



LIST OF INCARDIO SCIENTIFIC PAPERS

Last update: 7.03.2023

[Bone morphogenetic protein 1.3 inhibition decreases scar formation and supports cardiomyocyte survival after myocardial infarction](#), Nat Commun. 2022 Jan 10;13(1):81. doi: 10.1038/s41467-021-27622-9.

Abstract EN:

Despite the high prevalence of ischemic heart diseases worldwide, no antibody-based treatment currently exists. Starting from the evidence that a specific isoform of the Bone Morphogenetic Protein 1 (BMP1.3) is particularly elevated in both patients and animal models of myocardial infarction, here we assess whether its inhibition by a specific monoclonal antibody reduces cardiac fibrosis. We find that this treatment reduces collagen deposition and cross-linking, paralleled by enhanced cardiomyocyte survival, both in vivo and in primary cultures of cardiac cells. Mechanistically, we show that the anti-BMP1.3 monoclonal antibody inhibits Transforming Growth Factor β pathway, thus reducing myofibroblast activation and inducing cardioprotection through BMP5. Collectively, these data support the therapeutic use of anti-BMP1.3 antibodies to prevent cardiomyocyte apoptosis, reduce collagen deposition and preserve cardiac function after ischemia.

Abstract IT:

Nonostante la prevalenza della cardiopatia ischemica in tutto il mondo, ad oggi non è disponibile alcuna terapia a base di anticorpi monoclonali. Partendo dall'evidenza che i livelli plasmatici di una specifica isoforma Bone Morphogenetic Protein 1 (BMP1.3) sono particolarmente elevati sia nei pazienti che nei modelli animali di infarto miocardico, abbiamo valutato se la sua inibizione mediante un anticorpo monoclonale specifico potesse ridurre la fibrosi cardiaca. Abbiamo constatato che questo trattamento riduce la deposizione di collagene, parallelamente ad una maggiore sopravvivenza dei cardiomiociti sia in vivo che in colture primarie di cellule cardiache. Dal punto di vista dei meccanismi molecolari, l'anticorpo monoclonale anti-BMP1.3 inibisce il Transforming Growth Factor β pathway, riducendo così l'attivazione dei miofibroblasti e inducendo cardioprotezione attraverso la BMP5. Nel complesso, questi dati supportano l'uso terapeutico dell'anticorpo anti-BMP1.3 per prevenire l'apoptosi dei cardiomiociti, ridurre la deposizione di collagene e preservare la funzione cardiaca in seguito a ischemia.

Abstract DE:

Trotz der hohen Prävalenz ischämischer Herzerkrankungen weltweit gibt es derzeit keine Behandlung auf Antikörperbasis. Ausgehend von dem Nachweis, dass eine bestimmte Isoform des knochenmorphogenetischen Proteins 1 (BMP1.3) sowohl bei Patienten als auch in Tiermodellen von Herzinfarkten besonders stark erhöht ist, untersuchen wir hier, ob seine Hemmung durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper die Herzfibrose verringert. Wir stellen fest, dass diese

Behandlung die Kollagenablagerung und -vernetzung verringert und gleichzeitig das Überleben der Kardiomyozyten sowohl in vivo als auch in Primärkulturen von Herzzellen verbessert. Mechanistisch gesehen zeigen wir, dass der monoklonale Antikörper gegen BMP1.3 den Transforming Growth Factor β -Signalweg hemmt, wodurch die Aktivierung der Myofibroblasten reduziert und die Kardioprotektion durch BMP5 induziert wird. Insgesamt unterstützen diese Daten den therapeutischen Einsatz von Anti-BMP1.3-Antikörpern zur Verhinderung der Kardiomyozyten-Apoptose, zur Verringerung der Kollagenablagerung und zum Erhalt der Herzfunktion nach Ischämie.

Biologics and cardiac disease: challenges and opportunities Trends Pharmacol Sci. 2022 Nov;43(11):894-905. doi: 10.1016/j.tips.2022.06.001.

Abstract EN:

Biologics are revolutionizing the treatment of chronic diseases, such as cancer and monogenic disorders, by overcoming the limits of classic therapeutic approaches using small molecules. However, the clinical use of biologics is limited for cardiovascular diseases (CVDs), which are the primary cause of morbidity and mortality worldwide. Here, we review the state-of-the-art use of biologics for cardiac disorders and provide a framework for understanding why they still struggle to enter the field. Some limitations are common and intrinsic to all biological drugs, whereas others depend on the complexity of cardiac disease. In our opinion, delineating these struggles will be valuable in developing and accelerating the approval of a new generation of biologics for CVDs.

Abstract IT:

I farmaci biologici stanno rivoluzionando il trattamento di diverse malattie croniche, come ad esempio i tumori e le malattie monogeniche, superando i limiti degli approcci terapeutici classici con molecole chimiche. Tuttavia, l'uso clinico dei farmaci biologici è ancora limitato per le malattie cardiovascolari (MCV), nonostante queste siano la principale causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo. In questa pubblicazione, esaminiamo lo stato dell'arte dell'uso dei farmaci biologici per le malattie cardiache e forniamo un'analisi per comprendere perché ancora essi facciano fatica ad entrare nella pratica clinica. Alcune limitazioni sono comuni e intrinseche a tutti i farmaci biologici, mentre altre dipendono dalla complessità delle MCV. A nostro avviso, delineare queste difficoltà costituisce un utile punto di partenza per sviluppare e accelerare l'approvazione di una nuova generazione di farmaci biologici per le MCV.

Abstract DE:

Biologika revolutionieren die Behandlung chronischer Krankheiten wie Krebs und monogene Störungen, indem sie die Grenzen der klassischen therapeutischen Ansätze mit kleinen Molekülen überwinden. Allerdings ist der klinische Einsatz von Biologika bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die weltweit die Hauptursache für Morbidität und Mortalität sind, begrenzt. Wir geben einen Überblick über den aktuellen Stand des Einsatzes von Biologika bei Herzkrankheiten und erläutern, warum sie sich immer noch schwer tun, in diesem Bereich Fuß zu fassen. Einige Einschränkungen sind allen biologischen Arzneimitteln gemeinsam und inhärent, während andere von der Komplexität der Herzerkrankung abhängen. Wir sind der Meinung, dass die Beschreibung dieser Probleme für die Entwicklung und Beschleunigung der Zulassung einer neuen Generation von Biologika für Herz-Kreislauf-Erkrankungen von Nutzen sein wird.

Animal models and animal-free innovations for cardiovascular research: current status and routes to be explored. Consensus document of the ESC Working Group on Myocardial Function and the ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart Cardiovasc Res. 2022 Dec 9;118(15):3016-3051. doi: 10.1093/cvr/cvab370

Abstract EN:

Cardiovascular diseases represent a major cause of morbidity and mortality, necessitating research to improve diagnostics, and to discover and test novel preventive and curative therapies, all of which warrant experimental models that recapitulate human disease. The translation of basic science results to clinical practice is a challenging task, in particular for complex conditions such as cardiovascular diseases, which often result from multiple risk factors and comorbidities. This difficulty might lead some individuals to question the value of animal research, citing the translational 'valley of death', which largely reflects the fact that studies in rodents are difficult to translate to humans. This is also influenced by the fact that new, human-derived in vitro models can recapitulate aspects of disease processes. However, it would be a mistake to think that animal models do not represent a vital step in the translational pathway as they do provide important pathophysiological insights into disease mechanisms particularly on an organ and systemic level. While stem cell-derived human models have the potential to become key in testing toxicity and effectiveness of new drugs, we need to be realistic, and carefully validate all new human-like disease models. In this position paper, we highlight recent advances in trying to reduce the number of animals for cardiovascular research ranging from stem cell-derived models to in situ modelling of heart properties, bioinformatic models based on large datasets, and state-of-the-art animal models, which show clinically relevant characteristics observed in patients with a cardiovascular disease. We aim to provide a guide to help researchers in their experimental design to translate bench findings to clinical routine taking the replacement, reduction, and refinement (3R) as a guiding concept.

Abstract IT:

Le malattie cardiovascolari rappresentano una delle principali cause di morbilità e mortalità, il che rende più che mai necessaria la ricerca per migliorare la diagnostica e scoprire e testare nuove terapie preventive e curative, le quali richiedono modelli sperimentali capaci di riprodurre la malattia umana. La traslazione dei risultati della scienza di base alla pratica clinica è un compito impegnativo, in particolare per condizioni complesse come le malattie cardiovascolari, che spesso derivano da molteplici fattori di rischio e comorbidità. Questa difficoltà potrebbe portare a mettere in dubbio il valore della ricerca sugli animali, come dimostra il "deserto traslazionale", ossia la constatazione che gli studi sui roditori sono estremamente difficili da trasporre all'uomo. Ciò è influenzato anche dal fatto che nuovi modelli in vitro di derivazione umana possono ricapitolare specifici aspetti dei processi patologici. Tuttavia, sarebbe un errore pensare che i modelli animali non rappresentino un passo fondamentale nel percorso traslazionale, poiché consentono importanti approfondimenti fisiopatologici sui meccanismi delle malattie, in particolare a livello dei singoli organi e dell'intero organismo. Sebbene i modelli umani derivati da cellule staminali abbiano la potenzialità di diventare fondamentali per testare la tossicità e l'efficacia di nuovi farmaci, dobbiamo essere realistici e convalidare attentamente tutti i nuovi modelli che ricapitolano le patologie umane. In questo documento, mettiamo in evidenza i recenti progressi nel tentativo di ridurre il numero di animali per la ricerca cardiovascolare, dai modelli derivati da cellule staminali alla modellazione in situ delle proprietà del cuore, ai modelli bioinformatici basati su big data e ai modelli animali all'avanguardia, che mostrano caratteristiche clinicamente rilevanti osservate nei pazienti con specifiche malattie

cardiovascolari. Il nostro obiettivo è quello di fornire una guida per aiutare i ricercatori a progettare gli esperimenti per traslare i risultati dei test di laboratorio alla pratica clinica, utilizzando i principi di sostituzione, riduzione e perfezionamento come concetto guida.

Abstract DE:

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität und erfordern Forschungsarbeiten zur Verbesserung der Diagnostik und zur Entdeckung und Erprobung neuartiger präventiver und kurativer Therapien, was experimentelle Modelle erfordert, die die menschliche Krankheit nachbilden. Die Übertragung von Ergebnissen aus der Grundlagenforschung in die klinische Praxis ist eine schwierige Aufgabe, insbesondere bei komplexen Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die häufig auf mehrere Risikofaktoren und Begleiterkrankungen zurückzuführen sind. Diese Schwierigkeit könnte einige dazu veranlassen, den Wert der Tierforschung in Frage zu stellen, indem sie das Tal des Todes" bei der Übertragung anführen, das weitgehend die Tatsache widerspiegelt, dass Studien an Nagetieren schwer auf den Menschen übertragbar sind. Dies wird auch durch die Tatsache beeinflusst, dass neue, vom Menschen abgeleitete In-vitro-Modelle Aspekte von Krankheitsprozessen rekapitulieren können. Es wäre jedoch ein Irrtum zu glauben, dass Tiermodelle keinen wichtigen Schritt auf dem Weg der Translation darstellen, da sie wichtige pathophysiologische Erkenntnisse über Krankheitsmechanismen insbesondere auf Organ- und Systemebene liefern. Aus Stammzellen abgeleitete humane Modelle haben zwar das Potenzial, bei der Prüfung der Toxizität und Wirksamkeit neuer Arzneimittel eine Schlüsselrolle zu spielen, aber wir müssen realistisch sein und alle neuen humanähnlichen Krankheitsmodelle sorgfältig validieren. In diesem Positionspapier heben wir die jüngsten Fortschritte bei dem Versuch hervor, die Zahl der Tiere für die kardiovaskuläre Forschung zu verringern, angefangen bei aus Stammzellen gewonnenen Modellen bis hin zur In-situ-Modellierung von Herzeigenschaften, bioinformatischen Modellen auf der Grundlage großer Datensätze und modernen Tiermodellen, die klinisch relevante Merkmale aufweisen, die bei Patienten mit einer kardiovaskulären Erkrankung beobachtet werden. Unser Ziel ist es, den Forschern einen Leitfaden für die Versuchsplanung an die Hand zu geben, damit sie ihre Erkenntnisse aus dem Labor in die klinische Routine übertragen können. Dabei soll das Konzept der Ersetzung, Verringerung und Verfeinerung (3R) als Leitfaden dienen.

Ischemic wound revascularization by the Stromal Vascular Fraction relies on host-donor hybrid vessels, npj Regen Med 8, 8 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41536-023-00283-6> / La frazione stromale vascolare promuove la rivascularizzazione delle ferite ischemiche attraverso la formazione di vasi ibridi tra donatore e ricevente, npj Regen Med 8, 8 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41536-023-00283-6>

Abstract EN:

Non-healing wounds place a significant burden on both quality of life of affected patients and health systems. Skin substitutes are applied to promote the closure of non-healing wounds, although their efficacy is limited by inadequate vascularization. The stromal vascular fraction (SVF) from the adipose tissue is a promising therapy to overcome this limitation. Despite a few successful clinical trials, its incorporation in the clinical routine has been hampered by their inconsistent results. All these studies concluded by warranting pre-clinical work aimed at both characterizing the cell types composing the SVF and shedding light on their mechanism of action. Here, we established a model of non-healing wound, in which we applied the SVF in combination with a clinical grade skin substitute. We purified the SVF cells from transgenic animals to trace their fate after transplantation and observed that it gave rise to a mature vascular network composed of arteries, capillaries, veins, as well as lymphatics, structurally and functionally connected with the host circulation. Then we moved to a human-in-mouse model and confirmed that SVF-derived endothelial cells formed hybrid human-mouse vessels, that were stabilized by perivascular cells. Mechanistically, SVF-derived endothelial cells engrafted and expanded, directly contributing to the formation of new vessels, while a population of fibro-adipogenic progenitors stimulated the expansion of the host vasculature in a paracrine manner. These data have important clinical implications, as they provide a steppingstone toward the reproducible and effective adoption of the SVF as a standard care for non-healing wounds.

Abstract IT:

Le ferite difficili rappresentano una patologia molto diffusa, con un impatto importante per la qualità della vita dei pazienti e per la spesa sanitaria. Le terapie attualmente disponibili si basano sull'applicazione di sostituti cutanei per promuoverne la richiusura. Tuttavia la loro efficacia è limitata dalla vascolarizzazione inadeguata che solitamente caratterizza questa malattia. Recentemente, la frazione stromale vascolare (stromal vascular fraction - SVF) è risultata una terapia promettente grazie alla sua capacità di promuovere la formazione di nuovi vasi. Nonostante il successo di alcuni studi clinici, la sua integrazione nella routine clinica è stata ostacolata da risultati incoerenti. Di conseguenza risulta necessario caratterizzare i tipi di cellule che compongono l'SVF e a far luce sul loro meccanismo d'azione attraverso ulteriori studi preclinici. A tal fine, abbiamo creato un modello di ferita difficile, in cui abbiamo applicato l'SVF in combinazione con un sostituto cutaneo utilizzato nella pratica clinica. Purificando le cellule della SVF da animali transgenici siamo riusciti a tracciarne il destino dopo il trapianto, osservando che davano origine a una rete vascolare matura composta da arterie, capillari, vene e linfatici, strutturalmente e funzionalmente connessa con la circolazione dell'ospite. Successivamente, con un modello uomo-topo, abbiamo dimostrato che anche le cellule endoteliali derivate dall'SVF di pazienti, generavano vasi, composti sia da cellule di origine umana (cellule trapiantate) che murina (cellule dell'ospite), stabilizzati da cellule perivascolari. In questo modo abbiamo caratterizzato il duplice meccanismo d'azione della SVF. Da un lato, le cellule endoteliali derivate da SVF contribuiscono direttamente alla formazione di nuovi vasi, innestandosi ed espandendosi nel letto della ferita, mentre dall'altro una popolazione di progenitori fibro-adipogenici stimolano l'espansione della vascolarizzazione ospite in modo paracrino. Questi dati

hanno importanti implicazioni cliniche, in quanto forniscono un trampolino di lancio verso l'adozione riproducibile ed efficace dell'SVF come cura standard per le ferite difficili.

Abstract DE:

Nicht heilende Wunden stellen eine erhebliche Belastung sowohl für die Lebensqualität der betroffenen Patienten als auch für die Gesundheitssysteme dar. Hautersatzmaterialien werden eingesetzt, um den Verschluss von nicht heilenden Wunden zu fördern, ihre Wirksamkeit ist jedoch durch eine unzureichende Vaskularisierung begrenzt. Die Stromale Vaskuläre Fraktion (SVF) aus dem Fettgewebe ist eine vielversprechende Therapie, um diese Einschränkung zu überwinden. Trotz einiger erfolgreicher klinischer Studien wurde ihre Übernahme in die klinische Routine durch uneinheitliche Ergebnisse behindert. Alle diese Studien zielten darauf ab, die Zelltypen, aus denen sich die SVF zusammensetzt, zu charakterisieren und ihren Wirkmechanismus zu erforschen. In diesem Projekt haben wir ein Modell einer nicht heilenden Wunde entwickelt, in dem wir die SVF in Kombination mit einem klinischen Hautersatz angewendet haben. Wir reinigten die SVF-Zellen aus transgenen Tieren, um ihre Entwicklung nach der Transplantation zu verfolgen, und beobachteten, dass sie ein ausgereiftes vaskuläres Netzwerk aus Arterien, Kapillaren, Venen und Lymphgefäßen bildeten, das strukturell und funktionell mit dem Wirtskreislauf verbunden war. Der im Anschluss erfolgte Übergang zu einem Mensch-Maus Modell hat bestätigt, dass aus SVF gewonnene Endothelzellen hybride Mensch-Maus-Gefäße bildeten, die durch perivaskuläre Zellen stabilisiert wurden. Mechanisch gesehen haben die aus SVF stammenden transplantierten und expandierten Endothelzellen direkt zur Bildung neuer Gefäße beigetragen, während eine Population von fibroadipogenen Vorläuferzellen die Expansion des Wirtsgefäßsystems auf parakrine Weise stimulierte. Diese Daten haben wichtige klinische Implikationen, da sie ein Sprungbrett für die reproduzierbare und wirksame Einführung der SVF als Standardbehandlung für nicht heilende Wunden darstellen.

Master thesis: Automated Analysis of Multi-Electrode Array Signals of hiPSC-Derived Cardiomyocytes, (2022)

Abstract EN:

To perform cardiotoxicity screening of pharmacological compounds, multi-electrode array (MEA) systems that measure the external field potentials of the examined cardiomyocyte cell cultures have been increasingly used in recent years. For the analysis of the measurement results, almost exclusively proprietary software solutions of the MEA system manufacturers are available, the use of which, however, requires a high degree of specialisation and, prior to each analysis, the input of various parameters on which the success of the analysis depends.

The aim of this work is to develop an easy-to-use and reliable software tool for the fully automated analysis of MEA signals without the need for manual input of parameters, such as thresholds for peak detection. The central research question is how such a tool can be designed and implemented.

As an answer to the research question, a MATLAB software application was created which enables the loading, conversion and analysis of MEA signals with a user-friendly GUI. The analysis of the signals to extract features such as depolarisation spike amplitude, field potential duration or arrhythmia detection is performed by algorithms that do not require any external input and the tool can therefore also be used by users with little experience in the analysis of MEA signals.

The validation results show that the tool developed in the context of this work not only delivers results that are just as reliable as those of the reference system, but also works more accurately in the case of demanding signal patterns. The latter is due to the use of a bandpass filter for spike peak detection and the definition of the T-wave Point of Interest, as an alternative to the error-prone search for the T-wave peak. This particular point is based on the first derivative of the signal and with the help of which the development of the Field Potential Duration over time can be determined with great reliability.

Abstract IT:

Per effettuare lo screening della cardiotossicità dei farmaci, negli ultimi anni sono stati sempre più utilizzati sistemi multi-electrode array (MEA) che misurano i potenziali elettrici extracellulari in colture cellulari di cardiomiociti. Per l'analisi dei risultati delle misurazioni sono disponibili quasi esclusivamente software proprietari dei produttori di sistemi MEA, il cui utilizzo, tuttavia, richiede un elevato grado di specializzazione e, prima di ogni analisi, l'inserimento di vari parametri da cui dipende il successo dell'analisi stessa.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di sviluppare un nuovo software, facile da usare e affidabile per l'analisi completamente automatizzata dei segnali MEA, senza la necessità di inserire manualmente i parametri, come le soglie per il rilevamento dei picchi. La principale domanda scientifica è stata quindi quella di capire come progettare e implementare uno strumento di questo tipo.

A questo scopo è stata creata un'applicazione software MATLAB che consente di caricare, convertire e analizzare i segnali MEA con un'interfaccia grafica di facile utilizzo. L'analisi dei segnali per estrarre caratteristiche come l'ampiezza del picco di depolarizzazione, la durata del potenziale di campo o l'individuazione dell'aritmia, viene eseguita da algoritmi che non richiedono nessun input

esterno. Lo strumento può quindi essere utilizzato anche da utenti con poca esperienza nell'analisi dei segnali MEA.

I risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano che lo strumento sviluppato non solo fornisce risultati altrettanto affidabili di quelli del sistema commerciale di riferimento, ma risulta addirittura più accurato nel caso di segnali di difficile interpretazione. Questo grazie all'uso di un filtro passa-banda per il rilevamento dei picchi e grazie alla definizione del punto di interesse dell'onda T, in alternativa ai sistemi tradizionali di ricerca del picco dell'onda T, più soggetti ad errori. Questo punto in particolare si basa sulla derivata prima del segnale, con l'aiuto della quale è possibile determinare con grande affidabilità l'andamento della durata del potenziale elettrico extracellulare, nel tempo.

Abstract DE:

Für das kardiotoxische Screening pharmakologischer Substanzen werden in den letzten Jahren zunehmend Multi-Electrode-Array (MEA)-Systeme eingesetzt, die die externen Feldpotentiale der untersuchten Kardiomyozyten-Zellkulturen messen. Für die Auswertung der Messergebnisse stehen fast ausschließlich proprietäre Softwarelösungen der MEA-Systemhersteller zur Verfügung, deren Einsatz jedoch einen hohen Spezialisierungsgrad und vor jeder Auswertung die Eingabe verschiedener Parameter erfordert, von denen der Erfolg der Auswertung abhängt.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein einfach zu bedienendes und zuverlässiges Softwaretool für die vollautomatische Analyse von MEA-Signalen zu entwickeln, ohne dass die manuelle Eingabe von Parametern, wie z.B. Schwellenwerten für die Peak-Erkennung, erforderlich ist. Die zentrale Forschungsfrage ist, wie ein solches Werkzeug konzipiert und implementiert werden kann.

Als Antwort auf die Forschungsfrage wurde eine MATLAB-Softwareanwendung entwickelt, die das Laden, Konvertieren und Analysieren von MEA-Signalen mit einer benutzerfreundlichen GUI ermöglicht. Die Analyse der Signale zur Extrahierung von Merkmalen wie Depolarisationsspike-Amplitude, Feldpotentialdauer oder Arrhythmie-Erkennung erfolgt durch Algorithmen, die keine externen Eingaben erfordern, so dass das Tool auch von Benutzern mit wenig Erfahrung in der Analyse von MEA-Signalen verwendet werden kann.

Die Validierungsergebnisse zeigen, dass das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Tool nicht nur ebenso zuverlässige Ergebnisse liefert wie das Referenzsystem, sondern auch bei anspruchsvollen Signalmustern genauer arbeitet. Letzteres ist auf die Verwendung eines Bandpassfilters für die Spike-Peak-Detektion und die Definition des T-Wellen Point of Interest als Alternative zur fehleranfälligen Suche nach dem T-Wellen Peak zurückzuführen. Dieser besondere Punkt basiert auf der ersten Ableitung des Signals, mit dessen Hilfe die zeitliche Entwicklung der Feldpotentialdauer mit großer Zuverlässigkeit bestimmt werden kann.

“Modeling incomplete penetrance in arrhythmogenic cardiomyopathy by human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes” by De Bortoli M et al, Computational and Structural Biotechnology Journal, Accepted 16 February 2023.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037023000764#ack0005>

Abstract EN:

Human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) are commonly used to model arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM), a heritable cardiac disease characterized by severe ventricular arrhythmias, fibrofatty myocardial replacement and progressive ventricular dysfunction. Although ACM is inherited as an autosomal dominant disease, incomplete penetrance and variable expressivity are extremely common, resulting in different clinical manifestations. Here, we propose hiPSC-CMs as a proper in vitro model to study incomplete penetrance in ACM. Six hiPSC lines were generated from blood samples of three ACM patients carrying a heterozygous deletion of exon 4 in the *PKP2* gene, two asymptomatic (ASY) carriers of the same mutation and one healthy control (CTR), all belonging to the same family. Whole exome sequencing was performed in all family members and hiPSC-CMs were examined by ddPCR, western blot, Wes™ immunoassay system, patch clamp, immunofluorescence and RNASeq. Our results show molecular and functional differences between ACM and ASY hiPSC-CMs, including a higher amount of mutated *PKP2* mRNA, a lower expression of the connexin-43 protein, a lower overall density of sodium current, a higher intracellular lipid accumulation and sarcomere disorganization in ACM compared to ASY hiPSC-CMs. Differentially expressed genes were also found, supporting a predisposition for a fatty phenotype in ACM hiPSC-CMs. These data indicate that hiPSC-CMs are a suitable model to study incomplete penetrance in ACM.

Abstract IT:

Cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC-CMs) sono comunemente usate come modello di studio per la cardiomiopatia aritmogena (ACM), una malattia cardiaca ereditaria caratterizzata da gravi aritmie ventricolari, sostituzione del miocardio con tessuto fibroadiposo e progressiva disfunzione ventricolare. Anche se la ACM è ereditata come malattia autosomica dominante, la penetranza incompleta e l'espressività variabile sono estremamente comuni, e portano a differenti manifestazioni cliniche. Qui proponiamo i hiPSC-CMs come un buon modello in vitro per lo studio della penetranza incompleta nella ACM. Sei linee hiPSC sono state generate dai campioni di sangue di tre pazienti ACM portatori di una delezione in eterozigosi dell'esone 4 del gene *PKP2*, di due portatori asintomatici (ASY) della stessa mutazione e di un controllo sano (CTR), tutti appartenenti alla stessa famiglia. Il sequenziamento dell'intero esoma è stato eseguito in tutti i membri della famiglia e i hiPSC-CMs sono stati esaminati con ddPCR, western blot, saggio immunologico con sistema Wes™, patch clamp, immunoflorescenza e sequenziamento dell'RNA. I nostri risultati mostrano differenze molecolari e funzionali tra i hiPSC-CMs di pazienti ACM e i hiPSC-CMs di ASY, inclusa una maggiore quantità di mRNA mutato del gene *PKP2*, una minor espressione della proteina connessina 43, una minore densità della corrente sodio, un maggior accumulo lipidico e una maggior disorganizzazione del sarcomero nei hiPSC-CMs di pazienti ACM rispetto agli ASY. Sono stati inoltre identificati geni differenzialmente espressi, a supporto di una predisposizione ad un fenotipo adiposo nei hiPSC-CMs dei pazienti ACM. Questi dati indicano che i hiPSC-CMs sono un modello valido per lo studio della penetranza incompleta nella ACM.

Abstract DE:

Aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs) differenzierte Kardiomyozyten werden häufig als Studienmodell für arrhythmogene Kardiomyopathie (ACM) verwendet, einer vererbaren Herzerkrankung, die durch schwere ventrikuläre Arrhythmien, sowie den Austausch des myokardialen Gewebes durch fibröses Fettgewebe und fortschreitende ventrikuläre Dysfunktion gekennzeichnet ist. Obwohl ACM autosomal-dominant vererbt wird, sind unvollständige Penetranz und variable Expressivität sehr häufig, was zu unterschiedlichen klinischen Manifestationen führt. Hiermit schlagen wir hiPSC-CMs als geeignetes in-vitro-Modell für die Untersuchung der unvollständigen Penetranz bei ACM vor. Sechs hiPSC-Linien wurden aus Blutproben von drei ACM-Patienten, die eine heterozygote Deletion von Exon 4 im *PKP2*-Gen tragen, sowie zwei asymptomatischen Trägern (ASY) derselben Mutation und einer gesunden Kontrolle (CTR), die alle derselben Familie angehören, erzeugt. Bei allen Familienmitgliedern wurde eine vollständige Exom-Sequenzierung durchgeführt. Des Weiteren wurden hiPSC-CMs mittels ddPCR, Western Blot, WesTM-Immunoassay, Patch-Clamp, Immunfluoreszenz und RNA-Sequenzierung untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen molekulare als auch funktionelle Unterschiede zwischen ACM und ASY hiPSC-CMs, darunter eine erhöhte Menge an mutierter *PKP2*-mRNA, eine geringere Expression des Connexin-43-Proteins, eine geringere Gesamtdichte der Natriumladung, eine höhere intrazelluläre Lipidakkumulation und eine stärkere Desorganisation des Sarkomers in hiPSC-CMs von ACM-Patienten im Vergleich zu ASYs hiPSC-CMs. Es wurden auch differentiell exprimierte Gene identifiziert, die eine Prädisposition für einen Fettgewebe Phänotyp in ACM hiPSC-CMs belegen. Diese Daten weisen darauf hin, dass hiPSC-CMs ein geeignetes Modell zur Untersuchung der unvollständigen Penetranz in ACM sind.

CONTACT / CONTATTI / KONTACT:

Serena Zacchigna, INCardio Scientific Coordinator

serena.zacchigna@icgeb.org