

Université de Montréal

**Rôle fonctionnel des canaux potassiques activés par
le calcium au sein de progéniteurs cardiaques:
implication en médecine régénérative**

par Patrick Vigneault

Département de Pharmacologie et Physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)
en Pharmacologie
option Pharmacologie moléculaire

Avril 2018

© Patrick Vigneault, 2018

Université de Montréal
Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine

Thèse doctorale intitulée

**Rôle fonctionnel des canaux potassiques activés par le calcium au sein de
progéniteurs cardiaques: implication en médecine régénérative**

Présentée par

Patrick Vigneault

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Martin G. Sirois

Président-rapporteur

Stanley Nattel

Directeur de recherche

Nicolas Noiseux

Membre du jury

Mohamed Chahine

Examineur externe

Résumé

L'insuffisance cardiaque (IC) est un processus progressif et inexorable menant au remodelage pathologique du cœur et à la destruction du parenchyme cardiaque. Indépendamment de l'étiologie, on observe une diminution d'environ 30% du nombre de cardiomyocytes ventriculaires au stade terminal de la maladie. Reposant sur les données précliniques convergentes dans les modèles d'IC, le concept novateur de thérapie cellulaire a suscité beaucoup d'espoir en cardiologie. Bien que leur rôle dans l'homéostasie cardiaque soit controversé, les progéniteurs cardiaques endogènes (eCPCs) qui perdurent au sein du myocarde adulte possèderaient les caractéristiques optimales en vue de la régénération myocardique.

Nos données électrophysiologiques montrent que le courant potassique dépendant du Ca^{2+} de conductance intermédiaire ($I_{\text{KCa3.1}}$) est dominant et qu'il contribue à la détermination du potentiel membranaire (V_{mem}). L'hyperpolarisation engendrée par l'activation du canal KCa3.1 (SK4; *KCNN4*) maintient le gradient électrique et favorise l'entrée capacitive de Ca^{2+} (ECC). D'un point de vue fonctionnel, la potentialisation de la signalisation calcique intracellulaire induite par KCa3.1 semble cruciale pour la prolifération des eCPCs c-Kit^+ . Puisque le statut clinique est connu pour avoir des conséquences néfastes sur la fonctionnalité des cellules souches, nous avons comparé la densité du courant $I_{\text{KCa3.1}}$ dans des eCPCs c-Kit^+ provenant de cœurs sains et insuffisants. En accord avec les données électrophysiologiques, nos résultats démontrent que l'insuffisance cardiaque congestive (CHF) diminue significativement l'expression de KCa3.1 ainsi que des protéines régulatrices du cycle cellulaire.

Les cellules souches dérivées d'explants cardiaques (EDCs) représentent un autre produit cellulaire prometteur pour la thérapie cellulaire en cardiologie. Les EDCs se composent de sous-populations complémentaires dont la proportion varie en fonction du statut clinique. Alors que la population CD90⁻ constitue la fraction active en termes d'efficacité thérapeutique, il a été démontré qu'une proportion élevée de cellules CD90⁺ réduit le potentiel régénératif des EDCs. Afin de faire la lumière sur les déterminants ioniques de la thérapie cellulaire cardiaque, les propriétés électrophysiologiques des populations CD90⁺ et CD90⁻ ont été comparées. Considérant l'importance de KCa3.1 pour la fonction des eCPCs c-Kit⁺, la présence de canaux potassiques Ca²⁺-dépendants (KCa) dans les EDCs a été investiguée. Nous avons identifié 2 types de canaux KCa dans les EDCs humaines. Le canal KCa1.1 (BKCa; *KCNMA1*) est exprimé de façon homogène alors que KCa3.1 est présent exclusivement dans les cellules CD90⁻. D'un point de vue fonctionnel, l'activité du canal KCa3.1 détermine le V_{mem} et supporte la prolifération des EDCs. Puisque ce canal est présent uniquement dans la population cardiogénique, l'expression de KCa3.1 pourrait être un facteur déterminant de la capacité régénérative des EDCs. Nous avons investigué cette hypothèse et confirmé que la transplantation de cellules génétiquement modifiées pour exprimer le canal KCa3.1 augmente la régénération cardiaque dans un modèle murin d'IC d'origine ischémique. Pour la première fois, nous avons fait la démonstration que la modulation des propriétés ioniques de cellules souches peut améliorer leur efficacité thérapeutique.

Mots-clés: canaux ioniques, potentiel membranaire, cellules souches, signalisation calcique, insuffisance cardiaque, thérapie cellulaire.

Abstract

Heart failure (HF) is a progressive disease characterized by extensive pathological remodelling of the heart and myocardial damage. Regardless of the etiology, a decrease of about 30% in the number of ventricular cardiomyocytes is observed at the terminal stage of HF. Based on converging preclinical data in HF models, the innovative concept of cell therapy has generated a great deal of enthusiasm in cardiology. Although the role of cardiac stem cells in cardiac homeostasis is highly controversial, the multipotent progenitors that persist within the adult myocardium possess the ideal characteristics for cardiac regeneration, especially because of their cardiogenic commitment. Plasma membrane ion channels are involved in the fundamental processes of virtually all cells that make up the human body, including stem cells. A wide range of functional ion channels was identified in *ex vivo* proliferated endogenous cardiac progenitor cells (eCPCs), but their function remains poorly understood.

We have completed the very first characterization of the ionic profile of freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs. We found that the intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium current ($I_{KCa3.1}$) is the predominant conductance and contributes to the determination of membrane potential (V_{mem}). The hyperpolarization generated by the activation of the KCa3.1 channel (SK4; *KCNN4*) maintains the electrical gradient and promotes store-operated Ca²⁺-entry (SOCE) that activates progenitor cell proliferation. Experimental congestive heart failure (CHF) significantly decreased the expression of KCa3.1 as well as cell cycle regulatory proteins. Taken together, these findings suggest that alterations in KCa3.1 may have pathophysiological and therapeutic significance in regenerative medicine.

In addition to c-Kit⁺ eCPCs, cardiac explants-derived cells (EDCs) represent another promising cell product for myocardial repair. EDCs are obtained as a heterogeneous mixture composed of complementary subpopulations. Interestingly, it was found that a high proportion of CD90⁺ cells reduce the functional benefits of EDCs therapy. Consistent with this observation, it has recently been shown that the CD90⁻ population constitutes the active fraction in terms of therapeutic efficacy. In order to gain insight into the ionic determinants of EDCs function, the electrophysiological properties of the CD90⁺ and CD90⁻ populations were studied.

Considering the importance of KCa3.1 in c-Kit⁺ CPCs, we evaluated the presence of KCa channels in human EDCs. We have identified 2 types of KCa channels in ex vivo expanded EDCs. While KCa1.1 (BKCa; *KCNMA1*) channel was homogeneously expressed in both subpopulations, KCa3.1 was found exclusively in the CD90⁻ cell fraction. Similar to our previous observations in freshly isolated c-Kit⁺ eCPCs, KCa3.1 was responsible for the determination of V_{mem} under resting conditions and during SOCE. Importantly, we demonstrated that transplantation of genetically-modified EDCs to over-express *KCNN4* potentiates cardiac regeneration in a murine model of ischemic cardiomyopathy. This study provides the first evidence in the literature that modulating the activity of a single plasma membrane ion channel can truly improve the therapeutic efficacy of progenitor cells.

Keywords: Calcium-dependent potassium channels, membrane potential, stem cells, heart failure, cell therapy.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures et tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xviii
CHAPITRE 1 – Introduction.....	1
1.1 Insuffisance cardiaque: une épidémie silencieuse.....	2
1.1.1 Étiologie et physiopathologie de l'IC.....	2
1.1.2 Stratégies thérapeutiques actuelles.....	4
1.2 La thérapie cellulaire régénérative en cardiologie.....	6
1.2.1 Caractéristiques et origines des cellules souches.....	7
1.2.2 Candidats pour la thérapie cellulaire cardiaque.....	9
1.2.3 Régénération du parenchyme cardiaque adulte.....	11
1.2.4 Découverte de cellules souches cardiaques chez l'adulte.....	13
1.2.5 Application clinique des cellules souches cardiaques.....	17
1.2.5.1 Produit primaire dérivé d'explants.....	17
1.2.5.2 Cellules dérivées de cardiosphères.....	19
1.2.5.3 Sélection antigénique des cellules.....	21
1.2.6 Mécanismes régénératifs des cellules injectées.....	22
1.2.7 Limitations de la thérapie cellulaire cardiaque.....	25
1.2.8 Optimisation fonctionnelle des cellules souches.....	26
1.2.8.1 Modifications génétiques des cellules.....	27
1.2.8.2 Conditionnement cellulaire hypoxique.....	28
1.2.8.3 Interventions pharmacologiques ex vivo.....	29
1.2.8.4 Application de stimulations électriques.....	30
1.3 Propriétés électriques de la membrane cellulaire.....	31
1.3.1 Rôle du V_{mem} dans les processus physiologiques.....	34

1.3.1.1	Contrôle de la prolifération.....	35
1.3.1.2	Différenciation cellulaire	36
1.3.2	Familles de canaux ioniques sélectifs aux ions K^+	37
1.3.2.1	Canaux dépendants du potentiel	38
1.3.2.2	Canaux à rectification entrante	40
1.3.2.3	Canaux à deux domaines pore	41
1.3.2.4	Canaux activés par le calcium.....	42
1.3.3	Canaux K^+ au sein des progéniteurs cardiaques	48
1.4	Calcium intracellulaire: un messenger versatile	49
1.4.1	Homéostasie du Ca^{2+}_i au sein des cellules non-excitables	50
1.4.2	Machinerie cellulaire de l'entrée capacitive du Ca^{2+}	53
1.4.3	Caractéristiques spatio-temporelles des signaux calciques.....	56
1.4.4	Signalisation calcique au sein des progéniteurs cardiaques.....	58
1.5	Objectifs et hypothèse de la présente étude	61
CHAPITRE 2 – Calcium-Dependent Potassium Channels Control Proliferation of Cardiac Progenitor Cells and Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells		
	Mise en contexte	63
	Mise en contexte	64
	Key Points Summary	66
	Abstract	67
	Introduction.....	69
	Methods.....	72
	Results.....	81
	Discussion	89
	Conclusions.....	96
	References.....	97
	Figures.....	112
CHAPITRE 3 – <i>KCa3.1</i> Ion Channel Function Governs Cell Therapy Efficacy for Cardiac Injury: <i>KCNN4</i> -Transfer Improves Tissue Salvage and Function.....		
	Mise en contexte	128
	Mise en contexte	129

Abstract	131
Introduction	132
Methods	134
Results	140
Discussion	147
Conclusion	151
Refe re nces	152
Figures	160
Supplemental Materials	172
CHAPITRE 4 – Discussion g en erale	189
4.1 R es um er des principales d ec ouvertes	190
4.2 Distribution et fonctions du canal KCa3.1	192
4.2.1 R eg ulation de la prolif er ation cellulaire	193
4.2.2 Implication de KCa3.1 en th er apie cellulaire	194
4.3 Pertinence et originalit e des r es ultats	197
4.4 Perspectives futures des travaux	200
CHAPITRE 5 – Conclusion	203
Bibliographie	205

Liste des figures et tableaux

CHAPITRE 1

Tableau I.	Sommaire du débat entourant la pertinence clinique des eCPCs c-Kit ⁺	16
Tableau II.	Principaux facteurs sécrétés par les cellules souches adultes	24
Tableau III.	Familles de canaux K ⁺	39
Tableau IV.	Pharmacologie des canaux KCa	43
Figure 1.	Épidémie d'insuffisance cardiaque conséquemment aux progrès dans les soins coronariens aigus	3
Figure 2.	Conceptualisation de la thérapie cellulaire cardiaque.	7
Figure 3.	Évolution des thérapies régénératives en cardiologie	11
Figure 4.	Isolement de cellules souches à partir de biopsies cardiaques.	18
Figure 5.	Optimisation fonctionnelle des cellules souches ou progénitrices pour la thérapie cellulaire cardiaque	31
Figure 6.	Propriétés électriques de la membrane plasmique	33
Figure 7.	Fluctuation du V _{mem} au cours du cycle cellulaire	36
Figure 8.	Familles de canaux potassiques	47
Figure 9.	Principaux acteurs de l'homéostasie calcique des cellules non-excitables	52
Figure 10.	Mécanisme de l'entrée capacitive du Ca ²⁺	54

CHAPITRE 2

Table 1.	Hemodynamic data confirming the presence of CHF	112
Figure 1.	Enrichment of c-Kit ⁺ cells following immunomagnetic selection	113
Figure 2.	Functional ion currents endogenously expressed in freshly-isolated c-Kit ⁺ eCPCs	114

Figure 3.	Properties of endogenous Ca^{2+} -activated K^{+} current in freshly-isolated c-Kit ⁺ eCPCs and responses to various blockers.....	115
Figure 4.	Expression of ion-channel subunits in freshly-isolated c-Kit ⁺ eCPCs..	116
Figure 5.	Impact of heart disease on KCa3.1 expression and proliferation markers in freshly-isolated c-Kit ⁺ eCPCs.....	117
Figure 6.	KCa3.1-currents and membrane potential changes during SOCE in c-Kit ⁺ eCPCs	118
Figure 7.	Intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ changes during SOCE in c-Kit ⁺ eCPCs.....	120
Figure 8.	Effect of <i>KCNN4</i> -gene knockdown on KCa3.1 current, membrane-potential and intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in c-Kit ⁺ eCPCs.	121
Figure 9.	KCa3.1 current and membrane-potential changes during SOCE in dog BM- MSCs	122
Figure 10.	Intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ changes during SOCE in dog BM-MSCs.....	124
Figure 11.	Effect of cell-culture on $I_{\text{KCa3.1}}$ in c-Kit ⁺ eCPCs.....	125
Figure 12.	Effect of KCa3.1 inhibition on proliferation of progenitor cells	126
Figure 13.	Effect of KCa3.1 inhibition on cyclin-expression in progenitor cells..	127

CHAPITRE 3

Figure 1.	Endogenous ion currents expressed in human EDCs	160
Figure 2.	Functional endogenous KCa3.1 current and membrane-potential changes during SOCE in EDCs	162
Figure 3.	Effect of <i>KCNN4</i> -gene transfer on $I_{\text{KCa3.1}}$ and membrane potential of EDCs...164	
Figure 4.	Effect of <i>KCNN4</i> overexpression on EDC phenotype after 24-hour exposure to ischemia-mimicking media culture conditions	166
Figure 5.	Effects of <i>KCNN4</i> overexpression on myocardial function	167
Figure 6.	Effects of <i>KCNN4</i> overexpression on infarct properties, neo-angiogenesis, cardiomyogenesis and long-term engraftment.....	168
Figure 7.	Effects of <i>KCNN4</i> overexpression on the paracrine profile of EDCs	170

Supplemental Materials

Table S1.	Clinical characteristics of atrial appendage donors used to obtain EDCs	172
Table S2.	Echocardiographic measures of left ventricular function	173
Table S3.	Invasive hemodynamic measures of left ventricular function	174
Table S4.	Effect of <i>KCNN4</i> overexpression on electrophysiological parameters	176
Table S5.	Top 10 miRNAs within explant-derived cell extracellular vesicles involved with cardiomyocyte proliferation, salvage, and modulating cardiac fibrosis	177
Table S6.	Effect of <i>KCNN4</i> overexpression on the miRNA profile within extracellular vesicles compared to non-transduced explant-derived cells	178
Table S7.	Effect of <i>KCNN4</i> overexpression on the miRNA profile within extracellular vesicles compared to empty vector explant-derived cells	179
Figure S1.	Functional BKCa current in EDCs	180
Figure S2.	Effect of <i>KCNN4</i> engineering on EDC proliferation	181
Figure S3.	Effect of <i>KCNN4</i> engineering on EDC expression of cell-type selective markers	182
Figure S4.	Hemodynamic effects of transplanting <i>KCNN4</i> engineered EDCs	184
Figure S5.	Representative images demonstrating BrdU ⁺ /DAPI ⁺ cells within the peri-infarct region 4 weeks after LCA ligation	185
Figure S6.	Electrophysiological effects of EDCs or vehicle treatment on mice	186
Figure S7.	KEGG pathway analysis for molecular pathways predicted to be affected by miRNAs altered by <i>KCNN4</i> overexpression	187

Liste des abréviations

$[Ca^{2+}]_i$	Concentration de calcium intracellulaire
$[K^+]_o$	Concentration de potassium extracellulaire
4-AP	4-aminopyridine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférant
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BKCa	Canal potassique activé par le calcium de grande conductance
BMMNC	Cellule mononuclée de la moelle osseuse
BM-MSC	Cellule souche mésenchymateuse dérivée de la moelle osseuse
Ca^{2+}_i	Calcium intracellulaire
CaM	Calmoduline
CaMBD	Domaine de liaison à la calmoduline
CaMKII	Protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante de type II
CBP	Protéine de liaison aux ions calcique
CCR2	Récepteur de type 2 aux chimiokines CC
CD105	<i>Cluster of differentiation 105</i>

CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CD45	<i>Cluster of differentiation 45</i>
CD90	<i>Cluster of differentiation 90</i>
CDC	Cellule dérivée de cardiosphère
CHF	<i>Congestive heart failure</i>
CK2	Kinase caséine 2
c-Kit	Proto-oncogène K it
CMV	Corps multivésiculaire
cpMSC	Cellule souche mésenchymateuse cardiopoïétique
CRAC	<i>Calcium-release activated calcium channel</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CSp	Cardiosphère
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif
cTNT	Troponine-T cardiaque
Cx43	Connexine 43
CXCR4	Récepteur de type 4 aux chimiokines CXC
DAG	Diacylglycérol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR2	<i>Discoidin domain receptor 2</i>
DMSO	Dimethylsulphoxide
eCPC	Cellule progénitrice cardiaque endogène
eCSC	Cellule souche cardiaque endogène

EDC	Cellule dérivée d'explants cardiaque
E_{ion}	Potentiel d'équilibre thermodynamique
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EPC	Cellule progénitrice endothéliale
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire
ERP	Période réfractaire effective
ESC	Cellule souche embryonnaire
Fak	Kinase d'adhésion focale
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HGF	Facteur de croissance hépatocytaire
HIF	Facteurs induits par l'hypoxie
HSC	Cellule souche hématopoïétique
IC	Insuffisance cardiaque
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IGF-1	Facteur de croissance insulino-mimétique de type 1
IGFBP3	Protéine de liaison aux facteurs de croissance insulino-mimétique
IKCa	Canal potassique activé par le calcium de conductance intermédiaire
IM	Infarctus du myocarde
I.P.	Intrapéritonéal
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP3R	Récepteur à l'IP3
iPSC	Cellule souche pluripotente induite
IRM	Imagerie par résonance magnétique

Islet-1	<i>Insulin gene enhancer protein 1</i>
I.V.	Intraveineux
IVC	<i>Inferior vena cava</i>
K2P	Canal potassique à deux domaines pore
KCa	Canal potassique activé par le calcium
KDR	Récepteur à domaine kinase
Kir	Canal potassique à rectification entrante
Kv	Canal potassique dépendant du voltage
LCA	<i>Left coronary artery</i>
LVEF	<i>Left ventricular ejection fraction</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
MMI	Membrane mitochondriale interne
MnSOD	Superoxyde dismutase dépendante du manganèse
MSC	Cellule souche mésenchymateuse
MTMR6	<i>Myotubularin-related protein 6</i>
NCX	Échangeur sodium
NF- κ B	Facteur nucléaire κ B
NFAT	Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
PDGF	Facteur de croissance derive des plaquettes
Peg3/PW1	<i>Paternally-expressed gene 3</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate

Pim-1	<i>Proviral integrations of moloney virus in murine lymphomas</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Calcium ATPase de la membrane plasmique
PP2A	Protéine phosphatase 2A
RCK	Domaine régulateur de la conductance potassique
RCPG	Récepteur couple aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
ROC	Canaux calciques récepteurs dépendants
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RyR	Récepteur à la ryanodine
SAM	<i>Sterile α-motif</i>
S.C.	Sous-cutané
Sca-1	<i>Stem cell antigen 1</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SERCA	Sarco/endoplasmique reticulum calcium-ATPase
SKCa	Canal potassique activé par le calcium de faible conductance
SMA	Actine du muscle lisse
SMOC	<i>Second messenger-operated channel</i>
SOC	<i>Store-operated channel</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium-entry</i>

SP1	<i>Specificity protein 1</i>
SSEA1	<i>Stage-specific embryonic antigen 1</i>
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i>
TALK	<i>TWIK-related alkaline pH-activated K⁺ channel</i>
TASK	<i>TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel</i>
TEA	Tétraéthylammonium
TGFβ	Facteurs de croissance transformant bêta
THIK	<i>Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel</i>
TNFα	Facteur tumoral nécrosant alpha
TREK	<i>TWIK-related K⁺ channel</i>
TRESK	<i>TWIK-related spinal cord K⁺ channel</i>
TRP	<i>Transient receptor potential channel</i>
TWIK	<i>Tandem of P domains in a weak inwardly-rectifying K⁺ channel</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
V _{mem}	Potentiel électrique membranaire
VOC	Canal calcique opéré par le voltage
VT	<i>Ventricular tachycardia</i>
vWF	Facteur de von Willebrand
W8B2	<i>Mesenchymal stromal cell antigen-1</i>

"Perplexity is the beginning of knowledge." –

Khalil Gibran

Remerciements

C'est avec émotion et sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes ayant soutenu et apprécié mon travail. En premier lieu, je remercie chaleureusement mon directeur le Dr. Stanley Nattel, pour son intérêt, sa confiance incommensurable et ses nombreux conseils durant mon cheminement. J'ai énormément appris à ses côtés et je lui adresse toute ma reconnaissance.

Je remercie tous mes collègues qui m'ont amené à me surpasser et qui ont participé de près ou de loin aux travaux présentés dans cette thèse, soient Dr. Patrice Naud, Dr. Ange Maguy, Dr. Ling Xiao, Dr. Xiaoyan Qi, Dr. Jiening Xiao, Dr. Artavazd Tadevosyan, Dr. Jin Li, Dr. Mona Aflaki, Dr. Kristin Dawson, Dr. Sirirat Surinkaew, Dr. Yolanda Chen, Eric Duong, Dr. Balazs Ordog, Dr. Xiaobin Luo, Dr. Masahide Harada, Dr. Yuki Iwasaki, Dr. Chia-Tung Wu, Dr. Hai Huang, Dr. Takeshi Kato, Dr. Feng Xiong, Dr. Ali Kazemi, Dr. Eduard Guasch et Dr. Yiguo Sun, Dr. Nazlee Sharmin, Dr. Vincent Algalarrondo, Dr. Jonathan Melka, Dr. Yoshihiro Sobue, Dr. Roddy Hiram, Dr. Jean-Baptiste Guichard, Doa'a Al-u'datt et Dr. Tao Liu. Vous avez tous contribué à mon développement, tant personnel que professionnel, et ce travail n'aurait certainement pu être mené à bien sans votre support quotidien. Je souhaite remercier Chantal-St-Cyr, Nathalie L'Heureux et Jennifer Bacchi. Vous faites un travail exceptionnel et avez contribué à rendre mon passage au laboratoire des plus mémorable.

J'aimerais aussi remercier mes collaborateurs de l'Institut de cardiologie de l'Université d'Ottawa, notamment le laboratoire du Dr. Darryl R. Davis, et particulièrement Sandrine Parent. Son expertise et son dévouement sans pareil ont été cruciaux à l'accomplissement de cette thèse. Je lui souhaite le plus grand des succès.

Ce travail aurait été difficilement réalisable sans le soutien financier de la Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal et du Fonds de la recherche en santé du Québec, qui m'ont permis de me consacrer pleinement à mes études doctorales.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai sans doute quelque peu délaissés ces dernières années. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de mon cursus. Je remercie affectueusement mes petites sœurs pour leur joie de vivre contagieuse et leur soutien dans mes efforts. Je vous souhaite tout le bonheur et le succès que vous méritez. Je suis redevable à mes parents, Christine et Luc, de leur amour inconditionnel et leur confiance indéfectible dans mes choix. Vous m'avez donné toutes les chances pour réussir et j'espère aujourd'hui répondre aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Finalement, je remercie ma femme, Alexandra, pour son aide, son écoute et surtout son amour qui m'a été essentiel durant ces années. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte, ni la profonde gratitude que je te témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que tu n'as jamais cessé de consentir pour mon bonheur.

CHAPITRE 1 – Introduction

1.1 Insuffisance cardiaque: une épidémie silencieuse

L'insuffisance cardiaque (IC) est un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés notamment par sa fréquence et ses conséquences en terme de morbidité et de mortalité [1]. En dépit des nombreux progrès réalisés en matière de prévention et de prise en charge thérapeutique des maladies cardiovasculaires au cours de 30 dernières années, les statistiques indiquent que la prévalence et l'incidence de l'IC sont toujours en croissance à l'échelle mondiale [1]. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques permettant de réduire la mortalité associée à l'infarctus du myocarde (IM) ainsi que le vieillissement de la population font grimper les taux d'hospitalisations pour insuffisance cardiaque et le nombre de personnes à risque de développer la maladie (Figure 1, page 3) [2].

Malgré une progression favorable des pronostiques associés à cette condition, la mortalité demeure excessivement élevée et affecte plus de 60% chez les patients au stade terminal de la maladie [3]. On estime qu'environ 600 000 Canadiens et Canadiennes vivent actuellement avec une ICC et que 50 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, avec une prédominance chez les personnes âgées de plus de 65 ans (10/1000) [4]. Cette maladie est à l'origine de 22 000 décès par année au Canada, soit 9% du nombre total de décès par année au pays [4]. L'IC représente un lourd fardeau socio-économique, engendrant des coûts directs de plus de 2,8 milliards de dollars par année au système de santé Canadien [5].

1.1.1 Étiologie et physiopathologie de l'IC

L'IC se définit par un dysfonctionnement du muscle cardiaque entraînant une incapacité du cœur à remplir sa fonction de pompe et donc d'assurer le débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques et fonctionnels de l'organisme [6]. La maladie coronarienne, également

connue sous le nom de cardiopathie ischémique, est la maladie cardiaque la plus courante et représente plus de la moitié des cas d'IC dans la population générale de moins de 75 ans [7].

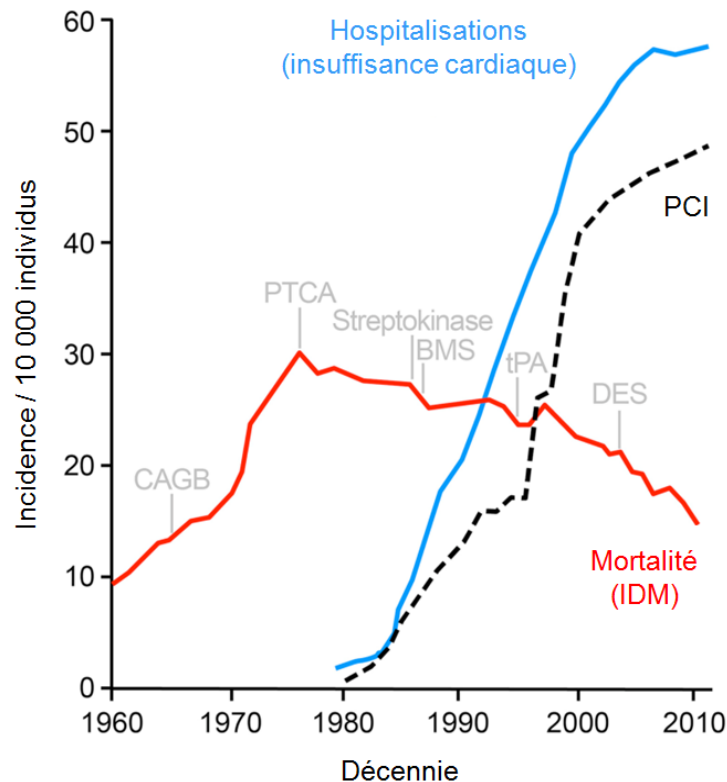


Figure 1. Épidémie d'insuffisance cardiaque conséquemment aux progrès dans les soins coronariens aigus.

Impact de la revascularisation aiguë sur la mortalité associée à l'infarctus du myocarde (tracé rouge) et l'augmentation concomitante des hospitalisations pour insuffisance cardiaque (tracé bleu). Les marqueurs verticaux informent sur l'instauration d'approches thérapeutiques pour la prise en charge de l'infarctus du myocarde (IDM). CABG; pontage coronarien, PTCA; angioplastie coronaire transluminale percutanée, tPA; activateurs du plasminogène tissulaire, BMS; endoprothèse artérielle, DES; endoprothèse artérielle à élution médicamenteuse. Tracé pointillé: intervention coronarienne percutanée (PCI). Adaptée de: Terzic *et al.*, 2016 [2].

Les conséquences cellulaires de l'ischémie débutent seulement quelques secondes suivant l'hypoxie. L'anoxie entraîne la mort et donc la perte irréversible des cardiomyocytes

responsables de la contractilité du myocarde. La zone cardiaque nécrosée est subséquentement remplacée par un tissu cicatriciel fibreux et akinétique. Cette perte de fonction se répercute sur la structure et la géométrie globale du myocarde qui subit un remodelage en réponse aux activités anormales des systèmes neurohormonaux et inflammatoires.

Initialement, le remodelage est compensatoire et bénéfique mais devient progressivement délétère menant à la dilatation du muscle cardiaque et à une désorganisation des interactions entre les cardiomyocytes survivants [8]. La conséquence ultime du remodelage ventriculaire est la perte de compliance et la diminution de la contractilité des fibres musculaires suivie d'une phase de réduction absolue du nombre des cellules [9]. Dans les cœurs explantés de patients au stade terminal de l'IC, il a été démontré une diminution de 30 % du nombre de cardiomyocytes ventriculaires [10,11]. La perte myocytaire entraîne un déséquilibre entre l'épaisseur de la paroi ventriculaire et le volume de la chambre, ce qui contribue à une augmentation soutenue du stress pariétal, aggrave la dilatation du ventricule gauche et peut entraîner une perte additionnelle de myocytes [12].

1.1.2 Stratégies thérapeutiques actuelles

Le traitement de l'insuffisance cardiaque a pour but de réduire les symptômes et améliorer le pronostic. La taille de l'infarctus et la formation de la cicatrice sont les principaux facteurs qui affectent la gravité du remodelage ventriculaire et la progression de l'insuffisance cardiaque vers le stade terminal. Les thérapies de reperfusion et autres mesures pharmacologiques visant à réduire l'ampleur de la nécrose myocardique peuvent limiter la dilatation des ventricules, retarder le remodelage pathologique et conséquemment réduire la mortalité.

Actuellement, le traitement de la majorité des patients souffrant d'IC est essentiellement pharmacologique [13,14]. Les développements de la pharmacologie ont prodigieusement amélioré le pronostic des patients souffrant d'IC (Figure 1). Quatre classes thérapeutiques ont démontré leur efficacité dans la prise en charge de l'IC soient les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (enalapril), les inhibiteurs du récepteur à l'aldostérone (losartan), les antagonistes du récepteur à l'aldostérone (spironolactone) et les bêta-bloquants (carvedilol, metoprolol, bisoprolol) [15]. La combinaison de ces différents traitements pharmacologiques vise à lutter contre l'activation neurohormonale chronique et ainsi limiter le remodelage pathologique responsable de l'évolution de la maladie. En plus du traitement de fond de l'IC, des diurétiques sont prescrits afin de limiter l'apparition d'œdèmes. Les thérapies bloquant l'activation des systèmes neurohormonaux sont les seules à inhiber le remodelage et améliorer la survie des patients souffrant d'IC [13].

Toutefois, aucun traitement actuel ne prend en charge le problème à la base de l'IC soit la destruction du parenchyme cardiaque. La transplantation cardiaque reste donc le traitement le plus efficace des formes les plus avancées d'IC. Toutefois, cette approche reste limitée par le faible nombre de greffons disponibles, par les nombreux risques de complications et par le statut clinique du patient [16,17]. Le développement de pompes implantables ainsi que de cœurs partiellement ou totalement artificiels pourrait alors s'avérer pertinent, mais plusieurs limitations techniques compliquent leur utilisation à long terme en clinique (durée limitée de la batterie, complications infectieuses et/ou hématologiques, etc.) [18,19]. Pour toutes ces raisons, il est impératif de développer de nouveaux outils de traitement afin de compenser la perte cellulaire responsable de l'IC.

1.2 La thérapie cellulaire régénérative en cardiologie

Plusieurs approches alternatives thérapeutiques innovantes sont présentement sous investigation dans le but d'accroître l'espérance et la qualité de vie des patients ayant épuisé les ressources médicales actuellement disponibles. Reposant sur les succès cliniques en hématologie et les données précliniques convergentes dans les modèles d'IC d'origine ischémique, le concept novateur de thérapie cellulaire a suscité beaucoup d'espoir en cardiologie depuis le début du XXI^e siècle [20].

Ainsi, un protocole de thérapie cellulaire optimal permettrait de remplacer le tissu cicatriciel par du tissu contractile, de manière à ralentir voire renverser la progression du remodelage pathologique du cœur (Figure 2, page 7). Plusieurs laboratoires indépendants ont donc développé des approches permettant d'isoler, de cultiver et d'amplifier in vitro des cellules souches provenant de différentes origines avant de les transplanter dans la zone ischémique dans l'espoir de reformer du tissu fonctionnel et restaurer la fonction cardiaque [20].

Considérant le nombre élevé de patients qui pourraient éventuellement bénéficier de cette technologie, la thérapie cellulaire représente un énorme potentiel financier pour plusieurs secteurs d'activité dont la production ainsi que la commercialisation des cellules et de leurs produits dérivés (exosomes, ARNm, etc.). Le marché mondial des cellules souches adultes est mené par les États-Unis, avec une part estimée à \$21,6 milliards en 2013 et un montant de \$57,34 milliards prévu pour l'année 2018 [21]. Le développement des cellules souches adultes en tant que produit thérapeutique pour traiter l'IC a conduit à la mise sur pied de plusieurs entreprises dont les activités de recherche sont financé par les secteurs privés et publics [21].

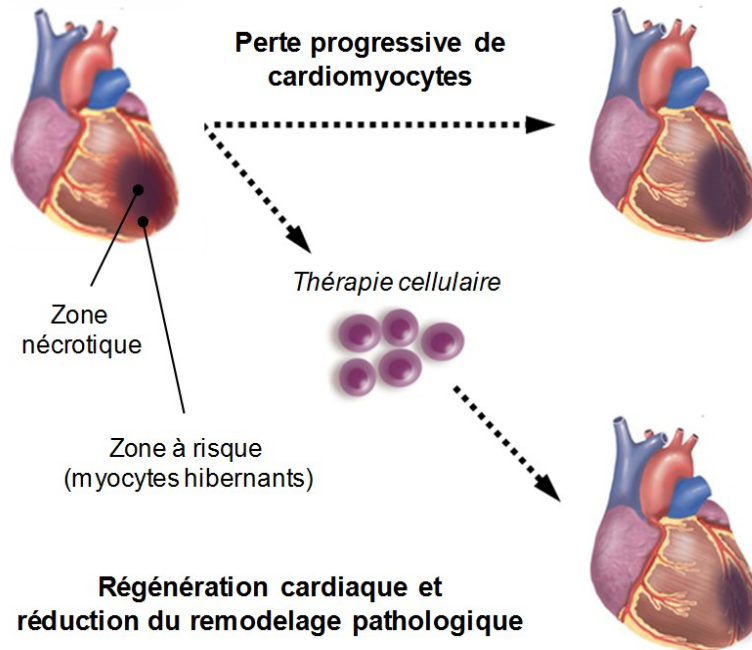


Figure 2. Conceptualisation de la thérapie cellulaire cardiaque.

Suite à un dommage myocardique, des cellules souches de différentes sources sont administrées à proximité de la zone lésée (injection intra-myocardique ou intra-coronaire). La thérapie cellulaire pourrait permettre de limiter ou même renverser le remodelage pathologique et activer les mécanismes de régénération endogènes. Adaptée de: Kim *et al.*, 2009 [22] et Kulandavelu *et al.*, 2016 [23].

1.2.1 Caractéristiques et origines des cellules souches

Les cellules souches sont distinctes des autres cellules qui composent l'organisme. Ce sont des cellules non différenciées et normales d'un point de vue karyotypique caractérisées par deux propriétés fonctionnelles spécifiques, soient l'auto-renouvellement et la plasticité cellulaire [24]. L'auto-renouvellement reflète la capacité des cellules souches à se diviser pendant de très longues périodes tout en conservant leur phénotype alors que la plasticité fait référence à leur pouvoir de différenciation en cellules matures, spécialisées et fonctionnelles constituant le tissu hôte [25]. La division des cellules souches se fait de façon symétrique ou

asymétrique [24]. Lors du processus de division cellulaire symétrique, deux cellules souches identiques sont produites assurant ainsi l'auto-renouvellement. La division cellulaire asymétrique aboutit quant à elle à la génération de deux cellules aux caractéristiques différentes, soit une cellule souche et une cellule progénitrice. Contrairement aux cellules souches, les cellules progénitrices sont engagées vers un type cellulaire spécifique et possèdent une capacité de division limitée. Les propriétés fondamentales énumérées précédemment permettent aux cellules souches de maintenir une réserve stable et permanente de cellules rapidement mobilisables en cas d'atteinte tissulaire et possédant la capacité d'acquérir les caractéristiques de différentes lignées cellulaires suivant l'environnement dans lequel elles se trouvent [26]. Considérant leur capacité régénérative, les cellules souches offrent de nouvelles opportunités thérapeutiques afin de traiter les maladies chroniques [27]. Les cellules souches peuvent provenir de l'embryon (cellules souches embryonnaires), du fœtus (cellules souches fœtales) ou de l'organisme adulte (cellules souches adultes ou tissulaires). Dépendamment de leur origine, le potentiel de différenciation des cellules souches est variable. De plus, chaque type de cellules souches possède ses propres avantages, limitations et aspects pratiques pour la translation de la thérapie cellulaire en clinique.

Les cellules souches embryonnaires (ESCs, *embryonic stem cells*) sont des cellules pluripotentes issues de la masse cellulaire interne d'un embryon préimplantatoire au stade de blastocyste [28]. Un embryon humain atteint le stade de blastocyste 4 à 5 jours après la fécondation et consiste en un amas d'environ 50 à 150 cellules. Les cellules souches embryonnaires peuvent proliférer indéfiniment tout en conservant leur pluripotence et sont capables de donner naissance aux trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) qui sont à l'origine de tous les tissus humains adultes [28,29]. Leur capacité à

générer l'ensemble des cellules du corps en fait un outil clé notamment pour la thérapie régénérative et l'ingénierie tissulaire.

Les cellules souches adultes sont des cellules multipotentes présentes au sein des tissus adultes différenciées et matures. De telles cellules ont été isolées à partir de la cornée [30], de la rétine [31], du foie [32], du pancréas [33], de la pulpe dentaire [34], du rein [35], du tissu adipeux [36,37], du cordon ombilical [38–40] et du cœur [41–43]. La restauration fonctionnelle de chaque type cellulaire permettant de préserver l'intégrité physiologique d'un tissu adulte est assurée par les cellules souches tissulaires et leurs descendantes, les cellules progénitrices.

1.2.2 Candidats pour la thérapie cellulaire cardiaque

Malgré leur importante plasticité cellulaire, l'utilisation des ESCs ou pluripotentes induites (iPSCs, *induced-pluripotent stem cells*) est délicate d'un point de vue éthique mais aussi en raison de leur pouvoir tumorigène et immunogène [44–46]. C'est principalement pour cette raison que les études précliniques et cliniques utilisant la greffe de cellules souches adultes sont de plus en plus fréquentes. Même si leur capacité de différenciation est plus restreinte en comparaison aux cellules pluripotentes [47], les cellules souches adultes présentent de nombreux avantages. L'attrait pour ces cellules provient essentiellement de leur accessibilité et de leur capacité à régénérer de nombreux tissus. De plus, elles peuvent provenir du patient lui-même évitant ainsi les rejets d'ordre immunologique (greffe autologue) et leur utilisation génère beaucoup moins de problèmes éthiques que les ESCs et iPSCs.

Théoriquement, plusieurs types de cellules souches provenant de différentes origines peuvent être utilisés pour la régénération cardiaque [48–52]. Toutefois, la pertinence clinique de certaines populations cellulaires est limitée par le manque de caractérisation

phénotypique, des difficultés d'isolation, d'expansion et une faible intégration au sein du tissu cardiaque lésé [53]. Le potentiel régénératif d'un large éventail de types cellulaires est en cours d'évaluation (Figure 3, page 11). Les myoblastes squelettiques (SMs, *skeletal myoblasts*), les cellules mononucléées dérivées de la moelle osseuse (BMMNCs, *bone marrow-derived mononucleated cells*), les cellules souches hématopoïétiques (HSCs, *hematopoietic stem cells*), les progéniteurs endothéliaux (EPCs, *endothelial progenitor cells*) et les cellules souches mésenchymateuses (MSCs, *mesenchymal stem cells*) ont été les premiers types cellulaires investigués pour la thérapie cellulaire en cardiologie [54]. Malgré des études précliniques prometteuses, les approches de première génération ont produits des bénéfices cliniques modestes et hétérogènes dans les premiers essais cliniques [55,56]. Les variations entre les essais peuvent entre autres être attribuées aux différences dans la conception des différentes études (e.g. préparation des cellules, voie d'administration, dose, méthodes de suivi, etc.) [20]. Des méta-analyses ont examiné l'efficacité de la thérapie cellulaire (principalement de première génération) et en sont venues à des conclusions divergentes [57–59]. Même si les essais cliniques de première génération ont généré des résultats incohérents, les progrès réalisés sur le terrain ont permis de suggérer l'utilisation de cellules présentant un phénotype plus près de l'organe cible.

Les thérapies de seconde génération ont démontré des résultats encourageants et comprennent les MSCs cardiopoïétiques (cpMSCs), les cellules souches cardiaques (eCSCs, *endogenous cardiac stem cells*) et progéniteurs endogènes (eCPCs, *endogenous cardiac progenitor cells*), les cellules dérivées de cardiosphères (CDCs, *cardiosphere-derived cells*) ainsi que les iPSCs [54]. Puisque les types cellulaires de seconde génération présentent aussi certaines lacunes, les futures générations de thérapies cellulaires en cardiologie reposeront

probablement sur l'optimisation fonctionnelle des cellules (e.g. feuillets tissulaire, biomatériaux, conditionnement ex vivo).

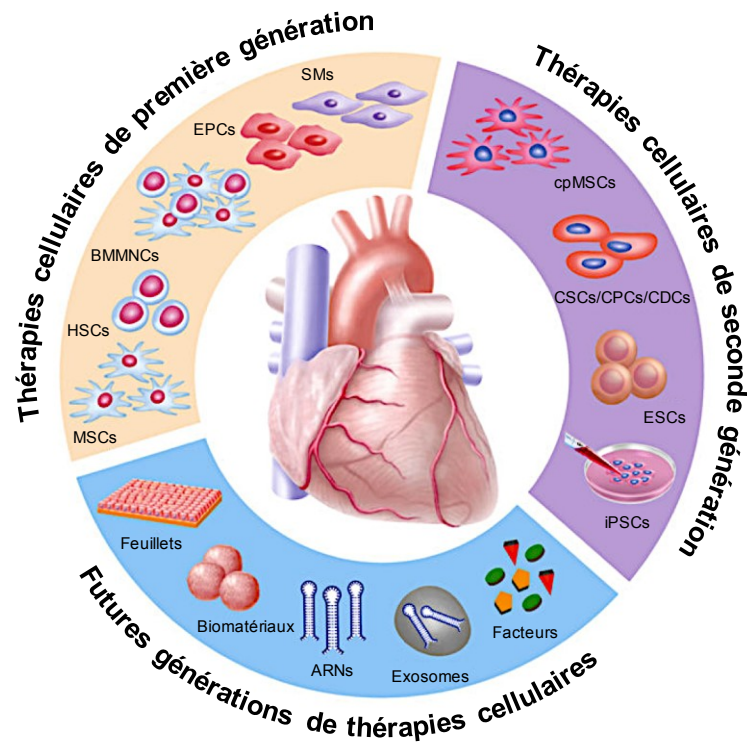


Figure 3. Évolution des thérapies régénératives en cardiologie.

Les types cellulaires de première génération ont démontré leur faisabilité et leur innocuité avec, cependant, des résultats hétérogènes et une efficacité clinique limitée. Les thérapies cellulaires de deuxième génération proposent l'utilisation de cellules présentant un phénotype plus près de l'organe cible. Les futures générations de thérapie cellulaire misent sur l'optimisation fonctionnelle des cellules ex vivo. Adaptée de: Cambria *et al.*, 2017 [54].

1.2.3 Régénération du parenchyme cardiaque adulte

Traditionnellement, le cœur humain était considéré comme étant un organe post-mitotique incapable de régénération spontanée. Ce dogme a été remis en question avec la démonstration formelle du renouvellement des cellules cardiaques au cours de la vie adulte.

Pour ce faire, les chercheurs ont déterminé l'âge des cardiomyocytes de façon rétrospective en utilisant la datation archéologique par le carbone-14. Puisque la radioactivité du carbone-14 (^{14}C) décroît de façon constante au fil du temps, les scientifiques ont déterminé son temps de demi-vie (i.e. période radioactive) et utilisent cet isotope comme chronomètre pour estimer l'âge de différents échantillons. Les chercheurs ont donc daté les cellules cardiaques en se rapportant aux explosions nucléaires menées entre 1955 et 1963 pendant la guerre froide, donnant des renseignements sur le taux de renouvellement des cardiomyocytes de patients ayant vécu pendant cette période. En 2009, Bergmann *et al.* ont publié une étude charnière qui suggère que près de 50% des cardiomyocytes sont renouvelés au cours de la vie d'un individu. Ils ont établi que le renouvellement des cardiomyocytes serait de 1% par an à l'âge de 25 ans et de 0,45% par an vers 75 ans [60]. Une autre étude a plutôt estimé le taux de renouvellement des cardiomyocytes à 22% par année chez l'adulte [61].

Malgré la controverse entourant l'ampleur du renouvellement du parenchyme cardiaque, ces observations démontrent clairement que de nouveaux cardiomyocytes sont formés chaque année. De plus, la détection de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (CDC6, Ki67, MCM5, phospho-H3 et la kinase Aurora B) au sein du noyau de cardiomyocytes adultes a permis de confirmer leur potentiel prolifératif [62–64]. Toutefois, ces études ne permettent pas de déterminer l'origine des cardiomyocytes nouvellement formés. Ces observations intrigantes ont donc motivé l'identification de la source de ces nouveaux myocytes, soit une population cellulaire capable de proliférer et de se différencier en cellules cardiaques matures.

1.2.4 Découverte de cellules souches cardiaques chez l'adulte

Il y a un peu plus d'une dizaine d'années, plusieurs laboratoires ont démontré que le cœur adulte possède un réservoir de cellules souches multipotentes. Quoiqu'il en soit, le fait qu'un nombre considérable de patients développent progressivement une IC suite à un infarctus du myocarde démontre que la régénération cardiaque endogène est négligeable chez l'adulte. Cependant, la découverte de cellules souches cardiaques chez l'adulte a permis de proposer de nouveaux types cellulaires potentiels pour la thérapie cellulaire. Considérant le faible potentiel thérapeutique et cardiogénique des types cellulaires de première génération, la découverte de cellules souches multipotentes au sein du cœur adulte a suscité beaucoup d'enthousiasme dans le domaine de la médecine régénérative.

Les connaissances acquises dans le domaine des cellules souches hématopoïétiques ont servi de bases pour la quête de cellules exprimant le récepteur tyrosine kinase c-Kit⁺ au sein du myocarde, dans l'espoir d'identifier une population cellulaire capable de renouveler le parenchyme cardiaque. Plusieurs populations de cellules souches cardiaques semblent co-exister dans le cœur adulte (MDR1/ABCG2⁺, Sca-1⁺, Islet-1⁺ et c-Kit⁺) [41,65–67], mais les cellules c-Kit⁺ ont été les plus étudiées et les mieux caractérisées au cours des dernières années. En 2003, Beltrami *et al.* ont démontré leur présence au sein de microenvironnements (niches) hypoxiques du cœur adulte [41]. Les cellules c-Kit⁺ se localisent préférentiellement dans des régions du cœur où le stress mécanique est faible telles que les appendices auriculaires, la base et l'apex ventriculaire [68]. Depuis leur découverte, les cellules cardiaques c-Kit⁺ ont été identifiées dans plusieurs modèles animaux et spécimen humains [41,43,69–74]. Ferreira-Martins *et al.* ont démontré que cette population cellulaire contribue significativement au développement cardiaque chez la souris [75]. Les cellules cardiaques

c-Kit⁺ possèdent les caractéristiques fondamentales des cellules souches (clonogénicité, multipotence et auto-renouvellement) et plusieurs évidences suggèrent qu'elles ont le potentiel de générer chacun des principaux types cellulaires cardiaques: cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et cardiomyocytes [41,76]. Ils ont aussi montré que ces cellules sont capables de divisions asymétriques au cours du développement et que l'expression du récepteur c-Kit ainsi que leur capacité de réplication diminuent graduellement pendant la différenciation. Chez l'adulte, ces cellules sont peu nombreuses (~1 cellule c-Kit⁺ pour 10 000 cardiomyocytes) et négatives pour les marqueurs de lignées cellulaires hématopoïétiques (Lin⁻: CD34, CD45, CD20, CD45RO et CD8) [41].

Certains groupes ont rapporté que plus de 10% des cellules souches cardiaques c-Kit⁺ expriment les facteurs de transcription cardiaques précoces *NKX2.5*, *GATA4* et *MEF2* tandis que plus de 0,5% des cellules expriment des protéines sarcomériques. Ces variations phénotypiques démontrent l'hétérogénéité de cette population et suggèrent que les cellules c-Kit⁺ existent à différents stades de maturation dans le cœur adulte. De plus, basé sur l'expression du récepteur KDR (*kinase domain receptor*), les cellules c-Kit⁺ peuvent être subdivisées en populations distinctes présentant soit un engagement préférentiellement myogénique (c-Kit⁺/KDR⁻) ou vasculaire (c-Kit⁺/KDR⁺) [77]. Les cellules c-Kit⁺ myogénique sont confinées dans l'espace interstitiel entre les cardiomyocytes et pourraient potentiellement participer au renouvellement du parenchyme cardiaque. Les cellules c-Kit⁺ présentant un phénotype vasculaire se trouvent quant à elles dans la région péri-vasculaire des vaisseaux coronaires et possèdent un faible potentiel cardiogénique. Des études montrent que les cellules c-Kit⁺ sont mobilisées au niveau de la lésion ischémique, prolifèrent et se différencient en cardiomyocytes. Selon certaines évidences, il semblerait que le gradient

hypoxique joue un rôle important dans cette réponse physiologique [78]. Bien que la présence de cellules c-Kit⁺ dans le cœur adulte semble indiscutable, leur rôle dans l'homéostasie cardiaque et leur contribution à la formation de nouveaux cardiomyocytes demeurent des sujets hautement controversés dans le domaine de la médecine régénérative.

Des résultats contradictoires ont été obtenus en ce qui concerne le potentiel cardiomyogénique des eCPCs c-Kit⁺ (Tableau I, page 16). Les rapports initiaux démontrant une différenciation significative en cardiomyocytes *in situ* [41,75,79] ont eu peine à être reproduits par des laboratoires indépendants [80–82]. Sultana *et al.* ont quant à eux démontré que le récepteur c-Kit identifie principalement une population de cellules endothéliales cardiaques matures, supportant le faible potentiel cardiogénique des eCPCs c-Kit⁺ rapporté par certains groupes [83]. Toutefois, des évidences portent à croire que le potentiel régénératif des eCPCs c-Kit⁺ pourrait être compromis par certaines pathologies cardiaques. En effet, Hamid *et al.* ont observé que le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), une cytokine pro-inflammatoire sécrétée en réponse à un dommage myocardique, inhibe la différenciation des eCPCs en cardiomyocytes et favorise le remodelage pathologique [84]. Récemment, Gude *et al.* ont noté que la fonction du récepteur c-Kit au sein du myocarde est beaucoup plus complexe et variée que ce qui avait été initialement documenté [85]. Leur étude a entre autres démontré qu'une sous-population de cardiomyocytes exprime la protéine c-Kit dans le cœur adulte en condition physiologique. L'expression hétérogène et dynamique du récepteur c-Kit dans le myocarde postnatal facilite la conciliation d'observations apparemment disparates et résout plusieurs aspects concernant le rôle controversé de ce récepteur en biologie cardiaque.

Tableau I. Sommaire du débat entourant la pertinence clinique des eCPCs c-Kit⁺.

Position	Résultats des recherches	Espèce(s)	Référence(s)
Défavorable	Les cellules c-Kit ⁺ ne sont pas des cellules souches cardiaques et ne participent ni au développement, à l'homéostasie ou à la régénération cardiaque.	Souris	Balsam et al., 2004 Zaruba et al., 2010 Sultana et al., 2015 [82,83,85]
	La formation de tissu cardiaque en réponse au transfert exogène de cellules c-Kit ⁺ est modeste voire inexistant.	Souris	Murry et al., 2004 [86]
	La population cellulaire c-Kit ⁺ ne contribue pas à la régénération cardiaque médiée par la transplantation de cellules dérivées de cardiosphères.	Humain	Cheng et al., 2014 [87]
Favorable	Les cellules c-Kit ⁺ sont présentes dans le cœur adulte et participent au développement, à l'homéostasie et à la régénération cardiaque.	Souris	Beltrami et al., 2003 Tallini et al., 2009 Ellison Et al., 2013 Anversa et al., 2013 Nadal-Ginard et al., 2014 Hatzistergos et al., 2015 [41,73,88-91]
	La transplantation autologue de cellules c-Kit ⁺ améliore la fonction cardiaque chez l'humain et dans les modèles d'insuffisance cardiaque expérimentale.	Humain, Porc	Quevedo et al., 2009 Schuleri et al., 2009 Bolli et al., 2011 Chugh et al., 2012 McCall et al., 2012 [92-96]
	La traçabilité génique supporte le rôle des cellules c-Kit ⁺ dans le développement et la régénération cardiaque.	Souris	van Berlo et al., 2014 Hatzistergos et al., 2015 [81,91]
	Le récepteur c-Kit est exprimé dans les cardiomyocytes néonataux en phase de différenciation terminale	Souris	Li et al., 2008 Naqvi et al., 2009 [97,98]
Neutre	Les études de traçabilité génique suggèrent que les cellules c-Kit ⁺ pourraient contribuer à la cardiogenèse observée après une lésion.	Souris	Hsieh et al., 2007 [99]
	Les cellules cardiaques endogènes c-Kit ⁺ participent à la régénération myocardique seulement au stade néonatal.	Souris	Jesty et al., 2012 [100]
	Les cardiomyocytes sains, endommagés et dédifférenciés peuvent potentiellement exprimer la protéine c-Kit.	Souris	Tallini et al., 2009 Zhang et al., 2010 Kubin et al., 2011 Liu et al., 2016 [89,101-103]

Données tirées de: Gude *et al.*, 2017 [105].

1.2.5 Application clinique des cellules souches cardiaques

Les cellules souches qui perdurent au sein du myocarde adulte présenteraient les meilleures caractéristiques pour la thérapie cardiaque [106]. La découverte de cellules souches cardiaques résidentes a donc motivé plusieurs groupes à développer des méthodes d'isolement et de culture pour l'application des eCSCs en clinique. Les tentatives initiales reposaient sur la sélection antigénique de cellules immédiatement après avoir procédé à la dissociation enzymatique complète du tissu cardiaque. Suivant cette approche, Beltrami *et al.* ont été les premiers à purifier et amplifier des eCSCs ex vivo [41].

Bien que cette première tentative ait permis de faire la preuve du concept, cette procédure ne peut être transposée dans un contexte clinique en raison de la collecte limitée de biopsies cardiaques lors de chirurgies. Afin de surmonter cet obstacle, Messina *et al.* ont développé un procédé permettant d'isoler et d'amplifier des cellules souches cardiaques adultes à partir d'explants tissulaires (Figure 4, page 18) [107]. Leur méthode consiste essentiellement à découper, puis digérer partiellement (cocktail enzymatique) le tissu cardiaque avant la mise en culture. Après quelques jours seulement, des cellules migrent spontanément hors des explants tissulaires et colonisent le substrat de culture. Le mécanisme exact impliqué dans la migration des cellules hors des explants demeure inconnu mais impliquerait la voie de signalisation Notch-1 et le processus de transition épithélio-mésenchymateuse [108].

1.2.5.1 Produit primaire dérivé d'explants

Malgré l'enthousiasme entourant le potentiel régénératif des cellules c-Kit⁺ et CDCs, l'obtention de ces produits cellulaires nécessite une expertise technique en plus d'une exposition prolongée aux conditions artificielles de culture. Ces contraintes se traduisent

essentiellement par des coûts ainsi que des délais considérables associés à la production de eCSCs pour usages cliniques. Pour ces raisons, le potentiel thérapeutique du produit primaire dérivé d'explants (EDCs, *explant-derived cells*) a été investigué. Les EDCs représentent le produit primaire obtenu à partir de biopsies myocardiques et se composent de sous-populations complémentaires exprimant des marqueurs associés aux cellules souches (c-Kit, ABCG2, SSEA-1), endothéliales (CD31, CD34) et mésenchymateuses (CD90, CD105) [109]. Les cellules c-Kit⁺ représentent 5-10% de la population totale, alors que la proportion de cellules CD90⁺ en constitue 30-40% [109].

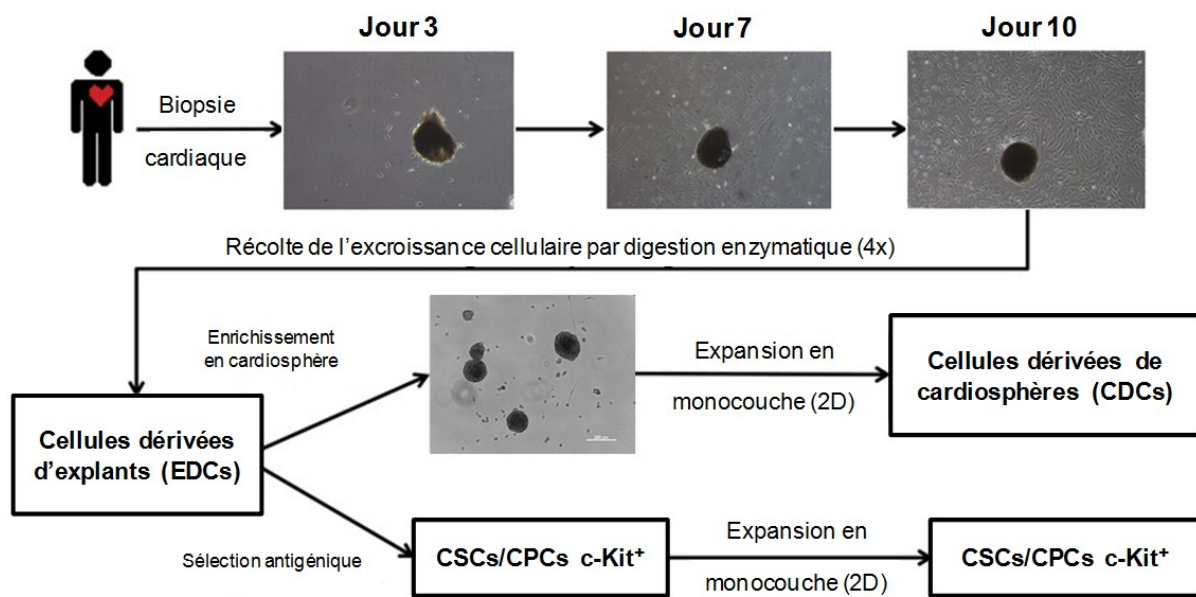


Figure 4. Isolement de cellules souches à partir de biopsies cardiaques.

Avant la mise en culture, les biopsies cardiaques sont finement découpées puis partiellement digérées. Après quelques jours, des cellules migrent spontanément hors des explants tissulaires et colonisent le substrat de culture. L'excroissance cellulaire est ensuite récoltée et peut être utilisée directement (EDCs, *explant-derived cells*), enrichie en cardiosphères (CDCs, *cardiosphere-derived cells*) avant amplification en monocouche, ou sélectionnées antigéniquement (e.g. CSCs/CPCs c-Kit⁺). Adaptée de: Mayfield *et al.*, 2014 [110].

Le potentiel angiogénique et cardiogénique des EDCs ainsi que leur capacité régénérative a été démontré dans plusieurs études précliniques au cours des dernières années [109,111–114]. Certaines études ont comparé directement l'efficacité thérapeutique des différentes populations de eCSCs. Ces études précliniques ont démontré que la performance régénérative des EDCs est comparable aux CDCs alors que les bénéfices fonctionnels produits par les eCSCs c-Kit⁺ sont nettement moindre [106,109]. Ces résultats démontrent que la formation de cardiosphères ou la sélection antigénique d'une population spécifique ne permet pas de générer un produit cellulaire avec un potentiel régénératif supérieur comparé au produit primaire dérivé d'explants. Dans un contexte clinique, les EDCs présentent de nombreux avantages en comparaison aux autres populations de eCSCs rapportées précédemment. L'utilisation du produit primaire dérivé d'explants permet entre autres de simplifier le processus d'isolement sans altérer les interactions cellulaires entre les différentes sous-populations, de diminuer les délais de culture afin de minimiser les risques de transformations cellulaires malignes et ultimement de réduire les coûts associés à la production des cellules [110]. L'application des EDCs en clinique représente donc un moyen simplifié et efficace de générer un produit cellulaire autologue pour la régénération cardiaque.

1.2.5.2 Cellules dérivées de cardiosphères

Après avoir été collectées, les EDCs peuvent être cultivées en suspension afin de promouvoir la formation d'agrégats cellulaires sphériques appelés cardiosphères (CSp), un processus initié par une interaction hydrophobique entre les cellules et le support de culture [107]. Des études récentes ont démontré que la voie de signalisation ERK/Sp1 joue un rôle dans la croissance des sphères par la stimulation de la production du facteur de croissance de

l'endothélium vasculaire (VEGF) [115]. La génération de CSp récapitule le microenvironnement cardiaque et favorise l'enrichissement de progéniteurs cardiaques au sein de la population, potentiellement via l'activation du récepteur c-Kit [116,117]. En raison leur taille (20-150 μm), le risque thrombotique suite à l'infusion intracoronaire de CSp s'est avéré être une préoccupation clinique importante. Afin de remédier à cette limitation, il a été démontré que les CSp peuvent être remises en conditions adhérentes de culture afin de reformer une monocouche cellulaire (*cardiosphere-derived cells*; CDCs) [118]. L'origine des CDCs à longterm a été questionnée. Certains ont d'abord suggéré que ces cellules auraient migré vers le cœur à partir d'une source extra-cardiaque avant la collecte tissulaire. Toutefois, cette hypothèse a été réfutée par les résultats d'une étude ayant tirée avantage de patients greffés. Dans ce travail, les courtes répétitions en tandem dans l'ADN des CDCs étaient identiques au cœur des donneurs, mais pas au receveur [119,120]. De plus, l'analyse des cellules provenant de paires de donneurs-receveurs de sexe opposé (i.e. receveur mâle, XY; donneuse femelle, XX) ont démontré que les CDCs étaient uniformément de karyotype XX tandis que les cellules circulantes périphériques étaient XY [119,120]. Ces expériences ont donc permis de confirmer que les CDCs possèdent une origine cardiaque intrinsèque.

Plusieurs études précliniques ont démontré la capacité et l'efficacité des CDCs à améliorer la fonction cardiaque suite à un infarctus du myocarde [118,121–123]. La contribution thérapeutique relative des sous-populations cellulaires issues de cardiosphères a été récemment investiguée et les résultats suggèrent que les cellules CD90⁺ sont responsable des bénéfices après transplantation [88,124]. En accord avec ces observations, les analyses phénotypiques et transcriptomiques réalisées par Gago-Lopez *et al.* ont montré que le marqueur CD90 discrimine des populations avec un potentiel de différenciation

cardiogénique divergent [125]. Alors que la population CD90⁺ présente un phénotype myofibroblastique (périostin⁺), les cellules CD90⁻ expriment certains facteurs de transcription cardiaques (*ISL-1* et *NKX2.5*) et ont un potentiel cardiogénique supérieur.

Ces résultats encourageants ont mené à la mise sur pied de l'essai clinique randomisé CADUCEUS (*Cardiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction*) [126,127]. Cette étude prospective de phase 1 a permis de démontrer l'innocuité et le potentiel thérapeutique d'une infusion intracoronaire autologue de cellules souches cardiaques chez des patients présentant une dysfonction ventriculaire gauche d'origine ischémique. Des examens d'imagerie par résonance magnétique (IRM) réalisés 6 mois suivant la procédure ont révélé une réduction de la masse cicatricielle, une augmentation de la masse de tissu viable, un épaississement de la paroi ventriculaire ainsi qu'une amélioration de la contractilité ségmentaire locale chez les patients traités [127]. Plusieurs autres essais cliniques ont aussi confirmé l'innocuité et le potentiel régénératif des CDCs en thérapie cellulaire cardiaque (ALCADIA, ALLSTAR, DYNAMIC, TICAP) [128].

1.2.5.3 Sélection antigénique des cellules

Contrairement à la stratégie qui mise sur l'effet synergique des différentes populations complémentaires de cellules dérivées d'explants, certains groupes ont préféré opter pour une population cellulaire spécifique, notamment les cellules c-Kit⁺ [43]. Cette population peut être isolée et purifiée par sélection antigénique à partir des EDCs ou CDCs. Puisque les cellules c-Kit⁺ représentent 5-10% de la totalité du produit primaire dérivé d'explants, elles doivent subir plusieurs étapes d'amplifications afin d'en obtenir des quantités suffisantes pour la thérapie cellulaire. Plusieurs études animales ont démontré la capacité des cellules c-Kit⁺ transplantées à améliorer la fonction cardiaque [41,43,129,130]. Malgré un manque de

connaissances apparent entourant la biologie de ces cellules et sur les mécanismes régénératifs responsables des bénéfices observés dans les différents modèles animaux, les cellules souches c-Kit⁺ ont rapidement été transposés en clinique. En 2009, Bolli *et al.* ont initié l'étude randomisée SCIPIO (*Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic cardiomyopathy*). La phase I de l'essai clinique SCIPIO est la première étude qui visait à évaluer l'efficacité des eCSCs c-Kit⁺ pour le traitement de la cardiomyopathie ischémique [95]. Cet essai a permis de démontrer que l'injection de cellules souches cardiaques c-Kit⁺/Lin⁻ améliore la fraction d'éjection ventriculaire gauche après 12 mois chez des patients présentant une IC d'origine ischémique. L'impact positif de la thérapie sur la fonction cardiaque globale a été associé à une amélioration de la classe fonctionnelle de la NYHA (*New York Heart Association*) et une meilleure qualité de vie des sujets traités.

1.2.6 Mécanismes régénératifs des cellules injectées

Malgré l'amélioration fonctionnelle observée après la transplantation de cellules souches, les mécanismes régénératifs des cellules souches demeurent peu connus. Les travaux initiaux ont montré que ces cellules étaient capables de se différencier en cardiomyocytes fonctionnels *in vivo*, mais le niveau de cardiogenèse enregistré suite à l'injection de cellules est largement insuffisant pour expliquer l'amélioration de la fonction cardiaque rapportée dans les différentes études. De plus, la mort massive des cellules dans les jours suivant l'injection est un phénomène bien documenté pour plusieurs types cellulaires dont les eCSCs. Les cellules transplantées sont soumises à un environnement ischémique et inflammatoire de sorte qu'une très faible quantité de cellules persiste (< 10% après 24 heures) et survivent (< 5% après 3 semaines) dans le myocarde [131,132]. Ces observations ont permis de découvrir des mécanismes d'action inattendus qui ont bouleversé les concepts de base de la thérapie

cellulaire. Le fait que des bénéfices soient notés en dépit de la faible rétention du produit transplanté suggère que la persistance à long terme des cellules dans le myocarde n'est pas essentielle à leur action sur la protection et la préservation de la fonction cardiaque. En effet, les bienfaits observés seraient essentiellement assurés par des mécanismes de réparation indirecte, médiés par l'action de facteurs paracrines sécrétés par les cellules transplantées [133,134]. Plusieurs études ont montré que les cellules souches sécrètent un large éventail de protéines dont certaines cytokines, chimiokines ainsi que de nombreux facteurs de croissance (Tableau II, page 24) [135]. Ces protéines produisent des effets pléiotropiques sur le tissu lésé et amplifient les processus de réparation endogènes.

Des évidences suggèrent aussi que les exosomes, microvésicules produites par les cellules souches, sont les principaux responsables des bénéfices observés en thérapie cellulaire [136,137]. Ces microparticules transportent une multitude de molécules bioactives (protéines, ARNm et miARN) caractéristiques du type cellulaire dont elles dérivent [138] et peuvent virtuellement transférer leur contenu à n'importe quelle cellule du corps. Les exosomes peuvent fusionner directement avec la membrane plasmique, et son contenu est alors libéré dans le cytosol. Certaines évidences suggèrent même que le transfert exosomal de miARN peut modifier le transcriptome des cellules réceptrices et ainsi altérer leur physiologie. Les mécanismes paracrines cardioprotecteurs sont variés et permettent notamment de limiter le remodelage de la matrice extracellulaire, le recrutement et la différenciation des eCSCs endogènes, l'inhibition des mécanismes hypertrophiques et apoptotiques ainsi que la stimulation de l'angiogénèse [135,139]. Les eCSCs produisent des quantités importantes de facteurs cardio-protecteurs en comparaison aux cellules d'origines extra-cardiaques, ce qui expliquerait leur supériorité thérapeutique [106].

Tableau II. Principaux facteurs sécrétés par les cellules souches adultes.

Facteur sécrété	Abréviation	Fonction(s) proposée(s)
<i>Adrenomedullin</i>	ADM	Cytoprotection
<i>Agio-associated migratory protein</i>	AAMP	Angiogenèse
<i>Angiogenin</i>	ANG	Angiogenèse, prolifération
<i>Angiopoetin-1</i>	AGPT1	Migration
<i>Bone morphogenetic-2</i>	BMP2	Développement
<i>Bone morphogenetic-6</i>	BMP6	Différenciation, croissance
<i>Connective tissue growth factor</i>	CTGF	Angiogenèse, croissance
<i>Endothelin-1</i>	EDN1	Cytoprotection, prolifération
<i>Fibroblast growth factor-2</i>	FGF2	Prolifération, migration
<i>Fibroblast growth factor-7</i>	FGF7	Prolifération
<i>Hepatocyte growth factor</i>	HGF	Cytoprotection, angiogenèse, migration
<i>Insulin growth factor</i>	IGF-1	Cytoprotection, migration, contractilité
<i>Interleukin-1</i>	IL-1	Induction VEGF
<i>Interleukin-6</i>	IL-6	Induction VEGF
<i>Interleukin-11</i>	IL-11	Cytoprotection
<i>Stem cell factor</i>	SCF	Prolifération, migration
<i>Leukemia inhibitory factor</i>	LIF	Prolifération, cytoprotection
<i>Macrophage inhinitory factor</i>	MIF	Prolifération, réponse inflammatoire
<i>Matrix metalloproteinase-2</i>	MMP2	Dégradation matricielle
<i>Matrix metalloproteinase-9</i>	MMP9	Dégradation matricielle
<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>	MCP-1	Dégradation matricielle
<i>Macrophage-specific colony-stimulating factor</i>	M-CSF	Prolifération/migration des monocytes
<i>Placental growth factor</i>	PGF	Prolifération
<i>Plasminogen activator</i>	PA	Dégradation matricielle
<i>Platelet-derived growth factor</i>	PDGF	Prolifération, migration
<i>Pleiotrophin</i>	PTN	Prolifération
<i>Secreted frizzled-related protein-1</i>	SFRP1	Développement
<i>Secreted frizzled-related protein-2</i>	SFRP2	Développement
<i>Stromal cell-derived factor</i>	SDF-1	Recrutement de progéniteurs
<i>Thrombospondin</i>	THBS1	Migration
<i>Thymosin-β4</i>	TMSB4	Migration, cytoprotection
<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>	TIMP-1	Migration
<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-2</i>	TIMP-2	Migration
<i>Transforming growth factor-β</i>	TGF-β	Maturation des vaisseaux, prolifération
<i>Tumor necrosis factor-α</i>	TNF-α	Dégradation matricielle, prolifération
<i>Vascular endothelial growth factor</i>	VEGF	Prolifération, migration, angiogenèse

Données tirées de Gnecchi *et al.*, 2008 [135].

1.2.7 Limitations de la thérapie cellulaire cardiaque

Certaines observations portent à croire que le statut clinique du patient pourrait également avoir une influence considérable sur les bénéfices de la thérapie cellulaire. Mayfield *et al.* ont évalué cette possibilité et ont observé que l'accumulation de co-morbidités a une incidence défavorable sur la capacité régénérative des cellules souches cardiaques injectées [113]. Le vieillissement exerce également un impact négatif sur la fonctionnalité des cellules souches [140]. En effet, il a été démontré que la prolifération, le potentiel de différenciation ainsi que la production de facteurs pro-angiogéniques est considérablement réduite chez les patients d'âge biologique avancé [141,142].

Tel que mentionné précédemment, le potentiel thérapeutique de la thérapie cellulaire est principalement limité par le faible taux de survie et d'intégration des cellules injectées [143]. Les causes de la perte massive des cellules transplantées sont multiples et dépendent en partie de la méthode d'administration [144]. Dans le cas d'une infusion intra-coronaire, l'élimination précoce des cellules s'explique essentiellement par leur faible capacité à migrer hors de la circulation sanguine (extravasation) [145]. Lors d'une injection intra-myocardique, la modeste rétention des cellules immédiatement après l'administration est principalement causée par la fuite de la suspension cellulaire dans l'espace interstitiel au niveau du site d'injection [146]. Les jours suivant la transplantation, la plupart des cellules ayant persistées meurent progressivement en raison de l'ischémie causée par une très faible vascularisation de la zone lésée, de l'inflammation, de l'activation du système immunitaire (transplantation allogénique) et de l'apoptose induite par le manque d'interaction entre les cellules greffées et la matrice extracellulaire (anoikose) [147].

Puisque les bénéfices fonctionnels de la thérapie cellulaire sont proportionnels au nombre de cellules retenues au niveau du site d'injection, il est impératif de développer des stratégies pour augmenter la rétention et la survie des cellules injectées. L'amélioration de la survie des cellules souches permettrait de réduire de façon considérable le nombre de cellules à injecter, d'éviter le besoin d'effectuer des injections répétées, de réduire les délais d'amplification des cellules et finalement de limiter l'inflammation tissulaire consécutive à l'élimination des débris cellulaires [148].

L'augmentation du nombre de cellules transplantées ne semble pas être la meilleure alternative. En plus de la majoration du volume total injecté et la multiplication des sites d'injection, l'amplification de la réponse inflammatoire pourrait augmenter le risque d'arythmies chez ces patients. Mis à part l'intégration et la survie des cellules transplantées, plusieurs autres facteurs conditionnent l'efficacité de la thérapie cellulaire dont l'indice mitotique, le potentiel de différenciation, la sécrétion de facteurs paracrines et la capacité de recrutement de cellules progénitrices endogènes et périphériques [111,149]. L'optimisation des protocoles actuels est donc nécessaire afin d'améliorer les bénéfices et surmonter les obstacles limitant le transfert de cette stratégie thérapeutique en routine clinique [2].

1.2.8 Optimisation fonctionnelle des cellules souches

Au cours des dernières années, plusieurs stratégies de conditionnement ont été investiguées afin d'améliorer les propriétés thérapeutiques des cellules souches (survie, prolifération, recrutement de progéniteurs endogènes, migration, rétention à long terme des cellules transplantées). Indépendamment de l'approche utilisée, le but ultime est d'augmenter la capacité régénérative des cellules souches via l'activation de certaines voies de signalisation endogènes afin de potentialiser et uniformiser les bienfaits du transfert adoptif de cellules

souches (Figure 5, page 31). Plusieurs études ont démontré que la modification des cellules in vitro permet d'améliorer le degré de rétention, la survie, le potentiel de différenciation, le profil paracrine ainsi que la capacité à recruter diverses cellules progénitrices suivant leur implantation [150]. La modification génique des cellules, le conditionnement cellulaire hypoxique/ischémique, les manipulations pharmacologiques ex vivo ainsi que le conditionnement bioélectrique constituent les principales approches évaluées afin d'optimiser la capacité des cellules souches [151].

1.2.8.1 Modifications génétiques des cellules

Plusieurs études montrent que l'ingénierie génétique des cellules souches permet d'améliorer la survie, la prolifération, le potentiel de différenciation ainsi que les caractéristiques métaboliques des cellules souches. De plus, il a été démontré que les cellules souches peuvent être utilisées comme vecteurs de thérapie génique sans compromettre leurs propriétés fondamentales [152]. Considérant l'importance de la signalisation paracrine des cellules souches pour la régénération cardiaque, l'utilisation de modifications génétiques afin de favoriser la production de facteurs de croissance cardioprotecteurs a été investiguée. Récemment, il a été démontré dans des études pré-cliniques que l'optimisation de la production des facteurs SDF-1 et IGF-1 par les EDCs améliore le potentiel régénératif des cellules [111,114]. La modification génétique des eCSCs avec la kinase Pim-1, un acteur clé de la voie de signalisation AKT, a aussi fait ses preuves dans des études précliniques [153–156]. Cette stratégie visait essentiellement à réduire l'apoptose et l'élimination des eCSCs suivant leur transplantation. Tel que prévu, il a été démontré que l'augmentation de l'expression de Pim-1 améliore la rétention et la régénération cardiaque médiée par les eCSCs [153]. Bien que ces études établissent la preuve du concept, la translation clinique de cette

approche est problématique en raison du potentiel oncogène de ce vecteur [157]. L'ingénierie génétique de cellules souches de différentes origines a également été utilisée pour améliorer la survie cellulaire (AKT [158], SDF-1 [159], IGF-1 [160], BCL2 [161], PDGF [162]), l'intégration électrique (Cx43) [163], la différenciation (TGF- β) [164], la migration (CD18 [165], β 1-intégrine [166], CXCR4 [167], CCR2 [168], eNOS [169], et l'angiogenèse (HGF [170], HIF-1 [171], VEGF [172], SDF-1 [173]). Toutefois, il est difficile d'évaluer l'efficacité de ces différentes approches compte tenu des variations de types cellulaires et des stratégies de transfert génique utilisées.

1.2.8.2 Conditionnement cellulaire hypoxique

Les premières études visant à déterminer les effets du pré-conditionnement hypoxique sur le myocarde ont démontré que la stabilisation des facteurs de transcription HIFs (*hypoxia inducible factors*) permet de limiter la taille de l'infarctus et favorise la néovascularisation [174,175]. Le conditionnement cellulaire hypoxique augmente l'expression de gènes cytoprotecteurs, stabilise le potentiel membranaire mitochondrial, favorise la prolifération et améliore la tolérance au stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [176]. Basé sur ces observations, plusieurs groupes ont évalué l'efficacité d'un conditionnement hypoxique dans le but d'améliorer la survie des cellules transplantées [177]. La culture de cellules souches en présence de faibles concentrations d'oxygène (1-5% O₂) augmente la persistance des cellules au sein du myocarde [178]. Certaines évidences suggèrent que les effets bénéfiques de l'hypoxie sont entre autres médiés par l'ouverture des canaux ioniques potassiques (K⁺) mitochondriaux sensibles à l'ATP [179]. L'activation de ces canaux induit une relâche modérée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui déclenche l'activation de la protéine kinase C (PKC) [180,181], menant ultimement à l'activation du facteur nucléaire

κ B (NF- κ B) et à la synthèse de molécules antioxydantes dont la MnSOD (*manganese-dependent superoxide dismutase*) [182]. De plus, il a été démontré que l'activation des voies de signalisation de l'axe SDF-1 α /CXCR4 en réponse au conditionnement hypoxique améliore la survie et la rétention des eCSCs au sein du tissu cardiaque ischémié [183]. D'autres évidences suggèrent que la voie PI3K/AKT serait aussi impliquée dans la tolérance au stress médié par le conditionnement hypoxique des eCPCs c-Kit⁺ [178]. En plus des effets cytoprotecteurs, le conditionnement hypoxique potentialise la production de facteurs paracrines, la prolifération ainsi que le potentiel cardiogénique et angiogénique des cellules [177]. Collectivement, ces études montrent que le conditionnement hypoxique est une approche simple permettant d'améliorer l'efficacité de la transplantation de cellules souches

1.2.8.3 Interventions pharmacologiques ex vivo

Le conditionnement pharmacologique représente une approche innovante et simple afin d'optimiser de façon considérable les effets thérapeutiques de la greffe de cellules souches. L'exposition à diverses molécules et agents pharmacologiques est une approche avantageuse car elle implique l'activation de multiples voies de signalisation endogènes. Alors que certaines molécules améliorent les caractéristiques phénotypiques des cellules, d'autres favorise plutôt la production de facteurs paracrines connus pour leurs effets protecteurs sur le myocarde, notamment SDF-1, HGF, IGF-1 et le VEGF [151].

L'augmentation de la tolérance au stress conférer par le conditionnement hypoxique peut aussi être obtenu par certaines interventions pharmacologiques, notamment par l'utilisation d'agonistes des canaux K⁺ mitochondriaux dont le diazoxide. En effet, il a été démontré que le traitement ex vivo de cellules avec le diazoxide augmente leur tolérance au stress via l'activation de la voie PI3K/AKT ainsi que la sécrétion de facteurs cytoprotecteurs

et pro-angiogéniques (VEGF, SDF-1, HGF et IGF-1) par des mécanismes du NF- κ B [184–186]. Puisque les facteurs de croissance, hormones et cytokines sont des acteurs clés dans la physiologie cellulaire, plusieurs ont été utilisés pour modifier les propriétés des cellules souches dont SDF-1, TGF- β , TGF- α et l'ocytocine [187–190]. L'exposition à certains facteurs cardiogéniques ex vivo est aussi être une stratégie prometteuse pour améliorer le potentiel régénératif des cellules souches [191,192].

1.2.8.4 Application de stimulations électriques

Plusieurs évidences portent à croire que l'intégration de signaux bioélectriques pourrait moduler et maintenir les fonctions essentielles à la survie des eCSCs (croissance, prolifération, migration, différenciation et apoptose) [193]. Par exemple, Kim *et al.* ont démontré que le conditionnement électrique permet d'améliorer la survie des cellules souches cardiaques via l'activation des voies de signalisation AKT/Fak/CTGF et conséquemment de bonifier les bienfaits de la thérapie cellulaire [194]. Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans le conditionnement bioélectrique soient peu connus, les effets bénéfiques de la stimulation électrique semblent être médiés par l'induction d'un stress cellulaire, comparable au conditionnement hypoxique décrit précédemment. Toutefois, les avantages fonctionnels conférés par le stress oxydatif persistent plus longtemps suggérant l'implication de différentes voies de signalisation [194]. Puisque le cœur est constamment soumis à une activité électrique, l'exposition des cellules à des signaux électriques pourrait aussi les amener à s'acclimater plus facilement à l'environnement cardiaque post-infarctus. Récemment, Campbell *et al.* ont aussi suggéré que la stimulation électrique pourrait stimuler la production d'exosomes cardioprotecteurs par les eCSCs et ainsi contribuer à la régénération cardiaque [195].

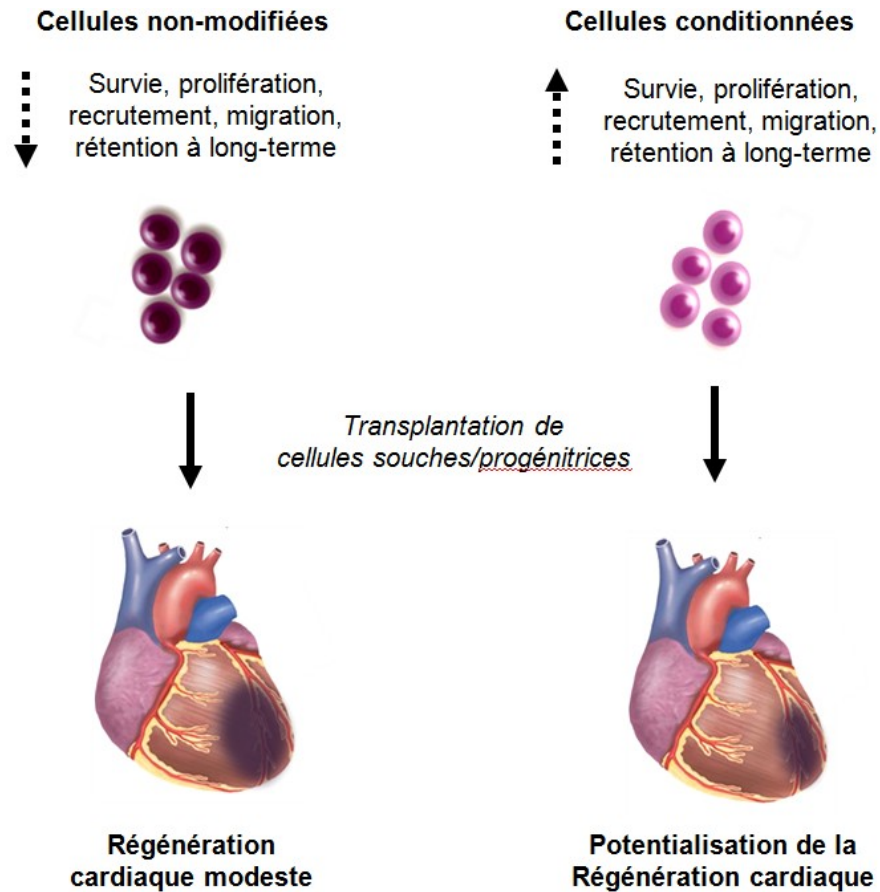


Figure 5. Optimisation fonctionnelle des cellules souches ou progénitrices pour la thérapie cellulaire cardiaque.

Représentation schématique de la potentialisation des capacités régénératives des cellules souches et progénitrices conditionnées *in vitro*. Les différentes stratégies de conditionnement visent à augmenter la survie, la prolifération, l'engagement cardiogénique, le recrutement de progéniteurs endogènes, la migration et la rétention à long terme des cellules transplantées. Adaptée de: Mohsin *et al.*, 2011 [150] et Kulandavelu *et al.*, 2016 [23].

1.3 Propriétés électriques de la membrane cellulaire

Selon le modèle de la mosaïque des fluides présenté par Singer et Nicholson [196], la membrane cellulaire est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées des

protéines et des glycolipides. La membrane constitue une véritable barrière imperméable au passage des molécules chargées tels que les ions [197]. Ces molécules ne peuvent alors franchir cette barrière hydrophobe que par l'intermédiaire de protéines transmembranaires. La perméabilité sélective des membranes est principalement due aux canaux ioniques qui permettent aux ions de traverser la membrane par diffusion passive selon leur gradient électrochimique [198].

Il existe quatre grandes familles de canaux ioniques basées sur leur sélectivité ionique et chaque canal porte le nom de l'ion pour lequel il est le plus sélectif. On trouve ainsi des canaux potassiques (K^+), des canaux sodiques (Na^+), des canaux calciques (Ca^{2+}) et des canaux chlore (Cl^-). Depuis leur découverte, plus de 100 canaux ioniques différents ont été clonés [199]. Bien que l'expression de canaux ioniques a été initialement rapportée dans les cellules excitables telles que les neurones et les myocytes cardiaques, des nombreux canaux sont aussi présents dans les membranes des cellules dites non-excitables [200].

Grâce à l'activité de différents transporteurs, la perméabilité de la membrane plasmique est différente pour chaque ion. Alors que la concentration d'ions K^+ est plus importante au niveau cytosolique en comparaison au milieu extracellulaire, on observe l'inverse pour les ions Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- . Parmi ces ions, le gradient du Ca^{2+} est le plus important (Figure 6, page 33). Le gradient de concentration qui existe pour chaque espèce ionique favorise des phénomènes de transports passifs par diffusion. Les ions étant des molécules chargées, leurs mouvements seront également fortement influencés par le gradient électrique transmembranaire [198]. Ainsi, la condition d'équilibre pour chaque espèce ionique ne sera pas nécessairement obtenue par l'égalisation des concentrations. Cette différence de potentiel électrique est appelée potentiel d'équilibre thermodynamique (E_{ion}).

Le potentiel d'équilibre des ions est obtenu avec l'équation de Nernst, qui correspond au potentiel de membrane pour lequel le flux net d'un ion particulier est nul [197]. Cependant, ce potentiel d'équilibre ne peut être atteint en raison de la différence de perméabilité de la membrane pour chaque espèce ionique.

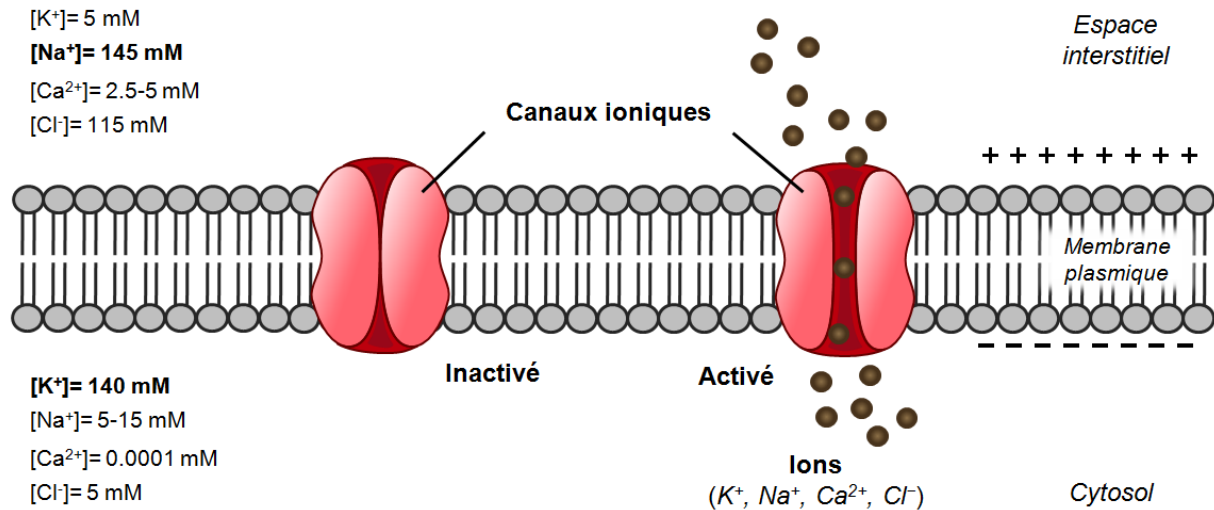


Figure 6. Propriétés électriques de la membrane plasmique.

La membrane cellulaire constitue une barrière imperméable au passage des différents ions, qui ne peuvent traverser cette barrière hydrophobe que par l'intermédiaire des canaux ioniques. Les ions sont distribués inégalement de part et d'autre de la membrane et contribuent à la détermination et au maintien du potentiel électrique membranaire. Données tirées de: Lodish *et al.*, 2000 [201]

En raison de la répartition inégale des ions maintenue par un système de pompage ionique électrogénique, chaque cellule maintient une différence de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane et développe conséquemment un potentiel électrique entre les deux versants de sa membrane plasmique [202]. On parle alors de potentiel de membrane ou polarisation membranaire (V_{mem}). Le potentiel de membrane est relativement stable au

repos et sa valeur est propre à chaque cellule, se situant généralement entre -20 et -100 mV [197]. En comparaison aux cellules excitables, les fluctuations de V_{mem} dans les cellules dites non-excitables sont de plus faibles amplitudes. Un flux entrant d'ions chargés positivement produit une dépolarisation du potentiel membranaire alors qu'un flux sortant génère une hyperpolarisation.

L'activité des canaux K^+ est le déterminant majeur des propriétés électriques de la membrane cellulaire au repos. Dans l'absence de signaux activateurs, la membrane plasmique est principalement perméable aux ions K^+ . Toutefois, l'existence d'une faible perméabilité aux ions Na^+ empêche que potentiel de membrane ne soit strictement égal au potentiel d'équilibre thermodynamique des ions K^+ (E_K). Lorsque plus d'une conductance est impliquée, le potentiel membranaire peut être calculé avec l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz [197]. Cette formule est une généralisation de l'équation de Nernst qui tient compte non seulement de la concentration, mais aussi de la perméabilité membranaire de chaque espèce ionique.

1.3.1 Rôle du V_{mem} dans les processus physiologiques

La relation entre la polarisation membranaire et le comportement des cellules est maintenant bien connue. Une analyse comparative du V_{mem} de plusieurs types cellulaires a révélé une forte corrélation entre la dépolarisation membranaire et le contrôle de la prolifération et de la différenciation [203]. Le fait que cette relation soit conservée dans un large éventail de cellules suggère que la régulation d'événements biologiques par le V_{mem} est un mécanisme de contrôle fondamental. Des données probantes dans de nombreux types de cellules ont fait ressortir non seulement une corrélation, mais un lien fonctionnel entre le V_{mem} et les fonctions cellulaires.

1.3.1.1 Contrôle de la prolifération

On a observé depuis longtemps que le niveau de polarisation membranaire corrèle étroitement avec les événements liés à la prolifération tels que la mitose, la synthèse de l'ADN et la progression globale dans le cycle cellulaire. Les modèles actuels décrivent notamment une oscillation rythmique du V_{mem} au cours du cycle cellulaire. Le lien entre le V_{mem} et la prolifération a été investigué dans un bon nombre de types cellulaires et on croit maintenant que la modulation du V_{mem} est nécessaire pour la progression du cycle cellulaire.

L'hyperpolarisation de la membrane est requise pour l'initiation du cycle et à la progression des phases G1 et S, tandis que la dépolarisation semble essentielle pour la transition G2/M et la division cellulaire [204]. La modulation dynamique du V_{mem} au cours du cycle cellulaire a principalement été attribuée à des modifications de la perméabilité ionique de la membrane (Figure 7, page 36). En effet, l'hyperpolarisation observée pendant les phases G1/S est causée par l'activation de différentes familles de canaux K^+ [205–209]. Le rôle clé de la conductivité potassique pour le maintien de la fonction proliférative a été confirmée à plusieurs reprises [210]. Malgré le lien évident entre le V_{mem} et l'indice mitotique, les détails mécanistiques sont peu connus [211–215]. Des rapports antérieurs ont montré que l'hyperpolarisation établit un gradient électrochimique optimal pour l'influx de Ca^{2+} [216], menant à l'activation de régulateurs positifs du cycle cellulaire [217] et de certains facteurs de transcription impliqués dans la réplication de l'ADN [218]. Bien que le rôle des canaux K^+ dans la progression du cycle cellulaire soit le plus étudié, d'autres gradients ioniques sont aussi impliqués.

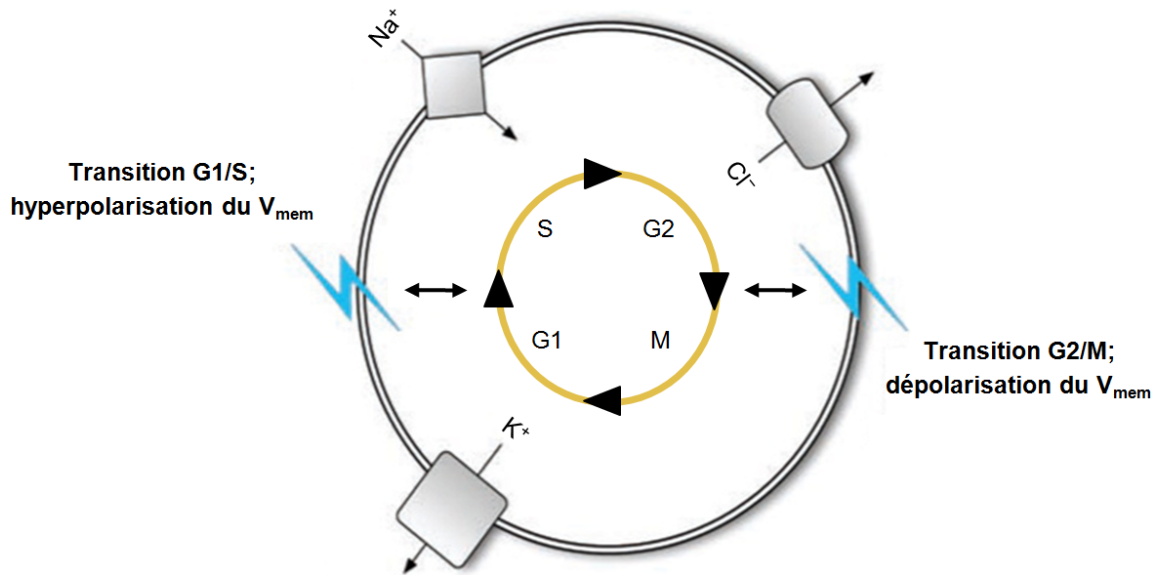


Figure 7. Fluctuation du V_{mem} au cours du cycle cellulaire.

La transition G1/S se caractérise par l'activation de canaux K^+ et l'hyperpolarisation subséquente du V_{mem} . Pendant la transition G2/M, l'activité des canaux K^+ diminue puis des canaux Na^+ et Cl^- s'ouvrent. Ce changement de perméabilité produisant une dépolarisation de la membrane plasmique. Adaptée de: Blackiston *et al.*, 2009 [210].

1.3.1.2 Différenciation cellulaire

Une analyse comparative du degré de polarisation membranaire de plusieurs types de cellules a révélé une forte corrélation entre le V_{mem} et le degré de différenciation [203]. En effet, les cellules matures possèdent généralement un V_{mem} plus polarisé que les cellules indifférenciées. Plusieurs évidences suggèrent qu'une dépolarisation membranaire soutenue favorise la prolifération de cellules matures et primitives tout en préservant leur plasticité [219–222]. De plus, il a été démontré que des variations de V_{mem} contrôlent la différenciation et des myoblastes squelettiques [223] et des cellules souches cardiaques [224] via l'activation du facteur de transcription NFAT. Sundelacruz *et al.* ont quant à eux observé que le V_{mem} détermine la spécification des cellules souches mésenchymateuses *in vitro* [221]. En plus de

fournir des informations sur la voie d'engagement et le niveau de maturation cellulaire, il est maintenant largement reconnu que les propriétés ioniques contribuent activement à la régulation du phénotype cellulaire. La dissection des mécanismes électrophysiologiques impliqués dans la régulation des fonctions cellulaires pourrait donc permettre de développer de nouvelles approches afin d'orienter le phénotype des cellules souches par la modulation du V_{mem} et de l'expression connexe des canaux ioniques.

1.3.2 Familles de canaux ioniques sélectifs aux ions K^+

Tel que mentionné précédemment, le potentiel de repos membranaire est régi principalement par la conductivité du K^+ . Les canaux K^+ représentent la famille la plus diversifiée de canaux. Leur expression est ubiquitaire et des rôles physiologiques très variés leur ont été attribués. Les canaux K^+ sont des multimères (homo- ou hétérodimères) dont les sous-unités α forment le pore ionique. Depuis le clonage du tout premier canal K^+ en 1987 [225], plus de 70 gènes codants différentes sous-unités α ont été identifiés. En plus de l'influence des sous-unités accessoires régulatrices [226], les modifications post-transcriptionnelles (édition [227–229], épissage alternatif [230–232]) et post-traductionnelles (phosphorylation [233], sumoylation [234–237], palmitoylation [238], glycosylation [239,240]) contribuent à la diversité des canaux K^+ . Une caractéristique essentielle de ces canaux est leur perméabilité préférentielle aux ions K^+ [241]. Cette sélectivité ionique est rendue possible par la présence de régions transmembranaires spécialisées dans le transport des ions K^+ . Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la boucle du domaine pore (P) est responsable de la sélectivité ionique du canal, sa conductance unitaire ainsi que sa sensibilité aux composés pharmacologiques [242]. La boucle P consiste en une courte séquence d'environ 20 acides aminés amphiphiles dont la nature est variable d'un canal K^+ à l'autre [243]. Il existe néanmoins une séquence de

3 acides aminés (GYG) hautement conservée parmi tous les canaux K^+ qui forment le filtre de sélectivité au K^+ [244,245]. Les canaux K^+ sont régulés par un large éventail de stimuli physiques (activité électrique, pression, température, lumière), chimiques (pH, osmolarité, oxygène, anesthésiques) et biologiques (ATP, calcium, protéine G, acides gras, kinases, phosphatases) [246]. Ils sont regroupés en différentes familles selon leur structure, mais également selon leurs caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques. Quatre familles représentent la grande majorité des canaux K^+ , soient les canaux K^+ dépendants du voltage (K_v , *voltage-gated potassium channels*) [247], les canaux K^+ à rectification entrante (K_{ir} , *inwardly-rectifying potassium channels*) [248], les canaux K^+ à deux domaines pore (K_{2P} , *two-pore domain potassium channels*) [249] et les canaux K^+ activés par le calcium (K_{Ca} , *calcium-activated potassium channels*) [250] (Tableau III, page 39).

1.3.2.1 Canaux dépendants du potentiel

L'activité des canaux K_v dépend exclusivement de la valeur du potentiel membranaire. Cette famille de canaux potassiques est la plus diversifiée et compte actuellement 40 membres. Les différents canaux K_v présentent des propriétés biophysiques et pharmacologiques très variées. Toutes les sous-unités α constituant le pore des canaux K_v présentent la même topologie, soit 6 segments transmembranaires (S1-S6) reliés entre eux par des boucles intra- et extra-cellulaires, 1 domaine pore (P) et des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. La boucle extracellulaire entre les segments S5 et S6 est impliquée dans la formation du pore (Figure 8, page 46) [251–253]. Des études sur la relation structure-fonction ont révélé que le segment S4, qui possède une structure primaire riche en acides aminés chargés positivement (arginines et lysines), est responsable de la sensibilité au potentiel des canaux K_v [254–256].

Tableau III. Familles de canaux K^+ .

Familles	Topologie	Conductance	Sous-familles	Activation	Modulateurs	Distribution
Kv	1P/6DTM	1-30 pS	Kv1.x (Shaker), Kv2.x (Shab), Kv3.x (Shaw), Kv4.x (Shal), Kv5.x, Kv6.x, Kv7.x (KCNQ), Kv8.x, Kv9.x, Kv10.x (Eag), Kv11.x (Erg), Kv12.x (Elk)	Voltage (dépoliarisation V_{mem})	TEA, 4-AP	Cerveau, cœur, rate, thymus, pancréas, cellules germinales
Kir	1P/2DTM	1-60 pS	Kir1.x (ROMK), Kir2.x, Kir3.x (GIRK), Kir4.x, Kir5.x, Kir6.x (KATP), Kir7.x	Protéines G (G beta-gamma), nucléotides (ATP, ADP)	Ba^{2+} , Mg^{2+} , Cs^+ , polyamines	Cerveau, cœur, muscle lisse, muscle squelettique, reins, placenta, pancréas
K2P	2P/4TM	5-100 pS	TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK, TRESK	pH, acides gras polyinsaturés, anesthésiques volatiles, stress mécanique (déformation de la membrane)	pH, acides gras polyinsaturés, anesthésiques volatiles, stress mécanique (déformation de la membrane)	Cerveau, cœur, poumons, foie, reins, prostate, pancréas
KCa	1P/6DTM	2-85 pS	KCa2.x (SKCa), KCa3.x (IKCa)	Élévation Ca^{2+} cytosolique ($K_d = 0.1-0.6 \mu M$)	TEA, UCL1684, TRAM-34, Apamin, Maurotoxine, Charybdotoxine	Cerveau, cœur, muscle lisse, érythrocytes, lymphocytes, macrophages poumons,
	1P/7DTM	100-220 pS	KCa1.x (BKCa)	Ca^{2+} cytosolique ($K_d \geq 1 \mu M$), voltage (dépoliarisation V_{mem})	TEA, Paxilline, Ibériotoxine, Charybdotoxine	Cerveau, muscle lisse, muscle squelettique

Les données du tablelau sont tirées de: Gutman *et al.*, 2005, Wei *et al.*, 2005, Goldstein *et al.*, Kubo *et al.*, 2005 [247–250].

Les analyses cristallographique ont permis de validé que le mouvement de ces charges lors de variations du potentiel membranaire induit un changement de conformation des domaines S5 et S6 provoquant l'ouverture du canal [257]. Les sous-unités des Kv se divisent en huit sous-familles sur la base de leurs homologies de structure. On distingue la sous-famille des canaux de type Shaker (Kv1), Shab (Kv2), Shaw (Kv3), Shal (Kv4), KCNQ (Kv7), Eag (Kv10), Erg (Kv11), et Elk (Kv12) [247]. Chaque canal est formé de quatre sous-unités α soit identiques (homotétramères) ou distinctes (hétérotétramères) [258]. Les sous-unités Kv5, Kv6, Kv8 et Kv9 ne sont toutefois pas fonctionnelle lorsqu'elles sont exprimés seuls, mais peuvent toutefois s'associer en hétérodimères avec les canaux Kv2 pour moduler leur activation et inactivation [258]. Alors que le pourcentage d'homologie entre les membres appartenant à une même famille avoisine 60%, il est environ de 40% entre les différentes sous-familles [259]. Toutefois, une association hétérotétramérique est seulement possible entre les membres d'une même famille. De plus, leur association avec diverses protéines accessoires cytosoliques (Kv β , protéines à domaine PDZ, KChiP, DPPL, KCNE) apporte un niveau supplémentaire de diversité fonctionnelle [226].

1.3.2.2 Canaux à rectification entrante

Les canaux K^+ de type Kir sont insensibles au potentiel membranaire. Ils ne possèdent donc pas de seuil d'activation et sont ouverts à tous les potentiels [260]. Toutefois, leur conductance augmente lorsque le V_{mem} est inférieur au potentiel d'équilibre de l'ion K^+ (E_K), et diminue lorsque le potentiel est supérieur à E_K . Cette propriété est le résultat d'un blocage voltage-dépendant des courants sortants par certains cations cytoplasmiques et polyamines endogènes [260,261]. En conditions physiologiques, ce sont les courants sortants qui prédominent et participent à la détermination et au maintien du potentiel de repos cellulaire

[262,263]. Les canaux Kir sont des tétramères dont chaque sous-unité est formée de 2 domaines transmembranaires reliés par une boucle extracellulaire [260,261,264,265]. Les Kir possèdent un long domaine C-terminal qui s'associe avec la région N-terminale pour former le domaine P cytoplasmique (Figure 8, page 46). Il existe quatre sous-familles fonctionnelles de canaux Kir, définies selon leur mode de régulation et les protéines endogènes associées. On distingue la sous-famille des canaux Kir classiques (Kir2), la sous-famille des canaux Kir activés par les protéines G (Kir3) (Hibino *et al.*), la sous-famille des canaux Kir activés par l'ATP (Kir1, Kir4, Kir5 et Kir7) et celle des canaux Kir inhibés par l'ATP (Kir6) [248]. Les canaux Kir classiques ne sont régulés ni par le métabolisme ni par les protéines G. Au sein de cette sous-famille, seul le canal Kir2.3 présente une sensibilité à l'acidification cellulaire ainsi qu'aux concentrations intracellulaires d'ATP. Le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) est l'agoniste primaire des canaux Kir classiques et se lie à l'interface du domaine transmembranaire et cytoplasmique [266]. La pharmacologie des canaux Kir est différente de celle des Kv. Alors qu'ils sont insensibles au TEA et 4-AP, cette famille de canaux est fortement inhibée par l'ion barium (Ba^{2+}) [248].

1.3.2.3 Canaux à deux domaines pore

La famille des canaux K2P est la toute dernière famille de canaux K^+ ayant été découverte [267]. Ces canaux sont ouverts à toutes les valeurs de potentiel membranaire et contribuent donc à la détermination du potentiel de repos de plusieurs types cellulaires. En plus de polariser la membrane plasmique, ces canaux permettent l'intégration de signaux cellulaires [268]. Définis comme étant des canaux K^+ de fuite, ces canaux ne possèdent pas de seuil d'activation et leur conductance dépend exclusivement du gradient électrochimique [269]. Néanmoins, la conductance des canaux K2P est régulée par une multitude de stimuli

physicochimiques tels que le pH, les anesthésiques, les acides gras polyinsaturés et l'étirement membranaire [270]. Ces canaux possèdent 4 segments transmembranaires, 2 boucles P et ses domaines N- et C-terminaux sont cytoplasmiques (Figure 8, page 46) [271]. Bien qu'elles possèdent toutes la même topologie, le pourcentage d'homologie entre les différentes sous-unités de cette famille de canaux est relativement faible (environ 40%), les plus grandes divergences se trouvant au niveau de l'extrémité C-terminale [267]. Cette famille compte 15 membres regroupés en 6 sous-familles selon leur homologie de séquence, leurs propriétés électrophysiologiques ou leurs modes de régulation. On distingue la sous-famille des TWIK (*tandem of P domains in a weak inwardly-rectifying K⁺ channel*), TREK (*TWIK-related K⁺ channel*), TASK (*TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel*), TALK (*TWIK-related alkaline pH-activated K⁺ channel*), THIK (*tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel*) et TRESK (*TWIK-related spinal cord K⁺ channel*) [249]. Peu d'études décrivent les propriétés biophysiques des courants de fond chez les mammifères et la pharmacologie de ces canaux demeure peu connue. Une des particularités de ces canaux est l'absence ou le faible effet des bloqueurs potassiques classiques (TEA, Ba²⁺, Cs⁺, 4-AP et toxines) [270].

1.3.2.4 Canaux activés par le calcium

L'ouverture des canaux KCa est régulée par le Ca²⁺ libre intracellulaire (Ca²⁺_i). Dans de nombreux systèmes physiologiques, les canaux KCa créent un lien entre les voies de signalisation calciques et l'excitabilité membranaire [272]. Les canaux KCa se divisent en trois sous-familles sur la base de leur conductance unitaire. On distingue les canaux SKCa (KCa2, *small conductance Ca²⁺-activated potassium channels*), IKCa (KCa3, *intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channels*) et BKCa (KCa1, *large conductance Ca²⁺-*

activated potassium channels) [273]. Mis à part leur conductance, ces canaux diffèrent par leurs séquences primaires d'acides aminés et présentent des profils pharmacologiques distincts. Les inhibiteurs peptidiques (toxines) sont les outils pharmacologiques de choix afin de discriminer les différents canaux KCa. Certains composés de synthèse sont aussi largement reconnus pour l'étude fonctionnelle des canaux KCa (Tableau III, page 42) [250].

Tableau IV. Pharmacologie des canaux KCa.

Canal	Gène(s)	Dépendance V_{mem}	Conductance	Inhibiteurs	Mécanisme(s) d'action
SKCa	<i>KCNN1</i>	Indépendants	2-20 pS	Tétraéthylammonium	Bloquage du pore
	<i>KCNN2</i>			Apamine	Liaison extracellulaire (S5-S3/S4)
	<i>KCNN3</i>			UCL1684	–
IKCa	<i>KCNN4</i>	Indépendant	20-85 pS	Tétraéthylammonium	Bloquage du pore
				Maurotoxine	Bloquage du pore
				Charybdotoxine	Bloquage du pore
				Clotrimazole	Liaison intracellulaire (S5-S6)
				TRAM-34	Liaison intracellulaire (S5-S6)
BKCa	<i>KCNMA1</i>	Élevée	100-220 pS	Tétraéthylammonium	Bloquage du pore
				Ibériotoxine	Bloquage du pore
				Charybdotoxine	Bloquage du pore
				Paxilline	Stabilisateur allostérique du S6

Les données du tableau sont tirées de: Wei *et al.*, 2005, Wulff *et al.*, 2013, Zhou *et al.*, 2014, Christophersen *et al.*, 2015, Nguyen *et al.* 2017 [250,274–277].

Les canaux SKCa (KCa2.1-2.3) ont la plus faible conductance unitaire de cette famille (2-20 pS) et sont exclusivement activés par le Ca^{2+}_i [278]. Les trois membres de cette sous-famille possèdent une structure très conservée (70-80% d'homologie) et une topologie membranaire très proches des canaux appartenant à la famille des Kv [279,280]. En effet, les canaux SKCa sont formés de tétramères (homo- ou hétérotétramères) dont chaque sous-unité α est constituée de 6 segments transmembranaires (S1-S6), une boucle P et des domaines N-

et C-terminaux cytosoliques (Figure 8, page 46) [281–283]. Malgré la présence de quelques résidus chargés au niveau du segment S4 des canaux SKCa, leur nombre est insuffisant pour conférer une sensibilité au potentiel membranaire. La sensibilité des canaux SKCa aux ions Ca^{2+} est conférée par la calmoduline (CaM, *Ca²⁺-modulated protein*), une calciprotéine ubiquitaire capable de lier le Ca^{2+} cytosolique libre. L'association entre la CaM et les sous-unités α des canaux SKCa est maintenue constitutivement et ce même en absence de Ca^{2+} [284]. Le domaine de liaison à la CaM (CaMBD, *CaM binding domain*) au niveau de la région C-terminale de la sous-unité α est hautement conservé au sein des canaux SKCa [285]. Un canal SKCa possède quatre sites CaMBD et quatre CaM interagissent avec chaque CaMBD. L'activation des canaux SKCa exige que toutes les sous-unités α soit liées à la CaM et que chaque CaM lie au moins un ion Ca^{2+} [286]. La liaison du Ca^{2+} induit un changement de conformation de la CaM qui est transféré à la sous-unité α , entraînant l'ouverture subséquente des canaux [280]. Bien que l'activation des canaux SKCa soit indépendante du potentiel membranaire, leur relation courant-voltage (*I-V*) est caractérisée par une faible rectification entrante causée par un blocage du pore par les cations divalents intracellulaires [287]. Au niveau membranaire, les canaux sont assemblés en un complexe protéique destiné à réguler de façon dynamique leur sensibilité au Ca^{2+} . L'interaction des canaux SKCa avec la protéine kinase CK2 et la protéine phosphatase A2 (PPA2) permet d'adapter la sensibilité des canaux au Ca^{2+} de par la régulation de la phosphorylation de la CaM (complexe SKCa-CaM-CK2-PP2A) [288].

Les canaux IKCa (KCa3.1) ont quant à eux une conductance unitaire intermédiaire (20-85 pS) en comparaison aux autres membres de cette famille et partagent environ 50% d'homologie de séquence avec les canaux SKCa [278]. Malgré ces différences, les canaux

IKCa ont plusieurs similarités avec les canaux SKCa. Les canaux IKCa forme des homotétramères dont chaque sous-unité α comprend 6 segments transmembranaires (S1-S6), une boucle P et des domaines N- et C-terminaux cytoplasmiques (Figure 8, page 46). Sa sensibilité au Ca^{2+} est conférée par la liaison constitutive de la CaM au niveau de l'extrémité C-terminale, une région hautement conservée avec les canaux SKCa [284]. Bien que différents inhibiteurs pharmacologiques de la calmoduline produisent des effets contradictoires sur l'activation des canaux IKCa [289,290], la mutation de CaM [289] ou la délétion de la région C-terminale du canal [290] abolit le courant. En plus d'être essentielle à leur activation, il a été démontré que l'interaction de la CaM avec IKCa est requise pour l'assemblage et l'adressage membranaire des canaux [291]. Contrairement aux canaux SKCa, certaines études ont montré que le métabolisme intracellulaire module l'activité des canaux IKCa [292–294]. De plus, il a été observé que la phosphatase MTMR6 (*myotubularin-related protein 6*), spécifique du phosphatidylinositol 3-phosphate phosphoinositide (PI(3)P), exerce une puissante action inhibitrice sur le canal [295]. Des études subséquentes ont montré que le PI(3)P active le canal IKCa via le recrutement de la protéine kinase NDPK-B (*nucleoside diphosphate kinase B*). La phosphorylation par NDPK-B des résidus His358 localisés à l'extrémité C-terminale du canal potentialise sa probabilité d'ouverture [296]. Dans plusieurs cas, l'acide aminé histidine sert de ligand pour le zinc et le cuivre [297]. Des observations récentes suggèrent que la liaison du cuivre aux résidus histidine pourrait s'opposer au changement de conformation des segments transmembranaires médié par la formation du complexe Ca^{2+} -CaM. Srivastava *et al.* ont observé que la phosphorylation des résidus histidine par NDPK-B prévient la liaison du cuivre et conséquemment l'inhibition du canal [298]. Alors que d'autres canaux sont également inhibés

par le cuivre (BKCa, Shaker et TASK-3) [299,300], le mécanisme impliqué est distinct de celui observé pour le canal IKCa. Contrairement au modèle proposé pour les canaux IKCa, leur inhibition est médiée par le cuivre extracellulaire et rien n'indique que l'effet soit dépendant de la phosphorylation de l'histidine. Parmi l'ensemble des canaux K^+ , ce mode de régulation semble être unique aux canaux IKCa. Des études biophysiques sont en cours pour confirmer la liaison directe du cuivre aux résidus histidine et valider le modèle structural.

Les canaux BKCa (KCa1.1) ont été les premiers de cette famille à avoir été identifiés et se caractérisent entre autres par une forte conductance unitaire (100-220 pS) [278], 10 à 20 fois plus importante que la plupart des canaux K^+ . En plus de leur sensibilité aux ions Ca^{2+} , ils sont également fortement dépendants du potentiel membranaire en conditions physiologiques [301]. Leur activation est principalement déclenchée par les variations de potentiel alors que le Ca^{2+}_i sert d'amplificateur [302]. Sous le seuil de sensibilité au Ca^{2+} (< 300 nM), l'activité du canal est purement dépendante du potentiel membranaire. La sous-unité α est composée de 7 domaines transmembranaires (S0-S6) reliés entre eux par des boucles intra- et extracellulaires. Les domaines S1-S6 sont semblables à ceux des canaux Kv, notamment le segment S4 qui est le senseur de potentiel (Figure 8, page 46) [303]. La présence d'un segment transmembranaire supplémentaire (S0) positionne la partie N-terminale des canaux BKCa du côté extracellulaire. Contrairement aux canaux SKCa et IKCa, les canaux BKCa lient directement le Ca^{2+} [304]. La région C-terminale de ces canaux constitue près de 70% de la sous-unité α et se compose de deux sites de liaison au Ca^{2+} de haute affinité, nommés " Ca^{2+} bowl" et d'un domaine RCK (*regulator of K^+ conductance*) [304–306]. Bien que les homotétramères des canaux BKCa soient fonctionnels, la majorité de ces canaux sont associés à des sous-unités β régulatrices. Il existe quatre types de sous-

unités β (β 1-4) et γ (γ 1-4), chacune affichant un profil d'expression tissulaire et un mode de régulation distinct [307]. Les sous-unités β possèdent 2 domaines transmembranaires relié entre eux par une longue boucle extracellulaire et interagissent avec le segment S0 et la région N-terminal de la sous-unité α [308,309]. L'association de sous-unités régulatrices aux canaux BKCa modifie leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques, leur degré de sensibilité au calcium ainsi que leur adressage à la membrane plasmique [226,272]. L'activité des canaux BKCa peut également être modulée par diverses protéines kinases et phosphatases [310].

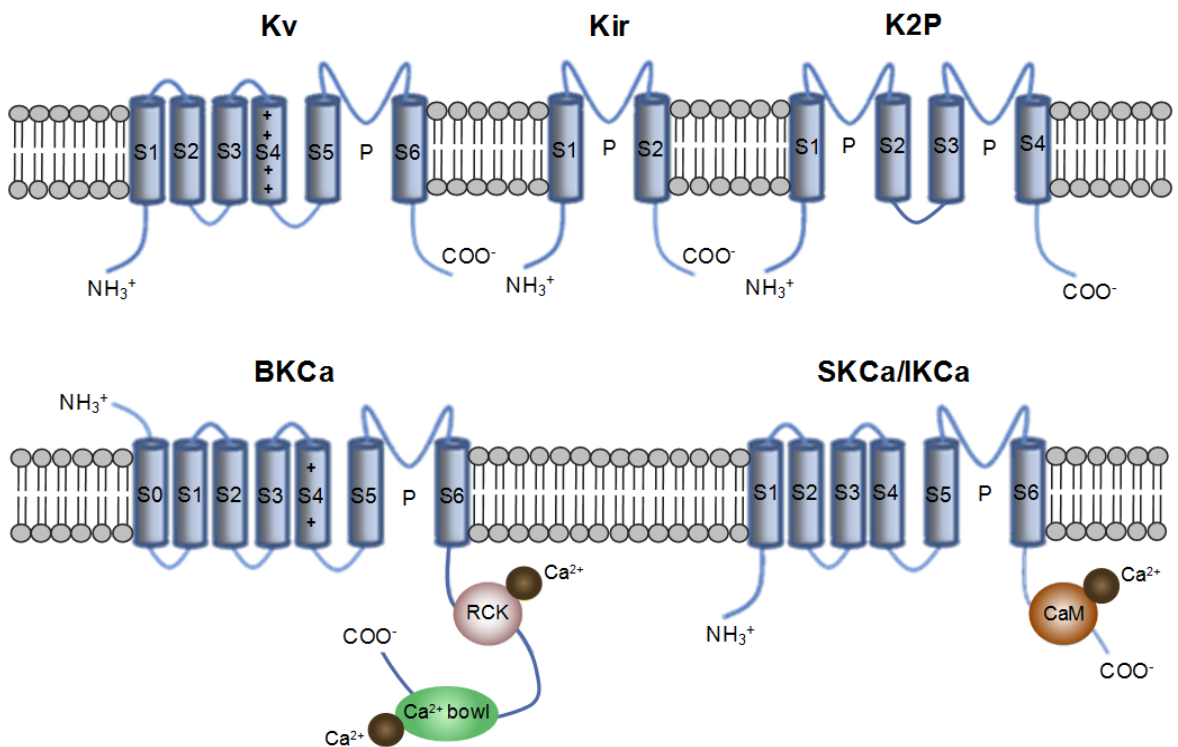


Figure 8. Familles de canaux potassiques.

Schéma de la topologie des sous-unités α des canaux K⁺ montrant l'emplacement des domaines transmembranaires. Les symboles «+» indiquent la présence de résidus chargés localisés au niveau de la région sensible au potentiel (S4) des canaux Kv et BKCa. P, domaine pore; RCK, *regulator of K⁺ conductance*; CaM, calmoduline.

1.3.3 Canaux K^+ au sein des progéniteurs cardiaques

Mis à part l'implication des canaux K^+ dans le déroulement du potentiel d'action des cellules excitables, ces canaux participent à la régulation de processus physiologiques fondamentaux de plusieurs types cellulaires dont les cellules souches et progéniteurs [311,312]. Tel que mentionné précédemment, plusieurs évidences ont établi le rôle des canaux K^+ dans la prolifération et la différenciation cellulaire par le biais de la modulation du V_{mem} . Même si les caractéristiques électrophysiologiques des progéniteurs cardiaques indifférenciés demeurent peu connues, il a été démontré que les cellules progénitrices cardiaques c-Kit⁺ (eCPCs c-Kit⁺) de différentes espèces expriment plusieurs familles de canaux K^+ fonctionnels.

Han *et al.* ont été les tout premiers à investiguer les propriétés ioniques de progéniteurs cardiaques [313]. Ils ont notamment observé la présence de courants ioniques possédant les caractéristiques biophysiques et pharmacologiques des K_v et K_{ir} dans les eCSCs c-Kit⁺ obtenues de tissus murins. Toutefois, ces courants présentent un profil d'expression hétérogène et sont présents dans une faible proportion des cellules. En effet, le courant de type K_v a été identifié dans 29.4% des eCSCs c-Kit⁺ alors que le courant K_{ir} est présent seulement dans 12.8% des cellules. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par le fait que les cellules cultivées ne sont pas synchrones au même stade du cycle cellulaire, ou encore par la présence potentielle de sous-populations c-Kit⁺. Bien que l'identité exacte des canaux responsables de la génération de ces courants demeure inconnue, l'expression des sous-unités $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.6$, $K_{ir1.1}$, $K_{ir2.1}$ et $K_{ir2.2}$ a été détectée. Contrairement à ce qui a été rapporté dans d'autres types cellulaires, le courant K_v ne s'avère pas être déterminant pour le maintien de la fonction proliférative des eCSCs c-Kit⁺.

Récemment, Zhang *et al.* ont rapporté la présence de courants BKCa, Kir et Kv dans les eCPCs c-Kit⁺ dérivées de spécimens auriculaires humains [314]. Tout comme les cellules de souris, les c-Kit⁺ eCPCs humaines présentent un profil ionique hétérogène. Les courants BKCa et Kir ont été enregistrés dans une grande proportion des cellules soit 85.8% et 81.4% alors que le courant Kv y est présent dans 46.8%. La quantification de différentes sous-unités a révélé une expression abondante de KCa1.1, Kir2.1, Kv4.2, Kv4.3 dans les eCPCs c-Kit⁺. D'un point de vue fonctionnel, il a été trouvé que l'inhibition de BKCa diminue la prolifération et la migration des eCPCs c-Kit⁺ in vitro. L'inhibition du courant Kir a quant à elle augmenté la motilité des cellules sans affecter la prolifération [315].

1.4 Calcium intracellulaire: un messager versatile

Le rôle versatile du Ca²⁺ dans la régulation des fonctions cellulaires est depuis longtemps reconnu. Cet ion est en effet un second messenger universel et un facteur clé dans la signalisation intracellulaire. Puisque la fonction des protéines est essentiellement déterminée par leur structure tridimensionnelle, la liaison du Ca²⁺ à différents effecteurs permet de générer des réponses cellulaires hautement diversifiées. Il est généralement reconnu que le cytoplasme cellulaire est un compartiment critique pour la transduction des signaux calciques puisque la plupart des protéines effectrices y résident. La concentration de Ca²⁺ cytosolique est ~100 nM au repos, mais peut augmenter drastiquement en réponse à divers stimuli [316]. Outre le milieu extracellulaire, les cellules puisent le Ca²⁺ dans différentes sources. Parmi les organelles intracellulaires, le réticulum endoplasmique (RE) en constitue la principale réserve. La concentration de Ca²⁺ au sein du RE et du milieu extracellulaire est environ 10 000 fois supérieure par rapport aux niveaux contenus dans le cytoplasme des cellules, ce qui

contribue à la rapidité de la signalisation calcique [317]. Le Ca^{2+} est la plus petite molécule qui soit aussi bien compartimenté au niveau cellulaire. Sa répartition au sein d'un même compartiment est bien souvent hétérogène en raison de la présence de protéines tampons. Ces protéines de liaison du Ca^{2+} (CBP, *calcium-binding protéins*) participent au déploiement de la signalisation et régulent précisément la nature ainsi que les caractéristiques spatio-temporelles des signaux calciques. En plus de leur présence dans le cytosol (calmoduline, calcineurine, calbindine D-28, calretinine et parvalbumine) [318], on retrouve les CBP emmagasinée en grande quantité dans diverses organelles intracellulaires telle que le RE (calséquestrine, calréticuline et calnexine) [319].

1.4.1 Homéostasie du Ca^{2+}_i au sein des cellules non-excitables

Le Ca^{2+} est la plus petite molécule qui soit aussi bien compartimentée au niveau cellulaire. L'homéostasie calcique cellulaire fait référence au maintien de l'équilibre entre les mécanismes responsables des flux calciques membranaires responsables de la compartimentalisation du Ca^{2+}_i . Cette balance est maintenue par différentes protéines membranaires et réticulaires impliquées dans la mobilisation et l'évacuation des ions calciques hors du cytosol. Le Ca^{2+}_i possède un rôle fondamental dans la transmission de l'information suite à la stimulation des récepteurs à la membrane plasmique. Plusieurs types de canaux Ca^{2+} ont été identifiés au niveau de la membrane plasmique des cellules non-excitables dont les VOC (*voltage-operated channels*), les ROC (*receptor-operated channels*), les SOC (*store-operated channels*) et les SMOC (*second messenger-operated channels*) [316,320]. L'élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) dans les cellules non-excitables est généralement initiée par la stimulation de récepteurs tyrosine kinases (RTKs) ou couplés aux protéines G (RCPG) menant à l'activation de la voie de la

phospholipase C (PLC) (Figure 9, page 51) [321]. Une fois activée, la PLC hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂) en inositol-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG) qui agissent à leur tour en tant que seconds messagers. En raison de son hydrophobicité, le DAG demeure ancré dans la membrane plasmique et active certains canaux Ca²⁺ [322], alors que l'IP₃ diffuse dans le cytosol pour se lier à son récepteur-canal (IP₃R) localisé au niveau du RE. L'activation des IP₃Rs provoque l'efflux de Ca²⁺ du RE, augmentant ainsi sa concentration intracellulaire [323]. La déplétion des réserves calciques réticulaires provoque une entrée capacitive de Ca²⁺ via les canaux CRACs (*calcium-release activated-channels*). L'activation de certains canaux cationiques de type TRP (*transient receptor potential*) par le DAG contribuent aussi à l'augmentation du Ca²⁺ cytosolique. Chez les mammifères, la famille des canaux TRP compte 28 membres regroupés en 6 sous-familles selon leur homologie structurale (TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML et TRPA) dont la plupart sont perméables au Ca²⁺ [324,325]. Bien que l'élévation du Ca²⁺ cytosolique soit un élément indispensable pour plusieurs processus biologiques, le maintien d'une surcharge calcique est néfaste et peut enclencher des voies de signalisation pro-apoptotiques et compromettre la survie de la cellule [326–328]. Le Ca²⁺ intracellulaire doit donc être évacué contre son gradient électrochimique par l'intermédiaire de l'échangeur NCX (*sodium-calcium exchanger*) et de pompes telles que la PMCA (calcium ATPase de la membrane plasmique) et SERCA (sarco/endoplasmique reticulum calcium-ATPase). L'échangeur NCX et la PMCA expulsent le Ca²⁺ cytosolique dans le milieu extracellulaire tandis que la SERCA permet sa recapture au sein du RE. Alors que les mécanismes responsables de l'augmentation rapide du Ca²⁺ cytosolique sont relativement bien compris, ceux impliqués dans le

renflement des réserves de Ca^{2+}_i suite à la vidange du RE sont pour leur part longtemps demeurés une énigme.

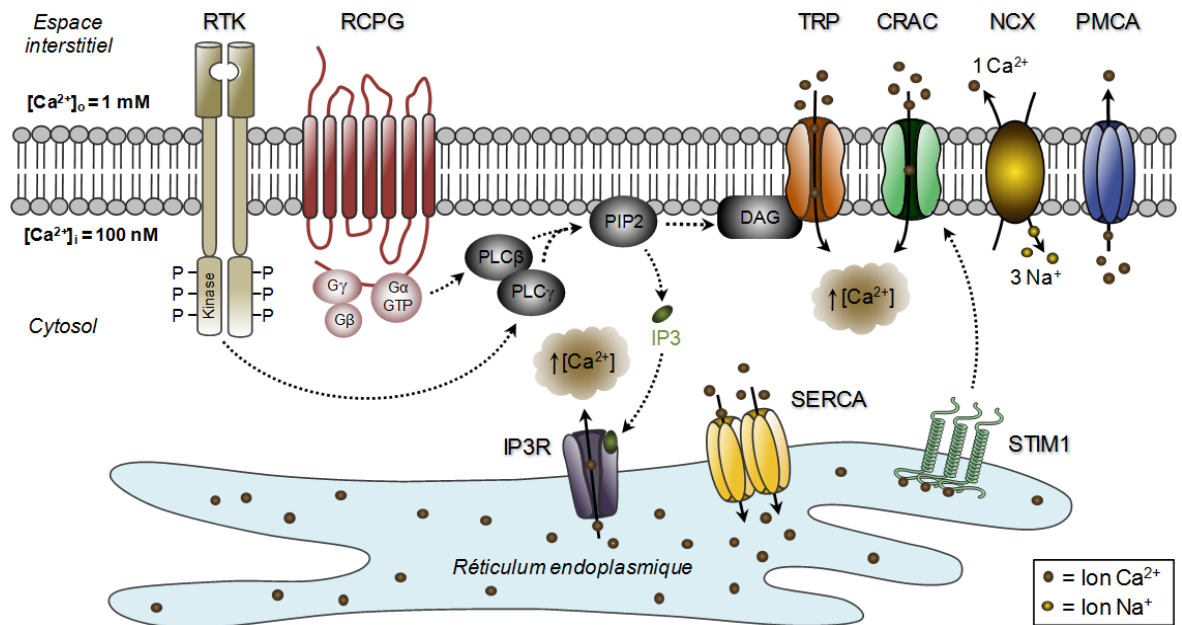


Figure 9. Principaux acteurs de l'homéostasie calcique des cellules non-excitables.

Suite à la stimulation de récepteurs tyrosine kinase (RTK) ou couplés aux protéines G (RCPG), l'IP3 généré lors de l'hydrolyse du PIP2 par les PLCs entraîne le relargage du Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique vers le cytosol via les récepteurs-canaux IP3R. La déplétion des réserves calciques réticulaires provoque une entrée capacitive de Ca^{2+} par les canaux CRACs (*calcium-release activated calcium channels*). L'activation de certains canaux cationiques de type TRP (*transient receptor potential*) par le DAG contribue aussi à l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire. Le Ca^{2+} cytosolique est ensuite transporté activement dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans le milieu extracellulaire par les transporteurs SERCA et PMCA respectivement. L'échangeur NCX expulse un ion Ca^{2+} hors du cytosol pour trois ions Na^+ transportés dans le cytosol (ratio 1:3). NCX, échangeur sodium-calcium; PMCA, calcium-ATPase de la membrane plasmique; SERCA, sarco/endoplasmique reticulum calcium-ATPase; PLC, phospholipase C; PIP2, phosphatidylinositol-4,5-diphosphate; IP3, inositol-triphosphate; DAG, diacylglycérol; IP3R, récepteur à l'IP3; STIM1, *stromal-interaction molecules 1*.

1.4.2 Machinerie cellulaire de l'entrée capacitive du Ca^{2+}

Il est maintenant établi que l'entrée capacitive de Ca^{2+} (SOCE, *store-operated calcium entry*; SOCE) opérée par les canaux calciques indépendants du potentiel de type CRAC représente la principale voie d'influx du Ca^{2+} dans les cellules non-excitables [329]. Puisque ces canaux sont insensibles au voltage, la magnitude de l'influx calcique dépend essentiellement du gradient électrique établi par le potentiel membranaire. Le SOCE est un processus essentiel permettant non seulement de réguler les voies de signalisation intracellulaire dépendantes du Ca^{2+} , mais aussi de maintenir les réserves de Ca^{2+} . Il a été démontré que le pore des canaux CRAC est formé par un assemblage tétramérique des protéines Orai [330]. Chez les mammifères, cette famille de canaux comporte 3 membres soit Orai1, Orai2 et Orai3 [331]. Chaque sous-unité Orai possède 4 segments transmembranaires reliés par des boucles extra- et intracellulaires ainsi que des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. Lors d'une diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans le RE, les protéines STIM (*stromal-interaction molecules*) s'associent avec les domaines N- et C-terminaux des sous-unités Orai conduisant à l'ouverture du canal [332]. Les protéines STIM possèdent un seul segment transmembranaire (TM1) imbriqué dans la membrane du RE et se caractérisent par leur sensibilité au Ca^{2+} [333]. Les 2 isoformes de STIM (STIM1 et STIM2) ayant été identifiées diffèrent essentiellement par leur affinité au Ca^{2+} [334]. L'extrémité N-terminale des protéines STIM est intraréticulaire et contient un domaine de liaison au Ca^{2+} EF-hand et un domaine SAM (*sterile α -motif*) [335]. Suite à l'activation des IP₃R, la diminution de la charge calcique dans le RE provoque la libération du Ca^{2+} lié au domaine EF-hand. La dissociation des ions Ca^{2+} entraîne un changement conformationnel, l'oligomérisation des protéines STIM et la formation de "puncta" [336]. Ces structures, constituées de tétramères de STIM, transloquent

à proximité de membrane plasmique pour s'associer aux sous-unités Orai et former des complexes SOCs (Figure 10, page 53) [337]. Plusieurs études ont démontré que les protéines STIM1 et Orai1 doivent interagir pour initier un SOCE.

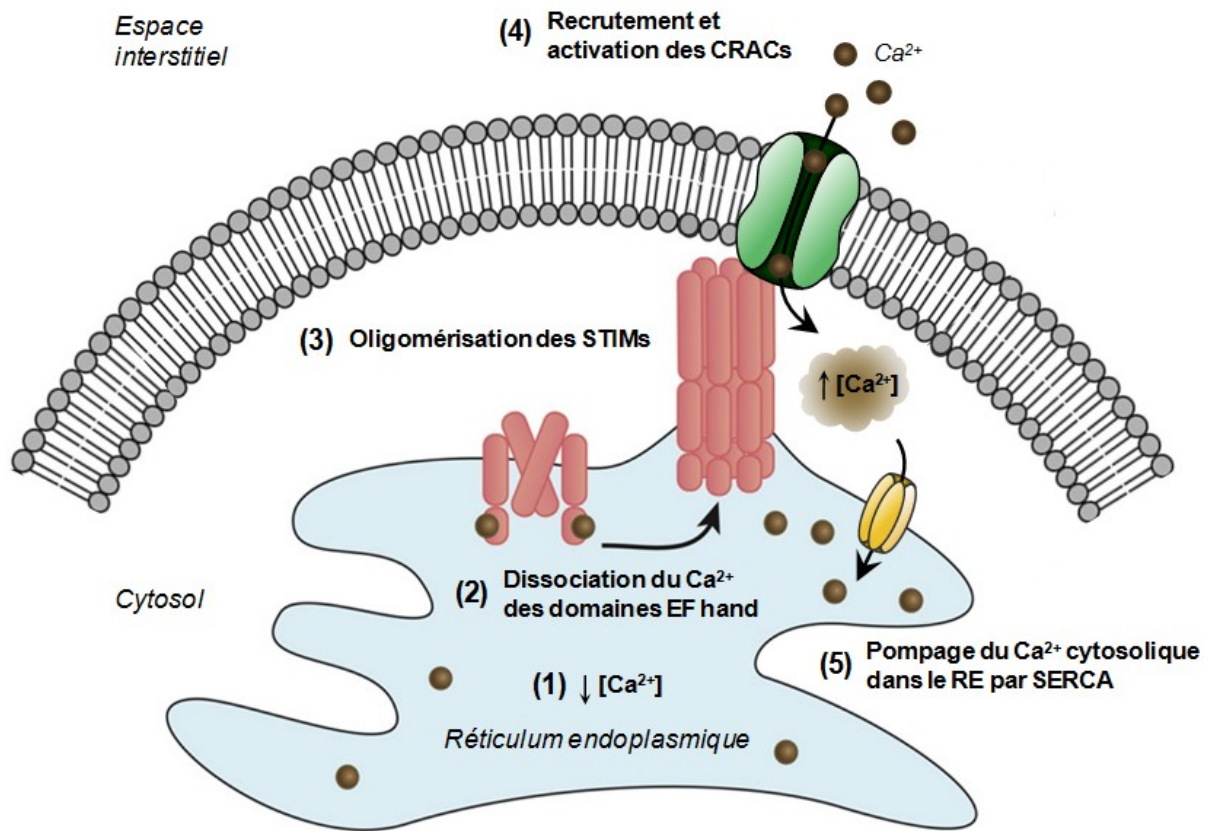


Figure 10. Mécanisme de l'entrée capacitive du Ca^{2+} .

(1-2) La diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intraréticulaire entraîne un changement de conformation et l'oligomérisation des protéines STIMs. (3-4) Les tétramères de STIMs transloquent à proximité de la membrane plasmique et activent les CRACs. (5) La pompe SERCA permet ensuite le pompage du Ca^{2+} à partir des microdomaines générés par les CRAC vers la lumière du RE. L'élévation de la concentration Ca^{2+} engendre la dissociation des oligomères STIMs et met fin au SOCE. STIM, *stromal interaction molecule*; CRAC, *calcium-release activated calcium channel*; SERCA, *sarco/endoplasmique reticulum calcium-ATPase*; SOCE, *store-operated calcium entry*. Adaptée de: Yeung *et al.*, 2017 [338].

Alors que l'extrémité C-terminale de Orail est nécessaire pour la formation du complexe, l'interaction entre STIM1 et le domaine N-terminal de Orail est responsable de l'activation du canal [339,340]. L'élévation de la concentration locale de Ca^{2+} est requise pour dissocier les oligomères STIM1 et mettre fin au SOCE [341]. La destination finale du Ca^{2+} n'est pas le cytosol, mais plutôt le RE qui doit être rechargé pour être prêt à répondre aux stimuli subséquents. La pompe SERCA est donc fonctionnellement couplée à la machinerie du SOCE et permet le pompage rapide du Ca^{2+} à partir des microdomaines générés par les CRAC vers la lumière du RE [342–344].

La cristallographie des CRAC a permis de clarifier le mécanisme menant à l'activation de ces canaux. Ces expériences ont montré que l'interaction de STIM1 avec le domaine ETON (*extended TMI Orail N-terminal*) des Orail permet l'ouverture du pore des CRAC et le passage subséquent des ions Ca^{2+} vers le cytosol [345]. Le domaine ETON possède 3 acides aminés chargés positivement qui repoussent les ions Ca^{2+} en absence de STIM1. L'interaction de STIM1 avec le domaine ETON provoque l'étirement de la structure de Orail ce qui repositionne les charges et permet un environnement propice au flux calcique. Il a été démontré que STIM1 peut aussi interagir avec le domaine C-terminal de certains membres de la famille des TRPC, notamment TRPC1 et TRPC4 [346]. Toutefois, leur contribution au SOCE est largement débattue. Il a récemment été démontré que le flux de Ca^{2+} généré par TRPC1 en réponse à la vidange réticulaire est dépendant des Orail [347]. En effet, le SOCE produit par Orail entraîne le recrutement de TRPC1 au niveau de la membrane plasmique et son activation subséquente par STIM1. Ainsi, les complexes STIM1-Orail et STIM1-TRPC1 forment 2 canaux distincts produisant différents signaux calciques. L'hypothèse initiale était que les canaux CRAC permettaient essentiellement de maintenir les

réserves de Ca^{2+} du RE. Il existe maintenant un nombre croissant d'évidences qui suggèrent que le Ca^{2+} qui pénètre dans le cytoplasme par les canaux CRAC serait lui-même responsable de la transduction du signal calcique [348,349]. L'efflux de Ca^{2+} du RE via les IP3Rs pourrait servir à amplifier la mobilisation intracellulaire de Ca^{2+} requise pour la transduction subséquente du signal.

1.4.3 Caractéristiques spatio-temporelles des signaux calciques

Afin d'assurer une signalisation polyvalente et spécifique, les cellules doivent contrôler précisément les propriétés spatio-temporelles des signaux calciques. Pour remplir cette tâche, les cellules doivent pouvoir continuellement restructurer les différentes composantes de la signalisation calcique [350]. Selon les propriétés des signaux produits, le Ca^{2+} peut générer une grande diversité de réponses cellulaires. En effet, la cinétique de la signalisation calcique détermine la façon dont l'information est décodée et traitée [351]. La signature calcique d'une fonction cellulaire correspond aux caractéristiques du signal à l'origine de cette fonction et se définit essentiellement par trois paramètres fondamentaux soient la localisation, l'amplitude et la fréquence.

La localisation des signaux calciques peut être globale ou bien se limiter au niveau de micro-domaines. Les micro-domaines sont des régions du cytoplasme caractérisés par une $[\text{Ca}^{2+}]$ élevée, généralement localisés à l'embouchure des canaux Ca^{2+} [352]. Selon la distribution spatiale du Ca^{2+} , la nature des processus cellulaires engendrés est très variable. Les influx calciques localisés sont à la base de processus cellulaires telles que la prolifération [353] et la migration [354,355] alors que les vagues calciques sont plutôt impliquées dans la communication entre les cellules [356]. Mis à part la localisation, la spécificité du signal peut aussi varier en fonction de la fréquence et de la durée du flux calcique. Tel que mentionné

précédemment, des augmentations soutenue de $[Ca^{2+}]_i$ peuvent être dommageables de sorte que les cellules utilisent préférentiellement des signaux calciques de faible amplitude ou des signaux calciques transitoires (oscillations calciques). Bien que la question ait été étudiée de manière exhaustive depuis un bon nombre d'années, il existe encore plusieurs incertitudes concernant les processus impliqués dans la génération des oscillations calciques. Néanmoins, certains facteurs de croissance, hormones et composés pharmacologiques sont connus pour induire des oscillations Ca^{2+} dont les fréquences sont déterminées par le type d'agent et sa concentration [357–360].

Il a été démontré que la dynamique (durée, fréquence et amplitude) des oscillations calciques permet d'optimiser la transcription génique en modulant la translocation de certains facteurs de transcription, tels que NF κ B et NFAT [360–364]. L'activation et l'inactivation de la voie de signalisation de NFAT dépendent de l'activité de protéines phosphatases et kinases dont les effets sont produits rapidement, impliquant que l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ doit être soutenue pour permettre une activation prolongée de ce facteur de transcription et la modulation subséquente de l'expression génique [365]. La cinétique d'inactivation de NF κ B est beaucoup plus lente car elle nécessite la formation d'un complexe protéique [365]. Conséquemment, NF κ B demeure activé plus longtemps que NFAT lorsque la mobilisation calcique est terminée. L'amplitude du signal, correspondant à la sommation des événements calciques survenant à un moment précis, contribue aussi à diversifier la signalisation [365]. Les protéines effectrices du Ca^{2+} possèdent un seuil d'activation qui dépend essentiellement de leur affinité pour cet ion. Cette propriété permet à la cellule d'activer spécifiquement certaines voies de signalisation en fonction de la $[Ca^{2+}]_i$ atteinte. Pour initier une cascade, la $[Ca^{2+}]_i$ nécessaire doit donc être supérieure au seuil d'activation des protéines responsables de

la transduction du signal. Il est généralement admis que l'amplitude du signal détermine la nature des voies de signalisation induites, alors que sa fréquence code l'information nécessaire pour assurer une transduction spécifique du signal.

1.4.4 Signalisation calcique au sein des progéniteurs cardiaques

Le Ca^{2+} est directement ou indirectement lié à presque toutes les propriétés des cardiomyocytes, y compris le couplage excitation-contraction et la transcription génique. Considérant que les eCPCs ne contribuent pas de façon significative à la formation de cardiomyocytes *in vivo* [81,83,366], une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la signalisation Ca^{2+} de ces cellules semble cruciale afin de les utiliser à leur plein potentiel dans un contexte de thérapie cellulaire. Ce n'est qu'au cours des dernières années que le rôle du Ca^{2+} intracellulaire dans la fonction des progéniteurs cardiaques a été étudié [367–370]. Cet axe de recherche a suscité un vif intérêt puisque plusieurs données suggèrent que la signalisation calcique est liée à la prolifération et à la différenciation de cellules souches et progéniteurs de différentes origines.

Ferreira-Martins *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence les voies de signalisation calciques dans les eCPCs c-Kit⁺ humaines [370]. Ils ont premièrement noté la présence d'oscillations calciques spontanées se produisant indépendamment du couplage avec les cardiomyocytes environnants ou de la présence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire. Le même groupe a observé que les oscillations calciques dans les eCPCs sont régulées par la libération de Ca^{2+} du RE via l'activation des IP3Rs et sa réabsorption par la pompe SERCA. Alors que les IP3Rs et SERCA sont fortement exprimés dans les eCPCs, les récepteurs à la ryanodine (RyR) n'ont pas été détectés. Ils ont aussi démontré que l'échangeur NCX, certains SOC et la pompe PMCA sont présents et fonctionnels sans toutefois avoir un impact direct

sur les oscillations calciques des eCPCs. Les récepteurs purinergiques (P2Y2), histaminiques (H1) et ceux de l'IGF1 (insulin-like growth factor 1) sont fortement exprimés et régulent quant à eux la magnitude de la signalisation calcique des eCPCs. En effet, la liaison d'ATP, d'histamine ou d'IGF1 à leur récepteur respectif augmente la susceptibilité et la fréquence des oscillations. La présence d'oscillations de Ca^{2+} dans les eCPCs est couplée avec la progression du cycle cellulaire, la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire. Ce même groupe a aussi démontré que l'induction d'oscillations calciques dans les eCPCs in vitro avant leur transplantation promeut la rétention et la prolifération des eCPCs au sein du myocarde, favorisant une régénération cardiaque accrue.

Bien que les SOC ne soient pas impliqués dans l'initiation des oscillations observées dans les eCPCs, ils permettent de recharger le contenu en Ca^{2+} du RE suite à la vidange réticulaire. L'utilisation d'ARN interférents (ARNi) dirigés contre Orai1, TRPC1 et STIM1 a permis de démontrer l'importance de ces sous-unités dans le processus du SOCE des eCPCs [367]. Des expériences d'immunoprécipitation ont ensuite confirmé l'interaction entre les différentes protéines et donc leur participation dans la formation des complexes SOC. L'inhibition du SOCE dans les eCPCs atténue la prolifération et la migration cellulaire. Au niveau moléculaire, la diminution l'expression de la cycline D1 et E ainsi que la phosphorylation de la kinase AKT pourrait expliquer les effets délétères observés suite à la réduction de l'influx calcique via les SOC.

Certains canaux de la sous-famille des TRPV, notamment TRPV2 et TRPV4, contribuent aussi à la diversité de la signalisation calcique des eCPCs par des mécanismes similaires à ceux décrits pour les canaux de type SOC [369]. Le canal TRPV2 régule la prolifération et la migration alors que TRPV4 est seulement impliqué dans le processus

migratoire. L'utilisation d'ARNi contre TRPV2 réduit l'expression des cyclines D1 et E2 ainsi que la phosphorylation des kinases ERK1/2 et AKT, alors que la répression génique du canal TRPV4 atténue uniquement la phosphorylation d'AKT sans affecter les protéines régulatrices du cycle cellulaire.

Alors que l'importance du Ca^{2+} intracellulaire pour la fonction des cellules souches est bien établie, les voies de signalisations calciques impliquées dans la régulation de la fonction des progéniteurs cardiaques endogènes demeurent peu connues. La protéine CaMKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II) est une enzyme ubiquitaire dont la structure et sa capacité d'autophosphorylation lui permettent de décoder les différents signaux calciques intracellulaires [371]. Les nombreux substrats de CaMKII font de cette kinase un acteur clé dans la régulation de l'homéostasie calcique, des canaux ioniques, de la transcription génique, de la translocation protéique, du métabolisme, de la prolifération, de la différenciation et de la tolérance au stress [372]. L'isoforme δB de la CaMKII (CaMKII δB) est la variante d'épissage prédominante au niveau nucléaire dans le cœur adulte et régule notamment l'expression de gènes hypertrophiques [373]. Quijada *et al.* ont observé que la distribution cellulaire de cette kinase dans les eCPCs est principalement cytosolique pendant la croissance et le développement post-natal, mais se retrouve majoritairement localisée au niveau nucléaire à la suite d'un stress pathologique [368]. Au stade précoce de la différenciation des progéniteurs *in vitro*, ils ont démontré que la distribution nucléaire de CaMKII δB augmente et favorise leur engagement cardiogénique. La différenciation des progéniteurs cardiaques médiée par CaMKII δB est corroborée par une série de caractéristiques morphologiques et moléculaires, y compris des augmentations de la taille cellulaire, une diminution de la prolifération et une augmentation de marqueurs exprimés par

les cellules matures de lignée cardiaque (cTNT et α -SMA). Mis à part son rôle dans la différenciation, CaMKII δ B contribue à la résistance au stress oxydatif des progéniteurs cardiaques. En effet, la répression génique de CaMKII δ B in vitro augmente la mortalité en présence de stress oxydant ainsi que l'expression de gènes associés à la sénescence cellulaire [368].

1.5 Objectifs et hypothèse de la présente étude

La thérapie cellulaire est une approche prometteuse pour atténuer voire empêcher la progression de l'insuffisance cardiaque. Bien que des populations cellulaires de diverses origines aient été proposées pour la thérapie cellulaire, la présomption que les cellules souches provenant du tissu cible possèdent des propriétés thérapeutiques optimales a conduit à l'isolement de différentes populations de cellules souches et progéniteurs cardiaques. Toutefois, les bénéfices cliniques notés lors des premiers essais sont modestes et variables. En vue d'exploiter le plein potentiel thérapeutique des cellules souches et progéniteurs cardiaques, il est primordial de développer nos connaissances sur les mécanismes régulant leurs fonctions. Les canaux ioniques sont des protéines membranaires ubiquitaires impliqués dans les processus fondamentaux des quelques cent mille milliards de cellules qui composent le corps humain. On sait depuis longtemps qu'en plus des molécules chimiques échangées par les cellules au cours de la croissance et du développement, les signaux bioélectriques représentent un système riche et intéressant pour manipuler les voies de signalisation intracellulaires et contrôler le comportement cellulaire. D'après les études existantes, il est clair que les flux ioniques contribuent à beaucoup plus que l'excitabilité des cellules. Tel que discuté précédemment, les échanges ioniques sont impliqués dans la progression du cycle

cellulaire, la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires. Une variété de canaux ioniques fonctionnels a été identifiée in vitro dans les eCSCs/eCPCs c-Kit⁺, mais leur fonction demeure peu connue. Toutefois, puisque les caractéristiques transcriptionnelles des eCPCs sont affectées par la culture in vitro [374], les propriétés électrophysiologiques rapportées précédemment pourrait différer de leur profil ionique in situ. L'objectif primaire de cette thèse était donc de définir le profil électrophysiologique des eCPCs c-Kit⁺ immédiatement après leur purification afin de préciser leur phénotype ionique. Considérant l'importance du Ca²⁺_i dans la régulation des fonctions biologiques et l'implication des canaux KCa dans la régulation de la signalisation calcique, une attention particulière a été accordée à cette famille de transporteurs ioniques. Mises à part les eCPCs c-Kit⁺, le profil électrophysiologique des EDCs et BM-MSCs a aussi été investigué afin de déterminer si les mécanismes de régulation ionique sont conservés au sein de différentes populations de cellules souches multipotentes.

**CHAPITRE 2 – Calcium-Dependent Potassium Channels
Control Proliferation of Cardiac Progenitor Cells and
Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells**

Mise en contexte

Les canaux ioniques membranaires sont impliqués dans les processus fondamentaux des quelques cent mille milliards de cellules qui composent le corps humain, dont les cellules souches. Une variété de canaux ioniques fonctionnels a été identifiée in vitro dans les cellules progénitrices cardiaques endogènes (eCPCs) c-Kit⁺, mais leurs fonctions demeurent peu étudiées. Puisque les conditions artificielles de culture altèrent le phénotype cellulaire, le profil ionique des eCPCs rapporté précédemment pourrait différer de leurs propriétés électrophysiologiques in situ. Pour pallier cette limitation, nous avons caractérisé les canaux ioniques fonctionnels immédiatement après sélection antigénique.

Vigneault, P. Naud, X. Qi, J. Xiao, L. Villeneuve, D. R. Davis, S. Nattel, Calcium-dependent potassium channels control proliferation of cardiac progenitor cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells, J. Physiol. 2018.
doi:10.1113/JP275388.

Contributions des auteurs.

P.V. a conçu l'étude, effectué les expériences primaires et analysé les données; S.N. et D.R.D. ont participé à la formulation d'hypothèses de l'étude, supervisé les travaux, discuté des résultats et édité le document; P.N., J.X., L.V. ont aidé à réaliser des expériences primaires et l'analyse des données; X.Q. a aidé à réaliser certaines expériences et fourni un support technique. Tous les auteurs approuvent la version finale du manuscrit ainsi que tous les aspects du travail.

Calcium-Dependent Potassium Channels Control Proliferation of Cardiac Progenitor Cells and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

Patrick Vigneault, MSc; Patrice Naud, PhD; Xiaoyan Qi, PhD;
Jiening Xiao, PhD; Louis Villeneuve, MSc; Darryl R. Davis, MD;
Stanley Nattel, MD*

Short title: KCa3.1 Channels in Stem and Progenitor Cells

Table of Contents Category: Molecular and cellular

Keywords: Ion channels – Stem cells – Cardiac disease

From the Research Center and Department of Medicine, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada (P.V., P.N., X.Q., J.X., L.V., S.N.); University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, Ontario, Canada (D.R.D.), Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada (S.N.) and Institute of Pharmacology, West German Heart and Vascular Center, Faculty of Medicine, University Duisburg-Essen, Essen, Germany (S.N.).

*Correspondence to Stanley Nattel, Montreal Heart Institute Research Center, 5000 Belanger St E, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada. E-mail: stanley.nattel@icm-mhi.org; T: 514-376-3330 ext 3990; F: 514-593-2493.

© 2018 The Physiological Society

Key Points Summary

- *Ex vivo* proliferated c-Kit⁺ endogenous cardiac progenitor cells (eCPCs) obtained from mouse and human cardiac tissues have been reported to express a wide range of functional ion-channels.
- In contrast to previous reports in cultured c-Kit⁺ eCPCs, we found that ion currents were minimal in freshly isolated cells. However, inclusion of free Ca²⁺ intracellularly revealed a prominent inwardly-rectifying current identified as the intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ current (KCa3.1)
- Electrical function of both c-Kit⁺ eCPCs and bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) is critically governed by KCa3.1 calcium-dependent potassium channels.
- Ca²⁺-induced increases in KCa3.1 conductance are necessary to optimize membrane potential during Ca²⁺-entry. Membrane hyperpolarization due to KCa3.1 activation maintains the driving force for Ca²⁺-entry that activates stem cell proliferation.
- Cardiac disease downregulates KCa3.1 channels in resident cardiac progenitor cells. Alterations in KCa3.1 may have pathophysiological and therapeutic significance in regenerative medicine.

Abstract

Endogenous c-Kit⁺ cardiac progenitor cells (eCPCs) and bone marrow (BM)-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are being developed for cardiac regenerative therapy, but a better understanding of their physiology is needed. Here, we addressed the unknown functional role of ion-channels in freshly-isolated eCPCs and expanded BM-MSCs using patch-clamp, microfluorometry and confocal microscopy. Isolated c-Kit⁺ eCPCs were purified from dog hearts by immunomagnetic selection. Ion-currents were barely detectable in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs with intracellular calcium (Ca²⁺_i) buffered. Under conditions allowing free intracellular Ca²⁺, freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs and ex-vivo proliferated BM-MSCs showed prominent voltage-independent conductances that were sensitive to intermediate-conductance K⁺-channel (KCa3.1 current, $I_{KCa3.1}$) blockers and corresponding gene (*KCNN4*)-expression knockdown. Depletion of Ca²⁺_i induced membrane-potential (V_{mem}) depolarization, while store-operated Ca²⁺-entry (SOCE) hyperpolarized V_{mem} in both cell types. The hyperpolarizing SOCE-effect was substantially reduced by $I_{KCa3.1}$ or SOCE blockade (TRAM-34, 2-APB), and $I_{KCa3.1}$ -blockade (TRAM-34) or *KCNN4*-knockdown decreased the Ca²⁺ entry resulting from SOCE. $I_{KCa3.1}$ suppression reduced c-Kit⁺ eCPC and BM-MSC proliferation, while significantly altering cyclin expression profile. $I_{KCa3.1}$ was reduced in c-Kit⁺ eCPCs isolated from dogs with congestive heart failure (CHF), along with corresponding *KCNN4* mRNA. Under perforated-patch conditions to maintain physiological [Ca²⁺]_i, c-Kit⁺ eCPCs from CHF-dogs had less negative resting membrane potentials (-58 ± 7 mV) versus c-Kit⁺ eCPCs from control dogs (-73 ± 3 mV, $P < 0.05$), along with slower proliferation. Our study suggests that Ca²⁺-induced increases in $I_{KCa3.1}$ are necessary to optimize membrane-potential during the Ca²⁺ entry that activates progenitor-cell

proliferation, and that alterations in KCa3.1 may have pathophysiological and therapeutic significance in regenerative medicine.

Key Words: cardiac progenitor cells ▪ calcium ▪ heart failure

Introduction

Since the early 2000s, pools of endogenous cardiac progenitor cells (eCPCs) have been identified in hypoxic niches within adult hearts (Beltrami *et al.*, 2003; Castaldo *et al.*, 2008; Di Meglio *et al.*, 2010). Indeed, several distinct eCPC populations have been identified based on their intrinsic properties and markers (MDR-1, c-Kit, Sca-1, Islet-1, SSEA-1, W8B2, ALDH, Peg3/PW1) (Beltrami *et al.*, 2003; Chimenti *et al.*, 2012; Hierlihy *et al.*, 2002; Laugwitz *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2003; Sandstedt *et al.*, 2014; Yaniz-Galende *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015). c-Kit⁺ eCPCs represent the best-characterized eCPC population and have been identified in the hearts of a range of species including humans (Bearzi *et al.*, 2007; Sandstedt *et al.*, 2012; van Vliet *et al.*, 2008), dogs (Linke *et al.*, 2005), pigs (Ellison *et al.*, 2011), sheep (Hou *et al.*, 2012), cats (Angert *et al.*, 2011), rats (Beltrami *et al.*, 2003), mice and zebrafish (Ellison *et al.*, 2013; Verduci *et al.*, 2014).

Clonogenic, self-renewing, multipotent c-Kit-expressing cells can be harvested from adult hearts (Bearzi *et al.*, 2007; Beltrami *et al.*, 2003; Linke *et al.*, 2005). c-Kit⁺ eCPCs are reported to constitute approximately 0.01% of cardiomyocytes in the adult rat heart (Beltrami *et al.*, 2003) and have been shown to differentiate into all three cardiovascular lineages (endothelial cells, vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes) *in vitro* under specific conditions (Beltrami *et al.*, 2003; Linke *et al.*, 2005). While c-Kit⁺ eCPCs have been suggested to play a role in cardiac adaptation and regeneration following myocardial stress (Nadal-Ginard *et al.*, 2014), recent evidence suggests that they minimally contribute cardiomyocytes under basal conditions or after cardiac injury (Sultana *et al.*, 2015; van Berlo *et al.*, 2014). Although the exact biological function of c-Kit⁺ eCPCs remains controversial in the field of cardiac regeneration, c-Kit⁺ cell therapy or *in situ* mobilization of c-Kit⁺ eCPC

pools have been shown to improve heart function by promoting cardiac repair (Angert *et al.*, 2011; Dawn *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Linke *et al.*, 2005). The mechanisms of benefit of stem and progenitor cell transplantation remains poorly defined. Paracrine mechanisms have been proposed to explain the reparative and regenerative actions of transplanted cells, including exosome-mediated effects on preexisting myocardium (Khan *et al.*, 2015; Sahoo and Losordo, 2014) and cell-specific protein modifications (Wei *et al.*, 2015). Despite their potential value in regenerative therapy and the possible functional role of c-Kit⁺ eCPCs in health and diseases, their cellular physiology needs to be better understood.

In a variety of non-excitabile cell-types including stem and progenitor cells, ion-channels are involved in migration, proliferation and differentiation (Lang *et al.*, 2007; Lehen'kyi *et al.*, 2007; Pardo, 2004). Various K⁺-channels are implicated in regulating progenitor cell cycle progression, cellular growth and phenotypic transition (Pardo, 2004; Tao *et al.*, 2008). Expanded c-Kit⁺ eCPCs obtained from mouse and human cardiac tissues have been reported to express a wide range of functional ion-channels. Han *et al.* reported three ion-currents in expanded microbead-purified mouse cardiac c-Kit⁺ cells, including a delayed-rectifier current I_{KDR} (likely encoded by *Kv1.1*, *Kv1.2* or *Kv1.6*), an inwardly-rectifying current I_{Kir} (likely encoded by *Kir1.1*, *Kir2.1* or *Kir 2.2*) and a volume-dependent Cl⁻-current $I_{Cl.vol}$ (encoded by *Clcn3*), present in 29%, 13% and 44% of cells respectively (Han *et al.*, 2010). More recently, Zhang *et al.* reported the presence of the large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ current BKCa (86% of cells; encoded by *KCa1.1*), transient-outward current I_{to} (47%; encoded by *Kv4.2* or *Kv4.3*), I_{Kir} (84%; encoded by *Kir2.1*), and tetrodotoxin-sensitive Na⁺-current $I_{Na.TTX}$ (61%; likely encoded by *Nav1.3* or *Nav1.6*) in cultured c-Kit⁺ eCPCs isolated from human atrial appendages (Zhang *et al.*, 2014). BKCa-

inhibition decreased cell-cycling and mobility in human c-Kit⁺ eCPCs, whereas $I_{K_{ir}}$ blockade increased cell-mobility without affecting cycling. It has also been shown that functional TRPV2 and TRPV4 channels are abundantly expressed in human cardiac c-Kit⁺ cells (Che *et al.*, 2016). Both channels are involved in cell migration, whereas only TRPV2 participates in regulating cell cycle progression (Che *et al.*, 2016). Ferreira-Martins *et al.* demonstrated that c-Kit⁺ human cardiac progenitor-cell growth and regenerative potential depend upon intracellular Ca²⁺ oscillations mediated by inositol-trisphosphate receptors (Ferreira-Martins *et al.*, 2009). One major limitation of all of these studies was that ion-currents and corresponding gene-expression were determined in expanded c-Kit⁺ eCPCs, but not in freshly-isolated cells. Because cell-culture conditions can alter cellular phenotype (Dawson *et al.*, 2012), the electrophysiological profile of these cells might not reflect their ionic properties *in situ*.

Here, we characterize for the first time the ion-currents in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs and address their function. Our results suggest a prominent role for KCa3.1-channels in controlling eCPC membrane-potential and proliferative function. Furthermore, we extend our observations to bone marrow-derived (BM) mesenchymal stem cells (MSCs). Our findings indicate an important role of KCa3.1-channels in stem-cell biology, which may be susceptible to manipulation to enhance therapeutic benefits of cell therapy.

Methods

Ethical Approval

All animal handling, surgical and post-surgical procedures followed the Guidelines of the National Institutes of Health and were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute. Experiments were conducted on random source adult mongrel dogs of both genders (supplier name available upon request from the corresponding author) fed a standard diet ad libitum. Since this study focuses exclusively on cells derived from the left ventricle, the atria were removed and used for other projects to maximize the use of animals. A total of 26 dogs were used in the current study (15 males, 11 females). Studies in dogs form a vital part of biomedical research as they are amongst the animal models known to recapitulate best many of the features of the human heart, including clinical heart failure phenotypes of various etiologies (Camacho *et al.*, 2016). The investigators involved in this study understand the ethical principles under which the Journal of Physiology operates and their work complies with the principles and regulations described by Grundy (Grundy, 2015).

Primary Cell Isolation and Culture

Adult mongrel dogs (30 ± 4 kg) were anesthetized with morphine (2 mg/kg S.C.) and α -chloralose (120 mg/kg intravenously, followed by 30 mg/kg per hour) and ventilated mechanically. Prior to heart excision, animals were deeply anesthetised (all reflex activity and pain responses suppressed) with sodium pentobarbital (30 mg/kg I.V.) and euthanized by exsanguination. Hearts were then extracted via median thoracotomy and immediately immersed in cold oxygenated Tyrode solution. Left ventricles (LVs) were subjected to

enzymatic digestion for cell isolation. The LV anterior wall was arterially-perfused with Tyrode solution (see composition below) containing collagenase (120 U/mL, Worthington, type II). The dissociated cells were collected and dispersed by gentle trituration in cold Kraftbruehe solution. Cell-suspensions were centrifuged twice at 60 g for 2 minutes to pellet cardiomyocytes. The supernatant was collected and filtered through a 40- μ m cell -strainer and centrifuged at 600 g for 5 minutes to pellet the cell-fraction containing small mononucleated cells including c-Kit⁺ eCPCs. Pelleted cells were resuspended in Ca²⁺-Mg²⁺-free Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum and 1-mmol/L EDTA. c-Kit⁺ cells were then purified with mouse monoclonal anti-c-Kit antibodies (313202; Biolegend) and magnetic immunobeads (Dyna) as described previously by other groups (Beltrami *et al.*, 2003; French and Davis, 2014). Cell-suspensions were initially incubated with anti-c-Kit primary antibody for 20 minutes at 4°C. Cells were then rinsed with cooled DPBS and incubated with sheep anti-mouse secondary antibody conjugated with superparamagnetic beads for an additional 10 minutes at 4°C with gentle agitation. To remove unlabelled cells (c-Kit⁻), cell-suspensions were placed on a magnetic particle concentrator (MPC-1) and washed 3 times with complete culture medium consisting of a mixture of 65% IMDM/35% DMEM-F12 containing 10%-FBS, 100-U/ml penicillin, 100- μ g/ml streptomycin, 2-mmol/L L-glutamine, 0.2-mmol/L 2-mercaptoethanol, 10-ng/ml human basic fibroblast growth factor, 10-ng/ml human epidermal growth factor, 10-ng/ml human LIF.

The freshly-collected c-Kit⁺ cells were used for ion-channel studies, gene-expression assays and immunocytochemistry. c-Kit⁺ eCPCs were also expanded *in vitro* for proliferation assay. c-Kit⁺ eCPCs have been cultured as previously described with slight modifications

(Bolli *et al.*, 2011). Briefly, c-Kit⁺ eCPCs were seeded on fibronectin (FN)-coated (20- μ g/mL) 6-well plates in complete culture medium and cultured at 37°C in 5% CO₂. The medium was changed the next day to remove debris and cultures were continued until cells reached 70-80% confluency (14-21 days). To ensure the availability of a sufficient number of cells for subsequent experiments, c-Kit⁺ eCPCs were lifted and re-plated in 100 mm FN-coated culture dishes for an additional week to allow expansion. Cells used in this study were from passages 2 to 4 to limit potential phenotypic drift. OriCellTM dog BM-MSCs were purchased from Cyagen and cultured according to the manufacturer recommendations. Cells used in this study were from early passages (4 to 8) to limit the possible variations in functional ion channel induced by cell aging and senescence in later passages.

siRNA Transfection Procedure

Canine ventricular c-Kit⁺ eCPCs were transfected with 100-nmol/L siRNA (SMARTpool siGENOME *KCNN4*-siRNA; GE Dharmacon) or negative control construct with Lipofectamine RNAi MAX reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Cells were used for functional experiments or collected for total RNA or purification 48 hours after the transfection.

Congestive Heart Failure (CHF) Dog-Model

The animal model was prepared as previously described in detail (Shinagawa *et al.*, 2002). Adult mongrel dogs were anesthetized with diazepam (0.25 mg/kg IV)/ketamine (5.0 mg/kg IV)/halothane (1% to 2% PI). Pacemaker leads were inserted fluoroscopically into the right-ventricular apex and connected to a pacemaker (St. Jude Medical, St. Paul, MN) implanted

subcutaneously in the neck. All dogs received post-surgical antibiotic treatments for 5 consecutive days (enrofloxacin, 5 mg/kg orally per day) to reduce the chance of infection. Following twenty-four hours for recovery, ventricular-pacing was initiated at 240 beats min⁻¹. After 2 weeks of continuous pacing, CHF was confirmed by signs (lethargy, dyspnea, and edema) and *in vivo* hemodynamic findings before animals were killed as described above. Hearts were then excised and LVs subjected to enzymatic digestion. All the animals included in this study completed the protocol.

Immunostaining

Freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs and unsorted cardiac cells (non-myocyte fraction) were seeded on FN-coated (20- μ g/mL) 8-well chamber slides with complete growth medium, and incubated for 6 hours at 37°C in 5% CO₂ to allow attachment. Cells were washed three times with warm Hanks' balanced salt solution (HBSS) before fixation (4% PFA in HBSS for 10 minutes at room temperature). Cells were washed three times and then blocked for 30 minutes with normal donkey serum (10% in HBSS) at room temperature. c-Kit⁺ eCPCs and unsorted cardiac cells were incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-c-Kit antibody (1/100; Santa Cruz), followed by donkey anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 555 (1/500; Invitrogen) and DAPI (1/1000; Invitrogen) for 1 hour at room temperature. The next day, fluorescent images were obtained with an LSM-710 inverted confocal laser scanning microscope.

Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs were resuspended in lysis buffer, and RNA was isolated with Quick-RNATM MicroPrep (Zymo Research), including DNase treatment to prevent genomic

contamination. Messenger RNAs were reverse-transcribed with the High-Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). qPCR was performed with TaqMan probes or SyBr green primers from Applied Biosystems for housekeeping genes hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*), β 2-microglobulin (*β 2M*) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PD*). TaqMan probes were used for *KIT*, *CD90*, *KCNN1*, *KCNN2*, *KCNN3*, *KCNN4*, *KCNMA1*, *KCNA5*, *CCND1* and *CCNE2*. SyBr green primers were used to quantify all other genes (*DDR2*, *CD31*, *CD34*, *CD45*, *CD105*, *KCNA3*, *KCNA4*, *KCND3*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *KCNJ12*, *KCNJ3* and *KCNJ5*). PCR was performed with Taqman Gene Expression Master Mix or SYBR Select Master Mix accordingly (Applied Biosystems). The geometric mean expression of *HPRT*, *β 2M*, and *G6PD* was used for normalization. Reactions were run on a *StepOnePlus*[™] Real-Time PCR System. Relative gene expression values were calculated with the $2^{-\Delta Ct}$ method.

Ion-Current and V_{mem} Recording

All *in vitro* recordings were obtained at 37°C. Whole-cell perforated-patch and tight-seal techniques were used to record membrane potential (V_{mem} , current-clamp mode) and ion-currents (voltage-clamp mode). Borosilicate glass electrodes (tip resistances 10-15 M Ω when filled with pipette-solution) were connected to a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B; Axon Instruments). For perforated-patch, nystatin-free intracellular solution was placed in the tip of the pipette by capillary action (~5 s), and then pipettes were backfilled with nystatin-containing (400- μ g/mL) pipette solution. $I_{KCa3.1}$ was recorded as 1- μ mol/L TRAM-34-sensitive current. Tyrode solution contained (mmol/L) NaCl 136, CaCl₂ 1.8, KCl 5.4, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.33, dextrose 10, and HEPES 5 (pH 7.4, NaOH). For Ca²⁺-free Tyrode

solution experiments, CaCl_2 was omitted and 1 mM EGTA was added. The pipette solution used to define global ion-current profiles contained (mmol/L) GTP 0.1, K-aspartate 110, KCl 20, MgCl_2 1, MgATP 5, HEPES 10, sodium-phosphocreatine 5, and EGTA 5 (pH 7.4, KOH). For $I_{\text{KCa3.1}}$ recording, the pipette solution contained (mmol/L) KCl 130, NaCl 5, MgCl_2 1, K_2ATP 5, HEPES 10 and EGTA 5 (pH 7.2, KOH). The amount of CaCl_2 required to achieve 300-nmol/L free- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was determined with WebMaxC software. The pipette-solution for perforated-patch experiments contained (mmol/L) KCl 140, NaCl 5 and HEPES 10 (pH 7.2, KOH). Junction potentials between bath and pipette solutions averaged 10 mV and were corrected before recording, for both V_{mem} and ion-current measurements. Currents are expressed as densities (pA/pF) to control for cell size/capacitance differences.

To study the effect of store-operated Ca^{2+} entry on $I_{\text{KCa3.1}}$ and V_{mem} , Ca^{2+}_i was depleted passively by bathing cells in Ca^{2+} -free Tyrode solution for at least 10 minutes, and then cell-contents were dialyzed by tight-seal attachment with pipette solutions containing (mmol/L) KCl 140, NaCl 5, MgCl_2 1.2 and HEPES 10 (pH 7.2, KOH). After whole-cell configuration and cell-dialysis were established, extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ was restored and V_{mem} changes were recorded.

Ca^{2+} -Imaging

Freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs were seeded on fibronectin-coated chamber slides with c-Kit⁺ eCPC complete growth medium, and incubated ~4 hours to allow attachment whereas MSCs were seeded on chamber slides with their recommended growth medium and incubated overnight to allow cell spreading. Freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs and expanded MSCs were loaded with Fluo-4-acetoxymethyl ester (10- $\mu\text{mol/L}$; Invitrogen) in complete growth medium

in the presence of Pluronic F-127 (20% solution in dimethylsulfoxide, 2.5- $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 minutes at 37°C in a humidified incubator with 95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2 . Chamber slides were positioned on the stage of a confocal microscope; cells were incubated with Ca^{2+} -free Tyrode solution and maintained for 15 minutes at room temperature before experimental protocols to allow passive depletion of intracellular Ca^{2+} stores and deesterification of Fluo-4-acetoxymethyl ester. Fluo-4 was excited at 488 nm; emitted fluorescence was collected at 495 nm with a confocal microscope (Olympus IX81). To study store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), cells were then exposed to Ca^{2+} -containing Tyrode solution supplemented with 1- $\mu\text{mol}/\text{L}$ thapsigargin. To assess whether KCa3.1 -activity modulates Ca^{2+} influx, cells were pretreated with 1- $\mu\text{mol}/\text{L}$ TRAM-34 before inducing SOCE. Basal intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ was also assessed in CTL and *KCNN4*-knockdown c-Kit⁺ eCPCs. Images were analyzed with ImageJ software.

Population Doubling Time Measurements

Population doubling time (PDT) was assessed in 12-well plates by manual cell counts. Expanded c-Kit⁺ eCPCs and BM-MSCs were lifted with TrypLE Select (Invitrogen) and plated into 12-well plates at 5×10^4 cells/well in 1 mL of complete growth medium. After overnight pre-incubation to allow recovery from trypsinization and cell-attachment, the cells were switched to a culture medium containing 1- $\mu\text{mol}/\text{L}$ TRAM-34, 10- $\mu\text{mol}/\text{L}$ TRAM-34, vehicle or siRNA molecules for 48 hours. Cell number was counted on days 1 and 3 after initial seeding. The doubling time was calculated with the cell numbers on day 1 and 3 using Doubling Time Computing software (<http://www.doubling-time.com/compute.php>).

Immunoblotting

Freshly isolated c-Kit⁺ cell from control and CHF animals were collected into ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10% glycerol (v/v), 0.1% Triton X-100 (v/v), 0.1% SDS (w/v), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol and protease inhibitor cocktail). After incubating on ice for 30 minutes, lysates were cleared by centrifugation at 8,000 g for 10 minutes, and the supernatants retained. Each lysate was denatured and resolved by electrophoresis on SDS–polyacrylamide gels (SDS–PAGE, 7.5% acrylamide gels). Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes, probed overnight at 4°C with a KCa3.1 (Alomone), cyclin D1 (Cell Signalling Technology) and cyclin E2 (Cell Signalling Technology) -specific antibodies and then, after stripping the membranes with Re-blot Plus mild antibody stripping solution (Millipore), re-probed using a GAPDH-specific antibody (Fitzgerald industries international Inc.). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Inc.) were used and immunoreactive bands were revealed by chemiluminescence. Expression data are provided relative to GAPDH for the same samples on the same gels.

Data Analysis

Clampfit 10.4 (Axon Instruments), GraphPad Prism 5.0, SigmaPlot 11.0, SigmaStat 3.1 and Quantity One 1-D software (Bio-Rad Laboratories) were used for data analysis. All data are expressed as mean \pm SEM. Multiple group comparisons were obtained with one-way ANOVA for non-repeated analyses in experiments involving more than 2 groups and two-way repeated-measures ANOVA for all multi-group analyses involving repeated measures. Individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected *t*-tests were obtained to identify the

statistical significance of individual-mean differences when overall group effects were noted.

A 2-tailed $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

c-Kit⁺ eCPCs in Adult Dog Hearts

Freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs had a homogenous round-shaped morphology with a membrane capacitance of 5.5 ± 0.4 pF (n/N = cells/dogs = 53/17). Immunostaining confirmed the c-Kit positivity of purified eCPCs (Figure 1a, left panel) and the c-Kit negativity of a comparator population (unsorted non-myocyte cell fraction; Figure 1a, right panel). We assessed the expression-profiles of genes characteristic of eCPCs (*KIT*), cardiac fibroblasts (*DDR2*), endothelial cells (*CD31*), hematopoietic lineage cells (*CD34* and *CD45*) and mesenchymal-derived cells (*CD90* and *CD105*), before and after magnetic sorting. Figure 1b shows that *KIT* mRNA was enriched > 20-fold, whereas *DDR2*, *CD31*, *CD34*, *CD45*, *CD90* and *CD105* expression was negligible after the sorting procedure. These results confirm that our isolation protocol yields highly-enriched and relatively pure c-Kit⁺ cardiac cells.

Endogenous Ion-Currents in Freshly-Isolated c-Kit⁺ eCPCs

In freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs, ion-currents were minimal with Ca²⁺_i buffered in tight-seal patch mode (Figure 2a-b). Perforated patch-clamp recording, which preserves intracellular macromolecules and divalent cations such as Ca²⁺ and Mg²⁺, revealed robust outward currents displaying inward rectification and a reversal potential (E_{rev}) of -78 ± 12 mV (Figure 2c). The inclusion of 300-nmol/L Ca²⁺ (free concentration) in tight-seal patch-pipettes revealed a prominent inwardly-rectifying voltage independent current (Figure 2a-b) with an E_{rev} of -93 ± 2 mV (Figure 2d).

Figure 2e shows the resting membrane potential (V_{mem}) values in cells studied with tight-seal patch-clamp in the absence and presence of Ca^{2+}_i , indicating that V_{mem} is governed by a Ca^{2+}_i -dependent conductance. With perforated-patch-clamp recording to maintain physiological intracellular contents, V_{mem} averaged -70 ± 2 mV, close to values obtained in the presence of 300-nmol/L Ca^{2+}_i . These results point to a crucial role for Ca^{2+}_i in the regulation of membrane potential in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs.

Properties of Endogenous Ca^{2+} -Dependent K^+ Current

To confirm the charge-carrier for the prominent Ca^{2+}_i -dependent current, we observed the response to increased extracellular K^+ -concentration ($[\text{K}^+]_o = 100$ -mmol/L). Figure 3a displays the current-voltage relationship before and after exposure to 100-mmol/L $[\text{K}^+]_o$. The reversal potential (E_{rev}) shifted from -91 to -29 mV and inward currents increased substantially with increased $[\text{K}^+]_o$, in line with expectations for an inwardly-rectifying K^+ -current. For comparison, the predicted E_{rev} for a pure K^+ -current based on the Nernst equation was -89 mV for baseline conditions and -9 mV for $[\text{K}^+]_o$ of 100-mmol/L, confirming K^+ as the principal charge carrier.

Since the large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel (BKCa) has been reported in cultured c-Kit⁺ human cardiac progenitor cells (Zhang *et al.*, 2014), we tested the response to the selective BKCa-blocker paxilline. Paxilline had no effect on the current density (Figure 3b). Based on the biophysical properties of the current and the fact that the intermediate-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel (SK4; KCa3.1) has been reported in several non-excitable cells including stem cells from various origins, we then tested the response to

KCa3.1 blockers. We found that TRAM-34 and maurotoxin (MTX) strongly inhibited the current (Figure 3c).

Ion-Channel Subunit-Gene Expression in Freshly-Isolated c-Kit⁺ eCPCs

Figure 4a-b shows K⁺-channel subunit expression in eCPCs relative to the unsorted non-myocyte cell fraction from the same animals. Most voltage-dependent and inwardly-rectifying K⁺-channel subunits were weakly expressed in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs. The only subunit showing significantly-greater expression in eCPCs versus unsorted comparator cells was the KCa3.1-channel encoding gene *KCNN4*, in agreement with our patch-clamp data.

eCPC $I_{KCa3.1}$ Remodeling in Heart Disease

Heart diseases and cardiovascular risk factors are associated with accelerated ageing of progenitor cells. Evidence in the literature suggests that heart failure promotes cardiac progenitor cell senescence, which might impair their regenerative potential (Zakharova *et al.*, 2013). We therefore assessed KCa3.1 expression in c-Kit⁺ eCPCs freshly-isolated from the hearts of CHF dogs. All dogs in the CHF group showed pulmonary congestion and pericardial effusion during open-chest study. Arterial systolic pressures were lower in CHF dogs compared to controls, and left ventricular (LV) end-diastolic, left atrial (LA), and right atrial (RA) pressures were higher (Table 1). Freshly-isolated CHF c-Kit⁺ eCPCs were smaller than control cells (4.2 ± 0.5 pF vs. 5.5 ± 0.4 pF, $P < 0.05$), and V_{mem} of c-Kit⁺ eCPCs was depolarized in CHF versus control dogs under perforated-patch conditions (-58 ± 7 mV vs. -73 ± 3 mV, $P < 0.05$). Consistent with the observed difference in V_{mem} , TRAM-34-sensitive

current was significantly reduced in c-Kit⁺ eCPCs from CHF-dog hearts (Figure 5a). Reduced expression levels of *KCNN4* mRNA and corresponding protein were confirmed (Figure 5b-c). Population doubling time measurements revealed that CHF c-Kit⁺ eCPCs proliferate at a slower rate compared to control cells (Figure 5d). Western blot demonstrated lower expression of cyclin E2 in CHF c-Kit⁺ eCPCs (Figure 5e). These results suggest that reduced $I_{KCa3.1}$ density and associated V_{mem} depolarization might contribute to perturbed cellular function of c-Kit⁺ eCPCs in CHF.

Evidence for a Functional Role of V_{mem} -Control During Ca^{2+} -Entry

One clear potential role for $KCa3.1$ in c-Kit⁺ eCPCs would be optimization of the driving force for Ca^{2+} during store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), an important signal for cell-activation that by increasing $[Ca^{2+}]_i$ would otherwise reduce the transmembrane Ca^{2+} concentration-gradient and turn itself off. To address this possibility, we induced SOCE by bathing eCPCs in nominally Ca^{2+} -free Tyrode solution to passively deplete intracellular Ca^{2+} stores, then superfused the cells with Tyrode solution containing 1.8-mmol/L Ca^{2+} . Figure 6a shows mean current densities recorded with a ramp protocol after Ca^{2+}_i -depletion (0-mmol/L $[Ca^{2+}]_o$, in black symbols), following SOCE (1.8-mmol/L $[Ca^{2+}]_o$, red symbols) and following SOCE in the presence of the selective $I_{KCa3.1}$ inhibitor TRAM-34 (1- μ mol/L, blue symbols). Under Ca^{2+}_i -depletion, currents are negligible; they are greatly enhanced by SOCE and substantially reduced by TRAM-34. These observations confirm a highly-significant reduction in currents during SOCE with $I_{KCa3.1}$ -inhibition.

To verify the consequences, we performed current-clamp recording of V_{mem} under conditions that elicited SOCE (Figure 6b). In the presence of very low intracellular $[Ca^{2+}]$

resulting from perfusion with nominally Ca^{2+} -free extracellular solution, V_{mem} was about -20 mV. Following store-depletion, the addition of 1.8-mmol/L extracellular Ca^{2+} induced a strong hyperpolarization (from -21 ± 4 mV to -79 ± 7 mV in 21 cells, $P < 0.001$). The addition of TRAM-34 during SOCE strongly attenuated this hyperpolarization, as shown by the V_{mem} changes in Figure 6b and indicated by the mean V_{mem} values in Figure 6c. SOCE-inhibition by 2-APB also attenuated the hyperpolarization produced by exposure to 1.8-mmol/L $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Figure 6c). These results indicate that $I_{\text{KCa3.1}}$ maintains a negative transmembrane potential during SOCE in eCPCs, thus ensuring the driving-force for Ca^{2+} -entry.

To directly assess the notion that $I_{\text{KCa3.1}}$ might facilitate Ca^{2+} -entry in eCPCs by maintaining the electrical gradient for inward Ca^{2+} movement, we monitored changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by microfluorometry/confocal microscopy. Figure 7a shows representative Fluo-4 images acquired before and during SOCE, in the presence or absence of the KCa3.1 -blocker TRAM-34. SOCE caused clear increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (lower left panel), largely attenuated by TRAM-34 (lower right). Mean data in Figure 7b show that TRAM-34 substantially decreased the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase during SOCE in c-Kit⁺ eCPCs.

To rule out any non-specific effects of TRAM-34 on Ca^{2+} dynamics and V_{mem} , we next studied $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and V_{mem} following *KCNN4*-gene knockdown in c-Kit⁺ eCPCs. Mean data in Figure 8a show that *KCNN4* mRNA was decreased by $69 \pm 12\%$ 48 hours after siRNA delivery. Patch-clamp experiments showed a significant reduction in TRAM-34-sensitive current for c-Kit⁺ eCPCs transfected with *KCNN4*-siRNAs compared to control (Figure 8b), and consistent with our previous observations, a more depolarized V_{mem} (Figure 8c). We then assessed $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by microfluorometry. Figure 8d shows representative Fluo-4

images acquired under basal conditions, with and without *KCNN4*-gene knockdown. Reducing $I_{KCa3.1}$ density by gene-knockdown clearly decreased basal $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 8e). Taken altogether, these results indicate that normal eCPC Ca^{2+} -signalling depends on $I_{KCa3.1}$ activity.

Regulation of Ca^{2+} -Signalling in Stem Cells from Extra-Cardiac Origin

To determine whether our observations regarding the role of $KCa3.1$ are specific to eCPCs or might apply more broadly to stem and progenitor cells, we examined a stem cell population of extra-cardiac origin, BM-MSCs. Canine BM-MSCs expressed TRAM-34-sensitive current (Figure 9a). BM-MSCs had a resting potential of about -70 mV, and were strongly depolarized by blocking $I_{KCa3.1}$ (Figure 9b). Figure 9c displays a typical current-clamp recording of V_{mem} under SOCE. In the presence of very low intracellular $[Ca^{2+}]_i$, V_{mem} was about -20 mV. Following store-depletion, the addition of 1.8-mmol/L extracellular Ca^{2+} induced a hyperpolarization (from -22 ± 3 mV to -64 ± 9 mV in 10 cells, $P < 0.001$). The addition of TRAM-34 during SOCE strongly attenuated this hyperpolarization, as shown by the V_{mem} changes in Figure 9c and indicated by the mean V_{mem} values in Figure 9d. SOCE-inhibition by 2-APB attenuated the hyperpolarization produced by exposure to 1.8-mmol/L $[Ca^{2+}]_o$ (Figure 9d). To assess the role of $I_{KCa3.1}$ in controlling Ca^{2+} -entry in BM-MSCs, we monitored changes in $[Ca^{2+}]_i$ by confocal microscopy. Figure 10a shows representative Fluo-4 images acquired before and during SOCE, in the presence or absence of the $KCa3.1$ -blocker TRAM-34. SOCE caused clear increases in $[Ca^{2+}]_i$ (lower left panel), significantly attenuated by TRAM-34 (lower right). As observed for c-Kit⁺ eCPCs, treatment of BM-

MSCs with TRAM-34 substantially decreased the level of $[Ca^{2+}]_i$ increase during SOCE (Figure 10b), indicating that BM-MSC Ca^{2+} -signalling depends on $I_{KCa3.1}$ activity.

Functional Role of $I_{KCa3.1}$ in Proliferation of Stem and Progenitor Cells *in vitro*

Ca^{2+} entry is required for progression through G1 and for the G1/S transition in several cell types, including human embryonic lung fibroblasts (Hazelton *et al.*, 1979; Tupper *et al.*, 1980) and L1210 leukemic cells (Cory *et al.*, 1987). Since Ca^{2+} -entry is also an important signal for eCPC growth (Ferreira-Martins *et al.*, 2009), $I_{KCa3.1}$ might play an important functional role by maintaining Ca^{2+} -entry under physiological conditions. Thus, we assessed the results of $I_{KCa3.1}$ -inhibition on c-Kit⁺ eCPC and BM-MSC proliferation *in vitro*. Before initiating proliferation assays, we confirmed that expanded c-Kit⁺ eCPCs (passages 2-4) express KCa3.1-current and *KIT* mRNA at levels similar to those in freshly-isolated cells (Figure 11a-b).

Cells were then incubated for 48 hours in the presence of TRAM-34 or siRNA molecules (c-Kit⁺ eCPCs only). Treatment with TRAM-34 significantly increased both c-Kit⁺ eCPC and BM-MSC population doubling time (Figure 12a-b). $I_{KCa3.1}$ knockdown in c-Kit⁺ eCPCs also significantly increased doubling-time (Figure 12c), albeit less effectively than the larger concentration of TRAM-34 (presumably because the effect of 69% *KCNN4*-knockdown on the current was less intense than current-blockade with 10- μ mol/L TRAM-34).

To gain insight into the molecular mechanisms by which KCa3.1 regulates stem and progenitor cell proliferation, we examined the expression levels of cell cycle regulatory proteins (i.e. cyclin D and cyclin E2). Pharmacological inhibition of KCa3.1 with TRAM-34

significantly decreased mRNA expression-levels of cyclin E2 and protein expression-levels of both cyclin D1 and E2 in c-Kit⁺ eCPCs (Figure 13a-b). KCa3.1 knockdown in c-Kit⁺ eCPCs produced similar effects to TRAM-34 (Figure 13c; note that because of the small number of cells available in these knockdown studies we were unable to perform immunoblots for this experiment). In BM-MSCs, both mRNA and protein expression-levels of cyclin D1 and E2 were downregulated after TRAM-34 treatment (Figure 13d-e). These results indicate a clear role for KCa3.1 regulation of V_{mem} and associated maintenance of Ca^{2+} -signalling for cycle progression and proliferation of stem and progenitor cells.

Discussion

In this study, we found that c-Kit⁺ eCPC membrane potential is critically dependent on KCa3.1 channel-function. During SOCE, Ca²⁺ entry depolarizes the cell unless there is a countervailing current-response. KCa3.1-channels are opened by Ca²⁺ ions, playing a crucial role in eCPC Ca²⁺-signalling by maintaining (and in fact enhancing) the driving force for Ca²⁺-entry under SOCE, thus amplifying the effect of the Ca²⁺ signal and contributing to c-Kit⁺ eCPC proliferation. We also show that KCa3.1 channels play a similar role in stem cells sourced from bone-marrow and that eCPC KCa3.1-channels are downregulated in cardiac disease.

Control of c-Kit⁺ eCPC Membrane Potential and Ca²⁺ Entry by KCa3.1-Channels

In various excitable and non-excitable cell types, many K⁺ channels have been implicated in regulating the membrane potential. In contrast to other cardiac cells like cardiomyocytes (Chilton *et al.*, 2005) and fibroblasts (Qi *et al.*, 2015), the membrane potential of freshly-isolated eCPCs is not set by Kir-channels. We found that the resting membrane potential of c-Kit⁺ eCPCs depends predominantly on the intermediate-conductance Ca²⁺-activated channel KCa3.1. Activation of KCa3.1 induces membrane hyperpolarization, thus increasing the driving force for Ca²⁺-entry through store-operated channels. This type of relationship between K⁺ channels, membrane potential, and Ca²⁺ influx is reminiscent of phenomena reported in immune-mediating T-cells by Hess *et al.* (Hess *et al.*, 1993) and in melanoma cells, where membrane hyperpolarization increased [Ca²⁺]_i by controlling the electrochemical gradient for Ca²⁺ entry into the cell (Nilius and Wohlrab, 1992).

Functional Role of KCa3.1 Channels and SOCE in Stem and Progenitor Cells

Ca²⁺-signalling is a tightly-regulated control mechanism in many cell-types that can be modulated in amplitude, duration and frequency by different stimuli (Berridge *et al.*, 2003; Clapham, 2007). Che *et al.* recently demonstrated that Ca²⁺-influx through SOCE channels promotes migration and proliferation of human c-Kit⁺ cardiac progenitors *in vitro* by modulating cell-cycle regulatory proteins (cyclin D1 and E) and AKT-signalling (Che *et al.*, 2015). c-Kit⁺ cardiac progenitor-cell growth is regulated by spontaneous intracellular Ca²⁺-oscillations that can be triggered by ATP, histamine and IGF-1 in an IP₃-dependent manner (Ferreira-Martins *et al.*, 2009). There is evidence that Ca²⁺-activated K⁺ channel blockers regulate cell function and fate in MSCs (Tao *et al.*, 2008) and induced-pluripotent stem cells (Kleger *et al.*, 2010), although the underlying ionic mechanisms have not been addressed. It is known that cyclins and cyclin-dependent kinases (cdk) complexes are regulated by calcium influx in some cell types (Mignen *et al.*, 2003; Tomono *et al.*, 1998). KCa3.1 blockers decrease proliferation of MSCs by modulating cyclin D1 and E2 expression, although the physiological basis has not been elucidated (Tao *et al.*, 2008). Here, we found that KCa3.1 plays a critical role in SOCE and that inhibiting it decreases the expression of cyclin E2 in c-Kit⁺ eCPCs. Our results point to KCa3.1 regulation of V_{mem} as a crucial determinant of stem- and progenitor-cell Ca²⁺ homeostasis and proliferation.

Novel Elements

Our study provides the first characterization of ion-current expression profiles in freshly isolated c-Kit⁺ eCPCs and identifies KCa3.1 as a novel and potentially important regulator of c-Kit⁺ eCPC V_{mem} and function. In the adult myocardium, c-Kit⁺ eCPCs may be connected to

surrounding cardiomyocytes and fibroblasts by gap and adherent junctions (Bearzi *et al.*, 2009, 2007). The electrical properties of c-Kit⁺ eCPCs are important for their function, as we show here, and could be subject to modulation by adjacent cells of other types.

The pool of c-Kit⁺ eCPCs is enhanced acutely after myocardial infarction, but this growth response is attenuated in CHF, arguing that CHF might have deleterious effects on c-Kit⁺ eCPC physiology (Urbanek *et al.*, 2005). Our results suggest that the impaired proliferative capacity of CHF c-Kit⁺ eCPCs might be due to downregulation of KCa3.1 and its adverse effects on cellular Ca²⁺-signalling.

Potential Significance

Division of c-Kit⁺ eCPCs is promoted by spontaneous Ca²⁺ oscillations, and c-Kit⁺ eCPC differentiation appears to contribute to cardiomyogenesis during embryonic and fetal life (Ferreira-Martins *et al.*, 2012). Loss of c-Kit⁺ eCPC function promotes cardiomyocyte aging and emergence of a senescent phenotype (Gonzalez *et al.*, 2008; Leri *et al.*, 2003). A variety of cardiac conditions (e.g. diabetes, obesity, cardiac overload, medications and aging) impair c-Kit⁺ eCPC function and promote cellular senescence (Anversa *et al.*, 2005; Frati *et al.*, 2011; Kurazumi *et al.*, 2011; Leonardini and Avogaro, 2013; Torella *et al.*, 2004). Nevertheless, questions remain about their physiological role and relevance in adult hearts. Recently, Di Siena *et al.* showed that constitutive activation of c-Kit receptor is associated with an increased cardiac myogenic and vasculogenic reparative potential after injury (Di Siena *et al.*, 2016). These results point towards a significant role of endogenous c-Kit⁺ eCPCs in cardiac repair, homeostasis and survival.

Although activation of c-Kit⁺ eCPCs follows myocardial injury, the intrinsic ability of

the myocardium to self-renew does not compensate for the massive loss of cardiomyocytes observed in severe pathologic conditions such as acute myocardial infarction or heart failure (Anversa *et al.*, 2006; Beltrami *et al.*, 1994; Linke *et al.*, 2005; Urbanek *et al.*, 2005). From a therapeutic point of view, *ex vivo* proliferated c-Kit⁺ eCPCs have emerged as an attractive candidate for cell-based regenerative therapy. Preclinical (Bolli *et al.*, 2013; Dawn *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2010) and clinical (Bolli *et al.*, 2011) studies have been encouraging, although there is controversy regarding the precise mechanisms by which c-Kit⁺ eCPCs improve cardiac function following direct transplantation into the damaged heart.

The potency of transplanted cells and the availability of an adequate cell number are the most relevant among key factors for the success of cell therapy in treating heart disease (D'Amario *et al.*, 2011). Recently, it has been shown that patient co-morbidities limit the ability of cardiac explant-derived progenitor cells to repair injured hearts in experimental animal models (Mayfield *et al.*, 2016). Cell therapy effectiveness varies greatly and approaches that would improve treatment efficacy/reliability would be highly desirable. A variety of molecular and cellular preconditioning strategies have been proposed to address the heterogeneous cardiac reparative proficiency of patient-derived stem cell products (Yu *et al.*, 2013).

Our findings raise the possibility that modulating KCa3.1 expression or function (e.g. by KCa3.1 gene-transfer) might be useful to improve the therapeutic potential of c-Kit⁺ eCPCs in cardiac cell therapy. KCa3.1-channel expression might also serve as a biomarker to identify progenitor cell sub-populations with higher proliferative capacity. Finally, we have shown the generalizability of the importance of KCa3.1 to BM-MSCs, another promising cell product being developed for cardiac regenerative therapy. Our work thus provides new

insights of conceptual and potential therapeutic significance into the fundamental determinants of progenitor cell function and disease-induced dysfunction.

Limitations

We studied cell-proliferation during *in vitro* expansion, while ion-currents were defined and characterized in freshly-isolated cells. However, maintained expression of KCa3.1 in cultured cells was confirmed before initiating proliferation assays. The density of $I_{\text{KCa3.1}}$ was similar between freshly-isolated and expanded cells (passage 2-4). Although cultured c-Kit⁺ eCPCs represent a useful model to study the role of KCa3.1 channels in cell-proliferation, the involvement of KCa3.1 in c-Kit⁺ eCPCs proliferation might be underestimated because of the potential emergence of other types of functional ion channels during *in vitro* amplification. It would be of interest to compare KCa3.1 expression in freshly isolated eCPCs with cultured eCPCs derived from later passages, since c-Kit⁺ eCPCs that are utilized in cell therapy are passaged at least 5 times to ensure the availability of a sufficiently large number of cells for adoptive transfer.

While we noted significant changes in c-Kit⁺ eCPC KCa3.1 expression and current with CHF, Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2014) noted no differences in ion-channel expression profile in cells from patients with different ages, diseases and medications. Previous work has shown that both electrophysiological and functional differences between freshly-isolated control and CHF atrial cardiac fibroblasts are obscured by the effects of cell culture (Dawson *et al.*, 2012). It would have been instructive to determine whether KCa3.1 over-expression can improve the proliferative function of CHF c-Kit⁺ eCPCs. We did attempt such studies; however, we were unsuccessful in obtaining adequate KCa3.1 protein over-expression with a

commercially-available lentivirus construct containing the human *KCNN4* gene.

We used pharmacological tools extensively in this study. The concentrations that we used were based on prior information in the literature. TRAM-34 produces potent and highly selective blocker of KCa3.1 channels with 200 to 1500-fold selectivity over Kv, BKCa, KCa2, Na⁺, CRAC and Cl⁻ channels (Köhler *et al.*, 2003; Wulff *et al.*, 2000). Full block of KCa3.1 current is seen in the low micromolar range (Köhler *et al.*, 2003). MTX blocks KCa3.1 in the nanomolar concentration range, but has no effect on KCa1.1, KCa2.1, KCa2.2 and KCa2.3 small-conductance KCa channels up to 1- μ mol/L (Castle *et al.*, 2003). 2-APB inhibits store-operated calcium entry (SOCE) half-maximally at 30- μ mol/L and completely at 250- μ mol/L (Martín-Romero *et al.*, 2008). As a complement to the pharmacological studies to exclude the role of potential off-target effects, we repeated key experiments with siRNA-based genetic knockdown of KCa3.1, showing that it reduced the corresponding current (Figure 8b), c-Kit⁺ eCPC resting membrane potential (Figure 8c) and SOCE-mediated Ca²⁺ entry (Figure 8e), as well as increasing cultured c-Kit⁺ CPC doubling time (Figure 12c).

Conflicting results have been obtained with respect to the cardiomyogenic potential of c-Kit⁺ eCPCs in adult hearts. Initial reports of significant *in situ* differentiation into cardiomyocytes (Beltrami *et al.*, 2003; Ferreira-Martins *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2006) have not been reproduced by other laboratories (Sturzu and Wu, 2011; van Berlo *et al.*, 2014; Zaruba *et al.*, 2010), suggesting that functional improvement resulting from c-Kit⁺ eCPCs might be due to paracrine mechanisms. Sultana *et al.* reported that c-Kit predominantly labels a mature cardiac endothelial cell population in developing and adult hearts rather than eCPCs, supporting the low cardiomyogenic potential of endogenous c-Kit⁺ cardiac cells (Sultana *et al.*, 2015). Moreover, the microenvironment in post-ischemic and failing hearts

may compromise eCPC regenerative potential. Indeed, Hamid *et al.* found that elevated tumor necrosis factor- α (TNF) receptor signalling restrains cardiomyocyte differentiation of resident eCPCs and promotes adverse cardiac remodeling (Hamid *et al.*, 2016). Irrespective of the precise role of c-Kit⁺ eCPCs in cardiac physiology, their potential usefulness in cell therapy impels efforts to improve our understanding of the determinants of their function. Furthermore, the similar role of KCa3.1 that we noted in c-Kit⁺ eCPCs and BM-MSCs argues for a potentially generalizable principle in stem-cell physiology.

Conclusions

KCa3.1-channels provide the principal conductance determining cell-membrane polarization in eCPCs and BM-MSCs, and are essential for normal SOCE and proliferative properties. Cardiac disease downregulates eCPC KCa3.1-channels and impairs KCa3.1-channel function. These findings provide new insights into the basic determinants of stem and progenitor cell physiology with potential relevance to improving cell and regenerative therapy for heart disease.

References

- Angert, D., Berretta, R.M., Kubo, H., Zhang, H., Chen, X., Wang, W., Ogorek, B., Barbe, M., Houser, S.R., 2011. Repair of the injured adult heart involves new myocytes potentially derived from resident cardiac stem cells. *Circ. Res.* 108, 1226–1237. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.239046>
- Anversa, P., Kajstura, J., Leri, A., Bolli, R., 2006. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 113, 1451–63. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595181>
- Anversa, P., Rota, M., Urbanek, K., Hosoda, T., Sonnenblick, E.H., Leri, A., Kajstura, J., Bolli, R., 2005. Myocardial aging--a stem cell problem. *Basic Res Cardiol* 100, 482–93. <https://doi.org/10.1007/s00395-005-0554-3>
- Bearzi, C., Leri, A., Lo Monaco, F., Rota, M., Gonzalez, A., Hosoda, T., Pepe, M., Qanud, K., Ojaimi, C., Bardelli, S., D'Amario, D., D'Alessandro, D.A., Michler, R.E., Dimmeler, S., Zeiher, A.M., Urbanek, K., Hintze, T.H., Kajstura, J., Anversa, P., 2009. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15885–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907622106>
- Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R.W., Lecapitaine, N., Cascapera, S., Beltrami, A.P., D'Alessandro, D.A., Zias, E., Quaini, F., Urbanek, K., Michler, R.E., Bolli, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., 2007. Human cardiac stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14068–14073. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706760104>
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., Anversa,

- P., 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763–776.
- Beltrami, C.A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G.A., Puricelli, C., Cigola, E., Quaini, F., Sonnenblick, E.H., Olivetti, G., Anversa, P., 1994. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation* 89, 151–163.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrml155>
- Bolli, R., Chugh, A.R., D'Amario, D., Loughran, J.H., Stoddard, M.F., Ikram, S., Beache, G.M., Wagner, S.G., Leri, A., Hosoda, T., Sanada, F., Elmore, J.B., Goichberg, P., Cappetta, D., Solankhi, N.K., Fahsah, I., Rokosh, D.G., Slaughter, M.S., Kajstura, J., Anversa, P., 2011. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 378, 1847–57. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61590-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61590-0)
- Bolli, R., Tang, X.L., Sanganalmath, S.K., Rimoldi, O., Mosna, F., Abdel-Latif, A., Jneid, H., Rota, M., Leri, A., Kajstura, J., 2013. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 128, 122–31. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001075>
- Camacho, P., Fan, H., Liu, Z., He, J.-Q., 2016. Large Mammalian Animal Models of Heart Disease. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 3. <https://doi.org/10.3390/jcdd3040030>
- Castaldo, C., Di Meglio, F., Nurzynska, D., Romano, G., Maiello, C., Bancone, C., Müller, P., Böhm, M., Cotrufo, M., Montagnani, S., 2008. CD117-positive cells in adult

- human heart are localized in the subepicardium, and their activation is associated with laminin-1 and alpha6 integrin expression. *Stem Cells* Dayt. Ohio 26, 1723–1731. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0732>
- Castle, N.A., London, D.O., Creech, C., Fajloun, Z., Stocker, J.W., Sabatier, J.-M., 2003. Maurotoxin: a potent inhibitor of intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channels. *Mol. Pharmacol.* 63, 409–418.
- Che, H., Li, G., Sun, H.-Y., Xiao, G.-S., Wang, Y., Li, G.-R., 2015. Roles of store-operated Ca²⁺ channels in regulating cell cycling and migration of human cardiac c-kit⁺ progenitor cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309, H1772-1781. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00260.2015>
- Che, H., Xiao, G.-S., Sun, H.-Y., Wang, Y., Li, G.-R., 2016. Functional TRPV2 and TRPV4 channels in human cardiac c-kit(+) progenitor cells. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 1118–1127. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12800>
- Chilton, L., Ohya, S., Freed, D., George, E., Drohic, V., Shibukawa, Y., Maccannell, K.A., Imaizumi, Y., Clark, R.B., Dixon, I.M.C., Giles, W.R., 2005. K⁺ currents regulate the resting membrane potential, proliferation, and contractile responses in ventricular fibroblasts and myofibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H2931-2939. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01220.2004>
- Chimenti, I., Gaetani, R., Barile, L., Forte, E., Ionta, V., Angelini, F., Frati, G., Messina, E., Giacomello, A., 2012. Isolation and expansion of adult cardiac stem/progenitor cells in the form of cardiospheres from human cardiac biopsies and murine hearts. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 879, 327–338. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-815-3_19

- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Cory, J.G., Carter, G.L., Karl, R.C., 1987. Calcium ion-dependent proliferation of L1210 cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 556–562.
- D’Amario, D., Fiorini, C., Campbell, P.M., Goichberg, P., Sanada, F., Zheng, H., Hosoda, T., Rota, M., Connell, J.M., Gallegos, R.P., Welt, F.G., Givertz, M.M., Mitchell, R.N., Leri, A., Kajstura, J., Pfeffer, M.A., Anversa, P., 2011. Functionally competent cardiac stem cells can be isolated from endomyocardial biopsies of patients with advanced cardiomyopathies. *Circ. Res.* 108, 857–861. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.241380>
- Dawn, B., Stein, A.B., Urbanek, K., Rota, M., Whang, B., Rastaldo, R., Torella, D., Tang, X.-L., Rezazadeh, A., Kajstura, J., Leri, A., Hunt, G., Varma, J., Prabhu, S.D., Anversa, P., Bolli, R., 2005. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3766–3771. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405957102>
- Dawson, K., Wu, C.-T., Qi, X.Y., Nattel, S., 2012. Congestive heart failure effects on atrial fibroblast phenotype: differences between freshly-isolated and cultured cells. *PLoS One* 7, e52032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052032>
- Di Meglio, F., Castaldo, C., Nurzynska, D., Miraglia, R., Romano, V., Russolillo, V., Giuseppina, L., Vosa, C., Montagnani, S., 2010. Localization and origin of cardiac CD117-positive cells: identification of a population of epicardially-derived cells in adult human heart. *Ital. J. Anat. Embryol. Arch. Ital. Anat. Ed Embriologia* 115, 71–78.

- Di Siena, S., Gimmelli, R., Nori, S.L., Barbagallo, F., Campolo, F., Dolci, S., Rossi, P., Venneri, M.A., Giannetta, E., Gianfrilli, D., Feigenbaum, L., Lenzi, A., Naro, F., Cianflone, E., Mancuso, T., Torella, D., Isidori, A.M., Pellegrini, M., 2016. Activated c-Kit receptor in the heart promotes cardiac repair and regeneration after injury. *Cell Death Dis.* 7, e2317. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.205>
- Ellison, G.M., Torella, D., Dellegrottaglie, S., Perez-Martinez, C., Perez de Prado, A., Vicinanza, C., Purushothaman, S., Galuppo, V., Iaconetti, C., Waring, C.D., Smith, A., Torella, M., Cuellas Ramon, C., Gonzalo-Orden, J.M., Agosti, V., Indolfi, C., Galiñanes, M., Fernandez-Vazquez, F., Nadal-Ginard, B., 2011. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 977–986. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.05.013>
- Ellison, G.M., Vicinanza, C., Smith, A.J., Aquila, I., Leone, A., Waring, C.D., Henning, B.J., Stirparo, G.G., Papait, R., Scarfò, M., Agosti, V., Viglietto, G., Condorelli, G., Indolfi, C., Ottolenghi, S., Torella, D., Nadal-Ginard, B., 2013. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell* 154, 827–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.039>
- Ferreira-Martins, J., Ogorek, B., Cappetta, D., Matsuda, A., Signore, S., D’Amario, D., Kostyla, J., Steadman, E., Ide-Iwata, N., Sanada, F., Iaffaldano, G., Ottolenghi, S., Hosoda, T., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., Rota, M., 2012. Cardiomyogenesis in the developing heart is regulated by c-kit-positive cardiac stem cells. *Circ Res* 110, 701–15. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.259507>

- Ferreira-Martins, J., Rondon-Clavo, C., Tugal, D., Korn, J.A., Rizzi, R., Padin-Iruegas, M.E., Ottolenghi, S., De Angelis, A., Urbanek, K., Ide-Iwata, N., D'Amario, D., Hosoda, T., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., Rota, M., 2009. Spontaneous calcium oscillations regulate human cardiac progenitor cell growth. *Circ Res* 105, 764–74. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206698>
- Fischer, K.M., Cottage, C.T., Wu, W., Din, S., Gude, N.A., Avitabile, D., Quijada, P., Collins, B.L., Fransioli, J., Sussman, M.A., 2009. Enhancement of myocardial regeneration through genetic engineering of cardiac progenitor cells expressing Pim-1 kinase. *Circulation* 120, 2077–2087. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.884403>
- Frati, C., Savi, M., Graiani, G., Lagrasta, C., Cavalli, S., Prezioso, L., Rossetti, P., Mangiaracina, C., Ferraro, F., Madeddu, D., Musso, E., Stilli, D., Rossini, A., Falco, A., Angelis, A.D., Rossi, F., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., Quaini, E., Quaini, F., 2011. Resident cardiac stem cells. *Curr Pharm Des* 17, 3252–7.
- French, K.M., Davis, M.E., 2014. Isolation and expansion of c-kit-positive cardiac progenitor cells by magnetic cell sorting. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1181, 39–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1047-2_4
- Gonzalez, A., Rota, M., Nurzynska, D., Misao, Y., Tillmanns, J., Ojaimi, C., Padin-Iruegas, M.E., Müller, P., Esposito, G., Bearzi, C., Vitale, S., Dawn, B., Sanganalmath, S.K., Baker, M., Hintze, T.H., Bolli, R., Urbanek, K., Hosoda, T., Anversa, P., Kajstura, J., Leri, A., 2008. Activation of cardiac progenitor cells reverses the failing heart senescent phenotype and prolongs lifespan. *Circ. Res.* 102, 597–606. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165464>

- Grundy, D., 2015. Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Physiology and Experimental Physiology. *J. Physiol.* 593, 2547–2549. <https://doi.org/10.1113/JP270818>
- Hamid, T., Xu, Y., Ismahil, M.A., Li, Q., Jones, S.P., Bhatnagar, A., Bolli, R., Prabhu, S.D., 2016. TNF receptor signaling inhibits cardiomyogenic differentiation of cardiac stem cells and promotes a neuroadrenergic-like fate. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *ajpheart.00904.2015*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00904.2015>
- Han, Y., Chen, J.D., Liu, Z.M., Zhou, Y., Xia, J.H., Du, X.L., Jin, M.W., 2010. Functional ion channels in mouse cardiac c-kit(+) cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C1109-17. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00207.2009>
- Hazelton, B., Mitchell, B., Tupper, J., 1979. Calcium, magnesium, and growth control in the WI-38 human fibroblast cell. *J. Cell Biol.* 83, 487–498.
- Hess, S.D., Oortgiesen, M., Cahalan, M.D., 1993. Calcium oscillations in human T and natural killer cells depend upon membrane potential and calcium influx. *J. Immunol.* *Baltim. Md* 150, 2620–2633.
- Hierlihy, A.M., Seale, P., Lobe, C.G., Rudnicki, M.A., Megoney, L.A., 2002. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 530, 239–43.
- Hou, X., Appleby, N., Fuentes, T., Longo, L.D., Bailey, L.L., Hasaniya, N., Kearns-Jonker, M., 2012. Isolation, Characterization, and Spatial Distribution of Cardiac Progenitor Cells in the Sheep Heart. *J. Clin. Exp. Cardiol.* S6.
- Khan, M., Nickoloff, E., Abramova, T., Johnson, J., Verma, S.K., Krishnamurthy, P., Mackie, A.R., Vaughan, E., Garikipati, V.N.S., Benedict, C., Ramirez, V., Lambers, E., Ito, A., Gao, E., Misener, S., Luongo, T., Elrod, J., Qin, G., Houser, S.R., Koch,

- W.J., Kishore, R., 2015. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ. Res.* 117, 52–64. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305990>
- Kleger, A., Seufferlein, T., Malan, D., Tischendorf, M., Storch, A., Wolheim, A., Latz, S., Protze, S., Porzner, M., Proepper, C., Brunner, C., Katz, S.-F., Varma Pusapati, G., Bullinger, L., Franz, W.-M., Koehntop, R., Giehl, K., Spyranis, A., Wittekindt, O., Lin, Q., Lin, Q., Zenke, M., Fleischmann, B.K., Wartenberg, M., Wobus, A.M., Boeckers, T.M., Liebau, S., 2010. Modulation of calcium-activated potassium channels induces cardiogenesis of pluripotent stem cells and enrichment of pacemaker-like cells. *Circulation* 122, 1823–1836. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.971721>
- Köhler, R., Wulff, H., Eichler, I., Kneifel, M., Neumann, D., Knorr, A., Grgic, I., Kämpf, D., Si, H., Wibawa, J., Real, R., Borner, K., Brakemeier, S., Orzechowski, H.-D., Reusch, H.-P., Paul, M., Chandy, K.G., Hoyer, J., 2003. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 108, 1119–1125. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000086464.04719.DD>
- Kurazumi, H., Kubo, M., Ohshima, M., Yamamoto, Y., Takemoto, Y., Suzuki, R., Ikenaga, S., Mikamo, A., Udo, K., Hamano, K., Li, T.S., 2011. The effects of mechanical stress on the growth, differentiation, and paracrine factor production of cardiac stem cells. *PLoS One* 6, e28890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028890>
- Lang, F., Föllner, M., Lang, K., Lang, P., Ritter, M., Vereninov, A., Szabo, I., Huber, S.M., Gulbins, E., 2007. Cell volume regulatory ion channels in cell proliferation and cell

- death. *Methods Enzymol.* 428, 209–225. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28011-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28011-5)
- Laugwitz, K.-L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L.-Z., Cai, C.-L., Lu, M.M., Reth, M., Platoshyn, O., Yuan, J.X.-J., Evans, S., Chien, K.R., 2005. Postnatal *Isl1*⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433, 647–653. <https://doi.org/10.1038/nature03215>
- Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., Prevarskaya, N., 2007. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 26, 7380–7385. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210545>
- Leonardini, A., Avogaro, A., 2013. Abnormalities of the cardiac stem and progenitor cell compartment in experimental and human diabetes. *Arch Physiol Biochem* 119, 179–87. <https://doi.org/10.3109/13813455.2013.798334>
- Leri, A., Franco, S., Zacheo, A., Barlucchi, L., Chimenti, S., Limana, F., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Anversa, P., Blasco, M.A., 2003. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *EMBO J.* 22, 131–139. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg013>
- Li, Q., Guo, Y., Ou, Q., Chen, N., Wu, W.-J., Yuan, F., O'Brien, E., Wang, T., Luo, L., Hunt, G.N., Zhu, X., Bolli, R., 2011. Intracoronary administration of cardiac stem cells in mice: a new, improved technique for cell therapy in murine models. *Basic Res. Cardiol.* 106, 849–864. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0180-1>
- Linke, A., Muller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C., Cascapera, S., Bohm, M., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., Hintze, T.H., Kajstura, J., Anversa, P., 2005. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and

- multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8966–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502678102>
- Martin, C.M., Meeson, A.P., Robertson, S.M., Hawke, T.J., Richardson, J.A., Bates, S., Goetsch, S.C., Gallardo, T.D., Garry, D.J., 2004. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265, 262–75.
- Martín-Romero, F.J., Ortiz-de-Galisteo, J.R., Lara-Laranjeira, J., Domínguez-Arroyo, J.A., González-Carrera, E., Alvarez, I.S., 2008. Store-operated calcium entry in human oocytes and sensitivity to oxidative stress. *Biol. Reprod.* 78, 307–315. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064527>
- Mayfield, A.E., Fitzpatrick, M.E., Latham, N., Tilokee, E.L., Villanueva, M., Mount, S., Lam, B.-K., Ruel, M., Stewart, D.J., Davis, D.R., 2016. The impact of patient comorbidities on the regenerative capacity of cardiac explant-derived stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 7, 60. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0321-4>
- Mignen, O., Thompson, J.L., Shuttleworth, T.J., 2003. Calcineurin directs the reciprocal regulation of calcium entry pathways in nonexcitable cells. *J. Biol. Chem.* 278, 40088–40096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306365200>
- Nadal-Ginard, B., Ellison, G.M., Torella, D., 2014. The cardiac stem cell compartment is indispensable for myocardial cell homeostasis, repair and regeneration in the adult. *Stem Cell Res.* 13, 615–630. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.04.008>
- Nilius, B., Wohlrab, W., 1992. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J. Physiol.* 445, 537–548.

- Oh, H., Bradfute, S.B., Gallardo, T.D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L.H., Behringer, R.R., Garry, D.J., Entman, M.L., Schneider, M.D., 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12313–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2132126100>
- Pardo, L.A., 2004. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiol. Bethesda Md* 19, 285–292. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2004>
- Qi, X.-Y., Huang, H., Ordog, B., Luo, X., Naud, P., Sun, Y., Wu, C.-T., Dawson, K., Tadevosyan, A., Chen, Y., Harada, M., Dobrev, D., Nattel, S., 2015. Fibroblast inward-rectifier potassium current upregulation in profibrillatory atrial remodeling. *Circ. Res.* 116, 836–845. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305326>
- Sahoo, S., Losordo, D.W., 2014. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ. Res.* 114, 333–344. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300639>
- Sandstedt, J., Jonsson, M., Kajic, K., Sandstedt, M., Lindahl, A., Dellgren, G., Jeppsson, A., Asp, J., 2012. Left atrium of the human adult heart contains a population of side population cells. *Basic Res. Cardiol.* 107, 255. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0255-7>
- Sandstedt, J., Jonsson, M., Vukusic, K., Dellgren, G., Lindahl, A., Jeppsson, A., Asp, J., 2014. SSEA-4⁺ CD34⁻ cells in the adult human heart show the molecular characteristics of a novel cardiomyocyte progenitor population. *Cells Tissues Organs* 199, 103–116. <https://doi.org/10.1159/000363225>

- Shinagawa, K., Shi, Y.-F., Tardif, J.-C., Leung, T.-K., Nattel, S., 2002. Dynamic nature of atrial fibrillation substrate during development and reversal of heart failure in dogs. *Circulation* 105, 2672–2678.
- Sturzu, A.C., Wu, S.M., 2011. Developmental and regenerative biology of multipotent cardiovascular progenitor cells. *Circ. Res.* 108, 353–364. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227066>
- Sultana, N., Zhang, L., Yan, J., Chen, J., Cai, W., Razzaque, S., Jeong, D., Sheng, W., Bu, L., Xu, M., Huang, G.-Y., Hajjar, R.J., Zhou, B., Moon, A., Cai, C.-L., 2015. Resident c-kit⁺ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat. Commun.* 6, 8701. <https://doi.org/10.1038/ncomms9701>
- Tang, X.-L., Rokosh, G., Sanganalmath, S.K., Yuan, F., Sato, H., Mu, J., Dai, S., Li, C., Chen, N., Peng, Y., Dawn, B., Hunt, G., Leri, A., Kajstura, J., Tiwari, S., Shirk, G., Anversa, P., Bolli, R., 2010. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 121, 293–305. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.871905>
- Tao, R., Lau, C.P., Tse, H.F., Li, G.R., 2008. Regulation of cell proliferation by intermediate-conductance Ca²⁺-activated potassium and volume-sensitive chloride channels in mouse mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C1409-16. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00268.2008>
- Tomono, M., Toyoshima, K., Ito, M., Amano, H., Kiss, Z., 1998. Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 353, 374–378. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0667>

- Torella, D., Rota, M., Nurzynska, D., Musso, E., Monsen, A., Shiraishi, I., Zias, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Sussman, M.A., Urbanek, K., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Anversa, P., Leri, A., 2004. Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 over-expression. *Circ Res* 94, 514–24. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000117306.10142.50>
- Tupper, J.T., Kaufman, L., Bodine, P.V., 1980. Related effects of calcium and serum on the G1 phase of the human W138 fibroblast. *J. Cell. Physiol.* 104, 97–103. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041040113>
- Urbanek, K., Rota, M., Cascapera, S., Bearzi, C., Nascimbene, A., De Angelis, A., Hosoda, T., Chimenti, S., Baker, M., Limana, F., Nurzynska, D., Torella, D., Rotatori, F., Rastaldo, R., Musso, E., Quaini, F., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., 2005. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ. Res.* 97, 663–673. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000183733.53101.11>
- Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C.A., Bussani, R., Beltrami, A.P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., 2005. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U A* 102, 8692–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500169102>
- van Berlo, J.H., Kanisicak, O., Maillet, M., Vagnozzi, R.J., Karch, J., Lin, S.-C.J., Middleton, R.C., Marbán, E., Molkentin, J.D., 2014. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* 509, 337–341. <https://doi.org/10.1038/nature13309>

- van Vliet, P., Roccio, M., Smits, A.M., van Oorschot, A. a. M., Metz, C.H.G., van Veen, T. a. B., Sluijter, J.P.G., Doevendans, P.A., Goumans, M.-J., 2008. Progenitor cells isolated from the human heart: a potential cell source for regenerative therapy. *Neth. Heart J. Mon. J. Neth. Soc. Cardiol. Neth. Heart Found.* 16, 163–169.
- Verduci, L., Loparco, G., Pozzoli, O., Pompilio, G., Capogrossi, M.C., 2014. Identification of Kita (c-Kit) positive cells in the heart of adult zebrafish. *Int. J. Cardiol.* 175, 204–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.04.231>
- Wei, K., Serpooshan, V., Hurtado, C., Diez-Cuñado, M., Zhao, M., Maruyama, S., Zhu, W., Fajardo, G., Nosedá, M., Nakamura, K., Tian, X., Liu, Q., Wang, A., Matsuura, Y., Bushway, P., Cai, W., Savchenko, A., Mahmoudi, M., Schneider, M.D., van den Hoff, M.J.B., Butte, M.J., Yang, P.C., Walsh, K., Zhou, B., Bernstein, D., Mercola, M., Ruiz-Lozano, P., 2015. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* 525, 479–485. <https://doi.org/10.1038/nature15372>
- Wu, S.M., Fujiwara, Y., Cibulsky, S.M., Clapham, D.E., Lien, C.-L., Schultheiss, T.M., Orkin, S.H., 2006. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 127, 1137–1150. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.028>
- Wulff, H., Miller, M.J., Hansel, W., Grissmer, S., Cahalan, M.D., Chandy, K.G., 2000. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8151–8156.
- Yaniz-Galende, E., Roux, M., Nadaud, S., Mougenot, N., Bouvet, M., Claude, O., Lebreton, G., Blanc, C., Pinet, F., Atassi, F., Perret, C., Dierick, F., Dussaud, S., Leprince, P.,

- Tréguët, D.-A., Marazzi, G., Sassooun, D., Hulot, J.-S., 2017. Fibrogenic Potential of PW1/Peg3 Expressing Cardiac Stem Cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.06.010>
- Yu, S.P., Wei, Z., Wei, L., 2013. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Transl Stroke Res* 4, 76–88. <https://doi.org/10.1007/s12975-012-0251-0>
- Zakharova, L., Nural-Guvener, H., Nimlos, J., Popovic, S., Gaballa, M.A., 2013. Chronic heart failure is associated with transforming growth factor beta-dependent yield and functional decline in atrial explant-derived c-Kit⁺ cells. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e000317. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000317>
- Zaruba, M.-M., Soonpaa, M., Reuter, S., Field, L.J., 2010. Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation* 121, 1992–2000. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.909093>
- Zhang, Y., Sivakumaran, P., Newcomb, A.E., Hernandez, D., Harris, N., Khanabdali, R., Liu, G.-S., Kelly, D.J., Pébay, A., Hewitt, A.W., Boyle, A., Harvey, R., Morrison, W.A., Elliott, D.A., Dusting, G.J., Lim, S.Y., 2015. Cardiac Repair With a Novel Population of Mesenchymal Stem Cells Resident in the Human Heart. *Stem Cells Dayt. Ohio* 33, 3100–3113. <https://doi.org/10.1002/stem.2101>
- Zhang, Y.-Y., Li, G., Che, H., Sun, H.-Y., Li, X., Au, W.-K., Xiao, G.-S., Wang, Y., Li, G.-R., 2014. Characterization of functional ion channels in human cardiac c-kit⁺ progenitor cells. *Basic Res. Cardiol.* 109, 407. <https://doi.org/10.1007/s00395-014-0407-z>

Figures

Table 1. Haemodynamic data confirming the presence of CHF

	Control Group (N = 14)	CHF (N = 10)	P value (vs. Control group)
Systolic BP	138 ± 9	112 ± 3**	<i>P</i> = 0.004
Diastolic BP	71 ± 5	69 ± 3	<i>P</i> = 0.713
Mean BP	104 ± 6	90 ± 3*	<i>P</i> = 0.027
LVEDP	4 ± 1	15 ± 1***	<i>P</i> < 0.001
RAP	5 ± 1	9 ± 2	<i>P</i> = 0.068
LAP	6 ± 1	12 ± 1**	<i>P</i> = 0.002

BP indicates blood pressure; LVEDP, LV end-diastolic pressure; and LAP and RAP, LA and RA mean pressure. All values are mm Hg. **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01 and ****P* ≤ 0.001 vs. Control group, by paired student *t*-test; N = dogs.

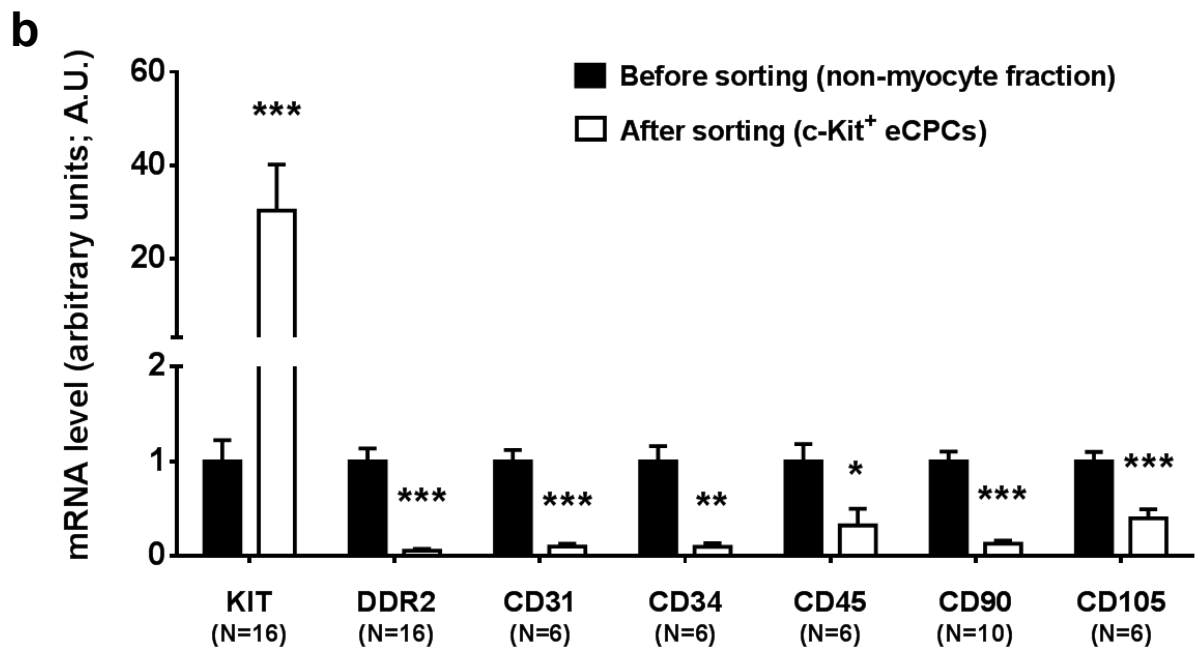
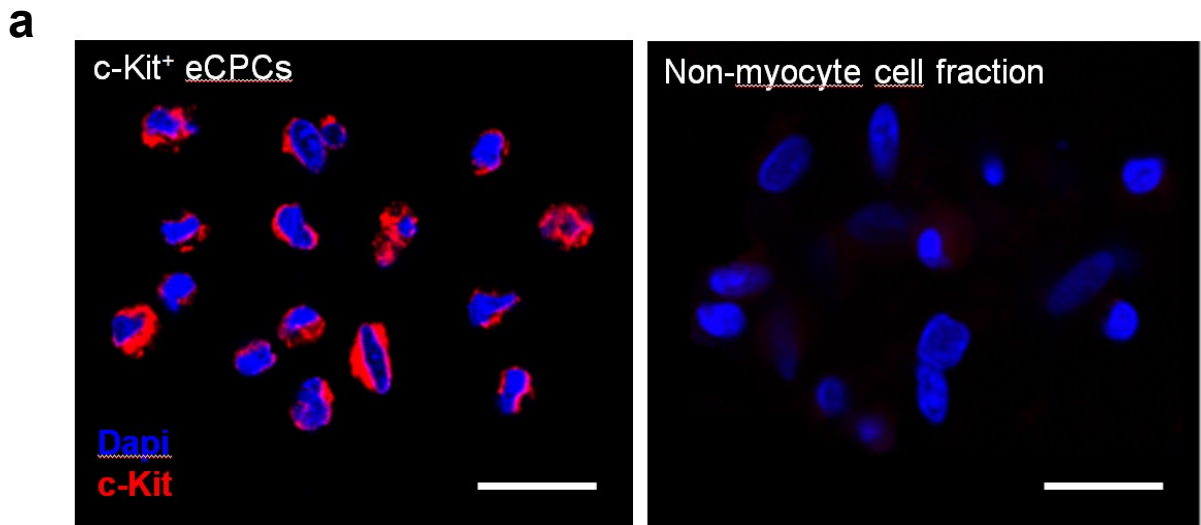


Figure 1. Selective enrichment of c-Kit⁺ cells following immunomagnetic selection. (a) Immunostaining of freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs and the non-myocyte cell fraction from which c-Kit⁺ eCPCs were purified. Staining shown is nuclear (DAPI, blue) and c-Kit protein (red). (b) Fold-change of *KIT*, *DDR2*, *CD31*, *CD34*, *CD45*, *CD90* and *CD105* mRNA-expression level before versus after immunomagnetic sorting. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. before sorting, by paired student *t*-tests; N = dogs. Scale bars, 20 μ m

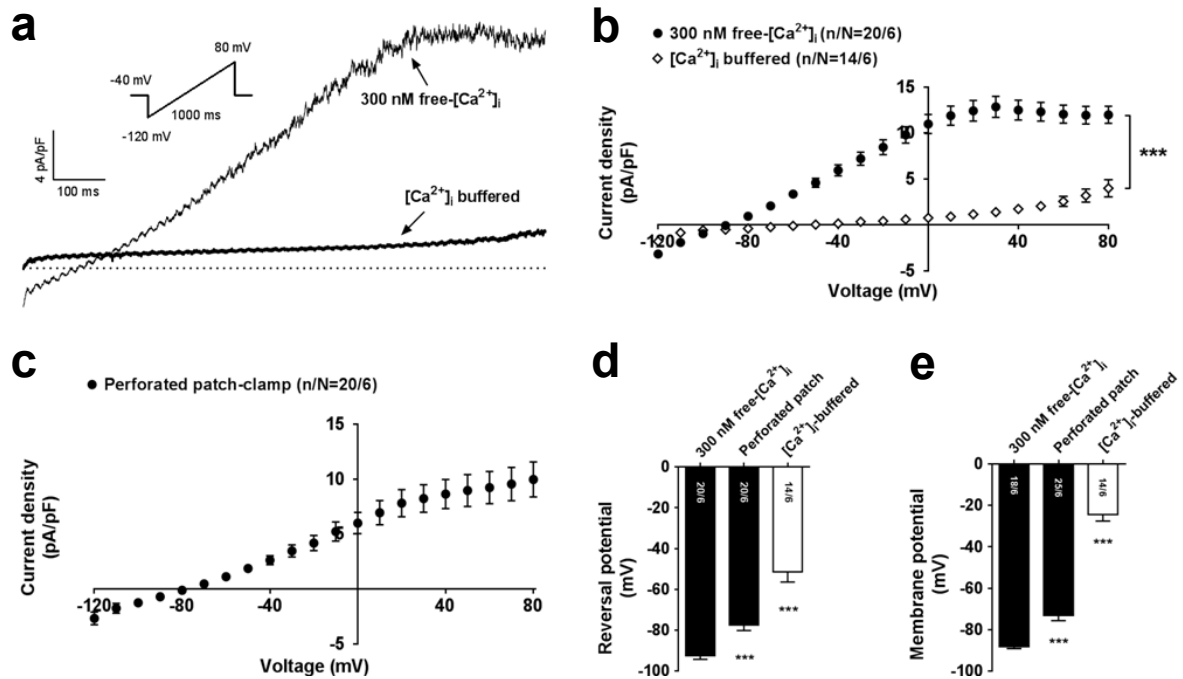


Figure 2. Functional ion currents endogenously expressed in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs. (a) Original ion-current recordings obtained from freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs under different experimental conditions (Ca²⁺_i buffered and 300-nmol/L free-[Ca²⁺]_i) with 1000-ms voltage ramps from -120 mV to +80 mV with a holding potential of -40 mV. (b) *I-V* relationship of whole-cell currents recorded with the presence or absence of free-[Ca²⁺]_i (tight-seal). (c) Current-voltage (*I-V*) relationship of whole-cell ion currents recorded with perforated-patch configuration (nystatin). (d) Reversal potential of whole-cell ion current recorded under various experimental conditions. (e) Resting potential of c-Kit⁺ eCPCs under various experimental conditions. ****P* < 0.001 vs. 300-nmol/L free-[Ca²⁺]_i, by two-way ANOVA repeated-measures (panel b); one-way ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected *t*-tests (panels d-e); n/N = cells/dogs per group.

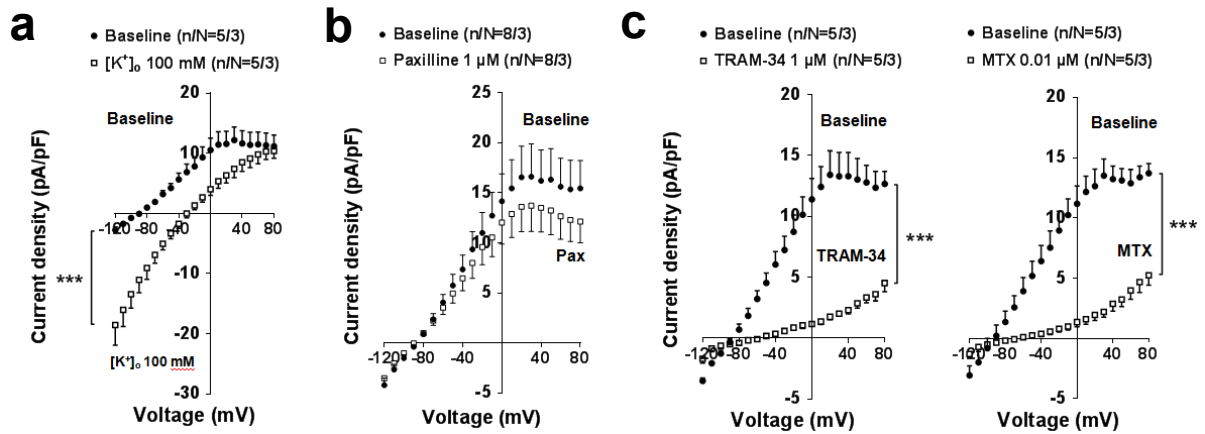


Figure 3. Properties of endogenous Ca^{2+} -activated K^+ current in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs and responses to various blockers. (a) Effect of increasing $[K^+]_o$ to 100-mmol/L on Ca^{2+} -activated currents. (b-c) Responses of currents in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs to BKCa and KCa3.1-blockers. * $P < 0.01$ vs. baseline, by two-way repeated-measures ANOVA; n/N = cells/dogs per group.**

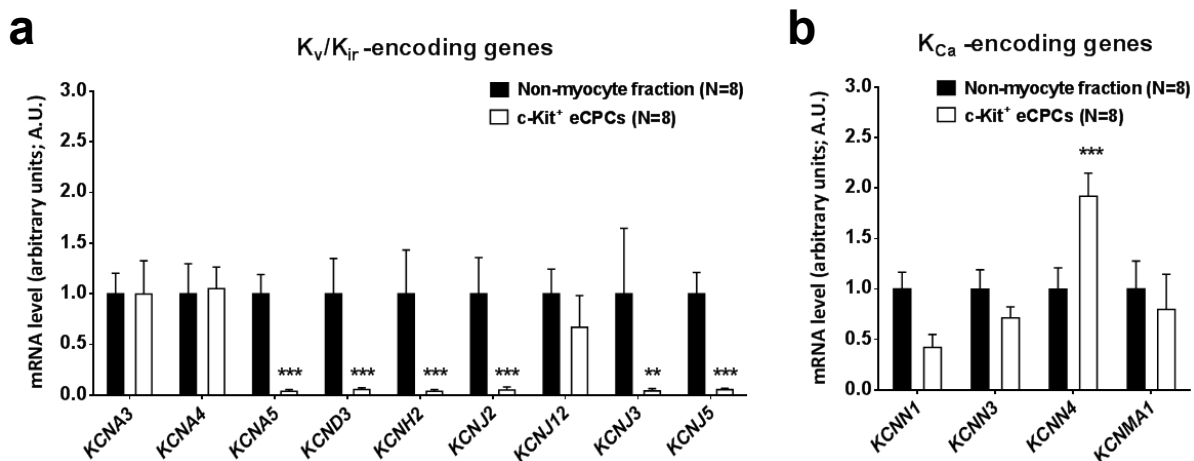


Figure 4. Expression of ion-channel subunits in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs. (a) mRNA expression of subunits encoding voltage-gated (K_v) K^+ channels and inward-rectifier (K_{ir}) K^+ channels in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs and non-myocyte fraction. (b) Ca^{2+} -activated K^+ channels (K_{Ca}) in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs and non-myocyte fraction. Expression levels are relative to cells from the non-myocyte fraction from which c-Kit⁺ eCPCs were purified. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. non-myocyte fraction, by paired student t -tests; N = dog.

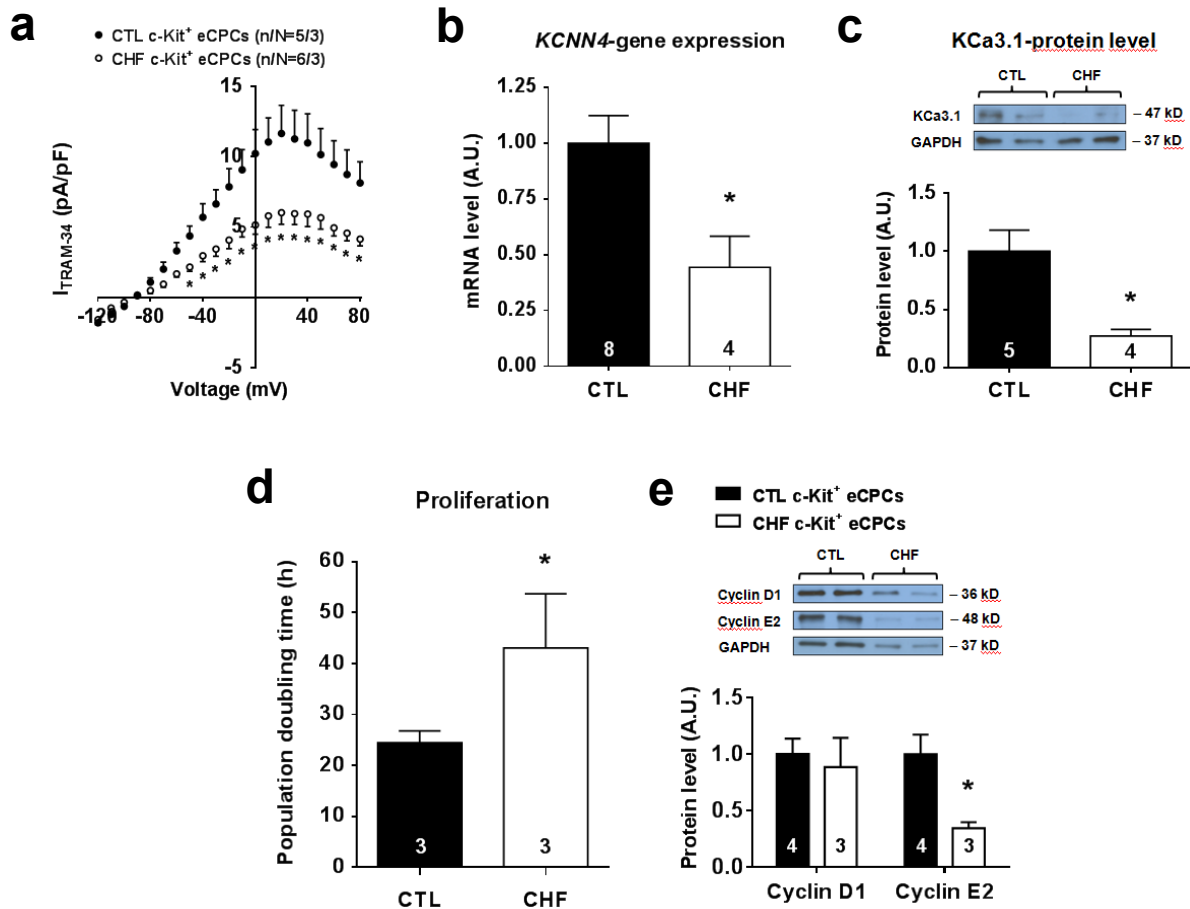


Figure 5. Impact of heart disease on *KCa3.1* expression and proliferation markers in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs. (a) $I_{TRAM-34}$ (*KCa3.1* current) mean \pm SEM density in c-Kit⁺ eCPCs freshly-isolated from control (CTL) and CHF dog hearts. (b) *KCNN4*-gene expression level in CTL and CHF c-Kit⁺ eCPCs. (c) *KCa3.1*-protein expression level in CTL and CHF c-Kit⁺ eCPCs. (d) Population doubling time of CTL and CHF c-Kit⁺ eCPCs (passages 2-4). (e) Cyclin expression profiles of CTL vs. CHF c-Kit⁺ eCPCs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. CTL c-Kit⁺ eCPCs, by non-paired student t -test; n/N = cells/dogs per group (panels a-b); numbers shown on bars are numbers of dogs per group (panels c-f).

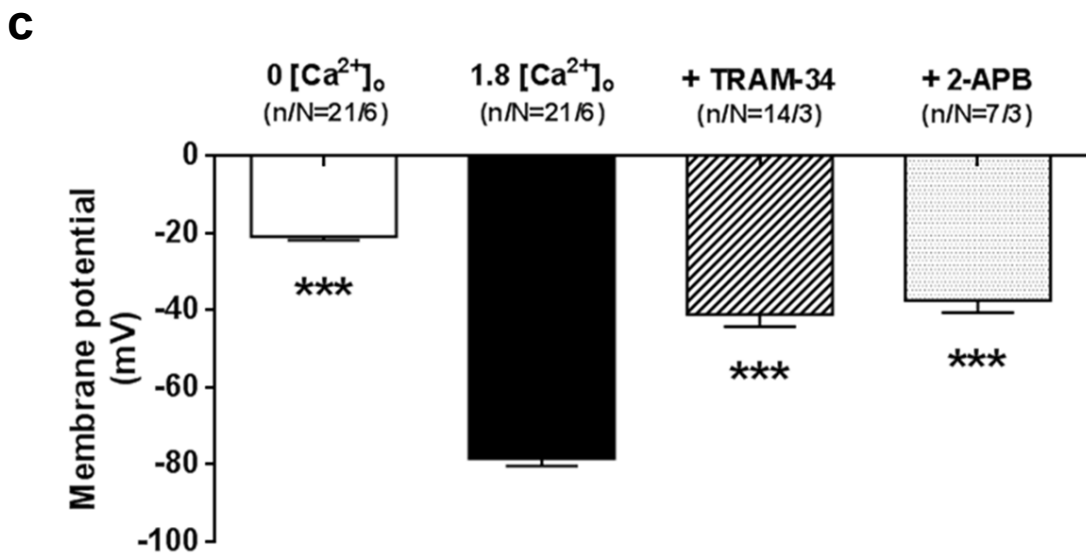
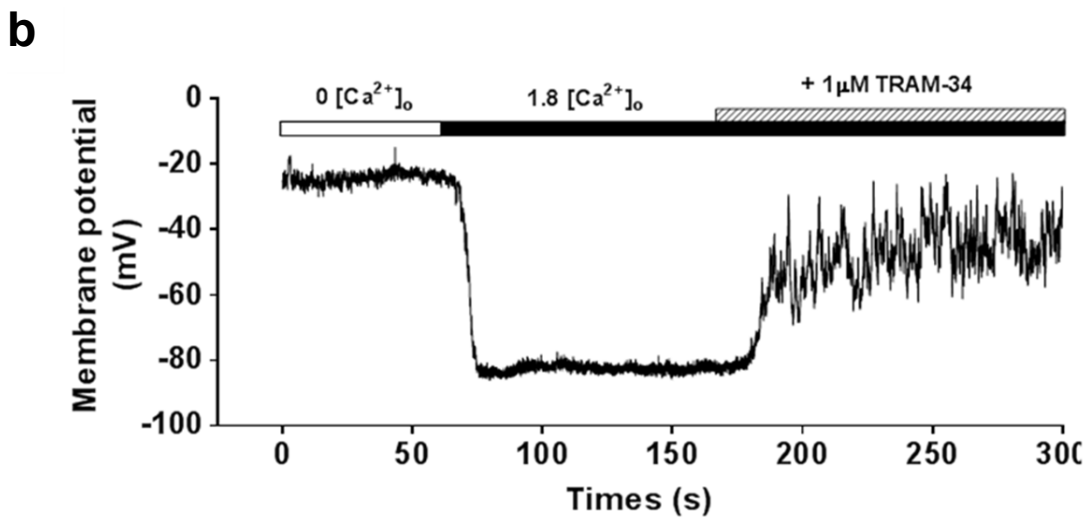
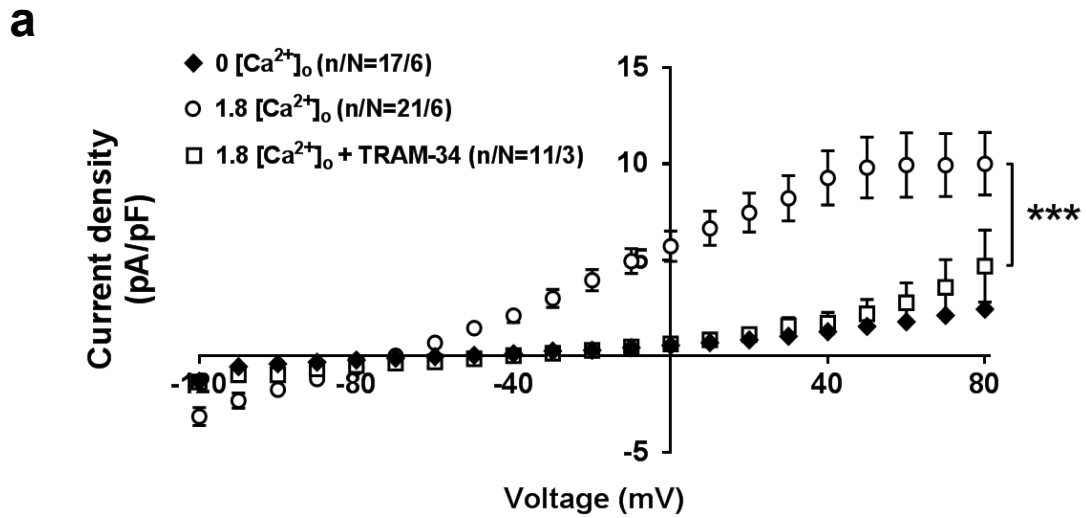


Figure 6. KCa3.1-currents and membrane potential changes during SOCE in c-Kit⁺ eCPCs. (a) Mean \pm SEM I - V curves of whole cell currents before and during SOCE, in the absence or presence of 1- μ mol/L TRAM-34. (b) Original current-clamp recordings in a single cell and (c) mean \pm SEM data for V_{mem} changes induced by SOCE upon re-exposure to 1.8-mmol/L $[\text{Ca}^{2+}]_o$. 2-APB = 2-aminoethoxydiphenyl borate (250- μ mol/L). *** $P < 0.001$ vs. 1.8-mmol/L $[\text{Ca}^{2+}]_o$, by two-way repeated-measures ANOVA (panel a); one-way ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected t -tests (panel c); n/N = cells/dogs per group.

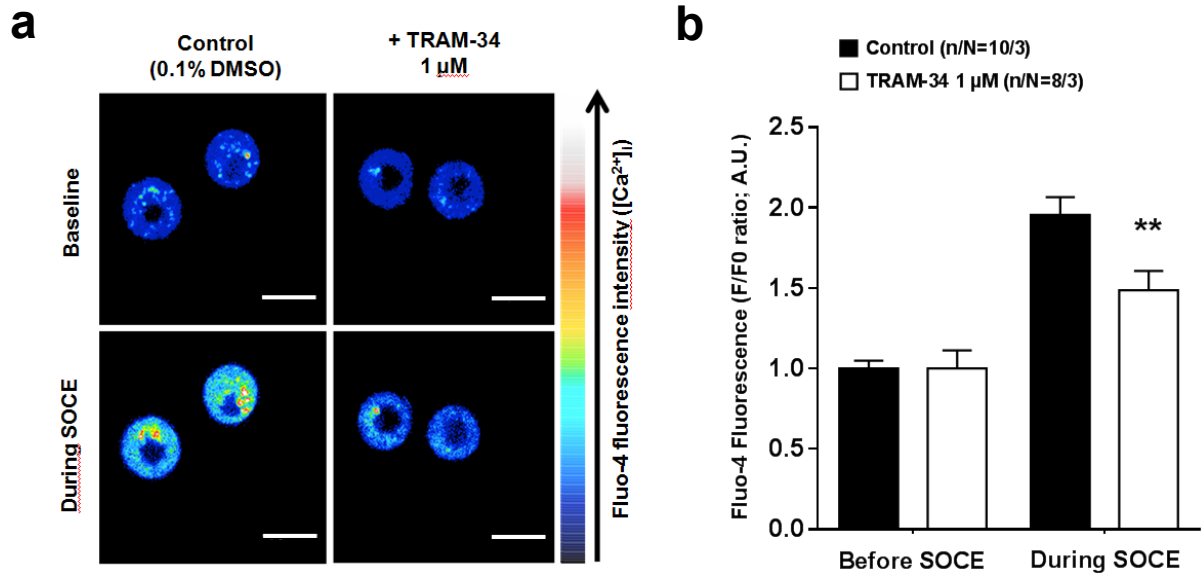


Figure 7. Intracellular $[Ca^{2+}]$ changes during SOCE in c-Kit⁺ eCPCs. (a) Representative Fluo-4 images in freshly-isolated c-Kit⁺ eCPCs. (b) Mean \pm SEM data for Fluo-4 signal intensity acquired before and during SOCE without or with exposure to TRAM-34. ****** $P < 0.01$ vs. control (0.1% DMSO), by two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni-corrected t -tests to compare differences between individual mean values; n/N = fields/dogs per group. Scale bars, 10 μ m.

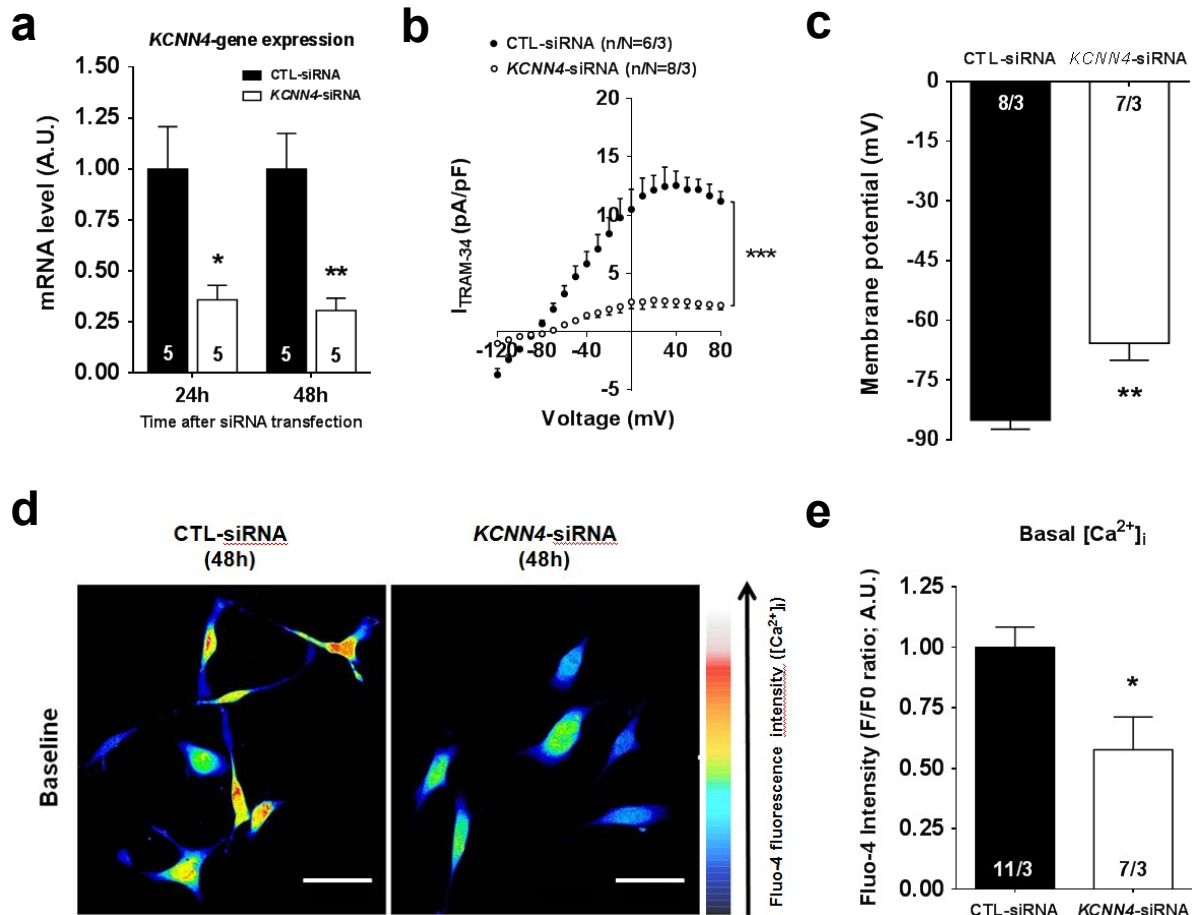


Figure 8. Effect of *KCNN4*-gene knockdown on $\text{KCa}_{3.1}$ current, membrane-potential and intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in c-Kit^+ eCPCs. (a) Mean \pm SEM *KCNN4*-gene expression in c-Kit^+ eCPCs following control and *KCNN4*-siRNA molecules delivery (numbers shown are numbers of independent experiments). (b) $I_{\text{TRAM-34}}$ mean \pm SEM density 48 hours after *KCNN4*-gene knockdown. (c) V_{mem} in control and *KCNN4*-gene knockdown c-Kit^+ eCPCs recorded with the perforated-patch technique. (d) Representative Fluo-4 images in expanded c-Kit^+ eCPCs (passage 2) following knockdown of *KCNN4*. (e) Mean \pm SEM data for basal Fluo-4 signal intensity (indicating $[\text{Ca}^{2+}]_i$) acquired 48 hours after *KCNN4*-gene knockdown. * $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs. CTL-siRNA, by two-way repeated-measures ANOVA (panel b); non-paired student *t*-tests (panels c,e); n/N = cells/dogs per group (panels b-c); n/N = fields/dogs per group (panel e). Scale bars, 50 μm**

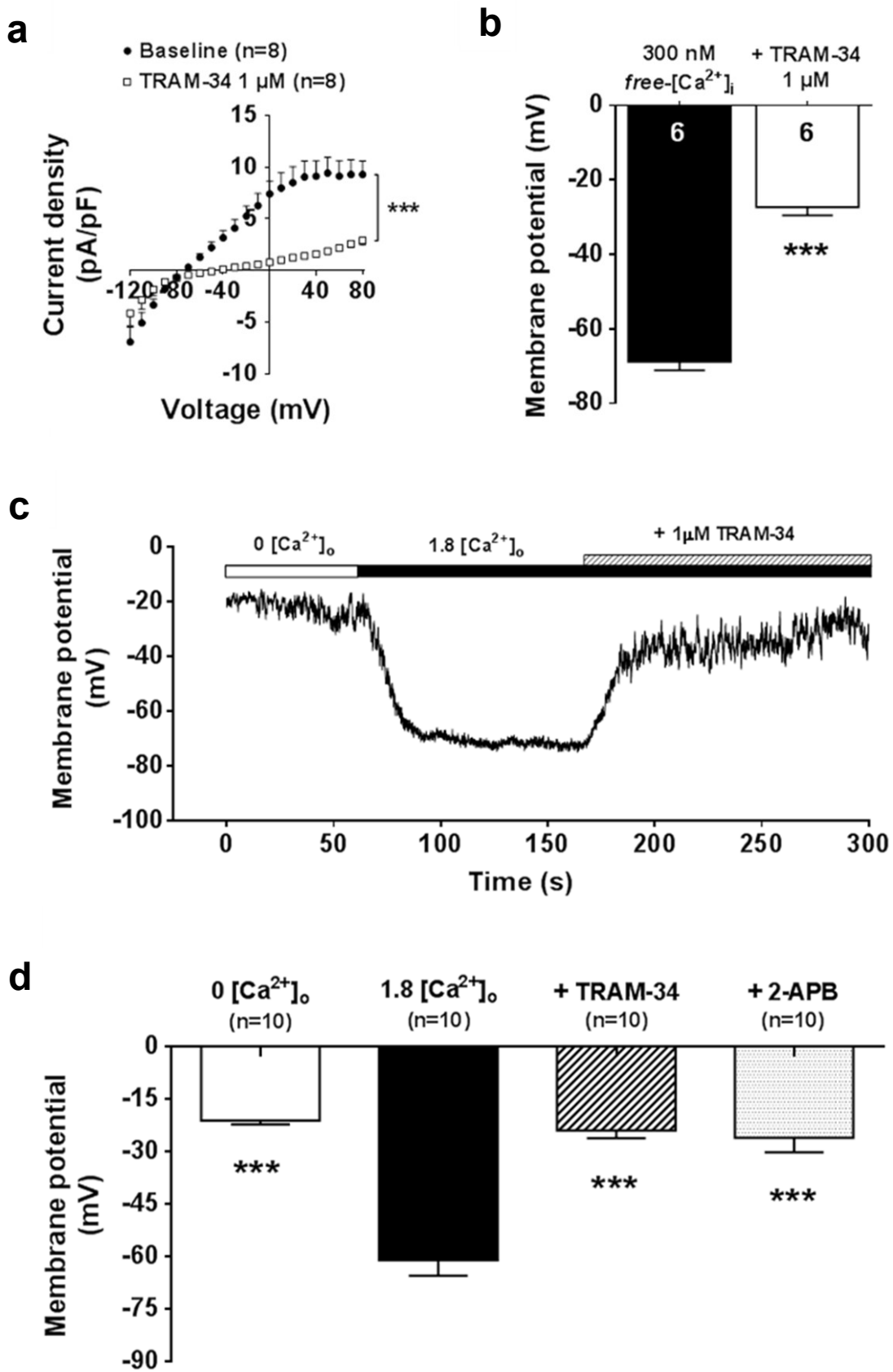


Figure 9. KCa3.1 current and membrane-potential changes during SOCE in dog BM-MSCs. (a) $I_{\text{TRAM-34}}$ mean \pm SEM density in expanded dog BM-MSCs. (b) V_{mem} in MSC before and after KCa3.1 blockade with TRAM-34. (c) Original current-clamp recording from one cell and (d) mean \pm SEM data for V_{mem} changes induced by SOCE. *** $P < 0.001$ vs. corresponding group, by two-way repeated-measures ANOVA (panel a); paired student t -test (panel b); one-way ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected t -tests (panel d); numbers shown on bars are numbers of cells studied.

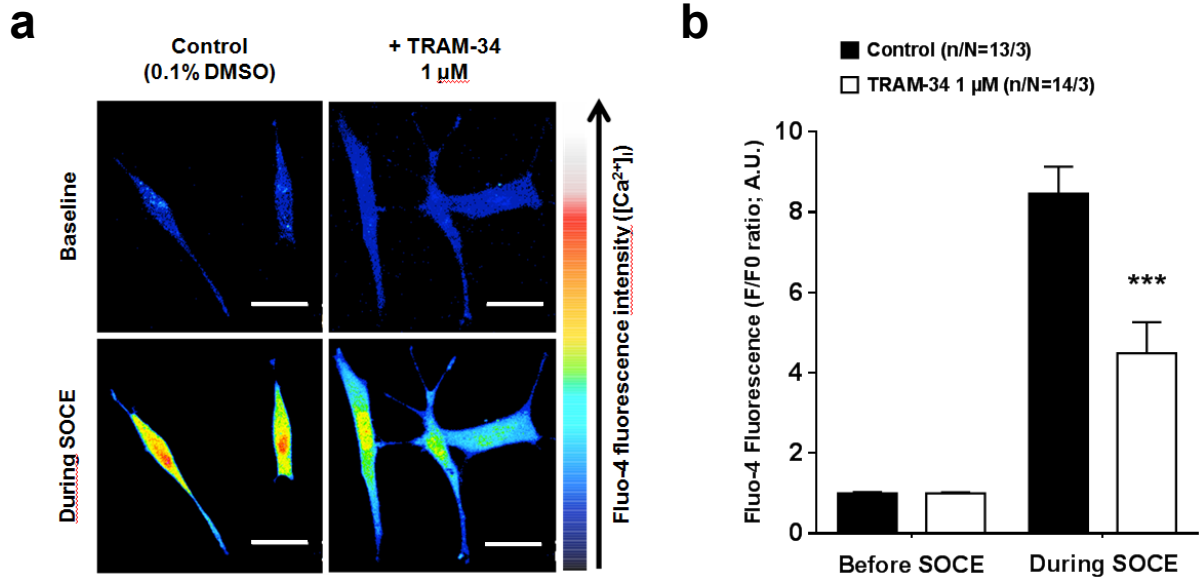


Figure 10. Intracellular $[Ca^{2+}]$ changes during SOCE in dog BM-MSCs. (a) Representative Fluo-4 images in expanded dog MSCs (passage 8). (b) Mean \pm SEM data for Fluo-4 signal intensity acquired before and during SOCE without or with exposure to TRAM-34. *** $P < 0.001$ vs. corresponding control (0.1% DMSO), by two-way repeated-measures ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected t -tests; n/N = fields/dogs per group. Scale bars, 30 μ m.

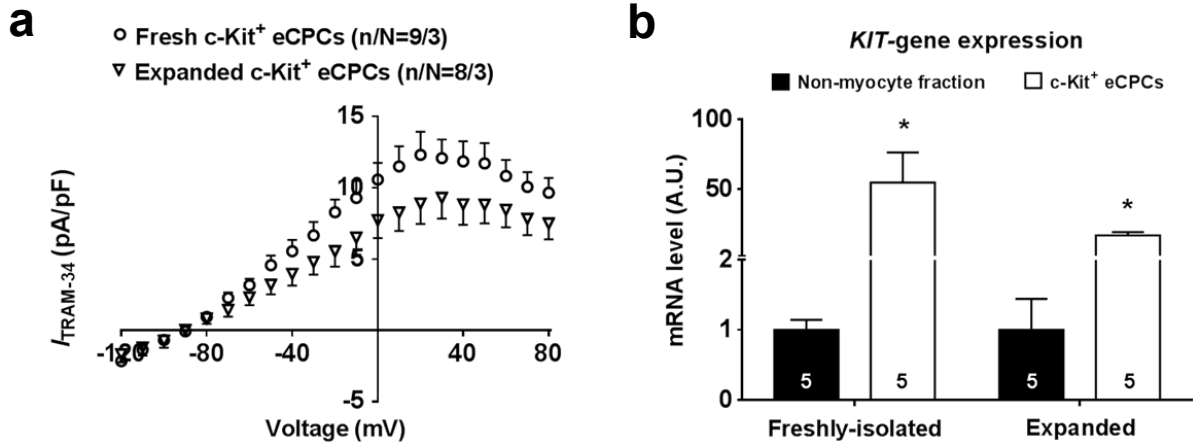


Figure 11. Effect of cell-culture on $I_{KC_{a3.1}}$ in c-Kit⁺ eCPCs. (a) Mean \pm SEM I - V curves of TRAM-34-sensitive ion-currents recorded in freshly-isolated and cultured c-Kit⁺ eCSCs (300-nmol/L free-[Ca²⁺]_i). n/N = cells/dogs per group. (b) *KIT*-gene expression level in freshly-isolated and *ex vivo* proliferated c-Kit⁺ eCPCs compared to non-myocyte fraction (passage 4). * $P < 0.05$ vs. non-myocyte fraction, by two-way repeated-measures ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected t -tests; numbers shown on bars are numbers of dogs per group.

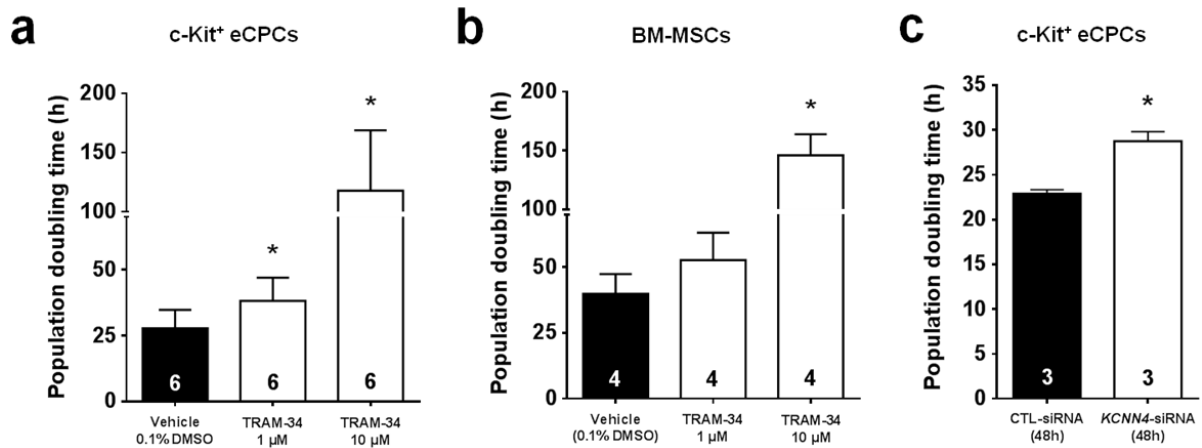


Figure 12. Effect of KCa3.1 inhibition on proliferation of progenitor cells. (a-b) Population doubling time of c-Kit⁺ eCPCs and BM-MSCs after treatment with 10-μmol/L TRAM-34 for 48 hours. **(c)** Population doubling time of c-Kit⁺ eCPCs following *KCNN4*-gene knockdown. * $P < 0.05$ vs. vehicle (0.1% DMSO), by one-way ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected *t*-tests (panels a-b); paired student *t*-test (panel c); numbers shown on bars are numbers of dogs per group.

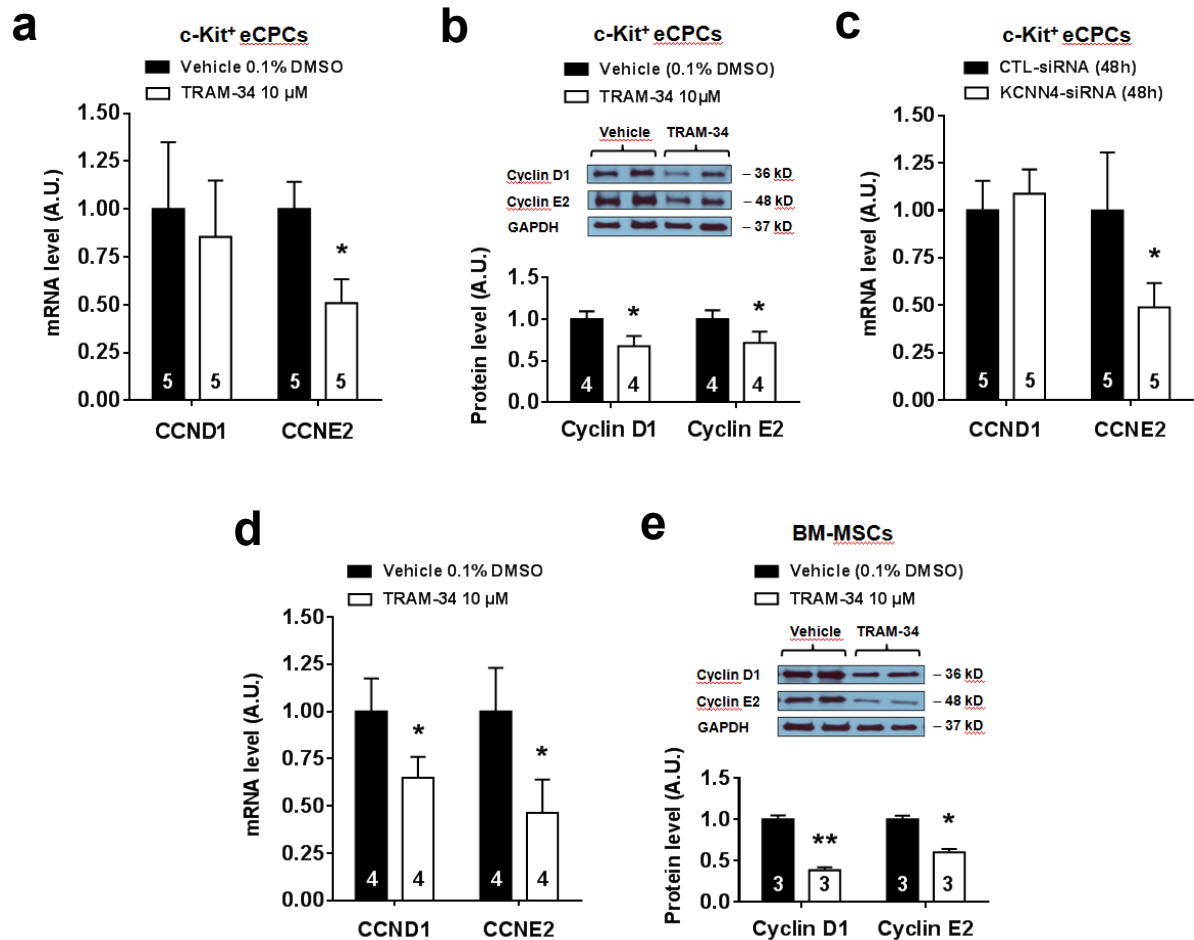


Figure 13. Effect of KCa3.1 inhibition on cyclin-expression in progenitor cells. (a-b) Cyclin expression profiles of c-Kit⁺ eCPCs after treatment with 10-μmol/L TRAM-34 for 48 hours and (c) following *KCNN4*-gene knockdown and after treatment with 10-μmol/L TRAM-34 for 48 hours (passage 2-4). (d-e) Cyclin expression profiles of BM-MSCs after treatment with 10-μmol/L TRAM-34 for 48 h (passage 4-8). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. control (0.1% DMSO), by paired student *t*-tests; numbers shown on bars are numbers of dogs per group.

**CHAPITRE 3 – Electrophysiological Engineering of
Heart-Derived Cells for Regenerative Therapy: Calcium-
Dependent Potassium Channels Govern Cell Therapy
Efficacy for Cardioprotection**

Mise en contexte

Bien que les travaux de recherche précliniques et cliniques effectués jusqu'à présent ont établi le potentiel que représente la thérapie cellulaire en IC, une meilleure compréhension des mécanismes qui régulent la fonction des cellules souches est primordiale afin de développer de nouvelles stratégies pour optimiser le potentiel de la thérapie cellulaire en cardiologie. De nombreuses évidences expérimentales soulignent le rôle des canaux ioniques dans la régulation des processus physiologiques cellulaires. Considérant l'importance de KCa3.1 pour la fonction des eCPCs c-Kit⁺, le profil d'expression des canaux potassiques activés par le Ca²⁺ (KCa) ainsi que leur implication en thérapie cellulaire cardiaque a été investiguée.

*Vigneault, P., Parent, S., Kanda, P., Michie, C., Davis, D. R. and Nattel, S.,
Electrophysiological engineering of heart-derived cells for regenerative therapy:
Calcium-dependent potassium channels govern cell therapy efficacy for
cardioprotection. Nat Commun. 2019. (manuscript in revision).*

Contributions des auteurs

P.V. a formulé l'hypothèse et conceptualisé l'étude; P.V et S.P. ont effectué les expériences primaires et analysé les données; S.N. et D.R.D. ont participé à la formulation de l'hypothèse, supervisé les travaux, discuté des résultats et édité le document; P.K. et C.M. ont réalisé certaines expériences in vitro et l'analyse subséquente des données. Tous les auteurs approuvent la version finale du manuscrit ainsi que tous les aspects du travail.

Electrophysiological Engineering of Heart-Derived Cells for Regenerative Therapy: Calcium-Dependent Potassium Channels Govern Cell Therapy Efficacy for Cardioprotection

Patrick Vigneault, MSc[†]; Sandrine Parent, BSc[†]; Pushpinder Kanda, MSc;
Connor Michie, BSc; Darryl R. Davis, MD[‡]; Stanley Nattel, MD^{‡*}

[†]Co-first authors; [‡]co-senior authors.

Short title: KCa3.1 Governs Cell Therapy Efficacy.

Table of Contents Category: Molecular and cellular.

Keywords: Ion channels – Cardiac progenitors – Cell therapy

From the Research Center and Department of Medicine, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada (P.V., S.N.); University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, Ontario, Canada (S.P., P.K., C.M., D.R.D.), Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada (S.N.) and Institute of Pharmacology, West German Heart and Vascular Center, Faculty of Medicine, University Duisburg-Essen, Essen, Germany (S.N.).

*Correspondence to Stanley Nattel, Montreal Heart Institute Research Center, 5000 Belanger St E, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada. E-mail: stanley.nattel@icm-mhi.org; T: 514-376-3330 ext 3990; F: 514-593-2493.

Abstract

We have shown that calcium-activated potassium (KCa) channels regulate fundamental progenitor-cell functions, including proliferation, but their contribution to cell-therapy effectiveness is unknown. Here, we test the participation of KCa channels in human heart explant-derived cell (EDC) physiology and therapeutic potential. TRAM34-sensitive KCa3.1 channels, encoded by the *KCNN4* gene, were exclusively expressed in therapeutically bioactive EDC subfractions and maintained a strongly polarized resting potential; whereas therapeutically inert EDCs lacked KCa3.1 channels and exhibited depolarized resting potentials. Somatic gene transfer of *KCNN4* resulted in membrane hyperpolarization and increased intracellular $[Ca^{2+}]$, which boosted cell-proliferation and the production of pro-healing cytokines/nanoparticles. Intramyocardial injection of EDCs after *KCNN4*-gene overexpression markedly increased the salutary effects of EDCs on cardiac function, viable myocardium and peri-infarct neovascularization in a well-established murine model of ischemic cardiomyopathy. Thus, electrophysiological engineering provides a valuable new strategy to improve the therapeutic value of progenitor cells for cardioprotection and possibly other indications.

Introduction

Despite significant advances in the management of cardiac diseases, heart failure remains one of the top killers worldwide¹. In response, stem cell therapy has emerged as a potential approach to prevent the progression of heart failure² and, amongst the number of candidates proposed for cardiac cell therapy, heart explant-derived cells (EDCs) have been developed as a promising paracrine-based cell therapeutic^{3,4}. Previous work has shown that EDCs are intrinsic cardiac CD105⁺ cells that reduce pathological cardiac remodeling and improve myocardial function⁵. Akin to non-cardiac cell products, clinical comorbidities may attenuate the regenerative potency of EDCs⁶⁻⁸ but very few markers of product identity have been shown to clearly predict an inert cell product, which makes clinical reliability and translation challenging.

In this study, we focus on the regulation of membrane potential (V_{mem}) and intracellular Ca^{2+} , which can exert significant influence over stem cell properties⁹. We recently showed that the function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and resident cardiac c-Kit⁺ cells is critically governed by the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel KCa3.1 (encoded by the *KCNN4* gene)¹⁰. In both adult progenitor cell types, KCa3.1 channels open in response to store-operated Ca^{2+} -entry (SOCE) to hyperpolarize the cell membrane, increase the driving force for Ca^{2+} entry and enhance transmembrane Ca^{2+} flux. KCa3.1 channel inhibition decreased SOCE, which suggested that Ca^{2+} induced increases in KCa3.1 are necessary to optimize membrane potential during Ca^{2+} entry. Based on these insights, we hypothesized that KCa3.1 channel activity might influence the behavior of therapeutically relevant cells, and that *KCNN4* overexpression might improve therapeutic efficacy by optimizing V_{mem} during SOCE. Here, we test this hypothesis and

provide the first evidence that tailoring plasma-membrane ion-channel function influences the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human cells using a promising adult cell therapeutic within an established immunodeficient mouse model of ischemic cardiomyopathy.

Methods

Cell Culture and Lentiviral Transduction

Human EDCs were cultured from left atrial appendages donated by patients undergoing clinically indicated heart surgery after obtaining informed consent under a protocol approved by the University of Ottawa Heart Institute Research Ethics Board as previously described⁴. As shown in Supplementary Table 1, there were no significant differences in the characteristics of patient cell lines used for in vitro or in vivo experiments. Briefly, cardiac biopsies were minced, digested (Collagenase IV, Thermo Fischer Scientific) and plated within MSC Nutristem XF medium (Biological Industries) exposed to physiologic (5%) oxygen⁵⁰. Once a week for 4 weeks, EDCs that spontaneously emerged from the plated biopsy were collected using TrypLE Select (Thermo Fischer Scientific). Cells were transduced with lentivirus to overexpress *KCNN4* (OHS6085-213573573, GE Healthcare Dharmacon), empty backbone (25890, Addgene). Two days later, cells were harvested using TrypLE Select for direct experimentation.

Ion-Current and V_{mem} Recording

All in vitro recordings were obtained at 37°C. Whole-cell perforated-patch and tight-seal techniques were used to record membrane potential (V_{mem} , current-clamp mode) and ion-currents (voltage-clamp mode). Borosilicate glass electrodes (tip resistances 2-3 M Ω when filled with pipette-solution) were connected to a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B; Axon Instruments). $I_{KCa3.1}$ was recorded as 1- μ mol/L TRAM-34-sensitive current, and I_{BKCa} as 1- μ mol/L paxilline-sensitive current. Tyrode solution contained (mmol/L) NaCl 136, CaCl₂ 1.8, KCl 5.4, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.33, dextrose 10, and HEPES 5, titrated to pH 7.4

with NaOH. For nominally Ca^{2+} -free Tyrode solution experiments, CaCl_2 was omitted and 1 mM EGTA was added. The pipette solution used to define global ion-current profiles contained (mmol/L) GTP 0.1, potassium-aspartate 110, KCl 20, MgCl_2 1, MgATP 5, HEPES 10, sodium-phosphocreatine 5, and EGTA 5 (pH 7.4, KOH). For $I_{\text{KCa3.1}}$ recording, the pipette solution contained (mmol/L) KCl 130, NaCl 5, MgCl_2 1, K_2ATP 5, HEPES 10 and EGTA 5 (pH 7.2, KOH). The amount of CaCl_2 required to achieve 300-nmol/L free- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was determined with WebMaxC software (University of California, Davis). Junction potentials between bath and pipette solution averaged 10 mV and were corrected before recording, for both V_{mem} and ion-current measurements. Currents are expressed as densities (pA/pF) to control for cell size/capacitance differences. To study the effect of SOCE on V_{mem} , Ca^{2+}_i was depleted passively by bathing cells in Ca^{2+} -free Tyrode solution for at least 30 minutes, and then cell-contents were dialyzed by tight-seal attachment with pipette solutions containing (mmol/L) KCl 140, NaCl 5, MgCl_2 1.2 and HEPES 10 (pH 7.2, KOH). After whole-cell configuration and cell-dialysis were established, extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ was restored and V_{mem} changes were recorded. Before starting patch-clamp experiments, a fluorescently-tagged antibody (FAB2067G, R&D Systems) was used to label the CD90^+ subpopulation.

Ca^{2+} -Imaging

EDCs genetically engineered to overexpress *KCNN4* (*KCNN4*-EDCs) and empty backbone-transduced EDCs (EV-EDCs) were loaded with Fluo-4-acetoxymethyl ester (10- $\mu\text{mol/L}$; Invitrogen) in complete growth medium in the presence of Pluronic F-127 (20% solution in dimethylsulfoxide, 2.5- $\mu\text{g/mL}$) for 30 minutes at 37°C in a humidified incubator under standard cell culture conditions. Chamber slides were positioned on the stage of a confocal

microscope; cells were incubated with Tyrode solution and maintained for 15 minutes at room temperature before experimental protocols to allow deesterification of Fluo-4-acetoxymethyl ester. Fluo-4 was excited at 488 nm; emitted fluorescence was collected at 495 nm. High power field images were acquired with a confocal microscope (Olympus IX81). Basal intracellular Ca^{2+} level was assessed in both groups. Images were analyzed with ImageJ software. Data are presented as mean fluorescence intensity relative to EV-EDCs.

Colorimetric, Flow Cytometric, Immunohistochemical, Proteomic and Extracellular Vesicle Evaluation

EDC proliferation was measured in conditions designed to mimic the ischemic environment of the heart (1% oxygen, basal media without growth factors). Relative cell counts were evaluated using a colorimetric WST-8 assay (Cell Counting Kit-8, Dojindo) with confirmatory manual cell counts and random field analysis for Ki67/ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) expression (12 visual field per cell line; ab156956, Abcam). After 18 hours of culture in 1%-oxygen basal media without growth factors conditions, EDCs and the culture medium were collected for analysis. Flow cytometry (Guava easyCyte, EMD Milipore) was used to evaluate cell viability with phycoerythrin-Annexin 5 (PE-Annexin V) and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (559763, BD Biosciences). The relative abundance of select cytokines within conditioned media was evaluated with Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems). Nanoparticle Tracking Analysis (Nanosight V2.3) was used to quantify extracellular vesicle content within conditioned media followed by multiplex fluorescent oligonucleotide-based miRNA detection (Human v3, Nanostring) to miRNA content within extracellular vesicles. Briefly, miRNeasy Micro Kit (Qiagen) was

used to extract total RNA with RNA quality/quantity measured Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Twenty-five nanograms of RNA were used for each reaction (Counter Human V3 miRNA Expression Assay, Nanostring). Image-quality control metrics were evaluated with nSolver (Nanostring); background subtraction was performed with the mean of negative controls plus two standard deviations. Normalized counts were obtained with trimmed-mean of M values (TMM)⁶⁴ and differentially expressed miRNA identified with the generalized linear model (GLM) likelihood-ratio-test⁶⁵ using EdgeR in the online DEBrowser tool (University of Massachusetts Medical School). Heat maps were created in DEBrowser tool using the “complete” clustering method.

In vivo Protocol

This protocol was reviewed and approved by the University of Ottawa Animal Care Committee. The detailed protocol was registered a priori within the Open Science Framework (<https://osf.io/nx2ck/>). Male NOD/SCID IL2R γ mice (8-9 weeks old; Charles River) were pre-treated with buprenorphine and anaesthetized with isoflurane under normothermic temperature control, for surgical LCA ligation. Seven days after LCA ligation, animals were randomized to echocardiographic guided intra-myocardial injection of 100,000 unmodified EDCs (NT-EDCs), 100,000 *KCNN4*-EDCs, 100,000 EV-EDCs or saline (i.e., vehicle-treated group) divided into two injections at the apex and ischemic border zone^{6-8,20,23,45}. During the surgery and functional evaluation, mice were intubated, anesthetized with 2-3% isoflurane and maintained under physiologic temperature control. All animals were injected with buprenorphine (0.05 mg/kg subcutaneous) 1 hour prior to surgery and twice

daily thereafter for 3 days. All mice were injected with bromodeoxyuridine (BrdU, 100 mg/kg I.P. daily) for 1 week after cell/vehicle injection.

Laboratory staff were blinded to treatment allocations and all outcome assessment and analysis was conducted by individuals blinded to group allotment. Group allocations were kept in a separate password protected list for unblinding after analysis of functional study outcome was completed. All mice underwent echocardiographic imaging to confirm the effects of LCA ligation (1-week post LCA ligation) and cell therapy (21 days post-cell/vehicle injection). Twenty-eight days after cell/vehicle injection, mice underwent invasive hemodynamics or invasive electrophysiological study prior to sacrifice. Mice randomized to invasive hemodynamics underwent insertion of a 1.2F Millar catheter into the left ventricle via the right carotid artery. Transient inferior vena cava (IVC) occlusion to reduce preload was used to change the loading conditions and generate pressure-volume loops. Mice randomized to invasive electrophysiological testing underwent a thoracotomy to expose the apex of the heart prior to programmed electrical stimulation (MyoPacer EP, Ion Optix) via a platinum electrode placed on the apex of the left ventricle⁵¹. A standard programmed electrical stimulation protocol was performed, consisting of 10 stimuli delivered at 100 ms intervals (S1, twice threshold, 2 ms) followed by a single extrastimulus (S2) starting at a coupling interval of 80 ms which then decremented by 2 ms until failure to capture defined the effective refractory period (ERP). If ventricular tachycardia or fibrillation were not induced, a second extrastimulus (S3) was introduced 80 ms after the shortest S2 that captured the ventricle. The S3 was then progressively decremented by 2-ms intervals until the ERP was reached. Finally, a third extrastimulus (S4) was introduced 80 ms after the last S3 that captured the ventricle and was then decremented by 2 ms intervals until the ERP was

reached. If the mouse failed to develop ventricular arrhythmias with extrastimuli, the animal was deemed non-inducible. Infarct size was quantified using histological sections stained with Mason-Trichrome (ThermoFisher) in which sections at equivalent distances from the LCA surgical stitch were directly compared. Infarcted wall thickness was defined as the average of 5 left ventricular wall thickness measurements distributed equally within the infarcted left ventricular scar, while the ischemic risk region was defined as the area between the two edges of the infarct scar⁵². Adjacent sections were used for immunohistochemical detection of capillary density (isolectin B4, B-1205, Vector Laboratories) or endogenous proliferation (BrdU, ab6326, Abcam) in conjunction with DAPI (Sigma-Aldrich) or cardiac troponin-T (cTnT, ab125266; Abcam) labelling. Human-cell engraftment was quantified using quantitative polymerase chain reaction for retained human Alu sequences^{6-8,20,23,45}.

Statistical Analysis

Clampfit 10.4 (Axon Instruments) and GraphPad Prism 6.0 were used for data analysis. All data are presented as mean \pm SEM. Multiple group comparisons were obtained with one-way ANOVA for non-repeated analyses in experiments involving more than 2 groups and two-way repeated-measures ANOVA for all multi-group analyses involving repeated measures. In all cases, normality was confirmed prior to further post-hoc testing. If ANOVA showed significant differences, Bonferroni's multiple comparisons test was used to compare individual means. Differences in categorical measures were compared using Fischer's exact test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Distinct endogenous currents exist in human EDCs

EDCs were obtained from patients with characteristics shown in Supplementary Table 1. Intriguingly, recent evidence has suggested that the major antigenic population found within ex vivo expanded heart derived cells (the CD90 negative population, CD90⁻) constitutes the therapeutically active fraction within these heart-derived cell preparations and is responsible for most of the functional benefits associated with cell transplantation^{11,12}.

Thus, to characterize endogenous Ca²⁺ activated K⁺ (K_{Ca}) channels within physiologically relevant subpopulations, CD90⁺ cells were fluorescently labeled before starting patch-clamp experiments. Under conditions that allow the activation of Ca²⁺-dependent current, we recorded outwardly-rectifying voltage-dependent currents in both CD90⁺ and CD90⁻ cells (Figure 1a). The reversal potential (E_{rev}) of these currents averaged -51 ± 5 mV and -75 ± 5 mV ($P < 0.01$) for CD90⁺ and CD90⁻ cells, respectively (Figure 1b). Although whole-cell ion current density was found to be of the same order in both cell types (Figure 1c), the differences in E_{rev} hinted that the two subpopulations possess distinct bioelectrical properties, and thus different profiles of plasma membrane ion channels.

EDCs contain 2 types of Ca²⁺-dependent K⁺ currents with distinct contributions to V_{mem}

Since currents recorded in EDCs displayed some biophysical characteristics (like outward rectification) of the large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ current (I_{BKCa}), we tested the response to the selective BK_{Ca}-blocker paxilline. The outwardly-rectifying current-voltage (I - V) relationship of EDCs was strongly affected by paxilline, leaving a substantial inwardly-rectifying current in CD90⁻ cells and a smaller residual outwardly-rectifying current in

CD90⁺ cells (Figure 1d). The paxilline-sensitive current representing I_{BKCa} was large and similar in both cell-types (Supplementary Figure 1a).

V_{mem} (recorded with perforated-patch methods to maintain the physiological intracellular milieu) was significantly less negative in CD90⁺ cells versus CD90⁻ cells (-25 ± 2 mV vs. -64 ± 7 mV; $P < 0.001$) and was unaffected by paxilline (Supplementary Figure 1b), suggesting that it is governed by another charge-carrier(s). The differences in paxilline-resistant current between the 2 cell-types was due to a TRAM-34-sensitive component, since their $I-V$ relationships became indistinguishable after exposure to the selective KCa3.1-blocker TRAM-34 (Figure 1e). In contrast to the substantial KCa3.1 currents (TRAM-34-sensitive; $I_{KCa3.1}$) in the CD90⁻ subpopulation, $I_{KCa3.1}$ was negligible in CD90⁺ cells (Figure 2a). Blocking $I_{KCa3.1}$ with TRAM-34 substantially depolarized V_{mem} of CD90⁻ EDCs without altering V_{mem} of CD90⁺ cells (Figure 2b). In the presence of TRAM-34, the V_{mem} of CD90⁻ EDCs became similar to that of CD90⁺ cells. These results indicate that the V_{mem} of EDCs is largely determined by TRAM-34-sensitive K_{Ca}3.1 conductance, which is substantial in CD90⁻ cells and undetectable in CD90⁺ cells.

V_{mem} is controlled by Ca²⁺-dependent K⁺ currents during Ca²⁺-entry

One potential role for $I_{KCa3.1}$ in EDCs would be hyperpolarization of V_{mem} to optimize Ca²⁺-inflow during SOCE, as previously demonstrated for cardiac-derived c-Kit⁺ cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells¹⁰. To address this possibility, we induced SOCE in EDCs and monitored V_{mem} (Figure 2c-d). In the presence of very low intracellular [Ca²⁺] resulting from perfusion with nominally Ca²⁺-free extracellular solution, V_{mem} was approximately -25 mV in both CD90⁺ and CD90⁻ cells. Following store-depletion, the

addition of 1.8-mmol/L extracellular Ca^{2+} induced a strong hyperpolarization in CD90^- cells (from -25 ± 3 mV to -67 ± 3 mV, $P < 0.001$), but had no effect on V_{mem} in CD90^+ cells. The addition of TRAM-34 during SOCE strongly inhibited the SOCE-associated hyperpolarization (Figure 2d), indicating a key role for $I_{\text{KCa3.1}}$ in governing V_{mem} in CD90^- cells during activation by SOCE.

***KCNN4*-gene transfer on hyperpolarizes V_{mem} and increases intracellular Ca^{2+}**

These observations are consistent with the notion that the differential expression of *KCNN4* contributes to the reduced regenerative performance of CD90^+ cells compared to $\text{CD90}^{-11,12}$, while providing a potential target to enhance the effectiveness of EDC therapy. We therefore engineered EDCs to overexpress KCa3.1 -current in EDCs prior to in vivo cell delivery. Lentivirus-mediated *KCNN4*-gene transfer increased *KCNN4*-gene expression about 20-fold compared to the empty vector (EV) (Figure 3a).

KCNN4 overexpression conferred a much more homogeneous electrophysiological phenotype to EDCs: *KCNN4*-transfer increased $I_{\text{KCa3.1}}$ density and hyperpolarized V_{mem} to about the same level in both CD90^+ and CD90^- cells (-77 ± 2 mV vs. -81 ± 2 mV; Figure 3b-c). Because V_{mem} hyperpolarization is known to facilitate Ca^{2+} -entry through voltage-independent channels¹³, we investigated whether *KCNN4*-transfer would affect intracellular Ca^{2+} . Consistent with our hypothesis, we found that intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ was significantly higher under resting conditions in *KCNN4*-transferred EDCs compared to EV-control (Figure 3d). Taken together, these results indicate that KCa3.1 overexpression enhances Ca^{2+} signaling in EDCs.

Overexpression of *KCNN4* increases proliferation

When EDCs were exposed to in vitro culture conditions designed to mimic the harsh post-infarct environment (1% oxygen/H₂O₂/nutrient-deprived), both EV- and NT-EDC numbers decreased from baseline (Figure 4a), whereas overexpression of *KCNN4* significantly increased proliferation (Figure 4b and Supplementary Figure 2) without altering resistance to apoptosis (Figure 4c). Despite ongoing constitutive expression of *KCNN4*, somatic gene transfer did not reduce the cardiogenic potential of EDCs (Supplementary Figure 3).

Transplantation of *KCNN4*-engineered EDCs improves cardiac function after myocardial infarction

Male NOD/SCID IL2R γ mice underwent left coronary artery (LCA) ligation, which was followed 1 week later by randomization to echocardiographically guided intra-myocardial injection of EV-EDCs, *KCNN4*-EDCs, NT-EDCs or vehicle (Figure 5a). Laboratory staff were blinded to treatment allocations and all outcome assessment and analysis was conducted by individuals blinded to group allotment. As shown in Figure 5b and Supplementary Table 2, all animals demonstrated equivalent degrees of pretreatment cardiac dysfunction and chamber dimensions 1 week after LCA ligation. Mice that received EV- or NT-EDCs demonstrated similar improvements in echocardiographic (Figure 5b, $P < 0.05$ vs. vehicle) and hemodynamic (Figure 5b, Supplementary Figure 4 and Supplementary Table 3) measures of cardiac function 4 weeks after LCA ligation, suggesting that lentiviral transduction *per se* had no effect on cell-mediated improvement of ischemic injury. Animals that received *KCNN4*-transferred EDCs demonstrated significantly improved cardiac

function (Figures 5b-c, Supplementary Figure 4 and Supplementary Table 3) 4 weeks after LCA ligation as compared to animals that received vehicle, EV- and NT-EDCs.

Histological analysis revealed that treatment with *KCNN4*-EDCs reduced infarct size (Figure 6a) and increased both infarct wall thickness and the amount of live tissue within the ischemic area (Figure 6b). These salutary changes in cardiac structure were paralleled by increases in BrdU⁺ cells (Figure 6c and Supplementary Figure 5) and new blood-vessel formation (Figure 6d) within the peri-infarct area. Consistent with the increased in vitro proliferation that we observed, overexpression of *KCNN4* boosted the long-term retention of EDCs by 7 ± 2 -fold compared to intra-myocardial injection of NT-EDCs ($P = 0.01$; Figure 6e). By surface telemetry, EDC-transplantation had no effect on ECG-indices of heart rate, cardiac conduction or repolarization (Supplementary Table 4). Programmed electrical stimulation induced ventricular arrhythmias with 2 extra-stimuli in a single vehicle-treated animal (Supplementary Figure 6a) while all EDC-treated animals were non-inducible; EDC-transplantation had no detectable effect on cardiac electrophysiology in vivo (Supplementary Figure 6b). Thus, increasing $I_{KCa3.1}$ within EDCs boosts endogenous repair without affecting electrophysiological function of the heart or increasing susceptibility to malignant ventricular arrhythmias.

Overexpression of *KCNN4* increases cytokine and nanoparticle secretion

The cytokine signature of EDCs was profiled using an unbiased proteomic array capable of detecting 102 cytokines within conditioned media after 48 hours of cell culture in nutrient-deprived hypoxic media (1% oxygen) conditions (Figure 7a). Although *KCNN4* overexpression did not significantly increase the number of cytokines within conditioned

media as compared to EV-EDCs (39 vs. 42 cytokines, respectively; Chi square 0.33, $P = 0.56$), *KCNN4* overexpression increased the production of cytokines already found within EDC conditioned media (6 vs. 1 cytokine levels increased respectively; Chi square 3.78, $P = 0.05$). Interestingly, amongst the cytokines increased via *KCNN4* overexpression several implicated in angiogenesis (vascular endothelial growth hormone)^{14,15}, post-infarct healing (angiogenin^{16,17}, insulin-like growth factor binding protein 3¹⁸, stromal derived factor 1 alpha)^{19,20} and immune modulation (intercellular adhesion molecule 1)²¹ were found (Figure 7b).

Given recent evidence supporting a critical role for extracellular vesicles in the salutary benefits conferred by heart-derived cell therapy²², the effect of *KCNN4* overexpression on extracellular vesicle production was profiled. Media conditioned by *KCNN4*-EDCs demonstrated a 1.6 ± 0.2 fold increase ($P < 0.05$ vs. EV- or NT-EDCs; Figure 7c) in nanoparticles with a size typical for extracellular vesicles (133 ± 5 nm, $P = \text{ns}$ vs. EV- or NT-EDCs). Consistent with previous transcriptome profiling²³, the most abundant miRNAs found within cultured EDC nanoparticles were associated with cardiomyocyte proliferation (e.g. miR-199a-5p), cardiomyocyte salvage (e.g. miR-125b-5p), protection against oxidative stress (e.g. miR-21-5p) or reducing cardiac fibrosis (e.g. miR-22-3p; Supplementary Table 5). Perhaps surprisingly, somatic gene transfer of *KCNN4* decreased the expression of only 4 miRNAs (*KCNN4*-EDCs vs. NT-EDCs, fold change > 1.5 , P -adjusted < 0.05 , Figure 7d, Supplementary Table 6). The targets of these miRNAs typically clustered within TGF- β signaling, Hippo signaling, apoptosis, steroid biosynthesis, RNA transport, protein processing, or cytoskeleton regulation (Supplementary Figure 7a). In comparison to lentiviral transduction alone, *KCNN4* overexpression altered the expression of

16 miRNAs (fold change > 1.5; *P*-adjusted < 0.05, Figure 7e and Supplementary Table 7) involved in the regulation of stem cell pluripotency, extracellular matrix turnover, cell-cycle regulation, transforming growth factor beta signaling and Hippo signaling (Supplementary Figures 7b and 7c). Thus, akin to effects seen on cytokine production, KCa3.1 activity increases nanoparticle production and alters miRNA expression to improve the healing-promotion signature of the EDC secretome.

Discussion

In this study, we found that the therapeutic potential of EDCs derived from human hearts is governed by the expression/function of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated channel KCa3.1. Although Ca^{2+} -activated K^+ channels were identified in all EDCs, KCa3.1 channels were exclusively expressed in the CD90^+ subpopulation that is thought to be responsible for most of the functional benefits associated with heart-derived cell therapy^{11,12}. Genetic manipulation to enhance KCa3.1-channel expression increased the proliferation and paracrine profile of EDCs in vitro. Compared to non-modified cells, electrophysiologically engineered EDCs were superior in improving cardiac function in association with a combination of enhanced angiogenesis, myocardial salvage and cardiomyogenesis when transplanted into a clinically relevant mouse model that mirrored post-infarct healing. Our study provides the first evidence in the literature that manipulation of plasma membrane ion channels can enhance the therapeutic benefits of progenitor cells.

Ion channels provide the basis for generating bioelectric signals that control cell function^{24,25}. This important role is underscored by the observation that KCa channels are widely distributed in many adult stem cell types and play a key role during embryonic development^{10,26-30}. Until recently, their contribution to the regulation of V_{mem} and Ca^{2+} dynamics has been uncertain- a knowledge gap which may stem from a myriad of differences in cell culture or technical methods³¹. While BKCa channels have a large conductance, they show strong outward rectification and carry relatively little current in EDCs near the K^+ reversal potential, which explains why they do not contribute to EDC resting potential (Supplementary Figure 1).

As shown in mesenchymal stem cells³²⁻³⁴, embryonic stem cells³⁵ or myoblasts^{36,37}, proliferation and differentiation are tightly controlled by changes in V_{mem} . In contrast to other cardiac cell types (cardiac fibroblasts³⁸ or myocytes³⁹), the membrane potential of EDCs is not determined by Kir channels. Rather, we found that the EDC resting membrane potential is largely governed by the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated channel KCa3.1. This finding mirrors our prior observation in expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells¹⁰, in which KCa3.1 channels control EDC membrane potential during SOCE to maintain the electrical gradient for Ca^{2+} influx. We now show here that in heart-derived cells, KCa3.1 channels play a pivotal role at the crossroad between Ca^{2+} influx, outward ion fluxes and V_{mem} to provide critical internal signaling which modulate cell growth, migration, differentiation and paracrine signaling⁴⁰. When considered within the context of K_{Ca} channel function defining cardiogenesis in both embryonic and induced pluripotent stem cells⁴¹⁻⁴³, our results highlight the important physiological role of KCa3.1 regulation of V_{mem} and hint that channel expression may provide an independent phenotypic marker of cell product “potency”.

Somatic gene-transfer of *KCNN4* increased proliferation and ultimately improved the long-term engraftment of transplanted cells. Given that *KCNN4* overexpression had negligible effects on resistance to apoptosis, it is unlikely that the acute retention or resistance to toxic metabolites was increased. We hypothesize that the increase in proliferation resulting from *KCNN4* transfer affords retained human cells the opportunity to multiply and more effectively release cytoprotective molecules. In addition to producing a larger transient pool of transplanted cells within the myocardium that increases paracrine stimulation of endogenous repair mechanisms, long-term cell retention was also greater.

However, given the trivial number of transplanted cells that were ultimately retained 3 weeks after injection (597 ± 200 vs. 69 ± 22 for *KCNN4*- vs. NT-EDCs, respectively), it is unlikely that differentiation into working myocardium played any role in the benefits seen after intra-myocardial injection.

It is widely agreed that most of the benefits conferred by adult cell therapy occur through paracrine stimulation of angiogenesis, cardiomyogenesis, immunomodulation and myocardial salvage^{5,44}. Consistent with the notion that paracrine engineering enhances cell treatment outcomes^{20,45}, we found that *KCNN4* overexpression improved the paracrine repertoire of EDCs. Since $I_{KCa3.1}$ -mediated increases in intracellular Ca^{2+} are necessary for the production of inflammatory chemokines and cytokines by various immune cells^{46,47}, it is reasonable to believe that a similar mechanism occurs in EDCs. It follows that the marked functional improvement in cardiac function observed after *KCNN4*-EDC transplant is likely mediated, in part, via increased cytokine and nanoparticle stimulation at the site of injection resulting from a combination of increased absolute cell numbers and per-cell paracrine output within the myocardium.

Our findings have potentially-significant practical applications, as identifying a heretofore unappreciated mediator of cell transplant outcome has the potential to improve the inconsistent clinical record of cardiac cell therapy². In comparison to expensive, more invasive strategies that repeatedly administer more of the same potentially ineffective cell product, strategies that optimize endogenous ionic-current flows have the potential to regulate more than cell excitability, as evidenced by the marked improvements in cell behavior⁴⁸. Our study is the first to elucidate the important participation of $KCa3.1$ channels in controlling the therapeutic capacity of progenitor-cell preparations. Given the role of these

channels in bone-marrow derived progenitor cells¹⁰, our findings may have implications beyond simply cardiac disease. The ability to control cell-function by modulating bioelectric properties is a potentially powerful tool to enhance the effectiveness of other progenitor cell types toward therapeutic application.

Although *KCNN4*-gene transfer clearly enhanced the therapeutic benefits of cardiac cell therapy, the detailed molecular mechanisms by which boosting KCa3.1 channel-function improved cell function will require further investigation. In this study, we used a viral vector to transfer the genetic material into cells. Lentiviruses are a useful tool for the engineering of adult stem cells because of their transduction efficiency toward slowly proliferating cells, and the absence of detrimental cellular effects⁴⁹. Despite the utility of such vectors to establish proof of concept, integration of genetic material into proto-oncogenic sites is a potential risk associated with the use of retroviruses that limits clinical translation. Other presently available viral vectors will need to be harnessed for clinical translation. This investigation also studied human cells transplanted into immunodeficient mice, making extrapolation to immune competent clearance of allogeneic cells uncertain. Finally, for this proof of principle experiment, we chose to inject cells 1 week after LCA ligation (analogous to ~1 month after a clinical myocardial infarction).

Conclusion

In this study, we demonstrate that KCa3.1 channels govern the V_{mem} of EDCs with targeted overexpression boosting both proliferation and the paracrine spectrum of EDCs. These fundamental changes enhanced cardiac function in a clinically relevant mouse model of myocardial healing while reducing myocardial scar burden without increasing the risk of malignant cardiac rhythms. Thus, we provide the first clear evidence that altering plasma-membrane ion channel activity represents a potentially valuable strategy to enhance the therapeutic potential of stem cells after transplantation into the injured heart. Future work will be needed to evaluate the effect of *KCNN4* overexpression on cell treatment outcomes when therapies are delivered into the extensively scarred and remodeled myocardium.

References

1. Savarese, G. & Lund, L. H. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card. Fail. Rev.* **3**, 7–11 (2017).
2. Nguyen, P. K., Rhee, J.-W. & Wu, J. C. Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016: a systematic review. *JAMA Cardiol.* **1**, 831–841 (2016).
3. Davis, D. R. Cardiac stem cells in the post-Anversa era. *Eur. Heart J.* **40**, 1039–1041 (2019).
4. Davis, D. R. *et al.* Isolation and expansion of functionally-competent cardiac progenitor cells directly from heart biopsies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 312–321 (2010).
5. Rafatian, G. & Davis, D. R. Concise Review: Heart-Derived Cell Therapy 2.0: Paracrine Strategies to Increase Therapeutic Repair of Injured Myocardium. *Stem Cells Dayt. Ohio* **36**, 1794–1803 (2018).
6. Molgat, A. S. D. *et al.* Hyperglycemia inhibits cardiac stem cell-mediated cardiac repair and angiogenic capacity. *Circulation* **130**, S70-76 (2014).
7. Mayfield, A. E. *et al.* The impact of patient co-morbidities on the regenerative capacity of cardiac explant-derived stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 60 (2016).
8. Mayfield, A. E. *et al.* Interleukin-6 Mediates Post-Infarct Repair by Cardiac Explant-Derived Stem Cells. *Theranostics* **7**, 4850–4861 (2017).
9. Levin, M. Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3835–3850 (2014).

10. Vigneault, P. *et al.* Calcium-dependent potassium channels control proliferation of cardiac progenitor cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Physiol.* (2018) doi:10.1113/JP275388.
11. Cheng, K. *et al.* Relative Roles of CD90 and c-Kit to the Regenerative Efficacy of Cardiosphere-Derived Cells in Humans and in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* **3**, (2014).
12. Shen, D. *et al.* Therapeutic benefits of CD90-negative cardiac stromal cells in rats with a 30-day chronic infarct. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 1984–1991 (2018).
13. Guéguinou, M. *et al.* KCa and Ca(2+) channels: the complex thought. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 2322–2333 (2014).
14. Matsumoto, R. *et al.* Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1168–1173 (2005).
15. Wu, J. *et al.* Infarct stabilization and cardiac repair with a VEGF-conjugated, injectable hydrogel. *Biomaterials* **32**, 579–586 (2011).
16. Reich, H. *et al.* Repeated transplantation of allogeneic cardiosphere-derived cells boosts therapeutic benefits without immune sensitization in a rat model of myocardial infarction. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **35**, 1348–1357 (2016).
17. Grigorian-Shamagian, L. *et al.* Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats. *Eur. Heart J.* **38**, 2957–2967 (2017).

18. Xiang, Q. *et al.* ISL1 overexpression enhances the survival of transplanted human mesenchymal stem cells in a murine myocardial infarction model. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 51 (2018).
19. Cheng, K. *et al.* Human cardiosphere-derived cells from advanced heart failure patients exhibit augmented functional potency in myocardial repair. *JACC Heart Fail.* **2**, 49–61 (2014).
20. Tilokee, E. L. *et al.* Paracrine Engineering of Human Explant-Derived Cardiac Stem Cells to Overexpress Stromal-Cell Derived Factor 1 α Enhances Myocardial Repair. *Stem Cells Dayt. Ohio* **34**, 1826–1835 (2016).
21. Salvador, A. M. *et al.* Intercellular Adhesion Molecule 1 Regulates Left Ventricular Leukocyte Infiltration, Cardiac Remodeling, and Function in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, e003126 (2016).
22. Ibrahim, A. G.-E., Cheng, K. & Marbán, E. Exosomes as Critical Agents of Cardiac Regeneration Triggered by Cell Therapy. *Stem Cell Rep.* **2**, 606–619 (2014).
23. Kanda, P. *et al.* Deterministic Encapsulation of Human Cardiac Stem Cells in Variable Composition Nanoporous Gel Cocoons To Enhance Therapeutic Repair of Injured Myocardium. *ACS Nano* **12**, 4338–4350 (2018).
24. Blackiston, D. J., McLaughlin, K. A. & Levin, M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle* **8**, 3519–28 (2009).
25. Sundelacruz, S., Levin, M. & Kaplan, D. L. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev* **5**, 231–46 (2009).

26. Wang, K. *et al.* Electrophysiological properties of pluripotent human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**, 1526–34 (2005).
27. Liebau, S. *et al.* Formation of cellular projections in neural progenitor cells depends on SK3 channel activity. *J. Neurochem.* **101**, 1338–1350 (2007).
28. Bai, X. *et al.* Electrophysiological properties of human adipose tissue-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1539-50 (2007).
29. Tao, R., Lau, C. P., Tse, H. F. & Li, G. R. Functional ion channels in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1561-7 (2007).
30. Subramani, B. *et al.* Generation and characterization of human cardiac resident and non-resident mesenchymal stem cell. *Cytotechnology* **68**, 2061–2073 (2016).
31. Angelini, F. *et al.* Foetal bovine serum-derived exosomes affect yield and phenotype of human cardiac progenitor cell culture. *BioImpacts BI* **6**, 15–24 (2016).
32. Sundelacruz, S., Levin, M. & Kaplan, D. L. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* **3**, e3737 (2008).
33. Sundelacruz, S., Levin, M. & Kaplan, D. L. Depolarization alters phenotype, maintains plasticity of predifferentiated mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A* **19**, 1889–1908 (2013).
34. You, M. *et al.* Voltage-gated K⁺ channels in adipogenic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 129–136 (2013).
35. Ng, S.-Y. *et al.* Role of voltage-gated potassium channels in the fate determination of embryonic stem cells. *J. Cell. Physiol.* **224**, 165–177 (2010).

36. Hinard, V., Belin, D., König, S., Bader, C. R. & Bernheim, L. Initiation of human myoblast differentiation via dephosphorylation of Kir2.1 K⁺ channels at tyrosine 242. *Dev. Camb. Engl.* **135**, 859–867 (2008).
37. König, S. *et al.* Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**, 28187–28196 (2004).
38. Qi, X.-Y. *et al.* Fibroblast inward-rectifier potassium current upregulation in profibrillatory atrial remodeling. *Circ. Res.* **116**, 836–845 (2015).
39. Chilton, L. *et al.* K⁺ currents regulate the resting membrane potential, proliferation, and contractile responses in ventricular fibroblasts and myofibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H2931–2939 (2005).
40. Berkefeld, H., Fakler, B. & Schulte, U. Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol. Rev.* **90**, 1437–1459 (2010).
41. Kleger, A. *et al.* Modulation of calcium-activated potassium channels induces cardiogenesis of pluripotent stem cells and enrichment of pacemaker-like cells. *Circulation* **122**, 1823–1836 (2010).
42. Liebau, S. *et al.* An Inducible Expression System of the Calcium-Activated Potassium Channel 4 to Study the Differential Impact on Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Int.* **2011**, 1–12 (2011).
43. Müller, M. *et al.* Ca²⁺ activated K channels-new tools to induce cardiac commitment from pluripotent stem cells in mice and men. *Stem Cell Rev.* **8**, 720–740 (2012).
44. Kanda, P. & Davis, D. R. Cellular mechanisms underlying cardiac engraftment of stem cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* **17**, 1127–1143 (2017).

45. Jackson, R. *et al.* Paracrine Engineering of Human Cardiac Stem Cells With Insulin-Like Growth Factor 1 Enhances Myocardial Repair. *J. Am. Heart Assoc.* **4**, e002104 (2015).
46. Ghanshani, S. *et al.* Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J. Biol. Chem.* **275**, 37137–37149 (2000).
47. Mark Duffy, S. *et al.* The K⁺ channel iKCA1 potentiates Ca²⁺ influx and degranulation in human lung mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 66–72 (2004).
48. McLaughlin, K. A. & Levin, M. Bioelectric signaling in regeneration: Mechanisms of ionic controls of growth and form. *Dev. Biol.* **433**, 177–189 (2018).
49. McGinley, L. *et al.* Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. *Stem Cell Res. Ther.* **2**, 12 (2011).
50. Li, T.-S. *et al.* Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair. *Cardiovasc. Res.* **89**, 157–165 (2011).
51. Cho, J. H. *et al.* Delayed Repolarization Underlies Ventricular Arrhythmias in Rats With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *Circulation* **136**, 2037–2050 (2017).
52. Tang, X.-L. *et al.* Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* **121**, 293–305 (2010).

53. Vlachos, I. S. *et al.* DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **43**, W460-466 (2015).
54. Eulalio, A. *et al.* Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* **492**, 376–381 (2012).
55. Ke, Z.-P., Xu, P., Shi, Y. & Gao, A.-M. MicroRNA-93 inhibits ischemia-reperfusion induced cardiomyocyte apoptosis by targeting PTEN. *Oncotarget* **7**, 28796–28805 (2016).
56. Pandey, R., Yang, Y., Jackson, L. & Ahmed, R. P. H. MicroRNAs regulating meis1 expression and inducing cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc. Regen. Med.* **3**, (2016).
57. Wang, X. *et al.* MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6. *Cardiovasc. Res.* **102**, 385–395 (2014).
58. Lesizza, P. *et al.* Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **120**, 1298–1304 (2017).
59. Xiao, J. *et al.* Cardiac progenitor cell-derived exosomes prevent cardiomyocytes apoptosis through exosomal miR-21 by targeting PDCD4. *Cell Death Dis.* **7**, e2277 (2016).
60. Hong, Y. *et al.* MiR-22 may Suppress Fibrogenesis by Targeting TGF β R I in Cardiac Fibroblasts. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **40**, 1345–1353 (2016).

61. Clark, A. L. & Naya, F. J. MicroRNAs in the Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2)-regulated Gtl2-Dio3 Noncoding RNA Locus Promote Cardiomyocyte Proliferation by Targeting the Transcriptional Coactivator Cited2. *J. Biol. Chem.* **290**, 23162–23172 (2015).
62. Wang, K. *et al.* The long noncoding RNA NRF regulates programmed necrosis and myocardial injury during ischemia and reperfusion by targeting miR-873. *Cell Death Differ.* **23**, 1394–1405 (2016).
63. Cheng, J., Zhang, P. & Jiang, H. Let-7b-mediated pro-survival of transplanted mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 216 (2015).

Figures

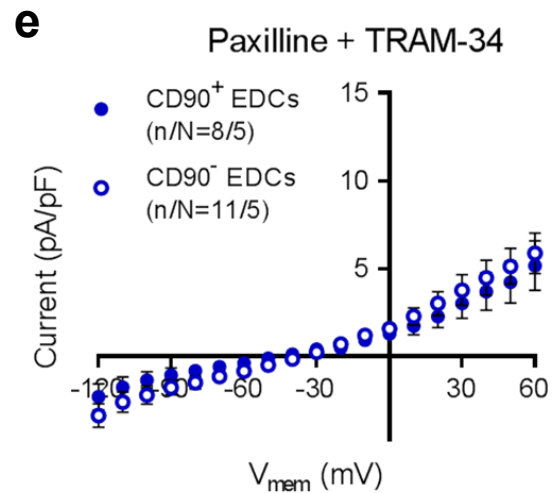
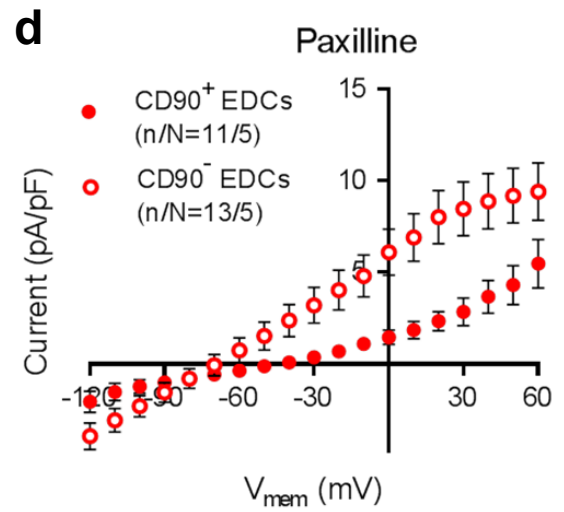
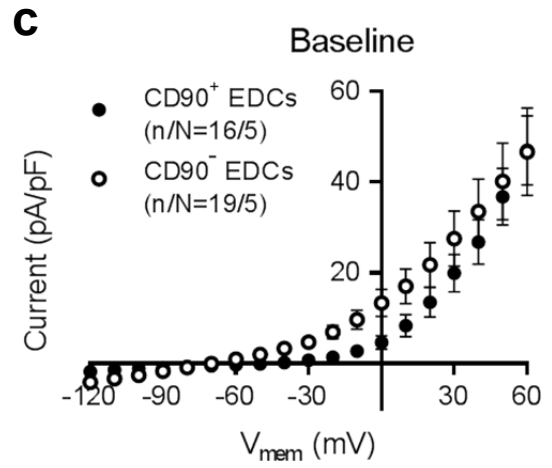
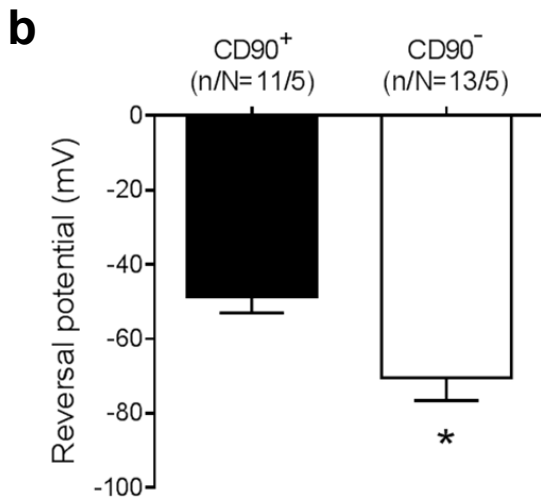
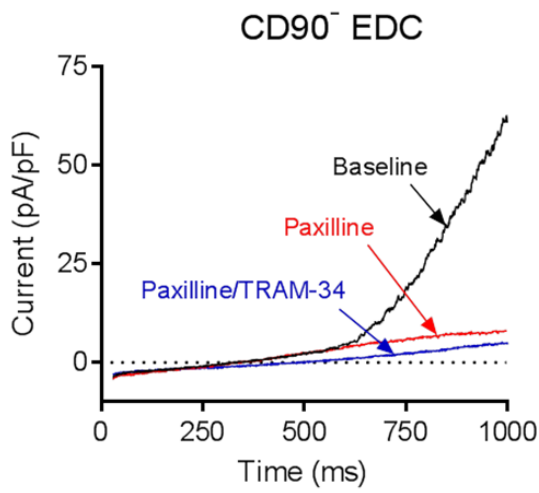
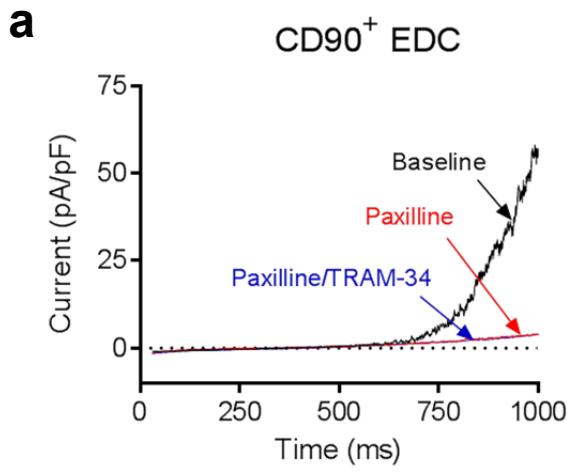


Figure 1. Endogenous ion currents expressed in human EDCs. **a.** Original whole cell currents from CD90⁺ (upper panel) and CD90⁻ EDCs (lower panel) under various experimental conditions, with a 1000-ms depolarizing voltage-ramp protocol from -120 mV to +60 mV, with a holding potential of -40 mV, before and after the addition of KCa inhibitors. **b.** Reversal potential of whole-cell ion currents recorded in CD90⁺ and CD90⁻ EDCs in the presence of 300-nmol/L free-[Ca²⁺]_i. **(c-e)** *I-V* relationship of whole-cell ion currents (recorded with 1000-ms voltage-ramps from -120 mV to +60 mV with a holding potential of -40 mV) in CD90⁺ and CD90⁻ EDCs under **(c)** basal conditions, **(d)** after addition of 1- μ mol/L paxilline or **(panel e)** after addition of 1- μ mol/L paxilline and 1- μ mol/L TRAM-34. Non-paired student *t*-test (panel b); two-way repeated-measures ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected *t*-tests; n/N = cells/cell lines per group.

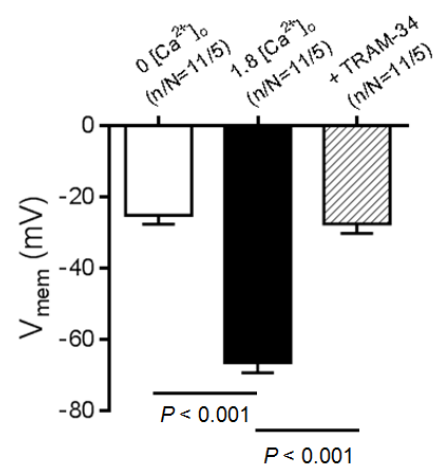
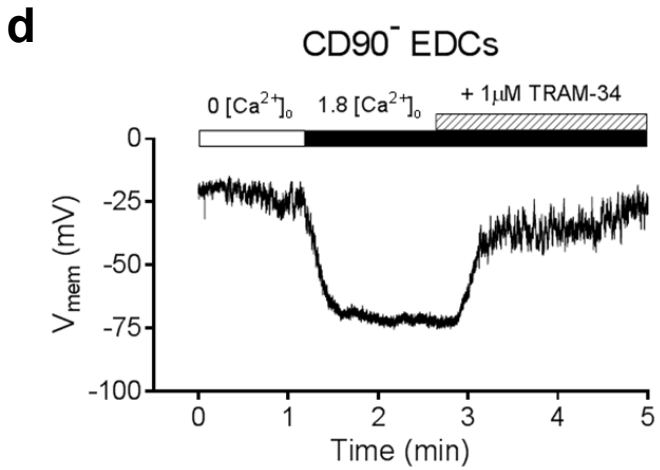
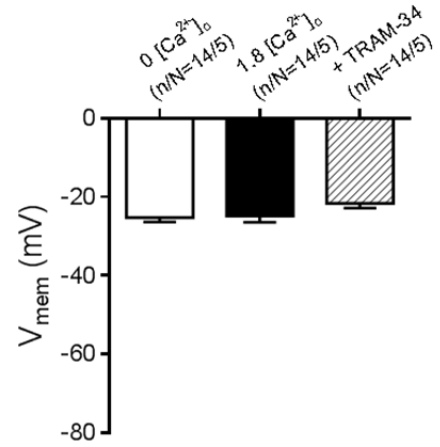
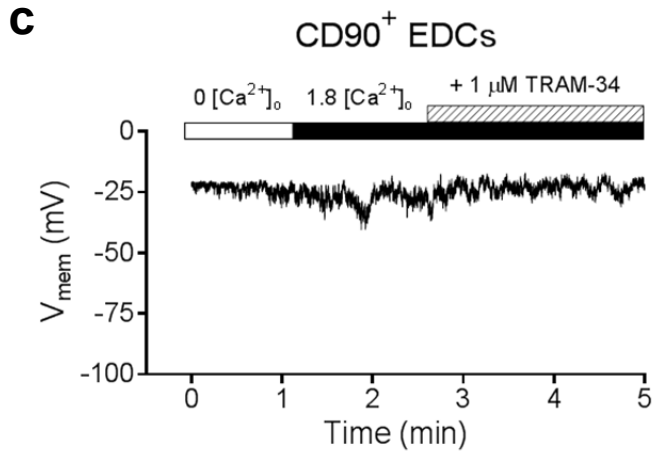
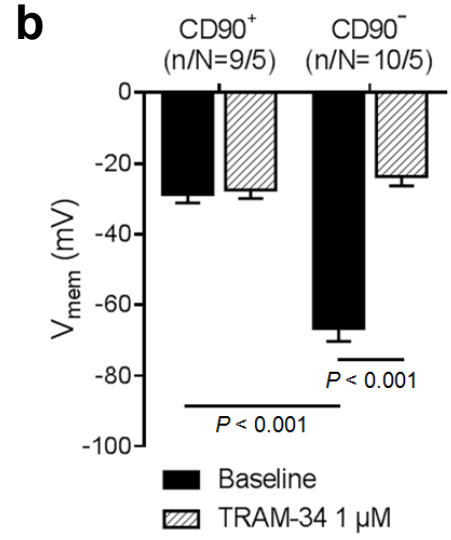
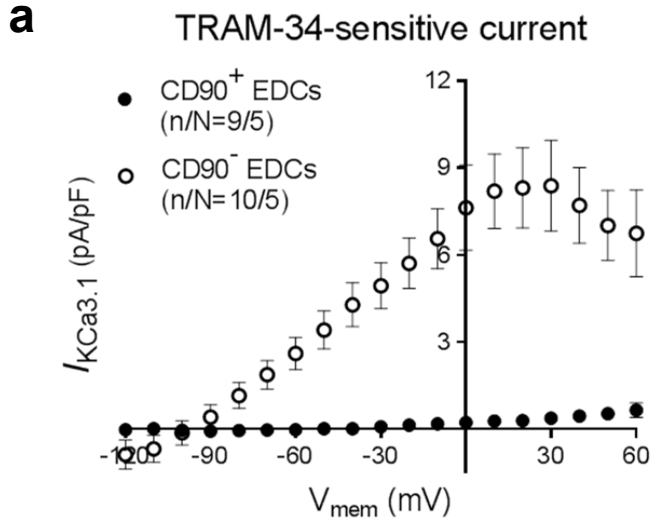


Figure 2. Functional endogenous KCa3.1 current and membrane-potential changes during SOCE in EDCs. **a.** *I-V* relationship of $I_{KCa3.1}$ (TRAM-34-sensitive current) in CD90⁺ and CD90⁻ EDCs. **b.** Resting potential of EDCs before and after exposure to 1- μ mol/L TRAM-34. Two-way repeated-measures ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected *t*-tests; n/N = cells/cell lines per group. **c.** Original current-clamp recording from one CD90⁺ cell (left panel) and mean \pm SEM data for V_{mem} changes induced by SOCE (resulting from intracellular Ca^{2+} -depletion by exposure to nominally Ca^{2+} -free extracellular Ca^{2+} (0 [Ca^{2+}]_o) and then reintroduction of 1.8-mmol/L Ca^{2+} (1.8 [Ca^{2+}]_o)), with subsequent exposure to 1- μ mol/L TRAM-34 (right panel). **d.** Original current-clamp recording from one CD90⁻ cell (left panel) and mean \pm SEM data for V_{mem} changes induced by SOCE and subsequent exposure to 1- μ mol/L TRAM-34 (right panel). One-way ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected *t*-tests; n/N = cells/cell lines per group.

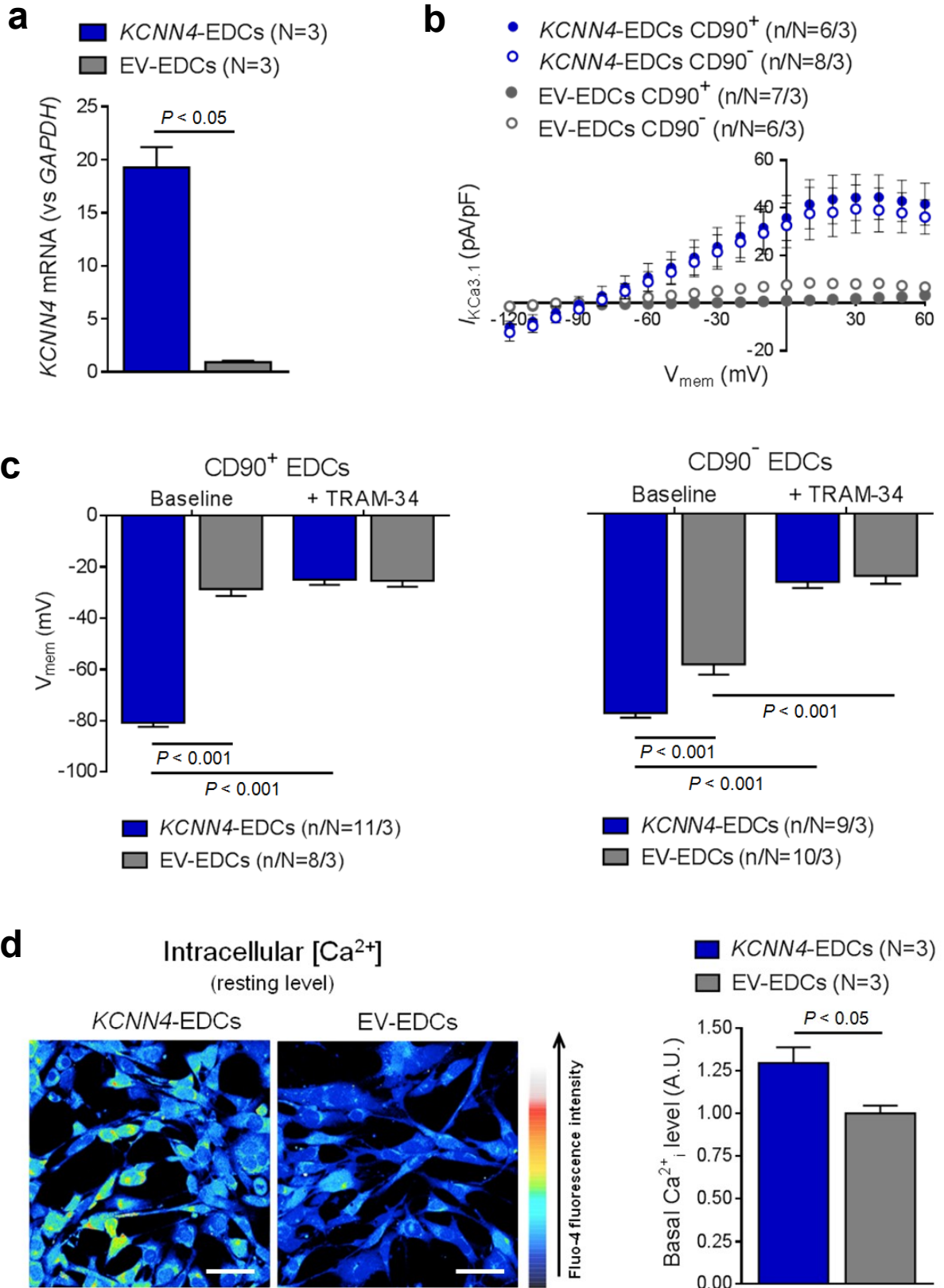


Figure 3. Effect of *KCNN4*-gene transfer on $I_{KCa3.1}$ and membrane potential of EDCs.

a. Mean \pm SEM *KCNN4*-gene expression in EDCs following lentivirus-mediated *KCNN4*-gene transfer or empty vector (EV; multiplicity of infection=20). **b.** *I-V* relationship of $I_{KCa3.1}$ currents recorded under various experimental conditions. **c.** Resting potential of EDCs under various experimental conditions, before and after exposure to 1- μ mol/L TRAM-34. **d.** Representative Fluo-4 images in EV- and *KCNN4*-transduced EDCs overexpression on intracellular $[Ca^{2+}]$. Scale bars, 50 μ m. Paired student t-test; N = biological samples (panel a); two-way repeated-measures ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected t-tests; n/N = cells/cell lines per group (panel c).

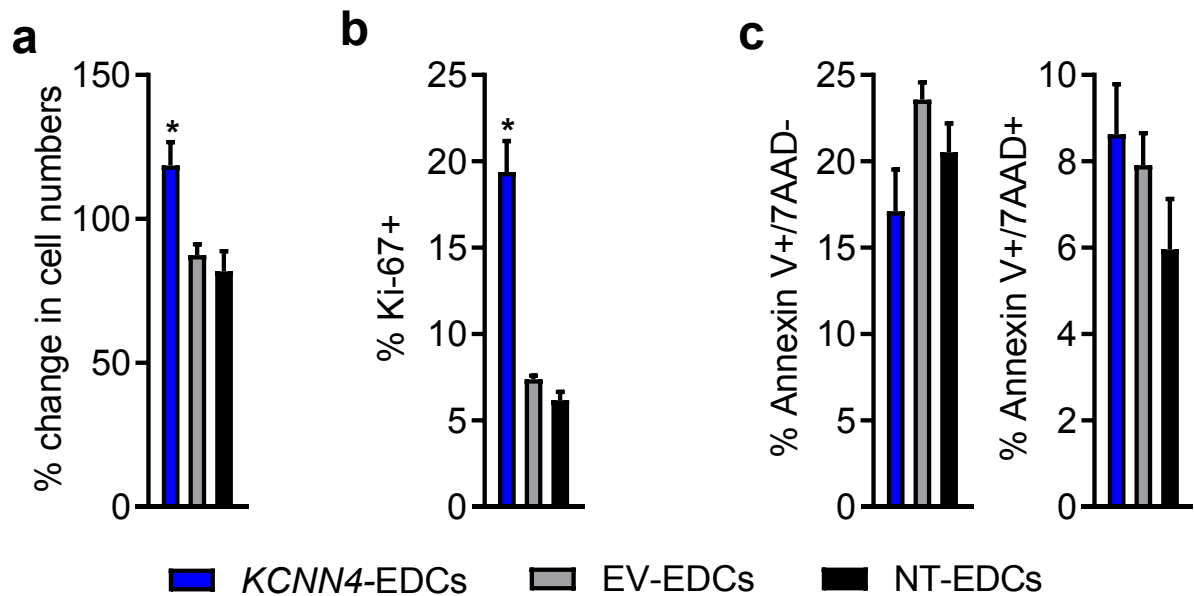


Figure 4. Effect of *KCNN4* overexpression on EDC phenotype after 24-hour exposure to ischemia-mimicking media culture conditions. **a.** Increasing $I_{KCa3.1}$ boosts EDC cell numbers ($n = 5$). * $P < 0.05$ vs. EV- and NT-EDCs. **b.** *KCNN4* overexpression increases the proportion of EDCs actively proliferating ($n = 5$). * $P < 0.05$ vs. EV- and NT-EDCs. **c.** Increasing $I_{KCa3.1}$ had no effect on the ability of EDCs to withstand apoptosis as indicated by expression of apoptotic (Annexin V⁺/7AAD⁻) and necrotic (Annexin V⁺/7AAD⁺) markers ($n = 5$). 7AAD, 7-aminoactinomycin. One-way ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni's multiple comparisons test.

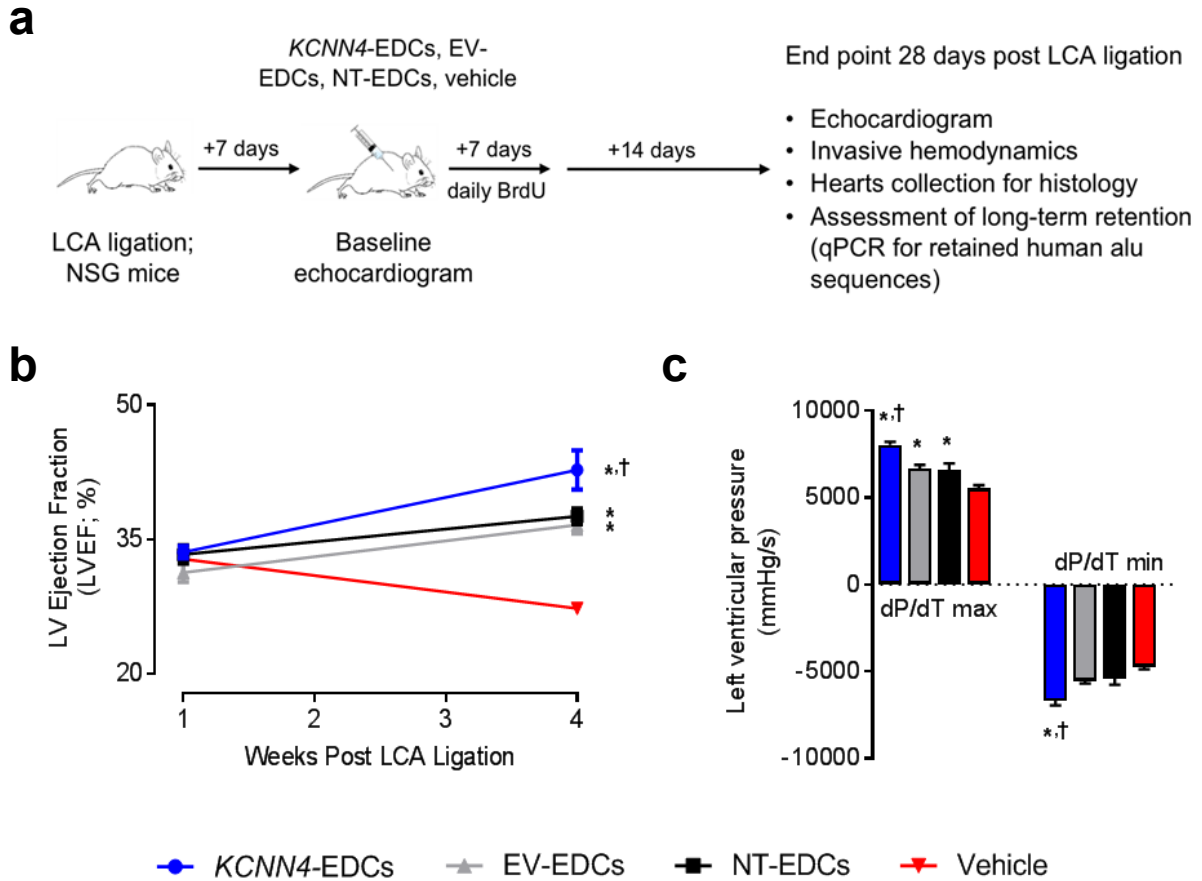


Figure 5. Effects of *KCNN4* overexpression on myocardial function. **a.** Schematic of in vivo experiments comparing the effect of *KCNN4* engineered human EDCs (*KCNN4*-EDCs) to empty vector human EDCs (EV-EDCs), non-transduced human EDCs (NT-EDCs) and vehicle using a NOD/SCID IL2R γ model of ischemic injury. LCA, left coronary ligation. **b.** Effects of *KCNN4*-EDCs (n = 12), EV-EDCs (n = 12), NT-EDCs (n = 13) or vehicle (n = 14) injection on echocardiographic ejection fraction 4 weeks after LCA ligation. **c.** Invasive hemodynamic measures of myocardial function 4 weeks after LCA ligation. One-way ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni multiple comparisons test.

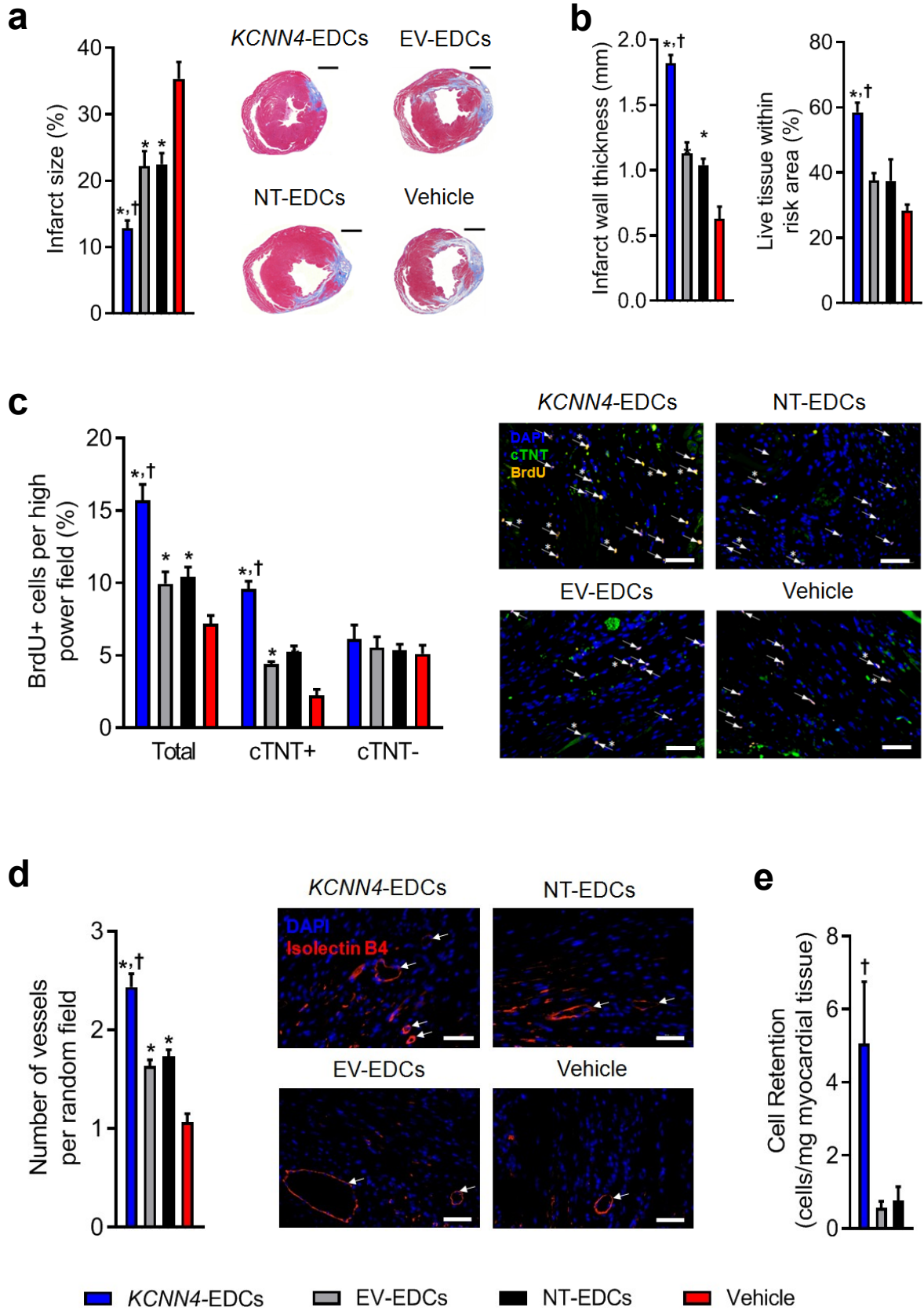


Figure 6. Effects of *KCNN4* overexpression on infarct properties, neo-angiogenesis, cardiomyogenesis and long-term engraftment. **a.** Scar size analysis 4 weeks after LCA ligation (n = 5). **b.** Quantification of infarct wall thickness and viable tissue within the risk area (n = 5). **c.** The total number of BrdU positive cells (white arrows), proliferating cardiomyocytes (BrdU⁺/cTnT⁺; white stars) and non-cardiomyocyte cells (BrdU⁺/cTnT⁻) quantified using random field analysis of immunohistochemistry staining with BrdU (red), cTnT (green) and DAPI (blue; n = 5). Scale bar, 100 μm. **d.** Vessel density within the peri-infarct area as indicated (white arrows) using isolectin B4 (red) and DAPI (blue) immunohistochemistry (n = 5). Scale bar, 100 μm. **e.** Quantitative PCR analysis for human Alu sequences 21 days after EDC injection (n = 9). **P* < 0.05 vs. vehicle treated mice, †*P* < 0.05 vs. EV- and NT-EDCs treated mice. One-way ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni multiple comparisons test.

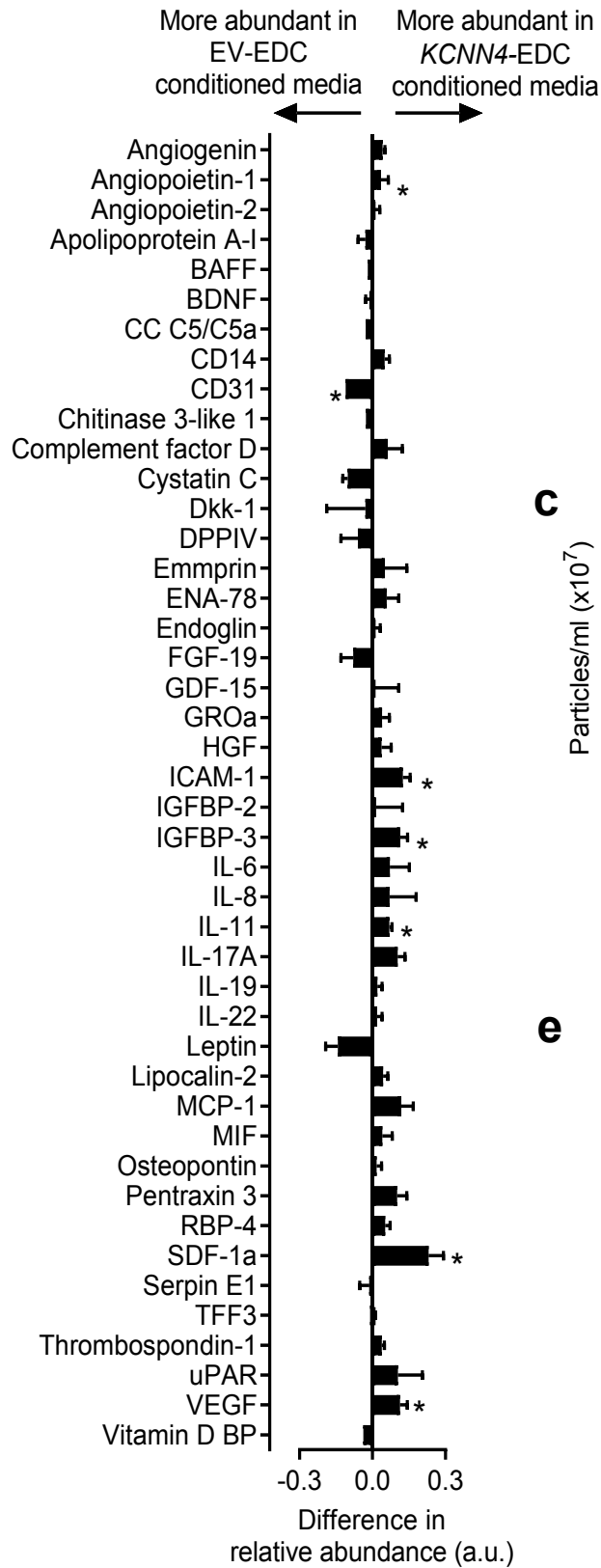
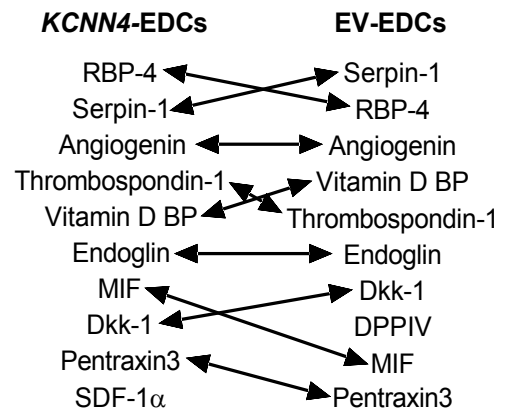
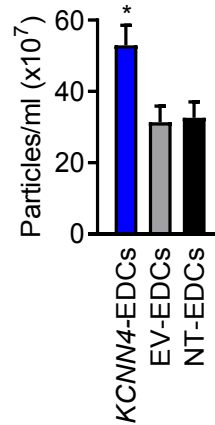
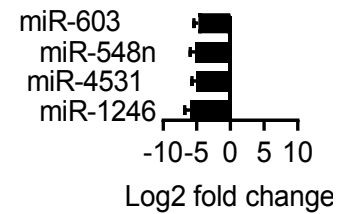
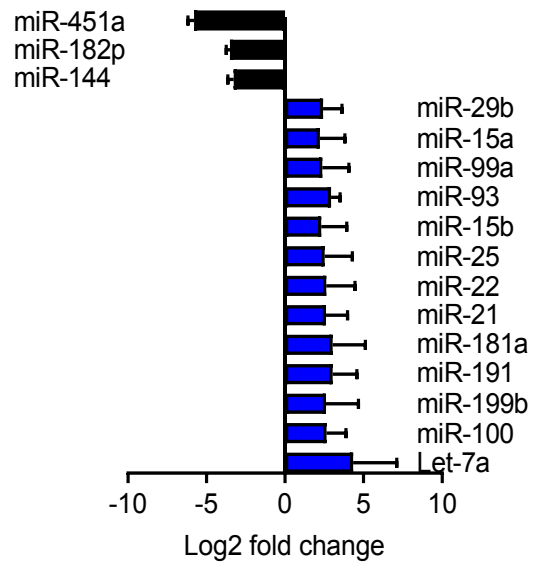
a**b****c****d****e**

Figure 7. Effects of *KCNN4* overexpression on the paracrine profile of EDCs. **a.** Direct comparison of cytokine proteomic expression within 39 cytokines found to be elevated within media conditioned by EV- or *KCNN4*-EDCs. * $P < 0.05$ vs. EV- or *KCNN4*-EDCs. BAFF, B-cell activating factor; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor, CC C5/C5a, Complement Component C5a; Dkk-1, Dickkopf-related protein 1; DPPIV, Dipeptidyl peptidase-4; ENA-78, Epithelial-neutrophil activating peptide; FGF-9, Fibroblast growth factor 19; GDF-15, Growth/differentiation factor 15; GRO α , Growth-regulated oncogene alpha; HGF, hepatocyte growth factor; ICAM-1, Intercellular adhesion molecule 1; IGBP-2, Insulin-like growth factor-binding protein; IGBP-3, Insulin-like growth factor-binding protein; IL-6, Interleukin-6; IL-8, Interleukin-8; IL-11, Interleukin-11; IL-17A, Interleukin-17A; IL-19, Interleukin-19; IL-22, Interleukin-22; MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1; MIF, Macrophage migration inhibitory factor; RBP-4, Retinol binding protein 4; TFF3, Trefoil factor 3; uPAR, Urokinase-type plasminogen activator receptor; VEGF, Vascular endothelial growth factor; Vitamin D BP, Vitamin D binding protein. **b.** Relative abundance of the top 10 cytokines produced by EV- and *KCNN4*-EDCs. **c.** Comparison of the size distribution of extracellular vesicles within EDC-conditioned media. Effects of *KCNN4* overexpression relative to the miRNA expression profile of NT-EDCs (**d**) or EV-EDCs (**e**). * $P < 0.05$ vs. EV- or *KCNN4*-EDCs.

Supplemental Materials

Table S1. Clinical characteristics of atrial appendage donors used to obtain EDCs.

	Atrial Appendage donors in vitro study (n = 8)	Atrial Appendage donors in vivo study (n = 4)	P value
Age (yrs)	65 ± 3	68 ± 4	0.73
BMI (kg/m ²)	30 ± 3	33 ± 3	0.58
Gender (male)	75%	50%	0.54
Diabetes	25%	0%	0.51
Hypertension	100%	50%	0.09
Dyslipidemia	63%	50%	1.00
Ongoing smoking	25%	50%	0.54
Thyroid disease	25%	25%	1.00
Peripheral vascular disease	13%	25%	1.00
Coronary artery disease	100%	75%	0.33
History of MI	38%	25%	1.00
Valvular heart disease	50%	50%	1.00
Congestive heart failure	0%	25%	0.33
NYHA class	1.25 ± 0.3	2.7 ± 0.9	0.13
LV Ejection Fraction (%)	53 ± 7	47 ± 3	0.52
CCS class	1.8 ± 0.7	3 ± 0.1	0.37
Creatinine (μmol/L)	82 ± 8	76 ± 8	0.65
Hemoglobin A1c	5.8 ± 0.2	5.8 ± 0.3	1.00
Medications			
Anti-platelet therapy	100%	100%	1.00
Beta-blocker	88%	50%	0.23
Statins	88%	25%	0.07
ACEI or ARB	88%	50%	0.23

NYHA = New York Heart Association; CCS = Canadian Cardiovascular Society; ACEI = Angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB = Angiotensin receptor blocker.

Table S2. Echocardiographic measures of left ventricular function.

		LVEDV (μL)	LVESV (μL)	Stroke Volume (μL)	Ejection Fraction (%)	Fractional Area Change (%)	Cardiac Output (mL/min)
1 week post- LCA ligation	<i>KCMN4</i> -EDCs (n=12)	66.6 \pm 1.8	44.2 \pm 1.2	22.4 \pm 0.8	33.6 \pm 0.7	20.0 \pm 0.5	9.0 \pm 0.9
	NT-EDCs (n=13)	76.8 \pm 4.9	51.4 \pm 3.5	25.4 \pm 1.6	33.3 \pm 1.0	20.1 \pm 0.6	9.8 \pm 1.0
	EV-EDCs (n=12)	73.9 \pm 6.7	50.8 \pm 4.6	23.1 \pm 2.3	31.3 \pm 1.1	18.4 \pm 0.7	8.6 \pm 0.9
	Vehicle (n=14)	69.5 \pm 4.7	46.9 \pm 3.4	22.6 \pm 1.4	32.8 \pm 0.6	20.3 \pm 0.6	8.2 \pm 0.6
4 weeks post- LCA ligation	<i>KCMN4</i> -EDCs (n=12)	73.8 \pm 3.8	42.9 \pm 3.1	30.9 \pm 1.3 [‡]	42.7 \pm 2.2 ^{*,‡,†}	26.8 \pm 1.6 ^{†,‡}	11.2 \pm 0.4 [‡]
	NT-EDCs (n=13)	95.6 \pm 8.3	60.1 \pm 5.6	35.5 \pm 2.9 [‡]	37.6 \pm 0.9 [‡]	23.4 \pm 0.6 [‡]	12.4 \pm 0.9 [‡]
	EV-EDCs (n=12)	93.7 \pm 8.4	59.9 \pm 6.1	33.7 \pm 2.5 [‡]	36.6 \pm 1.0 [‡]	22.4 \pm 0.5 [‡]	11.9 \pm 0.6 [‡]
	Vehicle (n=14)	76.0 \pm 4.4	55.4 \pm 3.4	20.7 \pm 1.2	27.3 \pm 0.6	17.4 \pm 0.8	7.3 \pm 0.5

EDC: explant-derived cell, EV: empty vector, LCA: left coronary artery, LVEDV: left ventricular end diastolic volume, LVESV: left ventricular end systolic volume, NT: non-transduced. * $P < 0.05$ vs. EV-EDCs, [†] $P < 0.05$ vs. NT-EDCs, [‡] $P < 0.05$ vs. vehicle.

Table S3. Invasive hemodynamic measures of left ventricular function.

	SW (mmHg* μ L)	CO (μ L/min)	SV (μ L)	Vmax (μ L)	Vmin (μ L)	Ves (μ L)	Ved (μ L)	Pmax (mmHg)
<i>KCNN4</i> -EDCs (n = 12)	1144 \pm 79 [‡]	9472 \pm 556	16.6 \pm 1.0	35.6 \pm 3.8	17.2 \pm 3.2	19.2 \pm 3.3	31.5 \pm 3.5	88.2 \pm 2.2 ^{*,†,‡}
NT-EDCs (n = 13)	997 \pm 76	9445 \pm 692	17.0 \pm 1.2	35.0 \pm 3.9	18.0 \pm 3.7	19.6 \pm 3.8	32.8 \pm 4.0	77.8 \pm 1.9 [‡]
EV-EDCs (n = 12)	981 \pm 113	9473 \pm 908	16.6 \pm 1.7	34.4 \pm 4.1	22.3 \pm 3.1	24.8 \pm 3.3	37.0 \pm 3.6	80.7 \pm 1.6 [‡]
Vehicle (n = 14)	713 \pm 92	8033 \pm 1024	14.4 \pm 1.9	36.4 \pm 3.5	22.1 \pm 2.7	24.6 \pm 2.7	33.9 \pm 2.9	68.0 \pm 1.3

	Pmin (mmHg)	Pmean (mmHg)	Pdev (mmHg)	Pes (mmHg)	Ped (mmHg)	HR (bpm)	Ea (mmHg/uL)	dP/dt max (mmHg/s)
<i>KCNN4</i> -EDCs (n = 12)	4.0 \pm 0.6 [‡]	39.2 \pm 1.9 [‡]	84.2 \pm 2.4 ^{*,†,‡}	82.5 \pm 2.6 ^{*,‡}	9.5 \pm 0.9 [‡]	557 \pm 8	5.3 \pm 0.3	7934 \pm 198 ^{*,†,‡}
NT-EDCs (n = 13)	2.5 \pm 0.6	34.3 \pm 1.4 [‡]	75.4 \pm 2.0 [‡]	71.3 \pm 3.0	7.3 \pm 0.9	557 \pm 11	4.5 \pm 0.3	6542 \pm 356 [‡]
EV-EDCs (n = 12)	3.8 \pm 0.7	36.1 \pm 2.1 [‡]	75.2 \pm 1.1 [‡]	76.6 \pm 1.8 [‡]	7.6 \pm 1.2	575 \pm 9	5.2 \pm 0.4	6518 \pm 196 [‡]
Vehicle (n = 14)	1.6 \pm 0.3	24.8 \pm 1.3	66.5 \pm 1.2	65.0 \pm 1.2	4.0 \pm 0.5	561 \pm 11	5.5 \pm 0.7	5674 \pm 166

	dP/dt min (mmHg/s)	dV/dt max (μ L/s)	dV/dt min (uL/s)	P@dV/dt max (mmHg)	P@dP/dt max (mmHg)	V@dP/dt max (μ L)	V@dP/dt min (μ L)
<i>KCNN4</i> -EDCs (n = 12)	-6629 \pm 282 ^{*,†,‡}	758 \pm 40	-796 \pm 52	12.9 \pm 3.1	54.3 \pm 1.7 ^{*,‡}	32.5 \pm 3.9	18.0 \pm 3.2
NT-EDCs (n = 13)	-5437 \pm 369	766 \pm 85	-893 \pm 68	12.9 \pm 5.3	45.1 \pm 2.2 [‡]	33.1 \pm 4.0	18.8 \pm 3.8
EV-EDCs (n = 12)	-5443 \pm 144	745 \pm 64	-846 \pm 95	12.7 \pm 2.9	47.9 \pm 2.0 [‡]	36.8 \pm 3.6	23.3 \pm 3.2
Vehicle (n = 14)	-4816 \pm 107	745 \pm 146	-826 \pm 151	8.7 \pm 3.4	36.1 \pm 0.8	34.1 \pm 3.5	22.8 \pm 2.7

	PVA (mmHg/ μ L)	PE (mmHg/ μ L)	CE
<i>KCNN4</i> -EDCs (n = 12)	2092 \pm 213	949 \pm 183	0.8 \pm 0.2
NT-EDCs (n = 13)	1980 \pm 271	789 \pm 162	0.6 \pm 0.1
EV-EDCs (n = 12)	1757 \pm 229	801 \pm 198	0.6 \pm 0.1
Vehicle (n = 14)	1308 \pm 177	595 \pm 112	0.4 \pm 0.1

CE: cardiac efficiency, CO: cardiac output, dP/dt_{max} : maximum derivative of pressure, dP/dt_{min} : minimum derivative of pressure, dV/dt_{max} : maximum derivative of volume, dV/dt_{min} : minimum derivative of volume, E_a : arterial elastance, EDC: explant-derived cell, EV: empty vector, HR: heart rate, NT: non treated, $P@dP/dt_{max}$: pressure at maximum derivative of pressure, $P@dV/dt_{max}$: pressure at maximum derivative of volume, P_{ed} : end diastolic pressure, P_{es} : end systolic pressure, P_{max} : maximum pressure, P_{mean} : mean pressure, P_{min} : minimum pressure, PVA: pressure-volume area, PE: potential energy, SV: stroke volume, SW: stroke work, TAU: isovolumic relaxation constant, $V@dP/dt_{max}$: volume at maximum derivative of pressure, $V@dP/dt_{min}$: volume at minimum derivative of pressure, V_{ed} : end diastolic volume, V_{es} : end systolic volume, V_{max} : maximum volume, V_{min} : minimum volume. * $P < 0.05$ vs. EV-EDCs, † $P < 0.05$ vs. NT-EDCs, ‡ $P < 0.05$ vs. vehicle.

Table S4. Effect of *KCNN4* overexpression on electrophysiological parameters.

	RR (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)
<i>KCNN4</i> -EDCs (n = 3)	165 ± 3	51 ± 3	27 ± 2	85 ± 2	209 ± 6
NT-EDCs (n = 3)	174 ± 12	56 ± 2	31 ± 2	90 ± 5	217 ± 10
EV-EDCs (n = 4)	157 ± 3	51 ± 2	24 ± 2	82 ± 2	208 ± 5
Vehicle (n = 3)	168 ± 5	47 ± 3	30 ± 2	94 ± 5	228 ± 9

EDC: explant-derived cell, EV: empty vector, NT: non-transduced.

Table S5. Top 10 miRNAs within adherent explant-derived cell extracellular vesicles involved with cardiomyocyte proliferation, salvage, and modulating cardiac fibrosis.

Name	Biological role
miR-199a	Promotes cardiomyocyte proliferation ⁵⁴
miR-93	Protects against ischemia-reperfusion injury ⁵⁵
miR-23a	Promotes cardiomyocyte proliferation ⁵⁶
miR-125b	Protects cardiomyocytes against p53 mediated apoptosis ⁵⁷
miR-199a+miR-199b	Promotes cardiomyocyte proliferation ⁵⁸
miR-21	Protects cardiomyocyte from oxidative stress ⁵⁹
miR-22	Regulates cardiac tissue fibrosis ⁶⁰
miR-495	Promotes cardiomyocyte proliferation ⁶¹
miR-873	Inhibits RIPK1/RIPK3-mediated necrotic cell death in cardiomyocytes ⁶²
let-7b	Protects transplanted mesenchymal stem cells from apoptosis ⁶³

Table S6. Effect of *KCNN4* overexpression on the miRNA profile within extracellular vesicles compared to non-transduced explant-derived cells.

Name	<i>P</i>-adjusted	<i>P</i>-value	Log2 (Fold change)
<i>Downregulated</i>			
miR-1246	0.001392	1.02E-05	-6.02242
miR-4531	0.004192	9.25E-05	-5.0545
miR-548n	0.003996	5.88E-05	-5.26002
miR-603	0.006064	0.000178	-4.76565

Table S7. Effect of *KCNN4* overexpression on the miRNA profile within extracellular vesicles compared to empty vector explant-derived cells.

Name	<i>P</i>-adjusted	<i>P</i>-value	Log2 (Fold change)
<i>Upregulated</i>			
let-7a	7.18E-05	5.28E-07	7.117411
miR-100	0.044937	0.003896	2.640891
miR-199b	0.009134	0.000269	2.600605
miR-191	0.016288	0.000637	3.028148
miR-181a	0.005024	0.000111	3.033296
miR-21	0.040347	0.002700	2.603005
miR-22	0.016288	0.000719	2.630868
miR-25	0.023237	0.001196	2.517763
miR-15b	0.040347	0.002967	2.307322
miR-93	0.047076	0.005538	2.935141
miR-99a	0.036286	0.002134	2.370586
miR-15a	0.044937	0.004436	2.222103
miR-29b	0.044937	0.004626	2.417488
<i>Downregulated</i>			
miR-144	0.044973	0.004960	-3.26627
miR-182	0.044937	0.003966	-3.51073
miR-451a	0.000382	5.61E-06	-5.79156

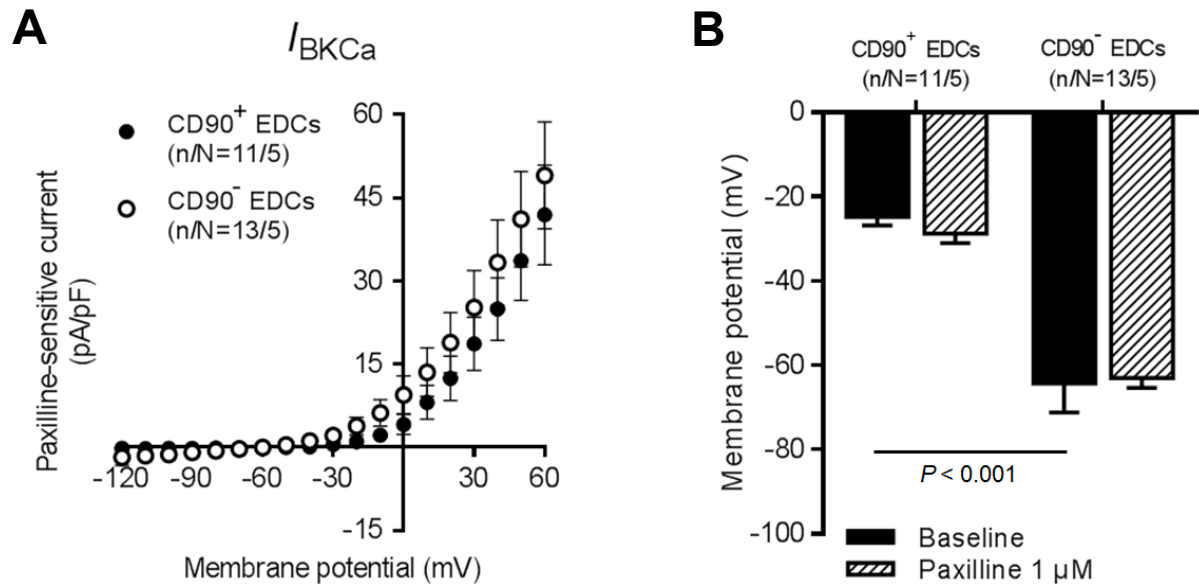


Figure S1. Functional BKCa current in EDCs. (A) I - V relationship of I_{BKCa} (paxilline-sensitive current) in CD90⁺ and CD90⁻ EDCs. (B) Resting potential of EDCs before and after exposure to 1- μ mol/L paxilline. Two-way repeated-measures ANOVA with individual-mean comparisons by Bonferroni-corrected t-tests; n/N = cells/cell lines per group.

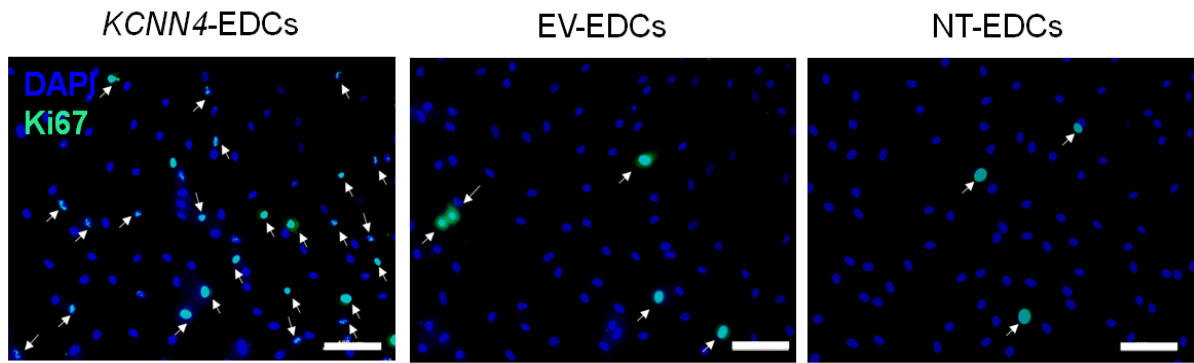


Figure S2. Effect of *KCNN4* engineering on EDC proliferation. Representative images demonstrating the expression of the proliferative marker Ki67. Arrows indicate Ki67⁺ cells. Scale bars, 100 μ m. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

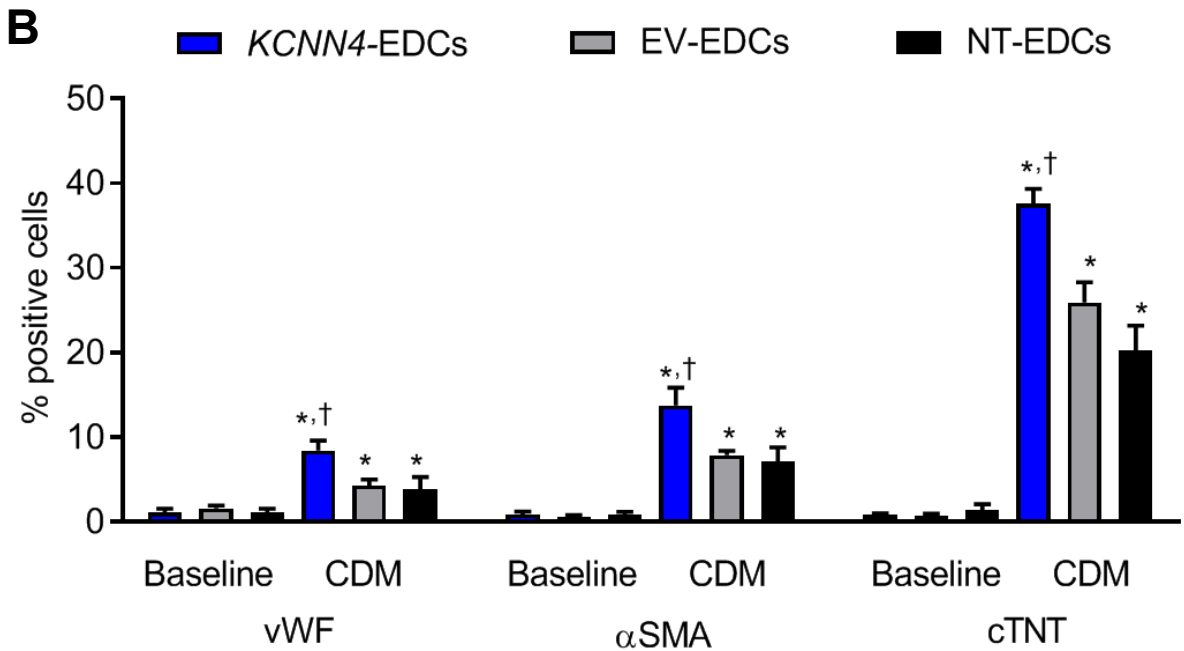
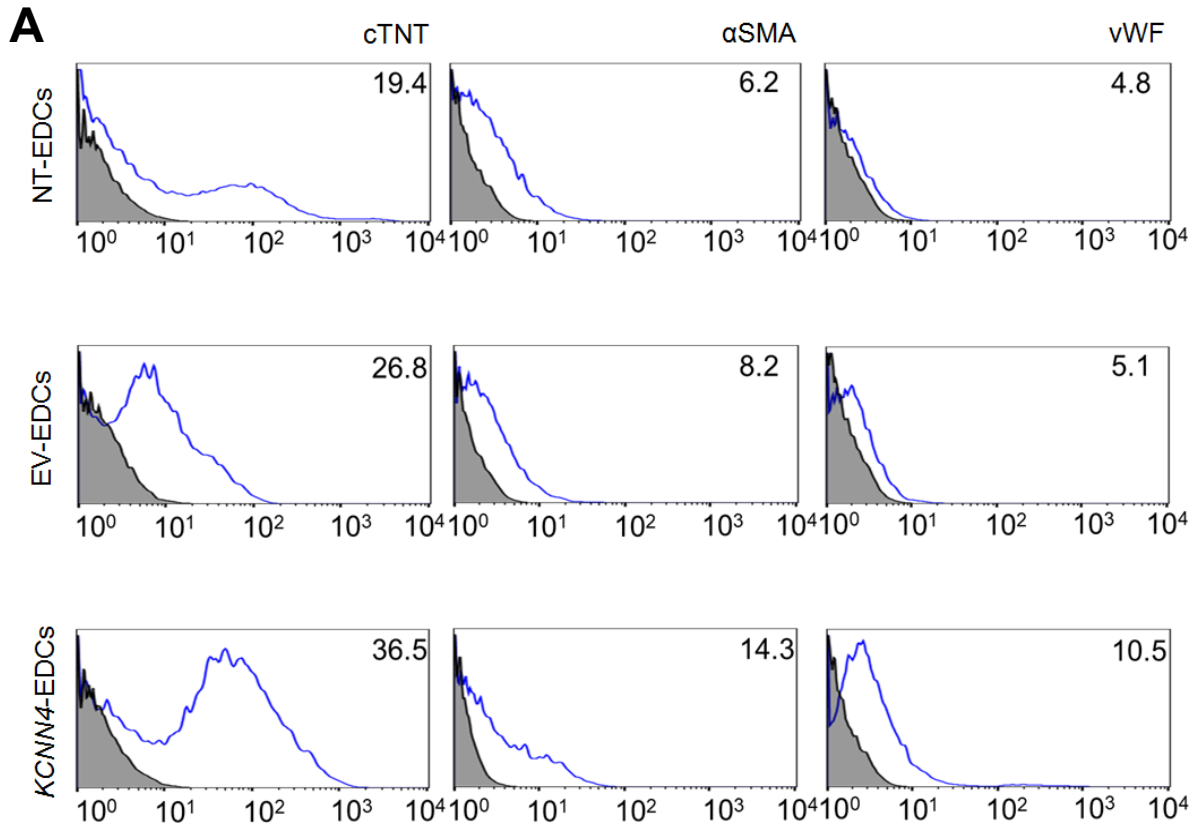


Figure S3. Effect of *KCNN4* engineering on EDC expression of cell-type selective markers. (A) Representative images of flow cytometry plots for cardiac troponin-T (cTNT, selectively expressed by cardiomyocytes), alpha smooth muscle actin (α SMA, typically expressed in vascular smooth-muscle cells) and von Willebrand factor (vWF, expressed in endothelial cells), before and after 1 week of culture of non-transduced (NT)-explant-derived cells (EDCs), empty-virus (EV)-EDCs and *KCNN4*-gene transferred EDCs (*KCNN4*-EDCs) in cardiogenic differentiation media (CDM). (B) Mean + SEM data demonstrating the effect of *KCNN4* overexpression on the expression pattern of EDCs. * $P < 0.05$ vs. baseline. † $P < 0.05$ vs. EV-EDCs and NT-EDCs after 1 week of culture within CDM.

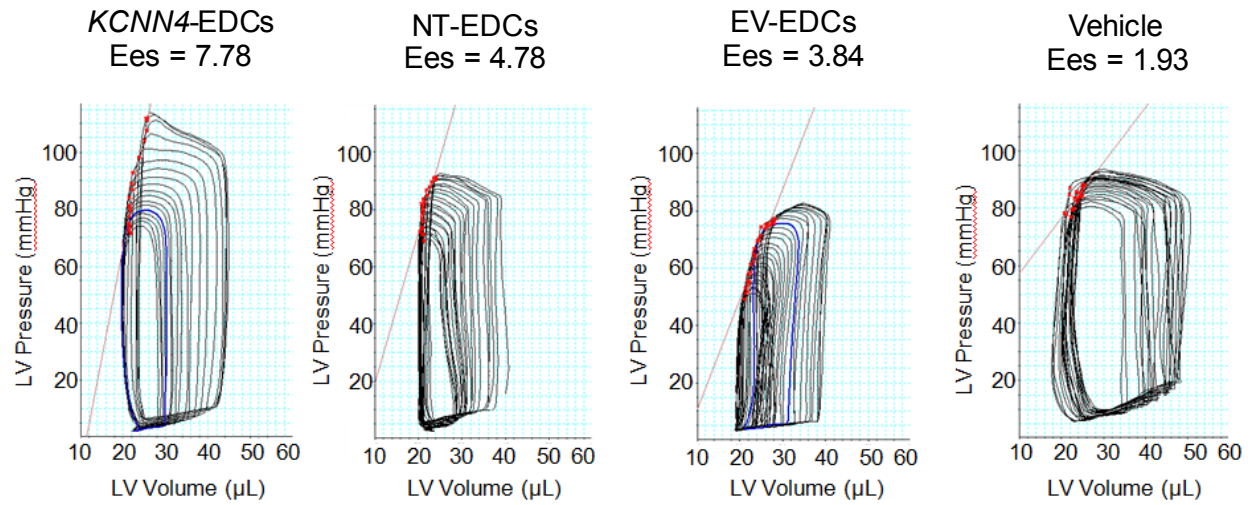


Figure S4. Hemodynamic effects of transplanting *KCNN4* engineered EDCs. Representative images of pressure-volume loops generated during IVC compression from mice 3 weeks after receiving *KCNN4*-EDCs, EV-EDCs, NT-EDCs or vehicle. Ees = end-systolic elastance.

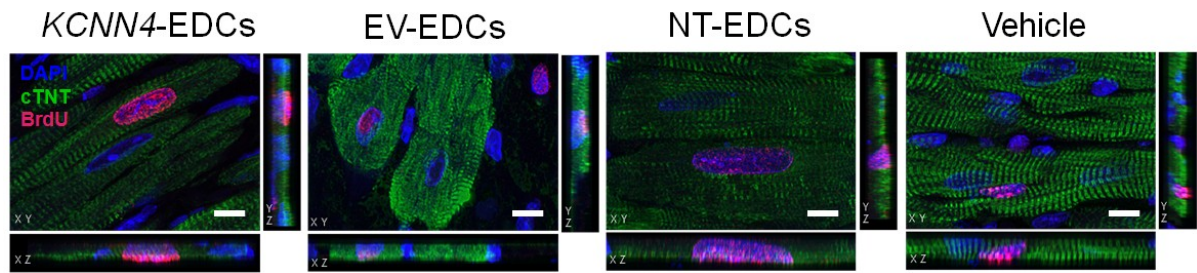


Figure S5. Representative images demonstrating BrdU⁺/DAPI⁺ cells within the peri-infarct region 4 weeks after LCA ligation. Z-stacks images of BrdU⁺ cells demonstrating nuclear localization. Scale bars, 10 μ m.

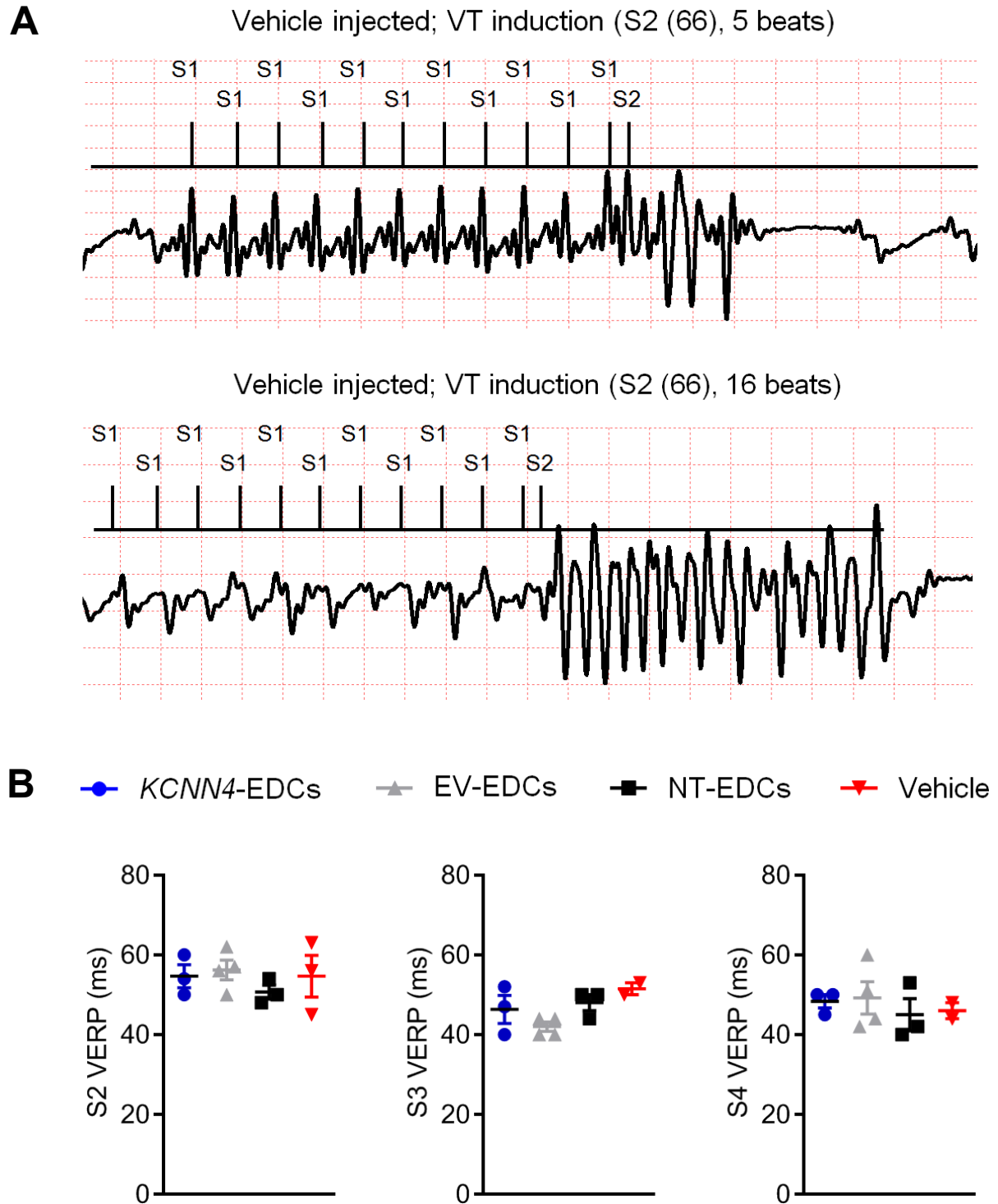
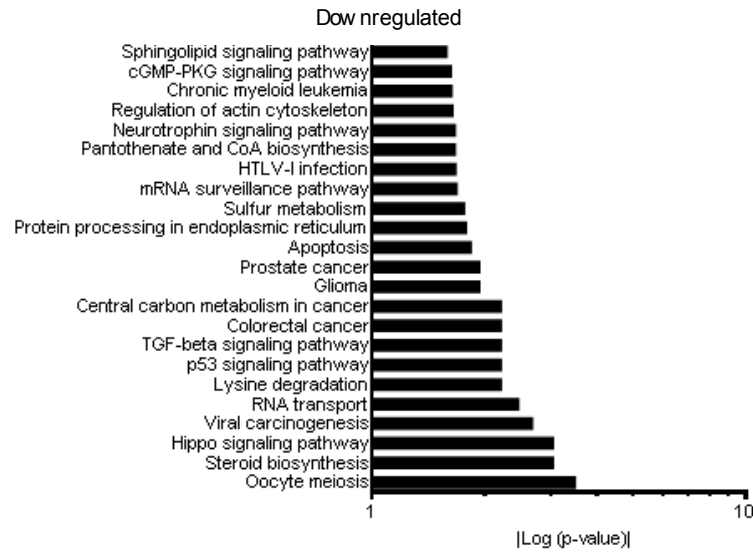
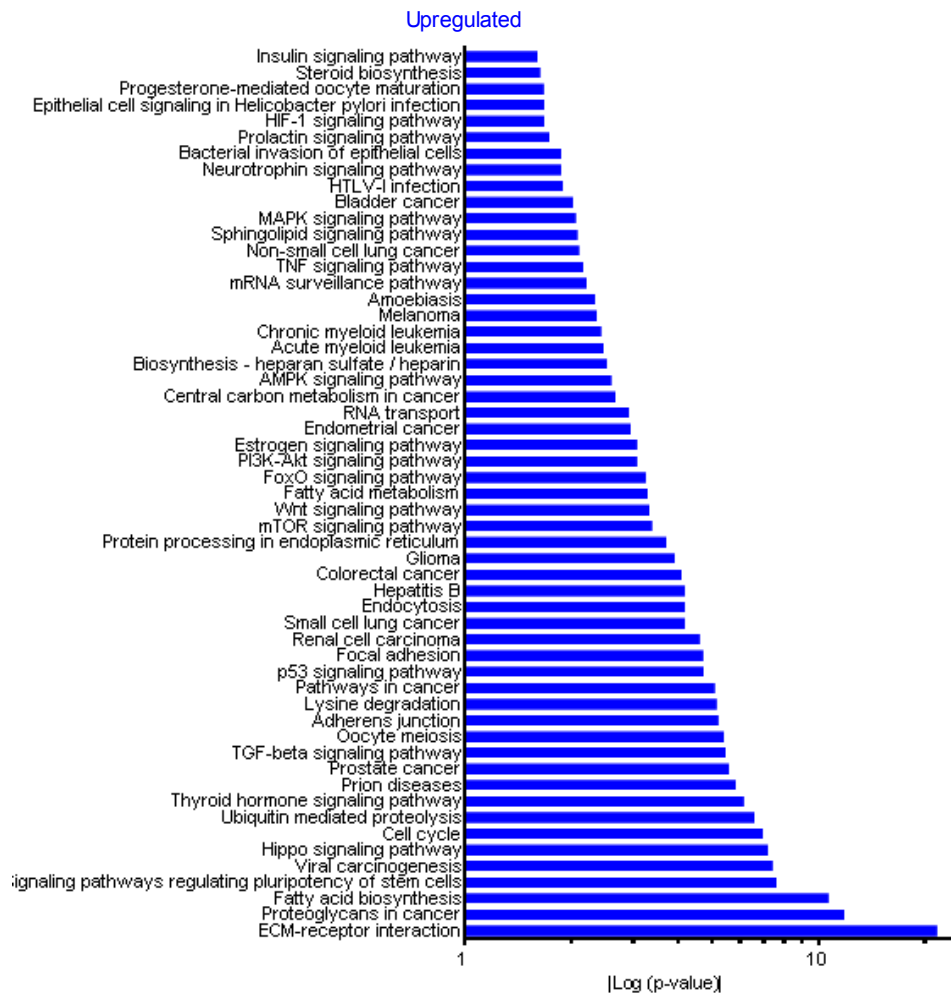


Figure S6. Electrophysiological effects of EDC or vehicle treatment on mice. (A) Telemetry demonstrating induction of ventricular tachycardia in mice treated with vehicle; (B) Effect of EDC or vehicle treatment on ventricular refractoriness.

A**KCNN4-EDCs vs. NT-EDCs****B****KCNN4-EDCs vs. EV-EDCs**

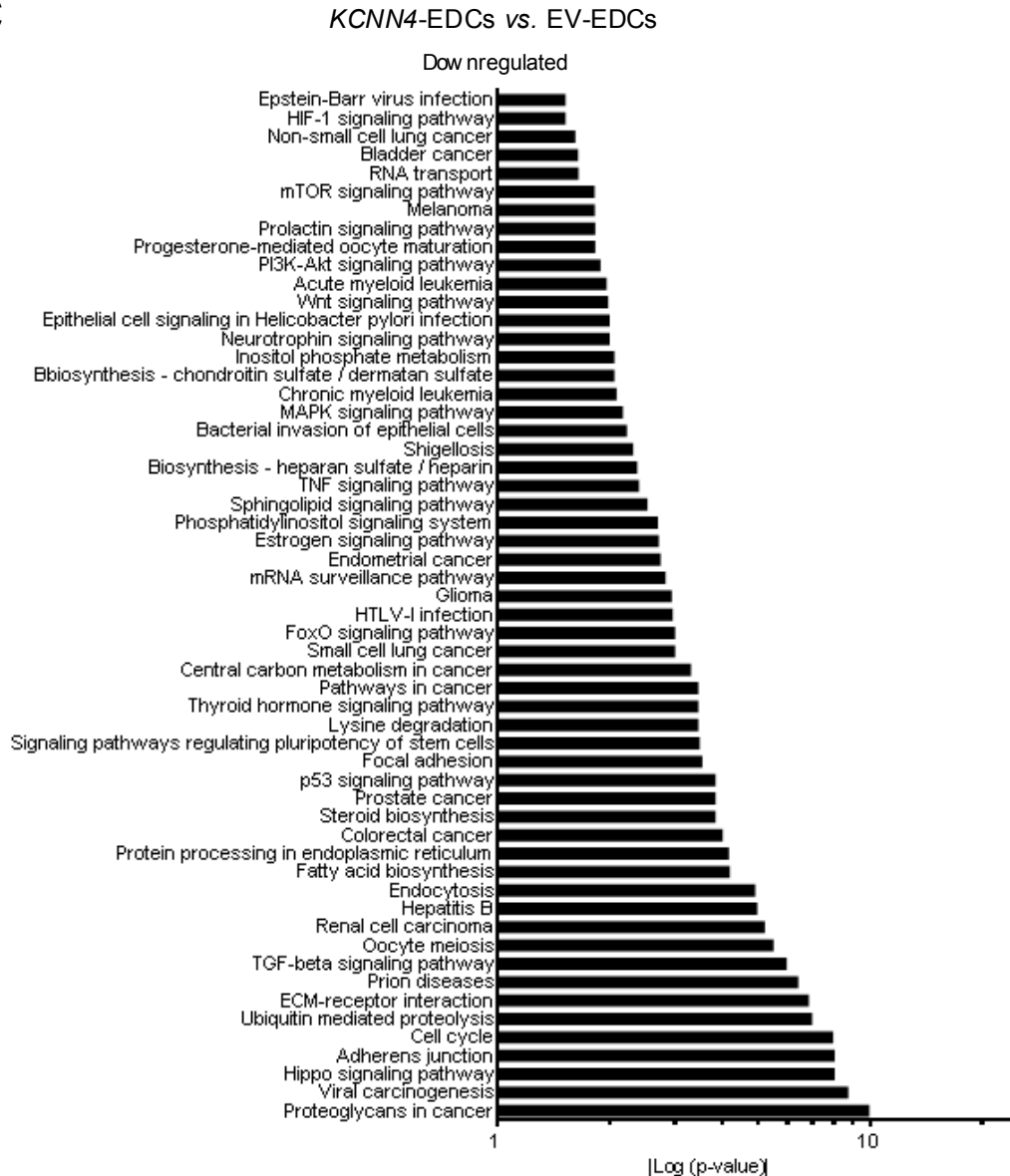
C

Figure S7. KEGG pathway analysis for molecular pathways predicted to be affected by miRNAs altered by *KCNN4* overexpression. Pathways associated with up- and down-regulated miRNAs in extracellular vesicles isolated from *KCNN4*-EDCs compared to (A) NT-EDCs or (B, C) EV-EDCs. For the comparison with NT-EDCs, only downregulated pathways were observed (as shown in A). For the comparison with EV-EDCs, both upregulated (B) and downregulated (C) pathways were noted. Online DIANA-TarBase tools were utilized to predict miRNA pathways based on experimentally validated miRNA interactions (DIANA-miRPath v3.0)⁵³. Blue represents upregulated pathways, black downregulated. No pathways were upregulated in *KCNN4*-EDCs compared to NT-EDCs.

CHAPITRE 4 – Discussion générale

Notre compréhension de l'importance et du rôle des propriétés bioélectriques dans les cellules non-excitables a grandement évolué depuis les premières évidences démontrant la contribution des courants ioniques endogènes dans la prolifération cellulaire [375]. Depuis cette découverte majeure, de nombreux progrès ont été réalisés dans l'établissement de la fonction de canaux ioniques spécifiques dans la régulation d'un large éventail de processus physiologiques. Il est maintenant bien reconnu que cette famille de protéines transmembranaires est essentielle au fonctionnement des cellules non-excitables. En dépit de leur implication potentielle en thérapie cellulaire, les connaissances entourant les propriétés bioélectriques des cellules souches et progéniteurs tissulaires sont limitées.

Les travaux présentés dans cet ouvrage étudient les propriétés électrophysiologiques de 3 populations cellulaires multipotentes présentement investiguées en thérapie cardiaque, soit les eCPCs c-Kit⁺, les EDCs et les BM-MSCs. Bien que les eCPCs c-Kit⁺ et EDCs soient obtenues par des méthodologies différentes, Gaetani *et al.* ont noté un haut degré de similarités génomiques [376]. Les BM-MSCS sont reconnues pour leur morphologie fibroblastique, leur adhérence au plastique lorsque maintenues en condition standard de culture ainsi que leur pouvoir de différenciation en lignées ostéogénique, chondrogénique et adipo-génique [377]. À l'opposé, les cellules souches d'origine cardiaque ont un fort potentiel cardiogénique [41], mais sont incapables de se différencier en ostéocytes et adipocytes [378]. Les niveaux d'acétylation des histones dans les régions promotrices des gènes spécifiques cardiaques s'avèrent plus élevés dans les eCPCs en comparaison aux BM-MSCs, confirmant leur supériorité cardiogénique [32]. En dépit de leur potentiel cardiogénique limité, les BM-MSCs ont reçu une attention particulière en raison de leur privilège immun ainsi que de leurs puissantes propriétés immunosuppresseurs.

4.1 Résumé des principales découvertes

Dans le cadre de la première étude, nous avons caractérisé pour la première fois le profil électrophysiologique des eCPCs c-Kit⁺ immédiatement après leur isolement. Contrairement à ce qui a été rapporté dans les eCPCs c-Kit⁺ après amplification ex vivo, nous avons constaté que les courants K⁺ activés par le Ca²⁺ (KCa) sont prédominants. Le canal KCa3.1 a été identifié sur une base pharmacologique et moléculaire. Bien que la distribution de l'expression du canal au sein de la population de eCSCs c-Kit⁺ n'a pas été évaluée dans cette étude, la présence de canaux KCa3.1 fonctionnel a été détectée dans la totalité des cellules investiguées. D'un point de vue fonctionnel, ces canaux déterminent le V_{mem} et participent à l'homéostasie Ca²⁺ intracellulaire et la prolifération des eCPCs c-Kit⁺. En comparaison avec les eCPCs c-Kit⁺ obtenues à partir de d'animaux sains, les eCPCs isolées de cœurs insuffisants présentent une plus faible expression du canal KCa3.1. Cette altération ionique corrèle avec une réduction de leur capacité proliférative, suggérant un lien entre l'expression de KCa3.1 et le phénotype de la maladie. Enfin, nous avons mis en évidence l'importance de ce mécanisme de régulation ionique dans un autre type cellulaire prometteur en cours de développement pour la thérapie régénérative cardiaque, soient les BM-MSCs. Bien que l'étude de BM-MSCs humaines aurait été davantage pertinente d'un point de vue clinique, l'utilisation de cellules canines nous a permis de comparer les mécanismes de régulation ionique pour deux populations cellulaires multipotentes distinctes provenant de la même espèce. Les résultats de cette première étude ont fourni de nouvelles perspectives sur les déterminants ioniques de la fonction des progéniteurs tissulaires.

L'objectif de la deuxième étude visait à déterminer l'impact de la surexpression du canal KCa3.1 dans le potentiel régénératif de cellules souches cardiaques humaines. En

conditions basales, nous avons rapporté que le canal KCa3.1 était exclusivement exprimé dans la sous-population responsable des effets bénéfiques observés en thérapie cellulaire [88,124]. Comparativement aux cellules non-modifiées, la surexpression de KCa3.1 procure des bénéfices fonctionnels supérieurs lorsque les cellules sont transplantées suite à une lésion myocardique. D'un point de vue mécanistique, nous avons constaté que la surexpression du canal KCa3.1 améliore la prolifération et le profil paracrine des EDCs in vitro. Ces résultats démontrent que le canal KCa3.1 est un facteur déterminant du potentiel thérapeutique des EDCs et que l'expression du canal KCa3.1 pourrait également servir de biomarqueur afin d'identifier et ultimement purifier les sous-populations cellulaires possédant une forte capacité régénérative. Cette étude novatrice est la première évidence que la manipulation de l'activité des canaux ioniques de la membrane plasmique peut améliorer la fonction des cellules souches et de ce fait augmenter les bénéfices cliniques.

4.2 Distribution et fonctions du canal KCa3.1

Chez les mammifères, les canaux KCa3.1 sont largement exprimés dans l'ensemble du corps. Ces canaux sont principalement retrouvés dans les cellules de lignées hématopoïétiques (érythrocytes, plaquettes, lymphocytes, mastocytes, monocytes et macrophages), les tissus épithéliaux du tractus gastro-intestinal, les poumons, les glandes endo- et exocrines, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires ainsi que dans les fibroblastes [379–386]. En ce qui concerne les cellules souches, le canal KCa3.1 a été précédemment rapporté uniquement dans les MSCs [387–391].

Malgré l'expression étendue de KCa3.1 dans de multiples types cellulaires, la perte de fonction du canal dans les divers modèles transgéniques ne produit aucune perturbation

physiologique grave [392–395]. La compensation des canaux SKCa (KCa2.1-3) et BKCa (KCa1.1) pourrait partiellement combler le déficit et ainsi potentiellement prévenir le développement d'un phénotype sévère. La première évidence du rôle physiologique des canaux KCa3.1 provient d'études menées par Gárdos *et al.* à la fin des années 1950, démontrant que l'efflux d'ions K^+ dans les érythrocytes était activé par l'entrée de Ca^{2+} [396]. Des études ultérieures ont confirmé que le canal KCa3.1 était responsable de la conductance potassique observée et que l'efflux d'ions K^+ médié par ce canal était accompagné de la perte de fluides cellulaires menant à la déshydratation des érythrocytes [397,398]. Il a été démontré que l'activation pharmacologique de KCa3.1 peut provoquer l'efflux de plus de 50% du contenu intracellulaire de K^+ . Dans certains cas, la diminution accrue du volume cellulaire causée par une activation excessive du canal peut enclencher les processus de mort cellulaire programmée (apoptose) [399,400]. Suivant ces observations, un rôle similaire des canaux KCa3.1 dans la régulation du volume cytosolique en réponse aux changements osmotiques a été rapporté dans d'autres types cellulaires d'origine hématopoïétique, y compris les lymphocytes T et les mastocytes [400,401].

4.2.1 Régulation de la prolifération cellulaire

Le Ca^{2+} est la clé d'une grande variété de processus cellulaires, tant moléculaires (expression génique) que cellulaires (migration, prolifération, sécrétion, différenciation), autant de processus connus pour être régulés par le Ca^{2+} . La modulation de la signalisation calcique est certainement la fonction la mieux définie des canaux KCa3.1. L'élévation du Ca^{2+} intracellulaire médiée par KCa3.1 est une condition préalable à la prolifération de nombreux types de cellules. En effet, la stimulation de la prolifération cellulaire par l'entremise de facteurs de croissance ou autres molécules mitogènes corrèle avec une augmentation de

l'activité du canal [381,384,402,403]. Il a aussi été démontré que l'expression fonctionnelle de KCa3.1 est augmentée en condition hypoxique et stimule la prolifération des cellules tumorales par un mécanisme dépendant de la voie de signalisation HIF [404].

Au niveau des eCPCs, nous avons démontré que le canal KCa3.1 contribue au maintien de l'activité proliférative normale des eCPCs c-Kit⁺ et son inhibition est accompagnée d'une diminution de l'expression des cyclines D1 et E2. Au cours du cycle cellulaire, des oscillations calciques se produisent parallèlement à l'hyperpolarisation du V_{mem} . Le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ contribue à la transduction des signaux calcique au noyau par le biais de facteurs de transcription tels que NF- κ B, NFAT et CREB (cAMP response element-binding protein) [405]. Des études démontrent que ces facteurs possèdent un rôle central dans la régulation transcriptionnelle des cyclines (A, B, D et E) au sein de plusieurs types cellulaires en réponse à l'élévation du Ca^{2+} [406–408]. Alors que l'activation de NF- κ B et CREB induisent généralement des programmes d'expression génique favorisant la progression du cycle cellulaire [406,409,410], la contribution de NFAT à la prolifération dépend de l'isoforme impliquée [407]. La kinase AKT stimule aussi la prolifération cellulaire en réponse à l'augmentation du Ca^{2+}_i et ce, même en absence de facteurs de croissances [411].

4.2.2 Implication de KCa3.1 en thérapie cellulaire

Dans l'ensemble, nos travaux démontrent que le canal KCa3.1 gouverne les performances thérapeutiques des EDCs, possiblement via la modulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Le transfert génique de *KCNN4* tend à homogénéiser le profil électrophysiologique des EDCs, suggérant une amélioration des capacités régénératives de la sous-population CD90⁺. La surexpression de *KCNN4* a considérablement amélioré la

rétenion à long terme des cellules transplantées, sans toutefois augmenter la susceptibilité aux arythmies ventriculaires. Il est peu probable que la rétenion aigue soit modifiée car la modification des cellules ne confère aucune résistance face à l'apoptose in vitro. Toutefois, la prolifération accrue des cellules pourrait surpasser les taux de mort cellulaire et par conséquent contribuer à maintenir un plus grand nombre de cellules viables à long terme. La prolifération et la différenciation cellulaire montrent une relation inverse remarquable. Cependant, des travaux récents ont clairement établi que la différenciation et la prolifération cellulaire sont régulées simultanément mais indépendamment et que les cellules commencent souvent à se différencier longtemps avant qu'elles ne cessent de se diviser. Néanmoins, ces processus cellulaires requièrent une coordination temporelle entre les mécanismes de régulation du cycle cellulaire et l'induction du programme transcriptionnel de différenciation. Le phénotype prolifératif attribué par la surexpression de *KCNN4* aurait donc pu avoir des effets délétères sur le potentiel cardiogénique des EDCs. L'amélioration de la capacité de différenciation des cellules génétiquement modifiées est en accord avec les effets positifs de l'hyperpolarisation membranaire sur l'engagement cardiomyogéniques des progéniteurs cardiaques rapporté par Van Vliet *et al.* [224]. De plus, l'activation de NFAT est connue pour réguler directement la transcription de *NKX2.5* au cours de la différenciation des cellules cardiaques, supportant le rôle du Ca^{2+}_i dans l'induction de l'expression de gènes cardio-spécifiques.

En dépit de ces observations, il est généralement reconnu que la différenciation des cellules transplantées ne survient que très rarement et que la plupart des bienfaits de la thérapie cellulaire sont médiés par des effets paracrines favorisant l'angiogénèse, la cardiomyogénèse, la réduction du remodelage pathologique ainsi que l'activation de

mécanismes immunomodulateurs. On sait depuis de nombreuses années que l'élévation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique est un pré-requis pour la libération de neurotransmetteurs et d'hormones [412]. La contribution de KCa3.1 dans la signalisation paracrine des cellules souches était inconnue, mais l'influx calcique médié par son activation est nécessaire pour la libération de cytokines par diverses cellules immunitaires [381,413–415]. En accord avec ces observations, nous avons constaté que la surexpression de KCa3.1 élargit favorablement le répertoire paracrine des EDCs. Par conséquent, la potentialisation des capacités régénératives des cellules transplantées est fort probablement le résultat de la libération d'une plus grande quantité de cytokines au niveau de la région lésée, conséquence d'une rétention à long terme accrue. Puisque les cytokines produites par les EDCs ont été quantifiées dans le milieu extracellulaire, il reste à savoir si la surexpression de *KCNN4* favorise l'expression protéique des facteurs paracrines enregistrés, leur sécrétion ou encore les deux. Parmi la variété de facteurs sécrétés, SDF-1 attire particulièrement l'attention puisque la surexpression de cette cytokine par les EDCs augmente les bénéfices thérapeutiques lorsque ces dernières sont transplantées après infarctus [111]. En plus de promouvoir le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse, l'augmentation de la concentration locale de SDF-1 corrèle avec une atténuation des voies pro-apoptotiques (ratio BCL2/BAX) en périphérie de la région infarctée.

En plus des effets positifs sur la prolifération et le spectre de cytokines produites par les EDCs, la surexpression de KCa3.1 stimule la production d'exosomes. Récemment, Ibrahim *et al.* ont démontré que les exosomes sont les acteurs clés de la régénération cardiaque médiée par les EDCs [416]. Ils ont constaté que l'inhibition de la production d'exosomes abolit les bénéfices du transfert adoptif de cellules. En 2003, Savina *et al.* ont

montré que la sécrétion d'exosomes est régulée par un mécanisme dépendant du Ca^{2+} [417]. Dans l'ensemble, ils ont constaté que l'augmentation du Ca^{2+}_i stimule la fusion des corps multivésiculaires (CMV) avec la membrane plasmique et le relargage subséquent d'exosomes. Puisque la surexpression de *KCNN4* affecte la production de cytokines, il est plausible que le contenu protéique des exosomes soit parallèlement modifié. Considérant la contribution majeure des exosomes dans la régénération cardiaque, il est primordial de caractériser leur contenu dans les cellules souches surexprimant *KCNN4*.

4.3 Pertinence et originalité des résultats

Malgré des données probantes sur le rôle instructif des signaux bioélectriques endogènes au cours du développement et dans les processus régénératifs [220,418–423], cette voie de régulation est généralement très peu considérée dans les domaines de la médecine régénérative et du génie tissulaire. Néanmoins, la possibilité de contrôler les fonctions des cellules souches en modulant les propriétés bioélectriques représente un outil puissant pour orienter le phénotype des cellules souches vers des applications thérapeutiques [424]. En plus des divers récepteurs membranaires, les nombreux types de canaux présents à la surface cellulaire peuvent transduire les différents stimuli environnementaux et ainsi permettre une réponse physiologique. Une meilleure compréhension des propriétés électrophysiologiques des cellules souches est primordiale afin de guider le développement de nouvelles stratégies pour améliorer leur valeur thérapeutique et ainsi permettre de tirer profit du potentiel de la biologie des canaux ioniques. Bien que les rapports précédents aient établis un lien entre la fonction des canaux ioniques et les processus cellulaires, les altérations phénotypiques survenant au cours des étapes d'amplification *ex vivo* pourraient

occulter certaines propriétés fondamentales des cellules [425]. Des études préliminaires ont noté un profil électrophysiologique relativement hétérogène, suggérant l'existence de certaines sous-populations de eCPCs c-Kit⁺ [313,314]. Cependant, la pertinence de ces observations est incertaine car il est difficile d'évaluer si cette variabilité ionique est réelle ou si elle dérive plutôt d'un artefact expérimental induit par les conditions de culture in vitro [426,427]. Dans l'espoir de développer des stratégies rationnelles visant à améliorer la fonction des eCPCs, il est primordial de déterminer leurs propriétés électrophysiologiques intrinsèques. Contrairement aux études initiales, nous avons démontré que le répertoire ionique des cellules immédiatement après isolement est largement moins étendu et beaucoup plus homogène que ce qui était décrit jusqu'alors. Grâce à notre approche, nous avons mis en évidence la présence d'une conductance ionique dominante et potentiellement importante pour la physiologie des eCPCs c-Kit⁺ in situ. Nos travaux se distinguent aussi des précédents par la démonstration du lien entre l'homéostasie calcique intracellulaire, le V_{mem} et la fonction proliférative. Parmi les études ayant investigué les mécanismes ioniques dans les eCPCs, aucune n'a identifié la nature des canaux responsables de la détermination et du maintien du V_{mem} .

D'un point de vue pathologique, nous avons observé une diminution fonctionnelle de KCa3.1 dans les eCPCs c-Kit⁺ obtenues de cœurs insuffisants et une plus faible expression de des cyclines D1 et E2. Ces résultats constituent la première évidence du remodelage ionique des eCPCs c-Kit⁺ en contexte pathologique et sont en accord avec la perte de fonction des cellules observée en IC [428]. Zhang *et al.* n'ont quant à eux noté aucun impact du statut clinique des patients sur le profil électrophysiologique des eCPCs c-Kit⁺ [314]. La divergence des résultats peut potentiellement s'expliquer par le fait que les cellules mise en

culture perdent rapidement leur phénotype pathologique [425].

Tel que mentionné précédemment, la comparaison du potentiel régénératif des sous-populations cellulaires composant les EDCs a révélé la supériorité thérapeutique des cellules CD90⁻ [88,124]. Cependant, les mécanismes moléculaires associés à leur capacité régénérative demeure inconnus. Des évidences suggèrent que cette différence pourrait être attribuée à une sécrétion accrue de facteurs pro-angiogéniques par la sous-population CD90⁻ en comparaison aux cellules CD90⁺ [124]. Nous avons donc investigué les EDCs sur le plan ionique afin de faire la lumière sur les déterminants ioniques de la thérapie cellulaire cardiaque. Ces expériences électrophysiologiques ont démontré la présence du canal KCa3.1 exclusivement dans les cellules CD90⁻. L'expression de KCa3.1 corrèle donc avec le potentiel régénératif des progéniteurs cardiaques, suggérant l'implication de ce canal dans la régénération cardiaque médiée par la population CD90⁻. Ultimement, les travaux issus de cette étude démontrent pour la première fois que les mécanismes de régulation ioniques gouvernent les propriétés régénératives des cellules souches. Ils font aussi la preuve que la modulation de l'activité d'un transporteur ionique unique permet d'améliorer le potentiel régénératif des cellules souches dans un contexte clinique.

La modulation des propriétés ioniques des cellules pourrait être une stratégie avantageuse en comparaison aux stratégies de conditionnement investiguées précédemment puisque des évidences suggèrent que la signalisation bioélectrique prédomine sur les signaux chimiques. Par exemple, malgré la présence de puissants inducteurs chimiques, il est possible de prévenir la différenciation des MSCs en les maintenant artificiellement dépolarisées [221]. Sundelacruz *et al.* ont même démontré que la modulation du V_{mem} peut partiellement renverser le processus de différenciation des MSCs et augmenter leur plasticité [222]. Mis à

part la différenciation, la motilité cellulaire est aussi préférentiellement affecté par les signaux bioélectriques lorsqu'ils sont opposés à des gradient chimiques [429,430]. De plus, le fait que l'augmentation accrue de la prolifération médiée par la surexpression de *KCNN4* ne se produise pas au détriment d'une réduction du potentiel de différenciation est aussi un avantage considérable puisque certaines évidences expérimentales proposent que l'engagement cardiogénique des cellules après transplantation est essentielle à la réponse régénérative [431]. En effet, bien que la surexpression nucléaire de la kinase AKT favorise la prolifération et la sécrétion de facteurs paracrine protecteurs, l'incapacité des cellules génétiquement modifiées d'acquérir un phénotype cardiaque entrave leur capacité régénérative. Afin de promouvoir des bénéfices fonctionnels, les stratégies de conditionnement doivent donc favoriser la prolifération sans avoir d'impact négatif sur la capacité d'engagement dans les lignées cellulaires cardiaques.

Les résultats présentés dans cette thèse ont significativement contribué à l'avancement des connaissances dans un domaine en émergence et pavent la voie pour le développement de nouvelles approches novatrices afin de surmonter les obstacles limitant le transfert clinique de la thérapie cellulaire.

4.4 Perspectives futures des travaux

En plus de leur expression à la membrane plasmique, les canaux $KCa_{3.1}$ ont aussi été identifiés au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (MMI) [432]. Quast *et al.* ont noté que le TRAM-34 induit une hyperpolarisation de la MMI, une réponse attendue lorsque le flux d'ions chargés positivement vers la matrice mitochondriale est inhibé [433]. Ils ont aussi constaté que l'inhibition spécifique des canaux $KCa_{3.1}$ mitochondriaux (m $KCa_{3.1}$)

provoque la translocation du facteur de transcription pro-apoptotique *BAX* dans la mitochondrie, une étape précoce de la mort cellulaire programmée. Dans l'ensemble, ces observations ont confirmé la présence de canaux *KCa3.1* fonctionnels au niveau de la MMI. Même si peu d'étude on étudié le rôle de ce canal dans les processus cellulaires il est connu que les fluctuations du potentiel mitochondrial provoqué par le flux d'ions K^+ modulent la chaîne respiratoire et conséquemment la production d'ATP (adénosine triphosphate) [434]. Considérant l'expression fonctionnelle de *KCa3.1* au niveau de la mitochondrie [432,433], on ne peut exclure la possibilité que ce canal contribue au phénotype prolifératif observé suite à la surexpression de *KCNN4*. Bien que les mécanismes moléculaires par lesquels *mtKCa3.1* affecte le métabolisme cellulaire doivent être élucidés, Kovalenko *et al.* ont rapporté que *mtKCa3.1* contrôle la prolifération cellulaire via la régulation de la phosphorylation oxydative (OxPhos) [435]. Puisque la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices impliquent des modifications de leur état métabolique [436], il est crucial d'investiguer l'impact de la surexpression de *KCNN4* sur le métabolisme énergétique des EDCs.

Bien que nos principaux travaux se limitent au domaine de la cardiologie, nos observations faites dans les cellules dérivées de la moelle osseuse suggèrent que ces mécanismes de régulation ionique sont bien conservés. Il est donc raisonnable de croire que ces découvertes pourraient bénéficier à plusieurs autres domaines médicaux, notamment en oncologie. Le développement de stratégies visant à accélérer la reconstitution hématologique et immunologique après transplantation est une voie de recherche active depuis plusieurs années [437–442]. Il est maintenant bien connu que les signaux calciques régulent l'hématopoïèse [443]. En effet, certains groupes ont démontré que le Ca^{2+} participe

directement aux processus de prolifération et différenciation des cellules d'origine hématopoïétique en réponse à diverses cytokines et à l'activation des récepteurs purinergiques [444–446]. Alors que KCa3.1 est largement exprimé dans les cellules de lignée hématopoïétique (érythrocytes [447], plaquettes [448], lymphocytes [379,414], mastocytes [401,449], monocytes/macrophages [450,451]), la modulation fonctionnelle de ce canal pourrait représenter une approche rationnelle pour optimiser la signalisation calcique intracellulaire et ainsi améliorer la fonctionnalité des cellules avant la greffe.

Tel que décrit précédemment, de nombreux processus cellulaires fondamentaux sont régulés par le couplage entre les variations du V_{mem} et le contrôle transcriptionnel des canaux ioniques [452]. En identifiant les canaux ioniques impliqués dans la détermination du V_{mem} , les voies de transduction activées en réponse aux variations de potentiel ainsi que les cibles transcriptionnelles ou épigénétiques en aval, les travaux futurs permettront d'établir le lien existant entre les signaux bioélectriques et la signalisation intracellulaire. Considérant la complexité de la signalisation bioélectrique, les techniques d'analyses à haut débit (e.g. RNA-seq, ChIP-seq) seront un atout important pour mieux comprendre et discriminer à l'échelle génomique les programmes cellulaires déclenchés par un changement de V_{mem} afin de mieux comprendre leur fonctionnement en identifiant les gènes clés et ainsi permettre au domaine de la médecine régénérative de tirer profit du potentiel de la biologie des canaux ioniques.

CHAPITRE 5 – Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que les canaux KCa3.1 régulent le potentiel membranaire et la signalisation calcique nécessaire pour le maintien de la fonction proliférative de certaines populations de progéniteurs cardiaques. La surexpression de KCa3.1 augmente la prolifération et élargit le répertoire paracrine des cellules. Ultimement, nous avons fait la preuve que la manipulation de l'activité d'un unique canal ionique représente une stratégie très prometteuse pour améliorer le potentiel thérapeutique en médecine régénérative.

Bibliographie

1. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev.* 2017;3: 7–11. doi:10.15420/cfr.2016:25:2
2. Terzic A, Behfar A. Stem cell therapy for heart failure: Ensuring regenerative proficiency. *Trends Cardiovasc Med.* 2016;26: 395–404. doi:10.1016/j.tcm.2016.01.003
3. Chen-Scarabelli C, Saravolatz L, Hirsh B, Agrawal P, Scarabelli TM. Dilemmas in end-stage heart failure. *J Geriatr Cardiol JGC.* 2015;12: 57–65. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2015.01.007
4. Heart & Stroke Foundation: 2016 report on the health of Canadians: the burden of heart failure. Available: www.heartandstroke.ca. Accessed 20 Sep 2017.
5. Tran DT, Ohinmaa A, Thanh NX, Howlett JG, Ezekowitz JA, McAlister FA, et al. The current and future financial burden of hospital admissions for heart failure in Canada: a cost analysis. *CMAJ Open.* 2016;4: E365–E370. doi:10.9778/cmajo.20150130
6. Packer M. Pathophysiology of chronic heart failure. *Lancet.* 1992;340: 88–92.
7. Fox KF, Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Gibbs JS, Underwood SR, et al. Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population. *Eur Heart J.* 2001;22: 228–236. doi:10.1053/euhj.2000.2289
8. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, et al. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation.* 1994;89: 151–163.

9. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, et al. The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27: 291–305.
10. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996;335: 1182–1189. doi:10.1056/NEJM199610173351603
11. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997;336: 1131–1141. doi:10.1056/NEJM199704173361603
12. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res.* 2000;86: 1107–1113.
13. Habal MV, Garan AR. Long-term management of end-stage heart failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2017;31: 153–166. doi:10.1016/j.bpa.2017.07.003
14. Friedrich EB, Böhm M. Management of end stage heart failure. *Heart.* 2007;93: 626–631. doi:10.1136/hrt.2006.098814
15. Parikh R, Kadowitz PJ. A review of current therapies used in the treatment of congestive heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2013;11: 1171–8. doi:10.1586/14779072.2013.816478
16. Yun JJ, Gonzalez-Stawinski G. Heart transplantation. *Minerva Chir.* 2009;64: 23–35.
17. Toyoda Y, Guy TS, Kashem A. Present status and future perspectives of heart transplantation. *Circ J.* 2013;77: 1097–110.
18. Abraham WT, Smith SA. Devices in the management of advanced, chronic heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10: 98–110. doi:10.1038/nrcardio.2012.178

19. Neragi-Miandoab S. A ventricular assist device as a bridge to recovery, decision making, or transplantation in patients with advanced cardiac failure. *Surg Today*. 2012;42:917–26. doi:10.1007/s00595-012-0256-z
20. Nguyen PK, Rhee J-W, Wu JC. Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016: a systematic review. *JAMA Cardiol*. 2016;1: 831–841. doi:10.1001/jamacardio.2016.2225
21. Broughton K, Sussman MA. Empowering Adult Stem Cells for Myocardial Regeneration V2.0: Success in Small Steps. *Circ Res*. 2016;118: 867–880. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305227
22. Kim H, Kim S-W, Nam D, Kim S, Yoon Y-S. Cell therapy with bone marrow cells for myocardial regeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11: 1897–1911. doi:10.1089/ars.2009.2486
23. Kulandavelu S, Karantalis V, Fritsch J, Hatzistergos KE, Loescher VY, McCall F, et al. Pim1 Kinase Overexpression Enhances ckit+Cardiac Stem Cell Cardiac Repair Following Myocardial Infarction in Swine. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68: 2454–2464. doi:10.1016/j.jacc.2016.09.925
24. Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Dev Camb Engl*. 1989;106: 619–633.
25. He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25: 377–406. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113248
26. Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H. Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell*. 2011;9: 402–411. doi:10.1016/j.stem.2011.10.004

27. Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2010;365: 155–163. doi:10.1098/rstb.2009.0149
28. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282: 1145–1147.
29. Biswas A, Hutchins R. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007;16: 213–222. doi:10.1089/scd.2006.0081
30. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, et al. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006;24: 2714–2722. doi:10.1634/stemcells.2006-0156
31. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000;287: 2032–2036.
32. Walkup MH, Gerber DA. Hepatic stem cells: in search of. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006;24: 1833–1840. doi:10.1634/stemcells.2006-0063
33. Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N. Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2004;22: 1070–1084. doi:10.1634/stemcells.22-6-1070
34. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97: 13625–13630. doi:10.1073/pnas.240309797
35. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult

- human kidneys. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2006;17: 2443–2456. doi:10.1681/ASN.2006010089
36. Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumié A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2005;205: 114–122. doi:10.1002/jcp.20381
37. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100: 1249–1260. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
38. Jeong JA, Hong SH, Gang EJ, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, et al. Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2005;23: 584–593. doi:10.1634/stemcells.2004-0304
39. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103: 1669–1675. doi:10.1182/blood-2003-05-1670
40. Prat-Vidal C, Roura S, Farré J, Gálvez C, Llach A, Molina CE, et al. Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant Proc*. 2007;39: 2434–2437. doi:10.1016/j.transproceed.2007.06.016
41. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114: 763–776.

42. Barile L, Messina E, Giacomello A, Marban E. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;50: 31–48. doi:10.1016/j.pcad.2007.03.005
43. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 14068–14073. doi:10.1073/pnas.0706760104
44. Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med.* 2011;9: 29. doi:10.1186/1479-5876-9-29
45. Martin U. Therapeutic Application of Pluripotent Stem Cells: Challenges and Risks. *Front Med.* 2017;4. doi:10.3389/fmed.2017.00229
46. Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res.* 2003;58: 324–35.
47. Poulson R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol.* 2002;197: 441–56. doi:10.1002/path.1176
48. Menasché P. Skeletal myoblasts and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45: 545–553. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.11.009
49. Clavel C, Verfaillie CM. Bone-marrow-derived cells and heart repair. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008;13: 36–43. doi:10.1097/MOT.0b013e3282f428d1
50. Le TYL, Chong JJH. Cardiac progenitor cells for heart repair. *Cell Death Discov.* 2016;2: 16052. doi:10.1038/cddiscovery.2016.52
51. Bai X, Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401: 321–326. doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.012

52. Greco N, Laughlin MJ. Umbilical cord blood stem cells for myocardial repair and regeneration. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2010;660: 29–52. doi:10.1007/978-1-60761-705-1_3
53. Dixit P, Katare R. Challenges in identifying the best source of stem cells for cardiac regeneration therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6. doi:10.1186/s13287-015-0010-8
54. Cambria E, Pasqualini FS, Wolint P, Günter J, Steiger J, Bopp A, et al. Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types. *Npj Regen Med*. 2017;2: 17. doi:10.1038/s41536-017-0024-1
55. Behfar A, Crespo-Diaz R, Terzic A, Gersh BJ. Cell therapy for cardiac repair--lessons from clinical trials. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11: 232–246. doi:10.1038/nrcardio.2014.9
56. Madonna R, Van Laake LW, Davidson SM, Engel FB, Hausenloy DJ, Lecour S, et al. Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: cell-based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure. *Eur Heart J*. 2016;37: 1789–1798. doi:10.1093/eurheartj/ehw113
57. Gyöngyösi M, Wojakowski W, Navarese EP, Moya LÀ, ACCRUE Investigators. Meta-Analyses of Human Cell-Based Cardiac Regeneration Therapies: Controversies in Meta-Analyses Results on Cardiac Cell-Based Regenerative Studies. *Circ Res*. 2016;118: 1254–1263. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307347
58. Gyöngyösi M, Wojakowski W, Lemarchand P, Lunde K, Tendera M, Bartunek J, et al. Meta-Analysis of Cell-based CaRdiac stUdiEs (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circ Res*. 2015;116: 1346–1360. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304346

59. Fisher SA, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E. Meta-analysis of cell therapy trials for patients with heart failure. *Circ Res.* 2015;116: 1361–1377. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304386
60. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324: 98–102. doi:10.1126/science.1164680
61. Kajstura J, Urbanek K, Perl S, Hosoda T, Zheng H, Ogórek B, et al. Cardiomyogenesis in the Adult Human Heart. *Circ Res.* 2010;107: 305–315. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223024
62. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 10440–10445. doi:10.1073/pnas.1832855100
63. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res.* 2011;109: 941–61. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243154
64. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344: 1750–1757. doi:10.1056/NEJM200106073442303
65. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell.* 2003;5: 877–89.
66. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after

- infarction. *Proc Natl Acad Sci U A.* 2003;100: 12313–8.
doi:10.1073/pnas.2132126100
67. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megoney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett.* 2002;530: 239–43.
68. Cyganek L, Chen S, Borchert T, Guan K. Cardiac Progenitor Cells and their Therapeutic Application for Cardiac Repair. *J Clin Exp Cardiol.* 2013;0. doi:10.4172/2155-9880.S11-008
69. Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U A.* 2005;102: 8966–71. doi:10.1073/pnas.0502678102
70. Ellison GM, Torella D, Dellegrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez de Prado A, Vicinanza C, et al. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58: 977–986. doi:10.1016/j.jacc.2011.05.013
71. Hou X, Appleby N, Fuentes T, Longo LD, Bailey LL, Hasaniya N, et al. Isolation, Characterization, and Spatial Distribution of Cardiac Progenitor Cells in the Sheep Heart. *J Clin Exp Cardiol.* 2012;S6.
72. Angert D, Berretta RM, Kubo H, Zhang H, Chen X, Wang W, et al. Repair of the injured adult heart involves new myocytes potentially derived from resident cardiac stem cells. *Circ Res.* 2011;108: 1226–1237. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.239046

73. Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD, et al. Adult c-kit(+) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*. 2013;154: 827–42. doi:10.1016/j.cell.2013.07.039
74. Verduci L, Loparco G, Pozzoli O, Pompilio G, Capogrossi MC. Identification of Kit (c-Kit) positive cells in the heart of adult zebrafish. *Int J Cardiol*. 2014;175: 204–205. doi:10.1016/j.ijcard.2014.04.231
75. Ferreira-Martins J, Ogorek B, Cappetta D, Matsuda A, Signore S, D’Amario D, et al. Cardiomyogenesis in the developing heart is regulated by c-kit-positive cardiac stem cells. *Circ Res*. 2012;110: 701–15. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259507
76. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2003;92: 139–50.
77. Bearzi C, Leri A, Lo Monaco F, Rota M, Gonzalez A, Hosoda T, et al. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2009;106: 15885–90. doi:10.1073/pnas.0907622106
78. Liang SX, Phillips WD. Migration of resident cardiac stem cells in myocardial infarction. *Anat Rec Hoboken NJ* 2007. 2013;296: 184–191. doi:10.1002/ar.22633
79. Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, Clapham DE, Lien C-L, Schultheiss TM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell*. 2006;127: 1137–1150. doi:10.1016/j.cell.2006.10.028
80. Sturzu AC, Wu SM. Developmental and regenerative biology of multipotent cardiovascular progenitor cells. *Circ Res*. 2011;108: 353–364. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227066

81. van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin S-CJ, et al. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*. 2014;509: 337–341. doi:10.1038/nature13309
82. Zaruba M-M, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ. Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation*. 2010;121: 1992–2000. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.909093
83. Sultana N, Zhang L, Yan J, Chen J, Cai W, Razzaque S, et al. Resident c-kit⁺ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun*. 2015;6: 8701. doi:10.1038/ncomms9701
84. Hamid T, Xu Y, Ismahil MA, Li Q, Jones SP, Bhatnagar A, et al. TNF receptor signaling inhibits cardiomyogenic differentiation of cardiac stem cells and promotes a neuroadrenergic-like fate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; ajpheart.00904.2015. doi:10.1152/ajpheart.00904.2015
85. Gude NA, Firouzi F, Broughton KM, Ilves K, Nguyen KP, Payne CR, et al. Cardiac c-Kit Biology Revealed by Inducible Transgenesis. *Circ Res*. 2018;123: 57–72. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311828
86. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004;428: 668–673. doi:10.1038/nature02460
87. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428: 664–668. doi:10.1038/nature02446

88. Cheng K, Ibrahim A, Hensley MT, Shen D, Sun B, Middleton R, et al. Relative Roles of CD90 and c-Kit to the Regenerative Efficacy of Cardiosphere-Derived Cells in Humans and in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis.* 2014;3. doi:10.1161/JAHA.114.001260
89. Anversa P, Kajstura J, Rota M, Leri A. Regenerating new heart with stem cells. *J Clin Invest.* 2013;123:62–70. doi:10.1172/JCI63068
90. Tallini YN, Greene KS, Craven M, Spealman A, Breitbach M, Smith J, et al. c-kit expression identifies cardiovascular precursors in the neonatal heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:1808–1813. doi:10.1073/pnas.0808920106
91. Nadal-Ginard B, Ellison GM, Torella D. The cardiac stem cell compartment is indispensable for myocardial cell homeostasis, repair and regeneration in the adult. *Stem Cell Res.* 2014;13:615–630. doi:10.1016/j.scr.2014.04.008
92. Hatzistergos KE, Takeuchi LM, Saur D, Seidler B, Dymecki SM, Mai JJ, et al. cKit⁺ cardiac progenitors of neural crest origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:13051–13056. doi:10.1073/pnas.1517201112
93. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:14022–7. doi:10.1073/pnas.0903201106
94. Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2009;30:2722–2732. doi:10.1093/eurheartj/ehp265

95. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378: 1847–57. doi:10.1016/S0140-6736(11)61590-0
96. McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, et al. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc*. 2012;7: 1479–1496. doi:10.1038/nprot.2012.075
97. Chugh AR, Beache G, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, et al. Administration of Cardiac Stem Cells in Patients with Ischemic Cardiomyopathy (the SCIPIO Trial): Surgical Aspects and Interim Analysis of Myocardial Function and Viability by Magnetic Resonance. *Circulation*. 2012;126: S54–S64. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.092627
98. Li M, Naqvi N, Yahiro E, Liu K, Powell PC, Bradley WE, et al. c-kit is required for cardiomyocyte terminal differentiation. *Circ Res*. 2008;102: 677–685. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.161737
99. Naqvi N, Li M, Yahiro E, Graham RM, Husain A. Insights into the Characteristics of Mammalian Cardiomyocyte Terminal Differentiation Shown Through the Study of Mice with a Dysfunctional c-Kit. *Pediatr Cardiol*. 2009;30: 651–658. doi:10.1007/s00246-008-9366-1
100. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkenstein JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med*. 2007;13: 970–4. doi:10.1038/nml618

101. Jesty SA, Steffey MA, Lee FK, Breitbach M, Hesse M, Reining S, et al. c-kit⁺ precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2012;109: 13380–5. doi:10.1073/pnas.1208114109
102. Zhang Y, Li T-S, Lee S-T, Wawrowsky KA, Cheng K, Galang G, et al. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PloS One*. 2010;5: e12559. doi:10.1371/journal.pone.0012559
103. Liu Q, Yang R, Huang X, Zhang H, He L, Zhang L, et al. Genetic lineage tracing identifies in situ Kit-expressing cardiomyocytes. *Cell Res*. 2016;26: 119–130. doi:10.1038/cr.2015.143
104. Kubin T, Pöling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, et al. Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell Stem Cell*. 2011;9: 420–432. doi:10.1016/j.stem.2011.08.013
105. Gude NA, Sussman MA. Chasing c-Kit through the heart: Taking a broader view. *Pharmacol Res*. 2017. doi:10.1016/j.phrs.2017.06.007
106. Li T-S, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B, et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59: 942–953. doi:10.1016/j.jacc.2011.11.029
107. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95: 911–921. doi:10.1161/01.RES.0000147315.71699.51

108. Zakharova L, Nural-Guvener H, Gaballa MA. Cardiac explant-derived cells are regulated by Notch-modulated mesenchymal transition. *PloS One*. 2012;7: e37800. doi:10.1371/journal.pone.0037800
109. Davis DR, Kizana E, Terrovitis J, Barth AS, Zhang Y, Smith RR, et al. Isolation and expansion of functionally-competent cardiac progenitor cells directly from heart biopsies. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49: 312–321. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.02.019
110. Mayfield AE, Tilokee EL, Davis DR. Resident cardiac stem cells and their role in stem cell therapies for myocardial repair. *Can J Cardiol*. 2014;30: 1288–1298. doi:10.1016/j.cjca.2014.03.018
111. Tilokee EL, Latham N, Jackson R, Mayfield AE, Ye B, Mount S, et al. Paracrine Engineering of Human Explant-Derived Cardiac Stem Cells to Over-Express Stroma-Cell Derived Factor 1 α Enhances Myocardial Repair. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2016;34: 1826–1835. doi:10.1002/stem.2373
112. Mayfield AE, Tilokee EL, Latham N, McNeill B, Lam B-K, Ruel M, et al. The effect of encapsulation of cardiac stem cells within matrix-enriched hydrogel capsules on cell survival, post-ischemic cell retention and cardiac function. *Biomaterials*. 2014;35: 133–142. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.085
113. Mayfield AE, Fitzpatrick ME, Latham N, Tilokee EL, Villanueva M, Mount S, et al. The impact of patient co-morbidities on the regenerative capacity of cardiac explant-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7: 60. doi:10.1186/s13287-016-0321-4
114. Jackson R, Tilokee EL, Latham N, Mount S, Rafatian G, Strydhorst J, et al. Paracrine Engineering of Human Cardiac Stem Cells With Insulin-Like Growth Factor 1

- Enhances Myocardial Repair. *J Am Heart Assoc.* 2015;4: e002104. doi:10.1161/JAHA.115.002104
115. Davis DR, Stewart DJ. Selectins for Cardiosphere Culture: The “E’s” Have It! *Mol Ther.* 2012;20: 1296–1297. doi:10.1038/mt.2012.120
116. Cho H-J, Lee H-J, Youn S-W, Koh S-J, Won J-Y, Chung Y-J, et al. Secondary sphere formation enhances the functionality of cardiac progenitor cells. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2012;20: 1750–1766. doi:10.1038/mt.2012.109
117. Davis DR, Ruckdeschel Smith R, Marbán E. Human cardiospheres are a source of stem cells with cardiomyogenic potential. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2010;28: 903–904. doi:10.1002/stem.413
118. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation.* 2007;115: 896–908. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655209
119. White AJ, Smith RR, Matsushita S, Chakravarty T, Czer LSC, Burton K, et al. Intrinsic cardiac origin of human cardiosphere-derived cells. *Eur Heart J.* 2013;34: 68–75. doi:10.1093/eurheartj/ehr172
120. Cho H-J, Lee H-J, Chung Y-J, Kim J-Y, Cho H-J, Yang H-M, et al. Generation of human secondary cardiospheres as a potent cell processing strategy for cell-based cardiac repair. *Biomaterials.* 2013;34: 651–661. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.011
121. Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee S-T, Smith RR, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in

- porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009;120: 1075–1083, 7 p following 1083. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816058
122. Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, Terrovitis J, Sun B, Galang G, et al. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61: 1108–1119. doi:10.1016/j.jacc.2012.10.052
123. Malliaras K, Li T-S, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation*. 2012;125: 100–112. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.042598
124. Shen D, Shen M, Liang H, Tang J, Wang B, Liu C, et al. Therapeutic benefits of CD90-negative cardiac stromal cells in rats with a 30-day chronic infarct. *J Cell Mol Med*. 2018;22: 1984–1991. doi:10.1111/jcmm.13517
125. Gago-Lopez N, Awaji O, Zhang Y, Ko C, Nsair A, Liem D, et al. THY-1 receptor expression differentiates cardiosphere-derived cells with divergent cardiogenic differentiation potential. *Stem Cell Rep*. 2014;2: 576–591. doi:10.1016/j.stemcr.2014.03.003
126. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LEJ, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379: 895–904. doi:10.1016/S0140-6736(12)60195-0
127. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, 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*. 2014;63: 110–122. doi:10.1016/j.jacc.2013.08.724
128. Hao M, Wang R, Wang W. Cell Therapies in Cardiomyopathy: Current Status of Clinical Trials. *Anal Cell Pathol Amst*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/9404057
129. Li Q, Guo Y, Ou Q, Chen N, Wu W-J, Yuan F, et al. Intracoronary administration of cardiac stem cells in mice: a new, improved technique for cell therapy in murine models. *Basic Res Cardiol*. 2011;106: 849–864. doi:10.1007/s00395-011-0180-1
130. Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, et al. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128: 122–31. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001075
131. Terrovitis JV, Smith RR, Marbán E. Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart. *Circ Res*. 2010;106: 479–494. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.208991
132. Terrovitis J, Lautamäki R, Bonios M, Fox J, Engles JM, Yu J, et al. Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54: 1619–1626. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.097
133. Chimenti I, Smith RR, Li T-S, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*. 2010;106: 971–980. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.210682

134. Burchfield JS, Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008;1: 4. doi:10.1186/1755-1536-1-4
135. Gneecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103: 1204–1219. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176826
136. Khan M, Nickoloff E, Abramova T, Johnson J, Verma SK, Krishnamurthy P, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ Res*. 2015;117: 52–64. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305990
137. Maring JA, Beez CM, Falk V, Seifert M, Stamm C. Myocardial Regeneration via Progenitor Cell-Derived Exosomes. In: *Stem Cells International* [Internet]. 2017 [cited 13 Mar 2018]. doi:10.1155/2017/7849851
138. Kishore R, Khan M. More than Tiny Sacks: Stem Cell Exosomes as Cell-free Modality for Cardiac Repair. *Circ Res*. 2016;118: 330–343. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307654
139. Mirotso M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gneecchi M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50: 280–289. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.08.005
140. Rota M, Goichberg P, Anversa P, Leri A. Aging Effects on Cardiac Progenitor Cell Physiology. *Compr Physiol*. 2015;5: 1775–1814. doi:10.1002/cphy.c140082

141. Nakamura T, Hosoyama T, Kawamura D, Takeuchi Y, Tanaka Y, Samura M, et al. Influence of aging on the quantity and quality of human cardiac stem cells. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep22781
142. Ye J, Hom DS, Hwang J, Yeghiazarians Y, Lee RJ, Boyle AJ. Aging Impairs the Proliferative Capacity of Cardiospheres, Cardiac Progenitor Cells and Cardiac Fibroblasts: Implications for Cell Therapy. *J Clin Med.* 2013;2: 103–114. doi:10.3390/jcm2030103
143. Abdelwahid E, Kalvelyte A, Stulpinas A, de Carvalho KAT, Guarita-Souza LC, Foldes G. Stem cell death and survival in heart regeneration and repair. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2016;21: 252–268. doi:10.1007/s10495-015-1203-4
144. Dib N, Khawaja H, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell Therapy for Cardiovascular Disease: A Comparison of Methods of Delivery. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4: 177–181. doi:10.1007/s12265-010-9253-z
145. Golpanian S, Schulman IH, Ebert RF, Heldman AW, DiFede DL, Yang PC, et al. Concise Review: Review and Perspective of Cell Dosage and Routes of Administration From Preclinical and Clinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5: 186–191. doi:10.5966/sctm.2015-0101
146. Grossman PM, Han Z, Palasis M, Barry JJ, Lederman RJ. Incomplete retention after direct myocardial injection. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2002;55: 392–397.
147. Li X, Tamama K, Xie X, Guan J. Improving Cell Engraftment in Cardiac Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/7168797

148. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008;3: 99–126. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456
149. Torella D, Ellison GM, Nadal-Ginard B. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells fulfill Koch's postulates as causal agents for cardiac regeneration. *Circ Res.* 2014;114: e24-26. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.303313
150. Mohsin S, Siddiqi S, Collins B, Sussman MA. Empowering adult stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res.* 2011;109: 1415–28. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243071
151. Herrmann JL, Abarbanell AM, Weil BR, Manukyan MC, Poynter JA, Brewster BJ, et al. Optimizing Stem Cell Function for the Treatment of Ischemic Heart Disease. *J Surg Res.* 2011;166: 138–145. doi:10.1016/j.jss.2010.05.057
152. Loebinger MR, Janes SM. Stem cells as vectors for antitumour therapy. *Thorax.* 2010;65: 362–369. doi:10.1136/thx.2009.128025
153. Fischer KM, Cottage CT, Wu W, Din S, Gude NA, Avitabile D, et al. Enhancement of myocardial regeneration through genetic engineering of cardiac progenitor cells expressing Pim-1 kinase. *Circulation.* 2009;120: 2077–2087. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.884403
154. Mohsin S, Khan M, Nguyen J, Alkatib M, Siddiqi S, Hariharan N, et al. Rejuvenation of human cardiac progenitor cells with Pim-1 kinase. *Circ Res.* 2013;113: 1169–79. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.302302
155. Mohsin S, Khan M, Toko H, Bailey B, Cottage CT, Wallach K, et al. Human cardiac progenitor cells engineered with Pim-I kinase enhance myocardial repair. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60: 1278–87. doi:10.1016/j.jacc.2012.04.047

156. Del Re DP, Sadoshima J. Enhancing the Potential of Cardiac Progenitor Cells: Pushing Forward with Pim-1. *Circ Res.* 2012;110: 1154–1156. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.269183
157. Tursynbay Y, Zhang J, Li Z, Tokay T, Zhumadilov Z, Wu D, et al. Pim-1 kinase as cancer drug target: An update. *Biomed Rep.* 2016;4: 140–146. doi:10.3892/br.2015.561
158. Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Ilasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther.* 2006;14: 840–50. doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.016
159. Elmadbouh I, Haider HK, Jiang S, Idris NM, Lu G, Ashraf M. Ex-vivo delivered stromal cell-derived factor-1 α promotes stem cell homing and induces angiomyogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42: 792–803. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.02.001
160. Haider HK, Jiang S, Idris NM, Ashraf M. IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1 α /CXCR4 signaling to promote myocardial repair. *Circ Res.* 2008;103: 1300–1308. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.186742
161. Kutschka I, Kofidis T, Chen IY, von Degenfeld G, Zwierzchoniewska M, Hoyt G, et al. Adenoviral human BCL-2 transgene expression attenuates early donor cell death after cardiomyoblast transplantation into ischemic rat hearts. *Circulation.* 2006;114: 1174-180. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001370

162. Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, Pallante B, Zheng J, Chazen JL, et al. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res.* 2004;94: E39-45. doi:10.1161/01.RES.0000122042.51161.B6
163. Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, Chang MG, Aon M, Xue T, et al. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res.* 2005;97: 159–167. doi:10.1161/01.RES.0000174794.22491.a0
164. Li T-S, Hayashi M, Ito H, Furutani A, Murata T, Matsuzaki M, et al. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation.* 2005;111: 2438–2445. doi:10.1161/01.CIR.0000167553.49133.81
165. Wu Y, Ip JE, Huang J, Zhang L, Matsushita K, Liew C-C, et al. Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res.* 2006;99: 315–322. doi:10.1161/01.RES.0000235986.35957.a3
166. Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell.* 2007;18:2873–2882. doi:10.1091/mbc.E07-02-0166
167. Zhang D, Fan G-C, Zhou X, Zhao T, Pasha Z, Xu M, et al. Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44: 281–292. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.11.010

168. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, et al. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007;25:245–251. doi:10.1634/stemcells.2006-0293
169. Kong D, Melo LG, Mangi AA, Zhang L, Lopez-Illasaca M, Perrella MA, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2004;109: 1769–1775. doi:10.1161/01.CIR.0000121732.85572.6F
170. Song MB, Yu XJ, Zhu GX, Chen JF, Zhao G, Huang L. Transfection of HGF gene enhances endothelial progenitor cell (EPC) function and improves EPC transplant efficiency for balloon-induced arterial injury in hypercholesterolemic rats. *Vascul Pharmacol*. 2009;51: 205–213. doi:10.1016/j.vph.2009.06.009
171. Jiang M, Wang B, Wang C, He B, Fan H, Guo TB, et al. Angiogenesis by transplantation of HIF-1 α modified EPCs into ischemic limbs. *J Cell Biochem*. 2008;103: 321–334. doi:10.1002/jcb.21416
172. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. 2002;105: 732–738.
173. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007;21: 3197–3207. doi:10.1096/fj.06-6558com
174. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against

- ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003;108: 79–85. doi:10.1161/01.CIR.0000078635.89229.8A
175. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res*. 2008;77: 463–470. doi:10.1093/cvr/cvm035
176. Lan Y-W, Choo K-B, Chen C-M, Hung T-H, Chen Y-B, Hsieh C-H, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6. doi:10.1186/s13287-015-0081-6
177. Muscari C, Giordano E, Bonafè F, Govoni M, Pasini A, Guarnieri C. Priming adult stem cells by hypoxic pretreatments for applications in regenerative medicine. *J Biomed Sci*. 2013;20: 63. doi:10.1186/1423-0127-20-63
178. Xu R, Sun Y, Chen Z, Yao Y, Ma G. Hypoxic Preconditioning Inhibits Hypoxia-induced Apoptosis of Cardiac Progenitor Cells via the PI3K/Akt-DNMT1-p53 Pathway. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep30922
179. Yu SP, Wei Z, Wei L. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Transl Stroke Res*. 2013;4: 76–88. doi:10.1007/s12975-012-0251-0
180. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2003;14: S227-232.
181. Lee HB, Yu MR, Song JS, Ha H. Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal

- mesothelial cells. *Kidney Int.* 2004;65: 1170–1179. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00491.x
182. Kaewpila S, Venkataraman S, Buettner GR, Oberley LW. Manganese Superoxide Dismutase Modulates Hypoxia Inducible Factor-1 alpha Induction via Superoxide. *Cancer Res.* 2008;68: 2781–2788. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2635
183. Tang YL, Zhu W, Cheng M, Chen L, Zhang J, Sun T, et al. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. *Circ Res.* 2009;104: 1209–1216. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.197723
184. Ali M, Mehmood A, Anjum MS, Tarrar MN, Khan SN, Riazuddin S. Diazoxide preconditioning of endothelial progenitor cells from streptozotocin-induced type 1 diabetic rats improves their ability to repair diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2015;410: 267–279. doi:10.1007/s11010-015-2560-6
185. Afzal MR, Haider HK, Idris NM, Jiang S, Ahmed RPH, Ashraf M. Preconditioning promotes survival and angiomyogenic potential of mesenchymal stem cells in the infarcted heart via NF-kappaB signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12: 693–702. doi:10.1089/ars.2009.2755
186. Niagara MI, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Pharmacologically preconditioned skeletal myoblasts are resistant to oxidative stress and promote angiomyogenesis via release of paracrine factors in the infarcted heart. *Circ Res.* 2007;100: 545–555. doi:10.1161/01.RES.0000258460.41160.ef
187. Cencioni C, Capogrossi MC, Napolitano M. The SDF-1/CXCR4 axis in stem cell preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2012;94: 400–407. doi:10.1093/cvr/cvs132

188. Noiseux N, Borie M, Desnoyers A, Menaouar A, Stevens LM, Mansour S, et al. Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential. *Endocrinology*. 2012;153:5361–72. doi:10.1210/en.2012-1402
189. Goumans M-J, de Boer TP, Smits AM, van Laake LW, van Vliet P, Metz CHG, et al. TGF-beta1 induces efficient differentiation of human cardiomyocyte progenitor cells into functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cell Res*. 2007;1: 138–149. doi:10.1016/j.scr.2008.02.003
190. Herrmann JL, Wang Y, Abarbanell AM, Weil BR, Tan J, Meldrum DR. Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor-alpha improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. *Shock* Augusta Ga. 2010;33:24–30. doi:10.1097/SHK.0b013e3181b7d137
191. Behfar A, Yamada S, Crespo-Diaz R, Nesbitt JJ, Rowe LA, Perez-Terzic C, et al. Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:721–734. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.066
192. Emmert MY, Wolint P, Jakab A, Sheehy SP, Pasqualini FS, Nguyen TDL, et al. Safety and efficacy of cardiopoietic stem cells in the treatment of post-infarction left-ventricular dysfunction - From cardioprotection to functional repair in a translational pig infarction model. *Biomaterials*. 2017;122: 48–62. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.11.029
193. Adams DS, Levin M. Endogenous voltage gradients as mediators of cell-cell communication: strategies for investigating bioelectrical signals during pattern formation. *Cell Tissue Res*. 2013;352: 95–122. doi:10.1007/s00441-012-1329-4

194. Kim SW, Kim HW, Huang W, Okada M, Welge JA, Wang Y, et al. Cardiac stem cells with electrical stimulation improve ischaemic heart function through regulation of connective tissue growth factor and miR-378. *Cardiovasc Res.* 2013;100: 241–251. doi:10.1093/cvr/cvt192
195. Campbell CR, Berman AE, Weintraub NL, Tang YL. Electrical stimulation to optimize cardioprotective exosomes from cardiac stem cells. *Med Hypotheses.* 2016;88: 6–9. doi:10.1016/j.mehy.2015.12.022
196. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972;175: 720–731.
197. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. 2002 [cited 12 Mar 2018]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>
198. Dubyak GR. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv Physiol Educ.* 2004;28: 143–154. doi:10.1152/advan.00046.2004
199. Kulbacka J, Choromańska A, Rossowska J, Weźgowiec J, Saczko J, Rols M-P. Cell Membrane Transport Mechanisms: Ion Channels and Electrical Properties of Cell Membranes. *Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy.* Springer, Cham; 2017. pp. 39–58. doi:10.1007/978-3-319-56895-9_3
200. Nilius B. 22 - Ion Channels in Nonexcitable Cells. In: Sperelakis N, editor. *Cell Physiology Source Book.* Academic Press; 1995. pp. 315–329. doi:10.1016/B978-0-12-656970-4.50028-2

201. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Intracellular Ion Environment and Membrane Electric Potential. 2000 [cited 31 Mar 2018]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21627/>
202. Wright SH. Generation of resting membrane potential. *Adv Physiol Educ.* 2004;28: 139–142. doi:10.1152/advan.00029.2004
203. Binggeli R, Weinstein RC. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J Theor Biol.* 1986;123: 377–401.
204. Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stühmer W, Pardo LA. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2014;369. doi:10.1098/rstb.2013.0094
205. Takahashi A, Yamaguchi H, Miyamoto H. Change in K⁺ current of HeLa cells with progression of the cell cycle studied by patch-clamp technique. *Am J Physiol.* 1993;265: C328-336. doi:10.1152/ajpcell.1993.265.2.C328
206. Arcangeli A, Bianchi L, Becchetti A, Faravelli L, Coronello M, Mini E, et al. A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol.* 1995;489: 455–471.
207. Pardo LA, Brüggemann A, Camacho J, Stühmer W. Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *J Cell Biol.* 1998;143: 767–775.
208. Brüggemann A, Stühmer W, Pardo LA. Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus oocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94: 537–542.

209. Deng XL, Lau CP, Lai K, Cheung KF, Lau GK, Li GR. Cell cycle-dependent expression of potassium channels and cell proliferation in rat mesenchymal stem cells from bone marrow. *Cell Prolif.* 2007;40: 656–70. doi:10.1111/j.1365-2184.2007.00458.x
210. Blackiston DJ, McLaughlin KA, Levin M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle.* 2009;8: 3519–28.
211. MacFarlane SN, Sontheimer H. Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia.* 2000;30: 39–48.
212. Valenzuela SM, Mazzanti M, Tonini R, Qiu MR, Warton K, Musgrove EA, et al. The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle. *J Physiol.* 2000;529 Pt 3: 541–52.
213. Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A. K⁺ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr Biol.* 2008;221: 1–6. doi:10.1007/s00232-007-9080-6
214. Putney LK, Barber DL. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J Biol Chem.* 2003;278: 44645–9. doi:10.1074/jbc.M308099200
215. Boutillier AL, Kienlen-Campard P, Loeffler JP. Depolarization regulates cyclin D1 degradation and neuronal apoptosis: a hypothesis about the role of the ubiquitin/proteasome signalling pathway. *Eur J Neurosci.* 1999;11: 441–8.
216. Wang JY, Wang J, Golovina VA, Li L, Platoshyn O, Yuan JX. Role of K⁽⁺⁾ channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278: C303–314. doi:10.1152/ajpcell.2000.278.2.C303

217. Kahl CR, Means AR. Regulation of cyclin D1/Cdk4 complexes by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *J Biol Chem.* 2004;279: 15411–15419. doi:10.1074/jbc.M312543200
218. Helin K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8: 28–35.
219. Cone CD. Maintenance of mitotic homeostasis in somatic cell populations. *J Theor Biol.* 1971;30: 183–194.
220. Cone CD, Tongier M. Control of somatic cell mitosis by simulated changes in the transmembrane potential level. *Oncology.* 1971;25: 168–182. doi:10.1159/000224567
221. Sundelacruz S, Levin M, Kaplan DL. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2008;3: e3737. doi:10.1371/journal.pone.0003737
222. Sundelacruz S, Levin M, Kaplan DL. Depolarization alters phenotype, maintains plasticity of predifferentiated mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2013;19: 1889–1908. doi:10.1089/ten.tea.2012.0425.rev
223. Konig S, Hinard V, Arnaudeau S, Holzer N, Potter G, Bader CR, et al. Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279: 28187–28196. doi:10.1074/jbc.M313932200
224. van Vliet P, de Boer TP, van der Heyden MA, El Tamer MK, Sluijter JP, Doevendans PA, et al. Hyperpolarization induces differentiation in human cardiomyocyte progenitor cells. *Stem Cell Rev.* 2010;6: 178–85. doi:10.1007/s12015-010-9142-5

225. Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*. 1987;237: 749–753.
226. Pongs O, Schwarz JR. Ancillary subunits associated with voltage-dependent K⁺ channels. *Physiol Rev*. 2010;90: 755–796. doi:10.1152/physrev.00020.2009
227. Bhalla T, Rosenthal JJC, Holmgren M, Reenan R. Control of human potassium channel inactivation by editing of a small mRNA hairpin. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11: 950–956. doi:10.1038/nsmb825
228. Garrett S, Rosenthal JJC. RNA editing underlies temperature adaptation in K⁺ channels from polar octopuses. *Science*. 2012;335: 848–851. doi:10.1126/science.1212795
229. Ryan MY, Maloney R, Fineberg JD, Reenan RA, Horn R. RNA editing in eag potassium channels: biophysical consequences of editing a conserved S6 residue. *Channels Austin Tex*. 2012;6: 443–452. doi:10.4161/chan.22314
230. Xie J, McCobb DP. Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science*. 1998;280: 443–446.
231. Sun XX, Bostrom SL, Griffith LC. Alternative splicing of the eag potassium channel gene in *Drosophila* generates a novel signal transduction scaffolding protein. *Mol Cell Neurosci*. 2009;40: 338–343. doi:10.1016/j.mcn.2008.11.005
232. Schwarz TL, Tempel BL, Papazian DM, Jan YN, Jan LY. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*. *Nature*. 1988;331: 137–142. doi:10.1038/331137a0

233. Park K-S, Yang J-W, Seikel E, Trimmer JS. Potassium channel phosphorylation in excitable cells: providing dynamic functional variability to a diverse family of ion channels. *Physiol Bethesda Md.* 2008;23: 49–57. doi:10.1152/physiol.00031.2007
234. Rajan S, Plant LD, Rabin ML, Butler MH, Goldstein SAN. Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. *Cell.* 2005;121: 37–47. doi:10.1016/j.cell.2005.01.019
235. Benson MD, Li Q-J, Kieckhafer K, Dudek D, Whorton MR, Sunahara RK, et al. SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104: 1805–1810. doi:10.1073/pnas.0606702104
236. Plant LD, Dementieva IS, Kollewe A, Olikara S, Marks JD, Goldstein SAN. One SUMO is sufficient to silence the dimeric potassium channel K2P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 10743–10748. doi:10.1073/pnas.1004712107
237. Plant LD, Dowdell EJ, Dementieva IS, Marks JD, Goldstein SAN. SUMO modification of cell surface Kv2.1 potassium channels regulates the activity of rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol.* 2011;137: 441–454. doi:10.1085/jgp.201110604
238. Shipston MJ. Ion Channel Regulation by Protein Palmitoylation. *J Biol Chem.* 2011;286: 8709–8716. doi:10.1074/jbc.R110.210005
239. Khanna R, Myers MP, Lainé M, Papazian DM. Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2001;276: 34028–34034. doi:10.1074/jbc.M105248200

240. Gong Q, Anderson CL, January CT, Zhou Z. Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283: H77-84. doi:10.1152/ajpheart.00008.2002
241. Roux B. Ion channels and ion selectivity. *Essays Biochem*. 2017;61: 201–209. doi:10.1042/EBC20160074
242. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*. 1994;66: 1061–1067.
243. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 1998;280: 69–77.
244. Lu Z, Klem AM, Ramu Y. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*. 2001;413: 809–813. doi:10.1038/35101535
245. Heginbotham L, Abramson T, MacKinnon R. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science*. 1992;258: 1152–1155.
246. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*. 2000;1: reviews0004.1-reviews0004.5.
247. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57: 473–508. doi:10.1124/pr.57.4.10
248. Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, et al. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and Molecular

- Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57: 509–526. doi:10.1124/pr.57.4.11
249. Goldstein SAN, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57: 527–540. doi:10.1124/pr.57.4.12
250. Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57: 463–472. doi:10.1124/pr.57.4.9
251. Biggin PC, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10: 456–461.
252. Kuang Q, Purhonen P, Hebert H. Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72: 3677–3693. doi:10.1007/s00018-015-1948-5
253. Choe S. Ion channel structure: Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3: 115–121. doi:10.1038/nrn727
254. MacKinnon R, Heginbotham L, Abramson T. Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron.* 1990;5: 767–771.
255. MacKinnon R, Yellen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science.* 1990;250: 276–279.
256. Dolly JO, Parcej DN. Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr.* 1996;28: 231–253.

257. Jiang Q-X, Wang D-N, MacKinnon R. Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature*. 2004;430: 806–810. doi:10.1038/nature02735
258. Maljevic S, Lerche H. Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. *J Neurol*. 2013;260: 2201–2211. doi:10.1007/s00415-012-6727-8
259. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868: 233–285.
260. Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*. 1997;59: 171–191. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.171
261. Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5: 268–277.
262. Thuringer D, Lauribe P, Escande D. A hyperpolarization-activated inward current in human myocardial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1992;24: 451–455.
263. Kurachi Y. Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart. *J Physiol*. 1985;366: 365–385.
264. Schram G, Melnyk P, Pourrier M, Wang Z, Nattel S. Kir2.4 and Kir2.1 K⁺ channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J Physiol*. 2002;544: 337–349. doi:10.1113/jphysiol.2002.026047
265. Preisig-Müller R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, et al. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99: 7774–7779. doi:10.1073/pnas.102609499

266. Fürst O, Mondou B, D'Avanzo N. Phosphoinositide regulation of inward rectifier potassium (Kir) channels. *Front Physiol.* 2014;4. doi:10.3389/fphys.2013.00404
267. Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279: F793-801. doi:10.1152/ajprenal.2000.279.5.F793
268. Renigunta V, Schlichthörl G, Daut J. Much more than a leak: structure and function of K₂p-channels. *Pflugers Arch.* 2015;467: 867–894. doi:10.1007/s00424-015-1703-7
269. Feliciangeli S, Chatelain FC, Bichet D, Lesage F. The family of K₂P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol.* 2015;593: 2587–2603. doi:10.1113/jphysiol.2014.287268
270. Kim D. Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. *Curr Pharm Des.* 2005;11: 2717–2736.
271. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, et al. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* 1996;15: 1004–1011.
272. Berkefeld H, Fakler B, Schulte U. Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev.* 2010;90: 1437–1459. doi:10.1152/physrev.00049.2009
273. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol.* 1998;8: 321–329.
274. Wulff H, Köhler R. Endothelial Small- and Intermediate-Conductance K_{Ca} Channels: An Update on Their Pharmacology and Usefulness as Cardiovascular Targets. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2013;61: 102–112. doi:10.1097/FJC.0b013e318279ba20

275. Nguyen HM, Singh V, Pressly B, Jenkins DP, Wulff H, Yarov-Yarovoy V. Structural Insights into the Atomistic Mechanisms of Action of Small Molecule Inhibitors Targeting the KCa3.1 Channel Pore. *Mol Pharmacol*. 2017;91: 392–402. doi:10.1124/mol.116.108068
276. Christophersen P, Wulff H. Pharmacological gating modulation of small- and intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (KCa2.x and KCa3.1). *Channels*. 2015;9: 336–343. doi:10.1080/19336950.2015.1071748
277. Zhou Y, Lingle CJ. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J Gen Physiol*. 2014;144: 415–440. doi:10.1085/jgp.201411259
278. Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol*. 1989;51: 385–399. doi:10.1146/annurev.ph.51.030189.002125
279. Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, et al. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*. 1996;273: 1709–1714.
280. Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, et al. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*. 1998;395: 503–507. doi:10.1038/26758
281. Tuteja D, Rafizadeh S, Timofeyev V, Wang S, Zhang Z, Li N, et al. Cardiac small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circ Res*. 2010;107: 851–859. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.215269

282. Monaghan AS, Benton DCH, Bahia PK, Hosseini R, Shah YA, Haylett DG, et al. The SK3 subunit of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels interacts with both SK1 and SK2 subunits in a heterologous expression system. *J Biol Chem.* 2004;279: 1003–1009. doi:10.1074/jbc.M308070200
283. Stocker M. Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5: 758–770. doi:10.1038/nrn1516
284. Adelman JP. SK channels and calmodulin. *Channels.* 2015;10: 1–6. doi:10.1080/19336950.2015.1029688
285. Schumacher MA, Rivard AF, Bächinger HP, Adelman JP. Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature.* 2001;410: 1120–1124. doi:10.1038/35074145
286. Maylie J, Bond CT, Herson PS, Lee W-S, Adelman JP. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J Physiol.* 2004;554: 255–261. doi:10.1113/jphysiol.2003.049072
287. Adelman JP, Maylie J, Sah P. Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: form and function. *Annu Rev Physiol.* 2012;74: 245–269. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153336
288. Bildl W, Strassmaier T, Thurm H, Andersen J, Eble S, Oliver D, et al. Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels and regulates channel gating. *Neuron.* 2004;43: 847–858. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.033
289. Fanger CM, Rauer H, Neben AL, Miller MJ, Rauer H, Wulff H, et al. Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. *Selective*

- blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem.* 2001;276: 12249–12256. doi:10.1074/jbc.M011342200
290. Khanna R, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK, Schlichter LC. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem.* 1999;274: 14838–14849.
291. Joiner WJ, Khanna R, Schlichter LC, Kaczmarek LK. Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Biol Chem.* 2001;276: 37980–37985. doi:10.1074/jbc.M104965200
292. Gerlach AC, Syme CA, Giltinan L, Adelman JP, Devors DC. ATP-dependent activation of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel, hIK1, is conferred by a C-terminal domain. *J Biol Chem.* 2001;276: 10963–10970.
293. He Q, Lee DI, Rong R, Yu M, Luo X, Klein M, et al. Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene.* 2002;21: 2623–2633. doi:10.1038/sj.onc.1205345
294. Gerlach AC, Gangopadhyay NN, Devor DC. Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance, calcium-dependent potassium channel, hIK1. *J Biol Chem.* 2000;275: 585–598.
295. Srivastava S, Li Z, Lin L, Liu G, Ko K, Coetzee WA, et al. The phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is a negative regulator of the Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa3.1. *Mol Cell Biol.* 2005;25: 3630–3638. doi:10.1128/MCB.25.9.3630-3638.2005
296. Srivastava S, Li Z, Ko K, Choudhury P, Albaum M, Johnson AK, et al. Histidine phosphorylation of the potassium channel KCa3.1 by nucleoside diphosphate kinase

- B is required for activation of KCa3.1 and CD4 T cells. *Mol Cell*. 2006;24: 665–675.
doi:10.1016/j.molcel.2006.11.012
297. Dokmanić I, Sikić M, Tomić S. Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2008;64: 257–263. doi:10.1107/S090744490706595X
298. Srivastava S, Panda S, Li Z, Fuhs SR, Hunter T, Thiele DJ, et al. Histidine phosphorylation relieves copper inhibition in the mammalian potassium channel KCa3.1. *eLife*. 2016;5. doi:10.7554/eLife.16093
299. Aedo F, Delgado R, Wolff D, Vergara C. Copper and zinc as modulators of neuronal excitability in a physiologically significant concentration range. *Neurochem Int*. 2007;50: 591–600. doi:10.1016/j.neuint.2006.12.001
300. Gruss M, Mathie A, Lieb WR, Franks NP. The two-pore-domain K(+) channels TREK-1 and TASK-3 are differentially modulated by copper and zinc. *Mol Pharmacol*. 2004;66: 530–537. doi:10.1124/mol.66.3.
301. Wei A, Solaro C, Lingle C, Salkoff L. Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron*. 1994;13: 671–681.
302. Piskorowski R, Aldrich RW. Calcium activation of BK_{Ca} potassium channels lacking the calcium bowl and RCK domains. *Nature*. 2002;420: 499–502. doi:10.1038/nature01199
303. Lee US, Cui J. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci*. 2010;33: 415–423. doi:10.1016/j.tins.2010.06.004

304. Bao L, Kaldany C, Holmstrand EC, Cox DH. Mapping the BKCa Channel's "Ca²⁺ Bowl." *J Gen Physiol.* 2004;123: 475–489. doi:10.1085/jgp.200409052
305. Krishnamoorthy G, Shi J, Sept D, Cui J. The NH₂ Terminus of RCK1 Domain Regulates Ca²⁺-dependent BKCa Channel Gating. *J Gen Physiol.* 2005;126: 227–241. doi:10.1085/jgp.200509321
306. Yusifov T, Savalli N, Gandhi CS, Ottolia M, Olcese R. The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105: 376–381. doi:10.1073/pnas.0705261105
307. Li Q, Yan J. Modulation of BK Channel Function by Auxiliary Beta and Gamma Subunits. *Int Rev Neurobiol.* 2016;128: 51–90. doi:10.1016/bs.irn.2016.03.015
308. Liu G, Niu X, Wu RS, Chudasama N, Yao Y, Jin X, et al. Location of modulatory β subunits in BK potassium channels. *J Gen Physiol.* 2010;135: 449–459. doi:10.1085/jgp.201010417
309. Wallner M, Meera P, Toro L. Determinant for β -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca²⁺-sensitive K⁺ channels: An additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93: 14922–14927.
310. van Welie I, du Lac S. Bidirectional control of BK channel open probability by CAMKII and PKC in medial vestibular nucleus neurons. *J Neurophysiol.* 2011;105: 1651–1659. doi:10.1152/jn.00058.2011
311. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes.* Third edition. Sinauer Associates, Inc.; 2001.
312. Li GR, Deng XL. Functional ion channels in stem cells. *World J Stem Cells.* 2011;3: 19–24. doi:10.4252/wjsc.v3.i3.19

313. Han Y, Chen JD, Liu ZM, Zhou Y, Xia JH, Du XL, et al. Functional ion channels in mouse cardiac c-kit(+) cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298: C1109-17. doi:10.1152/ajpcell.00207.2009
314. Zhang Y-Y, Li G, Che H, Sun H-Y, Li X, Au W-K, et al. Characterization of functional ion channels in human cardiac c-kit+ progenitor cells. *Basic Res Cardiol*. 2014;109: 407. doi:10.1007/s00395-014-0407-z
315. Zhang Y-Y, Li G, Che H, Sun H-Y, Xiao G-S, Wang Y, et al. Effects of BKCa and Kir2.1 Channels on Cell Cycling Progression and Migration in Human Cardiac c-kit+ Progenitor Cells. *PloS One*. 2015;10: e0138581. doi:10.1371/journal.pone.0138581
316. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;131: 1047–1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
317. Laude AJ, Simpson AWM. Compartmentalized signalling: Ca²⁺ compartments, microdomains and the many facets of Ca²⁺ signalling. *FEBS J*. 2009;276: 1800–1816. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06927.x
318. Schwaller B. Cytosolic Ca²⁺ Buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2. doi:10.1101/cshperspect.a004051
319. Prins D, Michalak M. Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3. doi:10.1101/cshperspect.a004069
320. Parekh AB, Putney JW. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. 2005;85: 757–810. doi:10.1152/physrev.00057.2003
321. Albarran L, Lopez JJ, Salido GM, Rosado JA. Historical Overview of Store-Operated Ca(2+) Entry. *Adv Exp Med Biol*. 2016;898: 3–24. doi:10.1007/978-3-319-26974-0_1

322. Numata T, Kiyonaka S, Kato K, Takahashi N, Mori Y. Activation of TRP Channels in Mammalian Systems. In: Zhu MX, editor. TRP Channels. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92819/>
323. Dawson AP. Calcium signalling: How do IP₃ receptors work? *Curr Biol.* 1997;7: R544–R547. doi:10.1016/S0960-9822(06)00277-6
324. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2: 387–396. doi:10.1038/35077544
325. Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ.* 2001;2001: re1. doi:10.1126/stke.2001.90.re1
326. Farber JL. The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environ Health Perspect.* 1990;84: 107–111.
327. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol.* 1992;32 Suppl: S33-42.
328. Kass GE, Orrenius S. Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect.* 1999;107: 25–35.
329. Chakrabarti R, Chakrabarti R. Calcium signaling in non-excitabile cells: Ca²⁺ release and influx are independent events linked to two plasma membrane Ca²⁺ entry channels. *J Cell Biochem.* 2006;99: 1503–1516. doi:10.1002/jcb.21102
330. Prakriya M, Lewis RS. CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium.* 2003;33: 311–321.

331. Lis A, Peinelt C, Beck A, Parvez S, Monteilh-Zoller M, Fleig A, et al. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol* CB. 2007;17: 794–800. doi:10.1016/j.cub.2007.03.065
332. Fahrner M, Derler I, Jardin I, Romanin C. The STIM1/Orai signaling machinery. *Channels Austin Tex*. 2013;7: 330–343. doi:10.4161/chan.26742
333. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol*. 2005;169: 435–445. doi:10.1083/jcb.200502019
334. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13: 549–565. doi:10.1038/nrm3414
335. Zheng L, Stathopoulos PB, Schindl R, Li G-Y, Romanin C, Ikura M. Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108: 1337–1342. doi:10.1073/pnas.1015125108
336. Navarro-Borelly L, Somasundaram A, Yamashita M, Ren D, Miller RJ, Prakriya M. STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy. *J Physiol*. 2008;586: 5383–5401. doi:10.1113/jphysiol.2008.162503
337. Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*. 2005;437: 902–905. doi:10.1038/nature04147
338. Yeung PS-W, Yamashita M, Prakriya M. Pore opening mechanism of CRAC channels. *Cell Calcium*. 2017;63: 14–19. doi:10.1016/j.ceca.2016.12.006

339. Muik M, Frischauf I, Derler I, Fahrner M, Bergsmann J, Eder P, et al. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem.* 2008;283: 8014–8022. doi:10.1074/jbc.M708898200
340. Stathopoulos PB, Schindl R, Fahrner M, Zheng L, Gasmi-Seabrook GM, Muik M, et al. STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nat Commun.* 2013;4: 2963. doi:10.1038/ncomms3963
341. Shen W-W, Frieden M, Demaurex N. Local cytosolic Ca²⁺ elevations are required for stromal interaction molecule 1 (STIM1) de-oligomerization and termination of store-operated Ca²⁺ entry. *J Biol Chem.* 2011;286: 36448–36459. doi:10.1074/jbc.M111.269415
342. Manjarrés IM, Alonso MT, García-Sancho J. Calcium entry-calcium refilling (CECR) coupling between store-operated Ca(2+) entry and sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Cell Calcium.* 2011;49: 153–161. doi:10.1016/j.ceca.2011.01.007
343. Alonso MT, Manjarrés IM, García-Sancho J. Privileged coupling between Ca(2+) entry through plasma membrane store-operated Ca(2+) channels and the endoplasmic reticulum Ca(2+) pump. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;353: 37–44. doi:10.1016/j.mce.2011.08.021
344. Manjarrés IM, Rodríguez-García A, Alonso MT, García-Sancho J. The sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) is the third element in capacitative calcium entry. *Cell Calcium.* 2010;47: 412–418. doi:10.1016/j.ceca.2010.03.001

345. Derler I, Plenk P, Fahrner M, Muik M, Jardin I, Schindl R, et al. The extended transmembrane Orail N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for Orail activation by STIM1. *J Biol Chem.* 2013;288: 29025–29034. doi:10.1074/jbc.M113.501510
346. Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL, et al. Functional interactions among Orail, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105: 2895–2900. doi:10.1073/pnas.0712288105
347. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 4682–4687. doi:10.1073/pnas.0611692104
348. Dupont G, Combettes L, Bird GS, Putney JW. Calcium oscillations. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3. doi:10.1101/cshperspect.a004226
349. Putney JW. The Physiological Function of Store-operated Calcium Entry. *Neurochem Res.* 2011;36: 1157–1165. doi:10.1007/s11064-010-0383-0
350. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1: 11–21. doi:10.1038/35036035
351. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4: 517–529. doi:10.1038/nrml155
352. Serulle Y, Sugimori M, Llinás RR. Imaging synaptosomal calcium concentration microdomains and vesicle fusion by using total internal reflection fluorescent

- microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104: 1697–1702. doi:10.1073/pnas.0610741104
353. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W, et al. Nucleoplasmic Calcium Is Required for Cell Proliferation. *J Biol Chem*. 2007;282: 17061–17068. doi:10.1074/jbc.M700490200
354. Wei C, Wang X, Zheng M, Cheng H. Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24: 254–261. doi:10.1016/j.ceb.2011.12.002
355. Minton K. Cell migration: Coordinating calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15: 152. doi:10.1038/nrm3761
356. Tonelli FMP, Santos AK, Gomes DA, da Silva SL, Gomes KN, Ladeira LO, et al. Stem cells and calcium signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740: 891–916. doi:10.1007/978-94-007-2888-2_40
357. Shen P, Larter R. Chaos in intracellular Ca²⁺ oscillations in a new model for non-excitable cells. *Cell Calcium*. 1995;17: 225–232.
358. Woods NM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*. 1986;319: 600–602. doi:10.1038/319600a0
359. Kraus M, Wolf B. Cytosolic calcium oscillators: critical discussion and stochastic modelling. *Biol Signals*. 1993;2: 1–15.
360. Haisenleder DJ, Yasin M, Marshall JC. Gonadotropin subunit and gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression are regulated by alterations in the frequency of calcium pulsatile signals. *Endocrinology*. 1997;138: 5227–5230. doi:10.1210/endo.138.12.5611

361. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. 1998;392: 933–936. doi:10.1038/31960
362. Chang LW, Spitzer NC. Spontaneous calcium spike activity in embryonic spinal neurons is regulated by developmental expression of the Na⁺, K⁺-ATPase beta3 subunit. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009;29: 7877–7885. doi:10.1523/JNEUROSCI.4264-08.2009
363. Kuczewski N, Porcher C, Ferrand N, Fiorentino H, Pellegrino C, Kolarow R, et al. Backpropagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2008;28: 7013–7023. doi:10.1523/JNEUROSCI.1673-08.2008
364. Shiraishi K, Okada A, Shirakawa H, Nakanishi S, Mikoshiba K, Miyazaki S. Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca²⁺ release during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol*. 1995;170: 594–606. doi:10.1006/dbio.1995.1239
365. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*. 1997;386: 855–858. doi:10.1038/386855a0
366. Molkenin JD, Houser SR. Are resident c-Kit⁺ cardiac stem cells really all that are needed to mend a broken heart? *Circ Res*. 2013;113: 1037–1039. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.302564
367. Che H, Li G, Sun H-Y, Xiao G-S, Wang Y, Li G-R. Roles of store-operated Ca²⁺ channels in regulating cell cycling and migration of human cardiac c-kit⁺ progenitor

- cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309: H1772-1781. doi:10.1152/ajpheart.00260.2015
368. Quijada P, Hariharan N, Cubillo JD, Bala KM, Emathingier JM, Wang BJ, et al. Nuclear Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Signaling Enhances Cardiac Progenitor Cell Survival and Cardiac Lineage Commitment. *J Biol Chem*. 2015;290:25411–25426. doi:10.1074/jbc.M115.657775
369. Che H, Xiao G-S, Sun H-Y, Wang Y, Li G-R. Functional TRPV2 and TRPV4 channels in human cardiac c-kit(+) progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2016;20: 1118–1127. doi:10.1111/jcmm.12800
370. Ferreira-Martins J, Rondon-Clavo C, Tugal D, Korn JA, Rizzi R, Padin-Iruegas ME, et al. Spontaneous calcium oscillations regulate human cardiac progenitor cell growth. *Circ Res*. 2009;105: 764–74. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206698
371. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*. 2002;364: 593–611. doi:10.1042/BJ20020228
372. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol*. 1995;57: 417–445. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.002221
373. Luczak ED, Anderson ME. CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73: 112–116. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.02.004

374. Kim T, Echeagaray OH, Wang BJ, Casillas A, Broughton KM, Kim B-H, et al. In situ transcriptome characteristics are lost following culture adaptation of adult cardiac stem cells. *Sci Rep.* 2018;8: 12060. doi:10.1038/s41598-018-30551-1
375. DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature.* 1984;307: 465–468.
376. Gaetani R, Feyen DAM, Doevendans PA, Gremmels H, Forte E, Fledderus JO, et al. Different types of cultured human adult cardiac progenitor cells have a high degree of transcriptome similarity. *J Cell Mol Med.* 2014;18: 2147–2151. doi:10.1111/jcmm.12458
377. Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Hum Gene Ther.* 2011;22: 3–17. doi:10.1089/hum.2010.211
378. Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015). *Stem Cell Res Ther.* 2016;7. doi:10.1186/s13287-016-0341-0
379. Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94: 11651–11656.
380. Peña TL, Rane SG. The fibroblast intermediate conductance K(Ca) channel, FIK, as a prototype for the cell growth regulatory function of the IK channel family. *J Membr Biol.* 1999;172: 249–257.
381. Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, et al. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. *Molecular*

- mechanism and functional consequences. *J Biol Chem.* 2000;275: 37137–37149.
doi:10.1074/jbc.M003941200
382. Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, Aiyar J. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem.* 1997;272: 32723–32726.
383. Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ Res.* 1999;85: e33-43.
384. Köhler R, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, et al. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation.* 2003;108: 1119–1125. doi:10.1161/01.CIR.0000086464.04719.DD
385. Chen MX, Gorman SA, Benson B, Singh K, Hieble JP, Michel MC, et al. Small and intermediate conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004;369: 602–615.
doi:10.1007/s00210-004-0934-5
386. Grgic I, Eichler I, Heinau P, Si H, Brakemeier S, Hoyer J, et al. Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25: 704–709. doi:10.1161/01.ATV.0000156399.12787.5c

387. Deng XL, Sun HY, Lau CP, Li GR. Properties of ion channels in rabbit mesenchymal stem cells from bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348: 301–9. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.054
388. Li GR, Deng XL, Sun H, Chung SS, Tse HF, Lau CP. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells.* 2006;24: 1519–28. doi:10.1634/stemcells.2005-0307
389. Li GR, Sun H, Deng X, Lau CP. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells.* 2005;23: 371–82. doi:10.1634/stemcells.2004-0213
390. Bai X, Ma J, Pan Z, Song YH, Freyberg S, Yan Y, et al. Electrophysiological properties of human adipose tissue-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293: C1539-50. doi:10.1152/ajpcell.00089.2007
391. Subramani B, Subbannagounder S, Palanivel S, Ramanathanpullai C, Sivalingam S, Yakub A, et al. Generation and characterization of human cardiac resident and non-resident mesenchymal stem cell. *Cytotechnology.* 2016;68: 2061–2073. doi:10.1007/s10616-016-9946-5
392. Si H, Heyken W-T, Wölfle SE, Tysiac M, Schubert R, Grgic I, et al. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Circ Res.* 2006;99: 537–544. doi:10.1161/01.RES.0000238377.08219.0c
393. Brähler S, Kaistha A, Schmidt VJ, Wölfle SE, Busch C, Kaistha BP, et al. Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing

- factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation*. 2009;119: 2323–2332. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.846634
394. Grgic I, Kaistha BP, Paschen S, Kaistha A, Busch C, Si H, et al. Disruption of the Gardos channel (KCa3.1) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly. *Pflugers Arch*. 2009;458: 291–302. doi:10.1007/s00424-008-0619-x
395. Düfer M, Gier B, Wolpers D, Krippeit-Drews P, Ruth P, Drews G. Enhanced glucose tolerance by SK4 channel inhibition in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2009;58: 1835–1843. doi:10.2337/db08-1324
396. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1958;30: 653–654.
397. Vadorpe DH, Shmukler BE, Jiang L, Lim B, Maylie J, Adelman JP, et al. cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca²⁺-gated K⁺ channel, mK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation. *J Biol Chem*. 1998;273:21542–21553.
398. Begenisich T, Nakamoto T, Ovitt CE, Nehrke K, Brugnara C, Alper SL, et al. Physiological roles of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated potassium channel Kcnn4. *J Biol Chem*. 2004;279:47681–47687. doi:10.1074/jbc.M409627200
399. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285: C1553-1560. doi:10.1152/ajpcell.00186.2003

400. Elliott JI, Higgins CF. IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Rep.* 2003;4: 189–194. doi:10.1038/sj.embor.embor722
401. Cruse G, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P. Functional KCa3.1 K⁺ channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax.* 2006;61: 880–885. doi:10.1136/thx.2006.060319
402. Peña TL, Chen SH, Konieczny SF, Rane SG. Ras/MEK/ERK Up-regulation of the fibroblast KCa channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta suppression of myogenesis. *J Biol Chem.* 2000;275: 13677–13682.
403. Wulff H, Knaus H-G, Pennington M, Chandy KG. K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;173: 776–786.
404. Tajima N, Schönherr K, Niedling S, Kaatz M, Kanno H, Schönherr R, et al. Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1alpha and the von Hippel-Lindau protein. *J Physiol.* 2006;571: 349–359. doi:10.1113/jphysiol.2005.096818
405. Enslin H, Sun P, Brickey D, Soderling SH, Klamo E, Soderling TR. Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 1994;269: 15520–15527.
406. Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12: 73–90.

407. Viola JPB, Carvalho LDS, Fonseca BPF, Teixeira LK. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* 2005;38: 335–344. doi:/S0100-879X2005000300003
408. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science.* 1991;252: 1427–1430.
409. Daniel P, Filiz G, Brown DV, Hollande F, Gonzales M, D'Abaco G, et al. Selective CREB-dependent cyclin expression mediated by the PI3K and MAPK pathways supports glioma cell proliferation. *Oncogenesis.* 2014;3: e108. doi:10.1038/oncsis.2014.21
410. Catalano S, Giordano C, Rizza P, Gu G, Barone I, Bonofiglio D, et al. Evidence that leptin through STAT and CREB signaling enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer proliferation. *J Cell Physiol.* 2009;218: 490–500. doi:10.1002/jcp.21622
411. Divolis G, Mavroeidi P, Mavrofydi O, Papazafiri P. Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1 α survival pathways. *Cell Biol Toxicol.* 2016;32: 437–449. doi:10.1007/s10565-016-9345-x
412. Burgoyne RD, Morgan A. Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci.* 1995;18: 191–196.
413. Friebel K, Schönherr R, Kinne RW, Kunisch E. Functional role of the KCa3.1 potassium channel in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients: FUNCTION OF KCa3.1 IN SYNOVIAL FIBROBLASTS. *J Cell Physiol.* 2015;230: 1677–1688. doi:10.1002/jcp.24924

414. Lam J, Wulff H. The Lymphocyte Potassium Channels Kv1.3 and KCa3.1 as Targets for Immunosuppression. *Drug Dev Res.* 2011;72: 573–584. doi:10.1002/ddr.20467
415. Di L, Srivastava S, Zhdanova O, Ding Y, Li Z, Wulff H, et al. Inhibition of the K⁺ channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 1541–1546. doi:10.1073/pnas.0910133107
416. Ibrahim AG-E, Cheng K, Marbán E. Exosomes as Critical Agents of Cardiac Regeneration Triggered by Cell Therapy. *Stem Cell Rep.* 2014;2: 606–619. doi:10.1016/j.stemcr.2014.04.006
417. Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem.* 2003;278: 20083–20090. doi:10.1074/jbc.M301642200
418. Borgens RB, Blight AR, Murphy DJ. Axonal regeneration in spinal cord injury: a perspective and new technique. *J Comp Neurol.* 1986;250: 157–167. doi:10.1002/cne.902500203
419. Borgens RB. The role of natural and applied electric fields in neuronal regeneration and development. *Prog Clin Biol Res.* 1986;210: 239–250.
420. Borgens RB, Blight AR, McGinnis ME. Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: the effects of applied electric fields. *J Comp Neurol.* 1990;296: 634–653. doi:10.1002/cne.902960409
421. Novák B, Bentrup FW. An electrophysiological study of regeneration in *Acetabularia mediterranea*. *Planta.* 1972;108: 227–244. doi:10.1007/BF00384111

422. Cone CD, Tongier M. Contact inhibition of division: involvement of the electrical transmembrane potential. *J Cell Physiol.* 1973;82: 373–386. doi:10.1002/jcp.1040820307
423. McCaig CD, Rajniecek AM, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev.* 2005;85: 943–78. doi:10.1152/physrev.00020.2004
424. McLaughlin KA, Levin M. Bioelectric signaling in regeneration: Mechanisms of ionic controls of growth and form. *Dev Biol.* 2018;433: 177–189. doi:10.1016/j.ydbio.2017.08.032
425. Dawson K, Wu C-T, Qi XY, Nattel S. Congestive heart failure effects on atrial fibroblast phenotype: differences between freshly-isolated and cultured cells. *PLoS One.* 2012;7: e52032. doi:10.1371/journal.pone.0052032
426. Chimenti I, Gaetani R, Forte E, Angelini F, De Falco E, Zoccai GB, et al. Serum and supplement optimization for EU GMP-compliance in cardiospheres cell culture. *J Cell Mol Med.* 2014;18: 624–634. doi:10.1111/jcmm.12210
427. Angelini F, Ionta V, Rossi F, Miraldi F, Messina E, Giacomello A. Foetal bovine serum-derived exosomes affect yield and phenotype of human cardiac progenitor cell culture. *BioImpacts BI.* 2016;6: 15–24. doi:10.15171/bi.2016.03
428. Cesselli D, Beltrami AP, D'Aurizio F, Marcon P, Bergamin N, Toffoletto B, et al. Effects of age and heart failure on human cardiac stem cell function. *Am J Pathol.* 2011;179: 349–366. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.036

429. Cao L, Pu J, Zhao M. GSK-3beta is essential for physiological electric field-directed Golgi polarization and optimal electrotaxis. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68: 3081–93. doi:10.1007/s00018-010-0608-z
430. Zhao M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20: 674–682. doi:10.1016/j.semcdb.2008.12.009
431. Fischer KM, Din S, Gude N, Konstandin MH, Wu W, Quijada P, et al. Cardiac Progenitor Cell Commitment is Inhibited by Nuclear Akt Expression. *Circ Res*. 2011;108:960–970. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.237156
432. De Marchi U, Sassi N, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabò I, et al. Intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium*. 2009;45: 509–516. doi:10.1016/j.ceca.2009.03.014
433. Quast S-A, Berger A, Buttstädt N, Friebel K, Schönherr R, Eberle J. General Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC. *PloS One*. 2012;7: e39290. doi:10.1371/journal.pone.0039290
434. Leanza L, Zoratti M, Gulbins E, Szabo I. Mitochondrial ion channels as oncological targets. *Oncogene*. 2014;33: 5569–5581. doi:10.1038/onc.2013.578
435. Kovalenko I, Glasauer A, Schöckel L, Sauter DRP, Ehrmann A, Sohler F, et al. Identification of KCa3.1 Channel as a Novel Regulator of Oxidative Phosphorylation in a Subset of Pancreatic Carcinoma Cell Lines. *PloS One*. 2016;11: e0160658. doi:10.1371/journal.pone.0160658

436. Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Veh RW, Wagner W, Derst C. KATP channels in mesenchymal stromal stem cells: strong up-regulation of Kir6.2 subunits upon osteogenic differentiation. *Tissue Cell*. 2011;43: 331–6. doi:10.1016/j.tice.2011.06.004
437. Andrade PZ, dos Santos F, Almeida-Porada G, da Silva CL, S Cabral JMS. Systematic delineation of optimal cytokine concentrations to expand hematopoietic stem/progenitor cells in co-culture with mesenchymal stem cells. *Mol Biosyst*. 2010;6: 1207–1215. doi:10.1039/b922637k
438. Lam AC, Li K, Zhang XB, Li CK, Fok TF, Chang AM, et al. Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion (Paris)*. 2001;41: 1567–1576.
439. Pineault N, Cortin V, Boyer L, Garnier A, Robert A, Thérien C, et al. Individual and synergistic cytokine effects controlling the expansion of cord blood CD34(+) cells and megakaryocyte progenitors in culture. *Cytotherapy*. 2011;13: 467–480. doi:10.3109/14653249.2010.530651
440. Li K, Chuen CKY, Lee SM, Law P, Fok TF, Ng PC, et al. Small peptide analogue of SDF-1alpha supports survival of cord blood CD34+ cells in synergy with other cytokines and enhances their ex vivo expansion and engraftment into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2006;24: 55–64. doi:10.1634/stemcells.2005-0082
441. Rossmanith T, Schröder B, Bug G, Müller P, Klenner T, Knaus R, et al. Interleukin 3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitor cells and

- maintains the engraftment potential of scid repopulating cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2001;19: 313–320. doi:10.1634/stemcells.19-4-313
442. Heike T, Nakahata T. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1592: 313–321.
443. Paredes-Gamero EJ, Barbosa CMV, Ferreira AT. Calcium signaling as a regulator of hematopoiesis. *Front Biosci Elite Ed*. 2012;4: 1375–1384.
444. Paredes-Gamero EJ, Leon CMMP, Borojevic R, Oshiro MEM, Ferreira AT. Changes in intracellular Ca²⁺ levels induced by cytokines and P2 agonists differentially modulate proliferation or commitment with macrophage differentiation in murine hematopoietic cells. *J Biol Chem*. 2008;283: 31909–31919. doi:10.1074/jbc.M801990200
445. Leon CMMP, Barbosa CMV, Justo GZ, Borelli P, Junior JDR, de Oliveira JSR, et al. Requirement for PLC γ 2 in IL-3 and GM-CSF-stimulated MEK/ERK phosphorylation in murine and human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2011;226: 1780–1792. doi:10.1002/jcp.22507
446. Lemoli RM, Ferrari D, Fogli M, Rossi L, Pizzirani C, Forchap S, et al. Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2004;104: 1662–1670. doi:10.1182/blood-2004-03-0834
447. Hoffman JF, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K, Wickrema A. The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 7366–7371. doi:10.1073/pnas.1232342100

448. Mahaut-Smith MP. The unique contribution of ion channels to platelet and megakaryocyte function. *J Thromb Haemost JTH*. 2012;10: 1722–1732. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04837.x
449. Mark Duffy S, Berger P, Cruse G, Yang W, Bolton SJ, Bradding P. The K⁺ channel iKCA1 potentiates Ca²⁺ influx and degranulation in human lung mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114: 66–72. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.005
450. Hanley PJ, Musset B, Renigunta V, Limberg SH, Dalpke AH, Sus R, et al. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101: 9479–9484. doi:10.1073/pnas.0400733101
451. Xu R, Li C, Wu Y, Shen L, Ma J, Qian J, et al. Role of KCa3.1 Channels in Macrophage Polarization and Its Relevance in Atherosclerotic Plaque Instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37: 226–236. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308461
452. Levin M. Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo. *Mol Biol Cell*. 2014;25: 3835–3850. doi:10.1091/mbc.E13-12-0708