GATA-6 TFs. Τα συγκεκριμένα κύτταρα ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα και σχηματίζουν στην επιφάνεια του βλαστόκοιλου (blastocoel) μια στιβάδα που ονομάζεται πρωτογενές ενδόδερμα (primitive endoderm) ή υποβλάστη (hypoblast). Η στιβάδα αυτή συμβάλλει στους εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Από τα υπόλοιπα κύτταρα της ICM θα προκύψει η επιβλάστη στο στάδιο του κυλίνδρου, από το οπίσθιο μέρος της οποίας θα προκύψει το μεσόδερμα. Το μεσόδερμα μαζί με το ενδόδερμα και το εξώδερμα αποτελούν τις τρεις βλαστικές στιβάδες που θα δώσουν γέννηση σε όλους τους ιστούς. Από το εξώδερμα θα προκύψουν κυρίως οι νευρικοί και οι εξωτερικοί επιθηλιακοί ιστοί (δέρμα), από το ενδόδερμα θα προκύψουν η τραχεία, οι πνεύμονες, το πάγκρεας, το συκώτι, ο θυροειδής αδένας, και τέλος, από το μεσόδερμα θα προκύψουν οι συνδετικοί ιστοί, ο σπλήνας, η καρδιά, τα οστά, το αίμα, οι σκελετικοί μύες, τα νεφρά και το αναπαραγωγικό σύστημα και των δύο φύλων (Εικόνα 1.4) [2].



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών τύπων που θα προκύψουν από τις τρεις βλαστικές στιβάδες. Κατά την εμβρυογένεση, η ICM θα δώσει γέννηση στις τρεις βλαστικές στιβάδες, στο εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα, από τις οποίες θα προκύψουν όλοι οι κυτταρικοί τύποι που θα δομήσουν όλους τους ιστούς [23].

1.3.2 Καθορισμός καρδιακού μεσοδέματος

Το σπλαχνικό ενδόδερμα και η επιβλάστη, αποτελούν την εξωτερική και εσωτερική στιβάδα της ICM, αντίστοιχα, ακριβώς πριν τη γαστριδίωση. Γαστριδίωση είναι η μορφογενετική διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό των 3 βλαστικών στιβάδων (εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα) και ξεκινάει με την εμφάνιση της PS. Ένα υποσύνολο επιβλαστικών κυττάρων υφίσταται μετάβαση από την επιθηλιακή κατάσταση στην οποία βρίσκεται σε μεσεγγυματική (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) για να μπορέσει να εισέλθει στην αρχική λωρίδα και σχηματίζει μια παροδική εμβρυϊκή δομή που λέγεται μεσενδόδερμα (mesendoderm). Ακολούθως ένα δεύτερο κύμα εισερχόμενων κυττάρων θα δώσει τα εξωεμβρυϊκά και εμβρυϊκά μεσοδερμικά κύτταρα. Είναι κατανοητό λοιπόν ότι το μεσενδόδερμα αποτελεί ένα σταυροδρόμι αποφάσεων σχετικά με τη μοίρα των κυττάρων, και βασικό παράγοντα για τον καθορισμό των καρδιακών κυττάρων [24]. Τέτοιες αποφάσεις είναι στενά συνδεδεμένες με την ισορροπία των

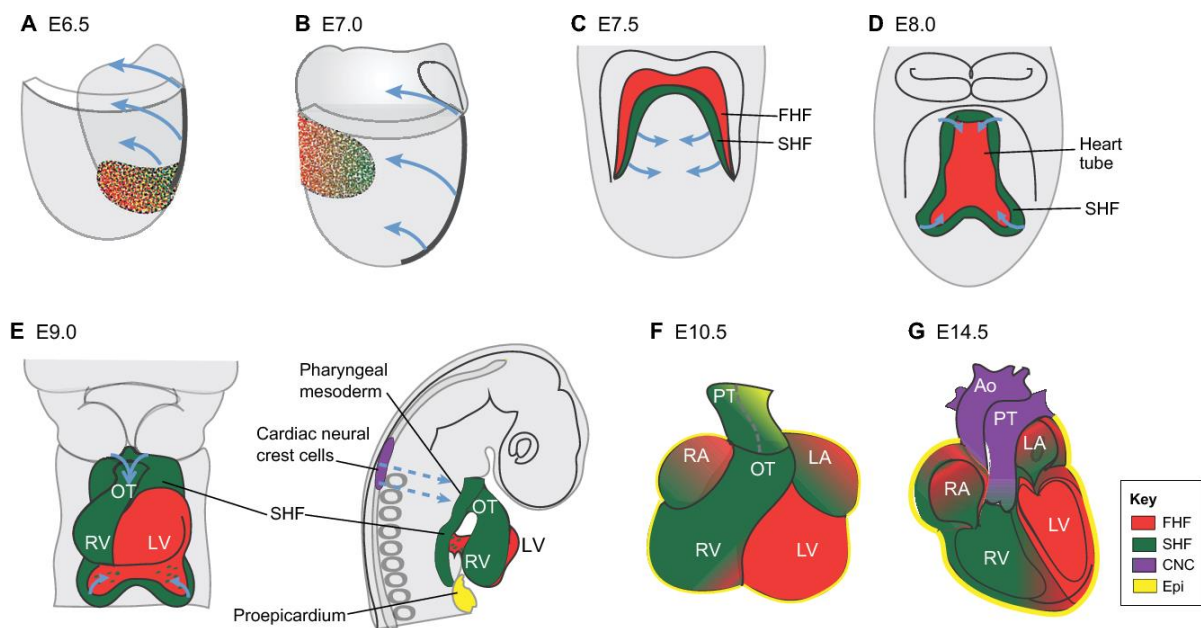
σηματοδοτικών μονοπατιών Nodal/BMP/Smad και Wnt [25]. Η σημασία των εν λόγω μονοπατιών στην ανάπτυξη της καρδιάς θα τεκμηριωθεί αναλυτικότερα και παρακάτω.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA-4, GATA-5 και GATA-6 έχουν σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος. Άλλα σημαντικά σηματοδοτικά μόρια για το σχηματισμό του μεσενδοδέρματος είναι οι πρωτεΐνες Nodal και Activin, μέλη της οικογένειας γονιδίων TGF-beta που συνεργάζονται με το μονοπάτι Wnt/ β -catenin [26]. Το καρδιακό μεσόδερμα επάγεται από σήματα που παράγονται από το παρακείμενο ενδόδερμα. Ένα από τα απαραίτητα στοιχεία του επαγωγικού σήματος προερχόμενο από το ενδόδερμα, είναι οι παράγοντες BMP. Η πρωτεΐνες BMP, έχουν την ιδιότητα να επαναπρογραμματίζουν το μεσενδόδερμα σε περιοχή σχηματισμού της καρδιάς, δηλαδή σε καρδιογενές μεσόδερμα. [27]. Ουσιαστικά, στο στάδιο της PS και του μεσενδοδέρματος, η σημαντική ισορροπία των σηματοδοτικών μονοπατιών Nodal και BMP2, ρυθμίζεται από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης μορφογόνων και άλλων μορίων που ανήκουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -catenin [28].

Σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος, συμπεριλαμβανομένου και του καρδιακού μεσοδέρματος, διαδραματίζει η διαβάθμιση της συγκέντρωσης των Nodal/Smad, όπως έχει αποδειχτεί από πειράματα σε έμβρυα ποντικού [29]. Η διαβάθμιση αυτή ρυθμίζει και την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Oct4 (κωδικοποιείται από το γονίδιο Pou5f1) και Eomes (Eomesodermin) στο έμβρυο, στην επιβλάστη καθώς και στο αναδυόμενο μεσενδόδερμα [30]. Γονίδιο-στόχος για το Oct4 αποτελεί ο μεσενδοδερμικός/ενδοδερμικός δείκτης Sox17, ο οποίος είναι απαραίτητος για την καρδιογένεση [31]. Ο Eomes ενεργοποιεί τον TF Mesp1 (δείκτης διαφοροποίησης του μεσοδέρματος σε καρδιογενή ιστό), και κατ' αυτόν τον τρόπο σταδιακά ενεργοποιείται το γονιδιακό δίκτυο που θα δώσει τελικά γέννηση στο όργανο της καρδιάς. Τέλος, μελέτες στο zebrafish (*Danio rerio*), έχουν αναδείξει το ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού FGF, που ευνοεί την επαγωγή του καρδιογενούς μεσοδέρματος σε βάρος του αιμαγγειοβλαστικού. Όπως αναφέρουν οι Simoes et al. πρόκειται για αμοιβαία ανταγωνιστικές γενεαλογίες. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, το FGF σηματοδοτικό μονοπάτι δρα κατά τη γαστριδίωση προς όφελος της καρδιακής μοίρας, περιορίζοντας τα κύτταρα του εμπρόσθιου αιμαγγειοβλαστώματος σε έμβρυα zebrafish. Επιπλέον, κατέστη φανερό ότι ο καρδιακός ρυθμιστής *nkx2.5*, μπορεί επίσης να περιορίσει τα κύτταρα του αιμαγγειοβλαστώματος, ωστόσο, για την καρδιακή εξειδίκευση είναι απαραίτητο το σηματοδοτικό μονοπάτι Fgf. Επίσης είναι γνωστό ότι για τα πρώιμα κύτταρα τόσο του αιμαγγειοβλαστώματος όσο και της καρδιάς, είναι απαραίτητη η λειτουργία των *gata4*, *gata5* και *gata6*. Τέλος, το Fgf μπορεί να είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του αιμαγγειοβλαστώματος από τα mESCs, έχει όμως και κατασταλτικό ρόλο στην περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών σε ενδοθηλιακά ή κύτταρα του αίματος [32].

1.3.3 Σχηματισμός καρδιακού σωλήνα

Κύτταρα από το καρδιογενές μεσόδερμα διασχίζουν το εμπρόσθιο ένα τρίτο της αρχικής λωρίδας σχηματίζοντας δύο πλευρικές περιοχές (Εικόνα 1.5A-1.5B), οι οποίες στη συνέχεια μετακινούνται προς τα εμπρός δημιουργώντας δύο επιμήκεις λωρίδες εκατέρωθεν του εμβρυϊκού άξονα. Καθώς αναπτύσσεται η κεφαλική πτυχή, το μελλοντικό καρδιακό μεσόδερμα σχηματίζει, γύρω από το εμπρόσθιο κοιλιακό τμήμα της, μια δομή με σχήμα ημισελήνου που ονομάζεται καρδιακή ημισέληνος (cardiac crescent) (Εικόνα 1.5C). Η ημισέληνος αυτή απαρτίζεται από τα πρώιμα καρδιακά κύτταρα του πρωτογενούς (First Heart Field, FHF), καθώς και από αυτά του δευτερογενούς καρδιακού πεδίου (Second Heart Field, SHF). Στο στάδιο αυτό, εκφράζονται γνωστοί μεταγραφικοί παράγοντες που χαρακτηρίζουν πρώιμους εμβρυϊκούς πληθυσμούς της καρδιάς όπως ο *Nkx2.5*, *Gata4-6*, *Mef2c* και ο *Tbx5*. Από το στάδιο αυτό και μετά, χειρισμοί όπως μεταμοσχεύσεις ή αφαιρέσεις τμημάτων προκαλούν ανωμαλίες στο σχηματισμό της καρδιάς, συνεπώς ο καθορισμός λαμβάνει χώρα σε αυτό το στάδιο. Οι δύο πλευρές της καρδιακής ημισελήνου συντηκονται στο μεσοκοιλιακό τμήμα και έτσι τα εμβρυϊκά κύτταρα του πρωτογενούς καρδιακού πεδίου θα σχηματίσουν τον καρδιακό σωλήνα (cardiac tube) (Εικόνα 1.5D) [2]. Από το πρωτογενές καρδιακό πεδίο θα προκύψουν τα πρώτα διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα, που θα συνεισφέρουν σε κύτταρα της αριστερής κοιλίας και σε μέρος των κόλπων [33–35]. Τα κύτταρα του FHF είναι κύτταρα μονοδύναμα (unipotent) και διαφοροποιούνται μόνο σε καρδιομυοκύτταρα [36]. Σε μεταγενέστερο χρονικά στάδιο αλλά σε παράλληλη εξέλιξη, νέα κύτταρα στρατολογούνται στον καρδιακό σωλήνα προερχόμενα από το δευτερογενές καρδιακό πεδίο [1, 37–39]. Το SHF προκύπτει από κύτταρα του υποφαρυγγικού μεσοδέρματος. Η προσθήκη των πρώιμων καρδιακών κυττάρων από το SHF στα δύο άκρα του καρδιακού σωλήνα, του αρτηριακού και του φλεβικού άκρου, όπως επίσης και στο κολπικό διάφραγμα, συνεχίζεται μέχρι την ολοκλήρωση του διαχωρισμού της αορτικής και της πνευμονικής κυκλοφορίας. Έτσι, τα κύτταρα του SHF είναι κύτταρα πολυδύναμα (multipotent) και συνεισφέρουν σημαντικά σε κύτταρα της δεξιάς κοιλίας, της οδού εκροής (Outflow Tract, OFT) και των δύο κόλπων, αφού διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα, σε κύτταρα του ηλεκτρικού συστήματος της καρδιάς, σε λεία μυϊκά κύτταρα και ενδοκαρδιακά/ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι πιθανό ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ FHF και SHF, είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση των κυττάρων του SHF χωρικά και χρονικά [40].



Εικόνα 1.5: Ο σχηματισμός της καρδιάς από τα κύτταρα του FHF και του SHF. (A,B) Κατά τη γαστριδίωση (E6.5-E7.0) τα μεσοδερμικά και ενδοδερμικά κύτταρα καταλαμβάνουν διακριτές περιοχές της εμβρυϊκής δομής. Τα CPCs του FHF (κόκκινο) και του SHF (πράσινο), απομακρύνονται από την PS (μαύρη γραμμή) και μεταναστεύουν πλευρικά. (C) Στάδιο σχηματισμού της καρδιακής ημισελήνου (E7.5), (D) Σχηματισμός του καρδιακού σωλήνα (E8.0), τα κύτταρα του FHF σχηματίζουν τον καρδιακό σωλήνα, ενώ τα κύτταρα του SHF τοποθετούνται στους πόλους. (E) Η καρδιά την ημέρα E9.0 έχει σχηματίσει τη δομή της αγκύλης (looping). (F,G) Η τετράχωρη καρδιά τις ημέρες E10.5 και E14.5. Με τα διαφορετικά χρώματα διακρίνονται οι δομές που προέκυψαν από το FHF, το SHF, τα καρδιακά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (Cardiac Neural Crest Cells, CNCCs) και το επικάρδιο (Epi). Τα βέλη υποδεικνύουν τις ανακατατάξεις των κυττάρων του FHF και του SHF, ενώ τα διακοπτόμενα βέλη υποδεικνύουν τη μετακίνηση των CNCCs. Ao:aorta, RA:right atrium, RV: right ventricle, LA:left atrium, LV: left ventricle, OT:outflow tract, PT: pulmonary trunk [41].

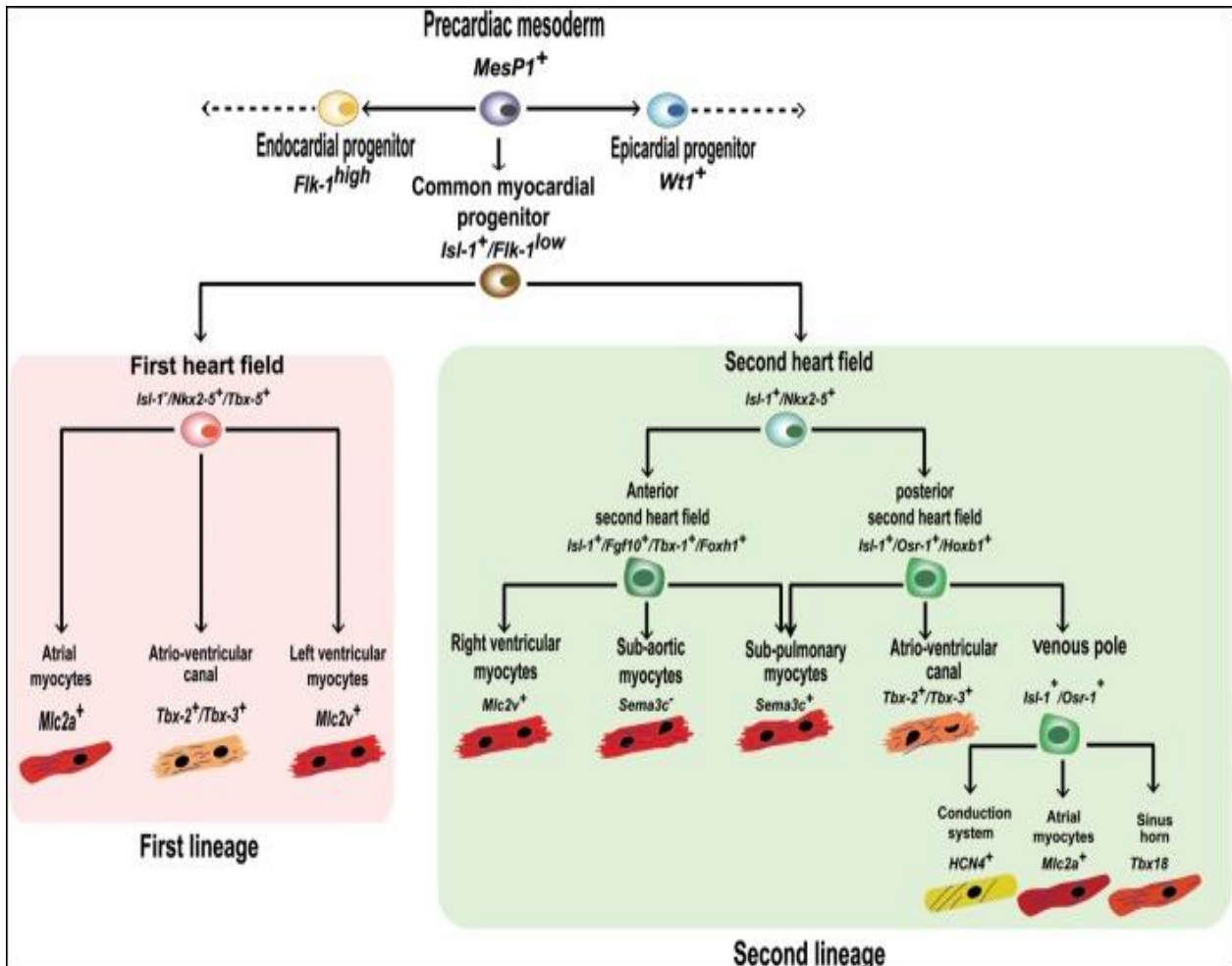
Στα μορφογενετικά γεγονότα που ακολουθούν τη δημιουργία του καρδιακού σωλήνα, συμπεριλαμβάνονται η δημιουργία της καρδιακής αγκύλης (looping) (Εικόνα 1.5E), η επέκταση των κολπικών και κοιλιακών θαλάμων, καθώς και η δημιουργία διαφραγμάτων για το διαχωρισμό κοιλιών, κόλπων και της οδού εκροής (Εικόνα 1.5F) [1].

Παρότι το μεγαλύτερο μέρος της καρδιάς προκύπτει από το εμπρόσθιο μεσόδερμα, σημαντική συμβολή έχουν και τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (neural crest). Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό του διαφράγματος της οδού εκροής, το οποίο διαχωρίζει την πνευμονική κυκλοφορία από την αορτική (Εικόνα 1.5G). Τα αμφίβια, τα πτηνά και τα θηλαστικά έχουν χωριστά συστήματα πνευμονικής και αορτικής κυκλοφορίας [2].

1.4 Εμβρυϊκά πρόδρομα καρδιακά κύτταρα (embryonic cardiac progenitors)

Η καρδιά των σπονδυλωτών δημιουργεί μία τρισδιάστατη δομή από τα πρώτα κίολας εμβρυϊκά στάδια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η οποία αποτελείται από διάφορους κυτταρικούς τύπους: τα καρδιομυοκύτταρα, τα αγωγά κύτταρα (CCs), τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (vSMCs), τα ενδοθηλιακά κύτταρα, και τους καρδιακούς ινοβλάστες. Η μορφογενετική διαδικασία της ανάπτυξης της καρδιάς στα θηλαστικά είναι μια περίπλοκη διαδικασία που

ρυθμίζεται χωροχρονικά από διάφορους τύπους πρόδρομων καρδιακών κυττάρων, καθώς και από διάφορους παρακρινικούς μεσολαβητές, οι οποίοι συναντώνται ήδη από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια [42]. Στην εικόνα 1.6 αναπαριστώνται συνοπτικά οι γενεαλογίες των CPCs του FHF και του SHF.



Εικόνα 1.6: Η Γενεαλογία των εμβρυϊκών καρδιακών κυττάρων του FHF και του SHF. [43]

Ο μεταγραφικός παράγοντας Brachyury (Bry), είναι ιδρυτικό μέλος της οικογένειας γονιδίων T-box (T). Όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής φέρουν το συντηρημένο πλαίσιο T (T-box), αμινοξική ακολουθία περίπου 200 αμινοξικών καταλοίπων μέσω της οποίας γίνεται η πρόσδεση στο DNA [44]. Μελέτες έχουν δείξει ότι είναι ο κύριος παράγοντας που ρυθμίζει τον καθορισμό των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού (mouse Embryonic Stem Cells, mESCs) σε κύτταρα μεσοδερμικής σειράς και συμβάλλει με αυτό τον τρόπο στο σχηματισμό του μεσοδέρματος στο στάδιο της γαστριδίωσης [45]. Έτσι, ο μεταγραφικός παράγοντας Brachyury είναι αυτός που χαρακτηρίζει τα πρόδρομα μεσοδερμικά κύτταρα. Τα Bry⁺ κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα που εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Islet-1 (Isl1⁺) και σε κύτταρα που εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Tbx5. Ακόμα, έχει αποδειχτεί ότι τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται in vitro στους βασικούς καρδιακούς κυτταρικούς τύπους (CMs, vSMCs, ECs) [46].

Ο μεταγραφικός παράγοντας Eomes (Eomesoermin) είναι ένα ακόμα μέλος της οικογένειας T-box, σημαντικός για τη διαφοροποίηση του μεσοδέρματος και το σχηματισμό της αρχικής λωρίδας(PS) [47]. Ο Eomes επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Mesp1* (mesodermal posterior 1), ο οποίος βρίσκεται στην κορυφή της ιεραρχίας του γονιδιακού δικτύου που αφορά τον καθορισμό της γονιδιακής μοίρας των κυττάρων του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς εκφράζεται στα πρώιμα καρδιακά κύτταρα στο στάδιο της αρχικής λωρίδας τις εμβρυϊκές μέρες E6.25-E7.25 στο ποντίκι. Οι Saga et al. έδειξαν ότι ο TF *Mesp1* θα εκφραστεί σε όλα τα Brg^+ κύτταρα [48]. Ο *Mesp1* έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός ρυθμιστής της εξειδίκευσης του μεσοδέρματος σε καρδιακό μεσόδερμα καθώς και της μετανάστευσης των πρόδρομων καρδιακών κυττάρων για το σχηματισμό της πρώιμης καρδιάς. Ακολουθώντας, τα κύτταρα $Mesp1^+$ διαφοροποιούνται περαιτέρω σε πρόδρομα καρδιακά κύτταρα (Cardiac Progenitor Cells, CPCs). Τα CPCs εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα *Nkx2-5* (NK2 homeobox 5) την εμβρυϊκή μέρα E7.5 στο ποντίκι [49]. Επιπλέον, ένα μέρος των CPCs εκφράζει τον TF *Tbx5* στο στάδιο της PS και θα αποτελέσει το FHF, ενώ ένα άλλο μέρος θα εκφράσει τον TF *Isl1* και θα αποτελέσει μέρος του SHF. Ωστόσο, στο στάδιο σχηματισμού του καρδιακού σωλήνα (E7.5-E8.0), υπάρχει πολύ μικρή αλληλεπικάλυψη της έκφρασης των δύο αυτών γονιδίων [34]. Τα κύτταρα $Isl1^+$ μεταναστεύουν από το φαρυγγικό μεσόδερμα στο οπίσθιο μέρος του καρδιακού σωλήνα, όπου λαμβάνουν χώρα η επέκταση της καρδιάς και η δημιουργία της αγκύλης [50]. Τέλος, μέρος των CPCs μπορεί να εκφράζουν $Mef2c^+$ (myocyte enhancer factor 2C) ή $HCN4^+$ (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4), ενώ άλλοι γνωστοί μοριακοί δείκτες των CPCs είναι οι *Smarcd3* και *Gata4* [51]. Η πρωτεΐνη *HCN4* βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων, η έκφραση της ξεκινάει την εμβρυϊκή ημέρα E6.75 και παροδικά στα πρώιμα στάδια της καρδιογένεσης υπάρχει αλληλοεπικάλυψη της έκφρασής της με την έκφραση του *Tbx5* (E7.5) [34].

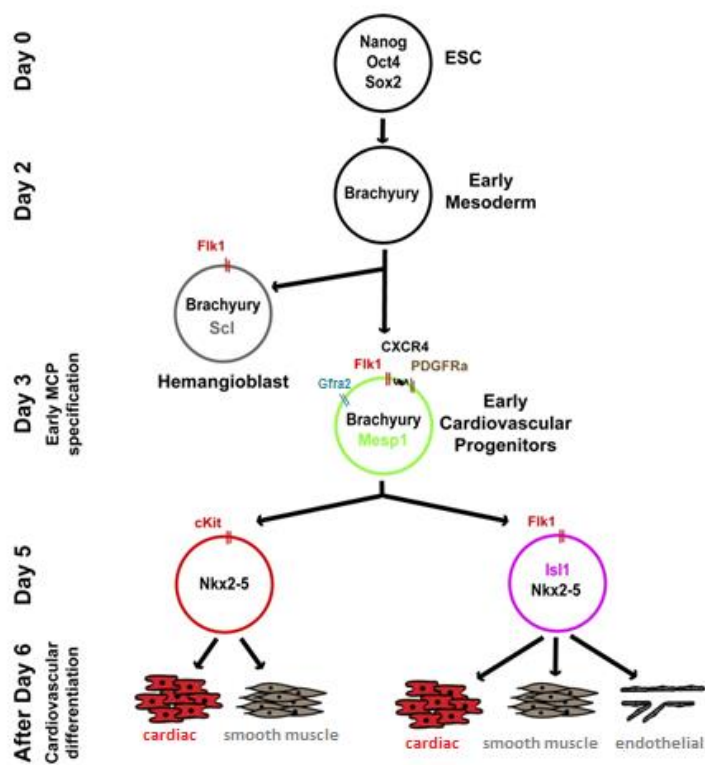
Η έκφραση του *Tbx5*, όπως έχει αποδειχτεί, ξεκινάει επίσης από το στάδιο της αρχικής λωρίδας και τα κύτταρα $Tbx5^+$ μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω μόνο σε καρδιομυοκύτταρα (unipotent) [36]. Αρχικά, η εμφάνιση του FHF γίνεται με τα $Tbx5^{low+}$ κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε $Nkx2.5^+/Tbx5^+$, ενώ είναι πιθανό και ένα μέρος των κυττάρων $Nkx2.5^{low+}$ να μετατρέπεται στο στάδιο της όψιμης λωρίδας E7.0 (Early Allantoic Bud, EB) σε $Nkx2.5^+/Tbx5^+$ κύτταρα [36]. Έπειτα από μεταγραφική ανάλυση, οι Zhang et al. αναγνώρισαν την πρωτεΐνη επιφάνειας CORIN ως δείκτη για την απομόνωση του διπλά θετικού πληθυσμού $Nkx2.5^+/Tbx5^+$. Επιπλέον, έπειτα από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, η ίδια ερευνητική ομάδα κατέληξε στο ότι ο διπλά θετικός υποπληθυσμός $Nkx2.5^+/Tbx5^+$ έχει χαρακτηριστικά όμοια με το FHF και διαφοροποιείται κυρίως σε καρδιομυοκύτταρα, ενώ ο $Nkx2.5^-/Tbx5^+$ υποπληθυσμός παρουσίασε χαρακτηριστικά γενεαλογίας επικαρδίου. Επιπλέον, ο υποπληθυσμός $Nkx2.5^+/Tbx5^-$ φάνηκε να έχει χαρακτηριστικά όμοια με το SHF, και τέλος, ο διπλά αρνητικός πληθυσμός $Nkx2.5^-/Tbx5^-$ εμφάνισε ιδιότητες ενδοθηλιακών κυττάρων [52]. Ο μεταγραφικός παράγοντας *Tbx5*, καθώς και οι *Gata4* και *Nkx2.5*, ρυθμίζουν διάφορα στάδια της

καρδιακής ανάπτυξης, και διάφορα knock-out μοντέλα για τα εν λόγω γονίδια έχουν εμφανίσει σοβαρές καρδιακές δυσλειτουργίες [53]. Επιπλέον, οι Tbx5 και Gata-4, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την υπομονάδα του συμπλόκου BAF, Baf60c, που συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, συμβάλλουν στον επαναπρογραμματισμό του μη καρδιακού μεσοδέρματος σε ιστό της καρδιάς [54].

Ένας άλλος πρώιμος καρδιακός πληθυσμός στον άνθρωπο χαρακτηρίζεται από την έκφραση του SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1), που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων, ενώ ο συγκεκριμένος κυτταρικός δείκτης ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο έκφρασης στο ποντίκι. Τα κύτταρα SSEA-1⁺ εκφράζουν γονίδια τόσο του FHF όσο και του SHF και διαφοροποιούνται σε CMs, καθώς και σε vSMCs και ECs [55]. Ομοίως με το SSEA-1, ο υποδοχέας του αυξητικού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 VEGFR-2, Flk-1, γνωστός και ως KDR (kinase insert domain protein receptor), καθώς και ο υποδοχέας του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα α, PDGFR-α, είναι επίσης από τους πιο γνωστούς κυτταρικούς δείκτες επιφάνειας, στο ποντίκι και στον άνθρωπο. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα Flk-1 (KDR)⁺ και τα PDGFRα⁺ κύτταρα διαφοροποιούνται σε CMs, SMCs και ECs τόσο in vitro όσο και in vivo. Επιπλέον, είναι πιθανό να υπάρχει στην επιβλάστη κάποιο προγονικό κύτταρο, ικανό να δώσει γέννηση σε δύο πληθυσμούς (bipotent), ένα Flk1⁺/Brachury⁺ και έναν Flk1⁻/Brachury⁺ κυτταρικό πληθυσμό, υπό τη δράση του BMP4 που εκκρίνεται από το εξωεμβρυϊκό εξώδερμα (Extraembryonic ectoderm, ExE) και του BMP2 στο σπλαχνικό ενδόδερμα (Visceral endoderm, VE), αντίστοιχα, όπως υποστηρίζουν οι Van Vliet et al. [43]. In vitro πειράματα σε ESCs, έδειξαν ότι ο flk1⁺ πληθυσμός οδήγησε σε συστελλόμενα καρδιομυοκύτταρα, σε αντίθεση με τον flk1⁻ πληθυσμό από τον οποίο αναπτύχθηκαν ελάχιστα καρδιομυοκύτταρα. Επιπλέον, οι Kattman et al. υποστήριξαν μέσω των πειραμάτων τους ότι τα καρδιομυοκύτταρα προκύπτουν in vitro από το flk1⁺ πληθυσμό, ο οποίος εμφανίζεται αργότερα κατά την ανάπτυξη και είναι διακριτός από τον πιο πρώιμο flk1⁺ πληθυσμό που έχει αιμαγγειοβλαστικό δυναμικό και διαθέτει μικρό δυναμικό διαφοροποίησης προς καρδιακά κύτταρα [46].

Οι μεταγραφικοί παράγοντες PDGFRα και Flk1 εκφράζονται in vivo στην καρδιακή ημισέληνο, και έτσι οι συγκεκριμένοι δείκτες επιφάνειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση των πρώιμων πολυδύναμων καρδιαγγειακών κυττάρων (Multipotent Cardiovascular Progenitors, MCPs) [56-57]. Η ερευνητική ομάδα Ishida et al. έδειξε ότι ο υποδοχέας Gfra2 (Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor Family Receptor Alpha 2) είναι ενδεικτικός ενός συγκεκριμένου πρώιμου πληθυσμού που συμβάλλει στη συστολή της καρδιάς [58]. Πιο συγκεκριμένα, ο Gfra2 συναντάται σε κύτταρα του FHF και του SHF, στο ποντίκι και στον άνθρωπο. Όταν τα CPCs αρχίζουν να διαφοροποιούνται προς CMs, η έκφραση του KDR χάνεται, και έτσι ο διπλά θετικός πληθυσμός GFRA2⁺/KDR^{neg}/PDGFRA⁺ είναι πλέον αντιπροσωπευτικός των πρώιμων καρδιομυοκυττάρων (Cardiomyocyte Precursor, CPs), ενός πληθυσμού μεταγενέστερου των CPCs. Η έκφραση της πρωτεΐνης GFRA2 μειώνεται σημαντικά όταν τα CPs

διαφοροποιούνται πλήρως σε CMs [58]. Επιπλέον, οι Bondue et al. μετά από τη διαφοροποίηση ESCs με DMEM 15% FBS, απομόνωσαν τον Mesp1-GFP πληθυσμό που προέκυψε κατά την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης (D3), και έπειτα από μεταγραφική ανάλυση βρήκαν ότι ο πληθυσμός αυτό είναι ένας σχετικά ομογενής πληθυσμός που παρουσιάζει υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών επιφάνειας Cxcr4, Pdgfra και Flk1, καθώς και της πρωτεΐνης Gfra2 (Εικόνα 1.7). Επιπλέον, η υπερέκφραση του Mesp1 στον ίδιο πληθυσμό (D3), οδήγησε σε υψηλότερη έκφραση των pdgfra και gfra2 [59].



Εικόνα 1.7: Διαφοροποίηση των ESCs προς κύτταρα καρδιαγγειακής σειράς. Ο Mesp1-GFP πληθυσμός που προκύπτει από τον Brachyury⁺, εκφράζει του υποδοχείς Cxcr4, Flk1, Gfra2 και Pdgfr, και τα Mesp1⁺ κύτταρα διαφοροποιούνται τελικά σε CMs, ECs και SMCs [59].

Η πρώιμη δομή του επικαρδίου (proepicardial organ, PEO) είναι μια παροδική δομή που προκύπτει από το μεσόδερμα, και από την οποία τελικά σχηματίζεται το επικάρδιο [60]. Πειράματα σήμανσης που έγιναν σε έμβρυα ποντικού υποδεικνύουν ότι στο σχηματισμό του PEO συμμετέχουν κύτταρα Nkx2.5⁺ ή/και Isl1⁺ πρόδρομα κύτταρα, ωστόσο, ο TF Nkx2.5 και όχι ο Isl1 είναι λειτουργικά απαραίτητος για την ανάπτυξη του PEO [61]. Η προαναφερθείσα δομή αποτελείται από δύο υποπληθυσμούς, καθένας από τους οποίους είναι θετικός για έναν από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες, Wilms tumor-1 (Wt1) και T-box18 (Tbx18). Οι πληθυσμοί αυτοί συνεισφέρουν κυρίως σε πληθυσμούς λείων μυϊκών κυττάρων και καρδιακών ινοβλαστών, ή διαφοροποιούνται περαιτέρω σε κύτταρα Semad3d⁺ (semaphoring 3D) και Scx⁺ (scleraxis), τα οποία συνεισφέρουν στον πληθυσμό των ενδοθηλιακών κυττάρων [6, 62]. Αφού, ολοκληρωθεί η μετανάστευση των κυττάρων του PEO, τα οποία πρόκειται να καλύψουν ολόκληρη την επιφάνεια

της καρδιάς και να σχηματίσουν το επικάρδιο, έπεται ο σχηματισμός ενός μεσεγχυματικού πληθυσμού κάτω από τη στιβάδα του επικαρδίου, ο οποίος προκύπτει από το μετασχηματισμό των επικαρδιακών κυττάρων που καλύπτουν την κολποκοιλιακή αύλακα από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά [63]. Επιπλέον, τα $Wt1^+$ κύτταρα μπορούν και διαφοροποιούνται επίσης, σε ενδοθηλιακά κύτταρα του κοιλιακού μυοκαρδίου στην αναπτυσσόμενη καρδιά του ποντικού και του ανθρώπου [64]. Σήμερα, είναι υπό συζήτηση το αν αυτά τα κύτταρα ($Wt1^+$) δύνανται να δώσουν καρδιομυοκύτταρα [61-62].

Ενώ η πλειοψηφία των κυττάρων της καρδιάς απαρτίζεται από κύτταρα που προέρχονται κυρίως από πρόδρομα κύτταρα του FHF και του SHF, κάποια μέρη της καρδιάς έχουν προκύψει από κύτταρα που έχουν προέλθει από καρδιακά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (Cardiac Neural Crest Cells, CNCCs). Τα CNCCs προέρχονται από το οπίσθιο μέρος του νευρικού σωλήνα με έκφραση των γονιδίων $Wt1$, $Pax3$ και $Sox10$, τα οποία μεταναστεύουν στον αρτηριακό πόλο του καρδιακού σωλήνα την ημέρα E9.5 στο ποντίκι [65]. Τα CNCCs διαφοροποιούνται σε SMCs και συμμετέχουν στο σχηματισμό των καρδιακών βαλβίδων, του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος, στη διάταξη της οδού εκροής και στην ανάπτυξη των διαφραγμάτων [65-66].

1.5 Ανακάλυψη νέων δεικτών για την απομόνωση των CPCs

Η χρήση τεχνικών υψηλής απόδοσης και ανάλυσης, όπως είναι η τεχνική «αλληλούχισης RNA μεμονωμένου κυττάρου» (single-cell RNA-seq), έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα χαρτογράφησης των αναπτυξιακών διαδικασιών, μία εκ των οποίων είναι η ανάπτυξη της ανθρώπινης καρδιάς. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας χαρτογράφησης της καρδιογένεσης, ανακαλύφθηκαν νέοι εμβρυϊκοί καρδιακοί πληθυσμοί οι οποίοι ενδεχομένως να μπορούν να συμβάλλουν στην αναγέννηση της καρδιάς [67].

Ένας τέτοιος πληθυσμός επισημάνθηκε από τους Lee et al., ο οποίος φέρει στην επιφάνειά του την πρωτεΐνη επιφάνειας $Lphn2$ (G protein-coupled cell surface receptor latrophilin-2). Η αφαίρεση του εν λόγω γονιδίου σε σειρά mESCs οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης γονιδίων $Gata4$, $Nkx2-5$, $Tbx5$ και $Isl1$ [68].

Πρόσφατα, μία άλλη ερευνητική ομάδα περιέγραψε έναν ακόμα πρώιμο πληθυσμό της καρδιάς, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την έκφραση του διαμεμβρανικού υποδοχέα LGR5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5). Ο υποδοχέας αυτός φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, καθώς η αποσιώπηση του γονιδίου LGR5 οδήγησε στη μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι αυτό. Επιπλέον, διαγραφή του ίδιου γονιδίου σε ανθρώπινα ESCs με την τεχνολογία CRISPR-Cas9, είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη διαφοροποίηση τους προς καρδιομυοκύτταρα μέσω μείωσης του ενδιάμεσου πληθυσμού $ISL1^+ TNNT2^+$. In vivo, τα κύτταρα $LGR5^+$ εντοπίζονται στην περιοχή της οδού εκροής, κατά την 4^η-5^η εβδομάδα κύησης και φαίνεται ότι τα κύτταρα αυτά συναντώνται μόνο στον άνθρωπο [69].

Ένας ακόμα ενδιαφέρον μεταγραφικός παράγοντας είναι ο δακτύλιος ψευδαργύρου Sall1 (Spalt-like gene 1), που συναντάται στα πρώιμα αδιαφοροποίητα καρδιακά κύτταρα και των δύο καρδιακών πεδίων, FHF και SHF. Ο πρώιμος αυτός πληθυσμός συνεισφέρει σε κύτταρα και στις δύο κοιλίες, στο ποντίκι [70].

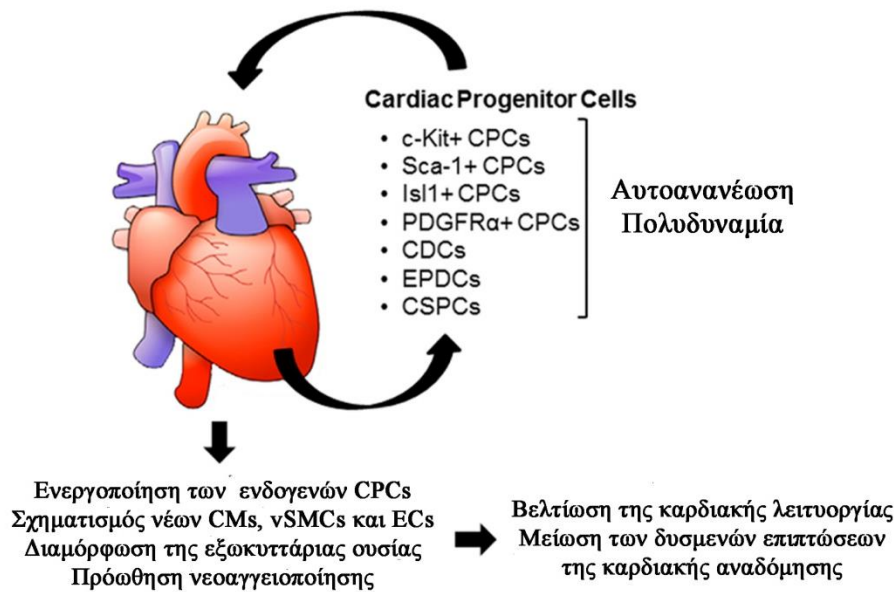
Τέλος, άλλοι πρώιμοι πληθυσμοί που έχουν ταυτοποιηθεί πρόσφατα ως καρδιακοί είναι οι $Hoxx^+$ και $Foxa2^+$. Η έκφραση του $Hoxx$ (homeodomain-only protein homeobox) ξεκινάει αμέσως μετά την ανάδυση των δύο καρδιακών πεδίων, και συγκεκριμένα μετά την εμφάνιση του πληθυσμού $Nkx2-5^+$. Τα κύτταρα $Hoxx^+$ δίνουν γέννηση μόνο σε καρδιομυοκύτταρα, τα οποία κατανέμονται σε όλους τους θαλάμους της καρδιάς, και είναι πληθυσμός αναγκαίος για την ανάπτυξη της καρδιάς στο ποντίκι [71]. Η πρωτεΐνη $Hoxx$ προωθεί τη μυογένεση μέσω της καταστολής του μονοπατιού Wnt . Από την άλλη, η πρωτεΐνη $Foxa2$ (forkhead box protein A2), σε αντίθεση με την $Hoxx$, δίνει γέννηση σε καρδιομυοκύτταρα μόνο των κοιλιών. Οι Bardot et al. έδειξαν ότι ο πρώιμος καρδιακός πληθυσμός $KDR^+/PDGFR\alpha^+$ εκφράζει ταυτόχρονα και την πρωτεΐνη $Foxa2$. Η έκφραση της $Foxa2$ εντοπίζεται κυρίως στα καρδιομυοκύτταρα της κοιλίας, με την ίδια αναλογία σε αριστερή και δεξιά κοιλία [72].

1.6 Τα CPCs στην ενήλικη καρδιά

Τα κύτταρα που αποτελούν την καρδιά των θηλαστικών είναι κύτταρα μετα-μιτωτικά, κύτταρα δηλαδή που έχουν χάσει την ικανότητά του να διαιρούνται και να αυτοανανεώνονται. Ωστόσο, συνεχώς νέες μελέτες υποδεικνύουν ότι πρώιμοι ενδογενείς πληθυσμοί της καρδιάς μπορούν και διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής [73]. Μάλιστα, έχει δειχτεί ότι 0.5-1% των καρδιομυοκυττάρων ανανεώνεται ετησίως, με αποτέλεσμα, κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου να ανανεώνεται το 40% των καρδιομυοκυττάρων της καρδιάς. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι αυτή η ανανέωση εξαρτάται από την ηλικία, αφού το ποσοστό της ετήσιας ανανέωσης των CM ανέρχεται στο 1% σε ηλικία 25 ετών, αλλά μόλις στο 0.45 % σε ηλικία 75 ετών [74]. Από την άλλη, τα ECs και τα μεσεγχυματικά κύτταρα της καρδιάς, ανανεώνονται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου [75].

Στο παρελθόν, πειράματα χαρτών γενεαλογίας, έδειξαν ότι τα CPCs συνεισφέρουν στην ανανέωση των CM της ενήλικης καρδιάς που χάνονται μετά από έναν τραυματισμό. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι ενώ, λοιπόν, υπό κανονικές συνθήκες τα CPCs θεωρούνται κύτταρα αδρανή (quiescent) και δε συνεισφέρουν σημαντικά στην ανανέωση των CM, μετά από έναν τραυματισμό, τα CPCs ενεργοποιούνται ως απόκριση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυοκύτταρα και σε αγγειακά κύτταρα (Εικόνα 1.8). Σε αντίθεση με άλλους κυτταρικούς τύπους των ενήλικων ιστών για τους οποίους κυτταρικοί δείκτες έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί εκτενώς, όπως είναι τα κύτταρα του μυελού των οστών (Bone Marrow Cells, BMCs), μέχρι στιγμής, τα CPCs της ενήλικης καρδιάς χαρακτηρίζονται από μια πληθώρα δεικτών, των οποίων η έκφραση εμφανίζει αλληλοεπικάλυψη, ενώ η ύπαρξή τους στην ενήλικη

καρδιά είναι ακόμα αμφιλεγόμενη [76]. Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά οι κύριοι πληθυσμοί που έχουν προταθεί κατά καιρούς ως CPC πληθυσμοί της ενήλικης καρδιάς που θα μπορούσαν ενδεχομένως να συμβάλλουν στην αναγέννησή της.



Εικόνα 1.8: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των CPCs στην ενήλικη καρδιά μετά από μεταμόσχευση [77].

Τα c-kit⁺ κύτταρα ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 2003, λόγω της έκφρασης του υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης και η χρήση τους οδήγησε στη βελτίωση της αναδόμησης και της δυσλειτουργίας της αριστερή κοιλίας σε προ-κλινικά μοντέλα και ανοίγοντας έτσι το δρόμο για την έγχυση των καρδιακών βλαστικών κυττάρων σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιομυοπάθεια (SCIPIO). Κατά την κλινική δοκιμή SCIPIO, τα c-kit⁺ κύτταρα απομονώθηκαν από την απόφυση του δεξιού κόλπου ασθενών που υποβλήθηκαν σε εγχείριση ανοιχτής καρδιάς. Τα κύτταρα που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκαν in vitro, και στη συνέχεια έγινε έγχυσή τους στον ασθενή-δότη από τον οποίο απομονώθηκαν μέσω της στεφανιαίας αρτηρίας. Παρόλο που τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά και τα c-kit⁺ κύτταρα βελτίωσαν την καρδιακή λειτουργία των ασθενών με ισχαιμική καρδιοπάθεια [78], αμφισβητήθηκαν από τους εκδότες του επιστημονικού περιοδικού «Lancet» (The Lancet Editors, 2014). Στην πορεία, αποδείχτηκε ότι τα c-kit⁺ CPCs δεν συνεισφέρουν σημαντικά σε νέα καρδιομυοκύτταρα, αλλά αντιθέτως σε ενδοθηλιακά κύτταρα στην αναπτυσσόμενη και ενήλικη καρδιά, μετά από τραυματισμό ή και χωρίς τραυματισμό [79]. Έτσι, οι ευεργετικές ιδιότητες του πληθυσμού c-kit⁺ είναι πιθανό να οφείλονται σε παρακρινικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα αυτά, παρά στο γεγονός ότι συνδράμουν στη δημιουργία νέου καρδιακού μυός [80].

Πέρα από τον κυτταρικό πληθυσμό c-kit⁺, υπάρχουν και άλλοι τέτοιοι πληθυσμοί που κατά καιρούς απασχόλησαν την επιστημονική κοινότητα ως εν δυνάμει CPC πληθυσμοί ικανοί να διαφοροποιούνται σε CMs. Πέρα από τη συμβολή τους στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της καρδιάς, έχει αναφερθεί ότι τα αδιαφοροποίητα Isl1⁺ κύτταρα υπάρχουν σε χαμηλό ποσοστό και

στην ενήλικη καρδιά των θηλαστικών, και βρίσκονται κυρίως στους κόλπους. Ωστόσο, ο ρόλος τους στην αναγέννηση της καρδιάς αμφισβητείται λόγω του ότι τα κύτταρα αυτά σταματούν να πολλαπλασιάζονται μετά τη γέννηση, ακόμα και όταν τα καρδιομυοκύτταρα διαιρούνται ακόμα [81]. Μία ακόμα, πρόσφατη έρευνα αναφέρει ότι κύτταρα Flk-1 (KDR)⁺ που βρίσκονται στο λιπώδη ιστό του περικαρδίου σε ενήλικη καρδιά αρουραίων, μπορούν και διαφοροποιούνται *in vitro* σε κύτταρα μυϊκής και αγγειακής σειράς. Η μεταμόσχευση αυτών των κυττάρων σε καρδιά αρουραίων μετά από τραυματισμό, οδηγεί στην ανασύσταση της και στο σχηματισμό νέων καρδιομυοκυττάρων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται ωστόσο, σε παρακρινικά φαινόμενα παρά στην απευθείας συνεισφορά των ενεμένων κυττάρων σε CMs [82]. Επιστημονικό ενδιαφέρον για τις καρδιομυογενικές του ιδιότητες συγκέντρωσε και ο πληθυσμός *sca-1*⁺, που όμως όπως αποδείχτηκε τελικά η συνεισφορά του στην καρδιά ποντικού αφορά τα ενδοθηλιακά κύτταρα και όχι τα CMs [83].

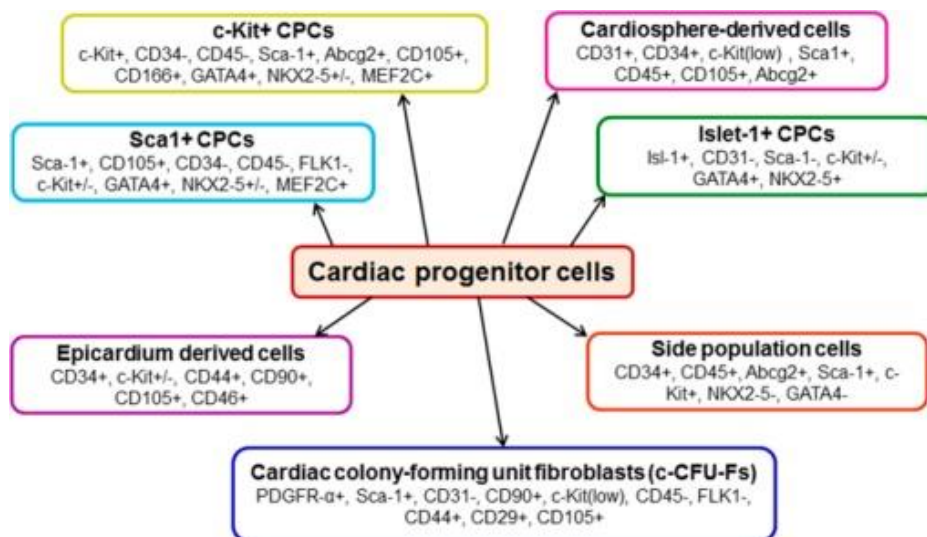
Το 2002 ταυτοποιήθηκαν στην καρδιά βλαστικά κύτταρα, υποδεικνύοντας για πρώτη φορά την ύπαρξη πρώιμων καρδιακών πληθυσμών στην ενήλικη καρδιά [84]. Τα κύτταρα αυτά ονομάστηκαν cSPCs (cardiac Side Population Cells). Στην ενήλικη καρδιά του ποντικού τα cSPCs αποτελούν το 0.8-2% των μη καρδιομυοκυττάρων, ποσοστό που ποικίλει ανάλογα με την ηλικία. Ο πληθυσμός αυτών των κυττάρων χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δύο πρωτεϊνών της υπεροικογένειας πρωτεϊνών ABC : την P-γλυκοπρωτεΐνη και την *Abcg2* (ABC sub-family G member 2). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα cSPCs είναι πληθυσμός διακριτός από τα *c-kit*⁺ κύτταρα, αφού δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη *c-kit* και εμφανίζουν διαφορετικό μεταγραφικό προφίλ. Τέλος, έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται στους 4 βασικούς τύπους της καρδιάς: CMs, ECs, SMCs και σε ινοβλάστες [85].

Στον άνθρωπο τα PDGFRa⁺ κύτταρα εντοπίζονται πέρα από την εμβρυϊκή καρδιά, και στο επικάρδιο, το μυοκάρδιο και το ενδοκάρδιο της ενήλικης καρδιάς, καθώς και μεταξύ των vSMCs της στεφανιαίας αρτηρίας, και φαίνεται να συμβάλλουν στη διατήρηση των μεσεγχυματικών και αγγειακών τμημάτων [86]. Η έκφραση του PDGFRA ταυτοποιεί έναν πληθυσμό ινοβλαστών στην ενήλικη καρδιά τόσο του ποντικού όσο και του ανθρώπου, που έχει την ιδιότητα να δημιουργεί αποικίες (colony-forming unit fibroblasts, c-CFU-Fs) [86]. Τόσο οι καρδιακοί ινοβλάστες, καθώς και οι c-CFU-Fs, προέρχονται από την πρώιμη δομή του επικαρδίου (προ-επικάρδιο), και υφίστανται EMT πριν να αποικίσουν το υπο-επικάρδιο και το μυοκάρδιο. Υπό συνθήκες, c-CFU-Fs μπορούν να δώσουν γέννηση σε κύτταρα vSMCs, σε διαφοροποιημένους ινοβλάστες και σε μικρό βαθμό σε κύτταρα που μοιάζουν με CMs [87].

Άλλοι πληθυσμοί του επικαρδίου όπως είναι τα κύτταρα που εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες *Wt1* και *Tbx18*, παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα μετά από τραυματισμό [61]. Πρόσφατα, οι Valente et al., ταυτοποίησαν έναν ακόμα πληθυσμό βλαστοκυττάρων που εκφράζει τους δείκτες επιφάνειας HSA (Heat Stable Antigen) και CD24 σε εμβρυϊκές και ενήλικες καρδιές στο ποντίκι

(Valente et al., 2019). Τα HSA/CD24⁺ κύτταρα πολλαπλασιάζονται μέχρι και 1 εβδομάδα μετά τη γέννηση του εμβρύου και μπορούν και ενσωματώνονται στον καρδιακό ιστό μετά τη μεταμόσχευση. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα HSA/CD24⁺ μονοπύρνα καρδιομυοκύτταρα, αυξάνονται έως και 3 φορές σε περιοχή της καρδιάς που έχει υποστεί εμφράγμα του μυοκαρδίου [88].

Τουλάχιστον έξι εργαστήρια παγκοσμίως, έχουν αναπαράγει και δημοσιεύσει τη μεθοδολογία για την απόκτηση κυττάρων CDCs (Cardiosphere-Derived Cells), επιβεβαιώνοντας παράλληλα την χρησιμότητά τους. Πρόκειται για κύτταρα πολυδύναμα, που αποτελούν ένα μίγμα στρωματικών μεσεγχυματικών μη διαφοροποιημένων κυττάρων, και έχουν προκύψει από την καλλιέργεια δειγμάτων βιοψίας κόλπων ή κοιλιών. Η καλλιέργεια τους με κατάλληλο τρόπο οδηγεί στη δημιουργία σφαιρών που είναι γνωστές ως καρδιόσφαιρες (Cardiospheres) [80]. Τα CDCs χρησιμοποιήθηκαν πρώτη φορά κλινικά στην κλινική δοκιμή CADUCEUS (CArdiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction). Κατά τη διάρκεια αυτής της κλινικής δοκιμής έγινε έγχυση μέσω της στεφανιαίας αρτηρίας αυτόλογων CDCs σε 17 ασθενείς με δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και έμφραγμα του μυοκαρδίου. Οι ασθενείς μετά από μήνες εμφάνισαν μείωση του μεγέθους της ουλής. Αυτή η μείωση της ουλής ήταν αποτέλεσμα της αύξησης του ζωτικού ιστού, ενισχύοντας την ιδέα ότι ο ιστός της ουλής μπορεί να μετατραπεί σε ζωτικό ιστό έπειτα από θεραπεία με CDCs [89]. Η καλύτερη κατανόηση των ινοβλαστών της καρδιάς είναι απαραίτητη, αφού πρόκειται για κύτταρα που φαίνεται να βοηθούν στην ανανέωση των CMs, πέρα από τη συμβολή τους στη δημιουργία της ουλής [90].



Εικόνα 1.9: Ενδογενείς πληθυσμοί CPCs στην ενήλικη καρδιά. [77]

Συνοψίζοντας, οι διάφοροι CPC πληθυσμοί για τους οποίους έχει γίνει μέχρι σήμερα λόγος ότι εντοπίζονται στην ενήλικη καρδιά, παρουσιάζουν ελάχιστο ή καθόλου δυναμικό διαφοροποίησης προς CMs, με αποτέλεσμα η ευεργετική τους δράση να είναι αποτέλεσμα παρακρινικών φαινομένων ή διαφοροποίησης τους προς άλλους κυτταρικούς τύπους της καρδιάς. Οι Malakin et al. σε πρόσφατη δημοσίευσή τους αναφέρουν ότι τα ενδοκαρδιακά

κύτταρα, τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα ECs, τα SMCs, και τα επικαρδιακά κύτταρα, δεν είναι ικανοί να παράγουν νέα CMs στην ενήλικη καρδιά [91]. Επιπλέον, οι Li et al. ανέπτυξαν τεχνολογίες γονιδιακής στόχευσης με το σύστημα Cre-loxP και επαγόμενη έκφραση της Cre ρεκομπινάσης με τη χορήγηση ταμοξιφένης ή δοξουκυκλίνης για μια σειρά πειραμάτων γενεαλογίας με στόχο να διαπιστώσουν αν ο ενδογενής πληθυσμός καρδιακών βλαστικών κυττάρων (Cardiac Stem Cells, CSCs) υπάρχει τόσο στην αναπτυσσόμενη, όσο και στην ενήλικη καρδιά. Έτσι, με τη χρήση 4 ανεξάρτητων στρατηγικών για την ανίχνευση της γενεαλογίας των κυττάρων, έδειξαν ότι η συνεισφορά των CSCs σε CMs είναι κάτι που συμβαίνει μόνο στο στάδιο της εμβρυϊκής και όχι στην ενήλικη καρδιά. Πιο συγκεκριμένα, με τις τεχνολογίες αυτές έγινε σήμανση όλων των μη-καρδιομυοκυττάρων, για την ανίχνευση τυχόν CM που θα προκύψουν από τέτοιους πληθυσμούς μετά από τραυματισμό. Όπως αποδείχτηκε 12 ώρες μέχρι και 28 ημέρες μετά το MI, κάποια τέτοια διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων προς CMs δε συνέβη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα νέα CMs στο τραυματισμένο μυοκάρδιο ενήλικου ποντικού ενδεχομένως να προέρχονται από προϋπάρχοντα CMs και όχι από τη διαφοροποίηση των ενδογενών CSCs. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία της περαιτέρω έρευνας των μηχανισμών που πράγματι οδηγούν στην αναγέννηση της ενήλικης καρδιάς, έτσι ώστε να καταστεί εφικτή η προώθηση του διπλασιασμού των προϋπάρχοντων CM, καθώς και η εξαναγκασμένη έκφραση παραγόντων επαναπρογραμματισμού με στόχο την απόκτηση νέων CM στην ενήλικη καρδιά [92].

1.7 Σηματοδοτικά μονοπάτια και παρακρινικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της καρδιάς

Η διαδικασία της καρδιογένεσης, είναι μια διαδικασία πολύπλοκη που περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια και εμπλέκει πλήθος μεταγραφικών παραγόντων, όπως είδαμε παραπάνω. Επιπλέον, για την ομαλή ανάπτυξη της καρδιάς είναι αναγκαία η σταδιακή ενσωμάτωση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών, χωρικά και χρονικά. Μετά από έρευνες, έχουν ταυτοποιηθεί εκείνα τα σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι απαραίτητα για τη διαμεσολάβηση της δημιουργίας αρχικά του μεσοδέρματος, και ακολούθως της περαιτέρω εξειδίκευσής του για να προκύψουν τα κύτταρα της καρδιακής σειράς. Η βαθιά κατανόηση του ρόλου και της δράσης τόσο των CPCs όσο και των παρακρινικών σημάτων, θα οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση της αναπτυξιακής διαδικασίας της καρδιάς, καθώς και της παθογένεσης συγγενών ανωμαλιών της καρδιάς (Congenital Heart Diseases, CHDs) [93]. Τα τρία σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν συγκεντρώσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον ως ρυθμιστές της καρδιογένεσης είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια Wnt, BMP και FGF. Αυτά, καθώς και μερικοί ακόμη παρακρινικοί διαμεσολαβητές αναλύονται παρακάτω.

➤ Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι

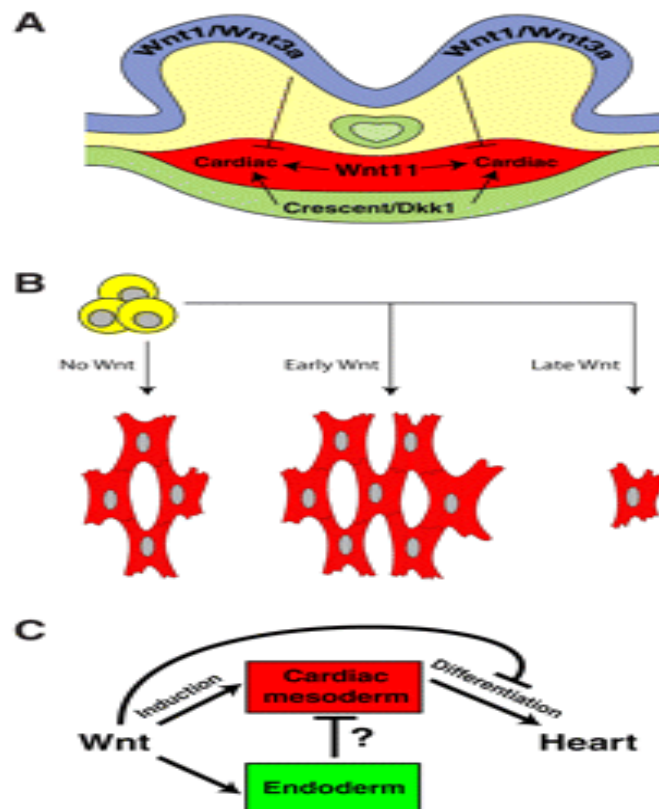
Τα Wnts είναι οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στην ομοιοστάση των ενήλικων ιστών, στην εξέλιξη των όγκων και τη διαφοροποίηση των ESCs. Η εν λόγω οικογένεια πρωτεϊνών αποτελείται από 19 διαφορετικές πρωτεΐνες Wnt και 10 είδη Frizzled υποδοχέων [94]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι wnt διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: στο κανονικό (canonical Wnt/ β -catenin pathway) και στο μη κανονικό (Non-canonical wnt pathway) σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt [95].

Το κανονικό μονοπάτι wnt ενεργοποιείται μέσω της πρόσδεσης των εξωκυττάρων μορίων wnt στους υποδοχείς Frizzled-LRP5/6. Μετά την αλληλεπίδραση προσδέτη/υποδοχέα, η διαμεσολάβηση του σήματος γίνεται μέσω της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Dsh, και καταλήγει στην απενεργοποίηση της κινάσης GSK3 (glycogen synthase kinase 3). Η παρεμπόδιση αυτού του ενζύμου αποτρέπει τη φωσφορυλίωση της β -κατενίνης, η οποία είναι ελεύθερη πλέον να προσδεθεί στο σύμπλοκο των TF LEF/TCF, και το νέο σύμπλοκο που δημιουργείται μετά και από την πρόσδεση της κινάσης μπορεί πλέον να εισέλθει στον πυρήνα και να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων [96]. Στο κανονικό μονοπάτι wnt ανήκουν οι προσδέτες Wnt1, Wnt2a, Wnt3a και Wnt8 [97]. Από την άλλη, το μη-κανονικό μονοπάτι wnt διαμεσολαβείται μέσω των μονοπατιών Wnt/ Ca^{2+} (ασβεστίου) και Wnt/JNK και περιλαμβάνει τους προσδέτες Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b και Wnt11 [98].

Η χαμηλή συγκέντρωση των Wnts είναι απαραίτητη για τον καθορισμό τους εμπρόσθιου μεσοδέρματος σε καρδιακό, γεγονός που υποδηλώνει ότι γονίδια που δρουν «ανταγωνιστικά» ως προς το Wnt, ενδεχομένως να συμμετέχουν στην εγκαθίδρυση διαβαθμίσεων της συγκέντρωσης του Wnt, και κατ' επέκταση στην διάταξη των αξόνων του σώματος των σπονδυλωτών. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις του wnt στο εμπρόσθιο μέρος του εμβρύου οδηγούν στο σχηματισμό της καρδιάς, ενώ οι υψηλές στο οπίσθιο μέρος οδηγούν στο σχηματισμό του αίματος [99]. Οι προσδέτες Wnt11, Wnt3a σε συνδυασμό με τους ανταγωνιστές του wnt noggin και chordin συμβάλλουν στον τοπικό περιορισμό των καρδιακών κυττάρων, ωστόσο, η παρεμπόδιση των Wnt3a και Wnt8c στο εμπρόσθιο πλάγιο μεσοδέρμα είναι αναγκαία για το σχηματισμό της καρδιάς [100]. Ωστόσο, η έκφραση των καταστολέων του Wnt (Crescent, sFRP1, sFRP2) στο έμβρυο φαίνεται να ξεκινάει μετά τον καθορισμό του προ-καρδιακού μεσοδέρματος (Εικόνα 1.10A). Άλλωστε, πειράματα σε mESCs δείχνουν ότι τα κύτταρα Flk1^+ δεν εμφανίζονται μετά από την καταστολή του Wnt με διαλυτό Dkk1, ενός ακόμη από τους παρεμποδιστές του Wnt [101]. Σε αντίστοιχα πειράματα σε έμβρυα *Xenopus*, η καταστολή των Wnt3a και Wnt8 οδηγεί στο σχηματισμό του καρδιακού μεσοδέρματος, ωστόσο, η πλήρης καταστολή του μονοπατιού Wnt/ β -catenin με τη χρήση του Dkk1 ή του Crescent, οδηγεί στην απουσία των καρδιακών κυττάρων σε έμβρυα *Xenopus* [102]. Φαίνεται λοιπόν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt δρα σαν διακόπτης που άλλοτε προωθεί και άλλοτε παρεμποδίζει την καρδιακή διαφοροποίηση των μεσοδερμικών κυττάρων. Έτσι, κατά τα πρώιμα στάδια της «δέσμωσης» των κυττάρων σε

καρδιακά φαίνεται να είναι αναγκαία η παρουσία των Wnts, σε αντίθεση με τα μετέπειτα στάδια που απαιτείται η καταστολή τους (Εικόνα 1.10C) [103].

Η θετική δράση του Wnt στο σχηματισμό της καρδιάς φαίνεται σε μερικά ακόμα παραδείγματα. Το μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης επιδρά θετικά στην έκφραση του TF Hex. Ο Hex απαιτείται για τον καθορισμό του παρακειμένου μεσοδέρματος σε καρδιακό [104]. Το μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης είναι απαραίτητο και για την διαφοροποίηση των mESCs σε καρδιακά κύτταρα [105]. Επιπλέον, η χορήγηση του Wnt11 αυξάνει την διαφοροποίηση προς καρδιακή σειρά στα ίδια κύτταρα [106]. Το μη-κανονικό μονοπάτι Wnt είναι επίσης απαραίτητο για την εξειδίκευση των καρδιακών κυττάρων. Σε ποντίκια στα οποία έγινε διαγραφή των γονιδίων Wnt5a ή Wnt11 δεν σχηματίστηκε σωστά η φαρυγγική αρτηρία και η οδός εκροής [107]. Ακόμα, σε καρδιά ποντικού μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, επάγεται στο επικάρδιο και στους καρδιακούς ινοβλάστες η έκφραση του Wnt1 [108]. Τέλος, όπως φάνηκε και από τα παραπάνω, το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης είναι αναγκαίο για τον καθορισμό των hPSCs (human Pluripotent Stem Cells) σε καρδιομυοκύτταρα, αλλά δεν είναι αρκετό. Μετά το σχηματισμό του μεσοδέρματος ωστόσο, η καταστολή του ίδιου μονοπατιού είναι αναγκαία για την περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων σε καρδιακά (Εικόνα 1.10B) [109].



Εικόνα 1.10 : (A) Οι προσδέτες Wnt και οι παρεμποδιστές του Wnt κατά την εμβρυική ανάπτυξη, μετά τη γαστριδίωση. Ο πράσινος κύκλος αποτελεί τη νωτοχορδή, η κατώτερη πράσινη στιβάδα το οριστικό ενδόδερμα, με μπλε χρώμα απεικονίζεται το νευρικό εξώδερμα, με κόκκινο το πρώιμο καρδιακό μεσόδερμα και με κίτρινο το σπλαχνικό μεσόδερμα. Οι Wnt1 και Wnt3 εκφράζονται στο νευρικό εξώδερμα ενώ οι Wnt11, Wnt2a και Wnt2b εκφράζονται στο καρδιακό μεσόδερμα. Οι crescent και Dkk1 εκφράζονται στο οριστικό ενδόδερμα και καταστέλλουν

το wnt μονοπάτι. (B) Μελέτες σε ESCs (κίτρινο) δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του Wnt μετά την εξειδίκευση του καρδιακού μεσοδέρματος κατά τη διαφοροποίηση των CMs, ενώ η ενεργοποίηση του αργότερα την παρεμποδίζει. (C) Το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι είναι σημαντικό για την επαγωγή του σχηματισμού της καρδιάς, αλλά καταστέλλει τη διαφοροποίηση των CMs. [110]

➤ Το TGF-β σηματοδοτικό μονοπάτι

Η υπεροικογένεια πρωτεϊνών TGF-β περιλαμβάνει παραπάνω από 30 μέλη και είναι τα εξής: οι παράγοντες TGF-β, οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), την ακτιβίνη A και το Nodal [111].

Ξεκινώντας με τις BMPs, πρόκειται για τους πιο σημαντικούς παράγοντες στην ανάπτυξη της καρδιάς και πολλές από αυτές εκφράζονται στην αναπτυσσόμενη καρδιά. Οι συγκεκριμένες μορφογενετικές πρωτεΐνες παρεμποδίζουν την καρδιακή ανάπτυξη κατά τα αρχικά στάδια πριν τη γαστριδίωση, και έτσι οι «ανταγωνιστές» των BMPs Chordin και Noggin διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάδυση του καρδιακού μεσοδέρματος [112]. Όπως και το Wnt, έτσι και οι BMPs, λοιπόν, έχουν διττό ρόλο στην ανάπτυξη της καρδιάς. Και τα δύο αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια συμβάλλουν στον σχηματισμό των πρώιμων καρδιακών κυττάρων ($Mesp1^+$, Kdr^+) κατά την επαγωγή του μεσοδέρματος, ωστόσο, καταστέλλουν τον σχηματισμό των μετέπειτα πρώιμων κυττάρων ($Nkx2.5^+$). Βέβαια το BMP, δρα και πάλι ευνοώντας τα πρώιμα καρδιακά κύτταρα, εφόσον εμφανιστούν τα $Nkx2.5^+$ κύτταρα [113].

Στην καρδιά εκφράζονται τουλάχιστον 6 πρωτεΐνες BMPs που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της καρδιάς (BMPs 2, 4, 5, 6, 7 and 10). Οι BMPs 2,4,5,6 και 7 εκφράζονται στην OFT και στους κολποκοιλιακούς θαλάμους (AV cushions), και παίζουν ρόλο στην ωρίμανση αυτών των ιστών [110–111]. Οι πρωτεΐνες BMP2 και BMP4 φαίνεται να έχουν τον σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη της καρδιάς. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες επάγουν *in vitro* την διαφοροποίηση προς κύτταρα καρδιακής σειράς σε κύτταρα που δεν προέρχονταν από ιστούς της καρδιάς [116]. Αρχικά, η έκφραση του BMP4 εντοπίζεται για πρώτη φορά την εμβρυϊκή μέρα 5.5, στο εξωεμβρυϊκό εξώδερμα και στην επιβλάστη. Στο στάδιο των σωματιών, η BMP4 εκφράζεται στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα, στο οπίσθιο τμήμα της αρχικής λωρίδας και στο πλάγιο μεσόδερμα [117]. Ποντίκια στα οποία έχει γίνει knockout του γονιδίου *Bmp4* πεθαίνουν μεταξύ των ημερών 6.5-9.5. Στα ποντίκια αυτά δε σχηματίζεται το μεσόδερμα, ωστόσο, ένα μικρός αριθμός αυτών των ζώων φτάνει στο στάδιο της κεφαλικής πτυχής ή μέχρι το στάδιο που χτυπά η καρδιά [118]. Μία ακόμα μελέτη κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου και *Mesp1*-Knockout ποντίκια, έδειξε μετά από ανάλυση με «αλληλούχιση RNA μεμονωμένου κυττάρου» (single-cell RNA-seq), ότι μεταξύ των πρώιμων $Mesp1^+$ κυττάρων την ημέρα 7.5, η *Bmp4* εντοπίστηκε μόνο στα καρδιακά κύτταρα που πρόκειται να διαφοροποιηθούν σε καρδιομυοκύτταρα, ενώ η έκφραση της *Bmp4* δεν συνέπεσε με αυτή του ενδοθηλιακού δείκτη *Sox7* [119].

Σε ό,τι αφορά την πρωτεΐνη BMP2, το υπό συνθήκη knockout της BMP2 σε ποντίκι την ημέρα 10.5 οδήγησε σε ελαττωματικό περικάρδιο, καθώς και σε προβλήματα στις κοιλίες και

στους κόλπους, αφού όπως είναι γνωστό η BMP2 είναι απαραίτητη για την επαγωγή της EMT στο ενδοκάρδιο και στην ολοκλήρωση της κολποκοιλιακής δομής στο μυοκάρδιο [120]. Ma et al., 2005. Μετά από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου η έκφραση της BMP2 αυξάνεται σημαντικά στο μυοκάρδιο [121].

Μία ακόμα πρωτεΐνη της οικογένειας των BMPs, η BMP10, εκφράζεται αποκλειστικά στο σπογγώδες μέρος της καρδιάς, όπου προωθεί τον πολλαπλασιασμό των μη ώριμων CMs [122]. Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι BMP παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων της ενήλικης καρδιάς σε καρδιομυοκύτταρα. Η προσθήκη BMPs σε MSCs ενήλικης καρδιάς ενίσχυσε την έκφραση καρδιακών γονιδίων, οδηγώντας στη διαφοροποίηση σε CMs [123].

Σημαντικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης είναι ακόμα και δύο άλλες πρωτεΐνες μέλη της υπερικογένειας TGF-β, η ακτιβίνη A και το Nodal. Οι πρωτεΐνες αυτές, έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γαστριδίωσης, στο σχηματισμό της PS, του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος, καθώς και στην αριστερή-δεξιά ασυμμετρία των αξόνων του σώματος [124]. Οι Cai et al. μέσω της διαφοροποίησης mESCs σε CPCs βρήκαν ότι η TGFβ2 επάγεται από το Nodal και στη συνέχεια συμβάλλει στη μετάδοση του καρδιακού σήματος. Η ακτιβίνη A και το Nodal συνεργάζονται με το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι για τον σχηματισμό του μεσοδέρματος στο έμβρυο, στο ποντίκι και στον άνθρωπο [113]. Οι συγκεντρώσεις της Ακτιβίνης A και του BMP4 παίζουν καθοριστικό ρόλο για την βέλτιστη επαγωγή του μεσοδέρματος σε mESCs και hESCs [125].

Τέλος, τα Smads είναι οι πρωτεΐνες που μεταδίδουν τα εξωκυττάρια σήματα που δέχεται το κύτταρο στους TGF-β υποδοχείς από τη μεμβράνη στον πυρήνα για τη μεταγραφή των επόμενων γονιδίων στόχων. Σε μερικούς κυτταρικούς τύπους οι Smad2 και Smad3 αλληλεπιδρούν με τις Smad1, Smad5 ή Smad8, οι οποίες με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν με το BMP4 μονοπάτι, συνεπώς ρυθμίζουν την επικοινωνία μεταξύ Ακτιβίνης/Nodal και των BMPs [126]. Επιπλέον, Η έκφραση των Smads σε καρδιά που έχει υποστεί MI είναι αρκετά αυξημένη και γενικά η έκφρασή τους έχει συσχετιστεί με την καρδιακή ίνωση και τα υψηλά επίπεδα σύνθεσης κολλαγόνου [127]. Η smad4 αποτελεί έναν από τους κύριους TF του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β. Η απώλεια του γονιδίου smad4 δεν έχει επίδραση στην αυτοανανέωση των hESCs, ωστόσο, οδηγεί σε πλήρη απώλεια των CM κατά την *in vitro* διαφοροποίησή τους προς καρδιακά κύτταρα. Ο ρόλος, λοιπόν, της Smad4 φαίνεται να είναι αναγκαίος για το σχηματισμό του καρδιακού μεσοδέρματος [128].

➤ Το FGF σηματοδοτικό μονοπάτι

Το σηματοδοτικό μονοπάτι FGF (Fibroblast Growth Factor) περιλαμβάνει περισσότερους από 20 προσδέτες και 4 διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κινάσης της τυροσίνης [129]. Ο ρόλος αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού στην ανάπτυξη της καρδιάς αντικατοπτρίζεται στο φαινότυπων δύο μεταλλαγμάτων, στα οποία έχει γίνει απαλειφή των γονιδίων Fgf10 και Fgf2. Η

έλλειψη έστω και ενός εκ των δύο, οδηγεί σε καρδιακούς φαινοτύπους, υπογραμμίζοντας έτσι το ρόλο του FGF στην καρδιογένεση. Οι FGF2 και FGF10, έχει δείχτεί ότι δίνουν έναυσμα για την καρδιακή διαφοροποίηση των ESCs και τον επαναπρογραμματισμό καλλιεργούμενων ινοβλαστών. Επιπλέον, κατά τη διαφοροποίηση των hPSCs, ο FGF2 προωθεί το σχηματισμό του μεσοδέρματος [130]. Ο FGF10 προωθεί τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των CM in vitro και in vivo, ενώ η υπερέκφραση του Fgf10 σε διαγονιδιακό ποντίκι, προκάλεσε την επανένταξη των CM στον κυτταρικό κύκλο. Τέλος, οι εμβυϊκές καρδιές των Fgf-KO ποντικών εμφάνισαν προβλήματα στη μορφολογία της δεξιάς κοιλίας [131].

➤ Τα σηματοδοτικά μονοπάτια Hedgehog, Notch και ρετινοϊκού οξέος

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια Hedgehog, Notch και ρετινοϊκού οξέος διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της καρδιάς, ωστόσο, δεν θα αναφερθούμε εκτενώς σε αυτά στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής. Συνοπτικά:

- Στο zebrafish το μονοπάτι Hedgehog (Hh) προάγει το σχηματισμό των CM [132], ενώ στο ποντίκι έχει αποδειχτεί ότι στη εγκαθίδρυση της αριστερής-δεξιάς ασυμμετρίας, των αγγείων της στεφανιαίας αρτηρίας, των διαφραγμάτων των κόλπων και στο σχηματισμό της OFT [133].
- Κατά την καρδιογένεση το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ελέγχει το σχηματισμό της δεξιάς κοιλίας και της OFT, την ανάπτυξη του λείου μυϊκού ιστού των αγγείων, την εξειδίκευση των θαλάμων και του σπογγώδους ιστού της καρδιάς [134].
- Το μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid, RA) ρυθμίζει τη διαμόρφωση των παραγώγων του SHF στο εμπρόσθιο και οπίσθιο μέρος των αξόνων [135].

1.8 Συγγενείς ανωμαλίες της καρδιάς

Οι συγγενείς ανωμαλίες της καρδιάς (Congenital Heart Defect, CHD), αποτελούν τη δεύτερη κατά σειρά συχνότητας αιτία θανάτου στη βρεφική και παιδική ηλικία, με εκτιμώμενη συχνότητα 4-50 νεογνά για κάθε 1000 γεννήσεις [136]. Στις Η. Π. Α., 36000 παιδιά ετησίως γεννιούνται με CHDs και υπολογίζεται ότι 4 έως 10 στα 1000 νεογνά παρουσιάζουν δυσμορφία στην καρδιά, 40% των οποίων διαγιγνώσκονται στον πρώτο χρόνο ζωής [137]. Πρόκειται για δομικές και λειτουργικές ανεπάρκειες της αναπτυσσόμενης καρδιάς με υψηλή νοσηρότητα στη νεογνική ηλικία [138]. Οι πιο κοινοί τύποι τέτοιων ανωμαλιών είναι οι εξής: έλλειμμα κοιλιακού διαφράγματος (Ventricular Septal Defect, VSD), έλλειμμα κολπικού διαφράγματος (Atrial Septal Defect, ASD), τετραλογία του Fallot (Tetralogy of Fallot, TOF), ανεπάρκεια της μιας κοιλίας (Single Ventricle Defect, SVD), δεξιά κοιλία με διπλή έξοδο (Double Outlet Right Ventricle, DORV), στένωση της πνευμονικής βαλβίδας (Pulmonary Valve Stenosis, PVS), βατός αρτηριακός πόρος (Patent Ductus Arteriosus, PDA), μετάθεση των μεγάλων αγγείων (Transposition of the Great Arteries, TGA), και τέλος η στένωση της αορτικής βαλβίδας (Aortic Valve Stenosis, AVS) [139]. Τα

προβλήματα στην ανάπτυξη των διαφραγμάτων είναι η πιο κοινή μορφή CHD που συναντάται, αποτελούν το 50% όλων των CHDs και εμφανίζουν ομοιότητες με μενδελικά σύνδρομα [140]. Σε ό,τι αφορά το TOF, όπως φαίνεται από το όνομά του το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από τέσσερις βλάβες: στένωση της πνευμονικής αρτηρίας, μετατόπιση της αορτής προς τη δεξιά κοιλία, μια οπή στο κοιλιακό διάφραγμα και διόγκωση της δεξιάς κοιλίας (αυτή η ανωμαλία είναι δευτερογενές αποτέλεσμα των άλλων τριών) [2].

Η πρόοδος για την κατανόηση τέτοιων γενετικών ανωμαλιών είναι συνεχής, ραγδαία και πολύ σημαντική καθώς πλέον άτομα με CHD φτάνουν στην ενηλικίωση και μπορούν να κάνουν τα δικά τους παιδιά. Σε ό,τι αφορά το γενετικό υπόβαθρο των CHDs, συνεχώς νέες μελέτες υποδεικνύουν ότι κεντρικό ρόλο σε αυτές τις ανωμαλίες της καρδιάς έχουν γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την αναπτυξιακή διαδικασία της καρδιάς. Η χρήση τεχνολογιών υψηλής απόδοσης έχει επιτρέψει τον προσδιορισμό νέων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ήδη γνωστών αλλά και νεοανακαλυφθέντων γονιδίων και πρωτεϊνών, γνώση που μπορεί να αποδειχτεί πολύτιμη στη θεραπεία και τη διαχείριση ασθενών με CHD, καθώς και των απογόνων τους [141]. Παρακάτω πρόκειται να αναφερθούν μερικές από τις πιο γνωστές και κοινές ανωμαλίες της καρδιάς, καθώς και οι TFs που εμπλέκονται σε αυτές.

Το ποντίκι είναι από τα κυριότερα μοντέλα στα οποία έχουν μελετηθεί πολλών ειδών CHDs θα πρέπει να σημειωθεί ότι ποντικοί στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί στοχευμένη αδρανοποίηση τέτοιων γονιδίων συνήθως δεν επιβιώνουν, αλλά πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση. Τα ετερόζυγα όμως άτομα φαίνονται συνήθως φυσιολογικά. Αντιθέτως, στον άνθρωπο η μελέτη αρκετών συγγενών ανωμαλιών της καρδιάς συνδέεται με την ετεροζυγωτία στα ίδια γονίδια, καθώς οι μεταλλαγές είναι επικρατείς και παρατηρείται ανεπάρκεια απλοειδίας (Haploinsufficiency), κατά την οποία στους διπλοειδείς οργανισμούς μόνο το ένα από τα δύο αντίγραφα ενός γονιδίου είναι φυσιολογικό, και αυτή η απώλεια της τάξεως του 50% της λειτουργικής πρωτεΐνης είναι αρκετή για να προκαλέσει ανεπάρκεια/ασθένεια [2] Slack 2013.

Όπως είναι πλέον κατανοητό, ο TBX5 είναι σημαντικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης κατά την εμβρυογένεση, και ειδικά σε συνδυασμό με τους TFs NKX2.5 και GATA-4, και η απώλεια της δράσης του οδηγεί στην ελαττωματική ανάπτυξη της καρδιάς και των άκρων [142]. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτούς τους 3 μεταγραφικούς παράγοντες έχουν συσχετιστεί με την απώλεια των καρδιακών διαφραγμάτων. Αναλύσεις γενετικής σύνδεσης του γονιδιώματος του ανθρώπου, έδειξαν ότι το σύνδρομο Holt-Oram οφείλεται σε μεταλλαγές στο γονίδιο TBX5 (χρωμόσωμα 12q24.1) [98-99] Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες της καρδιάς και των άκρων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι ASD και VSD, καθώς και από παραμόρφωση των άνω άκρων [100-102]. Μεταλλαγές στα γονίδια NKX2.5 και NKX2.5 προκαλούν τετραλογία του Fallot και την ανωμαλία του Ebstein [101-103]. Πειραματικές αναλύσεις σε μεταλλαγές του GATA-4 έχουν υποδείξει αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Gata-4 και Tbx5 και προκαλούν επίσης ASD και VSD. Μάλιστα, οι Maitra et al. έδειξαν ότι τα διπλά ετερόζυγα knockout ποντίκια ($Gata4^{+/-}$,

Tbx5^{+/-}) για τα γονίδια αυτά, εμφανίζουν διανοητική αναπηρία και νεογνική θνησιμότητα, που πιθανώς να οφείλεται σε καρδιακή ανεπάρκεια [149].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο TF Tbx2 παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του AV καναλιού, της αριστερής κοιλίας και του αγωγού συστήματος της καρδιάς [150]. Τα γονίδια Tbx3 και Tbx18 συμμετέχουν στην ανάπτυξη του φλεβόκομβου [151]. Μεταλλαγές του TBX20 οδηγούν σε αποκλίνουσα γένεση δημιουργία των βαλβίδων, σε απώλειες των διαφραγμάτων, TOF και καρδιομυοπάθεια [152]

Το σύνδρομο Di George είναι μια πολύπλοκη κατάσταση που οφείλεται σε μια έλλειψη στο χρωμόσωμα 22, η οποία περιλαμβάνει περίπου 45 γονίδια. Οι ανωμαλίες που εμφανίζονται στην καρδιά των ασθενών με σύνδρομο Di George θεωρείται ότι οφείλονται στην απώλεια ενός αλληλομόρφου του TBX1 (Haploinsufficiency). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από απλασία ή υποπλασία του θύμου αδένου, απλασία ή υποπλασία των παραθυροειδών και καρδιακές δυσμορφίες, όπως οι TOF και VSD [108-109].

Μεταλλαγές στο ανθρώπινο γονίδιο NKX2.5 συνδέονται με ανωμαλίες της καρδιάς, όπως ανωμαλίες στο σχηματισμό της ακκύλης, του συστήματος αγωγής των διαφραγμάτων των κόλπων, της τριγλώχινης βαλβίδας και τερατολογία του Fallot. Απαλοιφή του γονιδίου Nkx2-5 στο ποντίκι οδήγησε σε εμβρυϊκή θνησιμότητα λόγω της αποτυχίας δημιουργίας της δομής ακκύλης, ανεπάρκειας στη διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων κατά το σχηματισμό των θαλάμων της καρδιάς και έλλειψη του AV κόμβου [110-111]. Οι Tu et al. ερεύνησαν την απώλεια των γονιδίων nkx2.7 και nkx2.5 στην καρδιογένεση του zebrafish. Με την αποσιώπηση αυτών των γονιδίων έγινε φανερό ότι τα γονίδια αυτά είναι αναγκαία για τη δημιουργία της δομής-αγκύλης της καρδιάς [156].

Διαταραχές σε γονίδια της υπερικογένειας TGF-β, επιφέρουν εμβρυϊκή θνησιμότητα στο ποντίκι [157]. Το σύνδρομο Loeys-Dietz (LDS) είναι ένα παράδειγμα των ανωμαλιών που μπορεί να προκύψουν από δυσλειτουργίες σε αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι. Το κύριο χαρακτηριστικό του είναι η διογκωμένη αορτή ή το αορτικό ανεύρυσμα που συναντάται συχνά στα παιδιά και αυξάνει τον κίνδυνο του θανάτου γι'αυτό και απαιτεί χειρουργική παρέμβαση [158]. Τα χαρακτηριστικά αυτά του LDS παρουσιάζουν κοινά με αυτά του συνδρόμου Marfan (MFS), το οποίο προκαλείται από μεταλλαγές στο γονίδιο Fbn1 και είναι μια διαταραχή του συνδετικού ιστού που έχει αυτοσωμικό επικρατές χαρακτήρα [159]. Υπάρχουν 5 τύποι LDS, οι οποίοι οδηγούν σε μη λειτουργικές πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού και γενετικά διακρίνονται ως εξής: τύπος I (TGFβR1), τύπος II (TGFβR2), τύπος III (SMAD3), τύπος IV (TGFβ2) και τύπος V (TGFβ3). Οι τύποι I και II είναι οι πιο κοινοί μεταξύ των LDS [160].

Το σύστημα Notch εμπλέκεται στην ανάπτυξη των διαφραγμάτων και στο σχηματισμό των κύριων αγγείων, όπως φαίνεται στο σύνδρομο Alagille, το οποίο προκαλείται όταν χάνεται το ένα αντίγραφο του γονιδίου που κωδικοποιεί τον προσδέτη του Notch JAGGED1. Το σύνδρομο

Alagille χαρακτηρίζεται από τετραλογία του Fallot, στένωση πνευμονικής αρτηρίας και ατρησία των χοληφόρων πόρων.

Τέλος, η διγλώχινη αορτική βαλβίδα, αντί για τη φυσιολογική τριγλώχινη, έχει συσχετιστεί σε σημαντικό βαθμό με περιστατικά νοσηρότητας και θνησιμότητας στα μετέπειτα στάδια της ζωής και συναντάται στο 10-20 τοις χιλίοις του συνολικού πληθυσμού. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι πρόκειται για ανωμαλία υψηλής κληρονομικότητας [161].

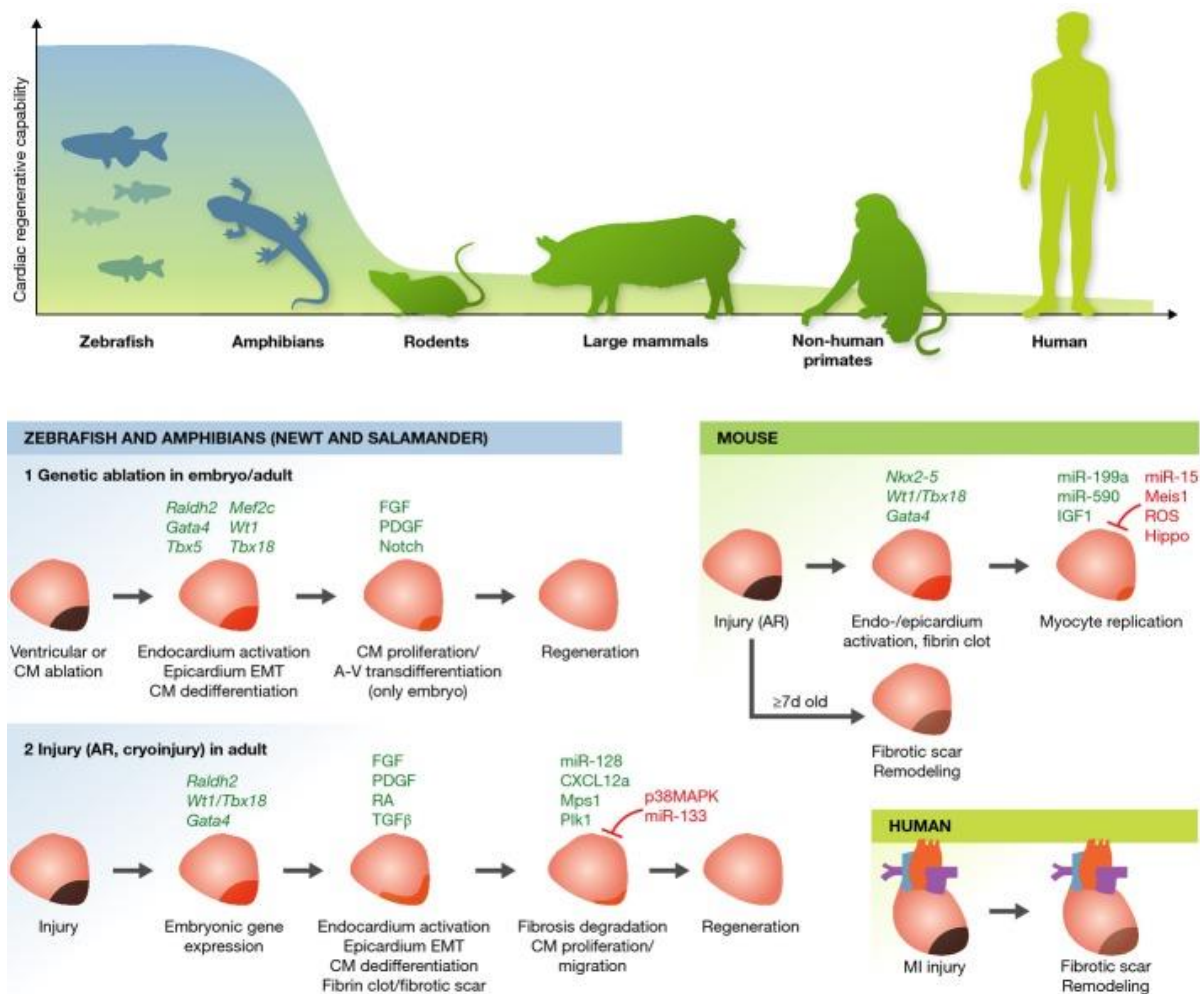
1.9 Η Αναγέννηση της καρδιάς

Η παλιότερα επικρατούσα άποψη ότι τα κύτταρα της ανθρώπινης καρδιάς μετατρέπονται σε μετα-μιτωτικά και δεν μπορούν πλέον να αυτό-ανανεώνονται με την πάροδο της ηλικίας ή κατά τον τραυματισμό, έχει ανατραπεί έπειτα από σχετικά πρόσφατα ευρήματα των Garbern και Lee [162]. Ωστόσο, ο αριθμός των CMs που ανανεώνονται είναι μικρός ακόμα και μετά από έναν τραυματισμό, όπως είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου [74, 119–121].

Ουρόδηλα αμφίβια, όπως είναι οι σαλαμάνδρες και οι τρίτωνες, έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τους τραυματισμένους ιστούς τους, συμπεριλαμβανομένου και της καρδιάς [122–123]. Το πώς τα καρδιομυοκύτταρα τέτοιων οργανισμών επανεισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο παραμένει άγνωστο, ωστόσο, στα μόρια που φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία συγκαταλέγονται τα FGFs, PDGFs, θρομβίνες, το σηματοδοτικό μονοπάτι BMP, και miRNAs όπως το miR-128 (Εικόνα 1.11) [124–125]. Σε αντίθεση με τα CM των θηλαστικών που είναι πολυπύρηννα ή/και πολυπλοειδή (4n), το 98% των φυσιολογικών CM τέτοιων αμφιβίων είναι μονοπύρηννα και διπλοειδή. Το γεγονός αυτό μπορεί να συμβάλλει στην αναγεννητική τους ικανότητα [170].

Χρόνια μετά από αυτές τις πρώτες παρατηρήσεις στα ουρόδηλα αμφίβια, παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και στο ζεβρόψαρο (zebrafish). Η καρδιά ενός ενήλικου zebrafish μπορεί να αναγεννηθεί πλήρως μέσα σε 60 ημέρες μετά από εκτομή του 20% του ακραίου μυοκαρδίου [127–128]. Σε όλα τα «μοντέλα τραυματισμού» του zebrafish (εκτομή, κρουοτραυματισμός, γενετικά μοντέλα), ο τραυματισμός επάγει την έκφραση γονιδίων που εκφράζονται κανονικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη της καρδιάς, όπως είναι τα Gata-4, Nkx2.5, Raldh2, Wt1 και Tbx18, και ακολούθως την ενεργοποίηση του ενδοκαρδίου και του επικαρδίου, καθώς και την EMT των κυττάρων του επικαρδίου [173]. Μετά από τον κρουοτραυματισμό σε μία περιοχή της καρδιάς δημιουργείται μια παροδική ινώδης ουλή σε αυτήν την περιοχή, της οποίας ο σχηματισμός αποδίδεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β/Activin, και η οποία ενδεχομένως να είναι απαραίτητη για την αναγέννηση της καρδιάς σε αυτό το μοντέλο. Σε αντίθεση με την αντίστοιχη ουλή στην καρδιά των θηλαστικών, το σημάδι αυτό σταδιακά μειώνεται και τελικά εξαφανίζεται [174] (Εικόνα 1.11). Ακολουθεί η αγγειοποίηση του τραυματισμένου μυοκαρδίου, και τελικά, γύρω από την εν λόγω περιοχή εμφανίζονται πολλαπλασιαζόμενα CM [175]. Πολλοί παρακρινικοί παράγοντες έχουν προταθεί για την προώθηση του πολλαπλασιασμού των CM, όπως είναι το RA

που συντίθεται από το επικάρδιο και το ενδοκάρδιο και η χημοκίνη CXCL12a (C-X-C motif chemokine 12a), γνωστή και ως SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), που εκφράζεται στα επικαρδιακά κύτταρα [132–134]. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα CM αποδιαφοροποιούνται και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται μετά από έναν τραυματισμό δεν είναι πλήρως γνωστοί, μελέτες όμως προτείνουν ότι οι κινάσες Mps1 (Mitotic checkpoint kinase) και Plk1 (polo-like kinase 1) ρυθμίζουν την αναγέννηση της καρδιάς στο zebrafish, ενώ ο πολλαπλασιασμός των CM αναστέλλεται από τα miR-133 και την κινάση p38 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) [135–136].



Εικόνα 1.11: Στο πάνω μέρος της εικόνας έχουμε τη σχηματική αναπαράσταση της αναγεννητικής ικανότητας των διαφόρων οργανισμών από τα κατώτερα σπονδυλωτά (zebrafish, αμφίβια) μέχρι τον άνθρωπο. (Κάτω μέρος) Απεικονίζονται οι αναγεννητικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε κάθε οργανισμό (zebrafish, αμφίβια, ποντίκι, άνθρωπος) μετά από έναν τραυματισμό της καρδιάς. Στο zebrafish, διαφορετικό είδους τραυματισμού, οδηγεί σε διαφορετική διαδικασία ανάρρωσης, με τελικό αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση την ολική αναγέννηση του μυοκαρδίου. Το ίδιο συμβαίνει και στην καρδιά του ποντικού μίας ημέρας. Σε ποντικό, ωστόσο, 7 ημερών και στον άνθρωπο έχουμε το σχηματισμό μόνιμης ουλής. Με πράσινα γράμματα αναφέρονται μόρια που ενισχύουν την αναγέννηση και με κόκκινο αυτά που την καταστέλλουν. AV: atrioventricular, CM: cardiomyocyte, EMT: epithelial-to-mesenchymal transition, MI: myocardial infraction [25].

Τέλος, στα θηλαστικά σε αντίθεση με τα αμφίβια και το zebrafish, ένας τραυματισμός στην καρδιά όπως είναι το MI προκαλεί τον οριστικό θάνατο των CM και μόνιμη ινώδη ουλή. Αυτό έχει

ως συνέπεια την ηλεκτρική αποσύζευξη του μυοκαρδίου, αρρυθμίες, μη ευνοϊκή αναδιαμόρφωση των κοιλιακών τοιχωμάτων, μείωση της κοιλιακής λειτουργίας, και τελικά την καρδιακή ανεπάρκεια (Εικόνα 1.11). Ωστόσο, μελέτες δείχνουν ότι σε νεογέννητο ποντίκι 1 ημέρας η καρδιά αναγεννάται πλήρως 21 ημέρες μετά από εκτομή του 15% του ακραίου κοιλιακού ιστού [137–138]. Αυτή η αναγεννητική ικανότητα όμως της καρδιάς του ποντικού χάνεται 7 ημέρες μετά τη γέννηση [137, 139].

Οι Hirose et al. υποστηρίζουν ακόμα ότι η απώλεια της αναγεννητικής ικανότητας των θηλαστικών οφείλεται αφενός στην πολυπλοειδία των CM κι αφετέρου στην απόκτηση της ενδοθερμίας τους μετά τη γέννηση και στα αυξανόμενα επίπεδα των ορμονών του θυρεοειδή στο αίμα [184]. Οι ενδόθερμοι οργανισμοί παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα μεταβολικών διεργασιών και θυρεοειδών ορμονών σε σχέση με του ποικιλόθερμους. Έτσι, είναι πιθανό στην πορεία της εξέλιξης να «αντάλλαξαν» την αναγεννητική τους ικανότητα με την απόκτηση ενδοθερμίας τους, η οποία ρυθμίζεται από τις ορμόνες του θυρεοειδούς αδένου. Έτσι, πολλά θηλαστικά κατά τη γέννηση θεωρούνται ποικιλόθερμα, μετέπειτα όμως η θερμοκρασία του σώματος ρυθμίζεται αναλόγως, γεγονός που συνάδει με την αύξηση των επιπέδων των θυρεοειδών ορμονών στο αίμα.

1.9.1 Καινοτόμες Θεραπείες

Πέρα από τις θεραπείες που βασίζονται στα βλαστοκύτταρα, υπάρχουν μερικές ακόμα καινοτομίες που έχουν προταθεί για τις καρδιακές παθήσεις και για τις οποίες γίνεται μία σύντομη αναφορά σε αυτή την ενότητα (Εικόνα 1.12).

Τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs, γνωστά ως microRNAs (miRNAs) συντονίζουν όπως είναι γνωστό τις βιολογικές διαδικασίες της καρδιακής ανάπτυξης [165–166]. Πρόσφατα, οι Gabisonia et al. μελέτησαν την επίδραση του miR-199a σε εμφραγματική καρδιά γουρουνιού. Ένα μήνα μετά τη θεραπεία, τα ζώα αυτά παρουσίασαν σημαντική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας. Η υπερέκφραση του miR-199a προκάλεσε ταχύτατο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των CMs, γεγονός που οδήγησε αφενός σε αρρυθμίες και στο θάνατο των ζώων κι αφετέρου σε αυξημένη καρδιακή μυϊκή μάζα και μείωση της ινώδους ουλής που προέκυψε από τον τραυματισμό [187]. Μία άλλη μορφή μη κωδικοποιητικών RNA είναι τα ολιγονουκλεοτίδια αντινοήματος ASOs (Antisense Oligonucleotides) που είναι χημικά ενεργά, μικρά, μονόκλινα μόρια DNA με αλληλουχία συμπληρωματική ως προς το RNA-στόχο. Σε μία πρόσφατη μελέτη τα ASOs χρησιμοποιήθηκαν έναντι του miR-25, το οποίο καταστέλλει τους μηχανισμούς διαχείρισης του ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου, και οδήγησαν στη βελτίωση της συστολής της καρδιάς [188].

Τα εξωκυττάρια σωματίδια (Extracellular Vesicles, EVs), όπως είναι τα εξωσώματα, είναι μη κωδικοποιητικά σωματίδια που αποτελούν μέσο μεταφοράς και επικοινωνίας στο εσωτερικό του κυττάρου [189]. Τα εξωσώματα μεταφέρουν λιπίδια και πρωτεΐνες μεταξύ και των καρδιακών

κυττάρων [170–171]. Ενδεχομένως, λοιπόν, να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην επιδιόρθωση της καρδιάς μετά τον τραυματισμό [189].

Παρόλο που στο παρελθόν οι γονιδιακές θεραπείες για το καρδιαγγειακό σύστημα είχαν συγκεντρώσει αρκετό ενδιαφέρον, πλέον παρουσιάζουν μικρή κλινική σημασία [192]. Οι αδενοϊοί (Adenoviruses, AVs) και οι λεντιοί (Lentiviruses, LVs) έχουν την ιδιότητα να μεταφέρουν γενετικό υλικό στα καρδιακά κύτταρα. Οι LVs όμως ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή των κυττάρων-στόχων αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο της μεταλλαξιγένεσης και γι' αυτό το λόγο δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [193]. Οι AVs από την άλλη, δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή και έχει αποδειχτεί ότι εμφανίζουν υψηλό βαθμό μεταγωγής στα CMs. Για την επίτευξη αυτής της υψηλής απόδοσης μεταγωγής όμως απαιτείται ενδομυϊκή ένεση του ιού [194]. Ακόμα, οι AVs είναι παγκοσμίως γνωστοί για το θάνατο ενός νέου ανθρώπου λόγω ανοσολογικής αντίδρασης στον ιό [195].

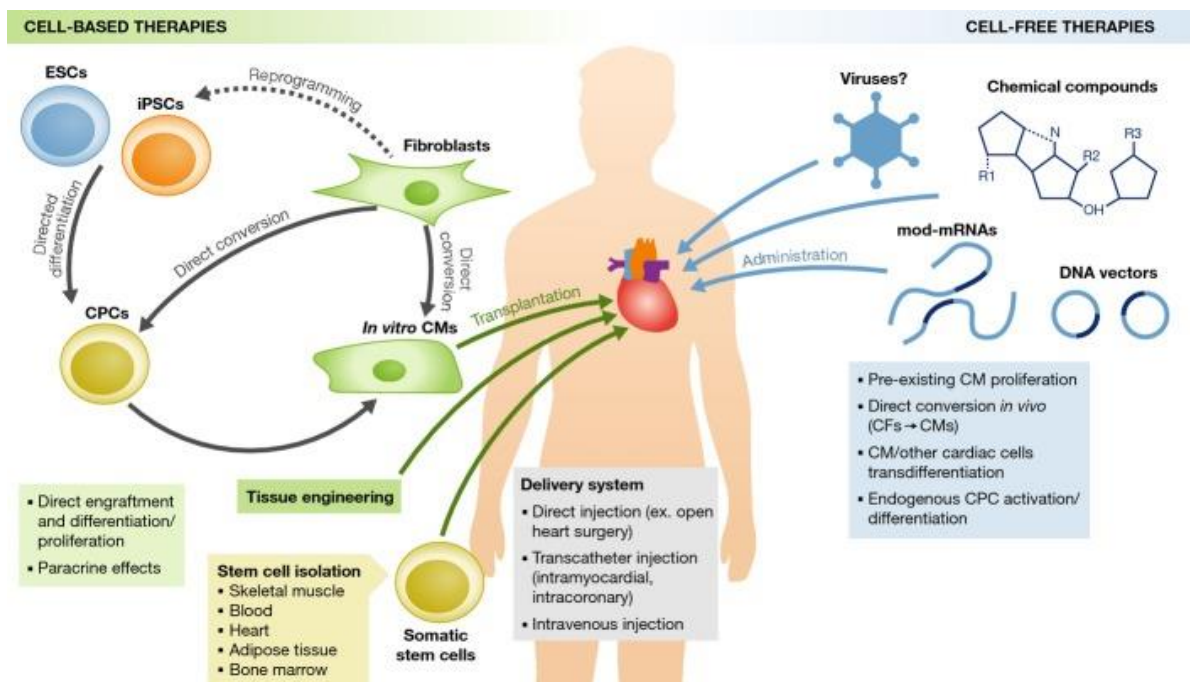
Μία πολλά υποσχόμενη θεραπεία είναι τα modRNAs. Πρόκειται για αγγελιοφόρα RNAs (mRNAs) που περιέχουν συνθετικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια από τα οποία λείπει η φωσφορική ομάδα και τα οποία κερδίζουν συνεχώς έδαφος στους τομείς τη γενετικής, της ανοσοθεραπείας και του καρκίνου [176–177]. Η ενδομυοκαρδιακή ένεση modRNA που κωδικοποιούν τον παράγοντα VEGF-A μέσω νανοσωματιδίων λιπιδίων (Lipid Nanoparticles, LNPs) σε καρδιά που έχει υποστεί τραυματισμό, οδήγησε στην ενίσχυση της νεο-αγγειογένεσης και στη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας σε μικρά και μεγάλα ζώα. Η θεραπεία αυτή δεν εμφάνισε δυσμενείς επιπτώσεις στην καρδιά. Επιπλέον, η χορήγηση των ίδιων modRNA ήταν αποτελεσματική και σε διαβητικούς ασθενείς [178–179]. Αναμένεται, λοιπόν, οι τεχνολογίες των modRNAs να αποκτήσουν μεγαλύτερη χρησιμότητα στο μέλλον.

Τέλος, οι Vandergriff et al. χρησιμοποίησαν συνθετικά πεπτίδια τα οποία προσελκύουν τα εξωσώματα που ενίονται ενδοφλεβίως στην περιοχή της εμφραγματικής καρδιάς τρωκτικών. Ως αποτέλεσμα, τα τρωκτικά εμφάνισαν μείωση της ινώδους ουλής της καρδιάς και βελτίωσαν την καρδιακή λειτουργία και την αγγειογένεση στην περιοχή του τραυματισμένου μυοκαρδίου [200].

Οι παραπάνω τεχνολογίες μπορούν να αποτελέσουν θεραπευτικά εργαλεία για το καρδιαγγειακό σύστημα, ωστόσο, υπάρχουν ακόμα προκλήσεις που μένει να ξεπεραστούν.

1.9.2 Θεραπείες βασισμένες σε βλαστικά κύτταρα

Οι θεραπείες που βασίζονται στη χρήση βλαστοκυττάρων είναι θεραπείες πολλά υποσχόμενες, και ενδεχομένως να μπορούν να συμβάλλουν στη δημιουργία νέου καρδιακού μυ και στη βελτίωση της λειτουργίας της καρδιάς έπειτα από παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Τα βλαστοκύτταρα που χρησιμοποιούνται στην προσπάθεια αναγέννησης της καρδιάς του ανθρώπου μπορεί να προέρχονται από διάφορες πηγές [42] (Εικόνα 1.12). Παρακάτω γίνεται μια σύντομη αναφορά σε αυτές τις διάφορες προσεγγίσεις της χρήσης των βλαστοκυττάρων για την αναγέννηση της καρδιάς:



Εικόνα 1.12: Τα είδη των θεραπειών που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα και οι θεραπείες που δεν βασίζονται σε βλαστοκύτταρα. Οι θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα περιλαμβάνουν τη μεταμόσχευση στην καρδιά CMs που έχουν προκύψει από ESCs ή iPSCs. Μέσω της έκφρασης των κατάλληλων TF, οι ινοβλάστες μπορούν να μετατραπούν απευθείας σε CMs ή σε CPCs χωρίς να περάσουν από ενδιάμεση κατάσταση πλειοδυναμίας. Διαφορετικά είδη καρδιακών και μη κυττάρων μπορούν να μεταμοσχευθούν. Οι θεραπείες που δεν βασίζονται σε βλαστοκύτταρα περιλαμβάνουν την χορήγηση χημικών στοιχείων ή γονιδίων μέσω ικών και μη ικών φορέων ή τροποποιημένων mRNAs που δρουν στα κύτταρα του ξενιστή και προάγουν την αναγέννηση της καρδιάς [25].

Βλαστικά κύτταρα υπάρχουν στο σώμα ενός ενήλικου ατόμου σε ιστούς εκτός της καρδιάς, όπως είναι τα πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών (Bone Marrow-derived Cells, BMCs), τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs). Η αξιοποίηση των BMCs αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος των κλινικών ερευνών για το MI. Σε προ-κλινικό επίπεδο, η μεταμόσχευση των hMSCs προερχόμενα από hBMCs που έγινε ενδομυοκαρδιακά, αύξησε την καρδιακή λειτουργία και την αγγειογένεση [141–142]. Βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό (Adipose-derived Stem Cells, ADSCs) ασθενών, καλλιεργούνται *in vitro* ταχύτερα από τα MSCs που προέρχονται από το μυελό των οστών [203]. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσοδερμικής σειράς, καρδιομυοκύτταρα Benard et al. 2003 και ενδοθηλιακά κύτταρα [144–145].

Πολλές μελέτες εστιάζουν το ενδιαφέρον τους στα CPCs που υπάρχουν φυσιολογικά στην ενήλικη καρδιά και ενδεχομένως να μπορούν να συμβάλλουν στην αναγέννησή της [42]. Η κλινική μελέτη SCIPIO ήταν η πρώτη κλινική μελέτη που διερεύνησε τις θεραπευτικές επιδράσεις των αυτόλογων CPCs (c-kit⁺) σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιοπάθεια [206]. Σε ασθενείς με την ίδια πάθηση και στα πλαίσια των κλινικών δοκιμών CADUCEUS και ALCADIA, έγινε μεταμόσχευση

CDCs μέσω της στεφανιαίας αρτηρίας με αποτέλεσμα τη μείωση της ινώδους ουλής της καρδιάς και τη βελτίωση της λειτουργίας της καρδιάς τοπικά. Άλλες τέτοιες κλινικές δοκιμές που στοχεύουν να διερευνήσουν την αναγεννητική ικανότητα των CDCs σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιομυοπάθεια είναι οι ALLSTAR, HOPE και DYNAMIC [147–148].

Η χρήση των hESCs και των παραγώγων τους, θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντική προοπτική στη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων, ωστόσο κάτι τέτοιο εγείρει ηθικά ζητήματα [209]. Διέξοδος στο πρόβλημα αυτό δόθηκε όταν το 2006 οι Takahashi και Yamanaka, έδειξαν ότι η χρήση 4 συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων οδηγεί στην αποδιαφοροποίηση των σωματικών κυττάρων και στη μετατροπή τους σε κύτταρα πλειοδύναμα, γνωστά ως επαγόμενα πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs). Τα κύτταρα αυτά έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με τα ESCs [56]. Με τα χρόνια, έχουν δημοσιευτεί πολλά πρωτόκολλα διαφοροποίησης των ESCs ή των iPSCs προς CMs [150–153]. Πρόκειται, λοιπόν, για μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία, εφόσον ξεπεραστούν τεχνικές δυσκολίες όπως είναι η μερική ωρίμανση των καρδιομυοκυττάρων, η ετερογένεια τέτοιων κυτταρικών πληθυσμών και η ανάγκη παραγωγής αυτών των κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα. Ένα ακόμα ζήτημα που προκύπτει σε τέτοιου είδους μεταμοσχεύσεις είναι η πρόκληση αρρυθμιών είτε από την ηλεκτρική αστάθεια μεταξύ μοσχεύματος και ξενιστή είτε από προσμίξεις στον πληθυσμό του μοσχεύματος. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, πρωτεΐνες όπως είναι η connexin-43 (Cx43) μέσω της οποίας δημιουργείται δίοδος επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, είναι αναγκαίες για την ηλεκτρομηχανική σύζευξη των κυττάρων του μοσχεύματος και των κυττάρων του ξενιστή. Μέσω της γενετικής μηχανικής μπορεί να εξασφαλιστεί η έκφραση τέτοιων πρωτεϊνών στα κύτταρα του μοσχεύματος [154–155].

Τα CPCs, ωστόσο, έχουν χαρακτηριστικά που μπορεί να είναι ευνοϊκότερα για την αναγέννηση του μυός της εμφραγματικής καρδιάς σε σχέση με τα μη ώριμα CMs. Πιο συγκεκριμένα, τα CPCs ως κύτταρα πολυδύναμα μπορούν να πολλαπλασιάζονται *in situ*, να μεταναστεύουν και να διαφοροποιούνται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους της καρδιάς, ενώ παράλληλα η θετική επίδρασή τους οφείλεται και στην απελευθέρωση παρακρινικών παραγόντων [156–159]. Οι Fernandes et al. σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη, σύγκριναν την επίδραση CPCs και καρδιομυοκυττάρων προερχόμενων από hESCs στην αναγέννηση καρδιάς αρουραίου που έχει υποστεί MI. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι και οι δύο αυτοί κυτταρικοί πληθυσμοί είχαν ευεργετικές επιδράσεις στην εμφραγματική καρδιά, δε φάνηκε όμως ο ένας να πλεονεκτεί του άλλου [219]. Περαιτέρω σχετικές μελέτες ενδεχομένως να δώσουν απάντηση για το αν τα CPCs είναι προτιμότερα για την αναγέννηση της καρδιάς σε σχέση με τα διαφοροποιημένα CM. Στα πλαίσια πρόσφατων κλινικών δοκιμών, έγινε μεταμόσχευση του πληθυσμού SSEA1⁺Isl1⁺ που προέκυψε από hESCs σε 6 ασθενείς με ισχαιμική καρδιομυοπάθεια και σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια. Οι ασθενείς έλαβαν μια μέτρια δόση των κυττάρων (8.2 εκατομμύρια κύτταρα) και μετά από ένα χρόνο εμφάνισαν μέτρια μείωση του όγκου της

αριστερής κοιλίας και αύξηση του όγκου του μοσχεύματος, ενώ δεν υπήρξε ένδειξη τερατώματος ή αρρυθμίας [220]. Παρά τα θετικά αποτελέσματα, μερικά ηθικά και τεχνικά εμπόδια, παραμένουν παρεμποδίζοντας τη χρήση των CPC για τη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων.

Μία άλλη προσέγγιση που εφαρμόζεται για τον ίδιο σκοπό, είναι ο απευθείας επαναπρογραμματισμός άλλων κυττάρων, όπως των ινοβλαστών προς κύτταρα που μοιάζουν με καρδιομυοκύτταρα (induced CMs), με τη χρήση ενός κοκτέιλ παραγόντων που επιδρούν στη μεταγραφή γονιδίων που θα οδηγήσουν στην μυοκαρδιακή διαφοροποίηση [161–162]. Ο επαναπρογραμματισμός άλλων σωματικών κυττάρων απευθείας σε άλλους κυτταρικούς τύπους χωρίς την ενδιάμεση κατάσταση των iPSC λέγεται και δια-διαφοροποίηση και είναι μια διαδικασία γρηγορότερη από την επαγωγή των iPSC, καθώς η πρώτη απαιτεί μερικές μέρες, ενώ η δεύτερη μπορεί να πάρει μέχρι και πάνω από 3 εβδομάδες. Ο επαναπρογραμματισμός των ινοβλαστών *in vitro* και *in vivo* επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός συνδυασμού από TFs, miRNAs, και χημικών μορίων που εντοπίζονται ειδικά στην καρδιά [222]. Μέχρι σήμερα, ο *in vivo* επαναπρογραμματισμός των ινοβλαστών έχει οδηγήσει σε κύτταρα που μοιάζουν με CMs, αλλά όχι σε αντιπροσωπευτικά CPCs [216].

Τέλος, μία ακόμα ενδιαφέρουσα προσέγγιση αποτελεί η μεταμόσχευση ενός συνδυασμού καρδιακών κυττάρων, όπως είναι τα CMs, τα vECs, τα SMCs και οι καρδιακοί ινοβλάστες (CFBs), η οποία αναμένεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα στην αναγέννηση της καρδιάς σε σχέση με την επιλογή ενός μόνο κυτταρικού τύπου [223]. Αυτή τη θεωρία ήρθε να ενισχύσει μία πρόσφατη μελέτη κατά την οποία η μεταμόσχευση του τριπλού πληθυσμού hPSC-CMs, ECs και SMCs βελτίωσε σημαντικά την καρδιακή λειτουργία και μείωσε το μέγεθος των ουλών μετά από MI σε καρδιά χοίρου. Τα hPSC-CMs ενσωματώθηκαν στο μυοκάρδιο του ξενιστή και τα ECs και SMCs συνεισέφεραν στο αγγειακό σύστημα [224].

1.9.3 Πρόδος για την απόκτηση CPC *in vitro*

Η χρήση των CPCs για την αποκατάσταση της καρδιακής λειτουργίας σε ασθενείς με καρδιακές παθήσεις φαίνεται να αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία, όπως έγινε κατανοητό και από τα παραπάνω. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, η ακριβής στοιχειομετρία και χωροχρονική δράση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων και ρυθμιστών της καρδιακής ανάπτυξης, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη δεν έχουν εξακριβωθεί πλήρως ακόμα και η αναπαραγωγή αυτών των συνθηκών *in vitro* αποτελεί μεγάλη πρόκληση. Σε αντίθεση με τα διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα, τα CPCs μπορούν να πολλαπλασιάζονται και θεωρητικά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους απαραίτητους κυτταρικούς τύπους της καρδιάς και να οδηγήσουν στην αποκατάσταση του ιστού. Αυτός είναι και ο λόγος που καταβάλλεται από πολλές ερευνητικές ομάδες προσπάθεια για την απόκτηση μεγάλου αριθμού CPCs *in vitro*. [45, 165–167]

Τα ESCs και τα iPSCs είναι κύτταρα πλειοδύναμα και μπορούν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα και των 3 βλαστικών στιβάδων, ενώ παράλληλα διατηρούν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται. Για το λόγο αυτό τέτοια κύτταρα χρησιμοποιούνται για την απόκτηση των CPCs ή των CM που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές μεταμοσχεύσεις. Σε ό,τι αφορά τα hESCs είναι πιο δύσκολο να αποκτηθούν, να διατηρηθούν και χρησιμοποιηθούν σε κλινικές δοκιμές λόγω ηθικών ζητημάτων. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται τα iPSCs, τα οποία ανοίγουν τον δρόμο για την αυτόλογη μεταμόσχευση επιλύοντας ταυτόχρονα το πρόβλημα της συμβατότητας και της ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς [228]

Τα περισσότερα πρωτόκολλα διαφοροποίησης προς CM βασίζονται στο σχηματισμό εμβρυοειδών σωμάτων (Embryoid Bodies, EBs), ωστόσο υπάρχουν και άλλα που χρησιμοποιούν την καλλιέργεια μονοστιβάδας (monolayer). Η επαγωγή του μεσοδέρματος στα EBs, είναι ένα στοχαστικό γεγονός που δημιουργεί έναν ανομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό από κύτταρα που ομοιάζουν CM, ο οποίος μάλιστα διαφέρει και από πρωτόκολλο σε πρωτόκολλο. Τα EBs όμως ενδεχομένως να πλεονεκτούν σε σχέση με τη χρήση της καλλιέργειας μονοστιβάδας, αφού πρόκειται για τη δημιουργία τρισδιάστατων ουσιαστικά δομών που προσομοιάζουν την ανάπτυξη του εμβρύου. Ο όρος “εμβρυοειδές σώματιο» είναι αποδεκτός όταν τα κύτταρα αφήνονται να διαφοροποιηθούν πλήρως σε αυτήν την τρισδιάστατη δομή [169–172].

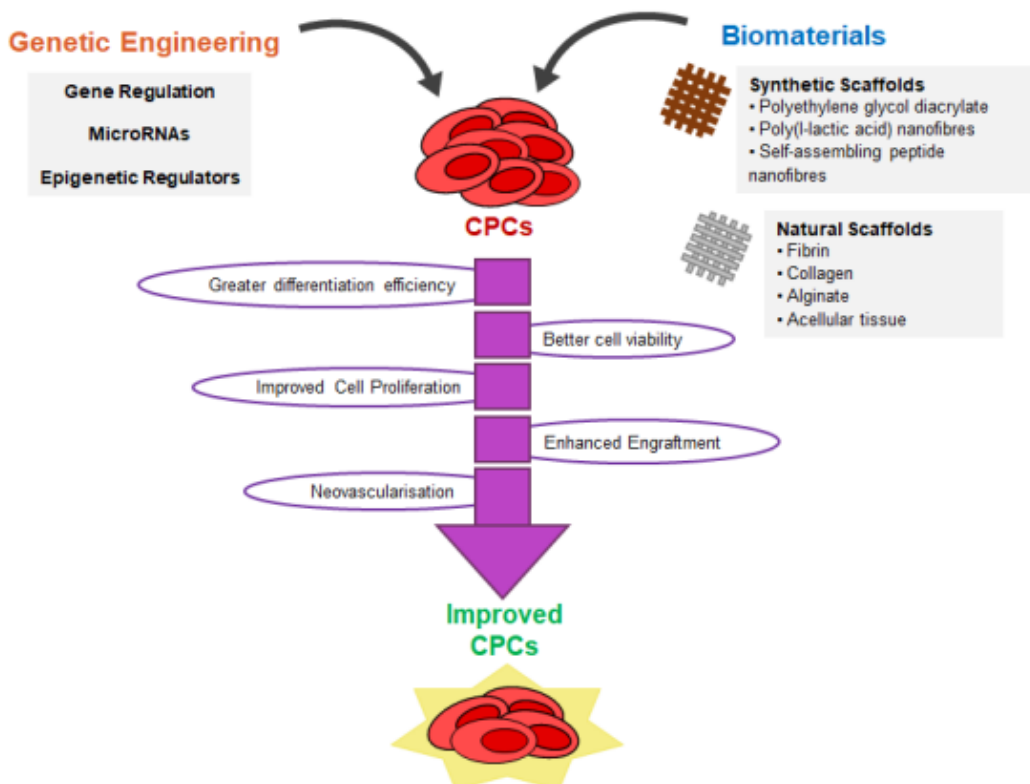
Ανεξάρτητα από το είδος της καλλιέργειας ή του πρωτοκόλλου που ακολουθείται, τα κύρια βήματα για την απόκτηση των CM ή ενός πρωιμότερου πληθυσμού CPC βασίζονται στην ίδια λογική. Είτε γίνεται λόγος για ESCs είτε για iPSCs, πρωταρχικό μέλημα είναι η διατήρηση της πλειοδυναμίας και της αυτοανανέωσης των κυττάρων αυτών. Αρχικά, η καλλιέργειά τους πάνω σε μία στρώση ινοβλαστών παρείχε στα κύτταρα αυτά αφενός μία επιφάνεια προσκόλλησης, αλλά κυρίως οι παράγοντες που εκκρίνονταν από τους ινοβλάστες ήταν ευνοϊκοί για την ανάπτυξη των ESCs. Αργότερα, έγινε γνωστό ότι ο εκκρινόμενος παράγοντας που ήταν υπεύθυνος για αυτή την προαγωγή της ανάπτυξης των ESCs είναι ο LIF (Leykaemia Inhibitor Factor) [173–174]. Ο LIF δρα ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) [234]. Πλέον, για τη διατήρηση των ιδιοτήτων των πλειοδύναμων βλαστικών κυττάρων γίνεται προσθήκη στην καλλιέργεια είτε του LIF είτε 2 μικρών μορίων-αναστολέων (2i), του CHIR που αναστέλλει την Gsk3 (Glycogen synthase kinase 3) και του PD03 που αναστέλλει την MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase). Η συνεργασιακή δράση του LIF και των 2 αναφερόμενων αναστολέων οδηγεί στο καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα [235]. Η CHIR αναστέλλει την δράση της Gsk3, μέσω της ενεργοποίησης του κανονικού Wnt/ β -catenin σηματοδοτικού μονοπατιού. Αυτή η ενεργοποίηση του Wnt μέσω του CHIR οδηγεί στην αναστολή της δράσης του Tcf3 (T-cell factor 3) που δρα καταστέλλοντας το γονιδιακό δίκτυο της πλειοδυναμίας, όπως προτάθηκε από τους Wray et al.[236]. Ωστόσο, μόνο η δράση του CHIR δεν είναι αρκετή, αλλά απαιτείται και η δράση του PD03, παράγοντας που ενισχύει την έκφραση του Nanog [237]. Στην περίπτωση των iPSCs, ανεξαρτήτως πρωτοκόλλου, το πρώτο βήμα είναι η αποδιαφοροποίηση του

επιλεγμένου κυτταρικού τύπου και η επαγωγή πλειοδυναμίας του κυττάρου με τους γνωστούς παράγοντες Yamanaka OCT4, SOX2, KLF4 και c-MYC. Μετά την επίτευξη της πλειοδυναμίας το ακόλουθο βήμα είναι η επαγωγή της καρδιακής διαφοροποίησης των iPSCs [238].

Πρώτος στόχος για τη διαφοροποίηση των ESCs ή των iPSCs προς κύτταρα καρδιομυογενικής σειράς, είναι η επαγωγή του μεσοδέρματος. Για το σκοπό αυτό, είναι απαραίτητο να γίνει η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της καρδιογένεσης, όπως τα BMPs, η ακτιβίνη A, οι ρυθμιστές WNT και οι παράγοντες FGF [165, 180]. Ο τύπος των μορίων και η χρονική στιγμή που προστίθενται οι διάφοροι παράγοντες, διαφέρουν από πρωτόκολλο σε πρωτόκολλο επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητα της διαφοροποίησης προς CMs και την ομοιογένεια ενός πληθυσμού CPCs. Μάλιστα, η ακτιβίνη A (Activin A), οι BMP2/4 και ο παράγοντας FGF2 επάγουν το σχηματισμό του καρδιακού μεσοδέρματος σε πολλά πρωτοκόλλα διαφοροποίησης [153, 170, 181–182]. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της δια-διαφοροποίησης CPCs μπορούν να δημιουργηθούν απευθείας από ινοβλάστες ενήλικου ποντικού που έχουν προέλθει από διάφορους ιστούς (καρδιά, πνεύμονας, ουρά) με τη χρήση ενός πρωτοκόλλου επαναπρογραμματισμού που μπορεί να περιλαμβάνει 11 παράγοντες (MESP1, MESP2, GATA4, GATA6, BAF60C, SRF, ISL1, NKX2.5, IRX4, TBX5 and TBX20) ή μόνο 5 παράγοντες (MEF2C, TBX5, GATA4 NKX2.5, BAF60C) [216]. Η απομόνωση των CPCs συνήθως βασίζεται στους δείκτες επιφάνειας που χαρακτηρίζουν αυτούς τους πληθυσμούς και στο προφίλ της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα τα γονίδια ISL1 και NKX2.5 χρησιμοποιούνται συχνά για την απομόνωση των CPCs [242]. Το ίδιο ισχύει και για το FLK1, που συχνά συνδυάζεται με τον PDGFR α . Ακόμα, οι Nelson et al. το 2008 χρησιμοποίησαν του δείκτες CXCR4 και FLK1 για να απομονώσουν ένα μέρος των CPCs, από έναν ετερογενή FLK1⁺ πληθυσμό [243].

Τέλος, η διαφοροποίηση των CPCs παρουσιάζει διαφορετική δυναμική *in vitro* και *in vivo*, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μικροπεριβάλλον της καρδιάς παίζει σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες των CPCs [244]. Έτσι, ένας τρόπος που μπορεί να συμβάλλει ενδεχομένως στην ενίσχυση της αναγεννητικής ικανότητας των CPCs είναι η μίμηση αυτού του μικροπεριβάλλοντος. Για το σκοπό αυτό, κατά τη διαφοροποίηση προς CPCs συνδυάζονται διάφορα στοιχεία που συναντώνται στο μικροπεριβάλλον ανάπτυξης της καρδιάς, όπως εξωκυττάρια ουσίες και βιοχημικοί παράγοντες όπως οι BMP2, VEGF, bFGF, DKK1, και IGF1. Είναι κατανοητό, λοιπόν, ότι η εύρεση του κατάλληλου υποστρώματος για τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς CPCs είναι υψίστης σημασίας. Τέτοια υποστρώματα πρέπει να είναι βιοδιασπώμενα, να μην οδηγούν σε ανοσολογική απόκριση, να έχουν ηλεκτρικές ή χημικές ιδιότητες που θα συμβάλουν στη σύζευξη των κυττάρων, και να προάγουν την αγγειοποίηση [186–187]. Τα υποστρώματα αυτά μπορεί να είναι υδροτζελ που αποτελούνται από υλικά που υπάρχουν φυσικά στην εξωκυττάρια ουσία όπως είναι η ζελατίνη (gelatin), η λαμινίνη, η φιβρίνη (fibrin), η alginate και το κολλαγόνο. Συγκεκριμένα η gelatin είναι ένα από τα πιο δημοφιλή υποστρώματα και χρησιμοποιείται για τον

πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ESCs [247]. Τα ικρίωματα, ωστόσο, μπορεί να είναι και συνθετικά. Ένα ιδανικό συνθετικό ικρίωμα πρέπει να είναι διασπώμενο, συμβατό, να διαθέτει μια επιφάνεια που θα επιτρέπει την προσκόλληση, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων και να έχει μια μακροδομή που θα υποστηρίζει την ανταλλαγή θρεπτικών και των απεκκρίσεων του κυττάρου. Περιορισμοί των συνθετικών υποστρωμάτων αποτελούν η βιοσυμβατότητα και η τοξικότητα (Εικόνα 1.13) [248].



Εικόνα 1.13: Στρατηγικές ενίσχυσης των ιδιοτήτων και της λειτουργικότητας των CPCs [249].

Όπως είπαμε και παραπάνω, τα CPCs ενδεχομένως να έχουν μεγαλύτερη αναγεννητική ικανότητα σε σχέση με τα διαφοροποιημένα CMs. Ένα μεγάλο κεφάλαιο, λοιπόν, αποτελεί η διατήρηση των CPCs στο στάδιο αυτό, αποτρέποντας την περαιτέρω διαφοροποίησή τους. Η διατήρηση της συγκέντρωσης της β-κατενίνης φαίνεται να αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο για την *in vitro* διατήρηση των CPCs [190–191]. Οι GSK3 αναστολείς, όπως είναι οι WNT3A και CHIR, προωθούν την εξάπλωση των CPCs και καταστέλλουν την περαιτέρω διαφοροποίησή τους. Το αποτέλεσμα είναι η απόκτηση ενός σχετικά ομοιογενούς πληθυσμού CPCs [251]. Άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η αναστολή του BMP μονοπατιού ενισχύει επίσης την εξάπλωση των CPCs αποτρέποντας τη διαφοροποίησή τους [183, 192]. Πιο συγκεκριμένα, ο αναστολέας του BMP Gremlin 2 (GREM2), ο οποίος εκφράζεται κατά την εξειδίκευση του καρδιακού μεσοδέρματος στα NKX2.5⁺ κύτταρα, προωθεί τον πολλαπλασιασμό CPCs προερχόμενων από iPSCs, καταστέλλοντας την ενεργότητα του υποδοχέα BMP4 [253]. Τα CPCs που προέρχονται από απευθείας επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων φαίνεται να έχουν παρόμοιες απαιτήσεις για

την εξάπλωση και τη διατήρησή τους. Συνοψίζοντας, η απόκτηση και η διατήρηση των CPCs, βασίζεται κυρίως στην σωστή χρονικά ενεργοποίηση και αναστολή πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών. Επομένως, η απόκτηση μεγάλου αριθμού CPCs που θα διατηρεί ταυτόχρονα την πολυδυναμία του και την ιδιότητα του να αυτοανανεώνεται, παραμένει μεγάλη πρόκληση ακόμα και σήμερα [183, 194–196].

1.9.3.1 Περιορισμοί στη χρήση των CPCs ως μέσο θεραπείας

Η συζήτηση για το κατά πόσο τα CPCs θα παίξουν ουσιαστικό ρόλο και θα αποτελέσουν μέρος της θεραπείας των καρδιακών παθήσεων είναι μεγάλη και αυτό γιατί η συνεισφορά και το αντίκτυπο των κυττάρων αυτών στην αναγέννηση της καρδιάς, δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμη. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ετερογένεια τέτοιων πληθυσμών και στην πολυπλοκότητα της φύσης των μηχανισμών που σχετίζονται με τις καρδιομυοπάθειες [249]. Σε αυτή την ενότητα αναφέρονται μερικοί από τους βασικούς περιορισμούς που συνηγορούν στη δυσκολία χρήσης τέτοιων κυττάρων.

Κύριος προβληματισμός αποτελεί το γεγονός ότι ακόμα και σήμερα δεν έχει εξακριβωθεί ποιος θα ήταν ένας ιδανικός CPC πληθυσμός που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε τέτοιες θεραπείες, καθώς δεν υπάρχουν δείκτες που να χαρακτηρίζουν με ακρίβεια έναν τέτοιο πληθυσμό. Το επιγενετικό τοπίο, όπως επίσης και το γονιδιακό, πρωτεϊνικό και εκκριτικό προφίλ των περισσότερων CPCs δεν είναι ξεκάθαρο [257]. Γι' αυτό οι πληθυσμοί των CPCs που προκύπτουν αποτελούνται από κύτταρα ετερογενή, λιγότερο ή περισσότερο ώριμα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αρρυθμίες και σε μικρό βαθμό ενσωμάτωσης στον ιστό του ξενιστή μετά τη μεταμόσχευση [258]. Επιπλέον, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να έχουν συγκρίνει τη θεραπευτική δράση διαφορετικών CPC πληθυσμών. Θεωρητικά ο ιδανικός πληθυσμός θα πρέπει να είναι ανθεκτικός σε αυτόλογες μεταμοσχεύσεις, να μπορεί να πολλαπλασιάζεται εκτενώς *in vitro*, να διαφοροποιείται σε όλους τους ώριμους κυτταρικούς τύπους της καρδιάς και να ενσωματώνεται στα κύτταρα του ξενιστή.

Ένα άλλο ζήτημα αποτελεί η χρήση των ιών στην περίπτωση των iPSCs, για την καλύτερη απόδοση της μεταγωγής *in vitro* και *in vivo*, καθώς σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ενεργοποίησης των ογκογονιδίων λόγω ενσωμάτωσης του ιού στο γονιδίωμα των κυττάρων. Επιπλέον, το κόστος τόσο του επαναπρογραμματισμού όσο και των αυξητικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στα υπάρχοντα πρωτόκολλα είναι αρκετά υψηλό. Είναι επιτακτική ανάγκη λοιπόν, η ανάπτυξη μεθόδων ασφαλέστερων σε ό,τι αφορά την γονιδιακή μεταφορά, καθώς και με χαμηλότερο κόστος [25].

Πολλές έρευνες πραγματοποιούνται σε μοντέλα τρωκτικών με συνέπεια τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών, να μην ανταποκρίνονται στη φυσιολογία και την ανατομία της καρδιάς του ανθρώπου. Για παράδειγμα, το πρωτόκολλο του απευθείας επαναπρογραμματισμού περιλαμβάνει τη χορήγηση 3 κύριων καρδιακών γονιδίων, GATA4, MEF2C και TBX5 (γνωστά και

ως GMT), ικανών να επάγουν τη διαφοροποίηση ινοβλαστών που προέρχονται από το ποντίκι σε καρδιακά κύτταρα, κάτι που δε συνέβη με τους ανθρώπινους ινοβλάστες [259]. Τέλος, στα πλαίσια διαφόρων μελετών, τα μόρια ή κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως μόσχευμα συχνά ενίονται απευθείας στην καρδιά με εγχείριση ανοιχτής καρδιάς. Αυτή η μέθοδος είναι αρκετά παρεμβατική και θα μπορούσε να προκαλέσει επιπλέον τραυματισμό και πόνο στους ασθενείς. Ωστόσο, κατά τη χρήση λιγότερο επίπονων μεθόδων, όπως είναι η ένεση των κυττάρων μέσω της στεφανιαίας αρτηρίας, οδηγεί στον εγκλωβισμό αυτών των κυττάρων σε άλλα όργανα [260].

Οι παραπάνω δυσκολίες οφείλονται κατά ένα βαθμό, στην ελλιπή κατανόηση των αναπτυξιακών διαδικασιών της καρδιάς, καθώς και της επίδρασης των επιγενετικών μηχανισμών και διαδικασιών της αναγέννησης της καρδιάς. Στο μέλλον, η νεοαποκτηθείσα γνώση ενδεχομένως να δώσει λύση στα παραπάνω προβλήματα και να οδηγήσει στη βελτιστοποίηση των συνθηκών για την απόκτηση ομοιογενών, καθαρών και ώριμων κυτταρικών πληθυσμών από τα CPCs.

1.10 Το ψάρι ζέβρα (zebrafish) ως πειραματικό μοντέλο

1.10.1 Γεωγραφική εξάπλωση, ενδιαίτημα και μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το zebrafish (*Danio rerio*) αποτελεί ένα από τα κύρια μοντέλα που χρησιμοποιείται σε μελέτες μοριακής γενετικής, αναπτυξιακής βιολογίας, τοξικολογικές και φαρμακολογικές αναλύσεις, καθώς και σε μελέτες σχετικές με τον καρκίνο. Το zebrafish χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως μοντέλο της βιολογίας από τον George Streisinger (Πανεπιστήμιο του Oregon) το 1970 λόγω του ότι ήταν οργανισμός απλούστερος από το ποντίκι και παρείχε ευκολία στους γενετικούς χειρισμούς. Οι συνάδελφοι του Streisinger, και ιδίως ο Chuck Kimmel, εντυπωσιάστηκαν από αυτή την ιδέα και τη δυνατότητα χρήσης του zebrafish για τη μελέτη του νευρικού συστήματος. Η χρήση του zebrafish ως οργανισμό μοντέλο απέκτησε πολύ μεγαλύτερη απήχηση όταν το 1990 δημιουργήθηκαν δύο γενετικά μοντέλα (mutants) μεγάλης σημασίας, το ένα από τη νομπελίστα Christiane Nusslein-Volhard στο Τύμπιγκεν της Γερμανίας, και το άλλο από τους Wolfgang Driever και Mark Fishman στη Βοστώνη των Η.Π.Α. [261]

Το είδος *Danio rerio* ανήκει στην κλάση των Ακτινοπτερυγίων και στην οικογένεια των Κυπρινοειδών [262] Βασικό μορφολογικό χαρακτηριστικό του zebrafish αποτελεί η εναλλαγή σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων οριζόντιων λωρίδων που βρίσκονται στο πλευρικό τμήμα του σώματος και επεκτείνονται από την κεφαλή έως το ουραίο πτερύγιο (Εικόνα 1.10). Το μοτίβο αυτό είναι αποτέλεσμα τριών τύπου χρωματοφόρων κυττάρων: i) των μελανοφόρων, που δημιουργούν τις 5-7 σκουρόχρωμες μπλε λωρίδες, ii) των ξανθοφόρων, που οφείλουν το χρώμα τους στα καροτινοειδή, και iii) των ιριδοφόρων, που προσδίδουν την ιριδίζοντα όψη στο ψάρι [263]. Το μήκος του σώματος του ενήλικου ατόμου κυμαίνεται από 30mm έως 40mm κατά μέσο όρο, ενώ σύμφωνα με κάποιους ερευνητές μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 6cm ολικό μήκος [264]. Τα ενήλικα άτομα εμφανίζουν φυλετικό διμορφισμό. Τα αρσενικά άτομα έχουν πιο

ατρακτοειδές σώμα, και κίτρινο χρώμα ανάμεσα στις ρίγες, ενώ τα θηλυκά έχουν μεγαλύτερη υπόλευκη κοιλιά με ασημένιες αντί για χρυσαφένιες λωρίδες και κίτρινο ραχιαίο πτερύγιο (Εικόνα 1.10) [265].

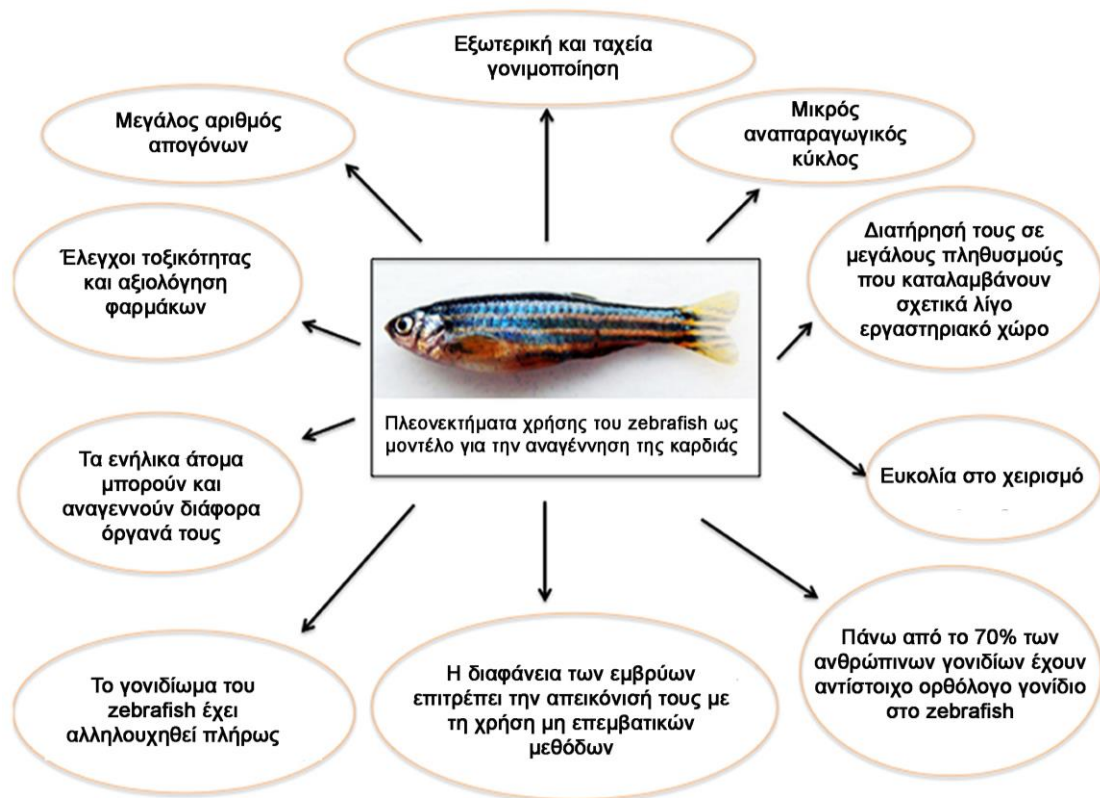


Εικόνα 1.14: Απεικόνιση θηλυκού (πάνω) και αρσενικού (κάτω) ενήλικου ατόμου zebrafish .

Είναι ψάρι τροπικό των γλυκών νερών, περιγράφηκε για πρώτη φορά στο ποταμό Γάγγη στα Ιμαλάια της νότιας Ασίας και αποτελεί γηγενής πληθυσμός στις χώρες Μπαγκλαντές, Μπουτάν, Πακιστάν Ινδία, Μυανμάρ και Νεπάλ [266]. Ως αλλόχθονο είδος το συναντάμε στις Κολομβία, Ιαπωνία, Σρι Λάνκα και στην Αμερική στην Καλιφόρνια, το Κονέκτικατ, τη Φλόριντα και το Νέο Μεξικό. Συνήθως συναντάται σε λίμνες ή στάσιμα νερά, σε ρυάκια και ποτάμια του γλυκού νερού και γενικώς σε υδάτινα ρεύματα με ταχύτητα 0m/sec-0.1m/sec [257–258] Επιπλέον, στα φυσικά οικοσυστήματα στα οποία επιβιώνουν τα zebrafish η θερμοκρασία του νερού κυμαίνεται από 25°C έως 38.6 °C, το pH 5.9-8.1 και η αλατότητα 0.01-0.8.[269]. Η μέση διάρκεια ζωής ενός ατόμου zebrafish υπολογίζεται στο ένα έτος στη φύση, ενώ σε αιχμαλωσία ζει περίπου δύο με τρία χρόνια και κάτω από ιδανικές συνθήκες φτάνει μέχρι και τα 5 [270].

1.10.2 Πλεονεκτήματα χρήσης του zebrafish στην επιστημονική έρευνα

Το zebrafish ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ως οργανισμός μοντέλο στην αναπτυξιακή βιολογία, κυρίως επειδή θεωρήθηκε σπονδυλωτό εύκολο στους γενετικούς χειρισμούς. Αυτό και μερικά ακόμα χαρακτηριστικά καθιστούν το zebrafish ιδανικό μοντέλο σε πολλούς τομείς (Εικόνα 1.15):



Εικόνα 1.15: Η σημασία του zebrafish ως μοντέλο για την αναγέννηση της καρδιάς [271].

- Τα ενήλικα άτομα έχουν μικρό μέγεθος και έτσι μεγάλοι πληθυσμοί διατηρούνται σε ενυδρεία εξοπλισμένα με συστήματα ανακύκλωσης γλυκού νερού, τα οποία αποτελούνται από πολλές μικρές δεξαμενές που επιτρέπουν την απομόνωση και την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών στελεχών [272].
- Το κόστος συντήρησης μιας μονάδας zebrafish είναι πολύ χαμηλότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο κόστος για μια μονάδα θηλαστικών. Οι διατροφικές απαιτήσεις των ιχθύων και οι απαιτήσεις της συντήρησης μιας εγκατάστασης γλυκού νερού είναι αυτές που καθορίζουν το σχετικά χαμηλό οικονομικό κόστος [273].
- Τα ζώα αυτά είναι σεξουαλικά ώριμα και ικανά για αναπαραγωγή από την ηλικία των 3-4 μηνών. Μάλιστα, κάτω από ιδανικές συνθήκες μπορούν να δώσουν εκατοντάδες αυγά ανά μία εβδομάδα, επιτρέποντας έτσι την ανάλυση γενετικών, στατιστικά σημαντικών, δεδομένων [274].
- Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η εξωτερική γονιμοποίηση και η ανάπτυξη των πολυάριθμων εμβρύων εκτός του σώματος του θηλυκού ατόμου. Τα έμβρυα που προκύπτουν είναι διάφανα κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη γονιμοποίησή τους, γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικό πειραματικό υλικό αφού επιτρέπει την παρατήρηση της συμπεριφοράς των κυττάρων in vivo. Το χαρακτηριστικό αυτό λοιπόν, σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα ποικίλων διαγονιδιακών σειρών, ενθαρρύνουν τη χρήση μη επεμβατικών μεθόδων, όπως η ζωντανή απεικόνιση (live imaging) δυναμικών φαινομένων του εμβρύου.

Ακόμα, τα όργανα του εμβρύου διαθέτουν μικρό μέγεθος με αποτέλεσμα να μπορούν να παρατηρηθούν ολόκληρα με τεχνικές μικροσκοπίας και με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού να επιτευχθεί η τρισδιάστατη απεικόνισή τους [275].

- Το του zebrafish παρουσιάζει πολλές φυσιολογικές και γενετικές ομοιότητες με τον άνθρωπο, σε όργανα και συστήματα όπως είναι ο εγκέφαλος, το πεπτικό, το μυϊκό, το καρδιαγγειακό και το εγγενές ανοσολογικό σύστημα. Για το λόγο αυτό, συχνή είναι η μελέτη της επίδρασης διαφόρων χημικών μορίων στα συστήματα και τα όργανα του εμβρύου (chemical genetic screen). Το γονιδίωμά του έχει αποκρυπτογραφηθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό του και εμφανίζει υψηλή ομολογία με το ανθρώπινο γονιδίωμα, καθιστώντας το zebrafish ιδανικό μοντέλο για την μελέτη ανθρώπινων ασθενειών με γενετικό υπόβαθρο (Postlethwait et al., 1998). Μάλιστα, πάνω από το 70% των ανθρώπινων γονιδίων έχουν αντίστοιχα ορθόλογα στο zebrafish, με αντίστοιχη σημαντική ομολογία και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η δυνατότητα πραγματοποίησης στοχευμένων μεταλλαγών στα γονίδια αυτά, έχει οδηγήσει στην δημιουργία in vivo μοντέλων κατάλληλων για την μελέτη των αντίστοιχων ανθρώπινων ασθενειών [276]
- Η χρήση του zebrafish είναι ευρέως διαδεδομένη λόγω της ευκολίας εφαρμογής ποικίλων γενετικών χειρισμών για την ταυτοποίηση νέων μηχανισμών και την μελέτη λειτουργίας γνωστών ή άγνωστων γονιδίων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται σε μελέτες πρόσθιας (forward) και ανάστροφης γενετικής (reverse). Σε ό,τι αφορά την πρόσθια γενετική, Πολλά αναπτυξιακά μεταλλάγματα έχουν απομονωθεί από πειράματα διαλογής μεταλλαξιγένεσης. Το πιο συνηθισμένο πρωτόκολλο περιλαμβάνει την ταυτοποίηση υπολειπόμενων μεταλλαγών, συχνά θνησιγόνων με διασταυρώσεις τριών γενεών. Οι μεταλλαγές επάγονται τυχαία με τη βοήθεια ενός μεταλλαξογόνου χημικού παράγοντα, όπως είναι η N-αιθυλ-N-νιτροζουρία (ENU). Με την ύπαρξη πολυάριθμων απογόνων, μπορεί να γίνει ανίχνευση ενδιαφερόντων φαινοτύπων κατόπιν της μεταλλαξιγένεσης [277].
- Σε ό,τι αφορά την ανάστροφη γενετική, πέρα από τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων, αρκετά δημοφιλής και αποτελεσματική για την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (knockdown) είναι η χρήση των αντισημαινόντων ολιγονουκλεοτιδίων (~25bp) μορφολίνης (morpholinos). Τα μόρια αυτά ενίενται σε γονιμοποιημένα αυγά ή βλαστομερίδια κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης, η επίδρασή τους διαρκεί για 48 ώρες και δρουν παρεμποδίζοντας την μετάφραση του mRNA που κωδικοποιείται από το γονίδιο-στόχο. Λόγω των πολλών γονιμοποιημένων αυγών που λαμβάνονται από μία διασταύρωση, μπορεί μέσα σε λίγες ώρες να επιτευχθεί μικροένεση σε εκατοντάδες γονιμοποιημένα ωάρια, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο αρκετό υλικό προς μελέτη της λειτουργίας του εν λόγω γονιδίου [275].
- Τέλος, τα πλεονεκτήματα αυτά σχετίζονται κυρίως με το αναπτυξιακό πρότυπο του zebrafish, το οποίο λαμβάνει χώρα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η γαστριδίωση ολοκληρώνεται 10 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, η ανάπτυξη και ο σχηματισμός των πρώτων οργάνων

ολοκληρώνεται μέσα στις πρώτες πέντε μέρες μετά την γονιμοποίηση και ο κύκλος ζωής του είδους είναι γενικά ταχύς [275].

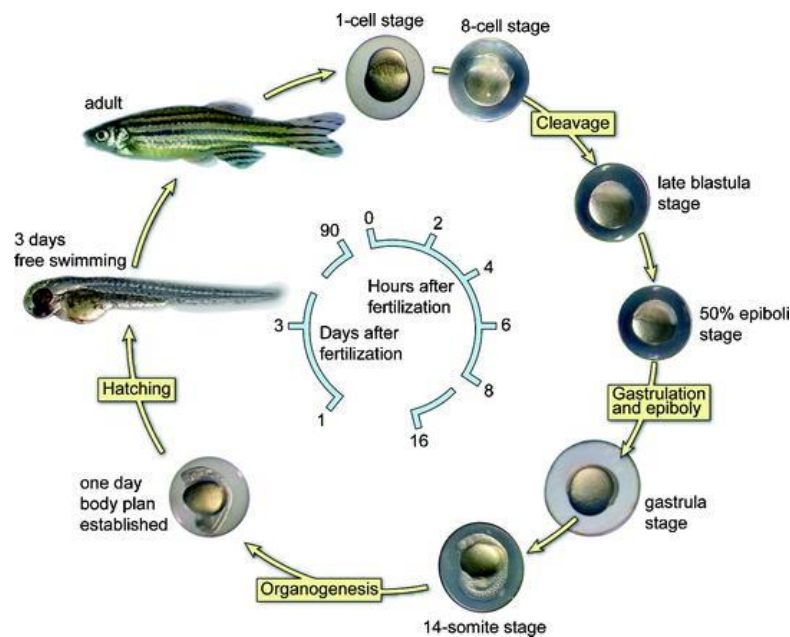
1.10.3 Αναπαραγωγή και εμβρυϊκή ανάπτυξη

Όπως και στα υπόλοιπα σπονδυλωτά, τα ωοκύτταρα παράγονται από ωογόνια καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Η ωογένεση εξαρτάται από την έκθεση των θηλυκών στις αρσενικές φερομόνες που διαχέονται στο νερό και γίνονται αντιληπτές από το οσφρητικό επιθήλιο των θηλυκών [278]. Η αναπαραγωγική συμπεριφορά του zebrafish επηρεάζεται επίσης σημαντικά από την ποσότητα της διαθέσιμης τροφής και την φωτοπερίοδο.

Η αναπαραγωγή του πραγματοποιείται με εξωτερική γονιμοποίηση. Τα εργαστηριακά στελέχη του zebrafish αναπαράγονται όλο το χρόνο, στη φύση όμως τα ενήλικα άτομα αναπαράγονται κυρίως τους θερινούς μήνες. Η αναπαραγωγή φαίνεται να συμβαίνει κατά την διάρκεια της ημέρας. Τα θηλυκά μπορούν να γεννήσουν εκατοντάδες αυγά μαζί ή λιγότερα κάθε λίγες μέρες. Η θερμοκρασία επηρεάζει άμεσα τον καθορισμό του φύλου στο zebrafish με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες να ευνοούν τα θηλυκά, και τις υψηλότερες τα αρσενικά [279]. Στη φύση, τα θηλυκά έχουν την τάση να γεννούν τα αυγά τους σε ρηχά νερά. Τα αυγά είναι διαφανή και έχουν διάμετρο περίπου 0.7 mm [269].

➤ Εμβρυϊκή ανάπτυξη

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη του zebrafish είναι ταχεία. Στις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hours post fertilization, hpf) σχηματίζονται όλα τα κύρια όργανα και μέσα στις 3 πρώτες ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (days post fertilization, dpf), τα έμβρυα εκκολάπτονται και αρχίζουν την αναζήτηση τροφής. Ο κύκλος ζωής του είδους διαρκεί συνολικά 12 εβδομάδες. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη διακρίνονται τα εξής στάδια: ο ζυγώτης (zygote), η περίοδος των αυλακώσεων (cleavage), το βλαστίδιο (blastula), το γαστρίδιο (gastrula), η περίοδος της κατάτμησης (segmentation), η φαρυγγική περίοδος (pharyngula), η περίοδος εκκόλαψης (hatching period) και η περίοδος της πρώιμης προνύμφης (early larva) (Εικόνα 1.16) [280].



Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση των εμβρυϊκών αναπτυξιακών σταδίων του zebrafish [281].

Η σύντηξη των προπυρήνων λαμβάνει χώρα 17 λεπτά περίπου μετά τη γονιμοποίηση, ενώ η πρώτη αυλάκωση περίπου 40 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση. Η αυλάκωση είναι μεροβλαστική, καθώς επιτελείται μόνο στην περιοχή του ζωικού πόλου. Εάν σε αυτό το στάδιο τα βλαστομερίδια είναι διαφανή και συμμετρικά το αυγό είναι γονιμοποιημένο. Μετά την πρώτη αυλάκωση τα βλαστομερίδια διαιρούνται ανά 15 λεπτά περίπου [280]. Μία ώρα μετά τη γονιμοποίηση το έμβryo βρίσκεται στο στάδιο των 4 κυττάρων. Οι συνεχόμενες αυλακώσεις μεταμορφώνουν το ζυγωτό σε μία συμπαγή μάζα κυττάρων που ονομάζεται μορίδιο (morula). Οι αυλακώσεις συνεχίζονται με συγχρονισμένο τρόπο έως ότου μετά από εννέα διαιρέσεις να λάβει χώρα η μετάβαση μεροβλαστιδίου (MBT, Mid-blastula Transition). Κατά τη μετάβαση μεροβλαστιδίου, τα εξωτερικά βλαστομερίδια που φέρουν κυτταροπλασματικές συνδέσεις με το λεκιθικό κύτταρο, βυθίζονται στο λεκιθικό κύτταρο σχηματίζοντας ένα πολυπύρρνο συγκύτιο το οποίο ονομάζεται λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα (Yolk Syncytial Layer, YSL). Στο στάδιο των 128 κυττάρων αρχίζουν οι κυτταρικές ανακατατάξεις και το έμβryo είναι πια στο στάδιο του βλαστιδίου (blastula) (Εικόνα 1.16) [282].

Κατά τη γαστριδίωση διακρίνονται τρεις κύριες μορφογενετικές διαδικασίες: η επιβολή (epiboly), η αναδίπλωση (involution) και η συγκλίνουσα επέκταση (convergent extension). Λίγο μετά την MBT, το βλαστόδερμα υφίσταται ενεργή επέκταση, η οποία ονομάζεται επιβολή. Στο zebrafish ο όρος γαστριδίωση χρησιμοποιείται για να περιγράψει μόνο την κίνηση αναδίπλωσης του μεσοδέρματος που είναι διακριτή από την επιβολή. Οι διαδοχικές διαιρέσεις συγκλίνουν και επεκτείνουν τα κύτταρα ώστε να δημιουργηθεί η τυπική δομή ενός τριπλοβλαστικού οργανισμού, που διαθέτει τρεις στιβάδες: το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα. Στο στάδιο αυτό, έχει επέλθει η 100% επιβολή οπότε το λεκιθικό κύτταρο καλύπτεται πλήρως από το βλαστόδερμα και ολοκληρώνεται η εγκατάσταση του ραχοκοιλιακού άξονα (Εικόνα 1.10) [283].

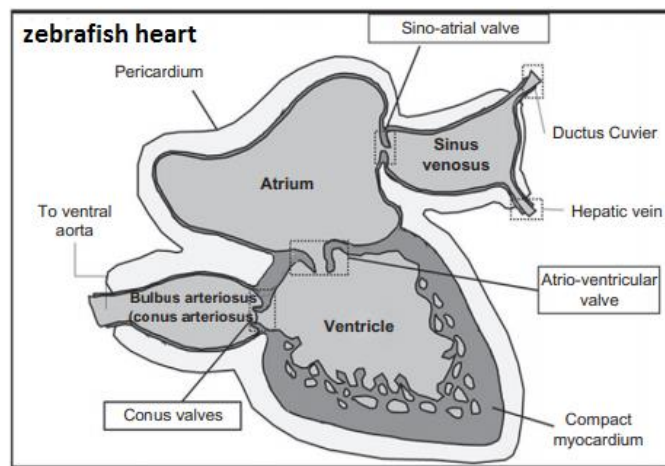
Μετά την ολοκλήρωση των 10 hpf, ξεκινάει ο σχηματισμός των σωματιών, των πρώιμων φαρυγγικών τόξων και η ανάπτυξη των νευρομερών (νευριδίωση) που ολοκληρώνονται μέχρι τις 24 hpf. Η ευθυγράμμιση του άξονα, και κατ' επέκταση η ευθυγράμμιση του σώματος του εμβρύου, η ανάπτυξη πτερυγίων και μελανοκυττάρων στην επιφάνεια του δέρματος, και η έναρξη της κυκλοφοριακής ροής αίματος είναι τα σημαντικότερα γεγονότα της φαρυγγικής περιόδου (24hpf-48hpf).

Συνήθως, τα έμβρυα εκκολάπτονται στους 28.5°C, περίπου στις 48-72 hpf και το μήκος τους είναι περίπου 3mm. Τα εκκολαπτόμενα έμβρυα, εκκρίνουν μικρά κύτταρα στην επιδερμίδα της κεφαλής τους, τα οποία εξυπηρετούν στην προσκόλληση τους σε σκληρές επιφάνειες [284]. Η νηκτική κύστη της πρώιμης προνύμφης μετά τις 72hpf διογκώνεται, η προνύμφη κολυμπάει ενεργά και εφόσον αποκτήσει λειτουργικούς σιαγόνες στόματος και ο λεκιθικός σάκος μειωθεί, ξενικά η αναζήτηση της τροφής. Τα νέα ψάρια φτάνουν σε αναπαραγωγική ηλικία στους 3-4 μήνες [280].

1.10.4 Η ανάπτυξη της καρδιάς στο zebrafish

Στο zebrafish, όπως και στα θηλαστικά, η καρδιά είναι το πρώτο όργανο που ξεκινάει να λειτουργεί στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, μόλις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η καρδιά ενός ενήλικου ατόμου zebrafish εντοπίζεται στον περικαρδιακό σάκο, στο εμπρόσθιο τμήμα του κορμού και αποτελείται από την εξωτερική μυϊκή στιβάδα του μυοκαρδίου και το ενδοκάρδιο, μια εσωτερική σπογγώδη στιβάδα. Τα δύο αυτά κυτταρικά στρώματα διαχωρίζονται από ένα εκτενές εξωκυτταρικό στρώμα θεμέλιας ουσίας που ονομάζεται καρδιακή γέλη [285]. Το μυοκάρδιο του zebrafish αποτελείται από μία εσωτερική σπογγώδη στιβάδα (trabecular), και τη στιβάδα του συμπαγούς (compact) μυοκαρδίου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους στιβάδες: μία λεπτή αρχέγονη στιβάδα (primordial) που βρίσκεται κεντρικά μετά τη σπογγώδη και μία εξωτερική στιβάδα (compact) [286].

Η καρδιά του zebrafish αποτελείται από έναν κόλπο και μία κοιλία, καθώς και από δύο ακόμα κοιλότητες, τον αρτηριακό βολβό (bulbus arteriosus) και τον φλεβώδη κόλπο (sinus venosus). Ο φλεβώδης κόλπος βρίσκεται στο σημείο εισόδου του μη-οξυγονωμένου αίματος και αποτελείται κυρίως από συνδετικό ιστό. Συνδέεται με τον καρδιακό κόλπο μέσω του σωλήνα Cuvier (Cuvier duct), ένα ζεύγος αγγείων ομόλογο με την άνω και κάτω κοίλη φλέβα των ανώτερων σπονδυλωτών. Στην προέκταση του σωλήνα Cuvier βρίσκεται η φλεβοκολπική βαλβίδα (sinoatrial valve, SA valve), μέσω της οποίας το αίμα εισέρχεται στον κόλπο της καρδιάς. Το αίμα ωθείται από τον κόλπο στην κοιλία μέσω της κολποκοιλιακής βαλβίδας (atrioventricular valve – AV valve), μέσω της αορτικής βαλβίδας (bulbus ventricular valve, BV valve) περνά από την κοιλία στον αρτηριακό βολβό (bulbus arteriosus), και τέλος, μέσω αυτού διανέμεται στα βράγχια (Εικόνα 1,17) [262, 277].



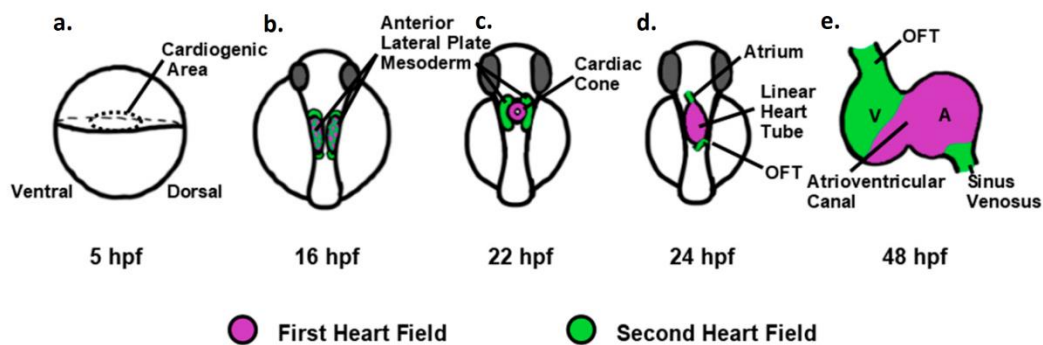
Εικόνα 1.17: Η ανατομία της καρδιάς στο ψάρι ζέβρα [288].

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η καρδιά του zebrafish παρουσιάζει υψηλό ποσοστό σπογγώδους ιστού σε σχέση με την καρδιά των ενήλικων θηλαστικών. Αυτή η πλαστικότητα των καρδιομυοκυττάρων του zebrafish ίσως να είναι και ο λόγος που τα καρδιομυοκύτταρα του zebrafish μπορούν και επανεισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο συμβάλλοντας στην αναγέννηση του τραυματισμένου ιστού [289].

Η ανάπτυξη της καρδιάς ξεκινάει με την εξειδίκευση των μυοκαρδιακών και ενδοκαρδιακών προγονικών κυττάρων που βρίσκονται πλαγίως της οριακής ζώνης (marginal zone) του εμβρύου πριν από τη γαστριδίωση. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα αυτά οριοθετούνται ανάμεσα στην περιοχή της YSK και του εμπρόσθιου πλάγιου μεσοδέρματος (Anterior Lateral Plate Mesoderm, ALPM) (Εικόνα 1.18a). Τα CPCs και στο zebrafish είναι μεταξύ των πρώτων μεσοδερμικών κυττάρων που αναδύονται, μερικές φορές μαζί με τα ενδοδερμικά κύτταρα [290]. Τα κολπικά προγονικά κύτταρα βρίσκονται περισσότερο κοιλιακά στο έμβρυο σε σχέση με τα προγονικά κύτταρα της κοιλίας [291]. Το ενδοκάρδιο προέρχεται από τη διακριτή περιοχή του πρόσθιου πλάγιου μεσοδέρματος το οποίο επίσης δίνει γένεση σε αιμοποιητικά κύτταρα της αρχικής μυελοειδούς σειράς [292]. Τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν και συγκλίνουν στη μέση γραμμή (mid-line) του σώματος του εμβρύου στο στάδιο των 8 σωματιών. Κατά τη διάρκεια αυτής της μετανάστευσης που διαρκεί 7-8 ώρες, τα CPCs διαιρούνται μία ή δύο φορές. Στον εμβρυικό άξονα, τα κύτταρα αυτά, συνενώνονται στο στάδιο των 15 σωματιών σχηματίζοντας δύο αρχέγονες σωληνοειδείς δομές στο ALPM (Εικόνα 1.18b). Για τη μετανάστευση αυτή των πρόδρομων κυττάρων, είναι απαραίτητη η έκφραση του υποδοχέα *agtr1b* της πρωτεΐνης απελίνης όσο τα κύτταρα βρίσκονται ακόμα στην οριακή ζώνη και στο ALPM, ενώ ο προσδέτης του, η απελίνη, εκφράζεται στην περιοχή της μέσης γραμμής [283–284]. Ο πρώτος κυτταρικός δείκτης που εκφράζεται στο στάδιο αυτό είναι η τροπομοσίνη, πρωτεΐνη που συμμετέχει στη ρύθμιση της συστολής των κυττάρων [295].

Όταν πλέον και τα δύο καρδιακά πεδία έχουν συντηχθεί στη μέση γραμμή, ο καρδιακός ιστός σχηματίζει έναν δίσκο στον οποίο τα κύτταρα της κοιλίας βρίσκονται στην περιφέρεια, τα ενδοκαρδιακά κύτταρα στο κέντρο και τα μελλοντικά κύτταρα του κόλπου στην επίσης

περιφερειακά [296]. Η διαφοροποίηση των μελλοντικών κυττάρων της κοιλίας λαμβάνει χώρα στο στάδιο των 12-15 σωματιών (16hpf) πολύ κοντά στην περιοχή της μέσης γραμμής, ενώ τα μελλοντικά κύτταρα του κόλπου διαφοροποιούνται ελαφρώς πιο πλευρικά, ως το στάδιο των 26 σωματιών (22hpf). Πληθυσμοί καρδιομυοκυττάρων πλησιάζουν μεταξύ τους, δημιουργούν ένα δίσκο από κύτταρα, αναφερόμενος ως καρδιακός σωλήνας, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται καρδιακή σύντηξη (Εικόνα 1.18c). Η σύντηξη των δύο σωληνοειδών δομών πραγματοποιείται στο στάδιο των 21 σωματιών, οδηγώντας στο σχηματισμό της οριστικής δομής του καρδιακού κώνου στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (Εικόνα 1.18d). Στο κέντρο του καρδιακού κώνου βρίσκονται τα προγονικά κύτταρα του ενδοκαρδίου [297]. Παρά την αρχέγονη οδό εκροής και την έλλειψη της δεξιάς κοιλίας, η προσθήκη των κυττάρων του SHF είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του αρτηριακού πόλου. Μελέτες της ανάπτυξης του SHF στο zebrafish υποδεικνύουν ότι οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία είναι συντηρημένοι σε σχέση με αυτούς στα θηλαστικά [288–289].

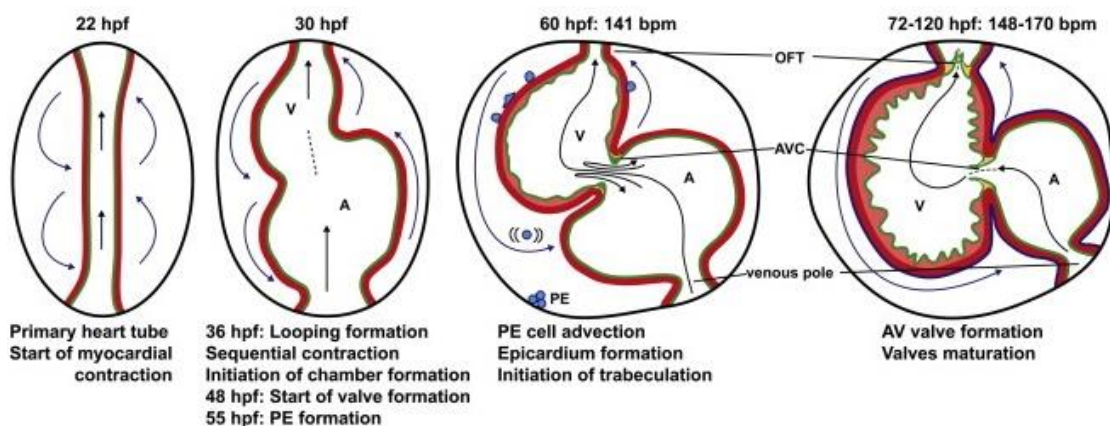


Εικόνα 1.18: Η ανάπτυξη της καρδιάς στο zebrafish. **a.** Κατά την πρώιμη ανάπτυξη της καρδιάς τα CPCs εντοπίζονται στο ALPM. **b.** Στη συνέχεια, τα CPCs μετακινούνται στη μέση γραμμή. **c.** Το FHF (μωβ) σχηματίζει τον καρδιακό σωλήνα, και ακολουθεί η προσθήκη του SHF (πράσινο) στους πόλους του καρδιακού σωλήνα. **d+e.** Ακολουθεί η διάταση των καρδιακών θαλάμων και η στροφή της καρδιάς. A: atrium, hpf: hours post-fertilization, LA: left atrium, LV: left ventricle, OFT: outflow tract, PT: pulmonary trunk, RA: right atrium, RV: right ventricle, V: ventricle. Τροποποιήθηκε από [300].

Από τη στιγμή που θα σχηματιστεί ο καρδιακός δίσκος, ο μυοκαρδιακός ιστός που προέρχεται από το δεξιό καρδιακό πεδίο ελίσσεται κοιλιακά και μετατοπίζεται προς τα μπροστά και αριστερά. Τα ενδοκαρδιακά κύτταρα που βρίσκονται κοιλιακά του μεσοκαρδιακού δίσκου, θα τοποθετηθούν μέσα στον αυλό του καρδιακού σωλήνα. Κατόπιν του ασυμμετρικού ελιγμού και της στροφής του μυοκαρδιακού ιστού, σχηματίζεται ο καρδιακός σωλήνας με το φλεβικό άκρο στα αριστερά και το αρτηριακό άκρο ακόμα στη μέση γραμμή. Ο καρδιακός σωλήνας στρίβει προς τα δεξιά της μέσης γραμμής. Το μέρος που βρίσκεται δεξιά μετά τη στροφή είναι η μελλοντική κοιλία, ενώ ο μελλοντικός κόλπος παραμένει αριστερά της μέσης γραμμής. Η κατεύθυνση της στροφής της καρδιάς αποτελεί χαρακτηριστικό συντηρημένο μεταξύ των σπονδυλωτών κατά την εξέλιξη και στο zebrafish αυτή η διαδικασία ολοκληρώνεται στις 36 hpf [301]. Κατά τη διάρκεια σχηματισμού του καρδιακού βρόγχου, η κοιλία και ο κόλπος γίνονται

διακριτές κοιλότητες με σχήμα «φασολιού», με μία διακριτή έξω και έσω καμπύλη κατά τη διαδικασία της διάτασης των θαλάμων (chamber ballooning) (Εικόνα 1.18e) [302].

Στο zebrafish, η συστολή των καρδιομυοκυττάρων ξεκινάει από το φλεβικό πόλο του καρδιακού σωλήνα στο στάδιο των 22 σωματιών. Οι πρώτες συστολές είναι άτακτες και μη συντονισμένες. Η καρδιά του zebrafish ξεκινά να χτυπά με ρυθμικό τρόπο στο στάδιο των 26 σωματιών, με καρδιακό χτύπο 25 χτύπους/λεπτό. Στις 24 ώρες ο παλμός αυξάνεται στις 90 συστολές/λεπτό, και αμέσως μετά ξεκινάει η κυκλοφορία του αίματος [295]. Μέχρι τις 30 ώρες μετά τη γονιμοποίηση ο καρδιακός σωλήνας χτυπά με 140 παλμούς/λεπτό, και ξεκινάει η δεξιά στροφή της καρδιάς. Στις 36 ώρες μετά τη γονιμοποίηση που ολοκληρώνεται η στροφή η καρδιά του zebrafish χτυπά με 180 παλμούς το λεπτό, ενισχύοντας την κυκλοφορία του αίματος στο υπόλοιπο σώμα και στο κεφάλι [303]. Με την έναρξη του καρδιακού χτύπου, η ροή του αίματος στον καρδιακό αυλό δίνει το φυσικό ερέθισμα για το σχηματισμό των θαλάμων, τη δημιουργία του σπογγώδους μέρους της καρδιάς, τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων και το σχηματισμό των βαλβίδων (Εικόνα 1.19). Αυτή η μηχανική δύναμη διαφέρει ανάλογα με το ιξώδες του αίματος, το οποίο καθορίζεται κυρίως από τη συγκέντρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων [304].

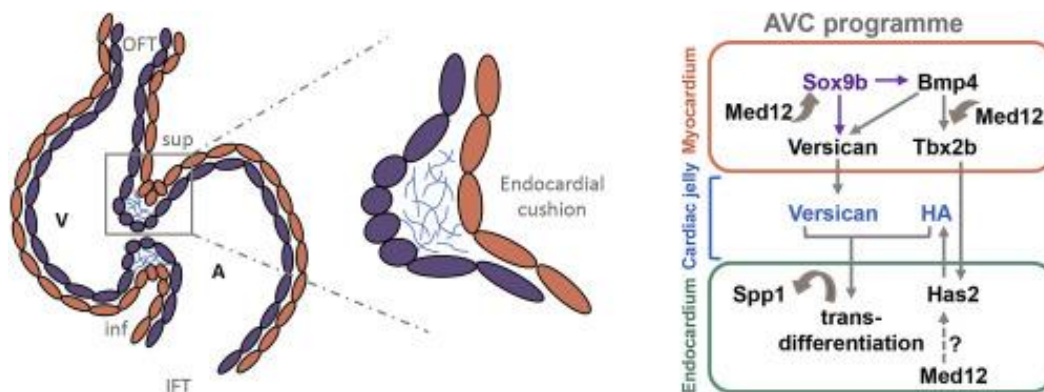


Εικόνα 1.19: Τα στάδια της καρδιακής ανάπτυξης και η έναρξη συστολής της καρδιάς στο zebrafish. Τα τοιχώματα της καρδιάς δέχονται τη φυσική δύναμη της ροής του αίματος εσωτερικά (μαύρα βέλη) και του περικαρδιακού υγρού (μπλε βέλη) εξωτερικά σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Στην περιοχή σχηματισμού των βαλβίδων αυτή η ροή γίνεται πιο έντονη. Στην εικόνα ενδοκάρδιο απεικονίζεται με πράσινη γραμμή, το μυοκάρδιο με κόκκινη, το επικάρδιο με μπλε και οι αναπτυσσόμενες βαλβίδες με κίτρινο. Οι μπλε μικροί κύκλοι είναι ενδεικτικοί των προ-επικαρδιακών κυττάρων. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν την πιο «βίαιη» ροή στην περιοχή των βαλβίδων. A:atrium, AVC: atrioventricular canal, bpm: beats per minute, LA: left atrium, LV: left ventricle, OFT: outflow tract, PE: proepicardium, RA : right atrium, RV: right ventricle, V: ventricle [305].

1.10.5 Η ανάπτυξη της κολποκοιλιακής βαλβίδας

Ο σχηματισμός της καρδιακής βαλβίδας ξεκινάει με το σχηματισμό του κολποκοιλιακού καναλιού και τη στένωση μεταξύ κόλπου και κοιλίας στις 37 hpf. Σε κυτταρικό επίπεδο, αυτό που συμβαίνει είναι ότι τα ενδοκαρδιακά κύτταρα της περιοχής που άπτονται της καρδιακής γέλης υφίστανται EMT, εφόσον δεχτούν τα κατάλληλα σήματα και ακολούθως, τα κύτταρα αυτά

μεταναστεύουν μέσα στην καρδιακή γέλη και πολλαπλασιάζονται για να γεμίσουν τις τοπικές διογκώσεις (Εικόνα 1.20) [297]. Διαφοροποίηση των ενδοκαρδιακών κυττάρων ξεκινά στις 36hrf. Στις 45 hrf, η έκφραση του notch1b περιορίζεται στο κολποκοιλιακό κανάλι. Μετά τις 55 hrf, αυτά τα ενδοκαρδιακά κύτταρα στο άνω και κάτω μέρος του κολποκοιλιακού καναλιού, σχηματίζουν ένα στρώμα κυβοειδών κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη επιφάνειας Dm-grasp, σε αντίθεση με τα επίπεδα κύτταρα που επαφίενται στο μυοκάρδιο των κοιλοτήτων και δεν εκφράζουν Dm-grasp [306].



Εικόνα 1.20: Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης για τη δημιουργία του κολποκοιλιακού καναλιού. AVC: atrioventricular canal, V:ventricle, A: atrium, HA: hyaluronan [307].

Σε ό,τι αφορά την EMT το σηματοδοτικό μονοπάτι που είναι απαραίτητο είναι το Wnt/ β -κατενίνης, το οποίο κωδικοποιεί τη συνθάση 2 του υαλουρονικού οξέος (Has2). Η παλινδρόμηση του αίματος προκαλεί την έκφραση του γονιδίου *klf2*, το οποίο είναι απαραίτητο για τις αλλαγές στη δομή των κυττάρων κατά τη δημιουργία των επαρμάτων [308]. Στις 105 hrf, οι διογκώσεις έχουν φτάσει το μέγιστο βαθμό, και ορισμένα κύτταρα έχουν μετατραπεί σε γλωττίδες (valve leaflets), οι οποίες αποτελούνται από δύο στρώματα κυττάρων που διαχωρίζονται από μία στρώση εξωκυττάριας ουσίας πλούσιας σε φιβρονεκτίνη [306]. Μέχρι την ενηλικίωσή του τα zebrafish αποκτούν κολποκοιλιακή βαλβίδα με 4 γλωχίνες.

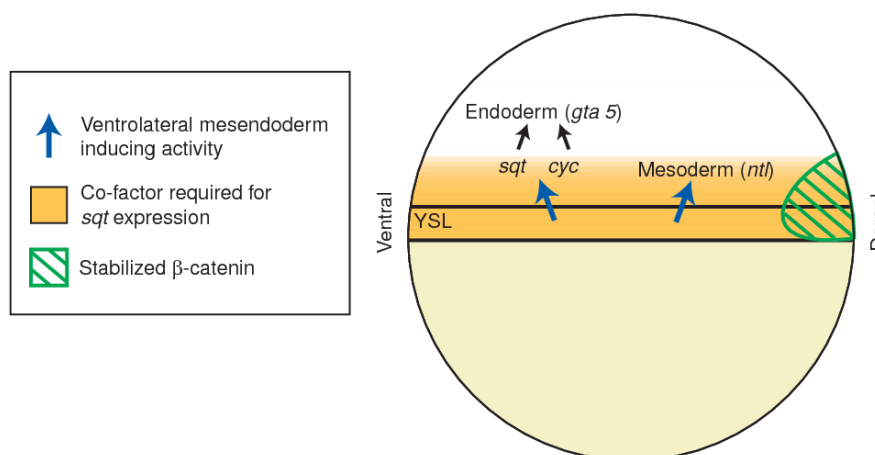
Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στο σχηματισμό της κολποκοιλιακής βαλβίδας του zebrafish είναι αρκετά συντηρημένοι και στους αμνιοτικούς οργανισμούς. Τα μόρια και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο ρυθμιστικό δίκτυο μορφοποίησης των βαλβίδων είναι τα Notch, NFAT, ErbB, Tgf- β , Wnt/ β -κατενίνη και Has2. Στο zebrafish, η αναστολή του notch, του οποίου η έκφραση ξεκινάει στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση έχει ως αποτέλεσμα την έκτοπη εμφάνιση Dm-grasp θετικών κυβοειδών ενδοκαρδιακών κυττάρων στην κοιλία, ενώ η συνεχής ενεργοποίηση του Notch στο ενδοκάρδιο οδηγεί στην αποδιαφοροποίηση των ενδοκαρδιακών κυττάρων στη βαλβίδα, προτείνοντας ότι η δράση του περιορίζει την διαφοροποίηση του κολποκοιλιακού καναλιού στην κοιλία [309]. Επίσης, η αναστολή της δράσης του notch στις 36 hrf είχε ως αποτέλεσμα αποδιοργάνωση του ενδοκαρδίου με μειωμένη έκφραση της Dm-grasp, προτείνοντας έναν απώτερο ρόλο στη διατήρηση της ταυτότητας του κολποκοιλιακού καναλιού [306].

Πέραν των γενετικών παραγόντων, υπάρχουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό των βαλβίδων και της καρδιάς. Οι λεγόμενες αιμοδυναμικές δυνάμεις επηρεάζουν την ανάπτυξη και το σχηματισμό της καρδιάς στο zebrafish καθώς αυτή λειτουργεί, προκαλώντας ενδοθηλιακό στρες. Στις δυνάμεις αυτές ανήκουν η δύναμη που ασκείται φυσιολογικά λόγω πίεσης στο τοίχωμα της καρδιάς και των αγγείων, τη φυσιολογική δύναμη των κυττάρων που απαρτίζουν το τοίχωμα των αγγείων και εμφανίζουν περιμετρικά εκτατική δύναμη ως αποτέλεσμα αυτής της φυσιολογικής πίεσης, και τέλος, το επονομαζόμενο shear stress, δηλαδή μία δύναμη τριβής, που εμφανίζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων από τη ροή του αίματος [310].

1.10.6 Η επαγωγή του μεσενδοδέρματος στο zebrafish

Το *oct4* (*spiel-ohne-grenzen*), αποτελεί γονίδιο εξαιρετικά σημαντικό για τον έλεγχο της πολυδυναμίας των εμβρυικών βλαστοκυττάρων στο ψάρι ζέβρα. Δρα ως γονίδιο μητρικής επίδρασης, καθώς η απουσία του προϊόντος του από το ωάριο και το ζυγωτό οδηγεί στη μείωση των επιπέδων έκφρασης του *bmp*, με αποτέλεσμα την υπερανάπτυξη των ραχιαίων δομών [311].

Το γονίδιο *notail*, είναι το ομόλογο του *Brachyury* στο zebrafish. Υπάρχει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ φαινοτύπου των μεταλλαγμάτων *ntl* του ποντικού και αυτών του zebrafish, γεγονός που ενισχύει τη θεωρία ότι ομόλογα γονίδια μπορεί να έχουν την ίδια λειτουργία μεταξύ σπονδυλωτών που ανήκουν σε διαφορετικές κλάσεις, ακόμα κι αν είναι εξελικτικά μακριά όπως είναι τα θηλαστικά και τα τελεόστεα. Τα μεταλλάγματα *ntl* και στα δύο είδη παρουσιάζουν απουσία του διαφοροποιημένης νωτοχορδής και του ραχιαίου μέρους του σώματος [312].



Εικόνα 1.21: Η επαγωγή του μεσενδοδέρματος. Η επαγωγή του μεσενδοδέρματος οφείλεται σε κάποιο σήμα που προέρχεται από τη YSL (μπλε βέλη) στις 3-4 hpf και ενεργοποιεί χωριστά τα *sqt* και *cyc* και το *ntl*. Η έκφραση της β-κατενίνης είναι σταθερή στην πράσινη περιοχή του σχήματος, και δρα συνεργατικά με έναν παράγοντα που εκφράζεται στην κίτρινη ζώνη του σχήματος και τη YSL για να επάγει την έκφραση του *sqt* [313].

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η επαγωγή του μεσοδέρματος στο zebrafish διεκπεραιώνεται από σηματοδότηση τύπου Nodal. Υπάρχουν δύο ομόλογα του *nodal* στο ψάρι ζέβρα: το *cyclops* και το *squint* (Εικόνα 1.21) [314]. Μια σειρά γονιδίων που κωδικοποιούν

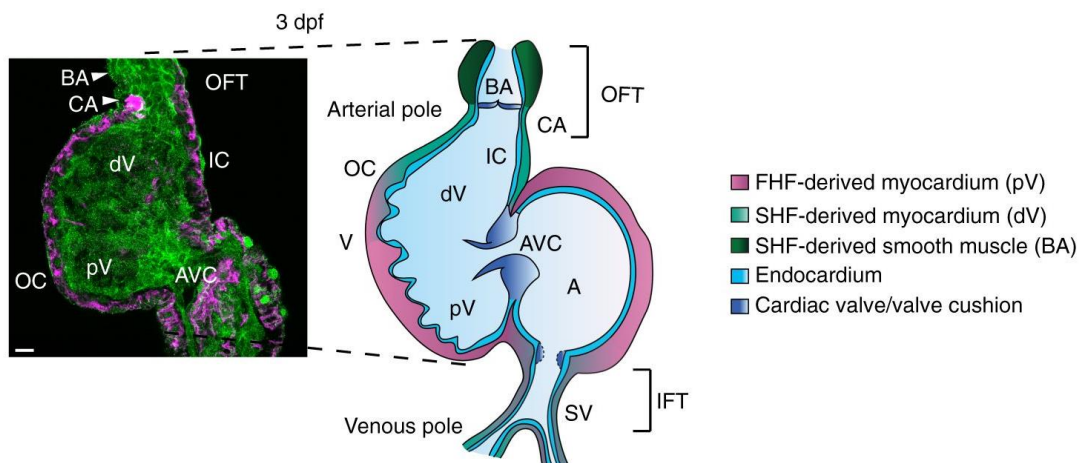
μεταγραφικούς παράγοντες χαρακτηριστικούς του πρώιμου μεσοδέρματος, όπως τα *bonnie-and-clyde*(=*mixer*), *faust* (=gata5) και *casanova* (=sox32) αποτελούν άμεσους στόχους της σηματοδότησης μέσω *Nodal*. Η πρωτεΐνη *Casanova* έχει ρόλο-κλειδί στη επαγωγή του μεσοδέρματος, καθώς η υπερέκφρασή της σε συνδυασμό με την έκφραση ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα, του *Sox17*, οδηγεί στο σχηματισμό του. Η *Casanova* λειτουργεί επίσης συνεργατικά με τον TF *Oct4* [315].

Δύο γονίδια BMP, τα *swirl* (*bmp2b*) και *snailhouse* (*bmp7*), εκφράζονται στο κοιλιακό τμήμα του γαστριδίου και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των κοιλιακών δομών. Οι *Chordin* και *Noggin* προσδέονται στους παράγοντες *Bmp* και μειώνουν τη δραστηριότητά τους. Η υπερέκφραση των παραγόντων *Fgf*, *Wnt*, και σε κάποιο βαθμό του ρετινοϊκού οξέος προκαλεί υπερβολική ανάπτυξη οπίσθιων δομών στο σύνολο του εμβρύου. Τρία γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες FGF, τα *fgf3*, *fgf8* και *fgf24* εκφράζονται στο μεσόδερμα [316]. Επιπλέον, η απώλεια του σηματοδοτικού μονοπατιού *Hedgehog* οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των καρδιακών πεδίων στο *zebrafish* στο στάδιο του βλαστιδίου [317].

1.10.7 Εμβρυικά CPCs στο *zebrafish*

Τα CPCs εντοπίζονται στο *zebrafish* στο ALPM με την αμφίπλευρη έκφραση πολλών συντηρημένων καρδιακών TF, όπως είναι οι *Nkx2.5*, *Hand2* και *Gata4/5*. Με τη χρήση μεταλλαγμένων σειρών *zebrafish* έχει δειχτεί ότι είναι τα μονοπάτια *Bmp* και *Nodal* επάγουν την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Nkx2.5*, οποίος συμμετέχει στη διαφοροποίηση των καρδιακών κυττάρων με την επαγωγή του γονιδίου *gata5* [318].

Η αναδυόμενη γραμμική καρδιά αποτελείται από το ενδοκάρδιο, που περιβάλλεται από τα πρώτα διαφοροποιούμενα καρδιομυοκύτταρα, γνωστά ως FHF. Τα μυοκάρδιο που αποτελείται από αυτά τα πρώτα καρδιομυοκύτταρα, είναι ορατό στις 16-18 hpf λόγω της έκφρασης του γονιδίου *myl7*, που αποτελεί δείκτη της διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων[319]. Τα πρόδρομα μυοκαρδιακά κύτταρα του κόλπου εκφράζουν το γονίδιο *amhc* ή *myh6* (*atrial myosin heavy chain*), ενώ τα πρόδρομα μυοκαρδιακά κύτταρα της κοιλίας εκφράζουν το γονίδιο *vmhc* (*ventricular myosin heavy chain*). Κύτταρα τα οποία εκφράζουν το γονίδιο *Itbp3* και εντοπίζονται αρχικά παρακείμενα του καρδιακού σωλήνα, συνεισφέρουν σημαντικά στη αναπτυσσόμενη καρδιά, και δίνουν γένεση στο μισό κοιλιακό μυοκάρδιο, καθώς και στο μυοκάρδιο που βρίσκεται κοντά στην OFT. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται επίσης σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα στην OFT(Εικόνα 1.22) [320].



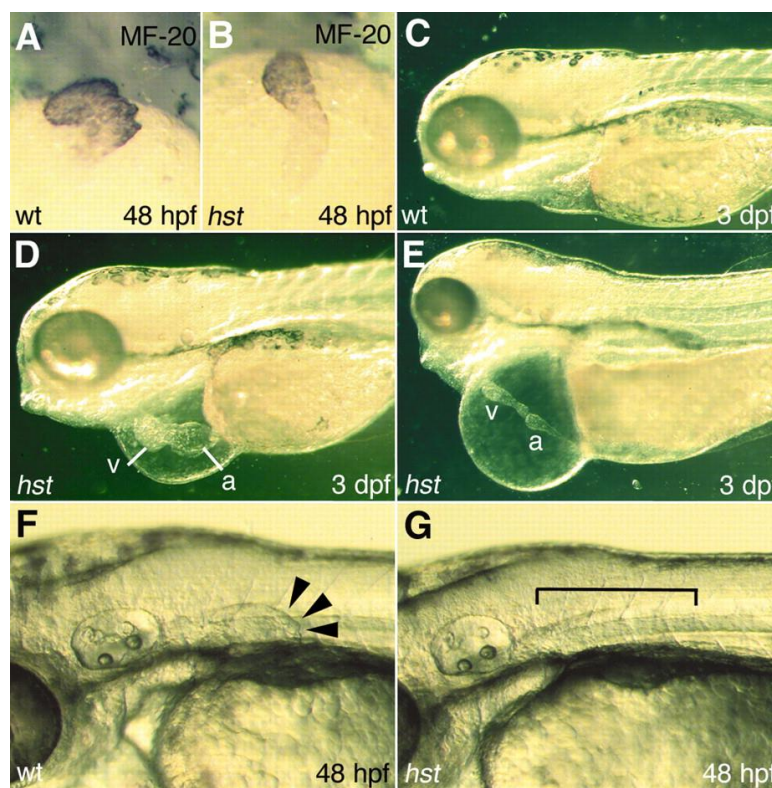
Εικόνα 1.22: Σχηματική αναπαράσταση της καρδιάς του zebrafish, όπως προέκυψε από εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας. Στην εικόνα φαίνονται ο κόλπος (A) και η κοιλία (V), που χωρίζονται μέσω της βαλβίδας του AVC καναλιού. Στην απομονωμένη καρδιά έχει γίνει χρώση με MHC (μυοκάρδιο) και με α -PKC το οποίο βάφει όλα τα κύτταρα. Το μυοκάρδιο που προέρχεται από το FHF καταλαμβάνει μέρος της κοιλίας (proximal, pV) και το μεγαλύτερο μέρος του κόλπου (A). Το SHF καταλαμβάνει επίσης μέρος της κοιλίας (distal, dV) και της OFT [321].

Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού Fgf, καθώς και των TF Tbx1 και Mef2c, είναι γνωστός στην ανάπτυξη του SHF στο zebrafish, ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζεται αυτή η ανάπτυξη δεν είναι ακόμα γνωστός [320]. Σε πειράματα γενεαλογίας, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί μοριακοί δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των *Itbr3*, *isl1* και *mef2c*, για να περιγράψουν το μυοκάρδιο που προέρχεται από το SHF στο zebrafish. Μέρος της κοιλίας και της OFT προέρχεται από κύτταρα που εκφράζουν *nkx2.5* και *Itbr3* [322]. Ο TF Tbx1 εκφράζεται στο καρδιοφαρυγγικό πεδίο (Cardiopharyngeal Field, CPF) πολλών χορδωτών και ρυθμίζει την καρδιακή ανάπτυξη διατηρώντας τον πολλαπλασιασμό και καταστέλλοντας τη διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων του SHF. Η απώλεια του *tbx1* στο zebrafish (*van gogh*, *vgo*) οδηγεί σε δυσλειτουργίες στα φαρυγγικά τόξα και σε μικρότερο BA, επιβεβαιώνοντας τη συντηρημένη λειτουργία του γονιδίου [323].

Στο zebrafish έχουν αναγνωριστεί δύο ορθόλογα γονίδια, *tbx5a* και *tbx5b*, που κωδικοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Tbx5. Τα επίπεδα έκφρασης του *tbx5a* είναι υψηλότερα κατά την ανάπτυξη της καρδιάς σε σχέση με του *tbx5b*. [324]. Οι Sanchez-Iranzo et al. έδειξαν ότι κατά την εμβρυική ανάπτυξη του zebrafish η περιοχή της κοιλίας χωρίζεται στις διακριτές περιοχές *tbx5a*⁺ και στις *tbx5a*⁻. Η έκφραση του γονιδίου *draculin* (*drl*) εντοπίζεται σε ένα πρώιμο πληθυσμό του LPM, ο οποίος θα δώσει γένεση στα καρδιομυοκύτταρα που θα σχηματίσουν τον αρχέγονο καρδιακό σωλήνα. Τα *drl*⁺ και *drl*⁻ κύτταρα χαρακτηρίζουν επίσης διακριτές περιοχές της εμβρυικής κοιλίας. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η κοιλία της καρδιάς των ενήλικων τελεόστεων, απαρτίζεται από περιοχές που προέρχονται από το FHF και από αυτές που προέρχονται από το SHF, όπως ακριβώς συμβαίνει και στα θηλαστικά [289].

Η απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των *tbx5a*, *tbx5b* στο zebrafish οδηγεί σε φαινοτύπους παρόμοιους με αυτούς που εμφανίζουν και τα θηλαστικά. Το 2002 οι Garrity et al.

έδειξαν ότι μεταλλαγές στο ορθόλογο γονίδιο *tbx5* στο zebrafish, οδήγησαν στο χαρακτηριστικό σχήμα της καρδιάς-κορδόνι (heartstrings, *hst*). Αρχικά, η καρδιά των *hst* μεταλλαγμάτων, φαίνεται να σχηματίζεται και να λειτουργεί φυσιολογικά μέχρι το στάδιο του καρδιακού σωλήνα, παρουσιάζοντας μόνο ελαφρία βραδυκαρδία (A,B). Στη συνέχεια, τα ψάρια αυτά εμφανίζουν έλλειψη του θωρακικού πτερυγίου και καρδιακές δυσλειτουργίες που επηρεάζουν τόσο τον κόλπο όσο και την κοιλία, όχι όμως την οδό εισροής (inflow tract), όπως είναι η αδυναμία στροφής του μυοκαρδιακού ιστού, οδηγώντας σε μία διατεταμένη μη λειτουργική καρδιά. Στις 3-4 dpf η κυκλοφορία του αίματος σταματά, καθώς μειώνεται σταδιακά η συσταλτικότητα της καρδιάς (Εικόνα ..C-E). Το περικαρδιακό οίδημα εμφανίζεται στις 2dpf και συχνά είναι αρκετά μεγάλο στις 3dpf (Εικόνα E). Ο βαθμός του οιδήματος και της διάτασης της καρδιάς διαφέρει ανάλογα και με το γενετικό υπόβαθρο της σειρά που χρησιμοποιείται. (D,E).



Εικόνα 1.23: Δυσμορφίες στην καρδιά και στο θωρακικό πτερυγίο των *hst* μεταλλαγμάτων. (A,C,F) Έμβρυα αγρίου τύπου. (B,D,E,G,) *hst* αδέρφια. (A,B) Χρώση με το αντίσωμα MF-20 στις 48hpf σε καρδιές εμβρύων κατά το στάδιο ολοκλήρωσης της στροφής της καρδιάς. (C-G) Ζωντανά έμβρυα. (C-E) έμβρυα στις 3dpf. (D,E) Τα *hst* εμφανίζουν ήπιο έως και σοβαρό περικαρδιακό οίδημα, έλλειψη στροφής, και διατεταμένη καρδιά. (F,G) 48hpf . (F) Ο οφθαλμός θωρακικού πτερυγίου στα έμβρυα αγρίου τύπου (με μαύρα βέλη). (G) Έλλειψη του οφθαλμού τα *hst* [325]

Η μείωση της έκφρασης του *tbx5* με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων morpholino (*Tbx5*-MO) απέδειξε ότι η επίδραση του *tbx5* στην ανάπτυξη είναι δοσο-εξαρτώμενη, και ιδίως σε ό,τι αφορά την ανάπτυξη του θωρακικού πτερυγίου. Η χορήγηση 12.4 ng *Tbx5*-MO οδηγεί σε δυσλειτουργίες της καρδιάς και των άκρων, ίδιες με αυτές των *hst* μεταλλαγμάτων στο 93% των ενεμένων εμβρύων. Τα έμβρυα αυτά εμφανίζουν δυσμορφισμό του θωρακικού πτερυγίου, ενώ η καρδιά τους που έχει σχήμα «κορδόνι» φαίνεται να σχηματίζεται και να λειτουργεί κανονικά κατά

το πρώιμο στάδιο του καρδιακού σωλήνα, εμφανίζει όμως βραδυκαρδία συγκριτικά με τα αγρίου τύπου αδέρφια τους. Τελικά αποτυγχάνει να ολοκληρώσει το στάδιο της στροφής και σταδιακά η κατάσταση επιδεινώνεται, αφού ο κόλπος και η κοιλία δε σχηματίζονται σωστά. Χαμηλότερες δόσεις του *tbx5-MO* (1.7 ng), οδήγησαν σε προσομοίωση του φαινοτύπου των *hst* μεταλλαγμάτων σε ποσοστό 64% των ενεμένων εμβρύων, ενώ προκάλεσε πιο ήπια καρδιακή δυσλειτουργία, μικρό ή καθόλου περικαρδιακό οίδημα και μικρότερου μεγέθους ή καθυστερημένους οφθαλμούς των θωρακικών πτερυγίων στο 30% των ενεμένων εμβρύων. Όπως γίνεται φανερό από όλα τα παραπάνω, μεταλλαγές στο γονίδιο *Tbx5* ή παρεμπόδιση της έκφρασής του, οδηγούν σε συνδρομικές ανεπάρκειες συντηρημένες σε ψάρια και θηλαστικά [325].

Κατά την ανάπτυξη της καρδιάς των σπονδυλωτών σημαντικό ρόλο παίζει η χρονική στιγμή κατά την οποία τα προγονικά κύτταρα του SHF προστίθενται στους πόλους της καρδιάς. Αυτή η διαδικασία πρέπει να ρυθμίζεται σωστά έτσι ώστε να αποφεύγεται η εμφάνιση CHDs. Η πρωτεΐνη *Hey2*, ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών bHLH, και είναι ένας μεταγραφικός αναστολέας που περιορίζει τη συσσώρευση των πρόδρομων κυττάρων του SHF στην καρδιά του zebrafish [326].

Ο TF *Isl1* εκφράζεται στο zebrafish στο στάδιο των 14 σωματιών, στο εμπρόσθιο τμήμα της μέσης γραμμής (trigeminal placode). Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο *isl1* εκφράζεται στα διαφοροποιούμενα καρδιομυοκύτταρα που θα σχηματίσουν τον καρδιακό κώνο, καθώς και στο μεσόδερμα στα αδιαφοροποίητα καρδιακά κύτταρα. Η έκφραση του εντοπίζεται στο παρακείμενο στον αρτηριακό πόλο μεσέγχυμα στις 24, 36 και 48 hpf. Τα κύτταρα αυτά επεκτείνονται από το περικαρδιακό τοίχωμα στην αναπτυσσόμενη κοιλία. Η έκφραση του *isl1* δεν εντοπίζεται στον αρτηριακό πόλο στις 72 hpf [327]. Ο φλεβόκομβος βρίσκεται στην εσωτερική καμπυλότητα της κοιλίας, την περιοχή η οποία προστίθεται τελευταία στον καρδιακό σωλήνα. Τα καρδιομυοκύτταρα της περιοχής εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα *Isl1*. Μεταλλαγμένες σειρές zebrafish που δεν εκφράζουν τον εν λόγω παράγοντα εμφανίζουν βραδυκαρδία και αρρυθμίες, υποδεικνύοντας το λειτουργικό του ρόλο στα κύτταρα του φλεβόκομβου. Η αποσιώπηση του *isl1* στο zebrafish δεν έχει επίδραση στον αρτηριακό πόλο, σε αντίθεση με την απουσία του *Isl1* στο ποντίκι, που επηρεάζει το σχηματισμό του αρτηριακού και φλεβικού πόλου. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η λειτουργία του *isl1* στην ανάπτυξη της καρδιάς του zebrafish δεν είναι συντηρημένη, ή ενδεχομένως κάποιο άλλο γονίδιο που δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί να αναπληρώνει γι'αυτή την απώλεια λειτουργίας. Οι μεταγραφικοί παράγοντες *Isl1*, *Nkx2.5* και *Fosl2* είναι αναγκαίοι για τη διατήρηση των πρόδρομων κυττάρων του SHF, ωστόσο, το ρυθμιστικό δίκτυο που είναι υπεύθυνο για τη διατήρησή τους ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί. [292]

Οι Lazic και Scott έδειξαν ότι ο TF *Mef2cb*, ομόλογος του MEF2C στο ποντίκι που αποτελεί δείκτης του SHF, εκφράζεται σε μέρος της κοιλιακής περιοχής, και είναι απαραίτητος για την ύστερη προσθήκη του μυοκαρδίου στον αρτηριακό πόλο. Το σηματοδοτικό μονοπάτι FGF μετά το σχηματισμό του καρδιακού κώνου είναι αναγκαίο για την έκφραση του *mef2cb*, και κατ'επέκταση για την προσθήκη του ύστερου μυοκαρδίου στον αρτηριακό πόλο [299].

Η έκφραση του Flk1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γενικά συντηρημένη στα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένου και του zebrafish. Έτσι, η έκφραση του flk1 στο zebrafish εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όχι όμως σε κύτταρα αιμοποιητικής σειράς ή σε προγονικά αιμαγγειοβλαστικής ή καρδιακής σειράς. Στο zebrafish, έχουν ταυτοποιηθεί 4 γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς VEGF: το ορθόλογα γονίδια flt1 και flt4, και δύο γονίδια με υψηλό βαθμό ομοιότητας με το γονίδιο KDR/Flk1 [328].

Τα προ-επικαρδιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παραγόντων Wt1, Tbx18 και Tcf21 στις 40-48hrf, ενώ και ο παράγοντας Bmp4 εκφραζόμενος στο μυοκάρδιο είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του επικαρδίου. Ο σημαντικότερος ρόλος που του έχει επιδοθεί είναι ότι ανταποκρίνεται ως ιστός σε περίπτωση τραυματισμού της καρδιάς, με την έκφραση των παραγόντων Tbx18 και Raldh2 [175].

2. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Τα CPCs αποτελούν σήμερα πολλά υποσχόμενη μορφή θεραπείας για τις καρδιακές παθήσεις. Ένας τέτοιος πρώιμος κυτταρικός πληθυσμός θα πρέπει πέραν όλων των άλλων, να μπορεί να ενσωματώνεται στον ιστό του ξενιστή και να διαφοροποιείται σε κύτταρα της καρδιάς, και κυρίως σε καρδιομυοκύτταρα. Γνωρίζοντας, λοιπόν, πλέον το μονοδύναμο χαρακτήρα των κυττάρων που εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα TBX5, η έκφραση του οποίου στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια είναι ενδεικτική του FHF, κρίνεται αναγκαία η απομόνωση και ανάλυση ενός τέτοιου πρώιμου μονοδύναμου πληθυσμού.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής για τη μελέτη του ρόλου του TBX5 στη διαφοροποίηση των CPCs είναι η απομόνωση ενός τριπλά θετικού πληθυσμού, που θα εκφράζει τις πρωτεΐνες επιφάνειας PDGFRA, KDR και GFRA2 ενδεικτικές των πρώιμων πολυδύναμων CPCs, καθώς και τον TF TBX5. Ο χαρακτηρισμός αυτού του τριπλά θετικού πληθυσμού με την τεχνική αλληλούχισης RNA μεμονωμένου κυττάρου μπορεί να οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα για την ταυτοποίηση πιθανώς νέων γονιδίων που σχετίζονται με το μονοδύναμο χαρακτήρα των κυττάρων αυτών, καθώς και για την περαιτέρω αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της καρδιάς.

Για τους παραπάνω λόγους κρίθηκε επίσης αναγκαία η απόκτηση της διπλά διαγονιδιακής σειράς ποντικών $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$ μέσα από διασταυρώσεις, η οποία δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης *in vivo* της έκφρασης του TBX5 τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη της καρδιάς όσο και στην καρδιά των ενήλικων ατόμων μετά από έναν τραυματισμό.

Επιπλέον, για την περαιτέρω ανάδειξη του ρόλου του TBX5 στην διαφοροποίηση των CPCs και στην ανάπτυξη της καρδιάς *en génie*, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης του TBX5 με τη χρήση morpholino σε έμβρυα zebrafish.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Απόκτηση Πρώιμων καρδιακών κυττάρων (CPCs)

3.1.1 Προέλευση της κυτταρικής σειράς mESCs που φέρει το διπλό διαγονίδιο $Tbx5^{CreERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$

Για την διαφοροποίηση των mESCs προς CPCs χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού, η οποία προέκυψε όπως έχουν περιγράψει και παλιότερα οι Kokkinopoulos et al [36]. Τα mESCs απομονώθηκαν από έγκυο μητέρα 2.5 ημερών, ομόζυγη για το διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP/eYFP}$, η οποία διασταυρώθηκε με αρσενικό ποντίκι που φέρει το διπλό διαγονίδιο $Tbx5^{CreERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$. Όπως αναφέρουν οι Kokkinopoulos et al. οι εκκολαπτόμενες βλαστοκύστες καλλιεργούνται για 5-6 ημέρες πάνω σε μία στρώση εμβρυϊκών ινοβλαστών σε θρεπτικό μέσο iSTEM, ειδικό για τα ESCs, στο οποίο προστίθεται ο παράγοντας LIF με συγκέντρωση 100μg/ml (ESGRO, Merck Millipore) (MEK1/2 and GSK3-beta inhibitors). Τα συσσωματώματα κυττάρων που δημιουργούνται απομονώνονται με τη χρήση θρυψίνης και επανακαλλιεργούνται με τον ίδιο τρόπο. Οι κλώνοι που προκύπτουν επεκτείνονται και τελικά επιλέγονται για περαιτέρω μελέτες αυτοί που παρουσιάζουν καρυότυπο αρσενικού και είναι διακριτοί λόγω της παρουσίας του γονιδίου Sry. Ακολούθως τα ES διατηρούνται στο θρεπτικό μέσο ESGRO (Complete PLUS Clonal Grade Medium-Millipore) χωρίς τους ινοβλάστες, μόνο με την προσθήκη του LIF [36].

Έτσι, η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη φέρει το διπλό διαγονίδιο $Tbx5^{CreERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί το υβριδικό μόριο CreERT2, κατά την οποία η Cre ρεκομπινάση έχει συντηχθεί με την αλληλουχία πρόσδεσης του ανθρώπινου υποδοχέα οιστρογόνων ER^{T2} , η οποία έχει τροποποιηθεί γενετικά, βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του $Tbx5$, και η έκφραση του TF $Tbx5$ συνεπάγεται την έκφραση του υβριδικού μορίου CreER^{T2}. Η αλληλουχία αυτή έχει κλωνοποιηθεί σε τεχνητό βακτηριακό χρωμόσωμα (BAC) (Εικόνα 3.1B). Η τεχνολογία αυτή αποτελεί ισχυρό και ευρέως διαδεδομένο εργαλείο για την επαγόμενη μεταλλαξινέωση στο ποντίκι. Το δεύτερο διαγονίδιο, εμπεριέχει την αλληλουχία eYFP που κωδικοποιεί την πράσινη/κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή ROSA26. Η έκφραση αυτού του γενετικού τόπου είναι καθολική καθώς το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε όλους τους εμβρυϊκούς και ενήλικους ιστούς στο ποντίκι. Μεταξύ του υποκινητή ROSA26 και της αλληλουχίας eYFP παρεμβάλλονται δύο αλληλουχίες loxP, οι οποίες έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και πλαισιώνουν μια αλληλουχία «στοπ», η οποία παρεμποδίζει τη μετάφραση της αλληλουχίας eYFP (Εικόνα 3.1B). Κάθε αλληλουχία loxP έχει μήκος 34bp και αποτελείται από δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις 13bp η καθεμία, οι οποίες χωρίζονται από μία μοναδική κεντρική αλληλουχία 8 bp στην οποία γίνεται ο ανασυνδυασμός. Τα κύτταρα

προέρχονται από ποντίκι ομόζυγο ως προς το διαγονίδιο ROSA26^{eYFP}, αφού η ομοζυγωτία αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης YFP και κατ' επέκταση την ένταση του σήματος.

3.1.2 Χορήγηση της 4-υδροξύ-ταμοξιφένης (4-OHT)

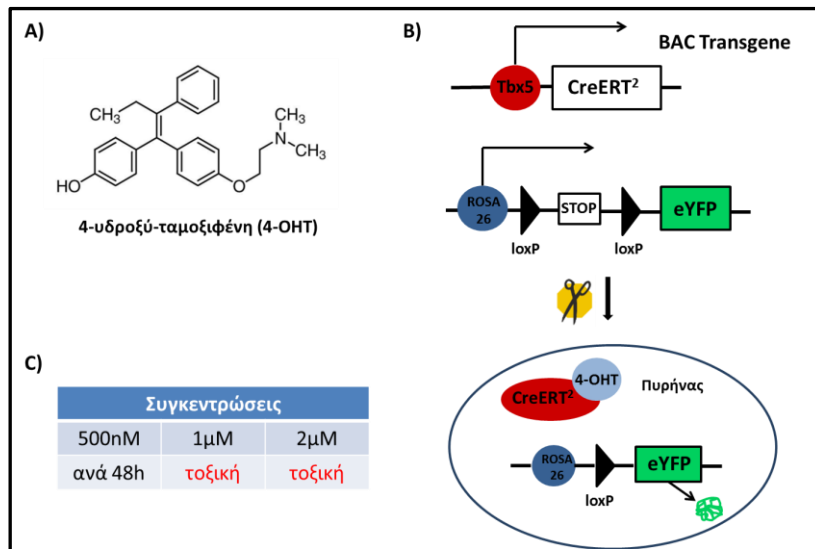
Στα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η χημική ένωση 4-υδροξύ-ταμοξιφένη (4-Hydroxytamoxifen, 4-OHT). Η ένωση 4-OHT (C₂₆H₂₉NO₂, MW=387.51) αποτελεί μεταβολίτης της ταμοξιφένης, που είναι ανταγωνιστής των οιστρογόνων, στον άνθρωπο και στα υπόλοιπα θηλαστικά. Η 4-OHT έχει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στους υποδοχείς των οιστρογόνων συγκριτικά με την ταμοξιφένη και τους άλλους μεταβολίτες της [329]. Από τα δύο ισομερή της 4-OHT, Z (trans) και E (cis), το trans ισομέρες έχει ισχυρή δράση αντι-οιστρογόνου σε αντίθεση με το cis ισομερές της ένωσης που έχει περίπου 100 φορές πιο ασθενή δράση. Πρόκειται για μόριο φωτοευαίσθητο, καθώς κατά την έκθεση στο φως και κατά την επώαση στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, υπόκειται σε μετατροπή του trans ισομερούς σε cis, γι' αυτό και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος [329].

➤ Προετοιμασία διαλύματος 4-OHT:

Για το παρόν πείραμα τα 5mg 4-OHT (Sigma-Aldrich) διαλύονται σε 250μl αιθανόλης και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 55°C μέχρι τη διαλυτοποίηση του ιζήματος. Έτσι το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 52mM ή 52000μM (stock) (Φυλάσσεται στους -80 °C). Στη συνέχεια, γίνεται αραιώση 1:100 αυτού του δ/τος (520 μM working solution) και το νέο διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

➤ Δράση της 4-OHT:

Ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται η βέλτιστη συγκέντρωση της 4-OHT στην καλλιέργεια διαφέρει (0.5μM-2μM). Από τις 3 συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν (0.5μM, 1μM, 2μM), επιλέχθηκε η 500nM ανά 48 ώρες, αφού οι συγκεντρώσεις 1μM και 2μM αποδείχτηκαν τοξικές για τα κύτταρα (Εικόνα 3.1C). Έτσι, τα 520 μM αραιώνονται 1000 φορές στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Μετά την πρόσδεση της 4-OHT στο υβριδικό μόριο CreERT2, προκύπτει ένα σύμπλοκο που εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου. Η Cre έχει εντοπιστεί στον πυρήνα των εμβρυϊκών κυττάρων σε έγκυο μητέρα, 24 ώρες μετά τη χορήγηση της 4-OHT, ενώ 48 ώρες μετά εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα [330]. Με την παρουσία της Cre στον πυρήνα πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός και η εκτομή του ενδιάμεσου τμήματος DNA μεταξύ των δύο αλληλουχιών loxP. Μετά την εκτομή παραμένει μόνο μία θέση loxP, και ξεκινάει η έκφραση της πρωτεΐνης eYFP (Εικόνα 3.1B).



Εικόνα 3.1: **A)** Συντακτικός τύπος της ένωσης 4-OHT. **B)** Σχηματική αναπαράσταση του ανασυνδυασμού που πραγματοποιείται από την CreERT2 μετά τη χορήγηση της 4-OHT. **C)** Πίνακας των συγκεντρώσεων της 4-OHT που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη.

3.1.3 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς $Tbx5^{CreERT2} / ROSA26^{eYFP/eYFP}$

Όλες οι διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω και αφορούν την καλλιέργεια και τη διαφοροποίηση των κυττάρων πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής, ο οποίος απολυμαίνεται πριν από κάθε εργασία για 10-15 λεπτά με τη χρήση λάμπας UV. Οι καλλιέργειες διατηρούνται σε θάλαμο επώασης, με θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂.

Συσκευές:

- Θάλαμος επώασης CO₂ [Series II 3110 Water-Jacketed CO2 (Thermo Forma)]
- Θάλαμος νηματικής ροής (NuAire Class II Biological Safety Cabinets)

3.1.3.1 *Επέκταση των κλώνων των ESCs*

Για την απόκτηση μεγαλύτερου αριθμού κλώνων των ESCs από έναν κλώνο ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Τα ειδικά φιαλίδια στα οποία έγινε η ψύξη των κυττάρων (cryotubes), τοποθετούνται από τους -80°C, όπου και φυλάσσονται, απευθείας σε υδατόλουτρο στους 37 °C για ένα περίπου λεπτό, μέχρι να ξεπαγώσουν τα κύτταρα.
2. Ακολούθως τοποθετούνται σε 10ml FBS σε 15ml falcon και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 1000 rpm.
3. Μετά τη φυγοκέντρωση το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε θρεπτικό ESGRO που εμπεριέχει τον παράγοντα LIF που συμβάλλει στην πλειοδυναμία και αυτό-ανανέωση των κυττάρων, καθώς και τα 2 μικρά μόρια αναστολείς MEK1/2 και GSK3 (2i). Κάθε 10 ημέρες πρέπει να γίνεται ανανέωση των παραγόντων αυτών στο ESGRO, τα οποία προστίθενται με

αραίωση 1:1000 από τα αρχικά διαλύματα. Τέλος, στο 2i ESGRO προστίθεται και το αντιβιοτικό πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (P/S).

4. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε ένα βοθρίο από 6-άρι πιάτο κυτταροκαλλιέργειας, στο οποίο προηγουμένως έχει γίνει επικάλυψη με διάλυμα ζελατίνης 0.1% (gelatin) για 15 λεπτά στους 37 °C στο θάλαμο επώασης. Η αλλαγή του θρεπτικού μέσου γίνεται κάθε 2-3 ημέρες.

3.1.3.2 Πάγωμα των ESCs

Κάθε νέος κλώνος που θα παγωθεί προέρχεται από ένα βοθρίο από 6-άρι πιάτο κυτταροκαλλιέργειας η επιφάνεια του οποίου έχει καλυφθεί σε ποσοστό 70-80% (confluent) , σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου 2i ESGRO
2. Επώαση των κυττάρων με διάλυμα 0.05% θρυψίνης/EDTA, για 5 λεπτά στους 37°C (τρυψινοποίηση), μέχρι να γίνει αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του πιάτου.
3. Για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης και ουδετεροποίηση του pH προστίθεται FBS. Η αναλογία των όγκων FBS: θρυψίνης είναι 2:1.
4. Γίνεται συλλογή των κυττάρων σε 15ml falcon και φυγοκέντρησή τους στις 1000rpm για 5 λεπτά.
5. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε διάλυμα 90% FBS/10%DMSO (διμεθυλοσουλφοξύδιο). Η παρουσία του DMSO αποτρέπει το σχηματισμό πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων.
6. Σε κάθε φιαλίδιο cryotube μεταφέρεται 1ml του παραπάνω διαλύματος των κυττάρων, που αντιστοιχεί σε ένα βοθρίο από 6-άρι πιάτο κυτταροκαλλιέργειας (70-80% confluent).
7. Τα ειδικά φιαλίδια με τα κύτταρα που πρόκειται να παγωθούν μεταφέρονται σε ειδικό δοχείο ψύξης κυττάρων, γνωστό και ως «Mr. Frosty», το οποίο περιέχει ισοπροπανόλη, που επιτρέπει την ήπια αρχική ψύξη των κυττάρων. Για την ακρίβεια εξασφαλίζει τη μείωση της θερμοκρασίας με ρυθμό -1°C/λεπτό.
8. Τοποθετούνται στους -80°C, όπου και μπορούν να διατηρηθούν για διάστημα μέχρι και ενός χρόνου.

Χημικά/Διαλύματα:

- Fetal Bovine Serum Heat Inactivated (FBS HI) (Gibco)
- 2.5% Trypsin/EDTA (10x) (GIBCO)
- Διάλυμα ζελατίνης 0.1% (?)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη 10000 U/ml (Gibco)
- 2i ESGRO που εμπεριέχει LIF, τους αναστολείς MEK1/2, GSK3beta inhibitors (Millipore complete medium/ Millipore 2i Medium Kit) και Pen/Strep (?)
- DMSO (dimethylsulfoxide, διμέθυλο-σουλφοξύδιο)

Υλικά/Συσκευές:

- Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryo tubes).
- Ειδικό δοχείο ψύξη κυττάρων με ισοπροπανόλη 100% (ThermoFisher)
- Πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 6 βοθρίων (Corning)
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5804)

3.1.4 Διαφοροποίηση των κυττάρων προς CPCs

Για την απόκτηση των CPCs κατά τη διαφοροποίηση των ESCs προς CMs, βασιστήκαμε σε προηγούμενο πρωτόκολλο διαφοροποίησης που δημοσίευσαν οι Kokkinopoulos et al. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, όπως και σε πολλά πρωτόκολλα διαφοροποίησης των ESCs προς κύτταρα καρδιομυογενικής σειράς, αρχικά γίνεται η επαγωγή του μεσοδέρματος, και στη συνέχεια ο καθορισμός του καρδιακού μεσοδέρματος με τη χρήση στα θρεπτικά μέσα διαφοροποίησης σηματοδοτικών μορίων που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της καρδιογένεσης [331]. Στην προσπάθεια απόκτησης ενός βέλτιστου πληθυσμού CPCs, έγινε διαφοροποίηση των κυττάρων και σύγκριση των CPC κυτταρικών πληθυσμών που προέκυψαν με τη χρήση δύο μεθόδων καλλιέργειας, της καλλιέργειας μονοστιβάδας και των εμβρυοειδών σωματίων (EBs). Κατά τους δύο αυτούς τρόπους διαφοροποίησης των κυττάρων που περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια θρεπτικά μέσα διαφοροποίησης, με μικρές διαφοροποιήσεις στις χρονικές στιγμές αλλαγής του κάθε θρεπτικού.

➤ **Καλλιέργεια Μονοστιβάδας**

- **Υπόστρωμα λαμινίνης 5μg/ml:** Πριν από την τοποθέτηση των κυττάρων σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 24-βοθρίων για τη διαφοροποίησή τους προς πρώιμα καρδιακά κύτταρα και καρδιομυοκύτταρα, προηγείται η επικάλυψη της επιφάνειας του βοθρίου με υπόστρωμα λαμινίνης. Η αραίωση της λαμινίνης γίνεται σε διάλυμα dPBS (1:20) και συγκέντρωση 5μg/ml. Έτσι, στα 300μl που απαιτούνται για την κάλυψη του βοθρίου χρησιμοποιούνται 15μl λαμινίνης. Στην περίπτωση που το πιάτο προορίζεται για ανοσοκυτταροχημεία τα κύτταρα τοποθετούνται σε 96-άρι πιάτο κυτταροκαλλιέργειας, όπου οι αντίστοιχοι όγκοι είναι 70μl και 3.5μl λαμινίνης. Η επώαση του πιάτου με το υπόστρωμα της λαμινίνης γίνεται στο θάλαμο επώασης στους 37°C για τουλάχιστον 2 ώρες.
- **Ημέρα -3 έως -1:** Τα κύτταρα στρώνονται με πυκνότητα 120000 κύτταρα/βοθρίο στο 24-αρι πιάτο κυτταροκαλλιέργειας, και 15000-20000 κύτταρα/βοθρίο στο 96-άρι πιάτο, σε θρεπτικό μέσο 2i ESGRO. Η επώαση τους με το 2i ESGRO διαρκεί από 1 έως 3 ημέρες μέχρι να καλυφθεί το 70-80% της επιφάνειας του βοθρίου.
- **Ημέρα 0:** Ξεκινάει η διαφοροποίηση με την προσθήκη του θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης SFD1 που συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

- **Ημέρα 1:** Απομάκρυνση του SFD1 και προσθήκη του SFD2 που εμπεριέχει κυτταροκίνες για την επαγωγή του μεσοδέρματος. Τα κύτταρα επωάζονται με το SFD2 για δύο ημέρες.
- **Ημέρα 3:** Αλλαγή του SFD2 με το Stempro34 που εμπεριέχει κυτταροκίνες για την εξειδίκευση του μεσοδέρματος σε καρδιακό. Η αλλαγή του Stempro γίνεται κάθε 2-3 ημέρες. Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν σε Stempro-34 μέχρι την πλήρη διαφοροποίηση τους και για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- **Ημέρα 4:** Προσθήκη της 4-OHT (500nM). Η αραίωση γίνεται στο Stempro-34 (1:1000 από το working solution)

➤ Εμβρυοειδή Σωματίδια

Για το σχηματισμό των EBs τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των «κρεμάμενων σταγόνων» (Hanging drops):

- **Ημέρα 0:** Σχηματισμός των hanging drops στο SFD1.
 - I. Μετά την τρυψινοποίηση τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε SFD1 (D0) και πραγματοποιείται μέτρησή τους με τη χρήση αιματοκυτόμετρου. Τα κύτταρα αραιώνονται έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα 100000 κύτταρα/mL στο SFD1.
 - II. Στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri 10cm τοποθετούνται σταγονίδια όγκου 30μl, καθένα από τα οποία περιέχει περίπου 3000 κύτταρα. Ο βέλτιστος αριθμός στογονίων στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri είναι 42 σταγόνες(6x7).
 - III. Στον πάτο του τρυβλίου προστίθενται 10 mL DMEM για την αποτροπή της εξάτμισης των σταγόνων και το καπάκι στο οποίο έχουν τοποθετηθεί οι σταγόνες τοποθετείται πάνω στο τρυβλίο με αποτέλεσμα αυτές να κρέμονται για να δημιουργηθούν τα EBs. Το τρυβλίο τοποθετείται στο θάλαμο επώασης στους 37°C.
- **Ημέρα 1:** Μία σφαίρα κυττάρων είναι ορατή σε κάθε σταγόνα.
- **Ημέρα 2:** Αποδιοργάνωση των EBs και μεταφορά σε SFD2.
 - I. Για τη μεταφορά των κυττάρων στο SFD2 γίνεται αποδιοργάνωση των σφαιρών. Αρχικά τα EBs αναμιγνύονται με τα 10ml DMEM και μεταφέρονται σε 15αρι falcon.
 - II. Φυγοκεντρώνονται για 2 λεπτά στις 800rpm.
 - III. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, και προστίθεται 1ml τρυψίνης, η οποία έχει προ-θερμανθεί στους 37°C. Τα κύτταρα επωάζονται με την τρυψίνη για ένα λεπτό στους 37°C.
 - IV. Το διάλυμα της τρυψίνης με τα κύτταρα αναμιγνύεται με την πιπέτα προκειμένου να διαλυθούν τα EBs.
 - V. Προστίθενται 2ml FBS για να απενεργοποιηθεί η δράση της τρυψίνης και στη συνέχεια συμπληρώνουμε με FBS μέχρι τα 10ml.
 - VI. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στις 1000rpm.

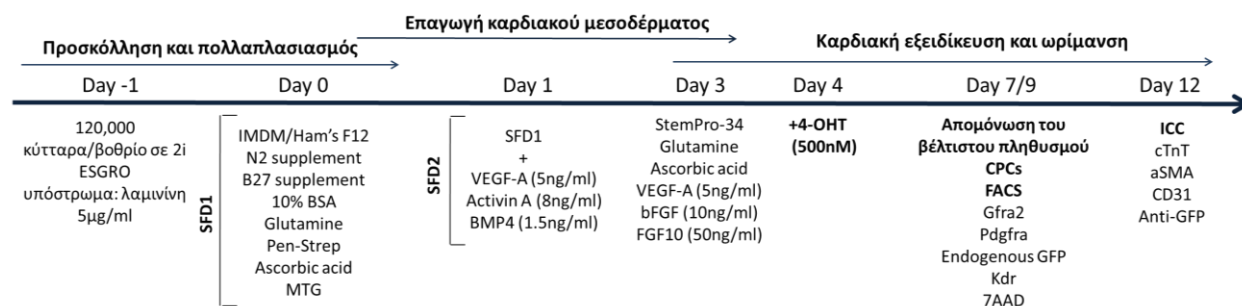
VII. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε SFD2, γίνεται μέτρηση με αιματοκυτόμετρο και προετοιμάζουμε ένα διάλυμα με συγκέντρωση 750000 κύτταρα/mL.

VIII. Τοποθετούμε τα νέα σταγονίδια στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri, και ακολούθως το DMEM, όμοια με το προηγούμενο βήμα την ημέρα D0.

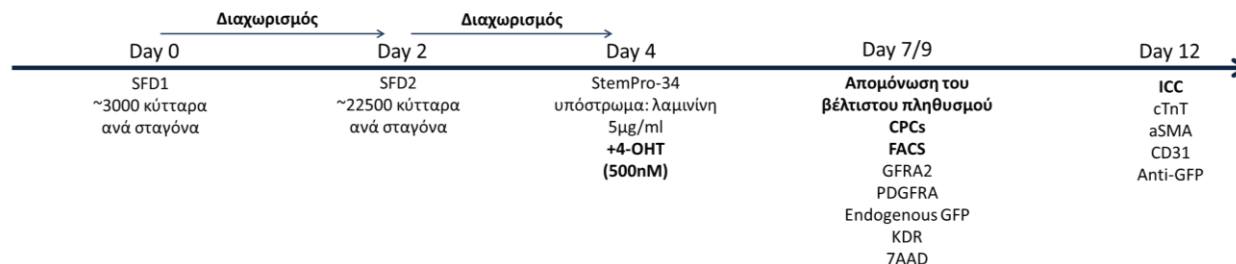
- **Ημέρα 3:** Τα νέα EBs είναι ορατά σε κάθε σταγόνα.
- **Ημέρα4:** Αποδιοργάνωση των EBs, όπως ακριβώς στην D2. Έπειτα, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε Stempro-34 και τοποθετούνται σε 24-άρι πιάτο κυτταροκαλλιέργειας. Πριν τη στρώση των κυττάρων, η επιφάνεια του βοθρίου έχει επωαστεί με διάλυμα λαμινίνης 5 µg/ml για 2 ώρες στους 37°C. Από αυτή τη χρονική στιγμή και μετά τα βήματα είναι ίδια ακριβώς με την καλλιέργεια μονοστιβάδας. Η χορήγηση της 4-OHT ξεκινάει την 4^η ημέρα (500nM) και η αλλαγή του Stempro-34 γίνεται κάθε 2-3 ημέρες.

Τα παραπάνω βήματα για τη διαφοροποίηση των ESCs προς CPCs συνοψίζονται στην εικόνα 3.2:

A) Καλλιέργεια Μονοστιβάδας (Monolayer)



B) Εμβρυοειδή Σωματίδια (Embryoid Bodies, EBs)-Τεχνηκή: «Hanging Drops»



Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας διαφοροποίησης των ESCs προς CPCs και CMs.

Χημικά/Διαλύματα:

- Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS +CaCl₂, +MgCl₂)(Gibco)
- Λαμινίνη (Biolaminin LN521, BioLamina)
- 2i ESGRO (LIF,MEK1/2,GSK3) (Millipore complete medium) και Pen/StrepDulbecco's Modified Egale Medium (DMEM, Gibco), με P/S
- 2.5% Trypsin/EDTA (10x)(GIBCO)
- Fetal Bovine Serum (FBS heat inactivated, HI) (Gibco)

- SFD1: IMDM/Ham's F12 (Invitrogen), N2 supplement (Gibco), B27 supplement (Gibco), 10% bovine serum albumin (BSA) (Sigma), L-glutamine (Gibco), Pen-Strep (Gibco), 0.5 mM ascorbic acid (Sigma) και 0.45 mM monothioglycerol (MTG, Sigma). Το διάλυμα IMDM/Ham's F12 φιλτράρεται με ειδικό δοχείο με φίλτρο 0.22mm (Stericup) της Millipore.
- SFD2: Για την παρασκευή του SFD2 χρησιμοποιείται ως βάση το SFD1 με την προσθήκη των κυτταροκινών Activin A (8 ng/ml, R&D Systems), BMP4 (1.5 ng/ml, R&D Systems) και 5 ng/ml ανθρώπινου VEGF (R&D Systems).
- Stempro-34: Για την Παρασκευή του Stempro-34 χρησιμοποιείται το SF υγρό θρεπτικό μέσο (Gibco) με προσθήκη του supplement 34 πριν τη χρήση, 2 mM L-glutamine, Pen-Strep (Gibco), 0.5 mM ασκορβικό οξύ, οι ανθρώπινοι παράγοντες VEGF (5 ng/ml), bFGF (10 ng/ml, R&D Systems) και FGF10 (50 ng/ml, R&D Systems).

Τα παραπάνω θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται κατά τη διαφοροποίηση διατηρούνται στους 4°C. Οι κυτταροκίνες στα SFD2, Stempro-34 πρέπει να ανανεώνονται στις 5-7 ημέρες. Το ασκορβικό οξύ ανανεώνεται ανά 3 ημέρες.

Υλικά/Συσκευές:

- Πιάτα κυτταροκαλλιέργειας (24,96-well plate, Corning)
- Τρυβλία Petri (Corning)
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5804)
- Αιματοκυτόμετρο

3.1.5 Απομόνωση των CPCs με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής- φθορισμού (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

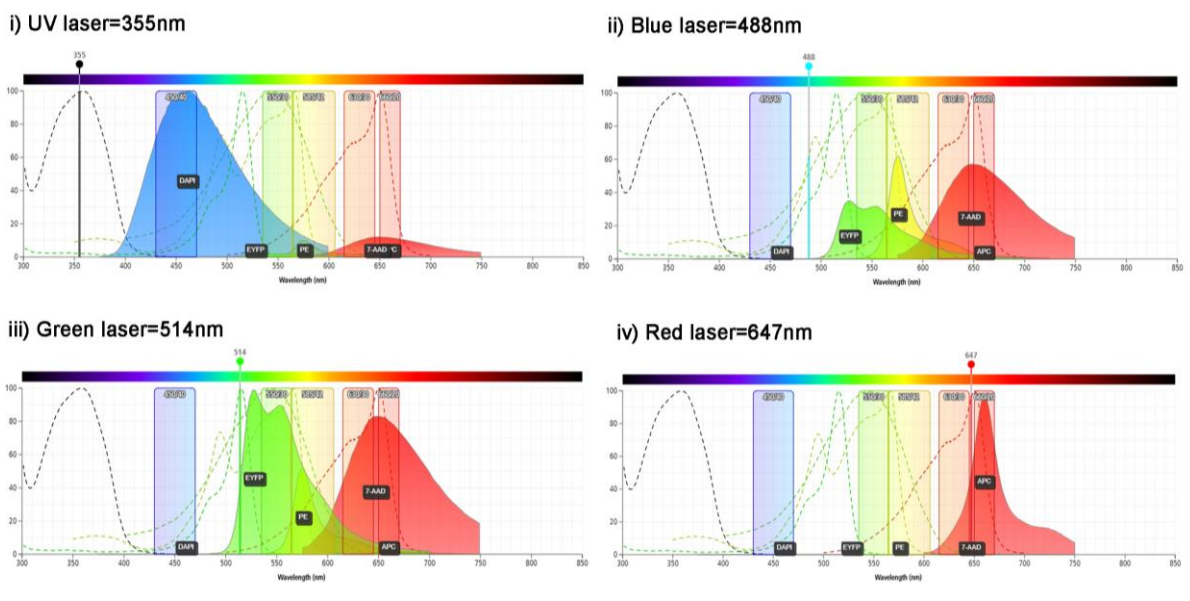
Με την κυτταρομετρία ροής πραγματοποιείται μελέτη και προσδιορισμός των κυττάρων με χρήση σημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές αντισωμάτων. Τα εξειδικευμένα αυτά αντισώματα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες επιφάνειας ενδεικτικές ενός συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού. Το κάθε αντίσωμα, ανάλογα με τη φθορίζουσα χρωστική που φέρει, απορροφά και εκπέμπει ενέργεια σε διαφορετικό μήκος κύματος. Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από μία πηγή φωτός, ένα σύστημα κατόπτρων και φίλτρων, διαδρομές για τη διέλευση υγρών και για την «εστίαση» των κυττάρων μέσα σε μία κυψελίδα ροής. Η ανάλυση των κυττάρων πραγματοποιείται κατά την ακτινοβολήσή τους από την πηγή φθορισμού όταν διέρχονται μέσα στην κυψελίδα. Η ανίχνευση των φωτεινών σημάτων από το ειδικά φίλτρα μεταφράζεται σε ηλεκτρική ενέργεια μέσα από ένα ηλεκτρονικό δίκτυο που μετατρέπει τα φωτεινά σήματα σε αριθμούς ανάλογους της έντασης του φωτός.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για το FACS είναι η εξής:

1. Απομάκρυνση θρεπτικού και τρυψινοποίηση των κυττάρων για 5 λεπτά με διάλυμα 0.05% θρυψίνης/EDTA στους 37°C.
2. Προσθήκη FBS HI και φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 1000rpm.
3. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 100μl διαλύματος του FACS (FACS buffer) που περιέχει το πρωτογενές (1^ο) αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης επιφάνειας ποντικού GFRA2 (Πίνακας 3.1) και μεταφέρονται σε 1.5ml erpendorff. Η επώαση με το 1^ο αντίσωμα διαρκεί 15 λεπτά στους 4°C. Ένα μέρος των κυττάρων που θα αποτελέσει το δείγμα ελέγχου (control), επαναδιαλύεται σε διάλυμα του FACS που δεν περιέχει αντίσωμα. Κατά τα άλλα η διαχείριση του control είναι ίδια με αυτή των υπόλοιπων δειγμάτων.
4. Προστίθεται 1ml FACS buffer και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά στις 2000rpm (πλύση).
5. Αμέσως μετά τα κύτταρα επαναδιαλύονται πάλι σε 100μl FACS buffer που περιέχει αυτή τη φορά το 2^ο αντίσωμα έναντι του anti-GFRA2, τη χρώση 7AAD που χρησιμοποιήθηκε για τον αποκλεισμό των νεκρών κυττάρων και τα υπόλοιπα αντισώματα που αναφέρονται αναλυτικά στον πίνακα (Πίνακα 3.1). Η δεύτερη επώαση διαρκεί επίσης 15 λεπτά στους 4°C, σε σκοτεινό μέρος.
6. Ακολουθεί η πλύση με το FACS buffer και η φυγοκέντρωσή τους για 3 λεπτά στις 2000rpm.
7. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε FACS buffer και τοποθετούνται σε 5ml falcon (FACS tube), αφού περάσουν από σήτα 70μm.
8. Η ανάκτηση των δειγμάτων γίνεται με το μηχάνημα FACSCalibur και η ανάλυσή τους με το λογισμικό FlowJo.

Αντίσωμα	Αραίωση, λ Διέγερσης/Εκπομπής (nm)	Χρώμα Εκπομπής	Laser Line
Anti-PDGFR beta antibody [APB5] Rat monoclonal Abcam	1:50 Excitation: 496 nm Emission: 578 nm	PE (purple)	Blue Laser Green Laser Yellow-Green Laser
anti-human/mouse GFRA2 Polyclonal Goat IgG (unconjugated) R&D Systems	1:13	-	-
donkey anti-goat IgG Alexa 405 conjugated Goat IgG Polyclonal (Abcam)	1:100 Excitation: 359 nm Emission: 461 nm	DAPI (Violet)	UV
anti-mouse KDR- Alexa647 Rat IgG2b Monoclonal BioLegend	1:100 Excitation:633/635 nm Emission:668nm	APC (Allophycocyanin) (Red)	Red laser
7AAD (7-amino- actinomycin D) Viability staining (BioLegend?)	1:50 Excitation: 488 nm Emission: 650nm	PerCP	Blue Laser

Πίνακας 3.1: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση των κυττάρων πριν το FACS .



Εικόνα 3.2: Τα lasers που χρησιμοποιήθηκαν στο FACS για τον ιονισμό των φθορίζοντων ομάδων των αντισωμάτων. Για κάθε ακτίνα laser συγκεκριμένου λ(nm) ακολουθεί η εκπομπή ενέργειας από τη φθορίζουσα

ομάδα των αντισωμάτων σε μεγαλύτερο μήκος κύματος στο ορατό φάσμα (400-700nm).

Χημικά/Διαλύματα:

- Διάλυμα του FACS: HBSS/3% FBS/ 3mM EDTA??
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco)
- Fetal Bovine Serum Heat Inactivated (FBS HI) (Gibco)
- 2.5% Trypsin/EDTA (10x)(GIBCO)

Υλικά/Συσκευές:

- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5804)
- Φυγόκεντρος (Heraeus Biofuge Pico)
- FACSCalibur (BD Biosciences)

3.2 Ανοσοκυτταροχημική Ανάλυση

Η ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry, ICC) είναι μέθοδος ημι-ποσοτική και βασίζεται στη χρήση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένων με χρωστικές φθορισμού με στόχο τον εντοπισμό ενός αντιγόνου σε κυτταρικό επίπεδο. Η λογική της χρήσης των φθορίζοντων αντισωμάτων είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω (3.1.5). Η σήμανση των αντισωμάτων με χρωστικές φθορισμού ή με ένζυμα επιτυγχάνεται με ομοιοπολική πρόσδεση των χρωστικών ή των ενζύμων σε κάποια λυσίνη ή κυστεΐνη του αντισώματος. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη σήμανση είναι η πολυμερική υπεροξειδάση και η αλκαλική φωσφατάση, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα. Συνήθως, χρησιμοποιείται η μέθοδος δύο στρωμάτων, η οποία περιγράφεται παρακάτω.

3.2.1 Μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 4% PFA

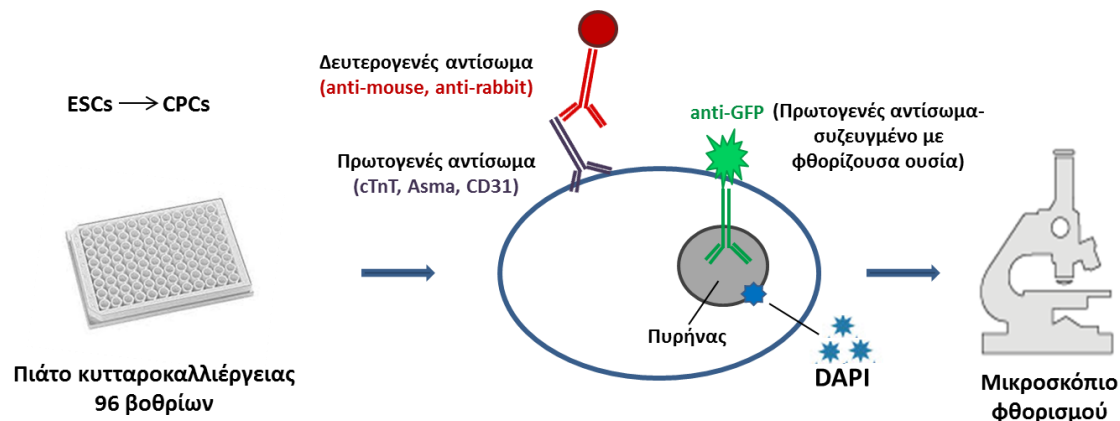
Για τα πειράματα της ICC η διαφοροποίηση των κυττάρων έγινε κυρίως σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 96 βοθρίων. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης η μονιμοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε τη 12^η ημέρα της διαφοροποίησης με την εξής διαδικασία:

1. Τη 12^η ημέρα της διαφοροποίησης των mESCs προς CMs, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (StemPro-34), και για τη μονιμοποίηση των κυττάρων προστίθεται 4% παραφορμαλδεύδη (4% PFA), η οποία έχει προθερμανθεί στους 37°C.
2. Το πιάτο κυτταροκαλλιέργειας με το μονιμοποιητικό διάλυμα, το οποίο χρησιμοποιείται για την σταθεροποίηση της δομής των κυττάρων και την προστασία τους από την αυτόλυση και τη βακτηριακή μόλυνση, αφήνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Ακολούθως, το διάλυμα 4% PFA απομακρύνεται και για την πλήρη απομάκρυνσή του γίνονται 3 πλύσεις με 1xPBS.
4. Τα μονιμοποιημένα πλέον κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν σε διάλυμα 1xPBS στους 4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.2.2 Χρώση των κυττάρων με τη χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε συνοψίζεται στην εικόνα 3.3 και είναι η εξής:



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της ICC για την ανοσοκυτταροχημική χρώση των κυττάρων.

1. Για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης γίνεται επώαση των κυττάρων με διάλυμα PBS που περιέχει 1% αλβουμίνη ορού μόσχου (Bovine Serum Albumin, BSA) και 0.2 % Triton-X 100 για 3 ώρες στους 4°C ή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Blocking solution).
2. Προσθήκη 1^{ου} αντισώματος: Το πρωτογενές αντίσωμα αναπτύσσεται συνήθως σε λαγό ή ποντίκι και αραιώνεται στο ίδιο διάλυμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Τα κύτταρα επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα όλη τη νύχτα (overnight, o/n) στους 4°C, στο σκοτάδι.
3. Την επόμενη μέρα, το πρωτογενές αντίσωμα απομακρύνεται, και η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται με 3 πλύσεις διάρκειας πέντε λεπτών η καθεμία με ρυθμιστικό διάλυμα 1xPBS.
4. Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος: Μετά το τέλος και της τρίτης πλύσης προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα, που αναπτύσσεται συνήθως σε κασίκα ή άλλα είδη ζώου, στις ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulin, IgG) του πρωτογενούς αντισώματος του ξενιστή και προσδένεται επί του πρωτογενούς αντισώματος. Το 2^ο αντίσωμα έχει σημανθεί με φθορίζουσα ομάδα έτσι ώστε, η θέση πρόσδεσής του να είναι ορατή στο μικροσκόπιο φθορισμού. Μαζί με το δευτερογενές αντίσωμα προστίθεται και το αντίσωμα anti-GFP, το οποίο έχει επίσης συντηχθεί με φθορίζουσα ομάδα. Τα αντισώματα αυτά αραιώνονται

επίσης σε διάλυμα 1%BSA/0.2% Triton-X 100/PBS. Η επώαση με τα αντισώματα αυτά διαρκεί 1 ώρα στους 4°C, στο σκοτάδι.

5. Για την απομάκρυνση του δευτερογενούς αντισώματος ακολουθούν επίσης 3 πλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία.
6. Τέλος, προστίθενται 1-2 σταγόνες/βοθρίο στο 96-άρι πιάτο από το mounting medium που περιέχει DAPI, το οποίο προσδένεται στο DNA και έτσι επιτρέπει την οπτικοποίηση των πυρήνων. Αμέσως μετά τα κύτταρα είναι έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση.
7. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με τη χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού Leica DM IPE2 με κάμερα Camera ORCA Flash 4.0 LT.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκυτταροχημείας της παρούσας μελέτης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντίσωμα	1° Αντίσωμα	2° Αντίσωμα	Κυτταρική τοπολογία
Anti-Cardiac Troponin T (cTnT) Mouse monoclonal Abcam	1:100	Alexa Fluor 555 Goat Anti-mouse IgG 1:400 Ex:555 Em:565	Καρδιομυοκύτταρα Κυτταρόπλασμα
Anti-alpha smooth muscle Actin (αSMA) Rabbit polyclonal Abcam	1:100	Alexa Fluor 647 Goat Anti-rabbit IgG 1:400 Ex:650 Em:668	Λεία μυϊκά κύτταρα Πυρήνας Κυτταρόπλασμα
Anti-CD31 Rabbit polyclonal Abcam	1:25	Alexa Fluor 647 Goat Anti-rabbit IgG 1:400 Ex:650 Em:668	Ενδοθηλιακά Κυτταρόπλασμα
Anti-gfp (conjugated, FITC) Goat polyclonal Abcam	1:100 Ex:493nm Em:528nm	—	Σε μέρος των καρδιομυοκυττάρων όπου εκφράζεται η πρωτεΐνη eYFP πυρήνας κυτταρόπλασμα

Πίνακας 3.2: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκυτταροχημική χρώση των κυττάρων.

Χημικά/Διαλύματα:

- 4% PFA/1xPBS
- DAPI mounting medium (Fluoroshield with DAPI, Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα blocking: 1%BSA/0.2% Triton-X 100/PBS

Υλικά/Συσκευές:

- Μικροσκόπιο φθορισμού Leica DM IPE2, Camera ORCA Flash 4.0 LT
- Vortex (Labnet)

3.3 Γονοτυπική ανάλυση για την απόκτηση των $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$ διαγονιδιακών ποντικών

Για την απόκτηση διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν το διπλό διαγονίδιο $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$ πραγματοποιήσαμε μια σειρά από διασταυρώσεις:

- **F0:** Αρχικά, γίνεται διασταύρωση μεταξύ των διαγονιδιακών knockin μοντέλων $Tbx5^{creERT2}$ και $ROSA26^{eYFP/eYFP}$ με το τελευταίο να εμφανίζει ομοζυγωτία για την αλληλουχία της πρωτεΐνης eYFP.
- **F1:** Στην F1 γενιά προκύπτουν ετερόζυγα άτομα που φέρουν ένα αλληλόμορφο του διαγονιδίου $ROSA26^{eYFP}$ και τα μισά περίπου (50%) από αυτά θα φέρουν το διαγονίδιο $Tbx5^{creERT2}$. Επιλέγονται τα άτομα της F1 γενιάς που φέρουν το $Tbx5^{creERT2}$ διαγονίδιο και διασταυρώνονται μεταξύ τους
- **F2:** Έτσι, στην F2 γενιά θα προκύψουν άτομα με τέσσερις διαφορετικούς γονοτύπους για το διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP}$ (+/+, +/eYFP, eYFP/+ eYFP/eYFP), το 75% των οποίων θα φέρει το διαγονίδιο $Tbx5^{creERT2}$ (+/+, cre/+, +/cre, cre/cre). Στη συνέχεια διασταυρώνονται αρσενικά και θηλυκά άτομα με γονότυπο $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$.
- **F3:** Τέλος, στην F3 γενιά πλέον όλα τα άτομα θα είναι ομόζυγα για το $ROSA26^{eYFP}$ και το 50% εξ αυτών θα φέρει το $Tbx5^{creERT2}$ διαγονίδιο.

Προκειμένου να ανιχνευθεί η παρουσία των διαγονιδίων $Tbx5^{creERT2}$ και $ROSA26^{eYFP}$, καθώς και του $ROSA26^{WT}$, έτσι ώστε να γίνει η σωστή διασταύρωση των ατόμων κάθε γενιάς με στόχο την απόκτηση του μοντέλου που φέρει το διπλό διαγονίδιο $Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), αφού προηγήθηκε η απομόνωση γενωμικού DNA από την ουρά των ποντικών.

3.3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από την ουρά ποντικού πραγματοποιήθηκε με αλκαλική λύση με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Συλλογή τμήματος 0.3cm από ουρά ποντικού, τοποθέτηση σε eppendorf 1.5ml.
2. Προσθήκη 75μl αλκαλικού διαλύματος λύσης σε κάθε ουρά ποντικού
3. Τοποθέτηση των ουρών μαζί με το αλκαλικό διάλυμα στους 95 °C σε heat-block για 1.5 ώρα.
4. Φυγοκέντριση για 3 λεπτά στις 2000 rpm πριν από το επόμενο βήμα για τη μείωση της θερμοκρασίας και αποφυγή της εξάτμισης του DNA κατά το άνοιγμα του eppendorf .
5. Προσθήκη 75 μl διαλύματος ουδετεροποίησης του pH. Το δείγμα μετά την προσθήκη αυτού του διαλύματος αφήνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Αμέσως μετά τα 10 λεπτά η απομόνωση του DNA έχει ολοκληρωθεί και το δείγμα είναι έτοιμο για την PCR. Η αποθήκευση γίνεται στους 4°C ή στους -20°C.

Χημικά/Διαλύματα:

- Διάλυμα αλκαλικής λύσης: 25mM NaOH, 0.2mM (pH~11.5)
- Διάλυμα ουδετεροποίησης: Tris-HCL 40mM (Προσαρμογή του pH (8 --> 5))

Συσκευές:

- Φυγόκεντρος (Heraeus Biofuge Pico)
- Block-Heater (Wealtec)

3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), είναι αντίδραση που χαρακτηρίζεται από μεγάλη ειδικότητα, ενισχύοντας στοχευμένα τμήμα μιας αλληλουχίας του γενετικού υλικού. Αρχικά, έχουμε αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA στους 95°C και ακολουθεί ο υβριδισμός των εκκινητών με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA στους 45-60°C. Τέλος, με τη δράση της Taq DNA πολυμεράσης, που είναι μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση έχουμε την επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση 5'→3'(72°C) και κατ' επέκταση τη δημιουργία συμπληρωματικής αλυσίδας ως προς τη μητρική. Για την ανίχνευση των διαγονιδίων Tbx5^{creERT2}, ROSA26^{eYFP} και του αγρίου τύπου ROSA26^{WT} οι αντιδράσεις, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν είναι οι εξής:

➤ Συστατικά Αντίδρασης (ThermoFischer):

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος ανά Αντίδραση(μl)
Εκμαγείο DNA	3
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 10x (Taq Buffer) (περιλαμβάνει 20mM MgCl ₂)	2.5
dNTPs (10mM)	0.5
Εμπρόσθιος εκκινητής διαγονιδίου (10mM)	1.25
Ανάστροφος εκκινητής διαγονιδίου (10mM)	1.25
Dreamtaq DNA πολυμεράση (5U/μl)	0.05
ddH ₂ O	16.5
Τελικός όγκος	25

➤ Συνθήκες Αντίδρασης:

Στάδιο	Θερμοκρασία		Χρόνος
	ROSA26 ^{eYFP/WT}	Tbx5 ^{creERT2}	
1. Αρχική αποδιάταξη	95°C	95°C	3 min
2. Αποδιάταξη DNA στόχου	95°C	95°C	15 s

3.	Υβριδισμός εκκινητών	58°C	60°C	15 s
4.	Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	72°C	30 s
5.	Επανάληψη των σταδίων 2,3, 4 για:	35 κύκλους	28 κύκλους	-
6.	Τελική επιμήκυνση	72°C	72°C	5 min

➤ Οι αλληλουχίες των 3 ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

ROSA eYFP	315: 5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'
	383: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'
ROSA WT	316: 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG -3'
	383: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'
Tbx5 creERT2	Cre2a: 5'-AGTTGCTTCAAAAATCCCTTCCAGGGCCCG-3'
	Cre3: 5'-AGCAATGCTGTTTCACTGGTTATGCGGCGG-3'

Συσκευές:

- Θερμοκυκλοποιητής (100™ Thermal Cycler, Bio- Rad)

3.3.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω του ιονισμού των φωσφορικών τους ομάδων, κι έτσι υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Μόρια νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους κινούνται με διαφορετική ταχύτητα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος αγαρόζης και η ταχύτητα μετακίνησής τους είναι συνάρτηση του μήκους τους, με τα μικρά μόρια να κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα, ενώ εξαρτάται ακόμα από το φορτίο και το σχήμα τους. Το αποτέλεσμα είναι διαφορετικού μεγέθους μόρια DNA να σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές του πηκτώματος.

• Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 2% (w/v):

1. Αραίωση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης 50X TAE σε 1X TAE με dH₂O.
2. Προσθήκη 2g αγαρόζης σε κωνική φιάλη και προσθήκη 100mL 1X TAE.
3. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαφανές.

4. Προσθήκη 5μL DNA Gel Stain και ελαφριά ανάμιξη.
5. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο με τα χτενάκια μέχρι να πολυμεριστεί πλήρως το πήκτωμα.
6. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που ήδη περιέχει το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X TAE).

Από τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται 15μl, αφού πρώτα προστίθενται 5μl διαλύματος φόρτωσης, με εφαρμογή τάσης 120V για 40 λεπτά. Οι ζώνες DNA γίνονται ορατές μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία. Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη των προϊόντων είναι 603bp για το ROSA^{WT}, 301bp για το ROSA^{eYFP}, 477bp για TBX5^{creERT2}.

Υλικά:

- Διάλυμα φόρτωσης: 40.15g σουκρόζη σε 80ml ddH₂O, προσθήκη 200mg Orange G (6x)
- Αγαρόζη (Agarose NIPPON Genetics Europe GmbH)
- 50X TAE: 2 M Tris acetate, 1M Glacial Acetic Acid, 0.05M EDTA, pH=8.2-8.4.
- Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics)

Συσκευές:

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Thermo Scientific)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης Thermo Scientific Electrophoresis EC1000-90
- Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας Gel Doc-It™ Imaging System (UVP)??

3.4 Διαβίωση και διατροφή του πειραματικού μοντέλου zebrafish

Η εκτροφή και η διαβίωση των πειραματόζων Danio rerio (zebrafish) πραγματοποιείται σε συγκεκριμένες συνθήκες στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA) σε συστήματα ανακύκλωσης και αποστείρωσης γλυκού νερού σε δοχεία 1, 3, 5 και 10 λίτρων. Στο ίδρυμα υπάρχουν δύο τέτοιες μονάδες, μία μικρότερη που διαθέτει δύο συστήματα και μία μεγαλύτερη και νεώτερη μονάδα πέντε συστημάτων, η οποία είναι ορατή στην εικόνα 3.4. Για την απολύμανση του νερού, πέρα από τα φίλτρα που υπάρχουν στα συστήματα, χρησιμοποιούνται λάμπες UV, καθώς με την υπεριώδη ακτινοβολία θανατώνονται οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που βρίσκονται μέσα στο νερό.



Εικόνα 3.4: Τα πέντε συστήματα της μεγαλύτερης μονάδας εκτροφής του zebrafish.

Η εναλλαγή φωτεινής–σκοτεινής περιόδου γίνεται τεχνητά με χρονοδιακόπτες και ο κύκλος περιλαμβάνει 14 ώρες φως και 10 ώρες σκότους. Η θερμοκρασία στα συστήματα διατηρείται σταθερή με τη χρήση αντιστάσεων και κυμαίνεται από 27°C έως 28.5°C, εύρος ιδανικό για ψάρια τροπικών κλιμάτων όπως το zebrafish, ενώ το νερό έχει pH ουδέτερο, δηλαδή 6.5-7.5. Σε ό,τι αφορά τη σύσταση του νερού, οι τιμές των συγκεντρώσεων των νιτρικών είναι <2.5mg/ml, των νιτρικών <0.025 mg/ml και η αγωγιμότητα κυμαίνεται από 400 έως 700 μ S. Όλες οι σχετικές με τα πειραματόζωα διαδικασίες είναι εγκεκριμένες από τις εθνικές αρχές και σύμφωνες με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Τα ενήλικα ψάρια ταΐζονται 2 φορές την ημέρα. Το πρωί η διατροφή τους περιλαμβάνει τη χορήγηση ζωντανής τροφής, δηλαδή εκκολαφθέντων προνυμφών του είδους *Artemia salina*. Η παρασκευή του διαλύματος ζωντανής γαρίδας γίνεται σε ανάστροφο κωνικό δοχείο στο οποίο προστίθεται 1L δις-απιονισμένο νερό, 34g αλάτων Instant Ocean και κατάλληλη ποσότητα αφυδατωμένων κύστεων *Artemia salina* (ZM Fish Food). Ακολουθεί η συνεχής ανάδευση και τροφοδότηση του διαλύματος με οξυγόνο για 48 ώρες, και τελικά, αφού γίνει ο διαχωρισμός των κελυφών που καθιζάνουν με τη χρήση μαγνήτη από τις ζωντανές γαρίδες, το διάλυμα της γαρίδα είναι έτοιμο και χορηγείται στα ψάρια με πλαστική πιπέτα Pasteur. Το μεσημέρι τα ψάρια ταΐζονται με εμπορικά διαθέσιμη ξηρά τροφή Z100 (ZM Fish Food) για τα ψάρια <2 μηνών ή Z300 /Z400 (ZM Fish Food) για τα ψάρια >2 μηνών.

3.5 Διασταύρωση και χειρισμός εμβρύων

Τα ενήλικα άτομα zebrafish, αφού εφόσον καθίστανται αναπαραγωγικά ώριμα 10-12 εβδομάδες μετά την γονιμοποίηση, μπορούν να διασταυρωθούν έως δύο φορές την εβδομάδα και είναι ενεργά όλη τη διάρκεια του έτους. Για την διασταύρωσή τους ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Το αρσενικό και το θηλυκό άτομο τοποθετούνται σε δοχείο 1L και διαχωρίζονται μεταξύ τους με μεταλλικό δίχτυ. Το θηλυκό τοποθετείται στην επάνω πλευρά και το αρσενικό κάτω από το μεταλλικό δίχτυ.

2. Έπειτα από περίπου 16 ώρες, που θα έχει παρέλθει ένας κύκλος φωτός-σκότους, το αρσενικό άτομο τοποθετείται μαζί με το θηλυκό στο πάνω μέρος του δικτιού. Τα αυγά που απελευθερώνονται από το θηλυκό μέσα στα πρώτα 30 λεπτά, γονιμοποιούνται, διαπερνούν το δίχτυ και καταλήγουν στο κάτω μέρος του δοχείου.

3. Ακολούθως γίνεται η συλλογή των αυγών με τη χρήση σουρωτηριού και τα ψάρια επιστρέφονται στα συστήματα από όπου προήλθαν.

4. Για την αποφυγή προσβολής από ενδεχόμενους παθογόνους μικροοργανισμούς, τα αυγά απολυμαίνονται με αραιό διάλυμα χλωρίνης (bleaching). Η επώαση των αυγών στο διάλυμα αυτό διαρκεί 5 λεπτά, και ακολούθως τα αυγά ξεπλένονται για 5 λεπτά με Egg Water (EW). Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για 1 φορά ακόμη.

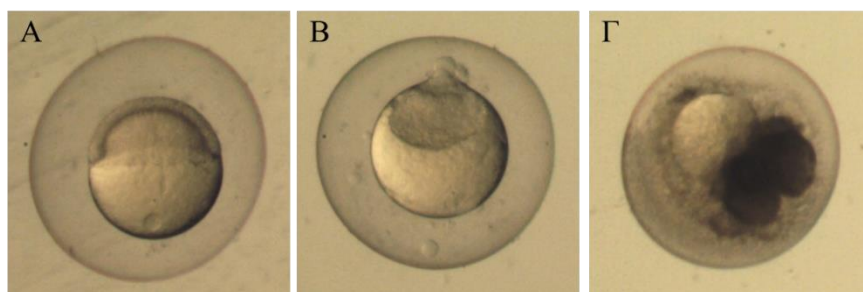
5. Τα γονιμοποιημένα έμβρυα (Εικόνα 3.5Α) διαχωρίζονται από τα μη γονιμοποιημένα (Εικόνα 3.5Β) και τα νεκρά (Εικόνα 3.5Γ) στο στερεοσκόπιο με τη χρήση μιας πλαστικής πιπέτας Pasteur.

6. Το EW αντικαθίσταται με EW εμπλουτισμένο με μπλε του μεθυλενίου, το οποίο έχει αντιμυκητιακή δράση.

7. Τα τριβλία με τα γονιμοποιημένα αυγά τοποθετούνται σε ειδικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C.

8. Στις 24hrf γίνεται αφαίρεση του χωρίου με την προσθήκη του ενζύμου προνάση στο διάλυμα EW που επωάζονται τα αυγά. Τα αυγά επωάζονται μαζί με την προνάση για 30 λεπτά στους 28°C. Το ένζυμο προστίθεται σε συγκέντρωση 20mg/ml σε 10ml EW.

9. Η προνάση ξεπλένεται με EW, και τα αυγά επωάζονται σε διάλυμα EW με PTU (1-phenyl 2-thiourea). Το PTU αναστέλλει τη μελανογένεση παρεμποδίζοντας τις διαδικασίες που σχετίζονται με την τυροσινάση στο μονοπάτι της μελανίνης. Η αναστολή της παραγωγής της μελανίνης από τα μελανοκύτταρα καθιστά διαφανή τα έμβρυα



Εικόνα 3.5: Στερεοσκοπικές εικόνες των αυγών 4 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Α) Στο γονιμοποιημένο αυγό διακρίνεται το συνεχώς διαιρούμενο κυτταρόπλασμα που περιορίζεται τελικά στις 4hrf σε μία στενή δισκοειδή μάζα πάνω από τη λέκιθο (στάδιο σφαίρας). Β) Στο αγονιμοποίητο αυγό η περιοχή του ζωικού πόλου είναι διαφανής. (Γ) Τα νεκρά ή μη γονιμοποιημένα αυγά φαίνονται μαυρισμένα έπειτα από κάποιες ώρες μετά τη γονιμοποίηση.

Τα έμβρυα διατηρούνται στον επωαστικό θάλαμο σε τρυβλία Petri με EW μέχρι την 5^η ημέρα μετά την γονιμοποίηση. Οι ενεργειακές του απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά καλύπτονται από τη λέκιθο κι έτσι δεν υπάρχει η ανάγκη χορήγησης εξωγενούς τροφής. Εφόσον παρέλθουν οι 5 drpf, τα έμβρυα μεταφέρονται στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων, όπου μεγαλώνουν σε δοχεία χωρητικότητας 1L και ταΐζονται με ξηρά τροφή Z000, δύο φορές την μέρα. Μετά την 30^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, γίνεται η μεταφορά τους στα συστήματα.

Χημικά/Διαλύματα:

- Egg water (EW): 0.3g/L Instant Ocean salts, 0.08 g/L CaSO₄, δις-απιονισμένο νερό (Double deionized water, ddH₂O)
- EW με μπλε του μεθυλενίου: Σε 1 λίτρο EW προστίθεται 1 ml από αρχικό διάλυμα μπλε του μεθυλενίου 10mg/L
- Τρυβλία Petri (Corning)
- Αραιό διάλυμα χλωρίνης (bleaching buffer): 180ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου 10% σε 500ml EW (Sigma-Aldrich)
- Προνάση (pronase): πρωτεάση από το βακτήριο *Streptomyces griseus*, συγκέντρωσης 20mg/ml (διαλύεται σε ddH₂O) (Calbiochem, 53702).
- Διάλυμα 1-φαινυλο 2-θειουρίας (PTU) σε EW (Sigma-Aldrich)
- Αναισθητικό διάλυμα Tricaine methanesulfonate 0,4%: 4gr Tricaine (Sigma-Aldrich) σε 1L H₂O, pH=7

Συσκευές:

- Ειδικός επωαστικός θάλαμος (ρυθμίζεται στους 28°C) (Lovibond Thermostatic cabinet)

3.6 Διαγονιδιακές σειρές zebrafish

Τα έμβρυα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν προέλθει από τη διασταύρωση ενήλικων διαγονιδιακών ατόμων zebrafish που έχουν προκύψει μέσω διαγονιδιακών τεχνικών (transgenesis), και φέρουν κάτω από επιλεγμένους υποκινητές αλληλουχίες που κωδικοποιούν φθορίζουσες πρωτεΐνες. Τα διαγονίδια αυτά κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και τα διαγονιδιακά ψάρια παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη και δεν εμφανίζουν φαινοτυπικές ή ιστολογικές ανωμαλίες. Οι σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

1. Tg (cmlc2:GFP)

Τα διαγονιδιακά cmlc2:gfp ψάρια εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη gfp στα κύτταρα του μυοκαρδίου. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη φθορίζουσα πρωτεΐνη, έχει κλωνοποιηθεί υπό του υποκινητή του γονιδίου cmlc2 (cardiac myosin light chain 2), που κωδικοποιεί την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης του κόλπου και της κοιλίας. Η έκφραση της cmlc2 ξεκινάει στο στάδιο των 13 σωματιών, δηλαδή περίπου στις 14hpf, στο στάδιο των 21 σωματιών η έκφρασή της είναι ενδεικτική του καρδιακού κώνου και από εκεί κι έπειτα διατηρείται καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξης.

2. Tg (Tp1:venus-PEST) και Tg(Tp1:h2B:mCherry)

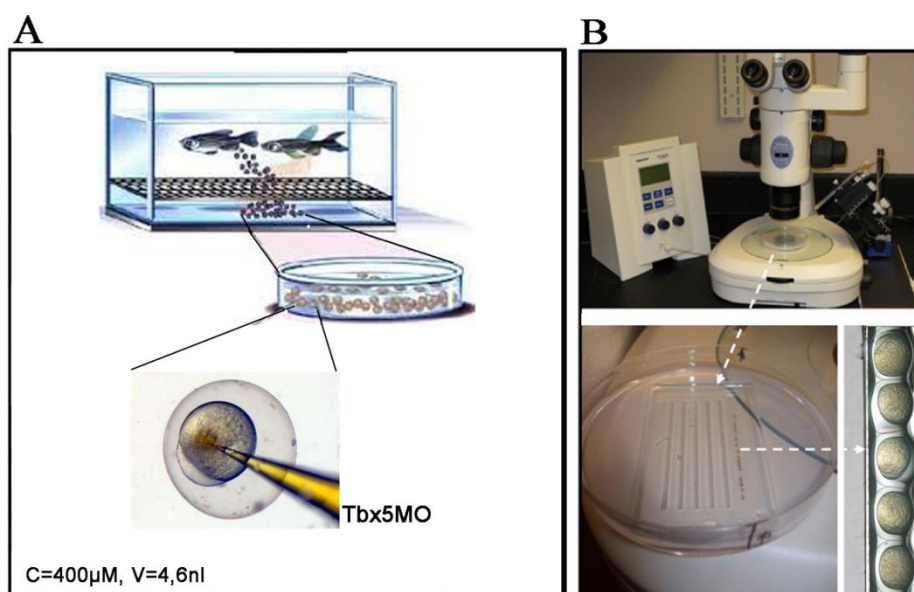
Πρόκειται για διπλή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει την πράσινη και κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, η αλληλουχία των οποίων είναι κλωνοποιημένη υπό έναν συνθετικό υποκινητή που αποκρίνεται στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch. Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη είναι μη σταθεροποιημένη (Venus-PEST) και έχει χρόνο ημιζωής 2h, σε αντίθεση με την GFP πρωτεΐνη με χρόνο ημιζωής 24 ώρες. Έτσι, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού του χρόνου ενεργοποίησης του Notch στο κοιλιακό ενδοκάρδιο [332]. Αντίθετα, η κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη παρουσιάζει αυξημένη σταθερότητα (Histone2BmCherry). Η αποικοδόμηση του PEST μειώνει σταδιακά τον χρόνο ημι-ζωής των πρωτεϊνών που είναι συζευγμένες με αυτόν (από 23 έως 2 ώρες για το GFP-PEST σε κύτταρα θηλαστικών) [333], ενώ οι φθορίζουσες πρωτεΐνες που συντήκονται με ιστόνες αποδίδουν περισσότερο χρόνο ημίσειας ζωής [334].

3.7 Μικροενέσεις αντισημαινόντων ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Tbx5

Τα αντισημαινόντα ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης έναντι του γονιδίου tbx5 (tbx5-Mo) σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικά ως προς την αλληλουχία του mRNA του tbx5 που βρίσκεται πριν από το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη μετάφρασή του. Τα μόρια Tbx5MO έχουν αλληλουχία: 5'-TTCAGTGTCCGCCATGTCGGAGAG-3'. Για την διαδικασία των μικροενέσεων των tbx5MO ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Για την παρασκευή του διαλύματος 400μM Tbx5MO γίνεται μίξη του εμπορικού διαλύματος των tbx5MO (GENE TOOLS), του ερυθρού της φαινόλης (Phenol Red) για να είναι ορατό το διάλυμα που ενίεται και αποστειρωμένου με UV νερού σε αναλογία 2:1:2.
2. Προετοιμασία της συσκευής μικροενέσεων, και τοποθέτηση της βελόνας στο φορέα με ρύθμιση της επιθυμητής κλίσης. Η βελόνα περιέχει σε όλο το μήκος της έτσι ώστε να δημιουργηθεί κενό αέρος.

3. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εισρόφηση με τη βελόνα του επιθυμητού διαλύματος που πρόκειται να ενεθεί
4. Αφού ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία στησίματος της βελόνας, το αρσενικό άτομο ενώνεται με το θηλυκό για να γίνει η διασταύρωση (Εικόνα 3.6A).
5. Συλλογή και μεταφορά των γονιμοποιημένων αυγών σε εκμαγείο αγαρόζης 2%, με αύλακες πλάτους όσο η διάμετρος του αυγού (Εικόνα 3.6B), το οποίο έχει αποκτήσει ίδια θερμοκρασία με αυτή των συστημάτων του ενυδρείου 28 °C.
6. Πραγματοποίηση ενέσεων με τη βοήθεια στερεοσκοπίου στο στάδιο που το γονιμοποιημένο αυγό βρίσκεται στο ένα κύτταρο (1-cell stage) (Εικόνα 3.6A). Η βελόνα εισάγεται στο ζωικό πόλο του αυγού, ιδανικά μέσα στο κύτταρο ή αλλιώς στη λέκιθο όσο το δυνατόν πιο κοντά στο κύτταρο . Ο όγκος που ενίεται σε κάθε αυγό είναι 4.6nl. Η επιτυχία της ένεσης επιβεβαιώνεται από το κόκκινο αποτύπωμα στη λέκιθο λόγω του ερυθρού της φαινόλης.
7. Συλλογή των αυγών που ενέθηκαν σε τρυβλία Petri με EW.
8. Η υπόλοιπη διαδικασία παραμένει ίδια με αυτή που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.4.



Εικόνα 3.6: **A)** Συλλογή εβρύων σε τρυβίο έπειτα από τη διασταύρωση. Τα έμβρυα ενίονται στη λέκιθο στην περιοχή του ζωικού πόλου όσο γίνεται πιο κοντά στο κύτταρο. Η συγκέντρωση του διαλύματος των *tbx5 morpholino* είναι 400µl, και ο όγκος που ενίεται σε κάθε έμβρυο είναι 4.6nl. **B)** Τα έμβρυα τοποθετούνται στη σειρά στις αύλακες ενός εκμαγείου αγαρόζης, και ενίονται κάτω από το στερεοσκόπιο.

Χημικά/Διαλύματα:

- Διάλυμα *Tbx5-MO* 1mM (GENE TOOLS)
- Διάλυμα ερυθρού της φαινόλης
- Egg Water

ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

- Συσκευή μικροενέσεων (Drummond Nanoject II Auto-Nanoliter Injector)
- Στερεοσκόπιο Nikon SMZ800

3.8 Χρώση των εμβρύων zebrafish με τη φαλλοϊδίνη

3.8.1 Μονιμοποίηση εμβρύων με διάλυμα PFA

Τα έμβρυα μονιμοποιήθηκαν στις 4dpf ή 96hpf με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Αναισθητοποίηση των εμβρύων με τη χρήση Tricaine.
2. Μεταφορά των εμβρύων σε Eppendorf 1,5ml.
3. Απομάκρυνση του EW και προσθήκη διαλύματος PFA 4%/1xPBS.
4. Διατήρηση των εμβρύων στους 4°C ο/ν ή 3h σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ξέπλυμα των εμβρύων με διάλυμα 1xPBS τρεις φορές.
6. Διατήρηση των εμβρύων σε 1xPBS στους 4°C.

3.8.2 Χρώση φαλλοϊδίνης

Η φαλλοϊδίνη είναι ένα δικυκλικό πεπτίδιο με υψηλή εξειδίκευση που βάφει τα νημάτια της ακτίνης (F-actin). Στην παρούσα μελέτη η φαλλοϊδίνη που χρησιμοποιήθηκε έχει συντηχθεί με φθορίζουσα ομάδα (conjugated) που εκπέμπει φωτεινή ενέργεια στα 633nm (FaRed). Η χρήση της, λοιπόν, επιτρέπει την οπτικοποίηση του μυοκαρδίου με τη μέθοδο της συνεστιακής μικροσκοπία. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Τα έμβρυα που έχουν μονιμοποιηθεί και βρίσκονται σε 1xPBS μεταφέρονται σε 1,5ml Eppendorf έτσι ώστε ο αριθμός τους να μην ξεπερνά τα 25 έμβρυα/eppendorff.
2. Γίνονται 3 πλύσεις (700-1000μl), 15 λεπτών η καθεμία με διάλυμα PBS-Triton 0.3% (PBST), κατά τη διάρκεια των οποίων η ανακίνηση είναι συνεχής (rotator).
3. Για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων γίνεται επώαση των εμβρύων με διάλυμα 4%BSA/PBST για 1.5 ώρα με συνεχή ανακίνηση.
4. Ακολουθεί η επώαση με τη φαλλοϊδίνη (biotium), η οποία αραιώνεται 500 φορές (1:500) σε διάλυμα 4%BSA/PBST. Το δείγμα τοποθετείται στους 4°C και ανακινείται καθόλη τη διάρκεια της νύχτας.
5. Την επόμενη ημέρα, για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος πραγματοποιούνται 5-6 πλύσεις με PBST διάρκειας 15 λεπτών η καθεμία με συνεχή ανακίνηση.
6. Απομάκρυνση του PBST και προσθήκη του 1xPBS. Τα δείγματα διατηρούνται σε 1xPBS στους 4°C, για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.9 Απεικονιστικές Μέθοδοι

Η οπτική απεικόνιση των μονιμοποιημένων εμβρύων με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Microscopy), η οποία επιτρέπει την ανακατασκευή της τρισδιάστατης δομής του αντικειμένου από τις εικόνες που λαμβάνονται. Επιπλέον, η τοποθέτηση πολύ μικρού διαφράγματος (Pinhole=1) στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτικού φακού για την εξάλειψη του φωτός από τα μη εστιασμένα σημεία του αντικειμένου οδηγεί σε αυξημένη ευκρίνεια σε σχέση με το απλό μικροσκόπιο. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι ο εξής: Upright Confocal και Deconvolution Workstation LEICA SP5 II.

Προετοιμασία δείγματος για συνεστιακή μικροσκοπία:

- I. Εναπόθεση των εμβρύων (7-10) σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
- II. Σχηματισμός ενός τετραγώνου με βαζελίνη γύρω από τα έμβρυα, για να τοποθετηθεί από πάνω η καλυπτρίδα δημιουργώντας ένα πηγαδάκι.
- III. Διευθέτηση των εμβρύων με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί ο επιθυμητός ιστός.
- IV. Κάλυψη με την καλυπτρίδα.
- V. Προσθήκη γλυκερόλης 70% σε 1xPBS.

Η οπτική απεικόνιση των εμβρύων έλαβε χώρα με την χρήση του στερεοσκοπίου Nikon SMZ800, με κάμερα Digital camera Sony Leica DFC 500 και του ανάστροφου μικροσκοπίου Leica DM IPE2 με κάμερα Camera ORCA Flash 4.0 LT.

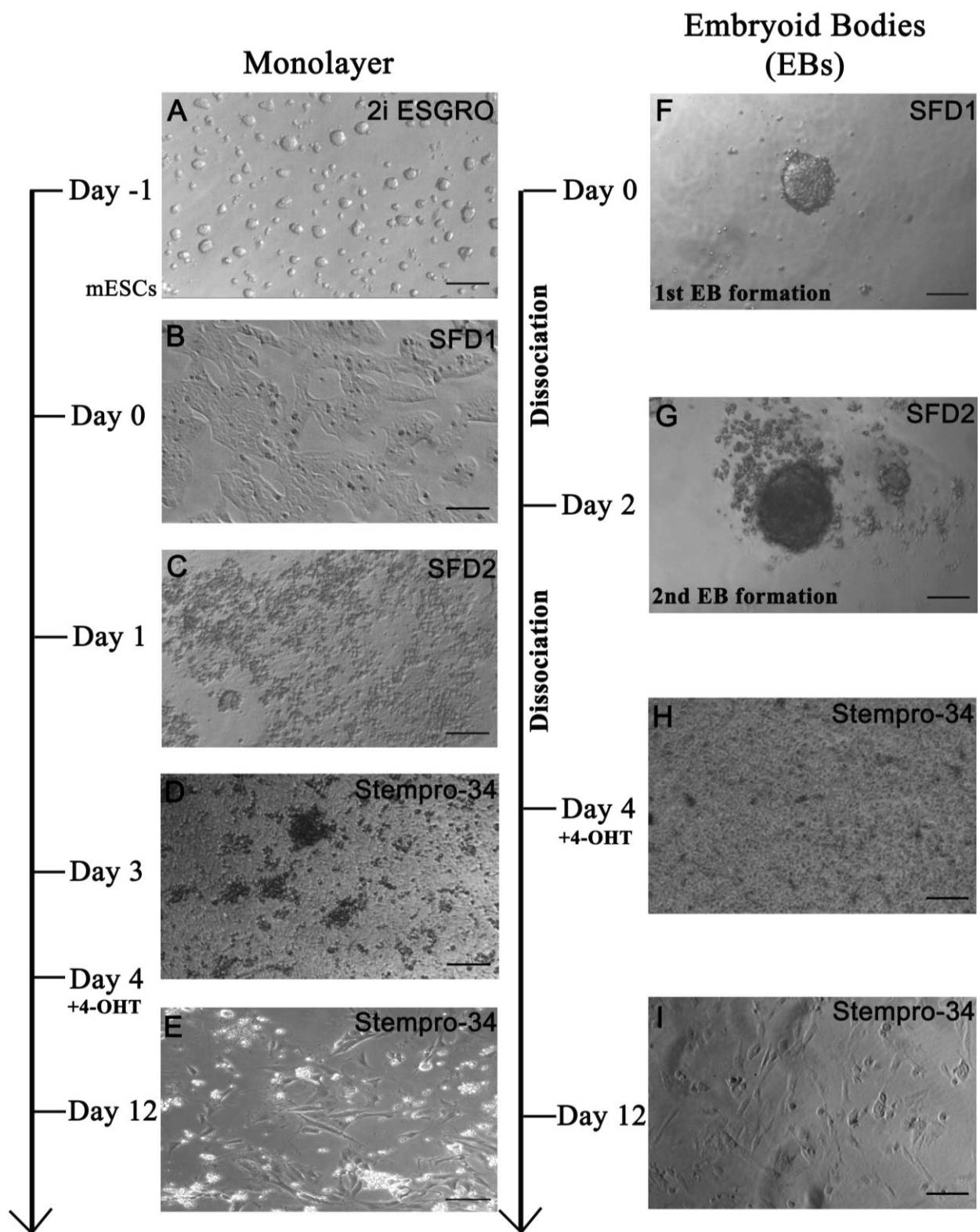
4. Αποτελέσματα

4.1 Μορφολογία των κυττάρων κατά τα στάδια διαφοροποίησης των mESCs προς CMs για την απόκτηση του επιθυμητού πληθυσμού CPCs.

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, αρκετές και διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τη διαφοροποίηση των mESCs προς κύτταρα που ομοιάζουν με καρδιομυοκύτταρα. Στην προσπάθεια απόκτησης του επιθυμητού πληθυσμού CPCs, ενός πληθυσμού δηλαδή που θα ανήκει στο FHF και θα δίνει γέννηση μόνο σε καρδιομυοκύτταρα, βασιστήκαμε στο πρωτόκολλο διαφοροποίησης των mESCs προς CMs που δημοσίευσαν οι Kokkinopoulos *et al.*, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές τεχνικές διαφοροποίησης των κυττάρων, αυτή της καλλιέργειας μονοστιβάδας και των εμβρυοειδών σωματιών. Το εν λόγω πρωτόκολλο διαφοροποίησης που περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 3.1.4 απαρτίζεται από 3 διακριτά στάδια.

Πιο συγκεκριμένα, κατά την καλλιέργεια μονοστιβάδας αρχικά έχουμε την προσκόλληση των mESCs στο υπόστρωμα της λαμινίνης και τον πολλαπλασιασμό τους στο θρεπτικό μέσο 2i ESGRO, για 24-48 ώρες οδηγώντας στην δημιουργία μικρών κλώνων (Εικόνα 4.1A), και ακολούθως στο SFD1 για 24 ώρες (Εικόνα 4.1B). Η επαγωγή του καρδιακού μεσοδέρματος γίνεται με την προσθήκη του SFD2 και των κυτταροκινών VEGF-A, Activin A και BMP4 (Εικόνα 4.1C). Μετά από δύο ημέρες γίνεται η αλλαγή του SFD2 από το Stempro-34 που εμπεριέχει τους παράγοντες bFGF, FGF10 και VEGF-A για την καρδιακή εξειδίκευση και ωρίμανση των κυττάρων (Εικόνα 4.1D). Η προσθήκη της 4-OHT ξεκινάει την 4^η ημέρα της διαφοροποίησης. Τα κύτταρα διατηρούνται στο Stempro-34 μέχρι την περαιτέρω διαφοροποίησή τους (Εικόνα 4.1E).

Στην περίπτωση των EBs, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η δημιουργία των κλώνων στο SFD1 γίνεται δημιουργώντας μια τρισδιάστατη σφαιρική δομή σε κάθε σταγόνα (Εικόνα 4.1F). Για τη μεταφορά των κυττάρων στο SFD2 πραγματοποιείται αποδιοργάνωση αυτής της δομής με τρυψινοποίηση των κυττάρων, ενώ στο SFD2 έχουμε τη δημιουργία των νέων εμβρυοειδών σωμάτων (Εικόνα 4.1G). Η αλλαγή του SFD2 στο Stempro-34 γίνεται με την αποδιοργάνωση των EBs, την επαναδιάλυση των κυττάρων στο Stempro-34 και τη μεταφορά τους σε καλλιέργεια μονοστιβάδας, σε υπόστρωμα λαμινίνης, σε 24άρι πιάτο κυτταροκαλλιέργειας (Εικόνα 4.1H). Και σε αυτήν την περίπτωση η προσθήκη της 4-OHT ξεκινάει την 4^η ημέρα διαφοροποίησης και τα κύτταρα αφήνονται να διαφοροποιηθούν πλήρως στο Stempro-34 (Εικόνα 4.1I).



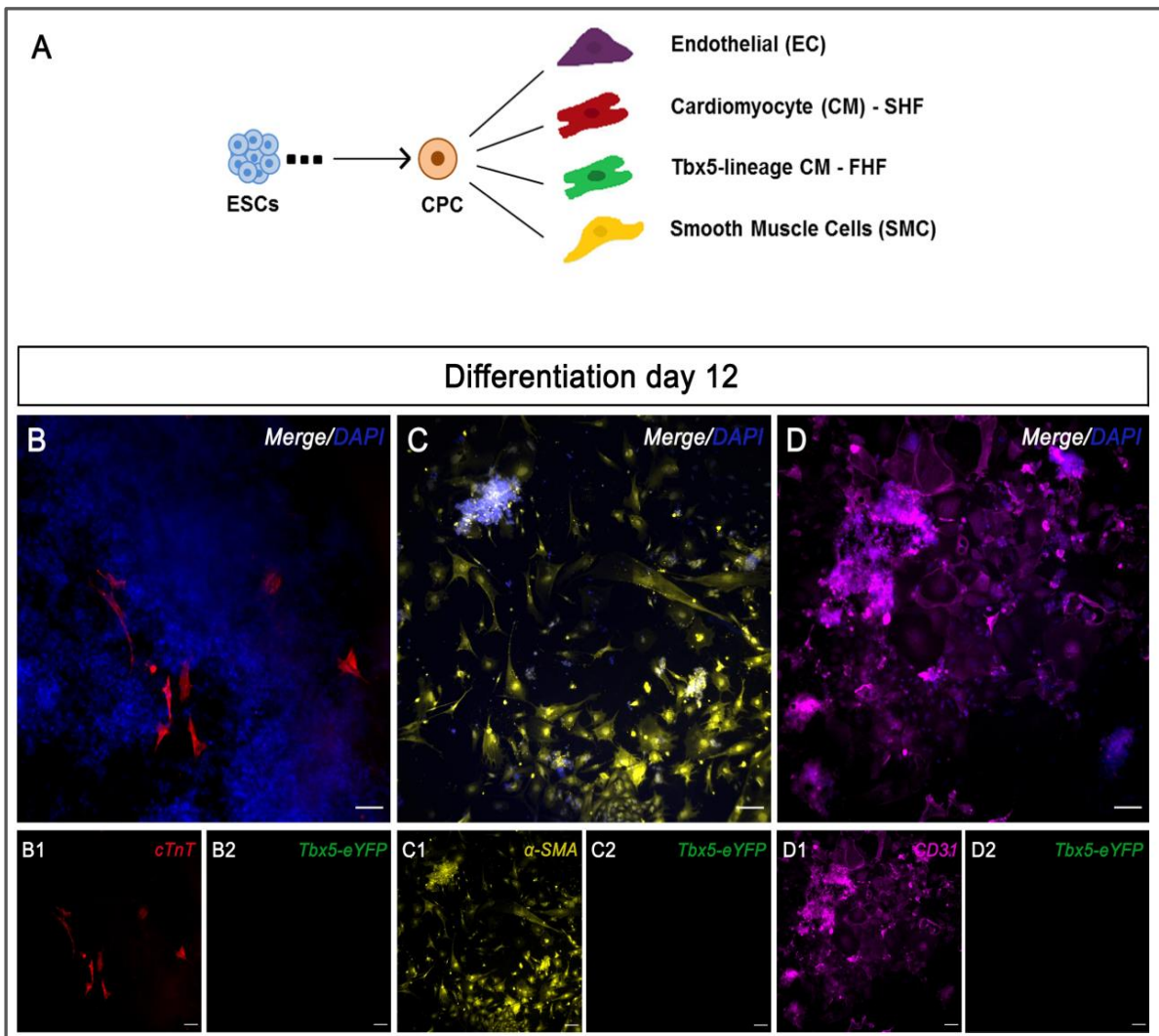
Εικόνα 4.1: Διαφοροποίηση των mESCs προς CMs για την απόκτηση CPCs *in vitro*, με χρήση της καλλιέργειας μονοστιβάδας (Monolayer) και των EBs. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας στις οποίες φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων μετά την αλλαγή κάθε θρεπτικού μέσου για τις δύο διαφορετικές τεχνικές. **(A-E) Καλλιέργεια μονοστιβάδας.** (A) Μορφολογία των mESCs στο 2iESGRO (Day -1), (B) Διαφοροποίηση των κυττάρων στο SFD1 (Day 0), (C) στο SFD2 (Day 1) και (D) στο Stempro-34 (Day 3), (E) Διαφοροποίηση των κυττάρων στο Stempro34 (Day 12). **(F-I) Καλλιέργεια EBs.** (F) 1^{ος} σχηματισμός των EBs στο SFD1 (Day 0), (G) 2^{ος} σχηματισμός των EBs στο SFD2 (Day 2) (H) Αποδιοργάνωση των EBs και διαφοροποίησή τους στο Stempro-34 (Day 4). (I) Διαφοροποίηση των κυττάρων στο Stempro-34 (Day 12). Προσθήκη της 4-OHT την 4^η ημέρα (Day 4). Οι φωτογραφίες απεικονίζονται με κλίμακα 100μM.

4.2 Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση των διαφοροποιημένων mESCs

Η ελλιπής κατανόηση των αναπτυξιακών διαδικασιών της καρδιάς, έχει ως αποτέλεσμα πρωτόκολλα τα οποία χρησιμοποιούνται για την απόκτηση καρδιομυοκυττάρων, να οδηγούν σε έναν ανομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό, ο οποίος αποτελείται από κύτταρα που ομοιάζουν με CM, καθώς κι από άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως είναι τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Στη σχετικά πρόσφατη δημοσίευση του πρωτοκόλλου στο οποίο βασίστηκε η παρούσα μελέτη, το 60% περίπου των διαφοροποιημένων κυττάρων είναι κύτταρα cTnT⁺, δηλαδή κύτταρα που ομοιάζουν σε CM. Στον ίδιο διαφοροποιημένο πληθυσμό έγινε επιβεβαίωση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Tbx5 με q-PCR. Προκειμένου, λοιπόν, να γίνει έλεγχος της επιτυχούς αναπαραγωγής του εν λόγω πρωτοκόλλου, καθώς και της έκφρασης του Tbx5 στα διαφοροποιημένα CM πραγματοποιήθηκε ανοσοκυτταροχημική ανάλυση για το χαρακτηρισμό των διαφοροποιημένων mESCs (Εικόνα 4.2A).

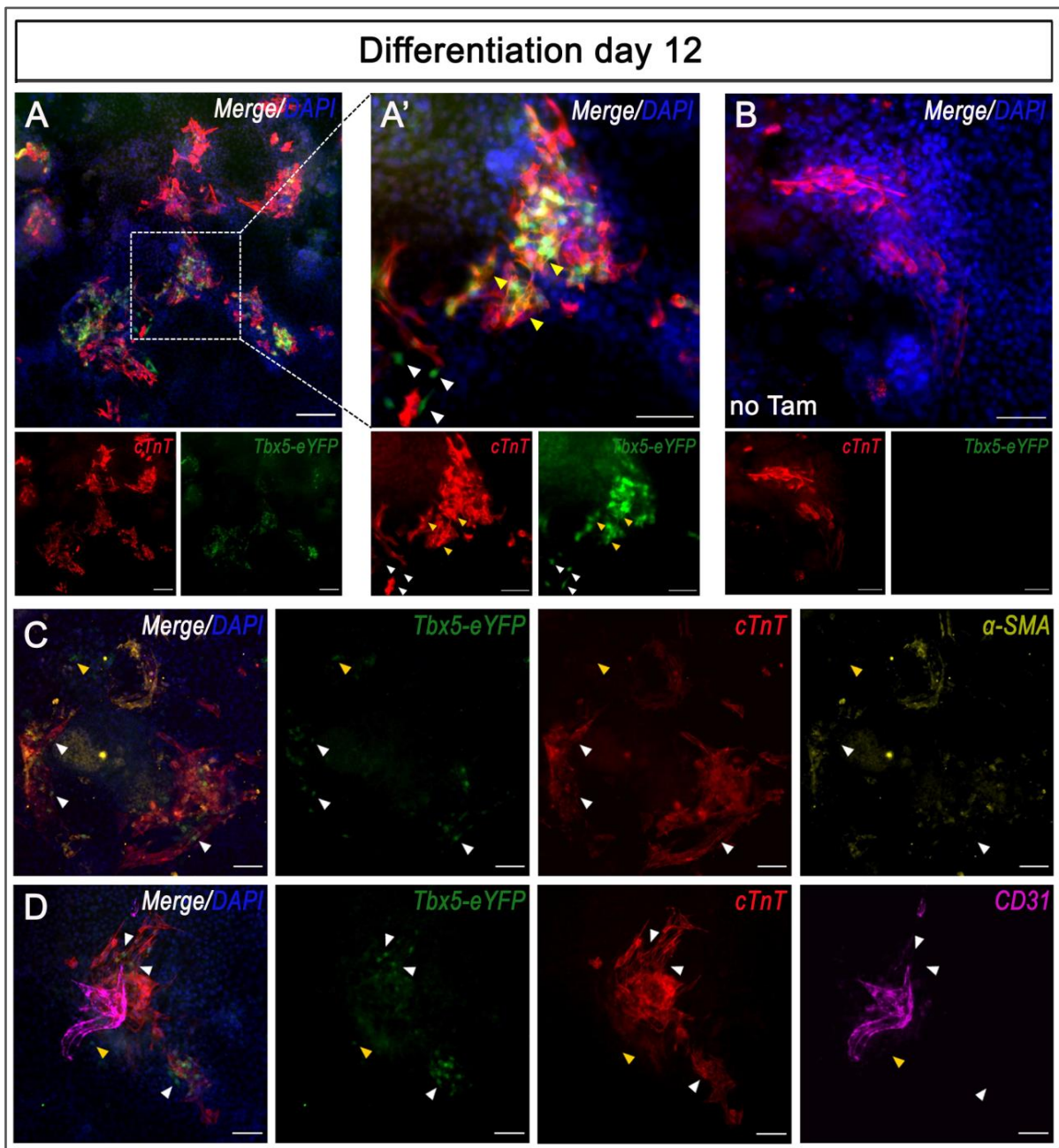
Για το σκοπό αυτό έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων τη 12^η ημέρα της διαφοροποίησης, χρονική στιγμή κατά την οποία είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα διαφοροποιημένα mESCs έχουν εκφράσει την πρωτεΐνη cTnT, ενδεικτική των CM. Έτσι, για το χαρακτηρισμό του διαφοροποιημένου πληθυσμού έγινε χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών cTnT, α-SMA, CD31 για την ταυτοποίηση των CM, των vSMCs και των ECs, αντίστοιχα. Η χορήγηση της 4-OHT την 4^η ημέρα της διαφοροποίησης έχει ως αποτέλεσμα σε κύτταρα στα οποία έχει εκφραστεί ο TF Tbx5, και κατ' επέκταση το υβριδικό μόριο της ρεκομπινάσης CreER^{T2}, να έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός με αποτέλεσμα την εκτομή του ενδιαμέσου τμήματος DNA μεταξύ των δύο αλληλουχιών loxP και τελικά την έκφραση της πρωτεΐνης eYFP. Τα κύτταρα αυτά είναι ορατά με τη χρήση αντισώματος έναντι της πράσινης/ κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης eYFP. Οι εικόνες που ακολουθούν είναι ενδεικτικές δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, κατά τα οποία ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα διαφοροποίησης των mESCs προς CMs, με τη μονιμοποίηση των κυττάρων να πραγματοποιείται τη 12^η ημέρα της διαφοροποίησης και στα δύο. Το αποτέλεσμα αυτής της διαφοροποίησης, ωστόσο, φαίνεται να είναι διαφορετικό, όπως προκύπτει από τις εικόνες αυτές.

Στην εικόνα 4.3, μπορούμε να διακρίνουμε και τους 3 τύπους κυττάρων της καρδιάς (CMs, SMCs, ECs), οι οποίοι έχουν προκύψει από τη διαφοροποίηση των mESCs. Από τις παρακάτω αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες είναι εμφανές ότι η ποιοτική διαφορά που παρατηρείται στον αριθμό των cTnT⁺ συγκριτικά με αυτόν των α-SMA⁺ και CD31⁺ κυττάρων είναι αισθητή. Πιο συγκεκριμένα, η αναλογία των καρδιομυοκυττάρων (cTnT⁺) στο συνολικό πληθυσμό των κυττάρων είναι αρκετά μικρή, ενώ δεν παρατηρείται η έκφραση του Tbx5 στα CM, αλλά και γενικά στην καλλιέργεια (Εικόνα 4.2B,B1,B2). Από την άλλη ο αριθμός των vSMCs είναι αρκετά μεγάλος και τα κύτταρα αυτά φαίνεται να αποτελούν την πλειοψηφία των διαφοροποιημένων κυττάρων (Εικόνα 4.2C,C1,C2), ενώ μεγάλος φαίνεται να είναι και ο αριθμός των ECs (Εικόνα 4.2D,D1,D2). Σε κανέναν από αυτούς τους δύο κυτταρικούς τύπους δεν εντοπίζεται η έκφραση του TF Tbx5.



Εικόνα 4.2: Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση στα διαφοροποιημένα mESCs τη 12^η ημέρα της διαφοροποίησης. **A)** Σχηματική αναπαράσταση της διαφοροποίησης των mESCs σε κύτταρα της καρδιάς. Τα διαφοροποιημένα mESCs εκφράζουν **B)** την πρωτεΐνη των καρδιομυοκυττάρων *cTnT*. **C)** των vSMCs, α -SMA και **D)** των ECs CD31. Κανένας από αυτούς τους κυτταρικούς τύπους δεν εκφράζει τον TF Tbx5. Κλίμακα: 100 μ M (B,C, D), 50 μ M (B1-2,C1-2, D1-2).

Σε επανάληψη του ίδιου πειράματος με τις βέλτιστες δυνατές συνθήκες όπως είναι η συχνότερη αλλαγή φρεσκοφτιαγμένων θρεπτικών μέσων, το αποτέλεσμα που προέκυψε είναι πολύ διαφορετικό από το προηγούμενο. Θα παρατηρήσουμε, λοιπόν, όπως είναι φανερό στην Εικόνα 4.2Α-Α', έναν πολύ μεγαλύτερο αριθμό καρδιομυοκυττάρων, ενώ μέρος αυτών των κλώνων φαίνονται πράσινοι, εκφράζουν δηλαδή των TF Tbx5. Μάλιστα ένα μέρος αυτών των πράσινων κυττάρων δεν έχει προλάβει να εκφράσει την πρωτεΐνη cTnT (άσπρα βέλη), ενώ ένα άλλος μέρος εκφράζει ταυτόχρονα τις πρωτεΐνες cTnT και Tbx5 (κίτρινα βέλη) (Εικόνα 4.3Α'). Σε κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε η 4-OHT, δεν εντοπίσαμε πράσινα κύτταρα (Εικόνα 4.3B). Ακόμα, ο αριθμός των α-SMA κυττάρων είναι πολύ μικρότερος συγκριτικά με το προηγούμενο πείραμα, ενώ στα κύτταρα αυτά δεν εντοπίζουμε την έκφραση του Tbx5, όπως συμβαίνει στα cTnT⁺ κύτταρα της ίδιας εικόνας. (Εικόνα 4.3C). Το ίδιο συμβαίνει και με τα ECs τα οποία εμφανίζονται επίσης σε μικρότερο ποσοστό στα διαφοροποιημένα κύτταρα σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα, ενώ και σε αυτά δεν εντοπίζουμε την έκφραση του Tbx5 (Εικόνα 4.3D). Η έκφραση του Tbx5 μόνο στα cTnT⁺ κύτταρα επιβεβαιώνει την μονοδυναμία των κυττάρων που εκφράζουν αυτό το μεταγραφικό παράγοντα, ενώ η απόκλιση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα δύο πειράματα αποδεικνύει τη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων σε ό,τι αφορά τα πρωτόκολλα διαφοροποίησης.



Εικόνα 4.3: Μόνο τα cTnT⁺ κύτταρα εκφράζουν τον TF Tbx5 τη 12^η ημέρα διαφοροποίησης. A-A') Διαφοροποιημένα mESCs που εκφράζουν την πρωτεΐνη cTnT και τον Tbx5. **B)** Κύτταρα cTnT⁺ στα οποία δεν έχει χορηγηθεί 4-OHT. **C)** Τα α-SMA⁺ κύτταρα δεν εκφράζουν τον Tbx5. **D)** Μόνο τα cTnT⁺ κύτταρα και όχι τα CD31⁺ εκφράζουν τον Tbx5. άσπρα βέλη: πράσινα κύτταρα που εκφράζουν μόνο τον Tbx5, κίτρινα βέλη: κύτταρα στα οποία υπάρχει συνέκφραση του Tbx5 με την πρωτεΐνη cTnT. Κλίμακα: 100 μM (A, C, D), 50μM (A', B).

4.3 Απόκτηση του βέλτιστου πληθυσμού CPCs από mESCs

Ένας από τους κύριους στόχους της παρούσας διπλωματικής μελέτης είναι η *in vitro* απόκτηση των CPCs και ο διαχωρισμός αυτών του FHF, από αυτά του SHF. Τα CPCs που θα ομοιάζουν με αυτά του FHF, θα εκφράζουν τον TF Tbx5, και κατ' επέκταση μέσω του ανασυνδυασμού που θα πραγματοποιηθεί από την Cre ρεκομπινάση που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου Tbx5, την πρωτεΐνη eYFP. Κατ' αυτόν τον τρόπο θα είναι εφικτή η απομόνωσή τους μέσω της κυτταρομετρίας ροής-φθορισμού (FACS). Προηγούμενες *in vitro* μελέτες αναφέρουν ότι ο πληθυσμός KDR⁺/PDGFRA⁺ [46, 125, 240] αποτελείται κυρίως από κύτταρα πολυδύναμα τα οποία διαφοροποιούνται σε όλους τους καρδιακούς κυτταρικούς τύπους τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο. Άλλες *in vitro* μελέτες αναφέρουν επίσης ότι ο κυτταρικός πληθυσμός GFRA2⁺/PDGFRA⁺ διαφοροποιείται κυρίως σε καρδιομυοκύτταρα [58]. Έτσι, για το διαχωρισμό των CPCs του FHF κρίθηκε αναγκαία η απομόνωση ενός κυτταρικού πληθυσμού που θα εκφράζει τον TF Tbx5 και θα είναι τριπλά θετικός για τις πρωτεΐνες επιφάνειας Kdr, Pdgfra και Gfra2.

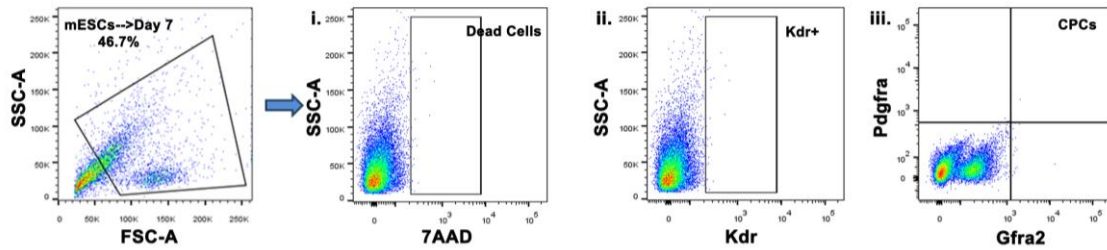
Για την επιβεβαίωση των παραπάνω δημοσιευμένων παρατηρήσεων, αλλά και την απόκτηση ενός βέλτιστου πληθυσμού CPCs μέσω της *in vitro* διαφοροποίησης των mESCs, πραγματοποιήσαμε μία σειρά πειραμάτων FACS. Στόχος, λοιπόν, αυτών των πειραμάτων ήταν αφενός να βρεθεί η βέλτιστη χρονική στιγμή κατά την οποία ο συνολικός πληθυσμός των διαφοροποιούμενων κυττάρων να είναι εμπλουτισμένος στον τριπλά θετικό πληθυσμό Kdr⁺/Pdgfra⁺/Gfra2⁺ που θα εκφράζει ταυτόχρονα και τον TF Tbx5, κι αφετέρου η βέλτιστη στρατηγική απομόνωσης των CPCs του FHF. Έτσι, έπειτα από τη διαφοροποίηση των mESCs προς CMs με τη χρήση του πρωτοκόλλου που αναφέρθηκε παραπάνω, έγινε χρήση φθοριζόντων αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων Kdr, Pdgfra και Gfra2 για την ταυτοποίηση του επιθυμητού πληθυσμού και το χαρακτηρισμό των διαφοροποιούμενων κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, για το χαρακτηρισμό του διαφοροποιούμενου πληθυσμού επιλέχθηκαν οι ημέρες 3,6,7,9,10 και 13 της διαφοροποίησης. Για να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητα διαφοροποίησης των mESCs προς CPCs μέσω της τρισδιάστατης καλλιέργειας σε σχέση με την καλλιέργεια μονοστιβάδας, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τα διαφοροποιημένα κύτταρα που προέκυψαν από EBs για επιλεγμένες χρονικές στιγμές, και συγκεκριμένα για τις ημέρες 9 και 10 της διαφοροποίησης.

Αρχικά, ήταν αναγκαίος ο εντοπισμός των κυττάρων που εκφράζουν τις εν λόγω πρωτεΐνες επιφάνειας στο συνολικό κυτταρικό πληθυσμό. Όπως προκύπτει από το διαχωρισμό των κυττάρων ανάλογα με το μέγεθος (FSC-A) και την πολυπλοκότητά τους (SSC-A), διακρίνονται δύο διαφορετικοί πληθυσμοί. Καθένας από τους δύο αυτούς πληθυσμούς αναλύθηκε ξεχωριστά. Από τον αρχικό πληθυσμό επιλέγονται αρχικά τα μονά κύτταρα αποκλείοντας έτσι συσσωματώματα κυττάρων, και ακολούθως τα κύτταρα που δεν είναι νεκρά, και άρα αρνητικά για τη χρώση 7AAD. Στη συνέχεια, στα ζωντανά κύτταρα γίνεται ο έλεγχος για τον αριθμό των θετικών κυττάρων που φέρουν του υποδοχείς Kdr, Pdgfra και Gfra2. Από το σύνολο των πειραμάτων προέκυψε ότι ο

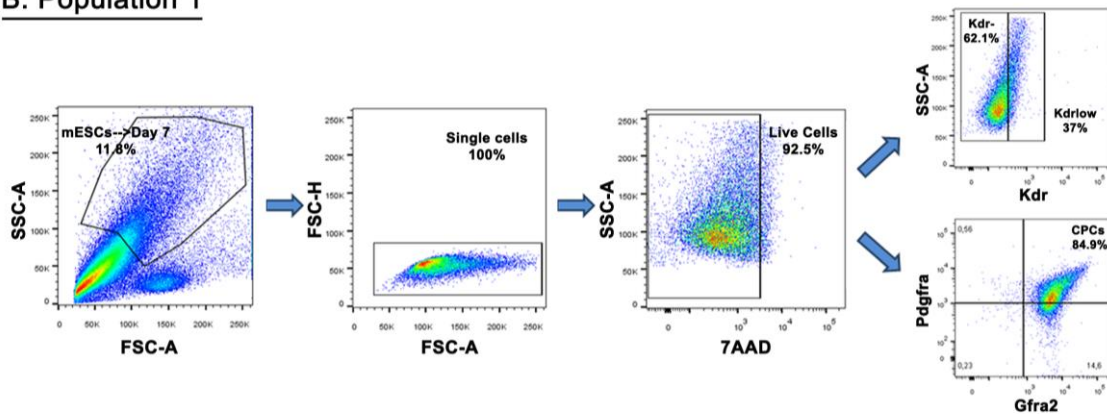
πληθυσμός $Pdgfra^+/Gfra2^+$ εντοπίζεται κυρίως στον πληθυσμό 1 σε ποσοστό περίπου 84.9% (Εικόνα 4.4B) την 7^η ημέρα της διαφοροποίησης έναντι του πληθυσμού 2 στον οποίο εντοπίζεται μόλις σε ποσοστό 11.8% ή και λιγότερο (Εικόνα 4.4C). Ο πληθυσμός στον οποίο συναντώνται τα CPCs αποτελεί και την πλειοψηφία των διαφοροποιούμενων κυττάρων (11.8%) σε σχέση με τον άλλο πληθυσμό (5.1%) και πρόκειται για κύτταρα με μεγαλύτερο μέγεθος. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αντιπροσωπευτικό για το σύνολο των πειραμάτων, αφού η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές της διαφοροποίησης, καθώς και για τις 2 τεχνικές καλλιέργειας, στις οποίες το σύνολο των CPCs συναντάται στον πληθυσμό 1. Το ίδιο ισχύει και για τον Kdr^+ πληθυσμό, αφού τα Kdr^+ εντοπίζονται μόνο στον πληθυσμό 1 (Εικόνα 4.4B), ενώ δεν εντοπίζονται Kdr^+ κύτταρα στον πληθυσμό 2 για το σύνολο των πειραμάτων (Εικόνα 4.4C). Για το λόγο αυτό οι αναλύσεις που ακολουθούν αφορούν τον πληθυσμό 1. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά μέρος των κυττάρων το οποίο δεν έγινε χρώση με κάποιο αντίσωμα, και με βάση αυτό επιλέχθηκε το όριο για την επιλογή των θετικών κυττάρων (Εικόνα 4.4A).

Differentiation Day 7 mESCs → CPCs

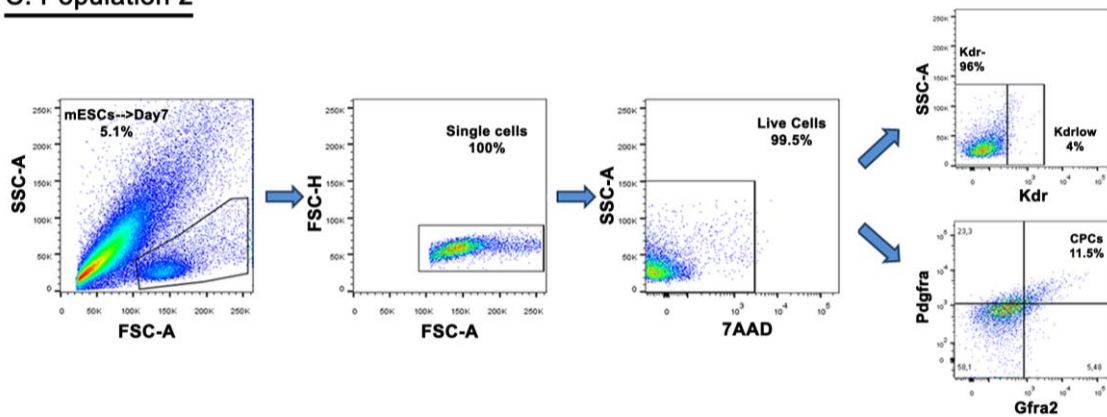
A. Unstained control



B. Population 1

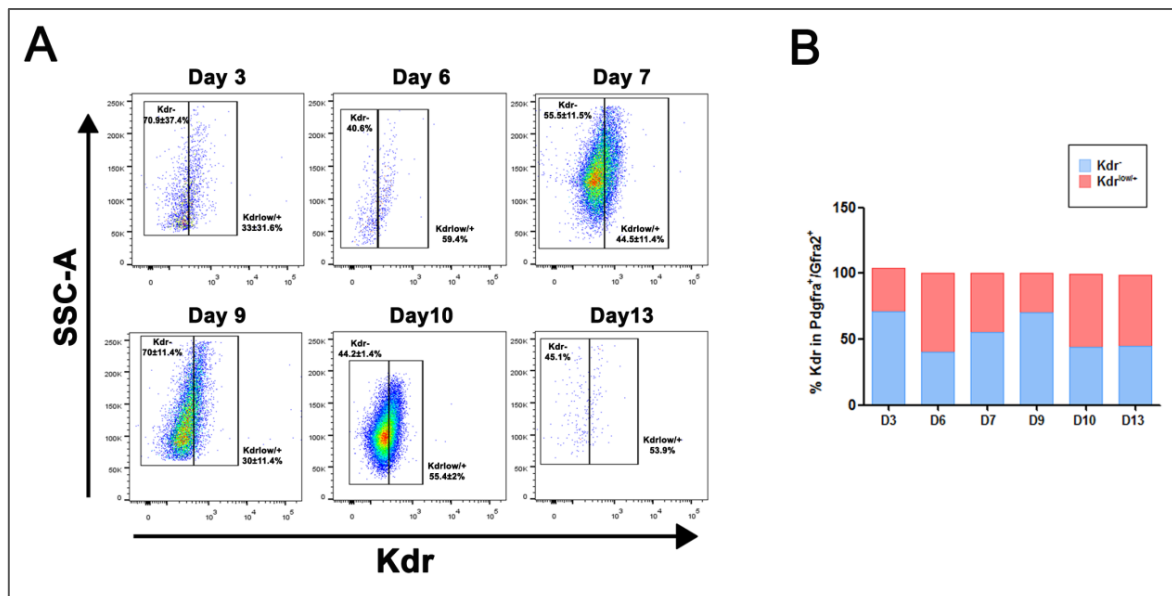


C. Population 2



Εικόνα 4.4: Διάκριση των CPCs στο συνολικό πληθυσμό ανάλογα με το μέγεθος(FSC-A) και την πολυπλοκότητα των κυττάρων (SSC-A) την 7^η ημέρα της διαφοροποίησης. **A)** Ανάλυση ενός δείγματος αναφοράς στο οποίο δεν έγινε χρήση αντισωμάτων (Unstained control). Οι πληθυσμοί i, ii και iii προκύπτουν μέσα από την επιλογή του αρχικού πληθυσμού . **B) Πληθυσμός 1.** Η συντριπτική πλειοψηφία των CPCs εντοπίζεται στον πληθυσμό 1, ο οποίος περιλαμβάνει κύτταρα μεγαλύτερα. **C) Πληθυσμός 2.** Πρόκειται για κύτταρα μικρότερα, στα οποία συναντάται μικρός αριθμός Pdgfra⁺/Gfra2⁺ κυττάρων, ενώ δεν συναντώνονται Kdr⁺ κύτταρα. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά της 7^{ης} ημέρας διαφοροποίησης για 4 βιολογικές επαναλήψεις. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του FACS έγινε με το πρόγραμμα FlowJo V10.

Για να διαπιστώσουμε αν τα $\text{Pdgfra}^+/\text{Gfra2}^+$ CPCs συναντώνται εντός του Kdr^+ πληθυσμού ή εκτός αυτού, έγινε έλεγχος των Kdr^+ έναντι των Kdr^- κυττάρων εντός αυτού του διπλά θετικού πληθυσμού, αφού προηγουμένως έχουν επιλεχθεί τα μονά ζωντανά κύτταρα του πληθυσμού 1. Η διάκριση των Kdr^+ από τα Kdr^- κύτταρα πραγματοποιήθηκε για τις ημέρες διαφοροποίησης 3,6,7,9,10 και 13. Αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι το προφίλ των κυττάρων για τις πρωτεΐνες αυτές, μεταβάλλεται ανάλογα με την ημέρα της διαφοροποίησης. Έτσι, βλέπουμε τις ημέρες 6,7,10 και 13 ο πληθυσμός $\text{Pdgfra}^+/\text{Gfra2}^+$ να ισοκατανέμεται σχεδόν μεταξύ Kdr^- και Kdr^{low} κυττάρων, με τα Kdr^{low} να εμφανίζονται σε ποσοστά 59.4, 44.5, 55.4 και 53.9% για τις 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές αντίστοιχα, και τα Kdr^- κύτταρα σε ποσοστά 40.6, 55.5, 44.2 και 45.1%. Από την άλλη, την 3^η και την 9^η ημέρα τα Kdr^- κύτταρα φαίνεται να υπερτερούν με ποσοστά 70.9 και 70% αντίστοιχα, έναντι των Kdr^{low} κυττάρων με ποσοστά 33 και 30%. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση υπάρχει αλληλεπικάλυψη του πληθυσμού $\text{Pdgfra}^+/\text{Gfra2}^+$ τόσο με τον Kdr^{low} όσο και με τον Kdr^- πληθυσμό σε όλες τις χρονικές στιγμές της διαφοροποίησης (Εικόνα 4.5A-B).



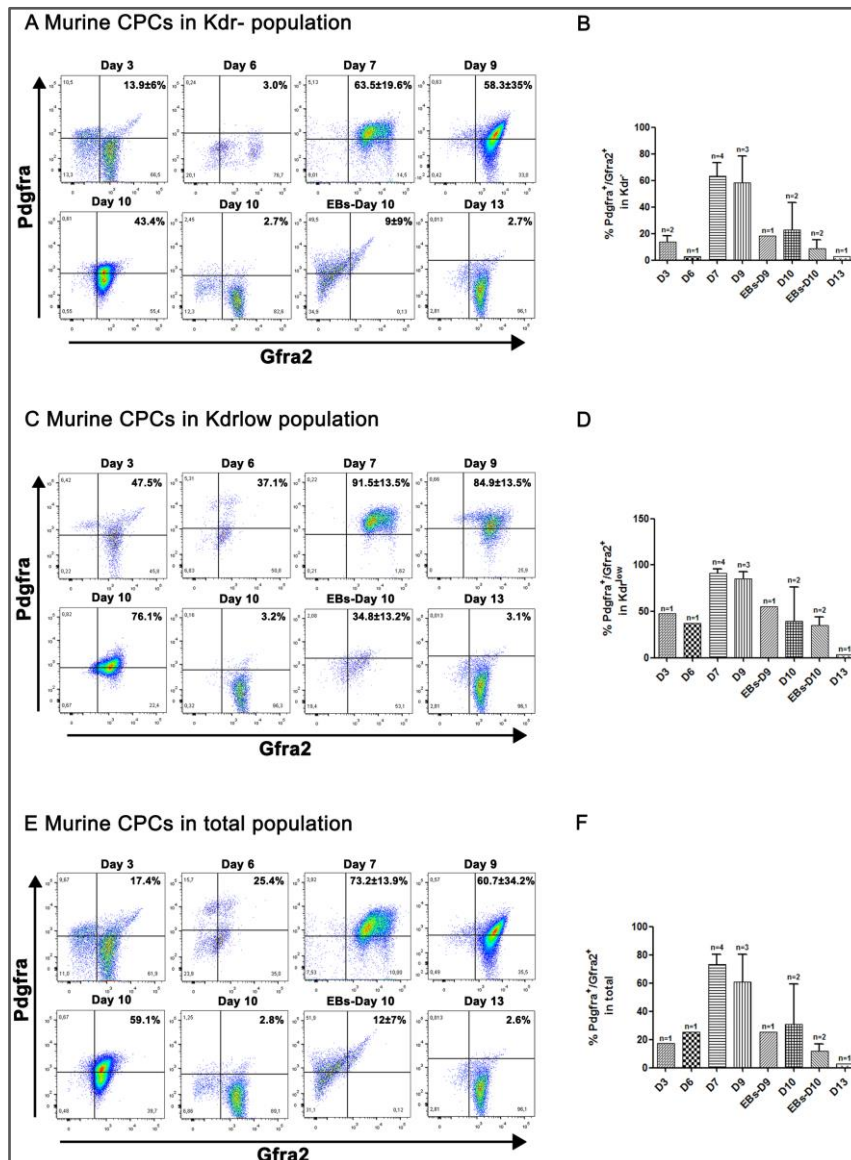
Εικόνα 4.5: Ο πληθυσμός $\text{Pdgfra}^+/\text{Gfra2}^+$ συναντάται στα Kdr^{low} και στα Kdr^- κύτταρα. **A)** Διαχωρισμός του Kdr^- και του Kdr^{low} πληθυσμού εντός των $\text{Pdgfra}^+/\text{Gfra2}^+$ CPCs για τις ημέρες 3,6,7,9,10 και 13. **B)** Συγκριτική ανάλυση των δύο πληθυσμών (Kdr^- , Kdr^{low}) με τη χρήση του προγράμματος Graphpad Prism. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του FACS έγινε με το πρόγραμμα FlowJo V10. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση με $n=2,1,4,3,2,1$ για τις ημέρες 3,6,7,9,10,13 αντίστοιχα.

Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι η έκφραση του Gfra2 κορυφώνεται την 7^η ημέρα της διαφοροποίησης, ενώ μέσω FACS έχει διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη Gfra2 εντοπίζεται από την 4^η έως την 9^η ημέρα διαφοροποίησης στον Pdgfra⁺ πληθυσμό [58]. Για να διερευνηθεί η βέλτιστη χρονική στιγμή για την απομόνωση των CPCs του FHF, έπρεπε να βρεθεί εκείνη η χρονική στιγμή κατά την οποία ο πληθυσμός Pdgfra⁺/Gfra2⁺ συναντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον πληθυσμό, καθώς και αν αυτό το μεγαλύτερο ποσοστό αφορά τον τριπλά θετικό πληθυσμό Kdr^{low}/Pdgfra⁺/Gfra2⁺ ή τον Kdr⁻/Pdgfra⁺/Gfra2⁺ πληθυσμό. Για το λόγο αυτό, για τις ημέρες διαφοροποίησης 3,6,7,9,10,13 σε καλλιέργεια μονοστιβάδας, και 9 και 10 σε EBs, έγινε ανάλυση του πληθυσμού 1 και εκτίμηση του ποσοστού των CPCs Pdgfra⁺/Gfra2⁺, στα Kdr⁻ και στα Kdr⁺ κύτταρα, αλλά και στον συνολικό πληθυσμό.

Από την εικόνα που ακολουθεί είναι φανερό ότι και στις 3 περιπτώσεις ο πληθυσμός Pdgfra⁺/Gfra2⁺ ακολουθεί περίπου το ίδιο πρότυπο (Εικόνα 4.6). Αρχικά, κατά την 3^η και 6^η ημέρα διαφοροποίησης εμφανίζεται ελάχιστα ή καθόλου στον Kdr⁻ πληθυσμό (13.9±6%, 3% αντίστοιχα)(4.6A), ενώ εμφανίζεται σε μικρό ποσοστό στον Kdr^{low} και στον συνολικό πληθυσμό την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης (47.5%, 17.4%), το οποίο αυξάνεται προοδευτικά ή παραμένει σταθερό κατά την 6^η ημέρα (37.1%, 25.4%)(4.6B-C). Στη συνέχεια, κατά την 7^η ημέρα διαφοροποίησης έχουμε την εμφάνιση του υψηλότερου ποσοστού CPCs και στις 3 περιπτώσεις, αύξηση μεγαλύτερη από διπλάσια από την 6^η ημέρα διαφοροποίησης (65.5±19.6%, 91.5±13.5%, 73.2±13.9%). Αρκετά μεγάλο ποσοστό CPCs σημειώθηκε και την 9^η ημέρα της διαφοροποίησης και για 3 περιπτώσεις (58.3±35%, 84.9±13.5%, 60.7±34.2%)(4.6A-B-C). Την ημέρα αυτή, ωστόσο, παρατηρήθηκε και μεγάλη τυπική απόκλιση μεταξύ των πειραμάτων. Η απόκλιση αυτή την 9^η ημέρα μπορεί να υποδηλώνει την έναρξη της μείωσης αυτού του πληθυσμού και την έναρξη της μετάβασης των κυττάρων από την πρώιμη κατάσταση μονοδυναμίας στην περαιτέρω διαφοροποίησή τους. Έτσι, τη 10^η ημέρα διαφοροποίησης παρατηρείται αφενός μείωση του ποσοστού των CPCs (43.4%, 76.1%, 59.1%), αφετέρου πλήρης απουσία του εν λόγω πληθυσμού CPCs (2.7%, 3.2%, 2.8%)(4.6A-B-C). Τέλος, σε κάθε περίπτωση τη 13^η ημέρα διαφοροποίησης ο πληθυσμός αυτός δεν εντοπίζεται καθόλου στον πληθυσμό γεγονός που υποδεικνύει ότι τα κύτταρα έχουν διαφοροποιηθεί περαιτέρω (2.7%, 3.1%. 2.6%)(4.6A-B-C). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι για όλες τις ημέρες της διαφοροποίησης το ποσοστό των CPCs στον Kdr^{low} πληθυσμό είναι μεγαλύτερο από τον αντίστοιχο πληθυσμό στα Kdr⁻ κύτταρα, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά που προκύπτουν αν δεν λάβουμε υπόψη μας τον υποδοχέα Kdr παίρνουν μία ενδιάμεση τιμή μεταξύ των άλλων δύο περιπτώσεων. Ειδικότερα για τις ημέρες 7 και 9, ο πληθυσμός των CPCs σχεδόν ταυτίζεται με τα Kdr^{low} κύτταρα υποδεικνύοντας ότι η απομόνωση ενός τριπλά θετικού πληθυσμού Kdr^{low}/Pdgfra⁺/Gfra2⁺ μεταξύ 7^{ης} και 9^{ης} ημερών διαφοροποίησης να είναι η καταλληλότερη στρατηγική για την απομόνωση του βέλτιστου πληθυσμού CPCs.

Τέλος, θα παρατηρήσουμε ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων με την τεχνική των EBs δεν παρουσιάζει σημαντικό πλεονέκτημα για τις ημέρες 9 και 10 για τις οποίες έγινε η ανάλυση του

πληθυσμού, αφού για τις αντίστοιχες ημέρες διαφοροποίησης των κυττάρων με την καλλιέργεια μονοστιβάδας τα ποσοστά των CPCs είναι μεγαλύτερα. Συγκεκριμένα, για την 9^η ημέρα τα ποσοστά των CPCs ανέρχονται στο 18.5, 55.6 και 25.2 % για τα Kdr⁻, Kdr^{low} κύτταρα και για τον συνολικό πληθυσμό, αντίστοιχα, ενώ για την 10^η ημέρα τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 8.9, 34.8 και 12% (4.6A-B-C).



Εικόνα 4.6: Απόκτηση του βέλτιστου πληθυσμού CPCs την 7^η και 9^η ημέρα της διαφοροποίησης με καλλιέργεια μονοστιβάδας μέσω της απομόνωσης του τριπλά θετικού πληθυσμού Kdr^{low}/PdGfra⁺/Gfra2⁺. **A)** Η εξέλιξη του πληθυσμού των CPCs στον Kdr⁻ πληθυσμό για την καλλιέργεια μονοστιβάδας και τα EBs, τις ημέρες 3,6,7,9,10 και 13. **B)** Συγκριτική ανάλυση του ποσοστού των CPCs για κάθε ημέρα διαφοροποίησης στον Kdr⁻ πληθυσμό. **C)** Η εξέλιξη των CPCs στον Kdr^{low} πληθυσμό για τις ίδιες χρονικές στιγμές και τις ίδιες μεθόδους καλλιέργειας. **D)** Συγκριτική ανάλυση του ποσοστού των CPCs για κάθε ημέρα διαφοροποίησης στον Kdr^{low/+} πληθυσμό. **E)** Η εξέλιξη των CPCs στον συνολικό πληθυσμό για τις ίδιες χρονικές στιγμές και τις ίδιες μεθόδους καλλιέργειας. **F)** Συγκριτική ανάλυση του ποσοστού των CPCs για κάθε ημέρα διαφοροποίησης στον συνολικό πληθυσμό. Οι συγκριτικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Graphpad Prism και η ανάλυση των αποτελεσμάτων του FACS έγινε με το πρόγραμμα FlowJo V10. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση και ο αριθμός των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε ημέρα της διαφοροποίησης είναι διαφορετικός και αναφέρεται στο γράφημα.

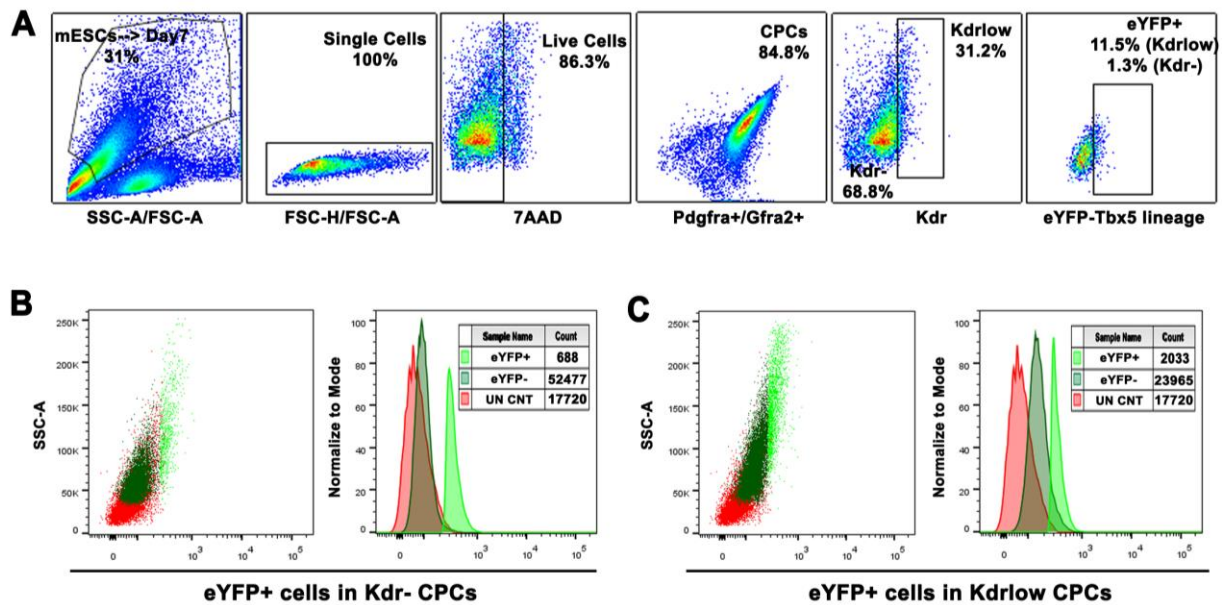
4.4 Διαχωρισμός των CPC σε FHF και SHF *in vitro*

Για το διαχωρισμό των CPCs σε FHF και σε SHF μέσω του FACS, το διαχωρισμό δηλαδή των κυττάρων σε αυτά που εκφράζουν τον TF Tbx5 και είναι θετικά για τους υποδοχείς Kdr, Pdgfra, Gfra2 και σε κύτταρα $Kdr^-/Pdgfra^+/Gfra2^+$ ήταν αναγκαίο να βρεθεί η βέλτιστη στρατηγική απομόνωσή τους μέσω των παραπάνω αναλύσεων. Έτσι, αρχικά έγινε ο εντοπισμός των CPCs στον συνολικό πληθυσμό των διαφοροποιούμενων κυττάρων και η συσχέτιση των $Pdgfra^+/Gfra2^+$ κυττάρων με τους πληθυσμούς Kdr^+ και Kdr^- , όπου προέκυψε ότι τα CPCs κατανέμονται και στους δύο αυτούς πληθυσμούς. Με βάση αυτά, ακολούθως προσδιορίστηκε η βέλτιστη χρονική στιγμή στην οποία εμφανίζεται το μεγαλύτερο ποσοστό των CPCs για τους δύο πληθυσμούς και για τις 2 τεχνικές διαφοροποίησης, και όπως υπέδειξε η ανάλυση των πειραμάτων FACS, αυτό συμβαίνει την 7^η και την 9^η ημέρα διαφοροποίησης με το μεγαλύτερο ποσοστό των CPCs να συναντάται στον Kdr^+ πληθυσμό στην καλλιέργεια μονοστιβάδας.

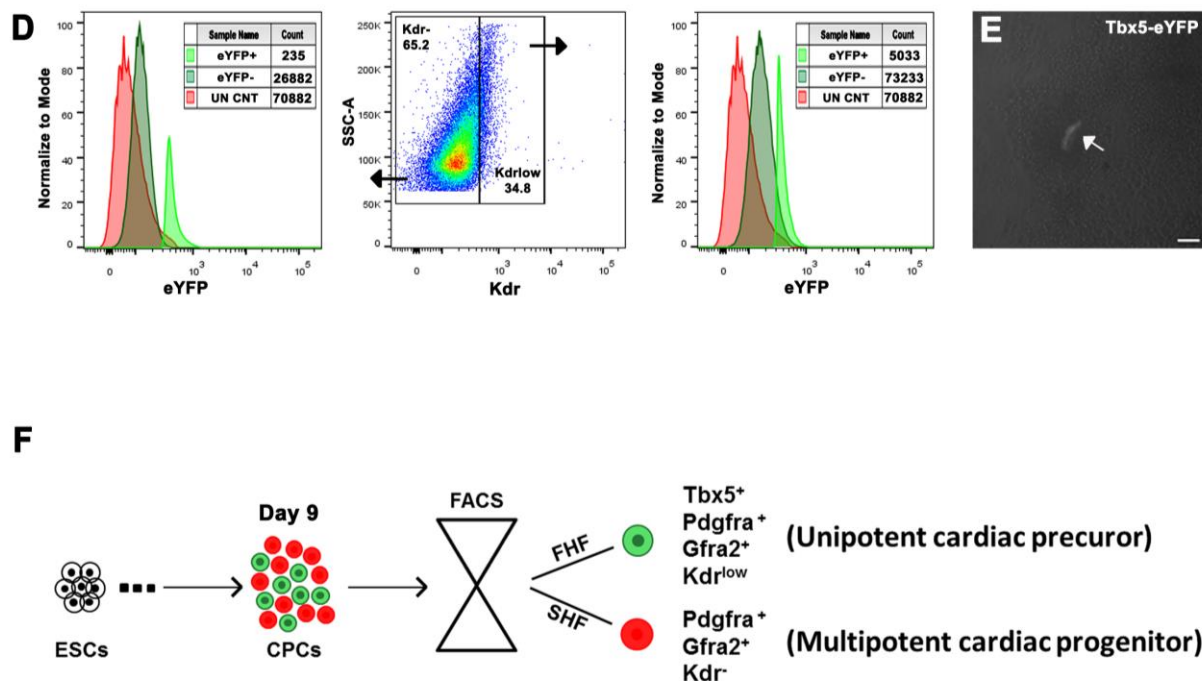
Έτσι, έχοντας ως απώτερο σκοπό, την απομόνωση των CPCs του FHF, έγινε έλεγχος των eYFP⁺ κυττάρων, των κυττάρων δηλαδή που θα εκφράζουν τον Tbx5, εντός των πληθυσμών $Kdr^-/Pdgfra^+/Gfra2^+$ και $Kdr^{low}/Pdgfra^+/Gfra2^+$ την 7^η και 9^η ημέρα της διαφοροποίησης. Όπως παρατηρήθηκε, το ποσοστό των eYFP⁺ κυττάρων είναι μεγαλύτερο (11.5%) στα CPCs εντός του Kdr^{low} σε αντίθεση με τα CPCs του Kdr^- πληθυσμού (1.3%) κατά την 7^η ημέρα (Εικόνα 4.7C). Λαμβάνοντας υπόψη τα απόλυτα νούμερα, εντοπίστηκαν 688 κύτταρα eYFP⁺ στα 53165 CPCs του Kdr^{low} πληθυσμού που επιλέχθηκαν, έναντι 2033 κυττάρων στα 25998 CPCs του Kdr^- πληθυσμού (Εικόνα 4.7A-B). Έτσι, παρότι τα eYFP⁺ κύτταρα εντοπίζονται και στους δύο πληθυσμούς ο αριθμός αυτών των κυττάρων στον Kdr^- πληθυσμό είναι μικρότερος (Εικόνα 4.7A-B). Η στρατηγική που ακολουθείται για την επιλογή των eYFP⁺ κυττάρων είναι η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε και παραπάνω (Εικόνα 4.7C).

Το ίδιο παρατηρείται και κατά την 9^η ημέρα διαφοροποίησης με αναλογία eYFP⁺ κυττάρων στα Kdr^- CPCs 179/63804 και 4765/38799 στα Kdr^{low} CPCs (Εικόνα 4.7D). Σε κάθε περίπτωση ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν τον Tbx5 είναι μεγαλύτερος στον πληθυσμό $Kdr^{low}/Pdgfra^+/Gfra2^+$ κάνοντας ευκολότερο το διαχωρισμό των CPCs του FHF και του SHF (Εικόνα 4.7F). Από την 7^η στην 9^η ημέρα διαφοροποίησης παρατηρήθηκε αύξηση των eYFP⁺ κυττάρων. Να σημειωθεί, ωστόσο, ότι η μικρή αναλογία των eYFP⁺ κυττάρων στον συνολικό πληθυσμό, και ενδεχομένως τα χαμηλά επίπεδα έκφρασής της πρωτεΐνης καθιστούν δύσκολο τον εντοπισμό αυτών των κυττάρων αμιγώς μόνο μέσω της ενδογενούς έκφρασης της πρωτεΐνης, χωρίς τη χρήση κάποιου αντισώματος, όπως προέκυψε και από τα πειράματα ανοκυτταροχημείας. Στην εικόνα 4.7E που προέκυψε από μικροσκόπιο φθορισμού εντοπίζονται δύο κύτταρα τα οποία εκφράζουν την πρωτεΐνη eYFP⁺ και είναι ορατά χωρίς τη χρήση αντισώματος.

Differentiation Day 7



Differentiation Day 9

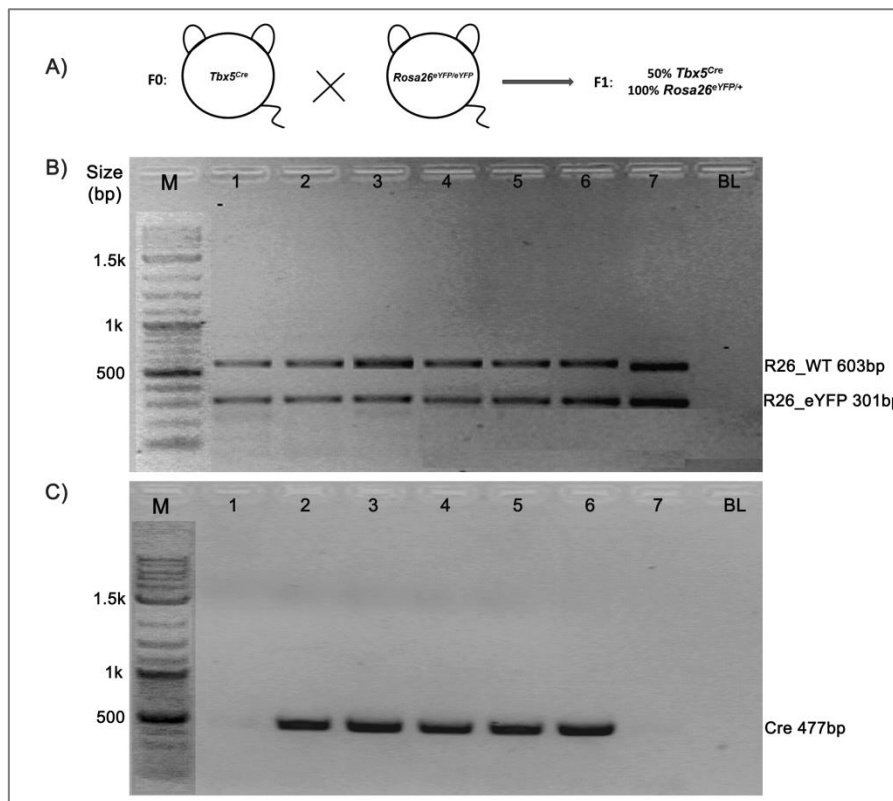


Εικόνα 4.7: Διαχωρισμός των κυττάρων του FHF και του SHF. Α) Ανάλυση των eYFP⁺ κυττάρων στα Kdr^{low} CPCs την 7^η ημέρα διαφοροποίησης. **Β)** Ανάλυση των eYFP⁺ κυττάρων στα Kdr⁻ CPCs την 7^η ημέρα διαφοροποίησης. **Γ)** Στρατηγική απομόνωσης των eYFP⁺ κυττάρων από το συνολικό πληθυσμό. **Δ)** Απομόνωση των eYFP⁺ κυττάρων από τα Kdr⁻ και Kdr^{low} CPCs την 9^η ημέρα διαφοροποίησης. **Ε)** Μικροσκοπική εικόνα κυττάρων που εκφράζουν τον TF Tbx5 (άσπρο βέλος) την 9 ημέρα διαφοροποίησης, Κλίμακα: 100μΜ. **Φ)** Στρατηγική απομόνωσης των CPCs του FHF (πρώιμα μονοδύναμα κύτταρα) και του SHF (πρώιμα πολυδύναμα κύτταρα).

4.5 Γονοτύπηση ποντικών για την απόκτηση του διαγονιδιακού μοντέλου Tbx5CreERT2/ROSA26eYFP/eYFP

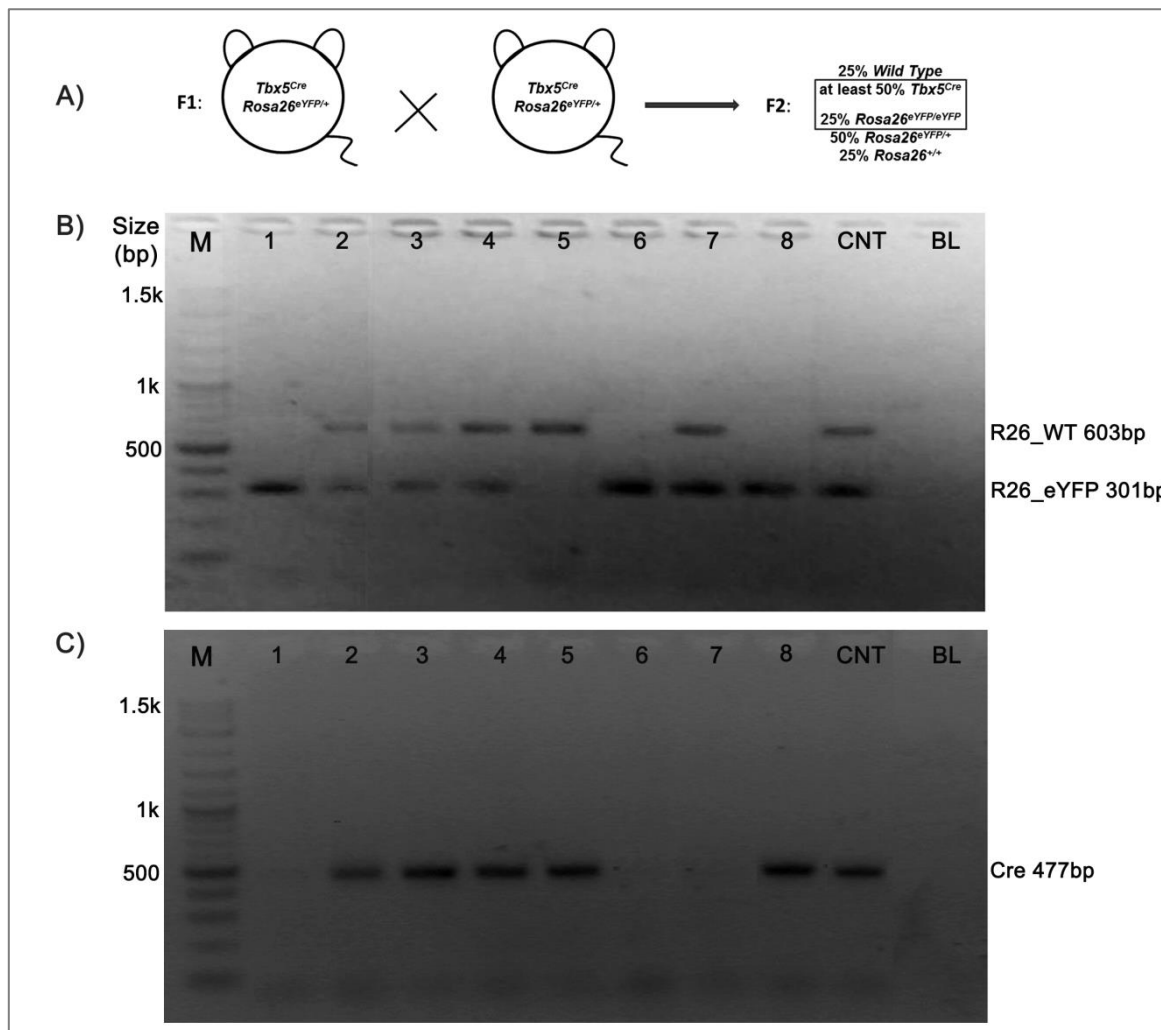
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τα *in vitro* πειράματα φέρει το διπλό διαγονίδιο Tbx5^{CreERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP} και προέκυψε από το αντίστοιχο διαγονιδιακό ποντίκι. Για την απόκτηση ενός τέτοιου μοντέλου ποντικού στο εργαστήριο, το οποίο θα φέρει το διπλό διαγονίδιο Tbx5^{CreERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP} πραγματοποιήθηκε μια σειρά από διασταυρώσεις. Το συγκεκριμένο μοντέλο θα επιτρέπει τον *in vivo* εντοπισμό της έκφρασης του Tbx5 από μία επιλεγμένη χρονική στιγμή κι έπειτα, δηλαδή μετά από τη χορήγηση της 4-OHT και την έκφραση της πρωτεΐνης eYFP. Για τον έλεγχο του γονοτύπου κάθε ποντικίου έγινε γονοτυπική ανάλυση με τη χρήση γενωμικού DNA. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για 3 ζεύγη εκκινητών. Από αυτά, το πρώτο υβριδίζει την περιοχή του ενδογενούς γονιδίου Rosa26^{WT} δίνοντας προϊόν με μοριακό βάρος 603 bp, το δεύτερο υβριδίζει την περιοχή του διαγονιδίου ROSA26^{eYFP} δίνοντας προϊόν 301 bp, και τέλος το τρίτο τη περιοχή του διαγονιδίου Tbx5^{CreERT2} δίνοντας προϊόν 477 bp. Ακολούθως, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης, παρουσία τμημάτων DNA γνωστών μοριακών βαρών για την πιστοποίηση του μοριακού βάρους των υπό εξέταση δειγμάτων. Για την αξιοπιστία της διαδικασίας, παράλληλα με τα δείγματα προς γονοτύπηση πραγματοποιείται μία επιπλέον αντίδραση στην οποία έχει προστεθεί αντί DNA νερό. Έτσι, δεν αναμένεται η εμφάνιση κάποιου προϊόντος και χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας. Για όλα τα δείγματα χρησιμοποιείται κοινό μίγμα όλων των συστατικών εκτός του DNA (premix).

Αρχικά, πραγματοποιείται η διασταύρωση της F0 γενεάς με του γονείς να έχουν γονότυπο Tbx5^{Cre} και ROSA26^{eYFP/eYFP}. Το 100% της F1 γενιάς αναμένεται να έχει γονότυπο ROSA26^{eYFP/eYFP}, ενώ μόλις το 50% περίπου θα φέρει το διαγονίδιο Tbx5^{Cre} (Εικόνα 4.8A). Πράγματι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.8B όλοι οι απόγονοι που προκύπτουν από τη διασταύρωση αυτή, είναι ετερόζυγοι για το διαγονίδιο ROSA26^{eYFP} με αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο ζωνών σε κάθε δείγμα, μία για το διαγονίδιο και μία για το ενδογενές γονίδιο. Ακόμα, 5 από αυτά τα ποντίκια (~70%) φέρουν το διαγονίδιο Tbx5^{Cre} (Εικόνα 4.8C). Η έλλειψη εμφάνισης ζώνης στον αρνητικό μάρτυρα (BL) επιβεβαιώνει την εγκυρότητα του αποτελέσματος.



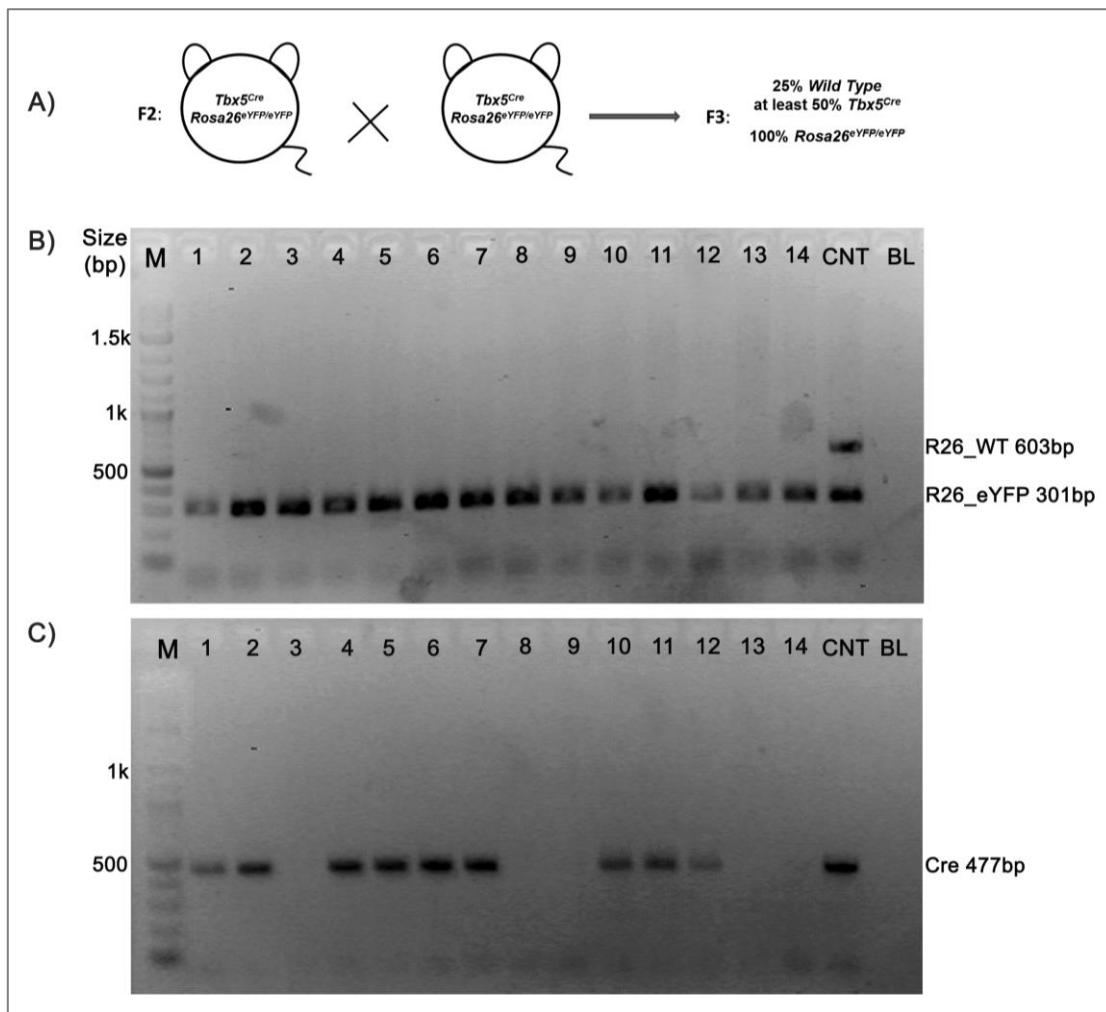
Εικόνα 4.8: Γονοτύπηση διαγονιδιακών απογόνων της F1 γενιάς με PCR. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. **A)** Σχηματική αναπαράσταση της διασταύρωσης των διαγονιδιακών γονέων $Tbx5^{Cre}$ και $ROSA26^{eYFP/eYFP}$ για την απόκτηση της F1 γενιάς. **B)** Η άνω ζώνη (603bp) ενισχύεται από το ζεύγος εκκινητών που υβριδίζει με το ενδογενές γονίδιο $ROSA26^{WT}$, ενώ η κάτω (301 bp) αντιστοιχεί στο διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP}$. **C)** Το προϊόν της ηλεκτροφόρησης (477 bp) αντιστοιχεί στο διαγονίδιο $Tbx5^{Cre}$. M: marker, τμήματα DNA γνωστών μοριακών βαρών, BL: blank, ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας.

Ακολούθως, από τα άτομα της F1 γενιάς επιλέχθηκαν εκείνα που φέρουν το διαγονίδιο $Tbx5^{Cre}$ και διασταυρώθηκαν μεταξύ τους για την απόκτηση της F2 γενιάς (Εικόνα 4.9A). Από αυτή τη διασταύρωση ατόμων ετερόζυγων για το διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP}$, προέκυψαν στην F2 γενιά άτομα με διαφορετικούς γονοτύπους. Έτσι, αναμένεται το 25% των ατόμων να μη φέρει καθόλου το διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP}$, μόλις το 25% να είναι ομόζυγο για το διαγονίδιο αυτό, ενώ το 75% ετερόζυγο. Από το σύνολο των ατόμων τουλάχιστον το 50% αναμένεται αν φέρει το διαγονίδιο $Tbx5^{Cre}$, αφού και οι δύο γονείς φέρουν ένα αντίγραφο του διαγονιδίου αυτού κι έτσι στην F2 γενιά κάποια άτομα ενδεχομένως να φέρουν δύο τέτοια αντίγραφα. Στην εικόνα 4.9B παρατηρούμε ότι 3/8 άτομα (~26%) εμφανίζουν μόνο την κατώτερη ζώνη μεγέθους 301 bp, ενώ ένα άτομο μόνο τη άνω ζώνη των 603 bp. Ακόμα, 4/8 άτομα (50%) είναι ετερόζυγα και εμφανίζουν και τις 2 ζώνες. Τέλος, 5/8 (~60%) άτομα φέρουν το $Tbx5^{Cre}$ διαγονίδιο (Εικόνα 4.9C). Από αυτού του είδους τις διασταυρώσεις θα επιλεγθούν άτομα με γονότυπο $Tbx5^{Cre}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$ για την απόκτηση της F3. Στην παρακάτω αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης που ακολουθεί ο επιθυμητός γονότυπος συναντάται μόνο στο άτομο 8. Για την αξιοπιστία της διαδικασίας, παράλληλα με τα δείγματα προς γονοτύπηση, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ως θετικός μάρτυρας δείγμα DNA από γονοτυπημένο ποντίκι με γνωστό γονότυπο $Tbx5^{Cre}/ROSA26^{eYFP/+}$ για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης και για τα 3 ζεύγη εκκινητών.



Εικόνα 4.9: Γοντύπηση διαγονιδιακών απογόνων της F2 γενιάς με PCR. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. **A)** Σχηματική αναπαράσταση της διασταύρωσης των διαγονιδιακών ποντικών της F1 γενιάς με γονότυπο $Tbx5^{Cre}/ROSA26^{eYFP/+}$ για την απόκτηση της F2 γενιάς. **B)** Η άνω ζώνη (603bp) αντιστοιχεί στο ενδογενές γονίδιο $ROSA26^{WT}$, ενώ η κάτω (301 bp) αντιστοιχεί στο διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP}$. **C)** Οι ζώνες που εμφανίζονται (477 bp) αντιστοιχούν στο διαγονίδιο $Tbx5^{Cre}$. M: marker, BL: blank, CNT: Control, γνωστό δείγμα αναφοράς που φέρει και τα δύο διαγονίδια.

Η τελευταία σειρά διασταυρώσεων για την απόκτηση της F3 γενιάς, στην οποία το 100% των απογόνων θα είναι ομόζυγοι για το διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP}$ και τουλάχιστον το 50% αυτών θα φέρει το διαγονίδιο $Tbx5^{Cre}$, πραγματοποιείται μεταξύ των ατόμων της F2 γενιάς με γονότυπο $Tbx5^{Cre}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$ (Εικόνα 4.10A). Έτσι, στην εικόνα 4.10B παρατηρούμε ότι πράγματι όλοι οι απόγονοι είναι ομόζυγοι για το διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP}$, αφού δεν εμφανίζεται η άνω ζώνη (603 bp) στα δείγματα, πέραν του θετικού μάρτυρα. Επιπλέον 9/14 (~65%) δείγματα εμφανίζουν την ζώνη που αντιστοιχεί στο διαγονίδιο $Tbx5^{Cre}$ (Εικόνα 4.10C).



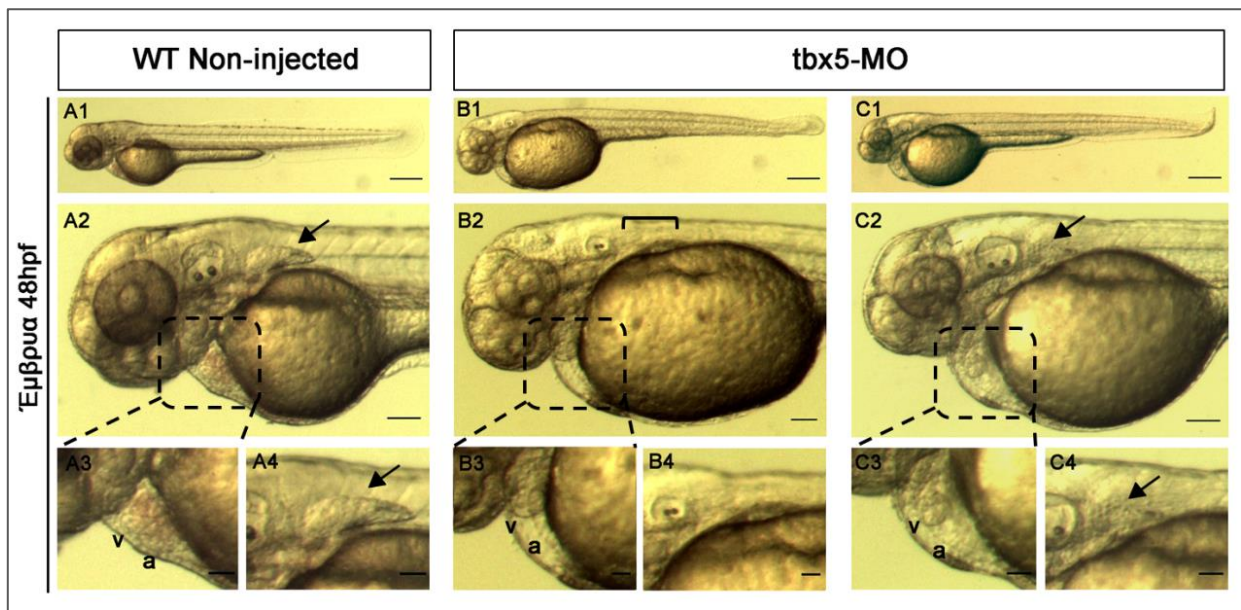
Εικόνα 4.10: Γονοτύπηση διαγονιδιακών απογόνων της F3 γενιάς με PCR. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. **A)** Σχηματική αναπαράσταση της διασταύρωσης των διαγονιδιακών ποντικών της F2 γενιάς με γονότυπο $Tbx5^{Cre}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$ για την απόκτηση της F3 γενιάς. **B)** Η άνω ζώνη (603bp) αντιστοιχεί στο ενδογενές γονίδιο $ROSA26^{WT}$, ενώ η κάτω (301 bp) αντιστοιχεί στο διαγονίδιο $ROSA26^{eYFP}$. **C)** Οι ζώνες που εμφανίζονται (477 bp) αντιστοιχούν στο διαγονίδιο $Tbx5^{Cre}$. M: marker, BL: blank, CNT: Control.

4.6 Φαινοτυπική ανάλυση της επίδρασης της αποσιώπησης του Tbx5 μέσω ενέσεων μορφολίνης

Ο ρόλος της πρωτεΐνης Tbx5 στην ανάπτυξη της καρδιάς των σπονδυλωτών, τόσο των θηλαστικών όσο και του zebrafish, έχει αναλυθεί παραπάνω. Σε προηγούμενες δημοσιεύσεις στις οποίες έχει διερευνηθεί ο ρόλος του εν λόγω γονιδίου στο zebrafish έχει δειχθεί ότι η απουσία της πρωτεΐνης Tbx5 έχει οδηγήσει σε καρδιακές δυσλειτουργίες, όπως είναι η βραδυκαρδία, και σε δυσμορφία της καρδιάς, αφού η αδυναμία ολοκλήρωσης της δεξιάς στροφής οδηγεί στη δομή που μοιάζει με κορδόνι [325]. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτός ο ρόλος και να υπογραμμιστεί η σημασία του tbx5 στην καρδιογένεση, προβήκαμε σε αποσιώπηση του γονιδίου μέσω μικροενέσεων αντισημερινόντων ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης έναντι του tbx5 στο στάδιο του γονιμοποιημένου αυγού. Ακολούθησε, η παρατήρηση των εμβρύων καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και τα αποτελέσματα αυτής της παρατήρησης αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

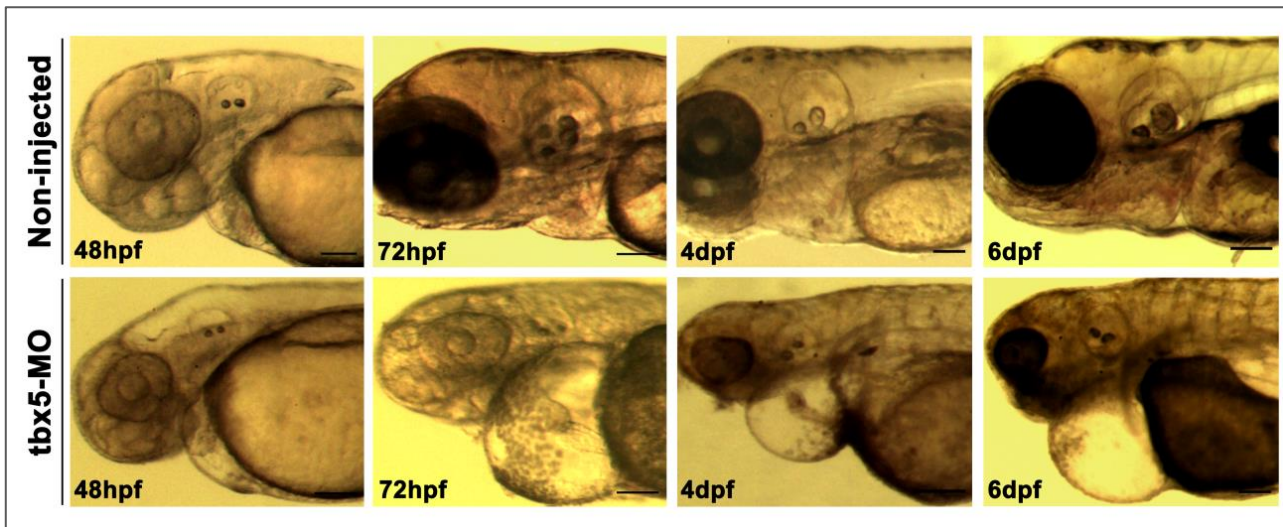
Αρχικά, η μορφολογία της καρδιάς των ενεμένων εμβρύων (Tbx5-MO) κατά τις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με αυτή της καρδιάς των ψαριών αγρίου τύπου, στα οποία δεν έγιναν ενέσεις (WT Non-injected). Ο κόλπος και η κοιλία φαίνονται και συστέλλονται φυσιολογικά. Μετά από άλλες 24 ώρες, στις 48 ώρες δηλαδή μετά τη γονιμοποίηση, παρατηρούμε ότι στην καρδιά των WT ψαριών έχει ολοκληρωθεί η δεξιά στροφή (Εικόνα 4.11-A₂₋₃), η οποία ολοκληρώνεται περίπου στις 36 hpf, εν αντιθέσει με την καρδιά των tbx5-MO, στα οποία η ολοκλήρωση της στροφής έχει αποτύχει με αποτέλεσμα τη δημιουργία της γραμμικής δομής που θυμίζει κορδόνι (Εικόνα 4.11-B_{2-C₂}). Επιπλέον, στα tbx5-MO έχουμε την εμφάνιση βραδυκαρδίας και περικαρδιακού οιδήματος σε μικρότερο (Εικόνα 4.11-B₃) ή μεγαλύτερο βαθμό (Εικόνα 4.11-C₃). Το μεγάλο περικαρδιακό οίδημα συνοδεύεται σε μέρος των εμβρύων και από την έλλειψη της κυκλοφορίας του αίματος. Ο βαθμός του περικαρδιακού οιδήματος, της βραδυκαρδίας και ο βαθμός διάτασης της καρδιάς διαφέρει από ψάρι σε ψάρι γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε στη θέση ένεσης είτε γενικότερα στην τεχνική ομοιομορφία των ενέσεων, και άρα στο βαθμό ενσωμάτωσης των morpholinos στο έμβρυο, αφού είναι γνωστό ότι η επίδραση του tbx5 στην ανάπτυξη είναι δόσο-εξαρτώμενη.

Η ανάπτυξη του πτερυγίου στο zebrafish ξεκινάει στις 26hpf με τους οφθαλμούς των θωρακικών πτερυγίων να είναι ορατοί στις 28hpf και οι οποίοι έχουν πολύ μικρό μέγεθος στο στάδιο αυτό. Έτσι, στις 48hpf ο οφθαλμός του θωρακικού πτερυγίου είναι ορατός στα WT (Εικόνα 4.11-A₄), ενώ στα tbx5-MO έχουμε την εμφάνιση οφθαλμών μικρότερων του φυσιολογικού μεγέθους (Εικόνα 4.11-C₄) για το στάδιο αυτό, ή την πλήρη έλλειψη του οφθαλμού του θωρακικού πτερυγίου (Εικόνα 4.11-B₄). Τυχόν δυσμορφίες που παρουσιάστηκαν μόνο σε λίγα ψάρια στο υπόλοιπο σώμα και την ουρά είναι μη-ειδικές και σχετίζονται με τις ενέσεις των morpholino.



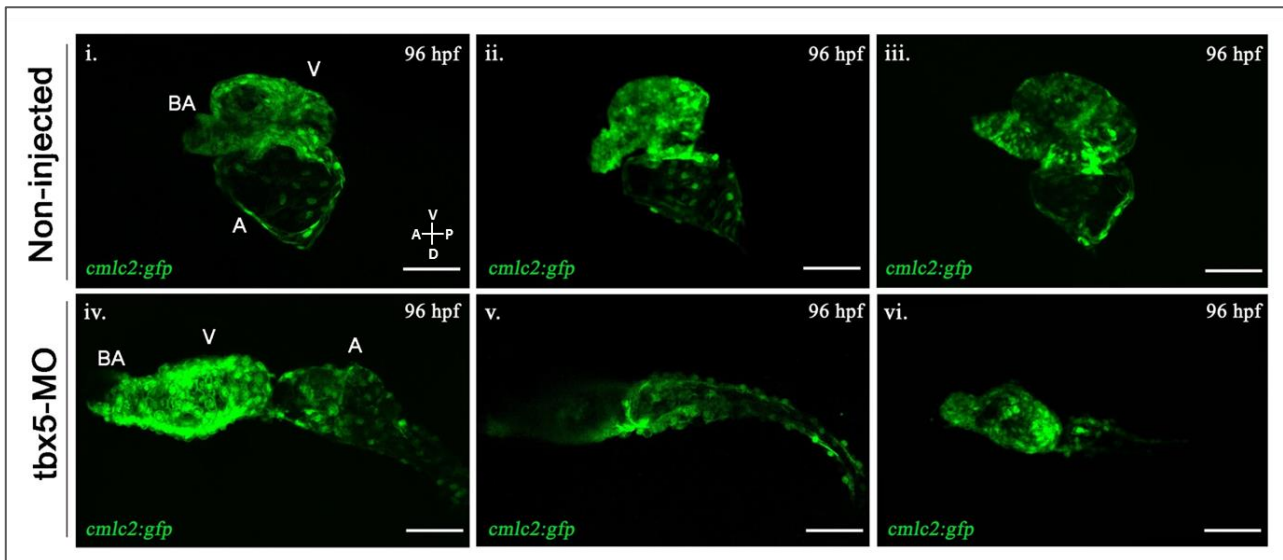
Εικόνα 4.11: Καρδιακή ανωμαλία και έλλειψη του θωρακικού πτερυγίου στα *tbx5*-MO. Στερεοσκοπικές εικόνες της πλάγιας όψης των εμβρύων στις 48hrf. **(A₁₋₄)** Στα έμβρυα αγρίου τύπου (WT Non-injected) έχουμε την φυσιολογική δομή της καρδιάς μετά την ολοκλήρωση στροφής (A₃) και την εμφάνιση του οφθαλμού του θωρακικού πτερυγίου (με μαύρο βέλος-A₄). **(B₁₋₄)** Στα *tbx5*-MO η δομή της καρδιάς παραμένει γραμμική σε σχήμα κορδόνι (B₃) και απουσιάζει ο οφθαλμός του θωρακικού πτερυγίου (αγκύλη- B₄). **(C₁₋₄)** *tbx5*-MO με σοβαρότερο περικαρδιακό οίδημα (C₃) και υποπλαστική δομή του οφθαλμού (μαύρο βέλος- C₄). a: atrium, v: ventricle Κλίμακα: A₁,B₁,C₁ 250 μM, A₂,B₂,C₂ 100 μM, A₃₋₄,B₃₋₄,C₃₋₄ 50 μM.

Ακολούθως, γίνεται παρακολούθηση των εμβρύων σε επόμενες χρονικές στιγμές για να αξιολογηθεί η εξέλιξη του φαινοτύπου. Όπως είπαμε και παραπάνω, η αδυναμία ολοκλήρωσης της δεξιάς στροφής της καρδιάς στα *tbx5*-MO είναι ορατή στις 48 hrf, ενώ έχουμε την εμφάνιση του περικαρδιακού οιδήματος και της βραδυκαρδίας. Το οίδημα, καθώς και ο βαθμός διάτασης της καρδιάς, γίνονται όλο και μεγαλύτερα στις 72 hrf, στις 4 dpf και στις 6 dpf (Εικόνα 4.12). Ψάρια στα οποία το οίδημα είναι πολύ μεγάλο εμφανίζουν σταδιακά μείωση της συσταλτότητας της καρδιάς και η κυκλοφορία του αίματος σταματά στις 3-4 dpf. Η έλλειψη του θωρακικού πτερυγίου που παρατηρείται στις 48 hrf διατηρείται και στα μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια, ενώ οι καρδιακές δυσλειτουργίες που έχουν προκληθεί από τη δράση των morpholino στις πρώτες 48 ώρες είναι μη αναστρέψιμες. Στις 6 dpf, μικρός αριθμός των ψαριών έχει επιβιώσει, ενώ μετά τις 6 dpf όλα τα *tbx5*-MO δεν επιβιώνουν.



Εικόνα 4.12: Στερεοσκοπικές εικόνες πλάγιας όψης *tbx5*-MO και WT εμβρύων κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης της καρδιάς. Ο βαθμός του περικαρδιακού οιδήματος και της διάτασης της καρδιάς μεγαλώνει με την πάροδο του χρόνου στα *tbx5*-MO, σε αντίθεση με τα WT έμβρυα (Non-injected) στα οποία η ανάπτυξη ολοκληρώνεται φυσιολογικά. Κλίμακα: 100μM

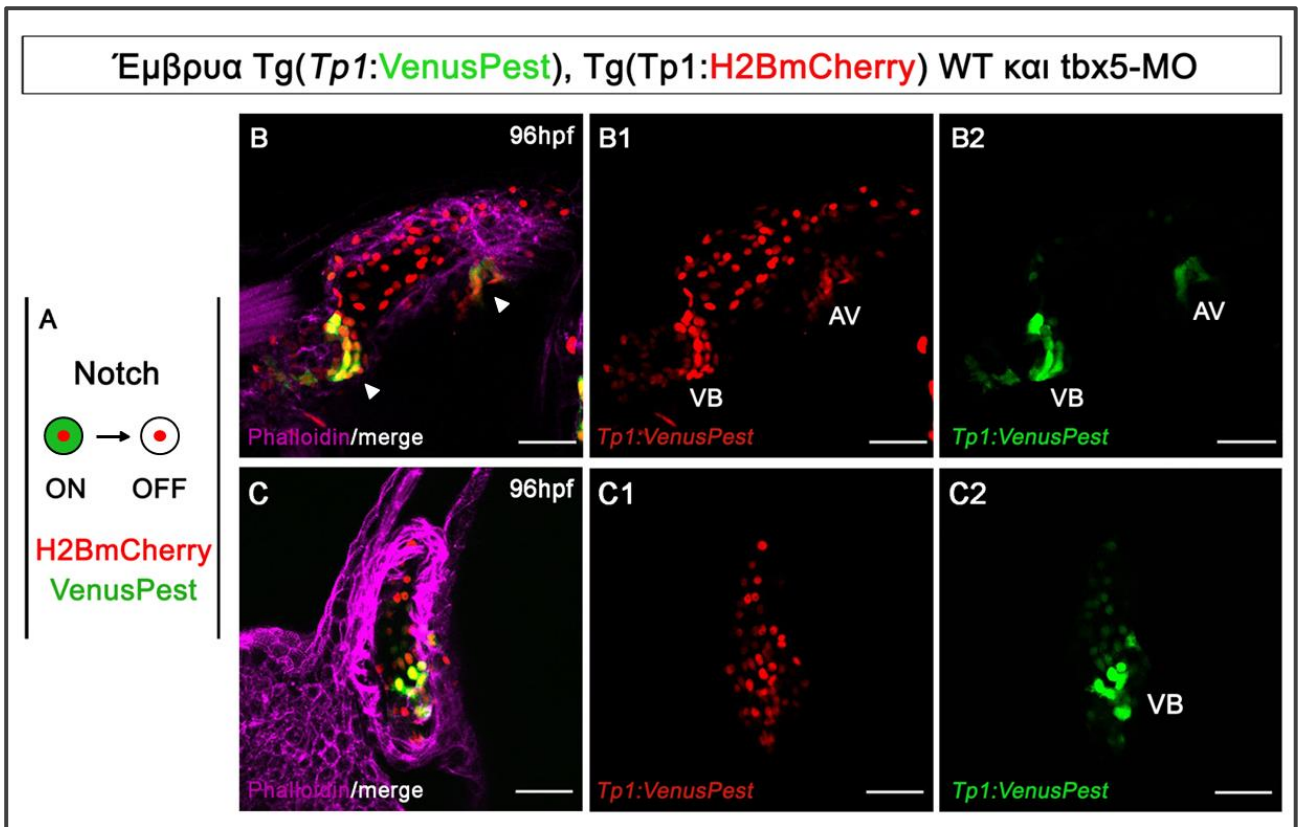
Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα που προέκυψε από τις στερεοσκοπικές εικόνες, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις μορφολίνιο έναντι του *Tbx5* σε διαγονιδιακά *cm1c2:gfp* έμβρυα που εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη *gfp* στα κύτταρα του μυοκαρδίου, επιτρέποντας έτσι την οπτικοποίηση του κόλπου και της κοιλίας των *tbx5*-MO εμβρύων. Τα έμβρυα μονιμοποιήθηκαν στις 96 hpf (4 dpf), και η απεικόνιση έγινε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου φθορισμού. Πράγματι, όπως θα παρατηρήσουμε στην εικόνα 4.13, στις 4 dpf, στις καρδιές των μη ενεμένων εμβρύων έχει ολοκληρωθεί η δεξιά στροφή της καρδιάς, και ο κόλπος (A), η κοιλία (V) και ο αρτηριακός βολβός (BA) έχουν αναπτυχθεί φυσιολογικά (Εικόνα 4.13-*i,ii,iii*). Από την άλλη, τα μέρη της καρδιάς στο σύνολο των *tbx5*-MO δεν έχουν αναπτυχθεί επαρκώς, ενώ είναι εμφανές ότι 4 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση η καρδιά έχει διατηρήσει τη γραμμική διατεταμένη δομή της («κορδόνι»). Ειδικότερα ο κόλπος, όπως φαίνεται στις εικόνες *v,vi*, έχει παραμείνει σε πολύ πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης αφού το μέγεθός του είναι αρκετά μικρό.



Εικόνα 4.13: Μικροσκοπικές εικόνες από τις καρδιές των *tbx5*-MO και μη ενεμένων εμβρύων στις 96 hpf. **i,ii,iii)** Οι καρδιές των μη ενεμένων εμβρύων έχουν αναπτυχθεί φυσιολογικά. **iv,v,vi)** Οι καρδιές των *tbx5*-MO παραμένουν γραμμικές. Κλίμακα: 50μM A: atrium, V: ventricle, BA: bulbus arteriosus.

4.7 Επίδραση της απουσίας του Tbx5 στο σχηματισμό των βαλβίδων

Ο σχηματισμός της καρδιακής βαλβίδας ξεκινάει στις 37 hpf με το σχηματισμό του κολποκοιλιακού καναλιού και τη στένωση μεταξύ κόλπου και κοιλίας, και η διαφοροποίηση των ενδοκαρδιακών κυττάρων ξεκινά στις 36hpf. Στις 45 hpf, 2 μέρες σχεδόν δηλαδή μετά τη γονιμοποίηση η έκφραση του *notch1b* περιορίζεται στο κολποκοιλιακό κανάλι. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις *tbx5*-MO σε Tg (Tr1: VenusPest, Tr1:H2mCherry) έμβρυα, τα οποία μονιμοποιήθηκαν στις 96 hpf, και σύμφωνα με τα παραπάνω, υπό φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση του *notch* αναμένεται στο κολποκοιλιακό κανάλι, στην περιοχή δηλαδή των βαλβίδων. Στις εικόνες που ακολουθούν με πράσινο χρώμα διακρίνεται η μη σταθεροποιημένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, η οποία αντιστοιχεί στην έκφραση του Notch τη στιγμή που έγινε η μονιμοποίηση, ενώ το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε περιοχές της καρδιάς όπου έχει ενεργοποιηθεί το *notch* τις τελευταίες 48 ώρες πριν τη μονιμοποίηση (Εικόνα 4.14A). Παρατηρήσαμε, λοιπόν, ότι στα έμβρυα στα οποία δεν έγιναν ενέσεις *tbx5*-MO και η ανάπτυξη της καρδιάς εξελίχθηκε φυσιολογικά, η έκφραση του Notch έχει ενεργοποιηθεί σε όλη την καρδιά και στις 96 hpf έχει περιοριστεί στην περιοχή των βαλβίδων (Εικόνα 4.14B). Από την άλλη, στα *Tbx5*-MO η έκφραση του σηματοδοτικού μονοπατιού στις 96 hpf εντοπίζεται σε όλη την καρδιά, με υψηλότερη έκφραση στην περιοχή της βαλβίδας που συνδέει την κοιλία με τον αρτηριακό βολβό, με την καρδιά να έχει παραμείνει στο πρώιμο στάδιο του σωλήνα (Εικόνα 4.14C).



Εικόνα 4.14: Αδυναμία σχηματισμού των βαλβίδων στα *Tbx5*-MO. Α) Έκφραση της πράσινης και κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης υπό τον έλεγχο συνθετικού υποκινητή που αποκρίνεται στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch. Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη είναι μη σταθεροποιημένη (Venus-PEST), ενώ η κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη παρουσιάζει αυξημένη σταθερότητα (Histone2BmCherry). **Β)** Η έκφραση του Notch περιορίζεται στις βαλβίδες στα μη ενεμένα έμβρυα στις 96 hpf (άσπρα βέλη). **Γ)** Έκφραση του Notch σε όλο το ενδοκάρδιο στα *tbx5*-MO στις 96hpf. Κλίμακα: 50μM, AV: Atrioventricular valve, VB: Ventriculobulbar.

5. Συζήτηση

Οι θεραπείες που βασίζονται στη χρήση βλαστοκυττάρων είναι πολλά υποσχόμενες, και ενδεχομένως να μπορούν να συμβάλλουν στη δημιουργία νέου καρδιακού μυός και στη βελτίωση της λειτουργίας της καρδιάς έπειτα από παθολογικές καταστάσεις, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης των ESCs και των iPSCs, καθιστά τα κύτταρα αυτά ένα εξαιρετικό μέσο για την απόκτηση CPCs και CMs, με σκοπό τη χρήση τους σε κλινικές μεταμοσχεύσεις [238]. Επειδή η απομόνωση και η διατήρηση των hESCs αποτελεί δύσκολο έργο και εγείρει ηθικά ζητήματα, χρησιμοποιούνται αντ' αυτού τα mESCs, ως εναλλακτική επιλογή προκειμένου να πραγματοποιηθούν μελέτες για την απόκτηση καθαρών πληθυσμών CPCs και CMs, οι οποίοι θα μπορούν να ενσωματώνονται επιτυχώς σε ισχαιμικές καρδιές ποντικών [166]. Οι μελέτες αυτές είναι αναγκαίες προτού να γίνουν οι αντίστοιχες κλινικές δοκιμές στον άνθρωπο. Για την ώρα, τα πρωτόκολλα τα οποία χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό οδηγούν σε έναν πληθυσμό, ο οποίος δεν απαρτίζεται στο 100% από καρδιομυοκύτταρα, αλλά από μία μίξη καρδιαγγειακών κυττάρων. Επιπλέον, τα διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα ουσιαστικά ομοιάζουν με τα *in vivo* CM, χωρίς να είναι πανομοιότυπα με αυτά, αφού τα αναπτυξιακά μονοπάτια που οδηγούν στην καρδιογένεση δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως.

5.1 Τα mESCs διαφοροποιούνται σε κύτταρα και των δύο καρδιακών πεδίων, με τα CMs του FHF να εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Tbx5

Πειράματα γενεαλογίας οδήγησαν στην ταυτοποίηση του FHF και του SHF [1]. Τα CPCs του SHF είναι κύτταρα πολυδύναμα, και διαφοροποιούνται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους της καρδιάς [335], ενώ τα CPCs του FHF είναι κύτταρα μονοδύναμα και διαφοροποιούνται περαιτέρω, κυρίως σε καρδιομυοκύτταρα [36]. Η ενεργοποίηση του Tbx5 στο FHF, είναι πιθανά αυτή που σηματοδοτεί τη δέσμευση των CPCs προς CMs [36].

Έτσι, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής μελέτης, έχοντας ως στόχο την απομόνωση των CPCs του FHF, έγινε διαφοροποίηση της κυτταρικής σειράς mESCs Tbx5^{creERT2}/ROSA26^{eYFP/eYFP} προς CPCs και CMs. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε η επαγωγή του καρδιακού μεσοδέρματος στα κύτταρα με τη χρήση των κυτταροκινών VEGF-A, Activin A, BMP4, bFGF και FGF10. Από προηγούμενες μελέτες, είναι γνωστό ότι τα σηματοδοτικά αυτά μόρια εμπλέκονται στην καρδιογένεση και χρησιμοποιούνται σε τέτοια πρωτόκολλα διαφοροποίησης [125, 153, 331]. Από την ανοσοκυτταροχημική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε προέκυψε, λοιπόν, ότι τη 12^η ημέρα της διαφοροποίησης τα κύτταρα έχουν εκφράσει τους γνωστούς δείκτες διαφοροποίησης cTnT, α -SMA και CD31 που χαρακτηρίζουν τους 3 βασικούς κυτταρικούς τύπους της καρδιάς: τα καρδιομυοκύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αντίστοιχα.

Στο στάδιο αυτό, λοιπόν, τα κύτταρα έχουν διαφοροποιηθεί περαιτέρω, ωστόσο, οι αναλογίες των εν λόγω κυτταρικών τύπων στο συνολικό πληθυσμό των διαφοροποιούμενων κυττάρων μπορεί να διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων. Έτσι, στη μία περίπτωση παρατηρήθηκε ένα μεγάλο ποσοστό καρδιομυοκυττάρων στην καλλιέργεια, το οποίο όπως προέκυψε ποιοτικά από τις εικόνες, φαίνεται να συμφωνεί με το 60% cTnT⁺ κυττάρων που προέκυψε με χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου από τους Kokkinopoulos *et al.* [331]. Από την άλλη, σε διαφορετικό πείραμα, με χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου προέκυψε ένας μεγάλος αριθμός ECs κυττάρων, και ένας ακόμα μεγαλύτερος vSMCs, εν αντιθέσει με τον αριθμό των CMs που ήταν πολύ μικρός. Οι διαφορετικοί ετερογενείς κυτταρικοί πληθυσμοί που προκύπτουν από τα ίδια κύτταρα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, είναι αποτέλεσμα αφενός της στοχαστικότητας που μπορεί να χαρακτηρίζει εν μέρει την *in vitro* διαφοροποίηση των ESCs, κι αφετέρου μπορεί να οφείλεται σε τεχνικά σφάλματα, τα οποία συσσωρεύονται σε τέτοιες διαδικασίες πολλών σταδίων οδηγώντας σε διακυμάνσεις σε ό,τι αφορά το αποτέλεσμα.

Τα CPCs που εκφράζουν τον Tbx5 είναι μονοδύναμα, και διαφοροποιούνται περαιτέρω μόνο σε καρδιομυοκύτταρα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τα CPCs που εκφράζουν αυτόν τον μεταγραφικό παράγοντα, λοιπόν, συγκαταλέγονται στα CPCs του FHF. Στα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήσαμε, η έκφραση της πρωτεΐνης eYFP, και κατ' επέκταση του Tbx5 εντοπίζεται μόνο στα καρδιομυοκύτταρα, ενώ δεν συναντάται στα vSMCs και στα ECs, γεγονός που επιβεβαιώνει το μονοδύναμο χαρακτήρα των Tbx5⁺ κυττάρων. Ακόμα, αξίζει να αναφέρουμε ότι στο πείραμα, στο οποίο η διαφοροποίηση των mESCs οδήγησε σε μεγαλύτερο αριθμό vSMCs και ECs, και σε ελάχιστα CM, η έκφραση του Tbx5 δεν εντοπίστηκε σε κανέναν από τους 3 κυτταρικούς τύπους, κάτι που ενδεχομένως να δείχνει ότι κατά τη διαφοροποίηση στην προκειμένη περίπτωση ευνοήθηκαν τα CPCs του SHF. Τέτοιου τύπου διακυμάνσεις στα αποτελέσματα της διαφοροποίησης καθιστούν ακόμα πιο επιτακτική την ανάγκη βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων διαφοροποίησης προς CPCs και CMs, για τον μεγαλύτερο εμπλουτισμό του πληθυσμού ενδιαφέροντος. Εξάλλου, η απόκτηση ομογενών πληθυσμών CPCs ή CMs *in vitro* είναι ένα βασικό βήμα που θα μας φέρει πιο κοντά στην κλινική χρήση τέτοιων πληθυσμών για τη θεραπεία των καρδιακών παθήσεων.

5.2 Απόκτηση του βέλτιστου πληθυσμού CPCs μεταξύ 7^{ης} και 9^{ης} ημέρας διαφοροποίησης.

Η γνώση μας για τους ακριβείς μηχανισμούς που ρυθμίζουν χωροχρονικά το διαχωρισμό και την ταυτότητα των CPCs παραμένει ελλιπής. Βασικό εμπόδιο για την κατανόηση αυτών των μηχανισμών αποτελεί η έλλειψη αξιόπιστων και συγκεκριμένων δεικτών για την ταυτοποίηση των CPCs, και ειδικότερα για την απομόνωση βιώσιμων CPCs, με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής-φθορισμού. Βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν ο διαχωρισμός των CPCs του FHF και του SHF, και για το σκοπό αυτό βασιστήκαμε στους γνωστούς δείκτες Kdr, Pdgfra και Gfra2

που χαρακτηρίζουν τα CPCs και των δύο καρδιακών πεδίων, καθώς και στην τεχνολογία Cre-LoxP για τη σήμανση των κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη Tbx5, ενδεικτική του FHF [36, 58].

Αρχικά, αφού έγινε ο εντοπισμός των διαφοροποιούμενων κυττάρων που εκφράζουν και τις τρεις πρωτεΐνες επιφάνειας Kdr, Pdgfra και Gfra2, στο συνολικό πληθυσμό των διαφοροποιούμενων κυττάρων, στόχος ήταν να προσδιοριστεί χρονικά η εμφάνιση του βέλτιστου πληθυσμού CPCs. Από προηγούμενες *in vitro* μελέτες, οι οποίες βασίστηκαν σε παρεμφερές πρωτόκολλο διαφοροποίησης είναι γνωστό ότι η έκφραση του Gfra2 εντοπίζεται τις ημέρες 4-9 της διαφοροποίησης στα Pdgfra⁺ κύτταρα με τη μέγιστη έκφραση να παρουσιάζεται την 7^η ημέρα της διαφοροποίησης. Στις μελέτες αυτές, η πλειοψηφία των Gfra2⁺/Pdgfra⁺ κυττάρων που απομονώθηκαν την 7^η ημέρα διαφοροποιείται σε Tnnt2⁺ και Actn1⁺ καρδιομυοκύτταρα χωρίς τάση διαφοροποίησης προς vSMCs και ECs. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι την 7^η ημέρα της διαφοροποίησης τα Gfra2⁺/Pdgfra⁺ κύτταρα έχουν ήδη «δεσμευτεί» προς μία καρδιακή μοίρα, ωστόσο, βρίσκονται ακόμα σε μία πρώιμη βλαστική κατάσταση, κατά την οποία εκφράζουν γνωστούς δείκτες των CPCs του FHF και του SHF, μεταξύ των οποίων τον Tbx5 που στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης σηματοδοτεί την παρουσία του FHF [58]. Επιπλέον, στα ίδια πειράματα αναφέρεται ότι κατά την 4^η-5^η ημέρα της διαφοροποίησης σχεδόν ολόκληρος ο Kdr^{low}/Pdgfra⁺ πληθυσμός εκφράζει την πρωτεΐνη Gfra2.

Στη μελέτη που πραγματοποιήσαμε, η δυναμική των CPCs που εκφράζουν τους δείκτες αυτούς σε γενικές γραμμές συγκλίνει με τα παραπάνω ευρήματα. Πιο συγκεκριμένα, τα Pdgfra⁺/Gfra2⁺ κύτταρα εμφανίζονται σε μικρό ποσοστό την 3^η ημέρα και σταδιακά αυξάνονται με την 7^η ημέρα να εμφανίζονται στο μεγαλύτερο ποσοστό το οποίο διατηρείται μέχρι και την 9^η ημέρα, κατά την οποία παρουσιάζεται μικρή μείωση αυτού του πληθυσμού, ενώ παρατηρείται επίσης μεγάλη τυπική απόκλιση μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων. Η απόκλιση αυτή την 9^η ημέρα μπορεί να υποδηλώνει την έναρξη της μείωσης αυτού του πληθυσμού και την έναρξη της μετάβασης των κυττάρων από την πρώιμη κατάσταση μονοδυναμίας στην περαιτέρω διαφοροποίησή τους. Τη 10^η ημέρα διαφοροποίησης παρατηρείται αφενός μεγάλη μείωση του ποσοστού των CPCs κι αφετέρου σε διαφορετικό πείραμα πλήρης απουσία των CPCs. Τη 13^η ημέρα διαφοροποίησης δεν εντοπίζονται Pdgfra⁺/Gfra2⁺ CPCs στον πληθυσμό.

Η διαφοροποίηση των κυττάρων με την τεχνική των EBs δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές καθώς τα ποσοστά των CPCs που παρατηρήθηκαν στα EBs την 9^η και 10^η ημέρα διαφοροποίησης είναι μικρότερα από αυτά που παρατηρήθηκαν στην καλλιέργεια μονοστιβάδας. Αυτό μπορεί να οφείλεται ενδεχομένως σε ορισμένα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η διαφοροποίηση με EBs, όπως είναι η απώλεια κυττάρων κατά την τρυψινοποίηση και η μεγάλη στοχαστικότητα που χαρακτηρίζει αυτόν τον τρόπο διαφοροποίησης, καθώς οι κυτταροκίνες που περιέχονται στο θρεπτικό μέσο δεν κατανέμονται ομογενώς στη σφαίρα με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των κυτταροκινών να είναι διαφορετική σε κάθε σημείο της σφαιρών [336].

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση του υποδοχέα Kdr (γνωστός και ως Flk-1) με τα Pdgfra⁺/Gfra2⁺ CPCs. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η πλειοψηφία των CPCs κατανέμεται και στους δύο πληθυσμούς Kdr⁻ και Kdr^{low}, με τον Kdr^{low} να παρουσιάζει τα μεγαλύτερα ποσοστά, και ειδικότερα την 7^η και 9^η ημέρα, σχεδόν ο συνολικός Kdr^{low} πληθυσμός είναι Pdgfra⁺/Gfra2⁺. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι Kdr και Pdgfra χρησιμοποιούνται ευρέως για την απομόνωση των CPCs [59]. Επίσης, είναι γνωστό ότι ο Kdr αποτελεί έναν από τους πρώιμους δείκτες κυττάρων αιμαγγειοβλαστικής σειράς, και της αιμοποίησης εν γένει [337]. Ωστόσο οι Yang *et al.* κατά τη διαφοροποίηση των hESCs προς CPCs απομόνωσαν δύο πληθυσμούς, τους KDR^{high}/C-KIT⁺ και KDR^{low}/C-KIT^{neg}, εκ των οποίων στον πρώτο εκφράζονταν γονίδια που σχετίζονται με κύτταρα αιμοποιητικής σειράς, ενώ στο δεύτερο την 8^η και 10^η ημέρα της διαφοροποίησης εμφάνισαν υψηλή έκφραση οι πρωτεΐνες CD31, VSM και γονίδια που σχετίζονται με την καρδιακή ανάπτυξη, όπως τα NKX2.5, ISL1 και TBX5, και την καρδιακή ωρίμανση, όπως τα CTNT, MLC2A [240]. Επομένως, μιλώντας για τον τριπλά θετικό πληθυσμό Kdr^{low}/Pdgfra⁺/Gfra2⁺ αναφερόμαστε σε κύτταρα πολυδύναμα, και των δύο πεδίων, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν και στους 3 καρδιακούς κυτταρικούς τύπους CMs, ECs, vSMCs.

Σύμφωνα με τα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήσαμε, ο Kdr^{low}/Pdgfra⁺/Gfra2⁺ πληθυσμός εμφανίζεται την 3^η ημέρα της διαφοροποίησης, και αυξάνεται μέχρι την 6^η ημέρα με τα Kdr^{low} να εμφανίζονται σε μεγάλο ποσοστό στο συνολικό πληθυσμό. Αντίθετα, την 7^η και 9^η ημέρα, τα Kdr^{low} κύτταρα παρουσιάζουν ποσοστιαία μείωση σε σχέση με τις προηγούμενες ημέρες, συνεχίζουν όμως να υπάρχουν στον πληθυσμό Pdgfra⁺/Gfra2⁺. Τελικώς, την 10^η και 13^η ημέρα, το ποσοστό των Pdgfra⁺/Gfra2⁺ CPCs μειώνεται δραστικά. Ωστόσο, έχουμε μία δεύτερη αύξηση των Kdr^{low} κυττάρων η οποία μπορεί να αφορά την εμφάνιση ενός άλλου προγονικού πληθυσμού μη καρδιακής γενεαλογίας. Τα αποτελέσματα αυτά, βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Kattman *et al.* που αναφέρουν εμφάνιση του πληθυσμού Kdr⁺/Pdgfra⁺ την 3^η ημέρα [125], καθώς και με αυτά των Ishida *et al.* σύμφωνα με τα οποία ο Kdr^{low} αυξάνεται από την 3^η ημέρα διαφοροποίησης, μειώνεται ωστόσο την 6^η ημέρα [58]. Φαίνεται, λοιπόν, ότι στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, ο Kdr συναντάται σε μέρος των πρώιμων πολυδύναμων κυττάρων της καρδιακής σειράς. Άλλωστε το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από άλλες μελέτες, όπου έπειτα από πειράματα γενεαλογίας στο ποντίκι φάνηκε ότι στα πρώιμα στάδια της καρδιακής ανάπτυξης το ενδοκάρδιο και μέρος του μυοκαρδίου αναπτύσσεται από έναν ενδιάμεσο πληθυσμό που εκφράζει τον Flk-1 [56, 338]. Ο πληθυσμός αυτός εμφανίζεται όταν τα κύτταρα εξέρχονται της PS και μεταναστεύουν στην καρδιακή ημισέληνο. Πράγματι οι Kattman *et al.* αναγνώρισαν δύο πληθυσμούς Flk-1⁺, έναν πρώιμο πληθυσμό Flk1⁺ (D3.25) που θα δώσει κύτταρα αιμαγγειοβλαστικής σειράς και έναν δεύτερο Flk1⁺ πληθυσμό που ακολουθεί τον πρώτο και διαφοροποιείται σε κύτταρα καρδιακής σειράς, σε CMs VSMs, και ECs [339]. Η αύξηση του Kdr^{low} πληθυσμού μετά τη 10^η ημέρα, μπορεί να αφορά κύτταρα άλλης προγονικής σειράς, καθώς οι δείκτες Pdgfra και Gfra2 δεν συναντώνται στον πληθυσμό.

5.3 Απομόνωση του FHF την 9η ημέρα με τον Tbx5 να εκφράζεται κυρίως στον $Kdr^{low}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$ πληθυσμό

Ο καθορισμός των πολυδύναμων καρδιακών κυττάρων σε μονοδύναμα κύτταρα του FHF, σηματοδοτείται από την παρουσία του Tbx5. Γνωρίζοντας, λοιπόν, ότι ο βέλτιστος CPC πληθυσμός συναντάται μεταξύ της 7^{ης} και 9^{ης} ημέρας διαφοροποίησης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του CPC πληθυσμού για τον εντοπισμό της έκφρασης του Tbx5 (eYFP⁺ κύτταρα) τις δεδομένες χρονικές στιγμές. Αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι την 7^η ημέρα ο μεγαλύτερος αριθμός των Tbx5⁺ κυττάρων συναντάται στον πληθυσμό $Kdr^{low}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$, ενώ ένας δεύτερος μικρότερος αριθμός κυττάρων που εκφράζουν τον Tbx5 συναντάται και στον $Kdr^{-}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$ πληθυσμό. Την 9^η ημέρα ο Tbx5⁺ πληθυσμός στον $Kdr^{low}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$, σχεδόν πενταπλασιάζεται, σε αντίθεση με τον $Kdr^{-}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$ πληθυσμό στον οποίο τα Tbx5⁺ κύτταρα μειώνονται και αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό του πληθυσμού. Η αύξηση των Tbx5⁺ κυττάρων από την 7^η στην 9^η ημέρα συνηγορεί στον πολλαπλασιασμό αυτών των αρχικών κυττάρων του FHF, καθιστώντας αυτή τη χρονική στιγμή καταλληλότερη για το διαχωρισμό των CPCs των δύο καρδιακών πεδίων. Η παρουσία Tbx5⁺ κυττάρων και στον $Kdr^{-}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$ μπορεί να οφείλεται στο ότι σύμφωνα με τους Ishida *et al.* [58], όσο τα κύτταρα δεσμεύονται προς μία καρδιακή μοίρα, και πριν διαφοροποιηθούν περαιτέρω προς CM, χάνουν την έκφραση του KDR έτσι ώστε τα διπλά θετικά $Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$ κύτταρα θα είναι αντιπροσωπευτικά των CPCs του FHF σε μετέπειτα στάδιο. Ακόμα, η έκφραση του Tbx5 μπορεί να είναι αλληλένδετη με τα CPCs του FHF, ωστόσο, η έκφρασή του είναι απαραίτητη στο SHF για τη δημιουργία διαφραγμάτων στους κόλπους, και έχει εντοπιστεί στο οπίσθιο μέρος του SHF. Ίσως, λοιπόν, τα Tbx5⁺ κύτταρα στον $Kdr^{-}/Pdgfra^{+}/Gfra2^{+}$ πληθυσμό, να αποτελούν έναν διαφορετικό πληθυσμό CPCs που σχετίζονται με το SHF [340].

Όπως γίνεται κατανοητό από όλα τα παραπάνω, το μοτίβο έκφρασης καθενός από τους παραπάνω μεταγραφικούς παράγοντες στο έμβρυο είναι δυναμικό και η ειδικότητα του καθενός για τα κύτταρα της καρδιακής σειράς είναι χρονικά παροδική. Συνεπώς, δεν υπάρχουν δείκτες που να χαρακτηρίζουν με ακρίβεια έναν τέτοιο πληθυσμό. Το γεγονός αυτός δυσχεραίνει την απομόνωση ενός καθαρού πληθυσμού CPCs και κατ'επέκταση τον διαχωρισμό των CPCs του FHF από αυτά του SHF. Η απομόνωση ενός τέτοιου πληθυσμού και η περαιτέρω ανάλυση αυτού του πληθυσμού με τεχνικές αλληλούχισης RNA μεμονωμένου κυττάρου, μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων δεικτών ή γονιδίων που χαρακτηρίζουν αυτό το μονοδύναμο πληθυσμό.

5.4 Το διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού $Tbx5^{Cre}/ROSA26^{eYFP/eYFP}$

Είναι γνωστό ότι η έκφραση του Tbx5 είναι ενδεικτική του FHF στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, όπως επίσης και ο μονοδύναμος χαρακτήρας των Tbx5⁺ κυττάρων. Ακόμα, ένα εύρος καρδιακών ανωμαλιών σχετίζεται με μεταλλάξεις στο TBX5 στον άνθρωπο [341]. Όλα τα

παραπάνω, υπογραμμίζουν τη σημασία του γονιδίου αυτού στην καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία. Ζωικά μοντέλα που χαρακτηρίζονται από τέτοιες ανωμαλίες, αποτέλεσαν χρήσιμο εργαλείο για την διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου αυτού στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ωστόσο, μέχρι πρότινος απουσίαζε η ύπαρξη ενός μοντέλου που θα επιτρέψει την άμεση εποπτεία της έκφρασης του *Tbx5* μέσω της επαγόμενης γονιδιακής στόχευσης, χρονοειδικά ή κυτταροειδικά. Το 2015 οι Kokkinopoulos *et al.* έπειτα από το σχεδιασμό του BAC διαγονιδίου *Tbx5^{creERT2}* δημιούργησαν τη σειρά ποντικών *Tbx5^{Cre}/ROSA26^{eYFP/eYFP}*.

Έτσι, με απώτερο σκοπό την απόκτηση ενός τέτοιου μοντέλου, πραγματοποιήθηκε μία σειρά διασταυρώσεων. Από εσωτερική διασταύρωση των στελεχών της F0 γενιάς *Tbx5^{creERT2}* και *Rosa26^{eYFP/eYFP}*, προέκυψε η F1 γενία. Για την απόκτηση της F2 γενιάς πραγματοποιήθηκαν εσωτερικές διασταυρώσεις μεταξύ των ατόμων της F1 που φέρουν το *Tbx5^{creERT2}* διαγονίδιο, και ακολούθως, εσωτερικές διασταυρώσεις της F2 γενιάς μεταξύ των ατόμων *Tbx5^{creERT2}/Rosa26^{eYFP/eYFP}* έτσι ώστε το 100% της F3 γενιάς να έχει τέτοιο γονότυπο. Ένα τέτοιο μοντέλο αφενός δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού της έκφρασης του *Tbx5* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, αφετέρου καθιστά εφικτό τον ενδεχόμενο εντοπισμό της έκφρασης του γονιδίου αυτού στην ενήλικη καρδιά. Εξάλλου, η παλιότερα επικρατούσα άποψη ότι τα κύτταρα της ανθρώπινης καρδιάς μετατρέπονται σε μετα-μιτωτικά και δεν μπορούν πλέον να αυτό-ανανεώνονται με την πάροδο της ηλικίας ή κατά τον τραυματισμό, έχει ανατραπεί έπειτα από σχετικά πρόσφατα ευρήματα των Garbern και Lee [162]. Ωστόσο, η ευεργετική δράση των μέχρι σήμερα αναφερθέντων CPC πληθυσμών στην ενήλικη καρδιά, δεν έχει επιβεβαιωθεί, και η θετική επίδραση τέτοιων πληθυσμών πιθανώς να οφείλεται σε παρακρινικά φαινόμενα ή στη διαφοροποίηση προς άλλους κυτταρικούς τύπους. Ο εντοπισμός ενός *Tbx5⁺* πληθυσμού σε ενήλικη υγιή ή εμφραγματική καρδιά ποντικού, και η απομόνωση και ανάλυση αυτού του πληθυσμού μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων γονιδίων που ενδεχομένως να κατέχουν εξέχουσα θέση στο γονιδιακό δίκτυο της καρδιακής ανάπτυξης.

5.5 Ο *Tbx5* είναι απαραίτητος για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης της καρδιάς και του θωρακικού πτερυγίου στο zebrafish

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας T-box φέρουν ένα υψηλά συντηρημένο πλαίσιο περίπου 200 αμινοξικών καταλοίπων, μέσω του οποίου γίνεται η προσδέση στο DNA [342]. Τα γονίδια T-box διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική εξειδίκευση και στις μορφογενετικές διαδικασίες [343], και μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά έχουν συνδεθεί με αναπτυξιακές διαταραχές στον άνθρωπο [342]. Μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο *TBX5* είναι υπεύθυνες για το σύνδρομο Holt-Oram, το οποίο χαρακτηρίζεται από συγγενείς ανωμαλίες της καρδιάς και των άκρων [344]. Η απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των *tbx5a*, *tbx5b* στο zebrafish οδηγεί σε φαινοτύπους παρόμοιους με αυτούς που εμφανίζουν και τα θηλαστικά. Έτσι, τόσο στα *hst* zebrafish έμβρυα όσο και στο ανθρώπινο σύνδρομο Holt-Oram, η έλλειψη του *Tbx5* παρεμποδίζει την ανάπτυξη της καρδιάς και των άκρων.

Η ερευνητική ομάδα των Garrity *et al.* ήταν από τις πρώτες που έδειξαν τις επιπτώσεις της απουσίας του Tbx5 στα έμβρυα του zebrafish. Τόσο τα μεταλλάγματα *hst*, καθώς και τα έμβρυα στα οποία έγινε αποσιώπηση του *tbx5* με ενέσεις αντισημαινόντων ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης (morphants) εμφάνισαν το χαρακτηριστικό σχήμα της «καρδιάς-κορδόνι». Η καρδιά των ψαριών αυτών, φαίνεται σχηματίζεται και να λειτουργεί φυσιολογικά μέχρι το στάδιο του καρδιακού σωλήνα, παρουσιάζοντας μόνο ελαφριά βραδυκαρδία. Στη συνέχεια, τα ψάρια αυτά εμφανίζουν έλλειψη του θωρακικού πτερυγίου και καρδιακές δυσλειτουργίες που επηρεάζουν τόσο τον κόλπο όσο και την κοιλία, όχι όμως την οδό εισροής (inflow tract), όπως είναι η αδυναμία στροφής του μυοκαρδιακού ιστού, οδηγώντας σε μία διατεταμένη μη λειτουργική καρδιά. Επιπλέον, τα έμβρυα χαρακτηρίζονται από απουσία του θωρακικού πτερυγίου ή εμφανίζουν υπανάπτυκτα πτερύγια, των οποίων σε μερικές περιπτώσεις η εμφάνιση γίνεται καθυστερημένα [325, 345].

Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκλίνουν με τις παρατηρήσεις που προέκυψαν από τις ενέσεις morpholino που πραγματοποιήσαμε σε έμβρυα zebrafish στο στάδιο του ενός κυττάρου. Όμοια με τα παραπάνω τα *tbx5*-MO έμβρυα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά τις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, ενώ στις 48 hpf είναι εμφανής η διατεταμένη καρδιά σε σχήμα κορδόνι και το περικαρδιακό οίδημα το μέγεθος του οποίου διαφέρει από έμβρυο σε έμβρυο. Τα έμβρυα εμφανίζουν επίσης βραδυκαρδία και απουσία του θωρακικού πτερυγίου, ή μικρότερο, λιγότερο αναπτυγμένο πτερύγιο. Στα επόμενα στάδια, της ανάπτυξης, στις 72 και 96 hpf δηλαδή, η αδυναμία ολοκλήρωσης της ανάπτυξης του μυοκαρδιακού ιστού παραμένει, ενώ επίσης δεν έχουμε αποκατάσταση του θωρακικού πτερυγίου. Άκομα, έχουμε επιδείνωση του περικαρδιακού οιδήματος και της βραδυκαρδίας και τελικά μετά τις 5-6 dpf τα περισσότερα έμβρυα δεν επιβιώνουν. Όπως έχει αποδειχτεί, η λειτουργία του *tbx5* στην καρδιά, εξαρτάται άμεσα από το βαθμό έκφρασης του γονιδίου αυτού, αφού τόσο η ανεπάρκεια απλοειδίας όσο και ο διπλασιασμός του γονιδίου οδηγούν σε καρδιακές ανωμαλίες [346 – 348]. Επομένως διαφορές μεταξύ των εμβρύων ενδεχομένως μπορούν να αποδοθούν στο βαθμό ενσωμάτωσης των *tbx5*-MO στα έμβρυα στα οποία λόγω των αναπόφευκτων τεχνικών αποκλίσεων, η τελική συγκέντρωση των morpholino να χαρακτηρίζεται από πολύ μικρές διαβαθμίσεις.

Επιπλέον, στον άνθρωπο, μεταλλάγες στο γονίδιο TBX5 είναι συνδεδεμένες σε μεγάλο βαθμό με σοβαρότατες ανωμαλίες στον κόλπο της καρδιάς, παρότι αφορούν και την κοιλία και άλλες περιοχές της καρδιάς [349]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τις μικροσκοπικές εικόνες στις οποίες φαίνεται το μυοκάρδιο των *cm1c2:gfp tbx5*-MO εμβρύων, όπου η κοιλία και ο αρτηριακός βολβός εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη, ωστόσο, παρουσιάζουν σοβαρότατη ανωμαλία στην ανάπτυξη του κόλπου.

Τέλος, όπως είναι φυσικό, η παρεμπόδιση της καρδιακής ανάπτυξης οδήγησε και σε ανωμαλίες στον σχηματισμό των βαλβίδων. Πρόκειται περισσότερο για έμμεση επίδραση της απουσίας του γονιδίου στην ανάπτυξη της καρδιάς, καθώς δεν έχει επισημανθεί συμμετοχή του

tbx5 στο σχηματισμό των βαλβίδων. Οι καρδιές των tbx5-MO παραμένουν σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο και η απουσία έκφρασης του γονιδίου είναι καθοριστική για τη μετέπειτα εξέλιξη αυτής της ανάπτυξης. Άλλωστε, Ο σχηματισμός της καρδιακής βαλβίδας ξεκινάει με το σχηματισμό του κολποκοιλιακού καναλιού και τη στένωση μεταξύ κόλπου και κοιλίας στις 37 hpf και αυτή η αναπτυξιακή διαδικασία συμβαίνει παράλληλα με την δεξιά στροφή του μυοκαρδιακού ιστού [297]. Έτσι, η παρεμπόδιση της τελευταίας, ενδεχομένως να οδηγεί έμμεσα στην παρεμπόδιση της έκκρισης σηματοδοτικών μορίων, καθώς και των σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στο σχηματισμό των βαλβίδων, επιβεβαιώνοντας τον καθοριστικό ρόλο του tbx5 στην ανάπτυξη της καρδιάς.

Εν κατακλείδι, να αναφέρουμε ότι το μοτίβο έκφρασης του tbx5 είναι δυναμικό στον αναπτυσσόμενο καρδιακό σωλήνα. Στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης το μοτίβο αυτό εμφανίζει ορισμένες διαφορές μεταξύ , ανθρώπου [350], ποντικίου [349], όρνιθας [351] και βατράχου [352]. Ωστόσο, μετά την ολοκλήρωση της δεξιάς στροφής της καρδιάς, υπάρχει διαβάθμιση της έκφρασης του tbx5 από το οπίσθιο προς το εμπρόσθιο τμήμα με υψηλότερο επίπεδο έκφρασης στους κόλπους, χαρακτηριστικό κοινό σε όλα αυτά τα είδη. Όπως προέκυψε από τα παραπάνω, επίσης, μεταλλαγές στο γονίδιο Tbx5 ή παρεμπόδιση της έκφρασής του, οδηγούν σε συνδρομικές ανεπάρκειες συντηρημένες σε ψάρια και θηλαστικά. Είναι σαφές, λοιπόν, ότι ανωμαλίες σε διάφορα όργανα που σχετίζονται με γενετικά σύνδρομα που συναντώνται στον άνθρωπο, μπορούν να μοντελοποιηθούν στο ψάρι με μεγάλη ακρίβεια. Αυτό, σε συνδυασμό με την ικανότητα αναγέννησης διαφόρων οργάνων και την ευκολία σε γενετικούς χειρισμούς, καθιστά το ψάρι ζέβρα μοντέλο ιδανικό και δυναμικό για την αναπτυξιακή βιολογία και την αναγεννητική ιατρική.

6. Βιβλιογραφία

- [1] M. Buckingham, S. Meilhac, and S. Zaffran, "Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells," *Nature Reviews Genetics*, vol. 6, no. 11. pp. 826–835, Nov-2005.
- [2] J. M. W. (Jonathan M. W. Slack, *Essential developmental biology*. Wiley, 2013.
- [3] R. K. Clark, *Anatomy and Physiology: Understanding the Human Body*. Jones & Bartlett Learning, 2005.
- [4] M. Fang, F. L. Xiang, C. M. Braitsch, and K. E. Yutzey, "Epicardium-derived fibroblasts in heart development and disease," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 91. Academic Press, pp. 23–27, 01-Feb-2016.
- [5] B. Zhou, A. von Gise, Q. Ma, J. Rivera-Feliciano, and W. T. Pu, "Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 375, no. 3, pp. 450–453, Oct. 2008.
- [6] C. L. Cai *et al.*, "A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells," *Nature*, vol. 454, no. 7200, pp. 104–108, Jul. 2008.
- [7] Y. Tang, J. R. Nyengaard, J. B. Andersen, U. Baandrup, and H. J. G. Gundersen, "The application of stereological methods for estimating structural parameters in the human heart," *Anat. Rec.*, vol. 292, no. 10, pp. 1630–1647, Oct. 2009.
- [8] A. C. Nag, "Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: A fine structural analysis and distribution," *Cytobios*, vol. 28, no. 109, pp. 41–61, 1980.
- [9] P. Zhou and W. T. Pu, "Recounting cardiac cellular composition," *Circulation Research*, vol. 118, no. 3. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 368–370, 2016.
- [10] W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, M. A. Wallig, B. Bolon, and R. Ochoa, *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. Elsevier Inc., 2013.
- [11] L. M. Miller and A. Gal, "Cardiovascular System and Lymphatic Vessels1," in *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, Elsevier, 2017, pp. 561-616.e1.
- [12] M. J. Curtis, "The Heart and Cardiovascular System," *Cardiovasc. Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 720b-720b, Jul. 1992.
- [13] J. Feher, *Quantitative Human Physiology: An introduction*. Academic Press, 2016.
- [14] P. A. Iaizzo and T. G. Laske, "Anatomy and Physiology of the Cardiac Conduction System," in *Cardiac Electrophysiology Methods and Models*, Springer US, 2010, pp. 73–89.
- [15] J. W. Clark, J. M. Shumaker, C. R. Murphey, and W. R. Giles, "Mathematical Models of Pacemaker Tissue in the Heart," 1991, pp. 255–288.
- [16] A. S. Amin, H. L. Tan, and A. A. M. Wilde, "Cardiac ion channels in health and disease," *Hear. Rhythm*, vol. 7, no. 1, pp. 117–126, Jan. 2010.
- [17] G. Auda-Boucher, B. Bernard, J. Fontaine-Péru, T. Rouaud, M. Mericksay, and M. F. Gardahaut, "Staging of the commitment of murine cardiac cell progenitors," *Dev. Biol.*, vol. 225, no. 1, pp. 214–225, Sep. 2000.
- [18] C. L. Baker and M. F. Pera, "Capturing Totipotent Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 22, no. 1. Cell Press, pp. 25–34, 04-Jan-2018.
- [19] S. B. Nissen *et al.*, "Four simple rules that are sufficient to generate the mammalian blastocyst," *PLoS Biol.*, vol. 15, no. 7, Jul. 2017.
- [20] H.-H. Ng and M. A. Surani, "The transcriptional and signalling networks of pluripotency," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 490–496, May 2011.
- [21] K. M. Loh and B. Lim, "A precarious balance: Pluripotency factors as lineage specifiers," *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 4. pp. 363–369, 08-Apr-2011.
- [22] N. M. E. Fogarty *et al.*, "Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis," *Nature*, vol. 550, no. 7674, pp. 67–73, Oct. 2017.
- [23] "Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions," 2001.
- [24] C. D. Stern and K. M. Downs, "The hypoblast (visceral endoderm): An evo-devo perspective," *Development*, vol. 139, no. 6, pp. 1059–1069, Mar. 2012.
- [25] M. Sahara, F. Santoro, and K. R. Chien, "Programming and reprogramming a human heart cell," *EMBO J.*, vol. 34, no. 6, pp. 710–738, Mar. 2015.
- [26] C. C. Lu and E. J. Robertson, "Multiple roles for Nodal in the epiblast of the mouse embryo in the establishment of anterior-posterior patterning," *Dev. Biol.*, vol. 273, no. 1, pp. 149–159, Sep. 2004.
- [27] T. Schlange, B. Andrée, H. H. Arnold, and T. Brand, "BMP2 is required for early heart development during a distinct time period," *Mech. Dev.*, vol. 91, no. 1–2, pp. 259–270, Mar. 2000.
- [28] T. Sumi, N. Tsuneyoshi, N. Nakatsuji, and H. Suemori, "Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance canonical Wnt/ β -catenin, activin/Nodal and BMP signaling," *Development*, vol. 135, no. 17, pp. 2969–2979, Sep. 2008.
- [29] K. L. Lee *et al.*, "Graded Nodal/Activin Signaling Titrates Conversion of Quantitative Phospho-Smad2 Levels into Qualitative Embryonic Stem Cell Fate Decisions," *PLoS Genet.*, vol. 7, no. 6, p. e1002130, Jun. 2011.
- [30] S. Stefanovic, N. Abboud, S. Désilets, D. Nury, C. Cowan, and M. Pucéat, "Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: A molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate," *J. Cell Biol.*, vol. 186, no. 5, pp. 665–673, Sep. 2009.
- [31] Y. Liu *et al.*, "Sox17 is essential for the specification of cardiac mesoderm in embryonic stem cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 10, pp. 3859–3864, Mar. 2007.
- [32] F. C. Simões, T. Peterkin, and R. Patient, "Fgf differentially controls cross-antagonism between cardiac and haemangioblast regulators," *Development*, vol. 138, no. 15, pp. 3235–3245, Aug. 2011.
- [33] F. Lescroart *et al.*, "Early lineage restriction in temporally distinct populations of Mesp1 progenitors during mammalian heart development," *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 829–840, 2014.
- [34] D. Später *et al.*, "A HCN4+ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 1098–1106, Sep. 2013.
- [35] W. P. Devine, J. D. Wythe, M. George, K. Koshiba-Takeuchi, and B. G. Bruneau, "Early patterning and specification of cardiac progenitors in gastrulating mesoderm," *Elife*, vol. 3, Oct. 2014.
- [36] I. Kokkinopoulos *et al.*, "Single-Cell Expression Profiling Reveals a Dynamic State of Cardiac Precursor Cells in the Early Mouse Embryo," *PLoS One*, vol. 10, no. 10, p. e0140831, Oct. 2015.
- [37] C. H. Mjaatvedt *et al.*, "The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field," *Dev. Biol.*, vol. 238, no. 1, pp. 97–109, Oct. 2001.
- [38] K. L. Waldo *et al.*, "Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field," *Development*, vol. 128, no. 16, pp. 3179–3188, 2001.
- [39] R. G. Kelly, M. E. Buckingham, and A. F. Moorman, "Heart fields and cardiac morphogenesis," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 4, no. 10, 2014.
- [40] A. Moretti *et al.*, "Multipotent Embryonic Isl1+ Progenitor Cells Lead to Cardiac, Smooth Muscle, and Endothelial Cell Diversification," *Cell*,

- vol. 127, no. 6, pp. 1151–1165, Dec. 2006.
- [41] M. P. Santini, E. Forte, R. P. Harvey, and J. C. Kovacic, “Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells,” *Development (Cambridge)*, vol. 143, no. 8, Company of Biologists Ltd, pp. 1242–1258, 15-Apr-2016.
- [42] N. Witman, C. Zhou, N. Grote Beverborg, M. Sahara, and K. R. Chien, “Cardiac progenitors and paracrine mediators in cardiogenesis and heart regeneration,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 2019.
- [43] P. Van Vliet, S. M. Wu, S. Zaffran, and M. Puceat, “Early cardiac development: a view from stem cells to embryos,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 96, no. 3, pp. 352–362, Dec. 2012.
- [44] J. Smith, “Brachyury and the T-box genes,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 7, no. 4, pp. 474–480, 1997.
- [45] K. M. Loh and B. Lim, “A Precarious Balance: Pluripotency Factors as Lineage Specifiers,” *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 363–369, Apr. 2011.
- [46] S. J. Kattman, T. L. Huber, and G. M. M. Keller, “Multipotent Flk-1+ Cardiovascular Progenitor Cells Give Rise to the Cardiomyocyte, Endothelial, and Vascular Smooth Muscle Lineages,” *Dev. Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 723–732, Nov. 2006.
- [47] C. Showell, O. Binder, and F. L. Conlon, “T-box genes in early embryogenesis,” *Dev. Dyn.*, vol. 229, no. 1, pp. 201–218, Jan. 2004.
- [48] Y. Saga, S. Miyagawa-Tomita, A. Takagi, S. Kitajima, J. I. Miyazaki, and T. Inoue, “MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube,” *Development*, vol. 126, no. 15, pp. 3437–3447, Aug. 1999.
- [49] K. R. Chien, I. J. Domian, and K. K. Parker, “Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine,” *Science*, vol. 322, no. 5907, pp. 1494–1497, 05-Dec-2008.
- [50] K. L. Laugwitz *et al.*, “Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages,” *Nature*, vol. 433, no. 7026, pp. 647–653, Feb. 2005.
- [51] I. L. Lei, L. Bu, and Z. Wang, “Derivation of cardiac progenitor cells from embryonic stem cells,” *J. Vis. Exp.*, no. 95, Jan. 2015.
- [52] J. Z. Zhang *et al.*, “A Human iPSC Double-Reporter System Enables Purification of Cardiac Lineage Subpopulations with Distinct Function and Drug Response Profiles,” *Cell Stem Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 802–811.e5, May 2019.
- [53] A. Magli *et al.*, “Pax3 and Tbx5 specify whether PDGFR α cells assume skeletal or cardiac muscle fate in differentiating embryonic stem cells,” *Stem Cells*, vol. 32, no. 8, pp. 2072–2083, 2014.
- [54] J. K. Takeuchi and B. G. Bruneau, “Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors,” *Nature*, vol. 459, no. 7247, pp. 708–711, Jun. 2009.
- [55] G. Blin *et al.*, “A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates,” *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 4, pp. 1125–1139, Apr. 2010.
- [56] M. Ema, S. Takahashi, and J. Rossant, “Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors,” *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 111–117, Jan. 2006.
- [57] N. Takakura, H. Yoshida, Y. Ogura, H. Kataoka, S. Nishikawa, and S. I. Nishikawa, “PDGFR α expression during mouse embryogenesis: Immunolocalization analyzed by whole-mount immunohistochemistry using the monoclonal anti-mouse PDGFR α antibody APAS5,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 45, no. 6, pp. 883–893, 1997.
- [58] H. Ishida *et al.*, “GFR2 Identifies Cardiac Progenitors and Mediates Cardiomyocyte Differentiation in a RET-Independent Signaling Pathway,” *Cell Rep.*, vol. 16, no. 4, pp. 1026–1038, 2016.
- [59] A. Bondue *et al.*, “Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation,” *J. Cell Biol.*, vol. 192, no. 5, pp. 751–765, Mar. 2011.
- [60] R. Carmona *et al.*, “The embryonic epicardium: an essential element of cardiac development,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 8, pp. 2066–2072, May 2010.
- [61] B. Zhou *et al.*, “Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart,” *Nature*, vol. 454, no. 7200, pp. 109–113, Jul. 2008.
- [62] T. C. Katz *et al.*, “Distinct Compartments of the Proepicardial Organ Give Rise to Coronary Vascular Endothelial Cells,” *Dev. Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 639–650, Mar. 2012.
- [63] M. Krainock, O. Toubat, S. Danopoulos, A. Beckham, D. Warburton, and R. Kim, “Epicardial Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Heart Development and Disease,” *J. Clin. Med.*, vol. 5, no. 2, p. 27, Feb. 2016.
- [64] S. N. Duim, K. Kurakula, M. J. Goumans, and B. P. T. Kruthof, “Cardiac endothelial cells express Wilms’ tumor-1. Wt1 expression in the developing, adult and infarcted heart,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 81, pp. 127–135, Apr. 2015.
- [65] V. Hildreth, S. Webb, L. Bradshaw, N. A. Brown, R. H. Anderson, and D. J. Henderson, “Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart,” *J. Anat.*, vol. 0, no. 0, pp. 071121040157003-???, Nov. 2007.
- [66] T. Nakamura, M. C. Colbert, and J. Robbins, “Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system,” *Circ. Res.*, vol. 98, no. 12, pp. 1547–54, Jun. 2006.
- [67] Y. Cui *et al.*, “Single-Cell Transcriptome Analysis Maps the Developmental Track of the Human Heart,” *Cell Rep.*, vol. 26, no. 7, pp. 1934–1950.e5, Feb. 2019.
- [68] C. S. Lee *et al.*, “Identification of Latrophilin-2 as a Novel Cell-Surface Marker for the Cardiomyogenic Lineage and Its Functional Significance in Heart Development,” *Circulation*, vol. 139, no. 25, Lippincott Williams and Wilkins, pp. 2910–2912, 18-Jun-2019.
- [69] M. Sahara *et al.*, “Population and Single-Cell Analysis of Human Cardiogenesis Reveals Unique LGR5 Ventricular Progenitors in Embryonic Outflow Tract,” *Dev. Cell*, vol. 48, no. 4, pp. 475–490.e7, Feb. 2019.
- [70] Y. Morita *et al.*, “Sall1 transiently marks undifferentiated heart precursors and regulates their fate,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 92, pp. 158–162, Mar. 2016.
- [71] R. Jain *et al.*, “Integration of Bmp and Wnt signaling by Hopx specifies commitment of cardiomyoblasts,” *Science (80-.)*, vol. 348, no. 6242, pp. aaa6071–aaa6071, Jun. 2015.
- [72] E. Bardot *et al.*, “Foxa2 identifies a cardiac progenitor population with ventricular differentiation potential,” *Nat. Commun.*, vol. 8, Feb. 2017.
- [73] P. Anversa and J. Kajstura, “Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart,” *Circulation Research*, vol. 83, no. 1. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1–14, 13-Jul-1998.
- [74] O. Bergmann *et al.*, “Evidence for cardiomyocyte renewal in humans,” *Science (80-.)*, vol. 324, no. 5923, pp. 98–102, Apr. 2009.
- [75] O. Bergmann *et al.*, “Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart,” *Cell*, vol. 161, no. 7, pp. 1566–1575, Jun. 2015.
- [76] P. C. H. Hsieh *et al.*, “Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury,” *Nat. Med.*, vol. 13, no. 8, pp. 970–974, Aug. 2007.
- [77] T. Le and J. Chong, “Cardiac progenitor cells for heart repair,” *Cell Death Discovery*, vol. 2, no. 1. Springer Nature, 12-Dec-2016.
- [78] R. Bolli *et al.*, “Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): Initial results of a randomised phase 1 trial,” *The Lancet*, vol. 378, no. 9806. Lancet Publishing Group, pp. 1847–1857, 2011.
- [79] N. Sultana *et al.*, “Resident c-kit + cells in the heart are not cardiac stem cells,” *Nat. Commun.*, vol. 6, Oct. 2015.
- [80] E. Messina *et al.*, “Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart,” *Circ. Res.*, vol. 95, no. 9, pp. 911–

921, Oct. 2004.

- [81] R. Genead *et al.*, "Islet-1 cells are cardiac progenitors present during the entire lifespan: From the embryonic stage to adulthood," *Stem Cells Dev.*, vol. 19, no. 10, pp. 1601–1615, Oct. 2010.
- [82] X. Wang, X. Liu, H. Zhang, L. Nie, M. Chen, and Z. Ding, "Reconstitute the damaged heart via the dual reparative roles of pericardial adipose-derived flk-1+ stem cells," *Int. J. Cardiol.*, vol. 202, pp. 256–264, Jan. 2016.
- [83] R. J. Vagnozzi, M. A. Sargent, S. C. J. Lin, N. J. Palpant, C. E. Murry, and J. D. Molkentin, "Genetic lineage tracing of Sca-1+ cells reveals endothelial but not myogenic contribution to the murine heart," *Circulation*, vol. 138, no. 25, pp. 2931–2939, 2018.
- [84] A. M. Hierlihy, P. Seale, C. G. Lobe, M. A. Rudnicki, and L. A. Megeney, "The post-natal heart contains a myocardial stem cell population," *FEBS Lett.*, vol. 530, no. 1–3, pp. 239–243, Oct. 2002.
- [85] C. M. Martin *et al.*, "Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart," *Dev. Biol.*, vol. 265, no. 1, pp. 262–275, Jan. 2004.
- [86] J. J. H. Chong, H. Reinecke, M. Iwata, B. Torok-Storb, A. Stempien-Otero, and C. E. Murry, "Progenitor cells identified by PDGFR-alpha expression in the developing and diseased human heart," *Stem Cells Dev.*, vol. 22, no. 13, pp. 1932–1943, Jul. 2013.
- [87] J. J. H. Chong *et al.*, "Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin," *Cell Stem Cell*, vol. 9, no. 6, pp. 527–540, Dec. 2011.
- [88] M. Valente *et al.*, "Mouse HSA+ immature cardiomyocytes persist in the adult heart and expand after ischemic injury," *PLOS Biol.*, vol. 17, no. 6, p. e3000335, Jun. 2019.
- [89] E. Marbán, "Breakthroughs in cell therapy for heart disease: Focus on cardiosphere-derived cells," in *Mayo Clinic Proceedings*, 2014, vol. 89, no. 6, pp. 850–858.
- [90] T. Le and J. Chong, "Cardiac progenitor cells for heart repair," *Cell Death Discovery*, vol. 2, no. 1. Springer Nature, p. 16052, 12-Dec-2016.
- [91] B. D. Maliken and J. D. Molkentin, "Undeniable evidence that the adult mammalian heart lacks an endogenous regenerative stem cell," *Circulation*, vol. 138, no. 8. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 806–808, 2018.
- [92] Y. Li *et al.*, "Genetic lineage tracing of nonmyocyte population by dual recombinases," *Circulation*, vol. 138, no. 8, pp. 793–805, 2018.
- [93] R. A. Bradshaw and E. A. Dennis, *Handbook of cell signaling, 2/e*, vol. 1–3. Elsevier Inc., 2010.
- [94] B. T. MacDonald, K. Tamai, and X. He, "Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases," *Developmental Cell*, vol. 17, no. 1. pp. 9–26, 21-Jul-2009.
- [95] W. Liu and A. C. Foley, "Signaling pathways in early cardiac development," *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 191–205, Mar. 2011.
- [96] X. He, M. Semenov, K. Tamai, and X. Zeng, "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way," *Development*, vol. 131, no. 8. pp. 1663–1677, Apr-2004.
- [97] M. D. Gordon and R. Nusse, "Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 32. pp. 22429–22433, 11-Aug-2006.
- [98] J. Huelsken and J. Behrens, "The Wnt signalling pathway," *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. 21, pp. 3977–3978, Nov. 2002.
- [99] T. M. Schultheiss, S. Xydias, and A. B. Lassar, "Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm," *Development*, vol. 121, no. 12, 1995.
- [100] M. J. Marvin, G. Di Rocco, A. Gardiner, S. M. Bush, and A. B. Lassar, "Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 3, pp. 316–327, Feb. 2001.
- [101] M. C. Nostro, X. Cheng, G. M. Keller, and P. Gadue, "Wnt, Activin, and BMP Signaling Regulate Distinct Stages in the Developmental Pathway from Embryonic Stem Cells to Blood," *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 1, pp. 60–71, Jan. 2008.
- [102] V. A. Schneider and M. Mercola, "Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 3, pp. 304–315, Feb. 2001.
- [103] E. Tzahor and A. B. Lassar, "Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 3, pp. 255–260, Feb. 2001.
- [104] A. C. Foley and M. Mercola, "Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex," *Genes Dev.*, vol. 19, no. 3, pp. 387–396, Feb. 2005.
- [105] A. T. Naito *et al.*, "Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/ β -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 52, pp. 19812–19817, Dec. 2006.
- [106] J. K. Yamashita *et al.*, "Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction," *FASEB J.*, vol. 19, no. 11, pp. 1534–1536, Sep. 2005.
- [107] P. Pandur, M. Läsche, L. M. Eisenberg, and M. Kühl, "Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis," *Nature*, vol. 418, no. 6898, pp. 636–641, Aug. 2002.
- [108] J. Duan *et al.*, "Wnt1/ β catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair," *EMBO J.*, vol. 31, no. 2, pp. 429–442, Jan. 2012.
- [109] A. Parikh, J. Wu, R. M. Blanton, and E. S. Tzanakakis, "Signaling Pathways and Gene Regulatory Networks in Cardiomyocyte Differentiation," *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, vol. 21, no. 4. Mary Ann Liebert Inc., pp. 377–392, 01-Aug-2015.
- [110] E. D. Cohen, Y. Tian, and E. E. Morrisey, "Wnt signaling: An essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal," *Development*, vol. 135, no. 5. The Company of Biologists Ltd, pp. 789–798, 01-Mar-2008.
- [111] S. Gu and X. H. Feng, "TGF- β signaling in cancer," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 50, no. 10. Oxford University Press, pp. 941–949, 01-Oct-2018.
- [112] D. E. Reese, C. E. Hall, and T. Mikawa, "Negative regulation of midline vascular development by the notochord," *Dev. Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 699–708, May 2004.
- [113] W. Cai, R. M. Guzzo, K. Wei, E. Willems, H. Davidovics, and M. Mercola, "A Nodal-to-TGF β cascade exerts biphasic control over cardiopoiesis," *Circ. Res.*, vol. 111, no. 7, pp. 876–81, Sep. 2012.
- [114] I. Lyons *et al.*, "Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*," *Genes Dev.*, vol. 9, no. 13, pp. 1654–1666, Jul. 1995.
- [115] H. Neuhaus, V. Rosen, and R. S. Thies, "Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF- β superfamily," *Mech. Dev.*, vol. 80, no. 2, pp. 181–184, Feb. 1999.
- [116] J. Lough, M. Barron, M. Brogley, Y. Sugi, D. L. Bolender, and X. Zhu, "Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm," *Dev. Biol.*, vol. 178, no. 1, pp. 198–202, Aug. 1996.
- [117] T. Fujiwara, D. B. Dehart, K. K. Sulik, and B. L. M. Hogan, "Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse," *Development*, vol. 129, no. 20, pp. 4685–4696, Oct. 2002.
- [118] G. Winnier, M. Blessing, P. A. Labosky, and B. L. M. Hogan, "Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse," *Genes Dev.*, vol. 9, no. 17, pp. 2105–2116, 1995.

- [119] F. Lescroart *et al.*, "Defining the earliest step of cardiovascular lineage segregation by single-cell RNA-seq," *Science (80-.)*, vol. 359, no. 6380, pp. 1177–1181, Mar. 2018.
- [120] L. Ma, M. F. Lu, R. J. Schwartz, and J. F. Martin, "Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning," *Development*, vol. 132, no. 24, pp. 5601–5611, Dec. 2005.
- [121] S.-A. Chang *et al.*, "Impact of Myocardial Infarct Proteins and Oscillating Pressure on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Effect of Acute Myocardial Infarction on Stem Cell Differentiation," *Stem Cells*, vol. 26, no. 7, pp. 1901–1912, Jul. 2008.
- [122] H. Chen *et al.*, "BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis," *Development*, vol. 131, no. 9, pp. 2219–2231, May 2004.
- [123] J. Y. Hahn *et al.*, "Pre-Treatment of Mesenchymal Stem Cells With a Combination of Growth Factors Enhances Gap Junction Formation, Cytoprotective Effect on Cardiomyocytes, and Therapeutic Efficacy for Myocardial Infarction," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 51, no. 9, pp. 933–943, Mar. 2008.
- [124] A. F. Schier, "Nodal Signaling in Vertebrate Development," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 589–621, Nov. 2003.
- [125] S. J. Kattman *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*, vol. 8, no. 2, pp. 228–240, Feb. 2011.
- [126] S. Pauklin and L. Vallier, "Activin/nodal signalling in stem cells," *Development (Cambridge)*, vol. 142, no. 4. Company of Biologists Ltd, pp. 607–619, 15-Feb-2015.
- [127] J. Hao, H. Ju, S. Zhao, A. Junaid, T. Scammell-La Fleur, and I. M. C. Dixon, "Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF- β in the chronic phase of myocardial infarct scar healing," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 31, no. 3, pp. 667–678, 1999.
- [128] J. Xu, P. J. Gruber, and K. R. Chien, "SMAD4 Is Essential for Human Cardiac Mesodermal Precursor Cell Formation," *Stem Cells*, vol. 37, no. 2, pp. 216–225, Feb. 2019.
- [129] D. M. Ornitz and N. Itoh, "The Fibroblast Growth Factor signaling pathway," *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, vol. 4, no. 3, pp. 215–266, May 2015.
- [130] D. Evseenko *et al.*, "Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 31, pp. 13742–13747, Aug. 2010.
- [131] "FGF10 Promotes Regional Foetal Cardiomyocyte Proliferation and Adult Cardiomyocyte Cell-Cycle Re-Entry - PubMed." [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25344367/>. [Accessed: 21-Mar-2020].
- [132] N. A. Thomas, M. Koudijs, F. J. M. van Eeden, A. L. Joyner, and D. Yelon, "Hedgehog signaling plays a cell-autonomous role in maximizing cardiac developmental potential," *Development*, vol. 135, no. 22, pp. 3789–3799, Nov. 2008.
- [133] H. Kolesová, H. Roelink, and M. Grim, "Sonic hedgehog is required for the assembly and remodeling of branchial arch blood vessels," *Dev. Dyn.*, vol. 237, no. 7, pp. 1923–1934, Jul. 2008.
- [134] F. A. High *et al.*, "An essential role for Notch in neural crest during cardiovascular development and smooth muscle differentiation," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 2, pp. 353–363, Feb. 2007.
- [135] I. O. Sirbu, X. Zhao, and G. Duester, "Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by down-regulatingIsl1 through theFgf8 pathway," *Dev. Dyn.*, vol. 237, no. 6, pp. 1627–1635, Jun. 2008.
- [136] M. E. Pierpont *et al.*, "Genetic basis for congenital heart defects: Current knowledge - A scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young," *Circulation*, vol. 115, no. 23, pp. 3015–3038, Jun-2007.
- [137] J. I. E. Hoffman, "Congenital heart disease: incidence and inheritance," *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 37, no. 1, pp. 25–43, 1990.
- [138] D. Van Der Linde *et al.*, "Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: A systematic review and meta-analysis," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 58, no. 21. Elsevier USA, pp. 2241–2247, 15-Nov-2011.
- [139] T. A. Andersen, K. D. L. L. Troelsen, and L. A. Larsen, "Of mice and men: Molecular genetics of congenital heart disease," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 71, no. 8. Birkhauser Verlag AG, pp. 1327–1352, 10-Aug-2014.
- [140] V. Garg, "Insights into the genetic basis of congenital heart disease," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, no. 10. Springer, pp. 1141–1148, 29-May-2006.
- [141] M. Wolf and C. T. Basson, "The molecular genetics of congenital heart disease: A review of recent developments," *Current Opinion in Cardiology*, vol. 25, no. 3. NIH Public Access, pp. 192–197, May-2010.
- [142] Y. Hiroi *et al.*, "Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation," *Nat. Genet.*, vol. 28, no. 3, pp. 276–280, 2001.
- [143] J. A. Terrett *et al.*, "Holt–Oram syndrome is a genetically heterogeneous disease with one locus mapping to human chromosome 12q," *Nat. Genet.*, vol. 6, no. 4, pp. 401–404, 1994.
- [144] D. Bonnet *et al.*, "A gene for Holt–Oram syndrome maps to the distal long arm of chromosome 12," *Nat. Genet.*, vol. 6, no. 4, pp. 405–408, 1994.
- [145] J. J. Schott *et al.*, "Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5," *Science (80-.)*, vol. 281, no. 5373, pp. 108–111, Jul. 1998.
- [146] D. W. Benson *et al.*, "Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways," *J. Clin. Invest.*, vol. 104, no. 11, pp. 1567–1573, 1999.
- [147] V. Garg *et al.*, "GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5," *Nature*, vol. 424, no. 6947, pp. 443–447, Jul. 2003.
- [148] E. Goldmuntz, E. Geiger, and D. W. Benson, "NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot," *Circulation*, vol. 104, no. 21, pp. 2565–2568, Nov. 2001.
- [149] M. Maitra *et al.*, "Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development," *Dev. Biol.*, vol. 326, no. 2, pp. 368–377, Feb. 2009.
- [150] W. T. J. Aanhaenen *et al.*, "The Tbx2+ primary myocardium of the atrioventricular canal forms the atrioventricular node and the base of the left ventricle," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 11, pp. 1267–74, Jun. 2009.
- [151] C. Wiese *et al.*, "Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 3, pp. 388–397, Feb. 2009.
- [152] E. P. Kirk *et al.*, "Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 81, no. 2, pp. 280–291, 2007.
- [153] F. Greenberg, F. F. Elder, P. Haffner, H. Northrup, and D. H. Ledbetter, "Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 43, no. 5, pp. 605–11, Nov. 1988.
- [154] A. K. Ryan *et al.*, "Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: A European collaborative study," *J. Med. Genet.*, vol. 34, no. 10, pp. 798–804, Oct. 1997.
- [155] M. Tanaka, Z. Chen, S. Bartunkova, N. Yamasaki, and S. Izumo, "The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development," *Development*, vol. 126, no. 6, pp. 1269–1280, Mar. 1999.

- [156] C. T. Tu, T. C. Yang, and H. J. Tsai, "Nkx2.7 and Nkx2.5 function redundantly and are required for cardiac morphogenesis of zebrafish embryos," *PLoS One*, vol. 4, no. 1, Jan. 2009.
- [157] W. Wang, D. Rigueur, and K. M. Lyons, "TGF β signaling in cartilage development and maintenance," *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.*, vol. 102, no. 1, pp. 37–51, 2014.
- [158] B. L. Loeys *et al.*, "A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2," *Nat. Genet.*, vol. 37, no. 3, pp. 275–281, 2005.
- [159] M. G. Keane and R. E. Pyeritz, "Medical management of Marfan syndrome," *Circulation*, vol. 117, no. 21, pp. 2802–13, May 2008.
- [160] A. Verstraeten and B. Loeys, "Genetics of marfan syndrome and loeys-dietz syndrome," in *Surgical Management of Aortic Pathology: Current Fundamentals for the Clinical Management of Aortic Disease*, Springer International Publishing, 2019, pp. 561–566.
- [161] L. Cripe, G. Andelfinger, L. J. Martin, K. Shoener, and D. W. Benson, "Bicuspid aortic valve is heritable," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 138–143, Jul. 2004.
- [162] J. C. Garbern and R. T. Lee, "Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration," *Cell Stem Cell*, vol. 12, no. 6, Cell Press, pp. 689–698, 06-Jun-2013.
- [163] J. Kajstura *et al.*, "Cardiomyogenesis in the adult human heart," *Circ. Res.*, vol. 107, no. 2, pp. 305–315, Jul. 2010.
- [164] M. Mollova *et al.*, "Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 4, pp. 1446–1451, Jan. 2013.
- [165] S. E. Senyo *et al.*, "Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes," *Nature*, vol. 493, no. 7432, pp. 433–436, Jan. 2013.
- [166] J. F. Brockes and A. Kumar, "Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine," *Science*, vol. 310, no. 5756, Science, pp. 1919–1923, 23-Dec-2005.
- [167] S. Roy and S. Gatién, "Regeneration in axolotls: a model to aim for!," *Exp. Gerontol.*, vol. 43, no. 11, pp. 968–973, Nov. 2008.
- [168] B. N. Singh, N. Koyano-Nakagawa, J. P. Garry, and C. V. Weaver, "Heart of newt: A recipe for regeneration," *Journal of Cardiovascular Translational Research*, vol. 3, no. 4, J Cardiovasc Transl Res, pp. 397–409, Aug-2010.
- [169] N. Witman, J. Heigwer, B. Thaler, W. O. Lui, and J. I. Morrison, "MiR-128 regulates non-myocyte hyperplasia, deposition of extracellular matrix and Islet1 expression during newt cardiac regeneration," *Dev. Biol.*, vol. 383, no. 2, pp. 253–263, Nov. 2013.
- [170] A. W. Neff, A. E. Dent, and J. B. Armstrong, "Heart development and regeneration in urodeles," *International Journal of Developmental Biology*, vol. 40, no. 4, UPV/EHU Press, pp. 719–725, 01-Aug-1996.
- [171] K. D. Poss, L. G. Wilson, and M. T. Keating, "Heart regeneration in zebrafish," *Science (80-)*, vol. 298, no. 5601, pp. 2188–2190, Dec. 2002.
- [172] A. Raya *et al.*, "Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. SUPPL. 1, pp. 11889–11895, Sep. 2003.
- [173] K. Kikuchi and K. D. Poss, "Cardiac Regenerative Capacity and Mechanisms," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 28, no. 1, pp. 719–741, Nov. 2012.
- [174] F. Chablais and A. Jaźwińska, "The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on TGF β signaling," *Development*, vol. 139, no. 11, pp. 1921–1930, Jun. 2012.
- [175] A. Lepilina *et al.*, "A Dynamic Epicardial Injury Response Supports Progenitor Cell Activity during Zebrafish Heart Regeneration," *Cell*, vol. 127, no. 3, pp. 607–619, Nov. 2006.
- [176] K. Kikuchi *et al.*, "Retinoic Acid Production by Endocardium and Epicardium Is an Injury Response Essential for Zebrafish Heart Regeneration," *Dev. Cell*, vol. 20, no. 3, pp. 397–404, Mar. 2011.
- [177] J. M. González-Rosa and N. Mercader, "Cryo-injury as a myocardial infarction model for the study of cardiac regeneration in the zebrafish," *Nat. Protoc.*, vol. 7, no. 4, pp. 782–788, Apr. 2012.
- [178] J. Itou *et al.*, "Migration of cardiomyocytes is essential for heart regeneration in zebrafish," *Dev.*, vol. 139, no. 22, pp. 4133–4142, Nov. 2012.
- [179] C. Jopling, E. Sleep, M. Raya, M. Martí, A. Raya, and J. C. I. Belmonte, "Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation," *Nature*, vol. 464, no. 7288, pp. 606–609, Mar. 2010.
- [180] V. P. Yin, A. Lepilina, A. Smith, and K. D. Poss, "Regulation of zebrafish heart regeneration by miR-133," *Dev. Biol.*, vol. 365, no. 2, pp. 319–327, May 2012.
- [181] E. R. Porrello *et al.*, "Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart," *Science (80-)*, vol. 331, no. 6020, pp. 1078–1080, Feb. 2011.
- [182] E. G. Strungs, E. L. Ongstad, M. P. O'Quinn, J. A. Palatinus, L. J. Jourdan, and R. G. Gourdie, "Cryo-injury Models of the Adult and Neonatal Mouse Heart for Studies of Scarring and Regeneration," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1037, Humana Press Inc., 2013, pp. 343–353.
- [183] A. I. Mahmoud *et al.*, "Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest," *Nature*, vol. 497, no. 7448, pp. 249–253, 2013.
- [184] K. Hirose *et al.*, "Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition," *Science (80-)*, vol. 364, no. 6436, pp. 184–188, Apr. 2019.
- [185] E. Van Rooij and E. N. Olson, "MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: Opportunities and obstacles," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 11, no. 11, Nature Publishing Group, pp. 860–872, 19-Nov-2012.
- [186] N. Liu and E. N. Olson, "MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development," *Developmental Cell*, vol. 18, no. 4, Elsevier, pp. 510–525, 20-Apr-2010.
- [187] K. Gabisonia *et al.*, "MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs," *Nature*, vol. 569, no. 7756, Nature Publishing Group, pp. 418–422, 16-May-2019.
- [188] C. Wahlgren *et al.*, "Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart," *Nature*, vol. 508, no. 7497, pp. 531–535, Mar. 2014.
- [189] M. Kanada *et al.*, "Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 12, pp. E1433–E1442, Mar. 2015.
- [190] J. P. G. Sluijter, V. Verhage, J. C. Deddens, F. Van Den Akker, and P. A. Doevendans, "Microvesicles and exosomes for intracardiac communication," *Cardiovascular Research*, vol. 102, no. 2, Oxford University Press, pp. 302–311, 01-May-2014.
- [191] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall, "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 654–659, Jun. 2007.
- [192] S. Ylä-Herttuala, C. Bridges, M. G. Katz, and P. Korpisalo, "Angiogenic gene therapy in cardiovascular diseases: dream or vision?," *Eur. Heart J.*, vol. 38, no. 18, p. ehv547, Jan. 2017.
- [193] C. Papayannakos and R. Daniel, "Understanding lentiviral vector chromatin targeting: Working to reduce insertional mutagenic potential for gene therapy," *Gene Therapy*, vol. 20, no. 6, Nature Publishing Group, pp. 581–588, 22-Jun-2013.
- [194] G. Vassalli, H. Büeler, J. Dudler, L. K. Von Segesser, and L. Kappenberger, "Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: A comparative study with adenovirus vectors," *Int. J. Cardiol.*, vol. 90, no. 2–3, pp. 229–238, Aug. 2003.

- [195] S. E. Raper *et al.*, "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 80, no. 1–2, pp. 148–158, Sep. 2003.
- [196] K. Karikó and D. Weissman, "Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: Implication for therapeutic RNA development," *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, vol. 10, no. 5, Curr Opin Drug Discov Devel, pp. 523–532, Sep-2007.
- [197] K. Karikó *et al.*, "Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability," *Mol. Ther.*, vol. 16, no. 11, pp. 1833–1840, Nov. 2008.
- [198] N. Sultana *et al.*, "Optimizing Cardiac Delivery of Modified mRNA," *Mol. Ther.*, vol. 25, no. 6, pp. 1306–1315, Jun. 2017.
- [199] L. Carlsson *et al.*, "Biocompatible, Purified VEGF-A mRNA Improves Cardiac Function after Intracardiac Injection 1 Week Post-myocardial Infarction in Swine," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 9, pp. 330–346, Jun. 2018.
- [200] A. Vandergriff *et al.*, "Targeting regenerative exosomes to myocardial infarction using cardiac homing peptide," *Theranostics*, vol. 8, no. 7, pp. 1869–1878, 2018.
- [201] J. F. Liu, B. W. Wang, H. F. Hung, H. Chang, and K. G. Shyu, "Human mesenchymal stem cells improve myocardial performance in a splenectomized rat model of chronic myocardial infarction," *J. Formos. Med. Assoc.*, vol. 107, no. 2, pp. 165–174, 2008.
- [202] M. Mazo *et al.*, "Transplantation of mesenchymal stem cells exerts a greater long-term effect than bone marrow mononuclear cells in a chronic myocardial infarction model in rat," *Cell Transplant.*, vol. 19, no. 3, pp. 313–328, 2010.
- [203] B. Lindroos, R. Suuronen, and S. Miettinen, "The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 7, no. 2, Stem Cell Rev Rep, pp. 269–291, Jun-2011.
- [204] V. Planat-Bénard *et al.*, "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells," *Circ. Res.*, vol. 94, no. 2, pp. 223–9, Feb. 2004.
- [205] A. Miranville, C. Heeschen, C. Sengenès, C. A. Curat, R. Busse, and A. Bouloumié, "Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells," *Circulation*, vol. 110, no. 3, pp. 349–55, Jul. 2004.
- [206] M. Hao, R. Wang, and W. Wang, "Cell Therapies in Cardiomyopathy: Current Status of Clinical Trials," *Analytical Cellular Pathology*, vol. 2017, Hindawi Limited, 2017.
- [207] K. Malliaras *et al.*, "Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: Evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-derived aUtologous stem CELls to reverse ventricular dysfunction)," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 63, no. 2, pp. 110–122, Jan. 2014.
- [208] M. H. Yacoub and J. Terrovitis, "CADUCEUS, SCPIO, ALCADIA: Cell therapy trials using cardiac-derived cells for patients with post myocardial infarction LV dysfunction, still evolving," *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, vol. 2013, no. 1, p. 3, Mar. 2013.
- [209] V. Volarevic *et al.*, "Ethical and safety issues of stem cell-based therapy," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 15, no. 1, Ivyspring International Publisher, pp. 36–45, 01-Jan-2018.
- [210] M. Talkhabi, N. Aghdami, and H. Baharvand, "Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: A state-of-art," *Life Sciences*, vol. 145, Elsevier Inc., pp. 98–113, 15-Jan-2016.
- [211] J. Zhang *et al.*, "Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 4, pp. e30-41, Feb. 2009.
- [212] J. Ma *et al.*, "High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Electrophysiological properties of action potentials and ionic currents," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 301, no. 5, Nov. 2011.
- [213] P. W. Burridge and E. T. Zambidis, "Highly Efficient Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Cardiomyocytes," 2013, pp. 149–161.
- [214] W. Roell *et al.*, "Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia," *Nature*, vol. 450, no. 7171, pp. 819–824, Dec. 2007.
- [215] S. X. Zheng *et al.*, "Comparison of Cardiac Stem Cells and Mesenchymal Stem Cells Transplantation on the Cardiac Electrophysiology in Rats with Myocardial Infarction," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 9, no. 3, pp. 339–349, Jun. 2013.
- [216] P. A. Lalit *et al.*, "Lineage Reprogramming of Fibroblasts into Proliferative Induced Cardiac Progenitor Cells by Defined Factors," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 3, pp. 354–367, Mar. 2016.
- [217] N. Witman and M. Sahara, "Expansion of cardiac progenitors from reprogrammed fibroblasts as potential novel cardiovascular therapy," *Stem Cell Investig.*, vol. 3, no. AUG, pp. 34–34, Aug. 2016.
- [218] L. Zhang *et al.*, "Role of Osteoprotegerin (OPG) in Bone Marrow Adipogenesis," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 40, no. 3–4, pp. 681–692, 2016.
- [219] S. Fernandes *et al.*, "Comparison of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, cardiovascular progenitors, and bone marrow mononuclear cells for cardiac repair," *Stem Cell Reports*, vol. 5, no. 5, pp. 753–762, Nov. 2015.
- [220] P. Menasché *et al.*, "Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 71, no. 4, pp. 429–438, Jan. 2018.
- [221] L. Qian *et al.*, "In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes," *Nature*, vol. 485, no. 7400, pp. 593–598, Apr. 2012.
- [222] K. Song *et al.*, "Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors," *Nature*, vol. 485, no. 7400, pp. 599–604, 2012.
- [223] K. E. Hatzistergos and A. Vedenko, "Cardiac Cell Therapy 3.0: The Beginning of the End or the End of the Beginning?," *Circ. Res.*, vol. 121, no. 2, pp. 95–97, Jul. 2017.
- [224] L. Ye *et al.*, "Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells," *Cell Stem Cell*, vol. 15, no. 6, pp. 750–761, Dec. 2014.
- [225] Y. Zhang *et al.*, "Expandable Cardiovascular Progenitor Cells Reprogrammed from Fibroblasts," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 3, pp. 368–381, Mar. 2016.
- [226] B. Ebrahimi, "Cardiac progenitor reprogramming for heart regeneration," *Cell Regeneration*, vol. 7, no. 1, KeAi Communications Co., pp. 1–6, 01-Sep-2018.
- [227] N. Christoforou, R. A. Miller, C. M. Hill, C. C. Jie, A. S. McCallion, and J. D. Gearhart, "Mouse ES cell-derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 3, pp. 894–903, Mar. 2008.
- [228] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, Aug. 2006.
- [229] A. M. Wobus *et al.*, "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 29, no. 6, pp. 1525–1539, 1997.
- [230] M. C. Engels *et al.*, "Insulin-like growth factor promotes cardiac lineage induction in vitro by selective expansion of early mesoderm," *Stem Cells*, vol. 32, no. 6, pp. 1493–1502, 2014.
- [231] C. Correia *et al.*, "Combining Hypoxia and Bioreactor Hydrodynamics Boosts Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation Towards

- Cardiomyocytes," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 10, no. 6, pp. 786–801, 2014.
- [232] A. G. Smith *et al.*, "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides," *Nature*, vol. 336, no. 6200, pp. 688–690, 1988.
- [233] R. L. Williams *et al.*, "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells," *Nature*, vol. 336, no. 6200, pp. 684–687, 1988.
- [234] H. Niwa, T. Burdon, I. Chambers, and A. Smith, "Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 13, p. 2048, Jul. 1998.
- [235] Q. L. Ying *et al.*, "The ground state of embryonic stem cell self-renewal," *Nature*, vol. 453, no. 7194, pp. 519–523, May 2008.
- [236] J. Wray *et al.*, "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 7, pp. 838–845, Jul. 2011.
- [237] Y. Miyazari and M. E. Torres-Padilla, "Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog," *Nature*, vol. 483, no. 7390, pp. 470–473, Mar. 2012.
- [238] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, Aug. 2006.
- [239] J. A. Efe *et al.*, "Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 215–222, Mar. 2011.
- [240] L. Yang *et al.*, "Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population," *Nature*, vol. 453, no. 7194, pp. 524–528, May 2008.
- [241] P. W. Burridge *et al.*, "A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability," *PLoS One*, vol. 6, no. 4, 2011.
- [242] M. J. Birket *et al.*, "Expansion and patterning of cardiovascular progenitors derived from human pluripotent stem cells," *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 9, pp. 970–979, Sep. 2015.
- [243] T. J. Nelson, R. S. Faustino, A. Chiriach, R. Crespo-Diaz, A. Behfar, and A. Terzic, "CXCR4 + /FLK-1 + Biomarkers Select a Cardiopoietic Lineage from Embryonic Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 26, no. 6, pp. 1464–1473, Jun. 2008.
- [244] S. X. Liang, T. Y. L. Tan, L. Gaudry, and B. Chong, "Differentiation and migration of Sca1+/CD31- cardiac side population cells in a murine myocardial ischemic model," *Int. J. Cardiol.*, vol. 138, no. 1, pp. 40–49, Jan. 2010.
- [245] R. Gaetani *et al.*, "Cardiospheres and tissue engineering for myocardial regeneration: Potential for clinical application," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 14, no. 5, J Cell Mol Med, pp. 1071–1077, 2010.
- [246] G. Vunjak-Novakovic *et al.*, "Challenges in cardiac tissue engineering," *Tissue engineering. Part B, Reviews*, vol. 16, no. 2, Tissue Eng Part B Rev, pp. 169–187, 2010.
- [247] E. Dawson, G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi, and K. Roy, "Biomaterials for stem cell differentiation," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 2, Adv Drug Deliv Rev, pp. 215–228, 14-Jan-2008.
- [248] K. Mendelson and F. J. Schoen, "Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress, and challenges," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 34, no. 12, pp. 1799–1819, Dec. 2006.
- [249] S. Barreto, L. Hamel, T. Schiatti, Y. Yang, and V. George, "Cardiac Progenitor Cells from Stem Cells: Learning from Genetics and Biomaterials," *Cells*, vol. 8, no. 12, p. 1536, Nov. 2019.
- [250] A. Nsair *et al.*, "Correction: Characterization and Therapeutic Potential of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitor Cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, Oct. 2012.
- [251] Y. Qyang *et al.*, "The Renewal and Differentiation of Isl1+ Cardiovascular Progenitors Are Controlled by a Wnt/ β -Catenin Pathway," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 2, pp. 165–179, Aug. 2007.
- [252] A. Ao, J. Hao, C. R. Hopkins, and C. C. Hong, "DMH1, a novel BMP small molecule inhibitor, increases cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac differentiation in mouse embryonic stem cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, Jul. 2012.
- [253] J. B. Bylund *et al.*, "Coordinated Proliferation and Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Progenitor Cells Depend on Bone Morphogenetic Protein Signaling Regulation by GREMLIN 2," *Stem Cells Dev.*, vol. 26, no. 9, pp. 678–693, May 2017.
- [254] L. A. Dyer, F. A. Makadia, A. Scott, K. Pegram, M. R. Hutson, and M. L. Kirby, "BMP signaling modulates hedgehog-induced secondary heart field proliferation," *Dev. Biol.*, vol. 348, no. 2, pp. 167–176, Dec. 2010.
- [255] N. Gude *et al.*, "Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population," *Circ. Res.*, vol. 99, no. 4, pp. 381–388, Aug. 2006.
- [256] T. S. Li *et al.*, "Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair," *Cardiovasc. Res.*, vol. 89, no. 1, pp. 157–165, Jan. 2011.
- [257] X.-H. Li *et al.*, "Generation of Functional Human Cardiac Progenitor Cells by High-Efficiency Protein Transduction," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 4, no. 12, pp. 1415–1424, Dec. 2015.
- [258] H. Amini, J. Rezaie, A. Vosoughi, R. Rahbarghazi, and M. Nouri, "Cardiac progenitor cells application in cardiovascular disease," *J. Cardiovasc. Thorac. Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 127–132, Aug. 2017.
- [259] R. Wada *et al.*, "Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 31, pp. 12667–12672, Jul. 2013.
- [260] S. L. M. A. Beeres, D. E. Atsma, J. Van Ramshorst, M. J. Schalijs, and J. J. Bax, "Cell therapy for ischaemic heart disease," *Heart*, vol. 94, no. 9, Heart, pp. 1214–1226, Sep-2008.
- [261] F. Rahman Khan and S. Sulaiman Alhewairini, "Zebrafish (Danio rerio) as a Model Organism," in *Current Trends in Cancer Management*, IntechOpen, 2019.
- [262] "Nelson, J.S. (2006) Fishes of the World. 4th Edition, John Wiley & Sons, Hoboken, 601 p. - References - Scientific Research Publishing." [Online]. Available: [https://www.scirp.org/\(S\(vtj3fa45qm1ean45vffcz55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1633759](https://www.scirp.org/(S(vtj3fa45qm1ean45vffcz55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1633759). [Accessed: 19-Feb-2020].
- [263] D. M. Parichy, "Evolution of danio pigment pattern development," *Heredity*, vol. 97, no. 3, Heredity (Edinb), pp. 200–210, Sep-2006.
- [264] "A Taxonomic Revision of the Indo-Burmese Species of Danio Hamilton Buchanan ... - R. P. Barman - Βιβλία Google." [Online]. Available: https://books.google.gr/books/about/A_Taxonomic_Revision_of_the_Indo_Burmese.html?id=TYyFAQAAIAAJ&redir_esc=y. [Accessed: 20-Feb-2020].
- [265] D. Lambert, *Aquarium fish : the illustrated identifier to over 100 freshwater species*. Apple, 1997.
- [266] T. Braunbeck *et al.*, "Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - An update," *ALTEX*, vol. 22, no. 2, pp. 87–102, 2005.
- [267] R. Spence, G. Gerlach, C. Lawrence, and C. Smith, "The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio," *Biol. Rev.*, vol. 83, no. 1, pp. 13–34, Dec. 2007.
- [268] M. M. McClure, P. B. McIntyre, and A. R. McCune, "Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish Danio rerio," *J. Fish Biol.*, vol. 69, no. 2, pp. 553–570, Aug. 2006.

- [269] R. E. Engeszer, L. B. Patterson, A. A. Rao, and D. M. Parichy, "Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field," *Zebrafish*, vol. 4, no. 1. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA, pp. 21–40, 27-Mar-2007.
- [270] G. S. Gerhard *et al.*, "Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*)," *Exp. Gerontol.*, vol. 37, no. 8–9, pp. 1055–1068, Aug. 2002.
- [271] G. Beffagna, "Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans," *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 6, p. 107, Aug. 2019.
- [272] K. L. Poon and T. Brand, "The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects," *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, vol. 2013, no. 1, p. 4, Mar. 2013.
- [273] J. P. Allen and M. N. Neely, "Trolling for the ideal model host: Zebrafish take the bait," *Future Microbiology*, vol. 5, no. 4. NIH Public Access, pp. 563–569, Apr-2010.
- [274] D. Brown, L. Samsa, L. Qian, and J. Liu, "Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish," *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, vol. 3, no. 2, p. 13, Apr. 2016.
- [275] D. Beis and D. Y. R. Stainier, "In vivo cell biology: Following the zebrafish trend," *Trends in Cell Biology*, vol. 16, no. 2. Trends Cell Biol, pp. 105–112, Feb-2006.
- [276] W. B. Barbazuk *et al.*, "The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [1]," *Genome Research*, vol. 10, no. 9. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1351–1358, 2000.
- [277] E. de Bruijn, E. Cuppen, and H. Feitsma, "Highly Efficient ENU Mutagenesis in Zebrafish," *Methods Mol. Biol.*, vol. 546, pp. 3–12, 2009.
- [278] J. von Hofsten and P. E. Olsson, "Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 3. Reprod Biol Endocrinol, 10-Nov-2005.
- [279] D. O. Conover and S. W. Heins, "Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish," *Nature*, vol. 326, no. 6112, pp. 496–498, 1987.
- [280] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling, "Stages of embryonic development of the zebrafish," *Dev. Dyn.*, vol. 203, no. 3, pp. 253–310, 1995.
- [281] "Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model Organism for Dementia | Veterian Key." [Online]. Available: <https://veteriankey.com/zebrafish-danio-rerio-as-a-model-organism-for-dementia/>. [Accessed: 24-Feb-2020].
- [282] D. A. Kane and C. B. Kimmel, "The zebrafish midblastula transition," *Development*, vol. 119, no. 2, pp. 447–456, 1993.
- [283] S. E. Lepage and A. E. Bruce, "Zebrafish epiboly: Mechanics and mechanisms," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 54, no. 8–9, pp. 1213–1228, 2010.
- [284] E. M. Goolish and K. Okutake, "Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface," *J. Fish Biol.*, vol. 55, no. 5, pp. 1054–1063, Nov. 1999.
- [285] E. J. Armstrong and J. Bischoff, "Heart valve development: Endothelial cell signaling and differentiation," *Circulation Research*, vol. 95, no. 5. Circ Res, pp. 459–470, 03-Sep-2004.
- [286] I. Tekeli *et al.*, "Fate predetermination of cardiac myocytes during zebrafish heart regeneration," *Open Biol.*, vol. 7, no. 6, 2017.
- [287] N. Hu, H. Joseph Yost, and E. B. Clark, "Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish," *Anat. Rec.*, vol. 264, no. 1, pp. 1–12, Sep. 2001.
- [288] W. W. Burggren, B. Dubansky, and N. M. Bautista, "Cardiovascular Development in Embryonic and Larval Fishes," in *Fish Physiology*, vol. 36, no. PartB, Elsevier Inc., 2017, pp. 107–184.
- [289] H. Sánchez-Iranzo *et al.*, "Tbx5a lineage tracing shows cardiomyocyte plasticity during zebrafish heart regeneration," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2018.
- [290] R. M. Warga and C. B. Kimmel, "Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish," *Development*, vol. 108, no. 4, pp. 569–580, 1990.
- [291] B. R. Keegan, D. Meyer, and D. Yelon, "Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula," *Development*, vol. 131, no. 13, pp. 3081–3091, Jul. 2004.
- [292] E. de Pater *et al.*, "Distinct phases of cardiomyocyte differentiation regulate growth of the zebrafish heart," *Development*, vol. 136, no. 10, pp. 1633–1641, May 2009.
- [293] I. C. Scott *et al.*, "The G Protein-Coupled Receptor Agtr1b Regulates Early Development of Myocardial Progenitors," *Dev. Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 403–413, Mar. 2007.
- [294] X. X. I. Zeng, T. P. Wilm, D. S. Sepich, and L. Solnica-Krezel, "Apelin and Its Receptor Control Heart Field Formation during Zebrafish Gastrulation," *Dev. Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 391–402, Mar. 2007.
- [295] D. Y. R. Stainier and M. C. Fishman, "Patterning the zebrafish heart tube: Acquisition of anteroposterior polarity," *Dev. Biol.*, vol. 153, no. 1, pp. 91–101, 1992.
- [296] J. Bussmann, J. Bakkers, and S. Schulte-Merker, "Early Endocardial Morphogenesis Requires Scl/Tal1," *PLoS Genet.*, vol. 3, no. 8, p. e140, Aug. 2007.
- [297] J. Bakkers, "Imported from <https://academic.oup.com/circovasres/article/95/2/183/292801>," *Cardiovasc. Res.*, vol. 91, no. 2, pp. 279–288, Jul. 2011.
- [298] D. Hami, A. C. Grimes, H. J. Tsai, and M. L. Kirby, "Zebrafish cardiac development requires a conserved secondary heart field," *Development*, vol. 138, no. 11, pp. 2389–2398, Jun. 2011.
- [299] S. Lazic and I. C. Scott, "Mef2cb regulates late myocardial cell addition from a second heart field-like population of progenitors in zebrafish," *Dev. Biol.*, vol. 354, no. 1, pp. 123–133, 2011.
- [300] E. Perl and J. S. Waxman, "Reiterative mechanisms of retinoic acid signaling during vertebrate heart development," *Journal of Developmental Biology*, vol. 7, no. 2. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 11, 30-May-2019.
- [301] R. M. Santer, "Morphology and innervation of the fish heart," *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, vol. 89. Adv Anat Embryol Cell Biol, pp. 1–102, 1985.
- [302] K. C. Sadler, *Zebrafish at the interface of development and disease research*. .
- [303] D. Y. R. Stainier, R. K. Lee, and M. C. Fishman, "Cardiovascular development in the zebrafish: I. Myocardial fate map and heart tube formation," *Development*, vol. 119, no. 1, pp. 31–40, 1993.
- [304] J. T. Granados-Riveron and J. D. Brook, "The impact of mechanical forces in heart morphogenesis," *Circ. Cardiovasc. Genet.*, vol. 5, no. 1, pp. 132–142, Feb. 2012.
- [305] L. Andrés-Delgado and N. Mercader, "Interplay between cardiac function and heart development," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1863, no. 7, pp. 1707–1716, Jul. 2016.
- [306] D. Beis *et al.*, "Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development," *Development*, vol. 132, no. 18, pp. 4193–4204, Sep. 2005.
- [307] J. Segert, I. Schneider, I. M. Berger, W. Rottbauer, and S. Just, "Mediator complex subunit Med12 regulates cardiac jelly development and AV valve formation in zebrafish," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 138, pp. 20–31, Oct. 2018.
- [308] J. Vermot *et al.*, "Reversing Blood Flows Act through klf2a to Ensure Normal Valvulogenesis in the Developing Heart," *PLoS Biol.*, vol. 7, no.

- 11, p. e1000246, Nov. 2009.
- [309] L. A. Timmerman *et al.*, "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 1, pp. 99–115, Jan. 2004.
- [310] M. D. Combs and K. E. Yutzey, "Heart valve development: Regulatory networks in development and disease," *Circulation Research*, vol. 105, no. 5, pp. 408–421, 28-Aug-2009.
- [311] S. Burgess, G. Reim, W. Chen, N. Hopkins, and M. Brand, "The zebrafish *spiel-ohne-grenzen* (*spg*) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian Oct4 and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis," *Development*, vol. 129, no. 4, pp. 905–916, 2002.
- [312] S. Schulte-Merker, M. Hammerschmidt, D. Beuchle, K. W. Cho, E. M. De Robertis, and C. Nüsslein-Volhard, "Expression of zebrafish gooseoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos," *Development*, vol. 120, no. 4, pp. 843–852, Apr. 1994.
- [313] S. Chen and D. Kimelman, "YSL and germ layer patterning," 2000.
- [314] S. T. Dougan, R. M. Warga, D. A. Kene, A. F. Schier, and W. S. Talbot, "The role of the zebrafish nodal-related genes *squint* and *cyclops* in patterning of mesendoderm," *Development*, vol. 130, no. 9, pp. 1837–1851, May-2003.
- [315] Y. Kikuchi *et al.*, "*casanova* encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 12, pp. 1493–1505, Jun. 2001.
- [316] B. Schmid *et al.*, "Equivalent genetic roles for *bmp7/snailhouse* and *bmp2b/swirl* in dorsoventral pattern formation," *Development*, vol. 127, no. 5, pp. 957–967, 2000.
- [317] J. L. Thomas, G. W. Morgan, K. M. Dolinski, and R. Thummel, "Characterization of the pleiotropic roles of Sonic Hedgehog during retinal regeneration in adult zebrafish," *Exp. Eye Res.*, vol. 166, pp. 106–115, Jan. 2018.
- [318] J. F. Reiter, H. Verkade, and D. Y. R. Stainier, "Bmp2b and Oep Promote Early Myocardial Differentiation through Their Regulation of *gata5*," 2001.
- [319] M. C. Fishman and K. R. Chien, "Fashioning the vertebrate heart: Earliest embryonic decisions," *Development*, vol. 124, no. 11, pp. 2099–2117, Jun. 1997.
- [320] J. Liu and D. Y. R. Stainier, "Zebrafish in the study of early cardiac development," *Circulation Research*, vol. 110, no. 6, NIH Public Access, pp. 870–874, 16-Mar-2012.
- [321] A. Felker *et al.*, "Continuous addition of progenitors forms the cardiac ventricle in zebrafish," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2018.
- [322] Y. Zhou *et al.*, "Latent TGF- β -binding protein 3 identifies a second heart field in zebrafish," *Nature*, vol. 474, no. 7353, pp. 645–648, Jun. 2011.
- [323] T. Piotrowski *et al.*, "The zebrafish *van gogh* mutation disrupts *tbx1*, which is involved in the DiGeorge deletion syndrome in humans," *Development*, vol. 130, no. 20, pp. 5043–5052, 2003.
- [324] R. Albalat, M. Baquero, and C. Minguillón, "Identification and characterisation of the developmental expression pattern of *tbx5b*, a novel *tbx5* gene in zebrafish," *Gene Expr. Patterns*, vol. 10, no. 1, pp. 24–30, Jan. 2010.
- [325] D. M. Garrity, S. Childs, and M. C. Fishman, "The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin *Tbx5* deficiency syndrome," *Development*, vol. 129, no. 19, pp. 4635–4645, Oct. 2002.
- [326] N. Gibb, S. Ladic, A. R. Deshwar, X. Yuan, M. D. Wilson, and I. C. Scott, "Hey2 restricts cardiac progenitor addition to the developing heart," *bioRxiv*, p. 199638, Oct. 2017.
- [327] D. Hami, A. C. Grimes, H. J. Tsai, and M. L. Kirby, "Zebrafish cardiac development requires a conserved secondary heart field," *Development*, vol. 138, no. 11, pp. 2389–2398, Jun. 2011.
- [328] H. Ishitobi *et al.*, "Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse," *Development*, vol. 138, no. 24, pp. 5357–5368, Dec. 2011.
- [329] D. W. Robertson and J. A. Katzenellenbogen, "Synthesis of the E and Z Isomers of the Antiestrogen Tamoxifen and Its Metabolite, Hydroxytamoxifen, in Tritium-Labeled Form," *J. Org. Chem.*, vol. 47, no. 12, pp. 2387–2393, 1982.
- [330] S. Hayashi and A. P. McMahon, "Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse," *Dev. Biol.*, vol. 244, no. 2, pp. 305–318, Apr. 2002.
- [331] I. Kokkinopoulos, H. Ishida, R. Saba, S. Coppen, K. Suzuki, and K. Yashiro, "Cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells using a simple and defined protocol," *Dev. Dyn.*, vol. 245, no. 2, pp. 157–165, Feb. 2016.
- [332] A. Aulehla *et al.*, "A β -catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 186–193, Feb. 2008.
- [333] X. Li *et al.*, "Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 52, pp. 34970–34975, Dec. 1998.
- [334] K. Brennand and D. Melton, "Slow and steady is the key to β -cell replication," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 3, pp. 472–487, Mar. 2009.
- [335] V. Garcia-Martinez and G. C. Schoenwolf, "Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos," *Dev. Biol.*, vol. 159, no. 2, pp. 706–719, Oct. 1993.
- [336] A. P. Van Winkle, I. D. Gates, and M. S. Kallos, "Mass Transfer Limitations in Embryoid Bodies during Human Embryonic Stem Cell Differentiation," *Cells Tissues Organs*, vol. 196, no. 1, pp. 34–47, Jun. 2012.
- [337] J. W. Xiong, "Molecular and developmental biology of the hemangioblast," *Developmental Dynamics*, vol. 237, no. 5, NIH Public Access, pp. 1218–1231, May-2008.
- [338] T. Motoike, D. W. Markham, J. Rossant, and T. N. Sato, "Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: Contribution to muscle lineage," *Genesis*, vol. 35, no. 3, pp. 153–159, Mar. 2003.
- [339] S. J. Kattman, T. L. Huber, and G. M. M. Keller, "Multipotent Flk-1+ Cardiovascular Progenitor Cells Give Rise to the Cardiomyocyte, Endothelial, and Vascular Smooth Muscle Lineages," *Dev. Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 723–732, Nov. 2006.
- [340] L. Xie, A. D. Hoffmann, O. Burnicka-Turek, J. M. Friedland-Little, K. Zhang, and I. P. Moskowitz, "Tbx5-Hedgehog Molecular Networks Are Essential in the Second Heart Field for Atrial Septation," *Dev. Cell*, vol. 23, no. 2, pp. 280–291, Aug. 2012.
- [341] J. D. Steimle and I. P. Moskowitz, "TBX5: A Key Regulator of Heart Development," in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 122, Academic Press Inc., 2017, pp. 195–221.
- [342] J. C. Murray, "Time for T," *Nature Genetics*, vol. 29, no. 2, pp. 107–109, 2001.
- [343] J. Smith, "T-box genes: What they do and how they do it," *Trends in Genetics*, vol. 15, no. 4, pp. 154–158, 01-Apr-1999.
- [344] C. T. Basson *et al.*, "Mutations in human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome," *Nature Genetics*, vol. 15, no. 1, pp. 30–35, Jan-1997.
- [345] D. G. Ahn, M. J. Kourakis, L. A. Rohde, L. M. Slivert, and R. K. Ho, "T-box gene *Tbx5* is essential for formation of the pectoral limb bud," *Nature*, vol. 417, no. 6890, pp. 754–758, Jun. 2002.
- [346] J. W. Dixon, T. Costa, and I. E. Teshima, "Mosaicism for duplication 12q (12q13→q24.2) in a dysmorphic male infant," *J. Med. Genet.*, vol. 30, no. 1, pp. 70–72, Jan. 1993.

- [347] C. J. Hatcher and C. T. Basson, "Getting the T-box dose right," *Nat. Med.*, vol. 7, no. 11, pp. 1185–1186, 2001.
- [348] A. R. Melnyk, L. Weiss, D. L. Van Dyke, and P. Jarvi, "Malformation syndrome of duplication 12q24.1- >qter," *Am. J. Med. Genet.*, vol. 10, no. 4, pp. 357–365, 1981.
- [349] B. G. Bruneau *et al.*, "Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt- Oram syndrome," *Dev. Biol.*, vol. 211, no. 1, pp. 100–108, Jul. 1999.
- [350] Q. Y. Li *et al.*, "Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family," *Nature Genetics*, vol. 15, no. 1. *Nat Genet*, pp. 21–29, Jan-1997.
- [351] C. M. Liberatore, R. D. Searcy-Schrack, and K. E. Yutzey, "Ventricular expression of tbx5 inhibits normal heart chamber development," *Dev. Biol.*, vol. 223, no. 1, pp. 169–180, Jul. 2000.
- [352] M. E. Horb and G. H. Thomsen, "Tbx5 in Xenopus heart development," 1999.