

La ricerca di base sulla cardiomiopatia aritmogena

Elena Sommariva

01/05/2023

La cardiomiopatia aritmogena (ACM) è una malattia genetica caratterizzata da sostituzione del muscolo cardiaco con tessuto non funzionale (fibrotico e grasso). La maggior parte dei pazienti presenta mutazioni nei geni desmosomiali che sono delle giunzioni tra le cellule che rendono stabile il tessuto, soprattutto quando è soggetto a stress, e regolano diversi meccanismi interni alla cellula. Il cuore è formato da diversi tipi di cellule. Il più del volume è occupato dai cardiomiociti (grosse cellule contrattili, responsabili della funzione pompa), ma la maggior parte delle cellule sono piccole, non contrattili e hanno funzione di supporto (cellule stromali).

Table 1 Milestones in the contemporary history of arrhythmogenic cardiomyopathy (AC)

1977–78	Fontaine et al., Electrical instability of the right ventricle ^{8,9}
1982	Marcus et al., Right ventricular dysplasia and 'triangle of dysplasia' ²
1986	Protonotariou and Tsatsopoulou, Naxos disease ²¹
1988	Thiene et al., SCD death in the young ³
1988	Nava et al., Familiarity ¹¹
1994	McKenna et al., Task force diagnostic criteria ³⁷
1995	Richardson et al., WHO classification of cardiomyopathies ⁶
1996	Basso et al., Myocardial dystrophy ⁴
1998	Valente et al., Apoptosis as mode of cell death ¹⁸
1999	Calkins, A national registry in USA
2000	Nava et al., Genetically determined cardiomyopathy ¹⁷
2000	McKoy et al., <i>JUP</i> recessive mutation in Naxos disease ²⁴
2000	Norgett et al., <i>DSP</i> recessive mutation in Carvajal syndrome ²⁶
2002	Rampazzo et al., <i>DSP</i> mutation in dominant form ²⁸
2003	Corrado et al., ICD for SCD prevention ⁴⁵
2004	Marchlinski et al., Electroanatomic mapping ¹⁰
2004	Gerull et al., <i>PKP2</i> mutations in dominant form ³⁰
2005	Bauce et al., Genotype–phenotype correlations ²⁹
2005	Norman et al., Left ventricular variant ⁴¹
2006	Corrado et al., ECG screening programme and prevention of SCD in competitive athletes ¹⁶
2006	Garcia-Gras et al., Loss of Wnt/ β -catenin signalling in transgenic mice ⁴⁹
2006	Pilichou et al., Mutations in <i>DSG2</i> in dominant form ³¹
2006	Syrris et al., Mutations in <i>DSC2</i> in dominant form ³²
2007	Asimaki et al., <i>JUP</i> mutations in dominant form ²⁴
2008	Basso et al., Endomyocardial biopsy ⁴⁰
2010	Marcus et al., Update of the Task Force diagnostic criteria ³⁸
2013	Rigato et al., Compound and digenic heterozygosity ³⁵
2013	Kim et al., AC with patient-specific iPSCs ⁵³
2014	Asimaki et al., Zebrafish model in Naxos disease ⁵⁰
2016	Sommariva et al., Mesenchymal cells as the source of adipocytes ²⁰
2018	Giuliodori et al., Loss of Wnt/ β -catenin signalling in zebrafish model ⁵¹

Tratto da: Arrhythmogenic Cardiomyopathy: A contemporary review of the history of arrhythmogenic cardiomyopathy highlighting the early discoverers and recent genetic work. Beffagna et al., EHJ 2020

La Cardiomiopatia aritmogena è una malattia identificata relativamente di recente, alla fine degli anni '70 come entità a sé stante [1] [2]. Fin dalla sua definizione è stato notato l'aspetto ereditario [3], e quindi ipotizzata una componente genetica. Nello studio dei meccanismi causativi della patologia la ricerca si è inizialmente quindi concentrata proprio sulla genetica. Nel tempo, forme autosomiche recessive quali le sindromi di Naxos [4] e di Carvajal [5] e forme autosomiche dominanti in grandi famiglie, in cui era possibile valutare la segregazione della patologia, hanno portato al riconoscimento dei principali geni associati, cioè i geni desmosomiali: *JUP*, codificante per la placoglobina [6], *DSP* per la desmoplachina [7], *PKP2* per la placofilina2 [8], *DSG2* per la desmogleina2 [9] e *DSC2* per la desmocollina2 [10]. Anche mutazioni in geni non desmosomiali possono causare l'ACM [11], sebbene non si possa escludere una sovrapposizione fenotipica con altre cardiomiopatie.

I desmosomi sono delle giunzioni che tengono unite cellule adiacenti e sono particolarmente presenti in tessuti in cui ci sia forte stress meccanico, come la cute o il cuore. Come un difetto nelle giunzioni cellulari causa la cardiomiopatia? Quali sono i meccanismi che legano il difetto genetico alla manifestazione fenotipica della patologia?

Gran parte della ricerca di base si è concentrata sui cardiomiociti, le cellule funzionali del cuore, che occupano gran parte del suo volume. La teoria più accreditata è che le giunzioni, indebolite dalla mutazione, non reggano alla trazione dovuta alla contrazione del cuore, soprattutto se sotto sforzo, e che i cardiomiociti muoiano. Inoltre i desmosomi sono strettamente legati ad altre strutture di membrana,

come alcuni canali ionici [12], e un riarrangiamento del desmosoma mutato può portare a difetti del canale del sodio [13] e delle connesine [14], entrambi fenomeni pro-aritmici. In aggiunta i desmosomi sono nodi cruciali per la partenza di segnali cellulari che arrivano al nucleo, provocando un cambiamento della trascrizione. In particolare risulta cambiata l'espressione genica dei meccanismi di gestione del calcio, che regolano l'accoppiamento tra segnali elettrici e il movimento meccanico del muscolo [15] [16]. Diversi meccanismi sono stati svelati anche per quanto riguarda la peculiarità della cardiomiopatia aritmogena, che la distingue dalle altre cardiomiopatie, cioè l'accumulo adiposo. Due esempi sono la deregolazione dei pathway di WNT [17] e HIPPO [18].

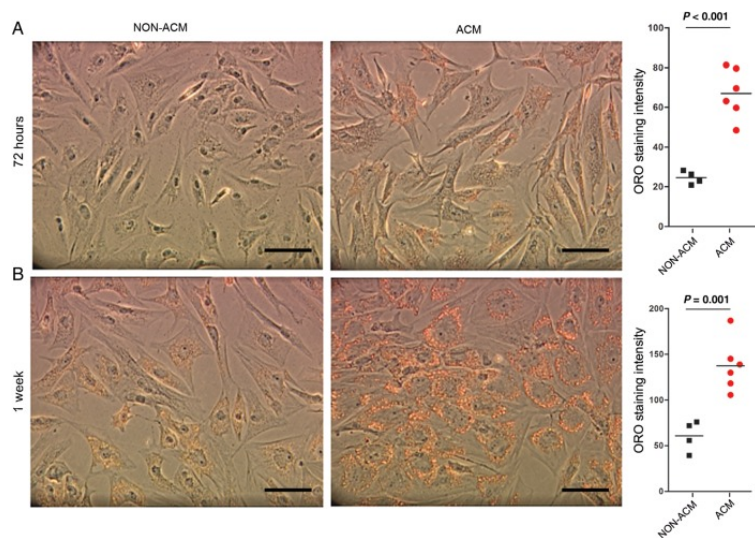
Nel nostro laboratorio abbiamo fatto una scoperta rivoluzionaria, confermata successivamente da altri gruppi [19]: non solo i cardiomiociti sono importanti nella cardiomiopatia aritmogena, ma anche altre cellule ne prendono parte. Abbiamo infatti dimostrato nel 2016 che nei cuori ACM le cellule stromali cardiache sono la fonte principale di adipociti [20], e nel 2021 anche di fibrosi [21] e che possono essere usate in piastra per scoprire i meccanismi di questa degenerazione fibro-adiposa.

Le cellule stromali sono relativamente piccole, fungono da sostegno per le cellule funzionali e superano i cardiomiociti in numero. Esprimono i geni desmosomiali e quindi sono sensibili alle loro mutazioni. Possono essere isolate direttamente da

minuscole biopsie cardiache di pazienti affetti da ACM [22]. Questi esperimenti sono stati tra i primi, nella ricerca sulla ACM, in cui si usassero cellule umane primarie, con alto valore traslazionale. Un altro modello cellulare utile ed innovativo, applicato per la prima volta all'ACM dal prof. Chen [23] sono le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Anche queste sono di origine umana e sono cellule staminali ottenute dalla riprogrammazione delle cellule somatiche di un paziente, derivanti ad esempio da sangue o cute. Queste cellule possono essere indotte a differenziare nei tipi cellulari di interesse e sono particolarmente utili per modellizzare tessuti difficilmente accessibili e campionabili, come il cuore. Grazie al loro differenziamento in diversi tipi cellulari cardiaci (cardiomiociti, cellule stromali ed endoteliali) sono stati ottenuti dei microtessuti cardiaci "in provetta" derivanti da uno specifico paziente, quindi nell'ottica della medicina personalizzata. Grazie a questa innovazione tecnologica abbiamo dimostrato che le cellule stromali ACM sono sufficienti a provocare disfunzioni di contrattilità in un microtessuto cardiaco composto da diversi tipi di cellule sane [24].

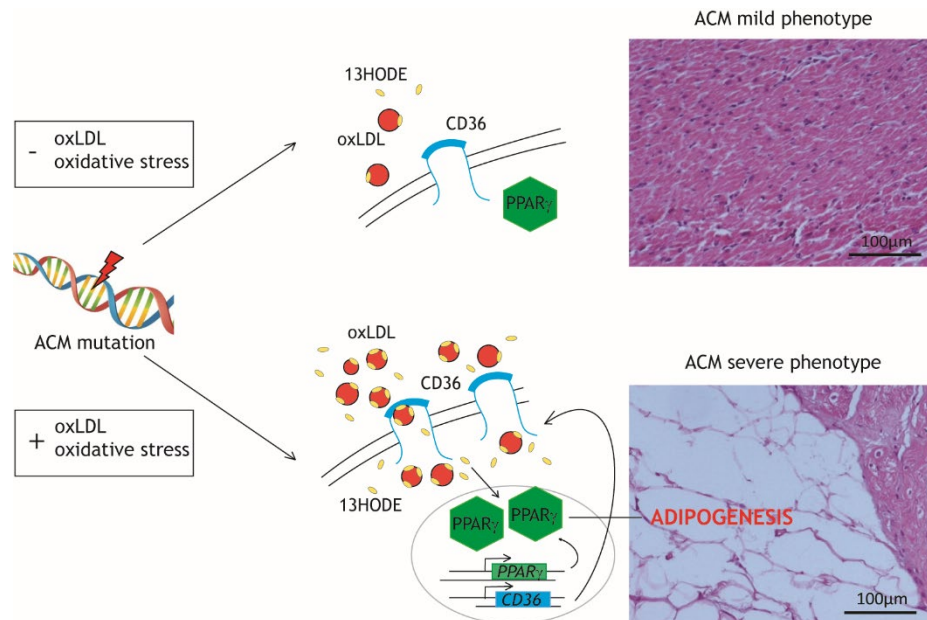
Dal punto di vista dei meccanismi, abbiamo dimostrato che la deregolazione della gestione dello ione calcio non è solo coinvolta nei difetti dei cardiomiociti dell'ACM, ma contribuisce anche alle proprietà differenziali anomale delle cellule stromali ACM [25]. A questo proposito stiamo studiando gli effetti di farmaci modulatori del calcio sull'adipogenesi e sulla fibrosi delle cellule ACM, usando i microtessuti cardiaci 3D.

Sfruttando le cellule stromali, le cellule iPSC, un modello *in vivo*, e lo studio delle caratteristiche cliniche dei pazienti ACM, abbiamo recentemente dimostrato che le LDL ossidate (il colesterolo cattivo, modificato da un processo di ossidazione) sono cofattori della patogenesi della malattia, e la aggravano molto. È importante notare che questi fattori peggiorativi sono oggi curabili. I nostri esperimenti hanno verificato che una statina



Le cellule stromali cardiache ACM accumulano più grasso (in rosso- Oil Red O) rispetto a quelle di controllo. Tratto da: Cardiac mesenchymal stromal cells are a source of adipocytes in arrhythmogenic cardiomyopathy. Sommariva et al., EHJ 2016.

può prevenire la progressione dell'ACM nei modelli murini [26]. Questa scoperta apre la strada a una possibile traslazione dei risultati alla clinica. Stiamo sviluppando modelli in piastra di ACM, ancora più complessi, organoidi paziente-specifici simili a piccoli cuori miniaturizzati, per valutare la reazione alle statine. Inoltre stiamo cercando fondi per eseguire un trial clinico per valutare nei pazienti l'uso delle statine (di cui si conosce già sicurezza e tollerabilità) per moderare la progressione dell'ACM.



Le mutazioni dell'ACM sono necessarie ma non sufficienti per la penetranza della malattia. È stato dimostrato il contributo dei lipidi ossidati come nuovi cofattori di patogenesi. Le LDL ossidate (oxLDL) innescano un ciclo vizioso che aumenta l'espressione di PPAR γ , regolatore dell'adipogenesi. Tratto da: Oxidized LDL-dependent pathway as new pathogenic trigger in arrhythmogenic cardiomyopathy. Sommariva et al., Embo Mol Mec 2021.

Referenze essenziali

1. Fontaine, G.; Guiraudon, G.; Frank, R.; Vedel, J.; Grosogeat, Y.; Cabrol, C.; Facquet, J. Stimulation Studies and Epicardial Mapping in Ventricular Tachycardia: Study of Mechanisms and Selection for Surgery. In *Stimulation studies and epicardial mapping in ventricular tachycardia : study of mechanisms and selection for surgery*; University Park Press: Baltimore, 1977.
2. Fontaine, G.; Frank, R.; Gallais-Hamonno, F.; Allali, I.; Phan-Thuc, H.; Grosogeat, Y. [Electrocardiography of delayed potentials in post-excitation syndrome]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **1978**, *71*, 854–864.
3. Nava, A.; Thiene, G.; Canciani, B.; Scognamiglio, R.; Daliento, L.; Buja, G.; Martini, B.; Stritoni, P.; Fasoli, G. Familial Occurrence of Right Ventricular Dysplasia: A Study Involving Nine Families. *J Am Coll Cardiol* **1988**, *12*, 1222–1228, doi:10.1016/0735-1097(88)92603-4.
4. Protonotarios, N.; Tsatsopoulou, A.; Patsourakos, P.; Alexopoulos, D.; Gezerlis, P.; Simitsis, S.; Scampardonis, G. Cardiac Abnormalities in Familial Palmoplantar Keratosis. *Br Heart J* **1986**, *56*, 321–326, doi:10.1136/hrt.56.4.321.
5. Norgett, E.E.; Hatsell, S.J.; Carvajal-Huerta, L.; Cabezas, J.C.; Common, J.; Purkis, P.E.; Whittock, N.; Leigh, I.M.; Stevens, H.P.; Kelsell, D.P. Recessive Mutation in Desmoplakin Disrupts Desmoplakin-Intermediate Filament Interactions and Causes Dilated Cardiomyopathy, Woolly Hair and Keratoderma. *Hum Mol Genet* **2000**, *9*, 2761–2766, doi:10.1093/hmg/9.18.2761.

6. Asimaki, A.; Syrris, P.; Wichter, T.; Matthias, P.; Saffitz, J.E.; McKenna, W.J. A Novel Dominant Mutation in Plakoglobin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **2007**, *81*, 964–973, doi:10.1086/521633.
7. Rampazzo, A.; Nava, A.; Malacrida, S.; Beffagna, G.; Bauce, B.; Rossi, V.; Zimbello, R.; Simionati, B.; Basso, C.; Thiene, G.; et al. Mutation in Human Desmoplakin Domain Binding to Plakoglobin Causes a Dominant Form of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **2002**, *71*, 1200–1206, doi:10.1086/344208.
8. Gerull, B.; Heuser, A.; Wichter, T.; Paul, M.; Basson, C.T.; McDermott, D.A.; Lerman, B.B.; Markowitz, S.M.; Ellinor, P.T.; MacRae, C.A.; et al. Mutations in the Desmosomal Protein Plakophilin-2 Are Common in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Nat Genet* **2004**, *36*, 1162–1164, doi:10.1038/ng1461.
9. Pilichou, K.; Nava, A.; Basso, C.; Beffagna, G.; Bauce, B.; Lorenzon, A.; Frigo, G.; Vettori, A.; Valente, M.; Towbin, J.; et al. Mutations in Desmoglein-2 Gene Are Associated with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation* **2006**, *113*, 1171–1179, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583674.
10. Syrris, P.; Ward, D.; Evans, A.; Asimaki, A.; Gandjbakhch, E.; Sen-Chowdhry, S.; McKenna, W.J. Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Associated with Mutations in the Desmosomal Gene Desmocollin-2. *Am J Hum Genet* **2006**, *79*, 978–984, doi:10.1086/509122.
11. Lazzarini, E.; Jongbloed, J.D.H.; Pilichou, K.; Thiene, G.; Basso, C.; Bikker, H.; Charbon, B.; Swertz, M.; van Tintelen, J.P.; van der Zwaag, P.A. The ARVD/C Genetic Variants Database: 2014 Update. *Hum Mutat* **2015**, *36*, 403–410, doi:10.1002/humu.22765.
12. Agullo-Pascual, E.; Reid, D.A.; Keegan, S.; Sidhu, M.; Fenyö, D.; Rothenberg, E.; Delmar, M. Super-Resolution Fluorescence Microscopy of the Cardiac Connexome Reveals Plakophilin-2 inside the Connexin43 Plaque. *Cardiovasc Res* **2013**, *100*, 231–240, doi:10.1093/cvr/cvt191.
13. Cerrone, M.; Delmar, M. Desmosomes and the Sodium Channel Complex: Implications for Arrhythmogenic Cardiomyopathy and Brugada Syndrome. *Trends Cardiovasc Med* **2014**, *24*, 184–190, doi:10.1016/j.tcm.2014.02.001.
14. Oxford, E.M.; Musa, H.; Maass, K.; Coombs, W.; Taffet, S.M.; Delmar, M. Connexin43 Remodeling Caused by Inhibition of Plakophilin-2 Expression in Cardiac Cells. *Circ Res* **2007**, *101*, 703–711, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.154252.
15. Kim, J.-C.; Pérez-Hernández, M.; Alvarado, F.J.; Maurya, S.R.; Montnach, J.; Yin, Y.; Zhang, M.; Lin, X.; Vasquez, C.; Heguy, A.; et al. Disruption of Ca²⁺ Homeostasis and Connexin 43 Hemichannel Function in the Right Ventricle Precedes Overt Arrhythmogenic Cardiomyopathy in Plakophilin-2-Deficient Mice. *Circulation* **2019**, *140*, 1015–1030, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039710.
16. Generation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Cellular Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy | European Heart Journal | Oxford Academic Available online: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/34/15/1122/469574> (accessed on 4 May 2023).
17. Garcia-Gras, E.; Lombardi, R.; Giocondo, M.J.; Willerson, J.T.; Schneider, M.D.; Khoury, D.S.; Marian, A.J. Suppression of Canonical Wnt/Beta-Catenin Signaling by Nuclear Plakoglobin Recapitulates Phenotype of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 2012–2021, doi:10.1172/JCI27751.

18. Chen, S.N.; Gurha, P.; Lombardi, R.; Ruggiero, A.; Willerson, J.T.; Marian, A.J. The Hippo Pathway Is Activated and Is a Causal Mechanism for Adipogenesis in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circ Res* **2014**, *114*, 454–468, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302810.
19. Lombardi, R.; Chen, S.N.; Ruggiero, A.; Gurha, P.; Czernuszewicz, G.Z.; Willerson, J.T.; Marian, A.J. Cardiac Fibro-Adipocyte Progenitors Express Desmosome Proteins and Preferentially Differentiate to Adipocytes Upon Deletion of the Desmoplakin Gene. *Circ Res* **2016**, *119*, 41–54, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.308136.
20. Sommariva, E.; Brambilla, S.; Carbucicchio, C.; Gambini, E.; Meraviglia, V.; Dello Russo, A.; Farina, F.M.; Casella, M.; Catto, V.; Pontone, G.; et al. Cardiac Mesenchymal Stromal Cells Are a Source of Adipocytes in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *European Heart Journal* **2016**, *37*, 1835–1846, doi:10.1093/eurheartj/ehv579.
21. Maione, A.S.; Stadiotti, I.; Pilato, C.A.; Perrucci, G.L.; Saverio, V.; Catto, V.; Vettor, G.; Casella, M.; Guarino, A.; Polvani, G.; et al. Excess TGF- β 1 Drives Cardiac Mesenchymal Stromal Cells to a Pro-Fibrotic Commitment in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 2673, doi:10.3390/ijms22052673.
22. Pilato, C.A.; Stadiotti, I.; Maione, A.S.; Saverio, V.; Catto, V.; Tundo, F.; Dello Russo, A.; Tondo, C.; Pompilio, G.; Casella, M.; et al. Isolation and Characterization of Cardiac Mesenchymal Stromal Cells from Endomyocardial Biopsy Samples of Arrhythmogenic Cardiomyopathy Patients. *J Vis Exp* **2018**, 57263, doi:10.3791/57263.
23. Kim, C.; Wong, J.; Wen, J.; Wang, S.; Wang, C.; Spiering, S.; Kan, N.G.; Forcales, S.; Puri, P.L.; Leone, T.C.; et al. Studying Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia with Patient-Specific iPSCs. *Nature* **2013**, *494*, 105–110, doi:10.1038/nature11799.
24. Giacomelli, E.; Meraviglia, V.; Campostrini, G.; Cochrane, A.; Cao, X.; Helden, R.W.J. van; Garcia, A.K.; Mircea, M.; Kostidis, S.; Davis, R.P.; et al. Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-Cardiomyocyte Contributions to Heart Disease. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 862-879.e11, doi:10.1016/j.stem.2020.05.004.
25. Maione, A.S.; Faris, P.; Iengo, L.; Catto, V.; Bissoni, L.; Lodola, F.; Negri, S.; Casella, M.; Guarino, A.; Polvani, G.; et al. Ca²⁺ Dysregulation in Cardiac Stromal Cells Sustains Fibro-Adipose Remodeling in Arrhythmogenic Cardiomyopathy and Can Be Modulated by Flecainide. *Journal of Translational Medicine* **2022**, *20*, 522, doi:10.1186/s12967-022-03742-8.
26. Sommariva, E.; Stadiotti, I.; Casella, M.; Catto, V.; Dello Russo, A.; Carbucicchio, C.; Arnaboldi, L.; De Metrio, S.; Milano, G.; Scopece, A.; et al. Oxidized LDL-Dependent Pathway as New Pathogenic Trigger in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *EMBO Mol Med* **2021**, *13*, e14365, doi:10.15252/emmm.202114365.