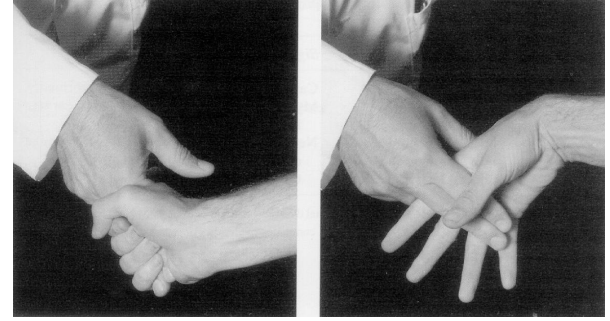
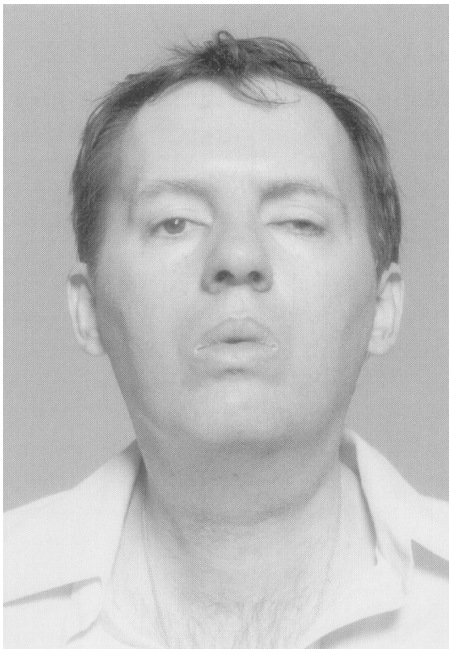


Distrofie Miotoniche — modelli cellulari

**Modellizzazione del battito cardiaco instabile:
cardiomiociti hiPSC-derivati come piattaforma
per il rischio di morte improvvisa nel DM1**

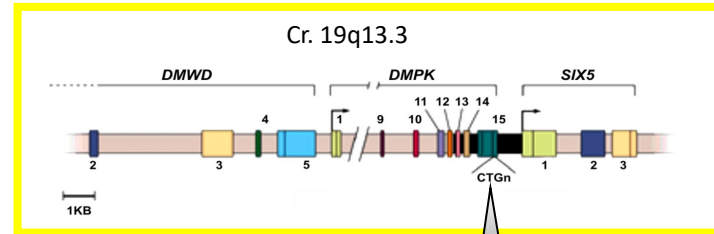
Giuseppe Novelli

**Università di Roma Tor Vergata
Fondazione Lorenzini (Italia-USA)**



Myotonic dystrophy

1992: identification of an unstable trinucleotide sequence [CTG]_n in the 3'UTR region of the *DMPK* gene on chromosome 19q13.3

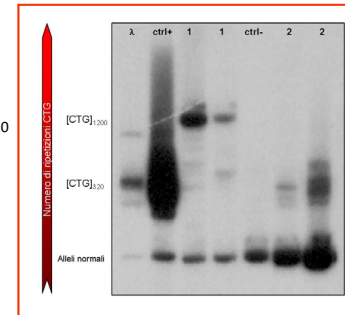


Normal (5-30)

5-36 repetitions: **normal alleles**
37-50 repetitions: **pre-mutation**
50-150 repetitions: **class E1**
150-1000 repetitions: **class E2**
1000 - >4000 repetitions: **class E3**

Brook et al, 1992;
Mahadevan et al., 1992

Expansions > 50



Il cuore nella Distrofia Miotonica di tipo 1 (80%)

DM1: malattia multisistemica autosomica dominante da espansione (CTG)_n nel gene *DMPK*.

Il coinvolgimento cardiaco è la seconda causa di morte e spesso precede i sintomi muscolari.

- Difetti di conduzione progressivi (blocchi AV, His-Purkinje)
- Tachiaritmie ventricolari, prolungamento del QT, fenotipo Brugada
- Cardiomiopatia dilatativa
- Splicing aberrante di *SCN5A* (Nav1.5) → substrato aritmogeno

Hiromasa 1998; Nguyen 1998; Wahbi 2013; Pambrun 2014.

Morte cardiaca improvvisa (SCD)

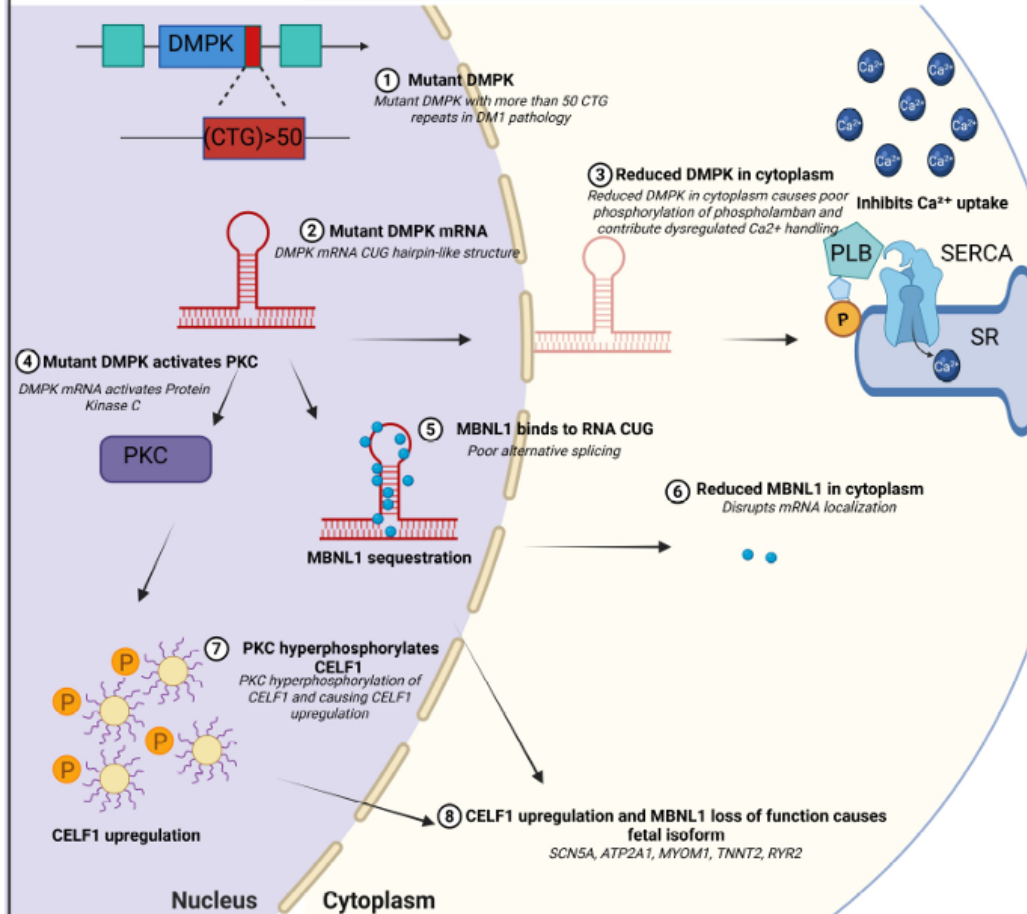
Rischio non predetto dalla sola dimensione dell'espansione; manca un modello cellulare umano per la stratificazione del rischio. (30%)

La domanda

Possiamo ricapitolare in vitro il fenotipo elettrico e meccanico del cardiomiocita DM1 per valutarne il rischio aritmogeno?



Pathogenesis of Myotonic Dystrophy type 1



Clinical outcomes

Diastolic dysfunction, slowed relaxation, conduction defects, and predisposition to arrhythmias

Impaired relaxation, myocardial contractile dysfunction, heart failure susceptibility, and arrhythmogenesis

Enhanced arrhythmogenicity (ventricular tachyarrhythmias), diastolic Ca^{2+} waves, and sudden death risk

Conduction delays, atrial and ventricular arrhythmias, and increased risk of sudden cardiac death

Limiti dei modelli attuali

Topi DMPK-KO e modelli MBNL non riproducono il fenotipo elettrofisiologico umano; il tessuto cardiaco è accessibile solo post-mortem.

Vantaggio hiPSC

Cardiomiociti paziente-specifici che battono in vitro, con genotipo DM1 nativo e ripetizione (CTG)exp conservata.

Obiettivo

Caratterizzare morfologia, elettrofisiologia (patch-clamp), risposta ai farmaci e biomeccanica (AFM) di CMs DM1 vs WT.

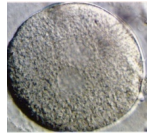
4 linee hiPSC (2 DM1: X1, Y2 — 2 WT: S3, T4); 12 cloni CM per genotipo, sempre confrontati per ridurre la variabilità cellula-cellula.



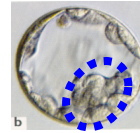
Biomedical applications of hPSCs

Human Embryonic Stem Cells

(Thomson et al., 1998)



*In vitro
fertilization*

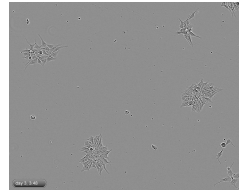


Inner cell mass

Human Induced Pluripotent Stem Cells

Stem Cells

(Takahashi et al., 2007)



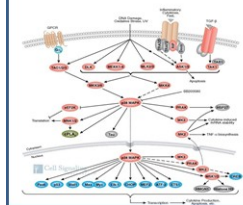
Self renew

Pluripotency

Cell
Therapy



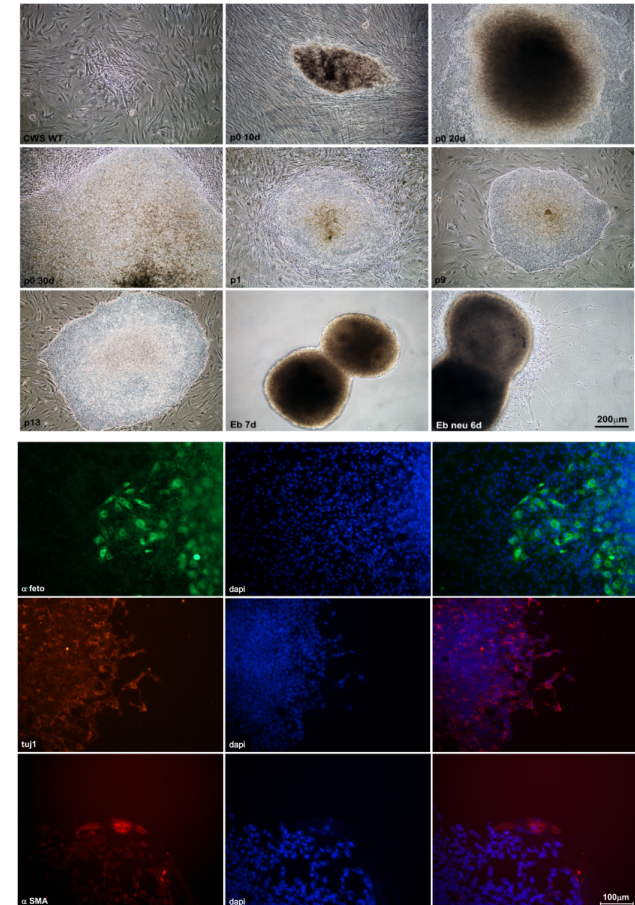
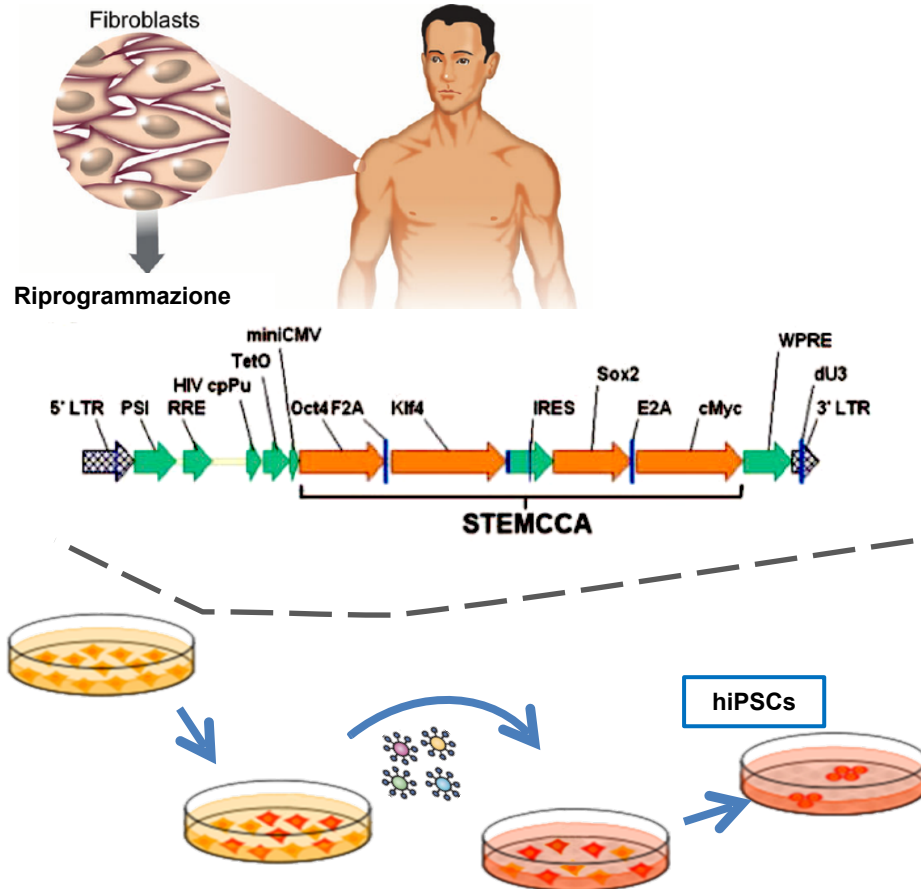
Disease modeling



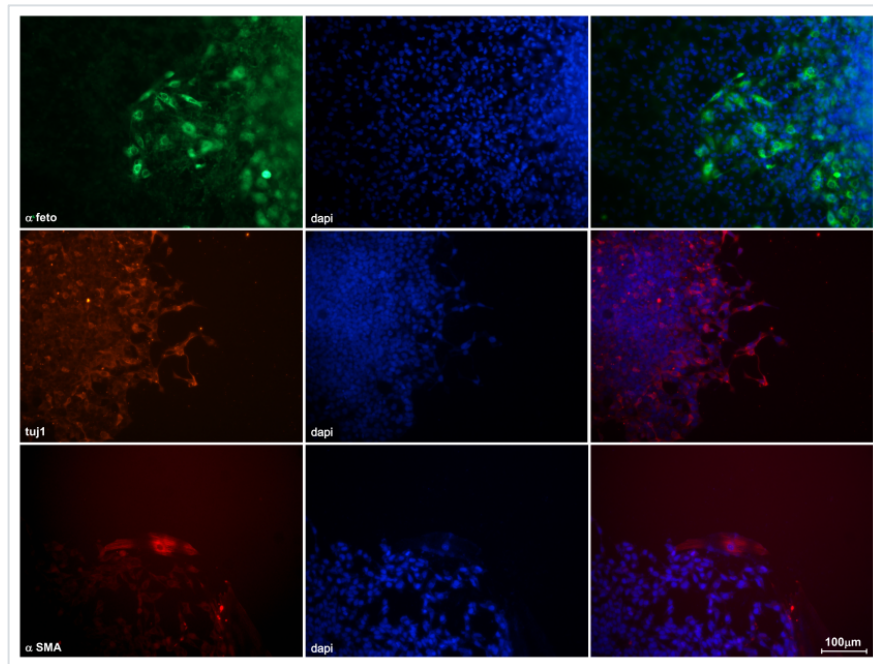
Drug
Discovery



Distrofie Miotoniche: modelli cellulari



Dalla biopsia cutanea al cardiomiocita battente



Riprogrammazione hSTEMCCA-loxP (OCT4/SOX2/KLF4/cMYC).

1 • Fibroblasti (HDF)

Biopsia cutanea da pazienti DM1 e controlli WT, sesso/età appaiati.

2 • hiPSC

Cassetta lentivirale policistronica; stemness confermata (OCT4, NANOG, SOX2, REX-1).

3 • Differenziamento cardiaco

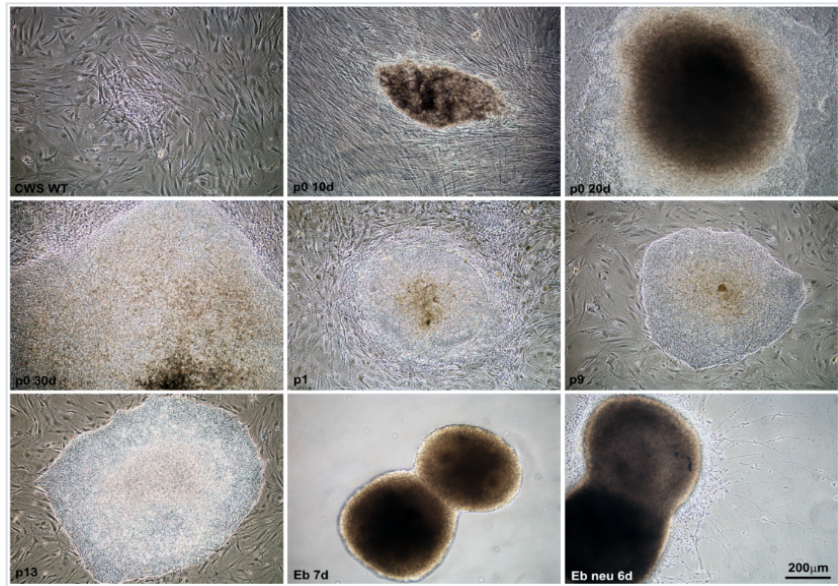
Corpi embrioidi → cardiomiociti battenti; marcatori BRA, MESP1, NKX2.5, TBX5, MYH6, TNNT2.

4 • CMs ventricolari

Selezione APD90/APD50 < 1.4 per le analisi elettrofisiologiche.



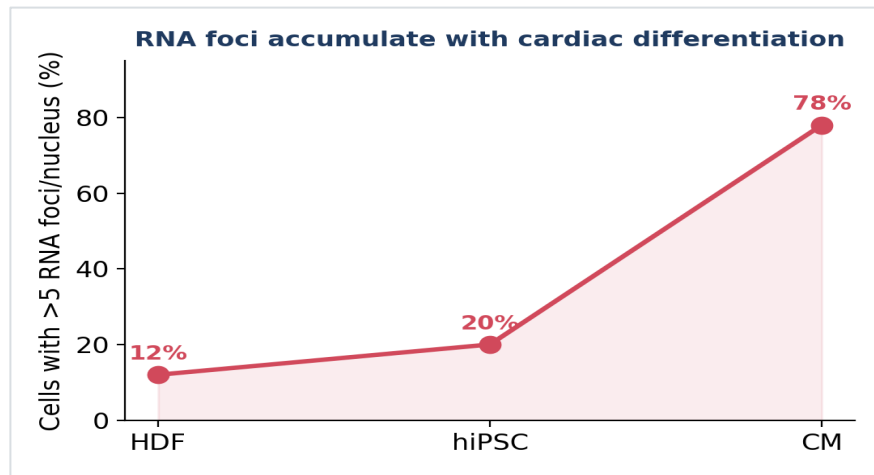
I CMs DM1 conservano i marcatori molecolari di malattia



Foci RNA (CUG)_{exp} in CMs cTnT+/MLC2v+; nessun focus nei WT.

Splicing adulto→fetale di **TNNT2**, **MBNL1/2**, **SCN5A**; espansione (CTG) che cresce HDF→CM.

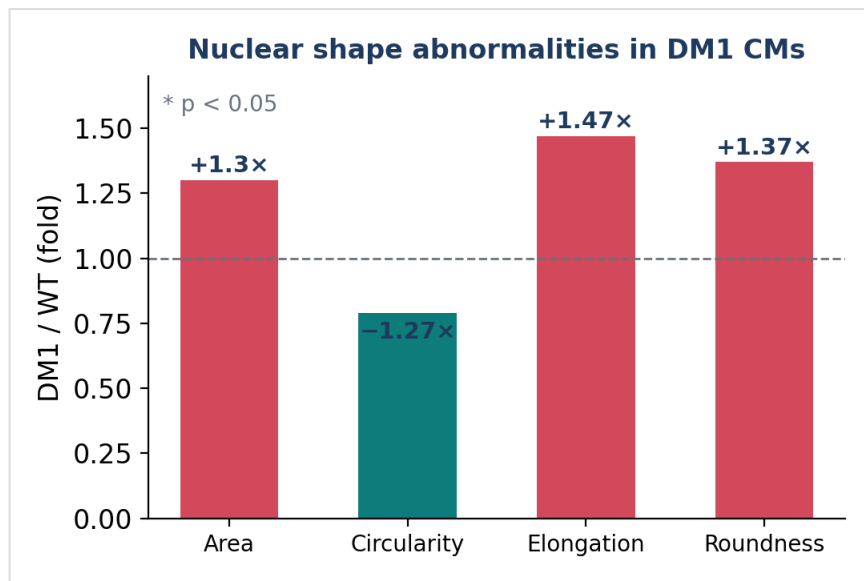
Foci intranucleari, splicing fetale e instabilità della ripetizione



Solo nei CMs DM1 (non in HDF/hiPSC):

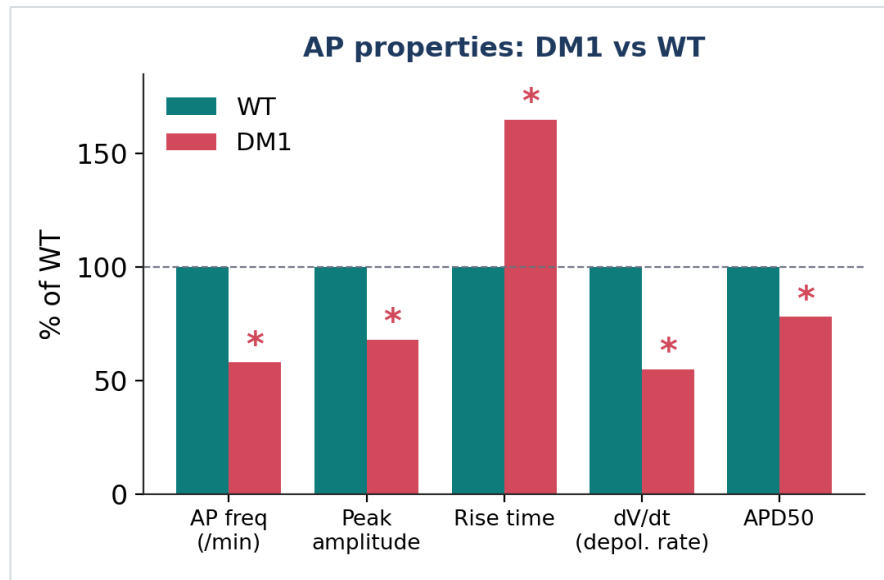
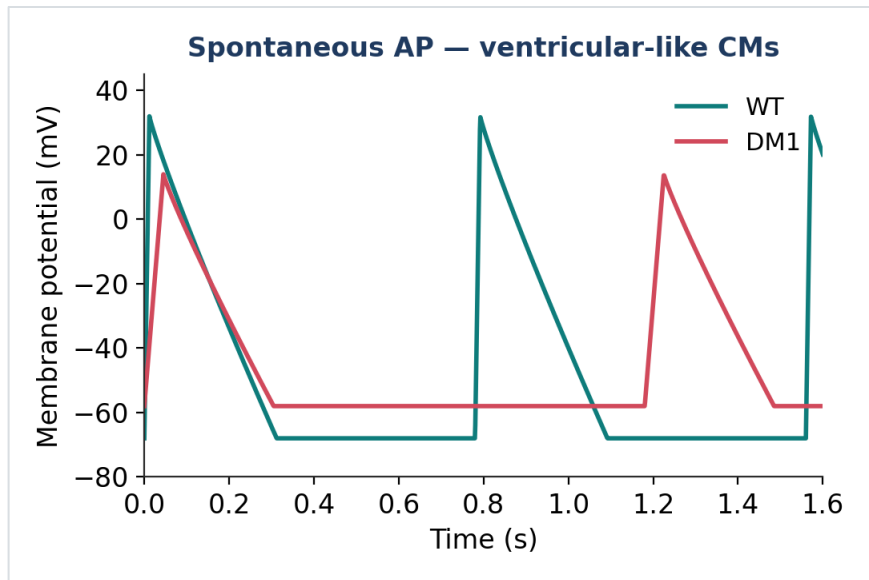
- Irregolarità nucleari significative (** $p < 0.01$)
- Area +1.3x, Elongazione +1.47x, Roundness +1.37x; Circolarità -1.27x
- Accumulo intranucleare di **Prelamina A** e rapporto *lamina A/C* alterato

Il difetto della lamina collega la tossicità da RNA all'architettura nucleare e alla vulnerabilità meccanica del cardiomiocita.



ImageJ; n=3 esperimenti indipendenti; * $p < 0.05$.





CMs ventricolari DM1: frequenza AP ridotta ($p < 0.001$), MDP/soglia depolarizzati, ampiezza e dV/dt ridotti, rise-time aumentato, APD50/APD90 ridotti.

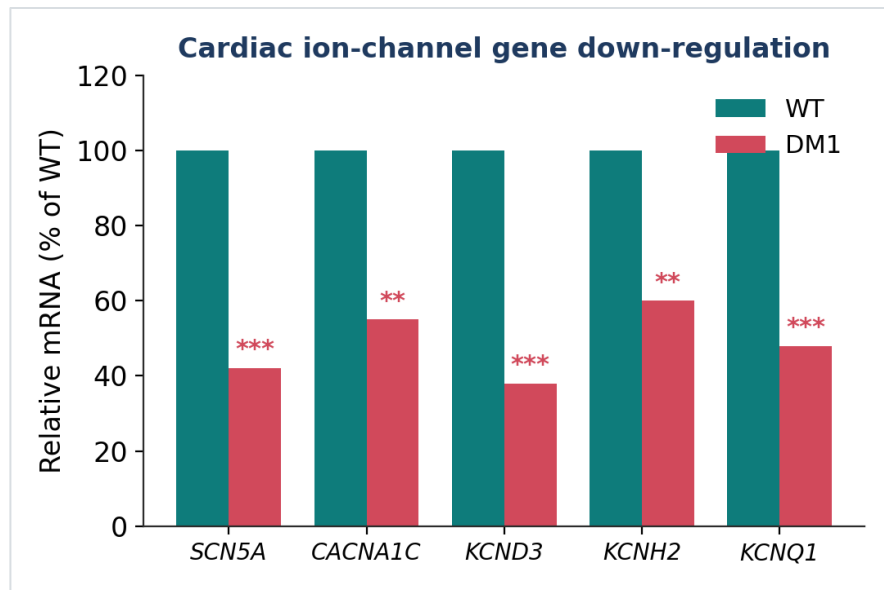
Un profilo coerente con ridotta corrente al sodio (Nav1.5) e predisposizione ad anomalie di conduzione.



Riduzione significativa in CMs DM1 (RT-qPCR, n=12/genotipo):

- **SCN5A** – canale del sodio Nav1.5 (***)
p<0.001)
- **CACNA1C** – canale del calcio Cav1.2 (**)
p<0.01)
- **KCND3, KCNH2, KCNQ1** – canali del potassio
- Aumentato rapporto isoforma *fetale/adulta* di *SCN5A* (spliceopatia).

La riduzione coordinata delle correnti depolarizzanti e ripolarizzanti genera un substrato elettrico instabile.



GAPDH come riferimento; media $\pm$ SEM.

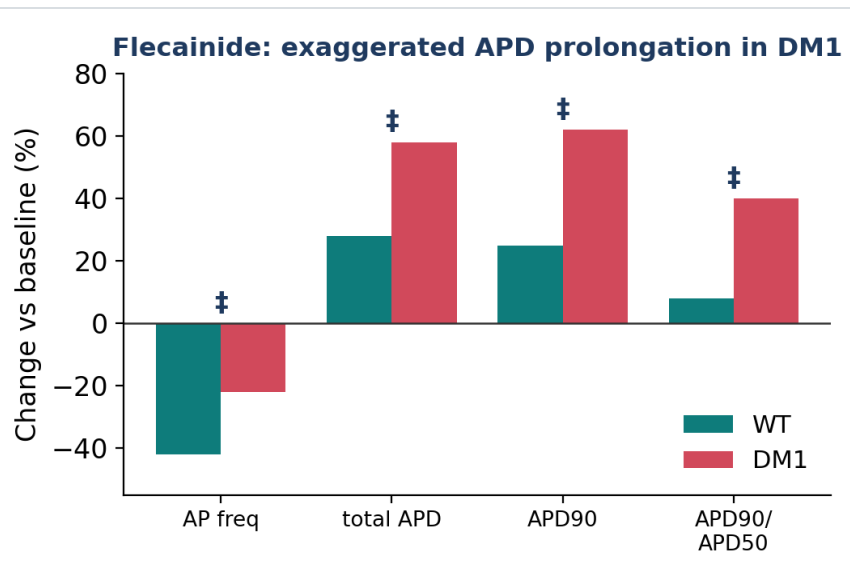


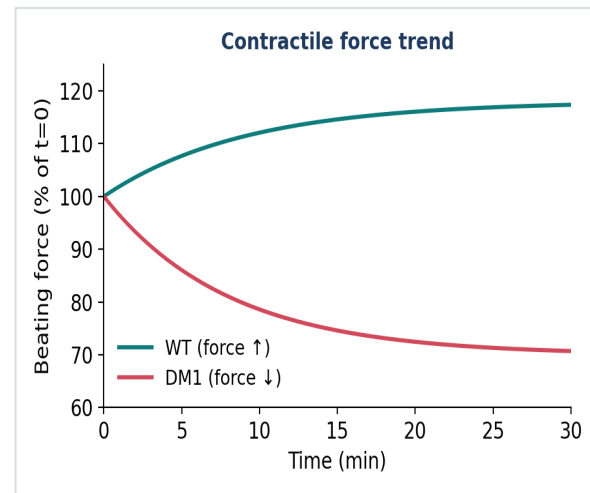
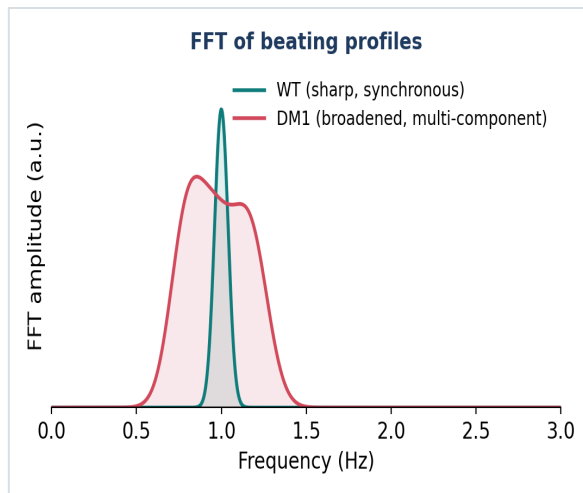
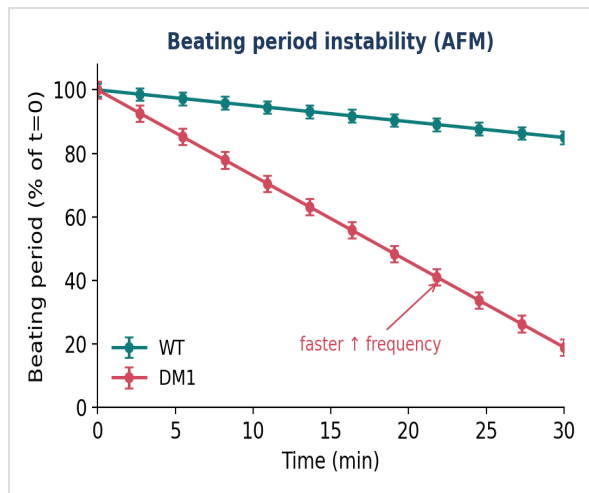
Ranolazina: riduce frequenza, ampiezza e APD totale in entrambe le popolazioni, senza differenze WT vs DM1.

Flecainide (bloccante Nav1.5):

- Minore riduzione di frequenza nei DM1 ($p < 0.01$)
- Prolungamento di APD totale, APD90 e APD90/APD50 marcatamente maggiore nei DM1 ($p < 0.01$)
- Riduzione di ampiezza/potenziale di picco solo nei DM1

Lo smascheramento farmacologico evidenzia la fragilità elettrica DM1 — rilevante per la sicurezza terapeutica.





Microscopia a forza atomica (AFM) sui cluster battenti:

DM1 — accorciamento più rapido del periodo (frequenza crescente), picchi FFT allargati (battito asincrono, multi-componente) e forza contrattile in calo nel tempo, all'opposto dei WT.

AFM: >75% dei tracciati DM1 vs >68% WT.



Un modello integrato del rischio aritmogeno nel DM1

(CTG)exp · foci RNA

Sequestro di MBNL,
spliceopatia

Canali ionici ↓

SCN5A/CACNA1C/Kv ridotti,
isoforme fetali

AP anomalo

Frequenza ↓,
depolarizzazione ↓,
conduzione fragile

Battito instabile

Periodo e forza variabili,
desincronizzazione (AFM)

Esito → substrato per aritmie ventricolari e cardiomiopatia dilatativa — i meccanismi alla base del rischio di morte cardiaca improvvisa nel DM1.



I cardiomiociti hiPSC-derivati DM1 ricapitolano il fenotipo cardiaco umano

- Conservano foci RNA, spliceopatia e instabilità della ripetizione lungo il differenziamento
- Mostrano AP alterato, down-regolazione dei canali ionici e anomalie nucleari/lamina A/C
- Rivelano instabilità del periodo e della forza di battito (AFM) e risposta farmacologica alterata

Piattaforma in vitro per la valutazione del rischio di SCD

- Stratificazione del rischio, screening di sicurezza farmacologica e terapie paziente-tailored
- Identificazione di nuovi biomarcatori del coinvolgimento cardiaco

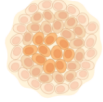
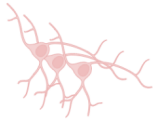
Messaggio chiave

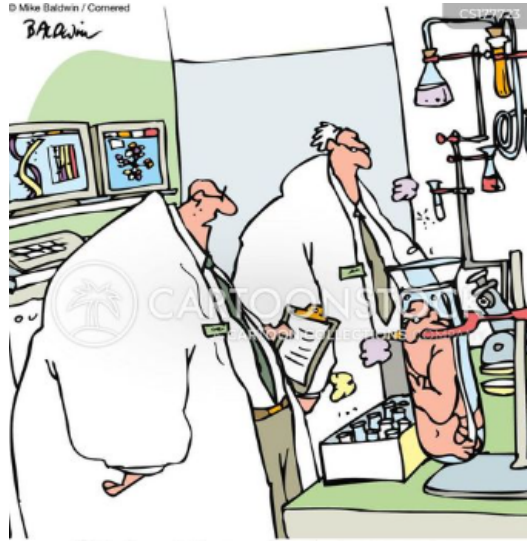
“Man mano che il cardiomiocita esce dal ciclo cellulare, i foci e la spliceopatia si accumulano: il battito diventa instabile.”

Un modello vivo del rischio aritmico nel DM1.



20 years of progress toward multi-lineage hPSC-derived DM1 platforms

		CTG expansion	Foci	MBNL1/2 sequestration	reported splice defects	
	pluripotent stem cells 	YES	YES	No	No	Kim et al., JCI insight 2019; Mondragon-Gonzales et al., Dis. Model. Mech. 2018; Wang et al., Molecules 2018
→	Cardiomyocytes 	YES	YES	YES	SCN5A ex5 TNNT2 ex5	Spitalieri et., J. Mol. Cell. Cardiol. 2018; Kim et al., JCI insight 2019; Poulin et al., Sci. Rep. 2021
→	MSC 	YES	YES	YES	INSR ex11 ATP2A1 ex22	Laustriat et al., Mol. Ther. Nucleic. Acids. 2015; Muary et al., iScience 2019
→	Myoblasts/ Myotubes 	YES	YES	YES	DMD ex78 Bin Ex11	Dastidar et al., Nucleic Acids Res. 2018; Kawada et al., Sci. Rep. 2023; Merien et al., Hum. Mol. gen. 2021
→	Motor neurons 	YES	YES	YES	DMD ex78 Bin Ex11	Marteyn et al., Cell Stem Cell 2011; Tahraoui et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2023
→	Cortical neurons 	YES	YES	YES	MBNL2 ex5 MATP ex2	Xia et al., Stem Cells 2015; Gao et al., Molecules 2016; Xia et al., Cell. Reprogram. 2013



"Nobody's perfect, but we're working on it."

⇒ Non si tratta di un modello "migliore", ma i sistemi derivati da hPSC consentono l'esplorazione di aspetti della DM1 precedentemente inaccessibili.

Grazie per l'attenzione

Gruppo di Genetica Medica — Università di Roma Tor Vergata

P. Spitalieri, R.V. Talarico, M. Murdocca, A. Botta, F. Sangiuolo; S. Caioli, C. Zona (IRCCS S. Lucia); R. Mango; M. Girasole, S. Dinarelli, G. Longo (CNR-ISM).

Spitalieri et al., J Mol Cell Cardiol 2018;118:95–109. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.03.012

European Union—Next Generation EU—NRRP M6C2—Investment 2.1 Enhancement and strengthening of biomedical research in the PNRR: (GEPINDM project code PNRR-MR1-2022-12375877).



Malattia e patogenesi

DM1 — distrofia miotonica di tipo 1

DMPK — Dystrophia Myotonica–Protein Kinase (gene)

(CTG)n · (CUG)n — espansione ripetuta nel DNA / RNA

3'UTR — regione 3' non tradotta del trascritto

foci — aggregati ribonucleari di (CUG)exp

MBNL1/2 — muscleblind-like 1/2 (fattori di splicing)

CELF1 (CUGBP1) — CUG-binding protein 1

spliceopatia — shift di splicing adulto→fetale

SCD — morte cardiaca improvvisa

Cellule e differenziamento

hPSC · hESC — staminali pluripotenti / embrionali umane

hiPSC — staminali pluripotenti indotte umane

CMs · hiPSC-CMs — cardiomiociti (hiPSC-derivati)

WT — wild type (controllo sano)

HDFs — fibroblasti dermici umani

EB — corpo embrioide

STEMCCA — cassetta lentivirale di riprogrammazione

cTnT · TNNT2 — troponina T cardiaca (proteina / gene)

MLC2v — catena leggera miosina ventricolare

Elettrofisiologia e metodi

AP — potenziale d'azione

APD50 · APD90 — durata dell'AP al 50% / 90%

MDP — potenziale diastolico massimo

dV/dt — velocità di depolarizzazione (upstroke)

INa · IK — corrente al sodio / potassio

SCN5A · CACNA1C — canali Na⁺ (Nav1.5) / Ca²⁺ (Cav1.2)

KCNH2 · KCNQ1 · KCND3 — canali del K⁺

AFM · FFT — forza atomica / trasformata di Fourier

RT-qPCR — PCR quantitativa (GAPDH rif.; SEM)

