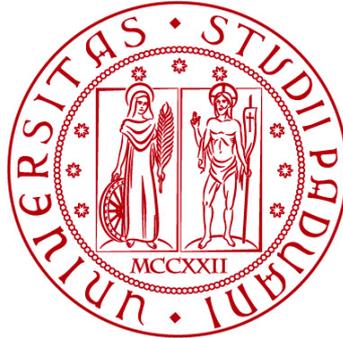


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**Caratterizzazione di cellule epicardiche e fibroblasti
cardiaci differenziati da hiPSCs portatrici di una
variante patogena nel gene DSP, associata alla
cardiomiopatia aritmogena**

Relatore: Prof.ssa Alessandra Rampazzo
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott.ssa Martina Calore
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott.ssa Claudia Vittoria Olmeda
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Beatrice Lugato

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Le cardiomiopatie.....	3
1.2 La cardiomiopatia aritmogena.....	3
1.2.1 Epidemiologia	4
1.2.2 Manifestazioni cliniche	4
1.2.3 Diagnosi	5
1.2.4 Trattamento	6
1.3 Genetica della cardiomiopatia aritmogena.....	7
1.4 I dischi intercalari.....	8
1.5 La patogenesi	10
1.6 Modelli di studio	16
2. SCOPO DELLO STUDIO	18
3. MATERIALI E METODI	19
3.1 hiPSCs	19
3.1.1 Preparazione del coating	19
3.1.2 Scongellamento	19
3.1.3 Mantenimento delle hiPSCs.....	19
3.1.4 Splitting	20
3.1.5 Congelamento	20
3.2 Differenziamento delle hiPSCs in cellule epicardiche.....	20
3.3 Differenziamento delle cellule epicardiche in fibroblasti cardiaci	22
3.4 Estrazione dell'RNA	23
3.5 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA	24
3.6 Disegno dei primers	24
3.7 Gradient PCR	25
3.8 qPCR	26
3.9 Immunofluorescenza	29
3.10 Analisi statistiche	30
4. RISULTATI	32
4.1 Differenziamento di hiPSCs in cellule epicardiche	32
4.1.1 Analisi di proteine <i>markers</i> di cellule epicardiche e di proteine dei dischi intercalari mediante immunofluorescenza.....	33

4.1.2 Valutazione dell'espressione di geni <i>markers</i> di cellule epicardiche, di geni desmosomali e di geni <i>markers</i> di altri tipi cellulari mediante Real-Time PCR.....	37
4.2 Differenziamento di hiPSCs-EPI in fibroblasti cardiaci	40
4.2.1 Analisi di proteine <i>markers</i> di fibroblasti cardiaci e di proteine dei dischi intercalari mediante immunofluorescenza.....	41
4.2.2 Valutazione dell'espressione di geni <i>markers</i> di fibroblasti cardiaci, di geni desmosomali e di geni <i>markers</i> di altri tipi cellulari mediante Real-Time PCR.....	44
5. DISCUSSIONE.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	56

ABSTRACT

La cardiomiopatia aritmogena è una malattia genetica rara, caratterizzata dalla morte dei cardiomiociti e sostituzione del miocardio con tessuto fibro-adiposo. Le alterazioni che ne derivano possono portare ad aritmie ventricolari che conducono a morte cardiaca improvvisa. La maggior parte delle varianti patogene associate alla malattia si trova in geni codificanti proteine dei dischi intercalari.

In questo progetto di tesi, si è proceduto al differenziamento, e successivamente alla caratterizzazione, di cellule epicardiche e fibroblasti cardiaci, a partire da cellule staminali pluripotenti indotte ottenute da un paziente, che porta una variante non senso p.Q273* nel gene codificante per la proteina desmoplachina. Parallelamente, sono stati differenziati e analizzati i rispettivi controlli isogenici.

L'efficacia del differenziamento è stata verificata tramite analisi di qPCR, che hanno confermato l'espressione dei marcatori epicardici *WT1*, *TBX18* e *TCF21* in hiPSCs-EPI e l'espressione dei marcatori dei fibroblasti *VIM*, *COL1A1*, *COL3A1* e *GATA4* in hiPSCs-CFs. Inoltre, è stata osservata l'espressione dei geni dei dischi intercalari *DSP*, *JUP* e *CX43* in entrambi i tipi cellulari e l'espressione del gene desmosomale *DSG2* in hiPSCs-EPI.

Le analisi di immunofluorescenza hanno confermato la presenza dei *markers* di differenziamento e chiarito la localizzazione delle proteine dei dischi intercalari in hiPSCs-EPI e hiPSCs-CFs.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le cardiomiopatie

Le cardiomiopatie rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie del miocardio, caratterizzate dall'alterazione delle funzioni elettriche e meccaniche, che porta alla compromissione della normale fisiologia cardiaca (1).

La Società Europea di Cardiologia classifica le cardiomiopatie, in base al loro fenotipo, in: dilatativa, ipertrofica, restrittiva e aritmogena del ventricolo destro. Le cardiomiopatie, inoltre, possono essere di tipo familiare o non familiare. Si parla di forme "familiari" quando nella stessa famiglia si riconoscono più casi di persone affette, e di forme "non familiari" quando non è presente una storia clinica familiare rilevante (1).

Le manifestazioni cliniche di queste patologie possono essere molto variabili. Tra gli affetti si riconoscono soggetti completamente asintomatici, soggetti con disfunzioni moderate o gravi e individui nei quali si verifica un'insufficienza cardiaca seguita da morte improvvisa; quest'ultimo scenario si riscontra in particolar modo nei giovani adulti. Tutte le cardiomiopatie sono associate a problemi sanitari legati ad alti tassi di morbilità, mortalità e necessità di cure cliniche (2).

1.2 La cardiomiopatia aritmogena

La cardiomiopatia aritmogena (*arrhythmogenic cardiomyopathy*, ACM) è una malattia genetica rara caratterizzata dalla perdita di cardiomiociti e sostituzione con tessuto fibro-adiposo. La conseguente modifica dell'architettura miocardica può portare ad alterazioni nella funzione ventricolare, aritmie e morte cardiaca (3).

Nel 1736, data di pubblicazione del saggio *De Motu Cordis et Aneurysmatibus*, ad opera del medico Giovanni Maria Lancisi, venne riportato per la prima volta il caso di una famiglia in cui la malattia si era ripresentata in quattro generazioni. Tuttavia, la prima descrizione clinica completa della patologia si avrà soltanto nel 1982 mentre le caratteristiche elettrocardiografiche verranno descritte per la prima volta nel 1984. Da allora, la patologia è nota come importante causa di morte improvvisa in giovani adulti (3).

Inizialmente considerata conseguenza di un'anomalia nello sviluppo del miocardio del ventricolo destro, la malattia venne definita "displasia aritmogena del ventricolo destro". Il termine è stato sostituito successivamente con "cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro", ad evidenziare il carattere progressivo della patologia. La morte dei cardiomiociti, infatti, non è sintomo di uno sviluppo difettoso bensì un evento che si verifica principalmente dopo la nascita. Ad oggi, sono noti casi in cui la patologia colpisce il solo ventricolo sinistro o entrambi i ventricoli, pertanto, attualmente si utilizza il termine più generale di "cardiomiopatia aritmogena" (4).

1.2.1 Epidemiologia

La ACM, nella popolazione generale, ha una prevalenza compresa tra 1:1000 e 1:5000. Questi dati rappresentano una stima approssimativa poiché spesso l'espressività variabile e la penetranza incompleta che caratterizzano la patologia, la rendono difficilmente diagnosticabile. Frequentemente, inoltre, la prima manifestazione della malattia coincide con la morte cardiaca improvvisa e ciò contribuisce ad un'ulteriore complicazione della diagnosi (3).

La frequenza della patologia può presentare variazioni regionali; ad esempio, risulta essere particolarmente elevata nella regione Veneto e in generale nel Nord-Est d'Italia (5). La ACM colpisce più frequentemente individui di sesso maschile rispetto ad individui di sesso femminile, con un rapporto di circa 3:1 (2). Le possibili cause sono da ricercare nelle differenze fisiologiche, ormonali e di espressione genica, esistenti tra uomini e donne. Dall'analisi dei livelli ormonali sierici di 54 soggetti affetti da ACM, Adkiss et. al hanno evidenziato una correlazione tra valori elevati di testosterone e lo sviluppo di aritmie negli individui di sesso maschile. Per quanto riguarda le donne invece, bassi livelli di estradiolo risultano associati ad un aumentato rischio aritmico (6).

La penetranza della malattia sembra essere influenzata non solo da fattori genetici ma anche da fattori non genetici, suggerendo un'eziologia complessa e multifattoriale. Uno studio condotto su gemelli monozigotici ha evidenziato che nonostante ad uno dei due fratelli fosse stata diagnosticata la ACM in seguito ad episodi di tachicardie ventricolari, l'altro risultava completamente asintomatico, portando ad ipotizzare il coinvolgimento di altri fattori nello sviluppo della malattia (7). Gli elementi non genetici coinvolti nella determinazione del fenotipo patologico non sono ancora del tutto noti, ma tra questi è da tempo riconosciuto l'esercizio fisico come fattore rischio, in quanto implicato in un aumento della gravità della patologia e della probabilità di sviluppare aritmie ventricolari (4). Anche le infezioni, l'ipertensione, malattie polmonari croniche e altre patologie cardiovascolari sembrano influenzare la patogenesi della ACM; tuttavia, il ruolo che queste ultime ricoprono rimane ancora da delineare (8).

Solitamente, l'insorgenza della malattia si osserva tra la terza e la quarta decade di vita. Segni e sintomi, di norma, non appaiono prima della pubertà e dopo i 60 anni, sebbene, occasionalmente, la prima manifestazione clinica si verifichi in pazienti oltre i 70 anni d'età. In quest'ultimo caso, la sostituzione del miocardio con tessuto fibro-adiposo può essere confusa con un cambiamento fisiologico legato all'età, portando alla formulazione di una diagnosi errata (3).

1.2.2 Manifestazioni cliniche

L'espressione fenotipica della cardiomiopatia aritmogena è molto variabile. Tra i soggetti colpiti si riconoscono individui completamente asintomatici ma anche

soggetti che sviluppano aritmie ventricolari che possono essere fatali e portare a morte cardiaca improvvisa. Il sintomo clinico più comune della patologia sono le aritmie, che possono causare palpitazioni, sincopi e arresto cardiaco, in particolar modo durante l'esercizio fisico (5).

L'evoluzione naturale della cardiomiopatia aritmogena si articola in 4 fasi. La prima è definita "occulta" e contraddistinta dall'assenza di sintomi ed anomalie strutturali; possono già evidenziarsi delle alterazioni elettriche (2). Durante questo stadio la morte cardiaca improvvisa può rappresentare la prima manifestazione della malattia, in individui giovani asintomatici. La seconda fase, definita "manifesta", è caratterizzata da episodi di aritmie, in associazione con alterazioni strutturali e funzionali del ventricolo destro, evidenziabili con test di *imaging*. I pazienti potrebbero avere sintomi aritmici come palpitazioni, sincopi e arresto cardiaco. Durante la terza fase solitamente si verifica un'insufficienza del ventricolo destro mentre la funzionalità del ventricolo sinistro si mantiene relativamente intatta (5). Nello stadio finale della malattia, l'insufficienza cardiaca diventa biventricolare e si manifesta una severa disfunzione sistolica di entrambi i ventricoli (2). È bene evidenziare che, sebbene nella maggior parte dei casi la patologia interessi principalmente il ventricolo destro, una minoranza di pazienti presenta varianti fenotipiche caratterizzate da coinvolgimento precoce e talora prevalente del ventricolo sinistro (3).

1.2.3 Diagnosi

Nelle fasi iniziali della patologia la diagnosi può risultare difficoltosa a causa della natura non specifica dei risultati clinici: non esiste un unico *gold standard*, di conseguenza la strategia migliore consiste nel combinare le informazioni provenienti da diversi test diagnostici. Una parte consistente dei pazienti, inoltre, è quasi o del tutto asintomatica. In questi casi la malattia è identificabile soltanto nel caso in cui vengano svolti screening di familiari affetti o screening cardiovascolari di routine sulla popolazione generale (3).

I criteri diagnostici per la ACM sono stati pubblicati per la prima volta nel 1994 da una *Task Force* internazionale e comprendono: alterazioni strutturali e disfunzioni globali e/o regionali del ventricolo destro; alterazioni istopatologiche del ventricolo destro; alterazioni della ripolarizzazione; alterazioni della depolarizzazione; aritmie; storia familiare e analisi genetica (3). Queste caratteristiche possono essere indagate mediante ecocardiografie, elettrocardiogramma e biopsie (5). Per ciascun gruppo di alterazioni i criteri sono classificati in "maggiori" o "minori", a seconda della specificità per la malattia. La patologia viene diagnosticata nel caso in cui siano presenti due dei criteri maggiori, un criterio maggiore e due minori o quattro criteri minori (3).

Nel 2010 i criteri diagnostici sono stati aggiornati per ovviare ad alcune delle limitazioni dei parametri definiti precedentemente, tra cui la ridotta sensibilità

diagnostica e la scarsa attenzione al coinvolgimento del ventricolo sinistro nella patologia. La revisione ha portato all'inclusione delle nuove conoscenze e tecnologie, al fine di aumentare la sensibilità, mantenendo la specificità. Nonostante queste modifiche, una corretta diagnosi rimaneva ostacolata da altri fattori quali la comprensione parziale del background genetico, l'assenza di criteri diagnostici per fenotipi della malattia meno comuni e la mancanza di metodi per la caratterizzazione tissutale. È in questo contesto che un gruppo interdisciplinare della Scuola di Medicina dell'Università di Padova ha proposto i *Padua Criteria*, introducendo ulteriori elementi diagnostici che tengano in considerazione l'espressione variabile della malattia. Il team ha evidenziato, inoltre, la possibilità di utilizzare la Risonanza Magnetica Cardiaca con Contrasto (CE-CMR) al fine di rilevare un'eventuale sostituzione dei cardiomiociti con tessuto fibro-adiposo. La CE-CMR consiste in una tecnica di *imaging* avanzata basata sull'utilizzo di un agente di contrasto, spesso a base di gadolino, che viene assorbito diversamente da tessuti normali rispetto a tessuti danneggiati e permette quindi di identificare la presenza di eventuali danni miocardici (9).

1.2.4 Trattamento

Ad oggi, l'obiettivo del trattamento per la ACM è quello di prevenire la morte cardiaca improvvisa. Tale fine, può essere perseguito mediante cambiamento dello stile di vita, somministrazione di trattamenti farmacologici, interventi di ablazione transcatetere, l'impianto di un defibrillatore cardiaco impiantabile (ICD) e, in ultima istanza, eseguendo un trapianto cardiaco.

Per quanto riguarda lo stile di vita, è stato evidenziato che l'aumento dell'attività simpatica e lo stiramento dei ventricoli che si verificano durante l'attività sportiva, innescano aritmie che possono portare alla morte cardiaca improvvisa. Inoltre, l'eccessivo stress meccanico cardiaco, durante competizioni e allenamenti, può aggravare la lesione del miocardio e quindi accelerare la progressione della malattia (3). È per questi motivi, che ai pazienti con ACM viene sconsigliata la partecipazione ad attività sportive agonistiche (5). A fini preventivi, la pratica di attività fisica intensa dovrebbe essere evitata anche da portatori sani della patologia, soprattutto se presenti casi di morte improvvisa in famiglia.

Il trattamento farmacologico comprende farmaci β -bloccanti e antiaritmici. I farmaci β -bloccanti, in virtù del loro effetto anti-adrenergico, riducono il rischio di aritmie ventricolari indotte dall'esercizio fisico e ostacolano la progressione della malattia miocardica abbassando il carico ventricolare. Tra i farmaci antiaritmici, sotalolo e amiodarone, risultano essere i più efficaci, avendo un rischio pro-aritmico relativamente basso. Tuttavia, la terapia a lungo termine con amiodarone dev'essere evitata a causa del suo effetto tossico a livello extracardiaco.

L'impianto di un ICD risulta essere la strategia terapeutica migliore in pazienti con tachicardia ventricolare sostenuta e precedenti di arresto cardiaco. È invece

sconsigliato per pazienti asintomatici e portatori del gene, a causa dell'elevato *rate* di complicanze elettriche e meccaniche e dell'impatto significativo sulla qualità della vita.

I pazienti con insufficienza cardiaca vengono trattati con farmaci diuretici, ACE inibitori e anticoagulanti. Il trapianto cardiaco rappresenta l'ultima risorsa per la gestione dei casi di insufficienza cardiaca e aritmie ventricolari non trattabili (3).

1.3 Genetica della cardiomiopatia aritmogena

Le prime evidenze di una base genetica per la ACM derivano dall'osservazione di più soggetti affetti in una stessa famiglia. Intorno agli anni 2000, nell'isola greca di Naxos, sono stati analizzati individui con una forma di ACM associata ad una sindrome cardiocutanea. Oltre a manifestazioni cardiache, penetranti al 100% a partire dall'adolescenza, i soggetti manifestavano cheratoderma e capelli lanosi sin dall'infanzia. Successive analisi di linkage hanno permesso di mappare il *locus* malattia sul cromosoma 17q21 e la mutazione causale è stata identificata in una delezione di 2 coppie di basi (2057del2), presente in omozigosi, nel gene JUP, codificante la proteina placoglobina. La placoglobina è una componente dei desmosomi, giunzioni intercellulari abbondanti a livello del muscolo cardiaco e degli epitelii. Parallelamente, in una famiglia dell'Ecuador, è stata identificata un'altra condizione cutanea simile alla malattia di Naxos: la sindrome di Carvajal, nella quale le manifestazioni cardiache coinvolgono principalmente il ventricolo sinistro e portano a cardiomiopatia dilatativa. L'aspetto interessante è che anche in questo caso, analisi di linkage hanno rivelato come gene causativo un gene desmosomale, in particolare DSP, codificante la proteina desmoplachina. In seguito a questa scoperta, mediante un approccio di *Candidate Gene Sequencing*, sono state identificate mutazioni causative in altri geni desmosomali: PKP2, codificante la proteina placofilina-2; DSG2, codificante la proteina desmogleina-2; e DSC2, codificante la proteina desmocollina-2 (3,4).

I cardiomiociti sono connessi meccanicamente ed elettricamente da giunzioni chiamate "dischi intercalari". In pazienti affetti, il sequenziamento di geni codificanti proteine che compongono queste strutture ha portato alla scoperta di ulteriori mutazioni coinvolte nella ACM. In particolar modo queste interessano i geni CDH2, codificante la caderina 2; CTNNA3, codificante la catenina $\alpha 3$; TJP1, codificante la proteina zonula occludens-1; e SCN5A, codificante la subunità alfa di tipo 5 della proteina del canale del sodio (4).

Sebbene le mutazioni in geni codificanti proteine che compongono le giunzioni tra cardiomiociti siano le più frequenti in pazienti affetti da ACM, sono state identificate varianti patogene associate alla malattia anche in geni coinvolti in altre funzioni, tra cui il mantenimento dell'architettura citoscheletrica, la regolazione del metabolismo del calcio, il trasporto del sodio e il *signaling* mediato dalle citochine. In particolare, i geni interessati sono i geni codificanti il recettore della rianodina 2

(RYR2) e il fosfolambano (PLN), coinvolti nella regolazione della concentrazione di calcio intracellulare; il fattore di crescita trasformante $\beta 3$ (TGF $\beta 3$); la desmina (DES); la titina (TTN), proteina abbondante a livello muscolare; la lamina A (LMNA), che forma la lamina nucleare; e la proteina transmembrana 43 (TMEM 43), implicata nell'organizzazione della membrana nucleare. A proposito di TMEM43, la mutazione missenso p.S358L, a causa di un effetto fondatore, è causa frequente di una cardiopatia correlata all'ACM in una popolazione canadese (4,8). Nella maggior parte dei casi, la ACM ha trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta, ma esistono anche forme recessive (4).

Ad oggi, è noto che circa metà dei soggetti affetti presenta almeno una mutazione in geni desmosomali. PKP2 è il gene più comunemente mutato in coorti di adulti, e ha una prevalenza di circa il 40%, mentre in età pediatrica sono più frequenti le mutazioni nel gene DSP (4). Le mutazioni *loss of function* sono le più numerose e presentano la maggior evidenza di patogenicità (8). Uno studio della durata di sei anni, condotto su un campione di 577 soggetti con varianti in geni coinvolti nella ACM, ha cercato di fare chiarezza sull'influenza di mutazioni diverse sulla gravità e sul decorso clinico della patologia. Ne è emerso che il rischio di morte cardiaca improvvisa risulta essere più elevato in pazienti con mutazioni nel gene DSP rispetto a soggetti con mutazioni nel gene PKP2. Pazienti con mutazioni nel gene PLN e una diagnosi di ACM presentano i primi sintomi ad un'età più avanzata rispetto a pazienti con mutazioni nel gene PKP2, ma il decorso clinico sembra essere più grave. Infine, come atteso, gli individui con mutazioni in più di un gene sono meno frequenti (4 % della popolazione analizzata dallo studio in questione) ma presentano un'evoluzione clinica più severa e un'insorgenza dei sintomi anticipata (10).

Una buona percentuale di soggetti con diagnosi di ACM non presenta varianti patogeniche già associate alla malattia. La causa può risiedere nella presenza di mutazioni patogene non ancora identificate, mutazioni private in geni non ancora associati ad ACM o varianti in regioni non codificanti di geni già associati ad ACM (8).

1.4 I dischi intercalari

I dischi intercalari sono strutture complesse e finemente regolate, caratteristiche del muscolo cardiaco. Garantiscono la propagazione del segnale elettrico, indispensabile al processo di contrazione, e permettono ai cardiomiociti di aderire tra loro e sostenere lo stress meccanico. I dischi intercalari consentono ai miociti di agire come un sincizio funzionale e sono pertanto fondamentali per il normale funzionamento cardiaco. L'importanza di queste strutture si esplica anche attraverso il loro coinvolgimento in diversi processi di *signaling* intracellulare (2). I dischi intercalari sono costituiti da desmosomi, *area composita*, giunzioni comunicanti e molecole non giunzionali. Le diverse componenti non sono tra loro

indipendenti, bensì interagiscono dal punto di vista strutturale, elettrico e metabolico, agendo come un'unità funzionale, chiamata *connessoma* (Figura 1).

I desmosomi sono complessi multiproteici che permettono l'adesione tra cellule e si trovano in particolar modo in tessuti soggetti a forti stress meccanici, come il tessuto cardiaco ed epitaliale. L'interazione delle proteine desmosomali con i filamenti intermedi del citoscheletro porta alla formazione di un *network* che conferisce resistenza meccanica ai tessuti. I desmosomi sono formati da proteine appartenenti a tre grandi famiglie: le caderine, le proteine armadillo e le plachine. Le caderine comprendono la desmogleina e la desmocollina, proteine transmembrana che formano omo o eterodimeri e che uniscono fisicamente cellule adiacenti attraverso i loro domini extracellulari. In particolare, le isoforme presenti a livello cardiaco sono la desmogleina-2 e la desmocollina-2. La porzione intracellulare di queste caderine è connessa alla placoglobina e alla placofilina-2, proteine armadillo, che mediano il legame con la desmoplachina, una proteina appartenente alla famiglia delle plachine. La desmoplachina è codificata da un gene localizzato sul cromosoma 6p24 che dà origine a due isoforme: DPI e DPII. DPI è la forma predominante a livello cardiaco. La desmoplachina è costituita da un dominio N-terminale globulare che permette l'interazione con le proteine armadillo, un dominio *rod* centrale responsabile dell'omodimerizzazione, e un dominio C-terminale che consente il collegamento dei desmosomi alla rete citoscheletrica, mediante un legame specifico con la desmina. (2).

L'*area composita* è una giunzione caratteristica del cuore che comprende sia proteine che costituiscono i desmosomi che elementi delle giunzioni aderenti, delle giunzioni comunicanti e canali ionici. Le giunzioni aderenti sono complessi multiproteici la cui principale componente è la proteina transmembrana N-caderina, i cui domini extracellulari mediano l'adesione cellula-cellula attraverso la formazione di un legame omofilico tra molecole di cellule adiacenti. Intracellularmente le giunzioni aderenti sono ancorate ai filamenti di actina del citoscheletro grazie all'interazione della N-caderina con le proteine armadillo p120 e β -catenina e le proteine strutturali vinculina, α E-catenina e α T-catenina. In questo modo, viene garantita la continuità tra i filamenti di actina di cardiomiociti adiacenti, permettendo la trasmissione della forza contrattile da una cellula all'altra. Nel cuore adulto di un mammifero, i desmosomi e le giunzioni aderenti non esistono come entità distinte, bensì sono presenti quasi esclusivamente nell'*area composita*. In questa giunzione ibrida le proteine desmosomali si trovano in prossimità delle proteine delle giunzioni aderenti. L'*area composita* copre la maggior parte dell'estensione del disco intercalare essendo interrotta solo raramente da desmosomi, giunzioni comunicanti e segmenti privi di giunzioni (11). Le giunzioni comunicanti sono canali intercellulari che garantiscono una conduzione elettrica rapida e coordinata, necessaria al mantenimento del normale ritmo cardiaco. Ciascun canale è formato da interazioni non covalenti tra due

emicanali, chiamati *connessoni*, costituiti ciascuno da sei molecole di connessina che si estendono nello spazio extracellulare a formare il poro di permeabilità del canale. La connessina 43 (CX43) è l'isoforma preponderante nel miocardio mentre connessina 40 e connessina 45 sono specifiche dei cardiomiociti atriali e del sistema di conduzione.

Il disco intercalare include anche strutture non giunzionali, coinvolte nella comunicazione tra cellule, tra cui i canali del sodio voltaggio dipendenti (Nav1.5), i canali del potassio voltaggio dipendenti e complessi coinvolti nel metabolismo del calcio (12).

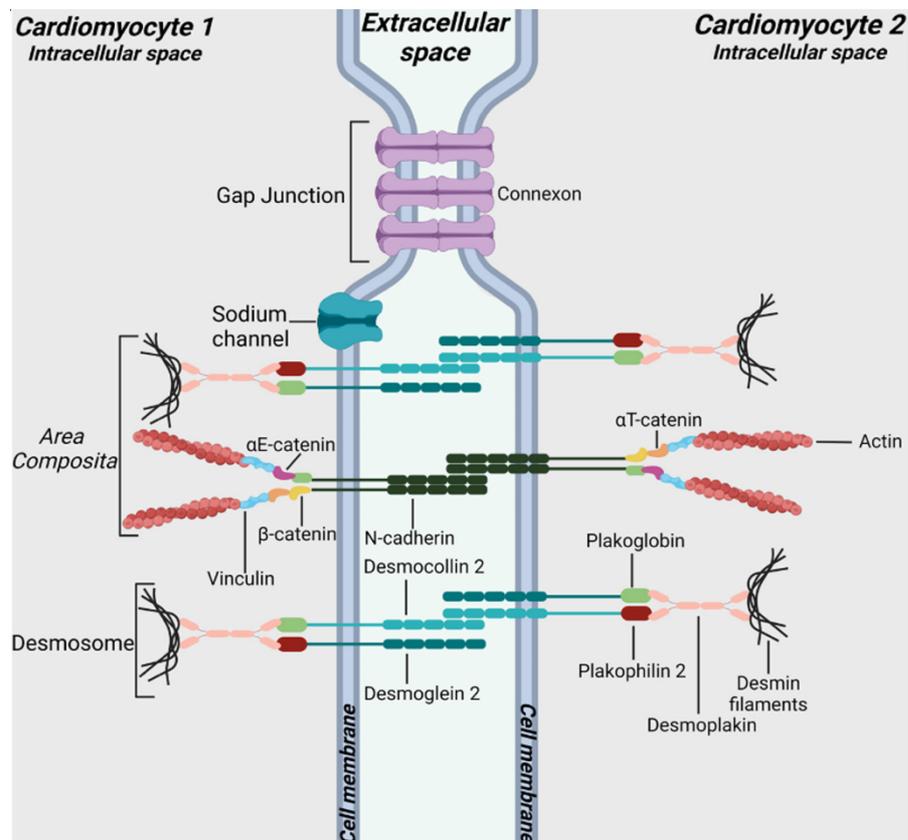


Figura 1. Organizzazione molecolare dei dischi intercalari. I dischi intercalari sono giunzioni caratteristiche del tessuto cardiaco che ne consentono il corretto funzionamento dal punto di vista elettrico, meccanico e metabolico. Queste strutture sono costituite da desmosomi, *area composita*, giunzioni comunicanti e molecole non giunzionali. L'area composita è una struttura ibrida costituita da proteine che formano i desmosomi, le giunzioni aderenti e le giunzioni comunicanti e da canali ionici (11).

1.5 La patogenesi

L'aspetto patologico caratteristico della cardiomiopatia aritmogena è la sostituzione del miocardio con tessuto fibro-adiposo. Questo fenomeno ha solitamente inizio dall'epicardio, ovvero lo strato più interno della membrana sierosa che avvolge il cuore, e si estende fino all'endocardio, lo strato a contatto con le cavità cardiache

(13). Come conseguenza del rimodellamento cardiaco, si possono verificare assottigliamento della parete cardiaca e formazione di aneurismi. Ciò si verifica in particolare a livello del cosiddetto *triangolo della displasia*, una regione compresa tra il tratto di efflusso, il tratto di afflusso e l'apice del ventricolo destro. Negli stadi più avanzati della malattia, l'alterazione strutturale del miocardio interferisce con l'attività elettrica causando tachicardia e fibrillazione ventricolare (3).

Dal punto di vista istologico, la patologia si manifesta con infiltrazioni adipose e fibrose. Si evidenzia inoltre la presenza di cellule infiammatorie, in particolare linfociti T e polimorfonucleati, e segni caratteristici come ipertrofia dei cardiomiociti, vacuolizzazione e nuclei dismetrici e dismorfici (13).

Sebbene i meccanismi molecolari alla base della ACM non siano ancora del tutto delineati, negli ultimi decenni si è affermata l'ipotesi che vede l'intervento di diversi processi, spesso interconnessi tra loro. In primo luogo, nei soggetti affetti si evidenzia un rimodellamento dei dischi intercalari. L'alterazione di proteine che costituiscono queste giunzioni porta ad una ridotta interazione tra i cardiomiociti, che si risolve in una perdita di adesione e nel conseguente distacco gli uni dagli altri (8). L'aumento dello spazio intercellulare a livello dei dischi intercalari è stato confermato da studi condotti su modelli murini e rappresenta uno dei primi cambiamenti patologici che si verifica in topi transgenici sovrerprimenti la mutazione *Dsg2-N271S*, corrispondente alla mutazione *DSG2-N266S* individuata in una paziente affetta da ACM (13). L'alterazione della struttura del disco intercalare si riflette anche in una ridotta presenza di JUP a livello giunzionale, che viene traslocata nel nucleo e porta all'alterazione di specifici pathways. È interessante evidenziare come questa anomalia si verifichi non solo quando è JUP stessa ad essere mutata, ma anche quando la mutazione interessa altre proteine desmosomali. Un'altra caratteristica comunemente osservata nei pazienti affetti da ACM è la diminuzione dei livelli di CX43 nelle giunzioni comunicanti; da cui consegue la compromissione della conduzione elettrica. Quest'ultima risulta ulteriormente alterata dalla ridotta presenza di Nav1.5 (4).

Nella ACM, la morte dei cardiomiociti si verifica piuttosto precocemente e può essere causata da una serie di meccanismi, tra cui la morte cellulare programmata per apoptosi, dovuta alla perdita di adesione tra cellule cardiache (8). Tuttavia, in diversi modelli murini è stato osservato che l'evento che dà inizio al danno miocardico non sia l'apoptosi, osservata principalmente negli stadi più avanzati della malattia, quanto più la morte per necrosi. Quest'ultima si accompagna a distruzione del sarcolemma, atrofia dei cardiomiociti, disgregazione dei miofilamenti ed attivazione di una risposta infiammatoria (13).

La progressione della malattia vede la sostituzione dei cardiomiociti necrotici e apoptotici con tessuto fibroso, nel tentativo di preservare l'integrità strutturale del miocardio. Uno dei protagonisti in questo processo è il *pathway* di segnalazione mediato da TGF β 3. Nel percorso canonico questo fattore di crescita lega una serie di recettori di membrana portando alla fosforilazione, e conseguente attivazione, del fattore di trascrizione SMAD, il quale promuove l'espressione di geni pro-fibrotici. Ciò si riflette in un aumento di espressione di proteine della matrice extracellulare e nel calo di espressione di metalloproteasi. Sono stati descritti anche percorsi di segnalazione TGF β non canonici, i più importanti dei quali includono l'attivazione di *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (13).

Le cellule stromali mesenchimali cardiache (C-MSC) sono cellule pluripotenti che originano dall'epicardio e partecipano sia al normale mantenimento cardiaco che al rimodellamento tipico di un contesto patologico (14). Dallo studio di biopsie cardiache di individui sani e pazienti con ACM è emerso che in entrambi i casi le C-MSC esprimono geni desmosomali e che l'espressione di geni pro-adipogenici risulta aumentata nelle C-MSC dei pazienti rispetto ai controlli.

Più recentemente cellule cardiache pluripotenti caratterizzate dall'espressione del gene PDGFR α sono state proposte come fonte di adipociti e fibrosi; queste prendono il nome di progenitori fibro-adipogenici (FAP). Lombardi et. al hanno dimostrato che cellule appartenenti ad un sottogruppo di FAP esprimono il marcatore adipogenico C/EBP- α , se portatrici di mutazioni nel gene DSP, subiscono un differenziamento in senso adipocitico (15).

La sostituzione del miocardio con tessuto fibro-adiposo risulta correlata ad un'altra caratteristica tipica della ACM: l'alterazione di vie di segnalazione fondamentali al mantenimento della fisiologia cellulare. Tra queste vi è il *pathway* Wnt canonico mediato dalla β -catenina, una proteina multifunzionale che, oltre a partecipare all'adesione cellulare, interviene nella modulazione della trascrizione (4). Questa via di segnalazione è coinvolta nella regolazione dello sviluppo durante l'embriogenesi, nel mantenimento dell'omeostasi dei tessuti adulti e nel differenziamento cellulare (14) (Figura 2). In condizioni fisiologiche, l'interazione dei ligandi Wnt con il recettore di membrana Frizzled porta all'attivazione della via Wnt. Di conseguenza, le proteine citoplasmatiche Dishevelled (DVL), axina e glicogeno sintasi chinasi-3 β (GSK3 β) vengono sequestrate a livello della membrana cellulare. Ciò impedisce la degradazione della β -catenina citoplasmatica che, libera di traslocare nel nucleo, si lega al fattore di trascrizione Tcf/Lef attivandolo e promuovendo la trascrizione di geni che favoriscono la crescita e la sopravvivenza cellulare. Nel contesto patologico della ACM, la via Wnt risulta spenta. Le proteine DVL, axina e GSK3 β non vengono trattenute in membrana e

formano un complesso che provoca la fosforilazione della β -catenina. Questa modifica post-traduzionale porta la proteina ad essere ubiquitinata e successivamente degradata ad opera del proteasoma. Come conseguenza, si ha il blocco della trascrizione dei geni normalmente indotti dal *pathway* Wnt (16) (Figura 2). Mutazioni in geni codificanti proteine dei dischi intercalari possono portare ad una generale destabilizzazione di queste giunzioni, che può risolversi nel distacco di proteine solitamente trattenute in membrana. Tra queste, vi è la placoglobina, che, una volta dislocata dalla giunzione, può traslocare al nucleo dove compete con la β -catenina, impedendo il suo legame a Tcf-Lef. Ciò causa la soppressione della via Wnt e l'induzione dell'espressione di geni pro-adipogenici, tra cui il recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR γ) (14). L'interazione diretta tra PPAR γ e la β -catenina sembra indurre la degradazione di quest'ultima, contribuendo allo spegnimento della via Wnt (4).

Nell'ACM si osserva anche un'alterazione dell'Hippo-YAP *pathway*, una via di segnalazione evolutivamente conservata che regola la dimensione degli organi e la proliferazione, la sopravvivenza e il differenziamento cellulare (4) (Figura 2). In condizioni fisiologiche l'Hippo-YAP *pathway* è attivo, di conseguenza i co-attivatori trascrizionali YAP e TAZ traslocano nel nucleo e si legano al DNA inducendo l'espressione di geni che promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Il rimodellamento dei dischi intercalari che si verifica nella ACM causa una ridotta localizzazione della proteina PKC α in membrana. Questo porta alla defosforilazione della proteina neurofibromina 2 (NF2) presente nella regione sub-membrana e l'attivazione di una cascata chinastica che vede come protagonisti dapprima le chinasi MST1\2 e in secondo luogo le chinasi LAST1\2. Queste, una volta attivate, fosforilano YAP e TAZ che vengono esportati dal nucleo e sequestrati a livello citoplasmatico, comportando lo spegnimento della via Hippo-YAP (17). È interessante evidenziare che l'accumulo di YAP a livello citoplasmatico sembra indurre la degradazione della β -catenina, suggerendo un *crosstalk* tra la via di segnalazione Hippo-YAP e la via Wnt (4) (Figura 2).

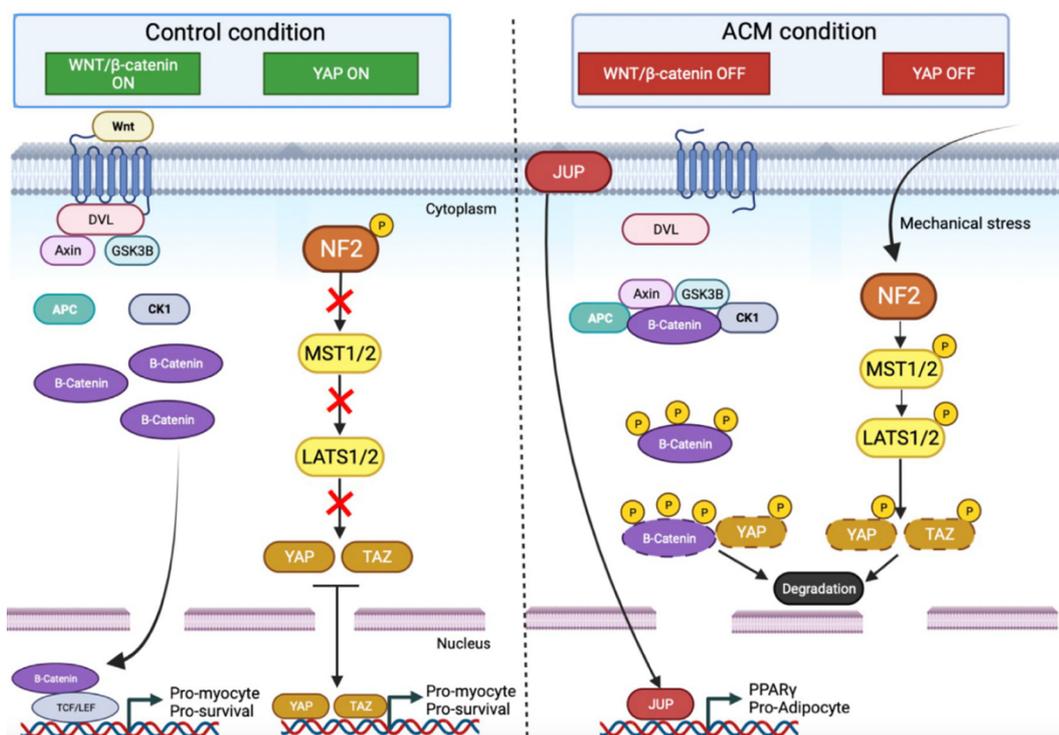


Figura 2. Wnt e YAP *pathway* a confronto tra la condizione di controllo e ciò che si verifica nella ACM. Nella condizione di controllo, i *pathway* Wnt e YAP sono accessi. Per quanto riguarda il Wnt *pathway*, l'attivazione di recettori di membrana da parte di ligandi Wnt porta al reclutamento di DVL, axina e GSK3 β inducendo l'accumulo della β -catenina nel citoplasma. La β -catenina migra al nucleo e lega il fattore di trascrizione TCF/LEF, portando all'espressione di geni che promuovono la crescita e la sopravvivenza cellulare. Nello YAP *pathway*, la fosforilazione di NF2 inibisce la cascata chinasi a valle, consentendo a YAP e TAZ di migrare al nucleo e indurre l'espressione di geni che promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Nella ACM, entrambi i *pathway* sono spenti. La β -catenina viene sequestrata nel citoplasma e degradata dal complesso del proteasoma mentre l'attivazione di NF2 porta all'accensione della cascata chinasi dello YAP *pathway*. Questa si conclude con la fosforilazione di YAP e TAZ, che vengono quindi trattenuti nel citosol dove interagiscono con la β -catenina portando alla sua degradazione. Inoltre, a causa della destabilizzazione desmosomale, JUP non viene trattenuto in membrana e trasloca al nucleo dove compete con la β -catenina, promuovendo l'espressione di geni pro-adipogenici come PPAR γ (14).

In biopsie miocardiche di pazienti affetti da ACM è possibile osservare infiltrati infiammatori rappresentati da aggregati interstiziali di neutrofili, macrofagi, mastociti e linfociti T. Recentemente è stato osservato che l'infiammazione precede, anche di diversi anni, le anomalie istologiche ed elettriche tipiche dell'ACM. Ad oggi la relazione causale tra infiammazione e morte dei cardiomiociti non è del tutto chiara. È però probabile che la morte cellulare, causata dalla distruzione dei complessi giunzionali, inneschi la risposta infiammatoria, che a sua volta porta all'esacerbazione della morte dei cardiomiociti stessi (13,18).

Nei primi stadi della patologia i cardiomiociti morti vengono eliminati dalle mieloperossidasi e dai neutrofili. Questi ultimi, man mano che la malattia progredisce, vengono gradualmente sostituiti dai macrofagi che, mediante il

rilasciano delle citochine IL-1 β e TNF- α , stimolano la produzione della chemochina LIX, promotrice della chemiotassi. L'aumento delle citochine IL-1 β , IL-6, TNF- α , dell'interferone- γ e della proteina chemioattrattiva dei monociti (MCP-1) mobilita i macrofagi M1 pro-infiammatori, che amplificano i danni tissutali preesistenti (18). Il rilascio di molecole endogene (DAMPs) che si verifica in seguito ad un danno cellulare, o a morte delle cellule per necrosi, può alimentare la dinamica infiammatoria mediante l'attivazione della via del complemento. Topi ACM knock-out per la desmina mostrano deposizione di fattori del complemento a livello miocardico già a partire dalle 2 settimane di vita. Inoltre, in questi modelli murini l'inibizione del recettore C5a vede come conseguenza un'attenuazione dei danni al sarcolemma e dell'infiltrazione dei leucociti, comportando un miglioramento della struttura, della funzione e della sopravvivenza cardiaca. Quest'osservazione supporta lo sviluppo di potenziali strategie terapeutiche volte a modulare la cascata del complemento (19).

Studi recenti evidenziano che l'alterazione desmosomale porta all'attivazione del fattore di trascrizione NF κ B. In topi knock out per la DSG2 è stato osservato un aumento dei livelli di NF κ B, nonché delle citochine IL-1 β , IL-12, TNF- α e dell'interferone γ . In questi stessi modelli, inoltre, è stato dimostrato che l'attenuazione di questo fattore di trascrizione, mediante l'utilizzo di una piccola molecola, porta ad una riduzione significativa della gravità della malattia. Questo risultato è in linea con l'idea che NF κ B sia un mediatore centrale del danno tissutale e della progressione della malattia (18).

L'individuazione di genomi di virus cardiotropici in individui affetti da ACM ha portato ad ipotizzare una possibile eziologia virale della malattia (4,18). A sostegno di questa tesi, in modelli murini infettati con il *Coxsackie virus*, è stato osservato lo sviluppo di caratteristiche tipiche dell'ACM. Tuttavia, l'ipotesi più probabile è che le infezioni virali siano una conseguenza del danno miocardico pre-esistente, piuttosto che una causa diretta scatenante la malattia. Le mutazioni in geni desmosomali indeboliscono infatti la struttura del disco intercalare aumentando la suscettibilità, oltre che ai danni meccanici, anche alle infezioni e rendendo il tessuto miocardico danneggiato un ambiente ideale per la proliferazione virale (18).

È stato osservato che le cellule T citotossiche inducono l'apoptosi dei cardiomiociti anche in assenza di infezioni virali. Questo suggerisce il contributo di una risposta autoimmunitaria alla patogenesi dell'ACM (18). A riprova di ciò, nel 97% degli individui affetti sono stati identificati anticorpi diretti contro la DSG2. In virtù della loro correlazione con la gravità della malattia, i livelli plasmatici di questi anticorpi potrebbero essere utilizzati come biomarcatori dell'ACM. L'elevata sensibilità e specificità consentirebbero la diagnosi della patologia anche durante la fase presintomatica; inoltre, variazioni nella quantità di anticorpi anti-DSG2 potrebbero essere utili per prevedere un rischio aumentato di aritmie. Tuttavia, i dati sin ora

raccolti derivano da indagini su piccole coorti e dovrebbero essere, pertanto, confermati da studi aggiuntivi su una coorte più ampia (13).

1.6 Modelli di studio

Lo studio dei meccanismi molecolari alla base della ACM richiede modelli sperimentali che mimino la malattia (4). Finora, gli studi *in vivo*, condotti su modelli animali hanno contribuito significativamente alla conoscenza dei meccanismi patologici. Tra i modelli sperimentali utilizzati vi è lo zebrafish (*Danio rerio*), che presenta però delle limitazioni, dovute alla parziale capacità rigenerativa del cuore e alla presenza di sole due camere cardiache. I modelli murini, grazie alla disponibilità di metodi sempre più sofisticati di manipolazione genetica e alla facilità di allevamento rispetto ad altri modelli di mammiferi, come ad esempio i maiali, rappresentano un valido modello di studio della malattia. Tuttavia, i cuori murini divergono da quelli umani in diversi aspetti, tra cui il ruolo dei canali ionici, il metabolismo del calcio e lo sviluppo dei cardiomiociti. Cuori murini e umani presentano differenze rilevanti anche in termini di proprietà elettrofisiologiche come la frequenza cardiaca a riposo, la fase di ripolarizzazione del potenziale d'azione e la durata del potenziale d'azione ventricolare. Queste discrepanze, associate al fatto che in molti modelli animali non si ripropone l'infiltrazione adiposa tipica dell'ACM, rappresentano un ostacolo alla creazione di modelli *in vivo* che riassumano correttamente le caratteristiche della malattia (20).

Al fine di ovviare a queste limitazioni, nell'ultimo decennio la ricerca si è focalizzata sull'utilizzo di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs). Nel 2006 sono state generate per la prima volta iPSCs a partire da fibroblasti murini, riprogrammati tramite l'utilizzo di quattro fattori trascrizionali: OCT3/4, c-MYC, SOX2 e KLF4. L'anno successivo sono state ottenute iPSCs umane (hiPSCs) utilizzando i medesimi fattori di trascrizione (21). Le hiPSCs possono essere generate mediante *reprogramming* di cellule somatiche, tra cui fibroblasti dermici, cellule mononucleate del sangue periferico e cellule epiteliali renali (22).

Le hiPSCs sono in grado di proliferare in maniera illimitata e differenziare nei 3 strati germinali. Questo permette la generazione di cellule cardiache, e da ciò la creazione di modelli per lo studio delle malattie cardiovascolari. Il differenziamento delle hiPSCs in cardiomiociti (hiPSCs-CMs) permette di bypassare il limite costituito dalla bassa vitalità *in vitro* dei cardiomiociti ottenuti da biopsie (21). Diversi studi hanno evidenziato come hiPSCs-CMs derivanti da paziente ricalchino caratteristiche tipiche della ACM, tra cui l'alterazione della struttura e della morfologia cellulare e la localizzazione anomala della proteina JUP, in associazione ad un aumento di lipogenesi e apoptosi (20). Le hiPSCs derivanti da pazienti presentano sia la variante patogena che il background genetico del paziente; pertanto, oltre a permettere la comprensione dei meccanismi alla base della patologia, aprono prospettive di progresso verso strategie di medicina

personalizzata per la diagnosi e il trattamento dei pazienti affetti (13). La generazione di controlli isogenici mediante la tecnica del CRISPR\Cas-9 permette inoltre di studiare gli effetti specifici di una variante senza incorrere in *bias* dovuti alla presenza di mutazioni patologiche sconosciute in linee cellulari di controllo non correlate (2).

Le hiPSCs-CMs in coltura rimangono in uno stato parzialmente immaturo; presentano infatti dimensioni cellulari ridotte, allineamento immaturo delle miofibrille, mancanza di tubuli T, potenziale di membrana a riposo depolarizzato, ridotta espressione dei canali ionici, e mitocondri e metabolismo simili a quelli fetali. Al fine di stimolarne la maturazione sono stati sperimentati diversi approcci, tra cui il prolungamento del tempo in coltura fino a 360 giorni; l'applicazione di uno stress meccanico che mimica l'aumento del carico di lavoro cardiaco che si verifica alla nascita in seguito al passaggio dalla circolazione materna a quella sistemica; e la regolazione dei livelli di ormoni che influenzano lo sviluppo cardiaco. È da evidenziare, inoltre, l'importanza del ruolo di popolazioni cellulari non miocitiche nella maturazione dei cardiomiociti (20). Il dialogo tra cellule stromali, vascolari e cellule tessuto-specifiche è essenziale per il mantenimento dell'omeostasi dei tessuti. Oltre a fornire nutrimento, fattori di crescita, matrice extracellulare e ormoni, anche le interazioni biofisiche tridimensionali con le cellule stromali sono necessarie a garantire il corretto funzionamento degli organi. Nel caso del cuore, solo il 30% della componente cellulare è composto da cardiomiociti mentre la restante frazione è rappresentata da cellule endoteliali, cellule vascolari stromali e fibroblasti cardiaci. In micro-tessuti cardiaci tridimensionali costituiti da cardiomiociti, cellule endoteliali e fibroblasti cardiaci ottenuti a partire da hiPSCs, è stato evidenziato un aumento della maturazione dei cardiomiociti. Questo si riflette nel miglioramento della contrattilità, della respirazione mitocondriale, delle strutture sarcomeriche e in generale dell'elettrofisiologia cardiaca (22). La creazione di micro-tessuti cardiaci ha un elevato potenziale nello studio della ACM e delle malattie cardiache in generale, in quanto permette di riprodurre in vitro un ambiente tridimensionale complesso e rappresenta un modello ideale per testare l'efficacia di nuovi farmaci o terapie genetiche.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo progetto di tesi consiste nel differenziamento e, successivamente, nella caratterizzazione di cellule epicardiche e fibroblasti cardiaci ottenuti da hiPSCs riprogrammate a partire da cellule epiteliali renali di un paziente affetto da ACM. Parallelamente alle cellule mutate, che portano una variante non senso p.Q273* nel gene codificante per la proteina desmoplachina, sono stati analizzati i rispettivi controlli isogenici.

La maggior parte delle varianti patogene associate all'ACM si trova in geni codificanti proteine dei dischi intercalari. L'obiettivo di questo studio è approfondire le conoscenze sull'espressione di tali geni in cellule epicardiche e fibroblasti cardiaci, alla luce di un loro possibile coinvolgimento nella patogenesi dell'ACM. Inoltre, l'ottenimento di questi tipi cellulari è fondamentale per l'integrazione dei fibroblasti cardiaci in modelli tridimensionali.

La generazione di microtessuti cardiaci a partire da hiPSCs offre enormi possibilità sia in termini di studio dei meccanismi molecolari alla base della malattia, che nell'ambito dello sviluppo di farmaci, rappresentando una valida alternativa agli studi clinici condotti su animali, i quali risultano spesso fallimentari a causa delle differenze fisiologiche rispetto all'uomo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 hiPSCs

In questa tesi, sono state utilizzate cellule hiPSCs ottenute mediante *reprogramming* di cellule epiteliali renali ricavate da un campione di urina. Il paziente donatore presenta una variante patogena in eterozigosi nel gene codificante per la proteina desmoplachina. La variante in questione è una mutazione non senso (c.817C>T) che causa la sostituzione di un codone codificante per un amminoacido con un codone di stop prematuro (p.Q273*). Parallelamente alle cellule mutate isolate dal paziente, sono stati coltivati e successivamente analizzati, i rispettivi controlli isogenici generati con la tecnica CRISPR/Cas9.

3.1.1 Preparazione del coating

Per l'espansione delle hiPSCs vengono utilizzate piastre multiwell da 6 pozzetti. Il coating è costituito da Geltrex (ThermoFisher Scientific, A1413202) concentrato 0,16 mg/ml e risospeso in DMEM/F-12 (ThermoFisher Scientific, 31331-028). In ogni pozzetto viene posto 1 ml di coating. Prima del suo utilizzo, la piastra viene riscaldata 40 minuti in incubatore a 37°C.

3.1.2 Scongellamento

In una falcon da 15 ml vengono aliquotati 3 ml di terreno E8++, costituito da Essential 8 basal medium (ThermoFisher Scientific, A1517001), 2% di E8-Supplement (ThermoFisher Scientific, A1517101) e 0,5% di Penicillina-Streptomina (P/S, ThermoFisher Scientific, 15070-063). La cryovial viene prelavata dal dewar di azoto liquido e posta in un bagnetto termostatico a 37°C, fino allo scioglimento quasi completo del ghiaccio al suo interno. Per evitare contaminazioni, il tappo della cryovial non deve essere immerso in acqua. Le cellule vengono trasferite nella falcon con il terreno precedentemente aliquotato. Si effettua quindi un lavaggio della cryovial con 1 ml di terreno E8++. Le cellule vengono centrifugate a 200 g per 5 minuti. Il surnatante viene aspirato e buttato e il pellet viene risospeso in 1,5 ml di E8++ addizionato con Thiazovivin (TZV, Sigma-Aldrich, 420220) allo 0,025%. Le cellule vengono seminate in una piastra 6-well, dopo aver rimosso da questa il coating, e poste in incubatore a 37°C e 5% CO₂. Dopo 24 ore, il mezzo di coltura dev'essere sostituito con un terreno privo di TZV. L'operazione di scongelamento dev'essere svolta rapidamente per evitare lo stress e la morte delle cellule.

3.1.3 Mantenimento delle hiPSCs

Ogni giorno il terreno esausto viene sostituito con nuovo terreno E8++ (1,5 ml/pozzetto) equilibrato a temperatura ambiente. Le cellule vengono splittate

periodicamente per evitare un'eccessiva confluenza, la quale potrebbe promuovere il loro differenziamento.

3.1.4 Splitting

Il terreno esausto viene raccolto in una falcon da 15 ml. Si effettua un lavaggio con DPBS 1X (ThermoFisher Scientific, 14190094) (1 ml/pozzetto). Il distacco delle cellule dalla piastra è favorito dall'utilizzo del chelante EDTA 0,5 mM (ThermoFisher Scientific, 15575020) (1 ml/pozzetto), che viene lasciato agire in incubatore per 5 minuti a 37°C. Prima che le cellule comincino a staccarsi, l'EDTA viene rimosso. Si eseguono dei lavaggi con terreno E8++, che viene in seguito trasferito nella falcon, insieme alle cellule raccolte. Le cellule vengono centrifugate per 5 minuti a 200 g. Il surnatante viene rimosso e il pellet risospeso in un opportuno volume di E8++ addizionato con TZV (1,5 ml/pozzetto). Le cellule vengono infine seminate in nuovi pozzetti, in numero proporzionale alla confluenza iniziale.

3.1.5 Congelamento

Il protocollo è analogo a quello utilizzato per lo splitting delle cellule. In questo caso però, a seguito della centrifugazione, le cellule vengono risospese in 1 ml di soluzione per il congelamento, costituita al 90% da E8++ e al 10% di DMSO (Sigma-Aldrich, D2650). La soluzione viene trasferita in una cryovial, che viene conservata per 24\48 ore a -80°C. Successivamente la cryovial viene posta in azoto liquido al fine di preservarla a lungo termine.

3.2 Differenziamento delle hiPSCs in cellule epicardiche

Il differenziamento in cellule epicardiche è stato ottenuto applicando il protocollo di Campostrini et. al, che prevede la somministrazione di fattori chiave nella regolazione dell'embriogenesi cardiaca (23).

In preparazione al differenziamento, le hiPSCs vengono splittate secondo il protocollo descritto al paragrafo 3.1.4. In questo caso le cellule vengono rimosse dal supporto insieme all'EDTA, che viene neutralizzato con una quantità di terreno pari al doppio del suo volume. Non si effettuano lavaggi, evitando così di raccogliere eventuali cellule differenziate. Le cellule vengono centrifugate e risospese in 1 ml di terreno E8++. Dalla sospensione cellulare vengono prelevati 18 µl e trasferiti in un'eppendorf in cui sono stati precedentemente aliquotati 2 µl di colorante Tripan (Sigma-Aldrich, T8154). 10 µl della soluzione Tripan-sospensione cellulare vengono in seguito trasferiti in una camera di Burker per la conta cellulare. Le cellule vengono risospese in un volume adeguato di E8++ addizionato a TZV (1,5 ml/pozzetto). Da questo momento, per il differenziamento in cellule epicardiche vengono utilizzate piastre multiwell da 12 pozzetti. Si procede alla semina delle cellule in piastre con coating in Matrigel (Corning,

354277) diluito 1:120 in DMEM/F12 (1 ml/pozzetto). Prima dell'utilizzo la piastra dev'essere riscaldata per circa 40 minuti in incubatore a 37°C.

Durante i primi step di differenziamento in cellule epicardiche, il terreno esausto viene periodicamente sostituito con terreno LI-BPEL, addizionato a specifici fattori di induzione. La composizione del terreno LI-BPEL è riportata in *Tabella 1*.

Il giorno 0 del differenziamento, esattamente a 24 h dalla semina delle hiPSCs, viene somministrato il terreno di induzione a mesoderma cardiaco (1,5 ml/pozzetto) rappresentato da LI-BPEL contenente BMP4 20 ng/ml (R&D Systems, 314-BP), Activin A 20 ng/ml (Miltenyi Biotec, 130-115-010) e CHIR 99021 1,5 µM (Axon Medchem, Axon1386).

Il giorno 3, il terreno esausto viene sostituito con LI-BPEL (1,5 ml/pozzetto) a cui vengono aggiunti XAV 939 5 µM (Tocris, 3748/10), BMP4 30 ng/ml e acido retinoico (RA) 1 µM (Sigma-Aldrich, R2625). Essendo RA un agente fotosensibile, l'operazione viene svolta al buio. XAV dev'essere opportunamente risospeso per evitare la formazione di cristalli.

Il giorno 6, il terreno esausto viene sostituito con LI-BPEL (1,5 ml/pozzetto) contenente BMP4 30 ng/ml e RA 1 µM.

Il giorno 9, le neoformate cellule epicardiche vengono splittate. Si rimuove il terreno esausto e si effettua un lavaggio con DPBS (0,5 ml /pozzetto). Le cellule vengono incubate per 5 minuti a 37°C con l'enzima Tryple 1X (Thermo Fisher Scientific, A1217701) (0,5 ml/pozzetto), che promuove il loro distacco dalla piastra. L'enzima viene neutralizzato con LI-BPEL (0,5 ml/pozzetto) e trasferito in una falcon da 15 ml. Si operano dei lavaggi per raccogliere il maggior numero di cellule. Queste vengono poi centrifugate 3 minuti a 300 g e risospese in LI-BPEL (1,5 ml/pozzetto) addizionato con SB431542 10 µM (Tocris, 1614/10). Vengono seminate 8×10^4 cellule/pozzetto in piastre con coating in Fibronectin (Sigma-Aldrich, F1141) diluito 1:200 in DPBS. Parte delle cellule seminate nella piastra multiwell da 12 pozzetti viene utilizzata per l'estrazione dell'RNA. Per la caratterizzazione mediante immunofluorescenza vengono utilizzati vetrini da 18 pozzetti (Ibidi, 81816). In ciascun pozzetto vengono seminate $1,5 \times 10^4$ cellule e viene aggiunta una quantità di terreno tale da avere un volume finale di 100 µl/pozzetto.

Il giorno 12, le cellule epicardiche dovrebbero essere confluenti al 90/95% pertanto possono essere congelate o si può procedere direttamente al differenziamento in fibroblasti cardiaci. Per il congelamento viene applicato il medesimo protocollo utilizzato il giorno 9. In questo caso le cellule, in seguito a centrifugazione, vengono risospese in 1 ml di CryoStor CS10 (Stem Cell Technologies, 07930) e trasferite in una cryovial, congelata dapprima a -80°C e dopo 48 ore in azoto liquido.

Componenti	Quantità per 250 ml
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Thermo Fisher Scientific, 21056-023)	107,5 ml
F12 nutrient mixture (Thermo Fisher Scientific, 31765-027)	107,5 ml
Protein-free Hybridoma Medium-II (Thermo Fisher Scientific, 12040-077)	12,5 ml
Bovine Serum Albumin (10% wt/vol in IMDM) (Bovogen Biologicals Australia, BSAS05)	6,25 ml
Poly(Vinyl Alcohol) (5% wt/vol in distilled water) (Sigma-Aldrich, P8136)	6,25 ml
Chemically-defined Lipid Concentrate (100X) (Thermo Fisher Scientific, 11905-031)	2,5 ml
Insulin-Transferrin-Selenium Ethanolamine (1000X) (Thermo Fisher Scientific, 51599-056)	250 µl
α-Monothioglycerol (13 µL in 1 mL IMDM) (Sigma-Aldrich, M6145)	750 µl
L-ascorbic acid 2-phosphate (5 mg/mL in distilled water) (Sigma-Aldrich, A8960)	2,5 ml
Glutamax (Thermo Fisher Scientific, 35050-038)	2,5 ml
Penicillin-streptomycin (ThermoFisher Scientific, 15070-063)	1,25 ml
Phenol red (Sigma-Aldrich, P3532)	2,5 mg

Tabella 1. Composizione del terreno di differenziamento LI-BPEL. Le quantità riportate fanno riferimento ad un volume finale di 250 ml.

3.3 Differenziamento delle cellule epicardiche in fibroblasti cardiaci

Il differenziamento delle cellule epicardiche in fibroblasti cardiaci è stato ottenuto, applicando il protocollo di Campostrini et. al, aggiungendo il fattore di crescita per i fibroblasti (FGF-2) al terreno di differenziamento LI-BPEL. Successivamente, è stato utilizzato il terreno di mantenimento FGM3 al fine di promuovere l'espansione dei fibroblasti (23).

Il giorno 12 di differenziamento, le cellule vengono staccate dal supporto con il medesimo protocollo utilizzato il giorno 9 per le cellule epicardiche. In questo caso il surnatante viene risospeso in LI-BPEL (1,5 ml/pozzetto) addizionato a FGF-2 10 ng/ml (Miltenyi Biotec, 130-093-842). In seguito a conta cellulare, vengono seminate 10^5 cellule/pozzetto in piastre con coating in Vitronectin (VTN, Thermo Fisher Scientific, A14700) diluito 1:100 in DPBS.

Dopo 24 h, il terreno esausto viene sostituito con LI-BPEL addizionato a FGF-2 10 ng/ml. Quest'operazione viene ripetuta ogni 2 giorni fino al giorno 19. Il giorno 19 il terreno di coltura viene sostituito con il terreno di mantenimento FGM3

(PromoCell, C-23025) a cui vengono aggiunti Supplement Mix 10x (PromoCell, C-23025) e P/S allo 0,5%. Il terreno viene cambiato ogni 2 giorni fino al giorno 28-29. A questo punto, le cellule dovrebbero aver raggiunto il 90/95% di confluenza. Vengono quindi splittate con rapporto 1:2, utilizzando il medesimo protocollo utilizzato il giorno 9 per le cellule epicardiche. Si procede alla semina in piastra con coating in VTN e si aggiunge un volume di FGM3 tale da raggiungere 2 ml\pozzetto. Dopo 3-4 giorni i fibroblasti dovrebbero essere a confluenza e possono quindi essere espansi in piastre prive di coating o congelati con la stessa modalità utilizzata per le cellule epicardiche. Al fine di caratterizzare i fibroblasti cardiaci, parte delle cellule ottenute viene utilizzata per l'estrazione dell'RNA e parte viene seminata in vetrini per immunofluorescenza.

3.4 Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto dalle colture cellulari utilizzando lo Zymo kit, Direct-zol™ RNA Miniprep, seguendo le indicazioni del produttore. Il terreno di coltura viene rimosso dal pozzetto e si effettua un lavaggio con DPBS 1X. In un pozzetto di una piastra 12 wells si aggiungono 200 µl di TRIzol®, che viene lasciato agire per circa 3 minuti a temperatura ambiente. Per fermare la reazione, si aggiunge lo stesso quantitativo in etanolo 95-100% e si spipetta intensamente per favorire la disgregazione del campione. Il campione viene trasferito in una colonnina Zymo-Spin™ IICR column che viene posta all'interno di un supporto e centrifugata a 16000 g per 30 secondi. Il *flow-trough* viene eliminato e la colonnina trasferita in un nuovo supporto. Si effettua un lavaggio con 400 µl di RNA Wash Buffer e si centrifuga a 16000 g per 30 secondi. Alla colonnina vengono aggiunti 80 µl di una mix costituita da 5 µl di DNAsi (6 U/µl) e 75 µl di DNA digestion buffer. Si incuba a temperatura ambiente per 15 minuti. In seguito a un lavaggio con 400 µl di Direct-zol™ RNA PreWash, si effettua una centrifuga a 16000 g per 30 secondi; questo step viene eseguito due volte. La colonnina viene trasferita in un nuovo supporto. Si aggiungono 700 µl di RNA Wash Buffer e si centrifuga a 16000 g per 1 minuto, al fine di assicurare la completa rimozione del Wash Buffer. Infine, la colonnina viene trasferita in una eppendorf e l'RNA viene eluito con 25 µl di acqua priva di DNAsi ed RNAsi. Si effettua un'ultima centrifuga a 16000 g per 30 secondi.

Successivamente, si procede all'analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto mediante lo spettrofotometro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, ND-2000C). Lo strumento viene tarato ad assorbanza zero mediante un bianco, rappresentato da 1 µl di acqua priva di RNAsi e DNAsi. Per ogni campione si posiziona 1 µL di RNA sul supporto e si valuta l'assorbanza a 260 nm. I rapporti 260/280 e 260/230 danno indicazioni sulla purezza del campione e sull'eventuale presenza di contaminanti quali proteine e carboidrati. Infine, i campioni vengono conservati a -80°C.

3.5 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

L'RNA estratto viene retrotrascritto, utilizzando il kit *Maxima Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, EP0742), al fine di ottenere il cDNA da utilizzare nella reazione di *real-time PCR*. Per prima cosa, preleviamo il volume di RNA necessario ad avere una quantità pari a 500 ng. Aggiungiamo, quindi, un volume di acqua priva di DNAsi ed RNAsi (Invitrogen, 10977035) tale da raggiungere il volume finale di 12,5 μ l. L'RNA dev'essere mantenuto sempre in ghiaccio per evitare la sua denaturazione. A ciascun campione viene aggiunta una prima mix di reazione, costituita da 1 μ l di dNTPs 10 mM (Thermo Fisher Scientific, 10297-018) e 1 μ l di random esameri 50 μ M (Promega, C1181). Dopo aver spipettato e spinnato i campioni, viene eseguito un primo step di denaturazione, a 65°C per 5 minuti. I campioni vengono mantenuti in ghiaccio. Viene aggiunta una seconda mix di reazione, i cui reagenti sono riportati in *Tabella 2*, che promuove la fase di retrotrascrizione vera e propria, secondo il programma specificato in *Tabella 3*.

Reagenti	Volume per 1 reazione
5x RT buffer (ThermoFisher Scientific, EP0742)	4 μ l
SUPERase-In TM Rnase Inhibitor (20 U/ μ L) (Invitrogen TM , AM2694)	1 μ l
Maxima Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) (Thermo Fisher Scientific, EP0742)	0,5 μ l
Volume finale	5,5 μ l

Tabella 2. Reagenti implicati nella reazione di retrotrascrizione. I volumi riportati fanno riferimento ad un ad una sola reazione.

Fase	Temperatura	Durata
<i>Annealing</i>	25°C	10 minuti
Estensione	50°C	60 minuti
Inattivazione della trascrittasi inversa	85°C	5 minuti

Tabella 3. Fasi, temperatura e durata della reazione di retrotrascrizione.

3.6 Disegno dei primers

I primers utilizzati nella *real-time PCR* sono stati disegnati mediante l'utilizzo del software *Primer3Plus* (<https://www.primer3plus.com>) inserendo come input le sequenze dell'mRNA dei geni di interesse, ottenute consultando la piattaforma *USCS Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu>). I primers disegnati devono rispettare alcuni requisiti necessari ad un ottimale funzionamento. La differenza tra le temperature di *melting* del primer *forward* e del primer *reverse* non dev'essere

superiore a 1°C. La lunghezza degli ampliconi dev'essere compresa tra 120 e 205 nucleotidi. La lunghezza di ciascun primer dev'essere compresa tra 18 e 22 nucleotidi. Non devono formare strutture secondarie come, ad esempio, forcine, eterodimeri o omodimeri; ciò può essere verificato attraverso la piattaforma BLAT (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) inserendo come input la sequenza del primer reverse e del primer forward.

3.7 Gradient PCR

Al fine di testare le temperature di annealing ottimali al funzionamento dei primers utilizzati in *real-time PCR*, è stata applicata la tecnica molecolare *gradient PCR*. I reagenti utilizzati nella mix di reazione sono indicati in *Tabella 4*.

Reagenti	Volume per 1 reazione
<i>GoTaq</i> ® Reaction Buffer 5X (Promega, M791A)	2,5 µl
dNTPs (1 mM) (Invitrogen™, 10297018)	2,5 µl
<i>Primer Forward</i> (10 µM)	0,5 µl
<i>Primer Reverse</i> (10 µM)	0,5 µl
<i>GoTaq</i> ® DNA Polymerase (5 U/µL) (Promega, M7848)	0,06 µl
Acqua DNasi/RNasi free (Invitrogen, 10977035)	5,44 µl
cDNA (5 ng/µl)	1 µl
Volume finale	12,5 µl

Tabella 4. Reagenti implicati nella reazione di PCR. I volumi riportati fanno riferimento ad un ad una sola reazione.

La reazione di PCR è stata eseguita seguendo il protocollo riportato in *Tabella 5*.

Fasi	Temperatura	Durata	Numero di cicli
Attivazione della DNA polimerasi	95°C	2 minuti	1
Denaturazione	95°C	30 secondi	38
Annealing	59°C	30 secondi	
Estensione	72°C	30 secondi	
Estensione finale	72°C	5 minuti	1

Tabella 5. Fasi, temperatura, durata e numero di cicli della reazione di PCR.

I prodotti di amplificazione sono stati successivamente separati attraverso un'elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% in TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM acido acetico glaciale, 1 mM EDTA, pH 8,2-8,4). L'aggiunta al gel

dell'intercalante del DNA *GelRed*TM *Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, SCT123), in rapporto 1:50000, permette la visualizzazione degli ampliconi.

In ciascun pozzetto vengono caricati 10 µl di campione. Inoltre, per avere una indicazione sulla migrazione dei frammenti nel gel, vengono caricati 5 µL di *DNA ladder*, che rappresenta un marcatore di peso molecolare. La corsa elettroforetica viene inizialmente condotta a 80 V; successivamente, il voltaggio viene progressivamente aumentato fino a 120 V.

La visualizzazione del gel avviene tramite lo strumento *Gel Doc*TM *XR+* (Bio- Rad). Al fine di verificare che il prodotto amplificato corrisponda effettivamente a quello di nostro interesse, la posizione nel gel di agarosio viene confrontata con il numero di paia di base atteso, riportato nella piattaforma *In silico PCR* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?db=dm2>).

I primers testati sono riportati in *Tabella 6*.

Target	Primer	Sequenza
<i>TNNI</i> <i>Troponina I</i>	<i>Forward</i>	5' TCCGTGGGAAGTTCAAGCG 3'
	<i>Reverse</i>	5' GACTTGGCGGCATCAAACATC 3'

Tabella 6. Primers testati con la tecnica *gradient PCR*.

3.8 qPCR

La *real-time PCR*, o PCR quantitativa (qPCR), è una tecnica molecolare che permette l'amplificazione del cDNA e la simultanea rilevazione quantitativa del prodotto di amplificazione. La molecola SYBR Green utilizzata nella reazione si intercala alla doppia elica, la sua fluorescenza viene quindi rilevata ed è proporzionale alla quantità di amplificato prodotto. È così possibile ottenere il ciclo soglia (C_t), che equivale al ciclo a cui il segnale è abbastanza forte per essere rilevato dal software. Il C_t è proporzionale alla quantità di template inizialmente presente.

La *real-time PCR* è stata eseguita al fine di valutare l'espressione di geni che codificano proteine facenti parte i dischi intercalari, l'espressione di *markers* caratteristici di cellule epicardiche, fibroblasti cardiaci, cellule endoteliali, cardiomiociti e l'espressione di un *marker* di pluripotenza. Le coppie di *primers* utilizzate per l'amplificazione dei diversi geni vengono riportate in *Tabella 7*.

Target	Primer	Sequenza
<i>COL1A1</i> <i>Catena α1 del</i> <i>collagene di tipo I</i>	<i>Forward</i>	5' CGAGGCTCTGAAGGTCCC 3'
	<i>Reverse</i>	5' CAGGAGCACCATTGGCAC 3'
<i>COL3A1</i> <i>Catena α1 del</i>	<i>Forward</i>	5' CTGGTCCCGAAGGAGGAAAG 3'
	<i>Reverse</i>	5' TAGGACCAGTAGGACCCCTTG 3'

<i>collagene di tipo III</i>		
<i>CX43</i>	<i>Forward</i>	5' TCTGAGTGCCTGAACTTGCC 3'
<i>Connexina 43</i>	<i>Reverse</i>	5' CCCTCCAGCAGTTGAGTAGG 3'
<i>DSG2</i>	<i>Forward</i>	5' TGCTGCTTCTCCTGATCTGC 3'
<i>Desmogleina-2</i>	<i>Reverse</i>	5' CAGATCCTCTCCCTCCCGAA 3'
<i>DSP</i>	<i>Forward</i>	5' CTCGGACGGCTACTGTCAA 3'
<i>Desmoplachina</i>	<i>Reverse</i>	5' GCCTGGGCAAACACTCATC 3'
<i>GATA4</i>	<i>Forward</i>	5' AAACGGAAGCCCAAGAACCT 3'
<i>GATA binding protein 4</i>	<i>Reverse</i>	5' GAGAACGTCTGGGACACGG 3'
<i>JUP</i>	<i>Forward</i>	5' CGCATCTCCGAGGACAAGAA 3'
<i>Placoglobina</i>	<i>Reverse</i>	5' TGGCATCCATGTCATCTCCAT 3'
<i>L7</i>	<i>Forward</i>	5' AATTCGAATGGCGAGGATGGCAAG 3'
<i>Proteina ribosomale 60S L7</i>	<i>Reverse</i>	5' TGCAACACCTTTCGAACCTTTGGG 3'
<i>NANOG</i>	<i>Forward</i>	5' TGTGTTCTCTTCCACCCAGC 3'
<i>Homebox protein NANOG</i>	<i>Reverse</i>	5' ACCAGGTCTTCACCTGTTTG 3'
<i>PECAM</i>	<i>Forward</i>	5' ACCAGGTCTTCACCTGTTTG 3'
<i>Molecola di adesione delle cellule endoteliali piastriniche</i>	<i>Reverse</i>	5' GGGATGTGCATCTGGCCTT 3'
<i>TBX18</i>	<i>Forward</i>	5' GACGATCTTCTCCCATCAAGC 3'
<i>T-box transcription factor 18</i>	<i>Reverse</i>	5' CTATCTTCAGGCGAGTAATCTGC 3'
<i>TCF21</i>	<i>Forward</i>	5' CTGACGTGGCCCTTTATGGT 3'
<i>Trascription Factor 21</i>	<i>Reverse</i>	5' CGCTCCAGGTACCAAACCTCC 3'
<i>TNNI</i>	<i>Forward</i>	5' TCCGTGGGAAGTTCAAGCG 3'
<i>Troponina I</i>	<i>Reverse</i>	5' GACTTGGCGGCATCAAACATC 3'
<i>VIM</i>	<i>Forward</i>	5' TGCCGTTGAAGCTGCTAACTA 3'
<i>Vimentina</i>	<i>Reverse</i>	5' CCAGAGGGAGTGAATCCAGATTA 3'
<i>WT1</i>	<i>Forward</i>	5' TGTCAGCGAAAGTTCTCCCG 3'
<i>Proteina del tumore di Wilms</i>	<i>Reverse</i>	5' GCTGAAGGGCTTTTCACTTGT 3'

Tabella 7. In tabella sono riportate le coppie di *primers* utilizzate per l'amplificazione di mRNA codificanti proteine dei dischi intercalari (*DSP*, *DSG2*, *JUP*, *CX43*), *markers* caratteristici di cellule epicardiche (*WT1*, *TBX18*, *TCF21*), *marker* di cellule endoteliali (*PECAM*), *marker* dei cardiomiociti (*TNNI*) e un *marker* di pluripotenza (*NANOG*). Sono riportati anche i *primers* per l'amplificazione dell'mRNA del gene *housekeeping* (*L7*).

La qPCR è stata eseguita utilizzando il kit *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, A25742). Per ogni gene analizzato, viene preparata una mix di reazione con primers specifici. I reagenti della mix di reazione sono riportati in *Tabella 8*.

Reagenti	Volume per 1 reazione
<i>Master mix PowerUp™ SYBR™ Green</i>	7 µl
<i>Primer forward</i>	1 µl
<i>Primer reverse</i>	1 µl
Volume finale	9 µl

Tabella 8. Reagenti implicati nella reazione di *real-time* PCR. I volumi riportati fanno riferimento ad un ad una sola reazione.

In ciascun pozzetto di una piastra da 384 vengono caricati dapprima 9 µl di mix e successivamente 1 µl di cDNA concentrato 5 ng/µl. Nei controlli negativi anziché cDNA viene aliquotato 1 µl di acqua DNAsi, RNAsi free. Ciascuno dei campioni è stato analizzato in triplicato tecnico al fine di supportare statisticamente i risultati. Durante il caricamento, piastra, campioni e mix vengono tenuti in ghiaccio. Successivamente, la piastra viene coperta con una pellicola, centrifugata e inserita nel macchinario CFX-384™ *Real-time System* (Bio-Rad). Il programma di reazione viene riportato in *Tabella 9*.

Fasi	Temperatura	Durata	Numero di cicli
Attivazione dell'uracil-n-glicosilasi	50°C	2 minuti	1
Attivazione della DNA polimerasi	95°C	2 minuti	1
Denaturazione	95°C	15 secondi	40
<i>Annealing</i> ed estensione	60°C	1 minuto	
Curva di dissociazione	65°C - 95°C		1

Tabella 9. Fasi, temperatura, durata e numero di cicli della reazione di *real-time* PCR.

L'elaborazione dei dati viene eseguita mediante il software *CFX Manager™* (Bio-Rad). Se la deviazione standard dei tre replicati tecnici è superiore a 0,35 viene esclusa dall'analisi la curva che si discosta maggiormente dalle altre due.

L'analisi è stata effettuata applicando il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Il gene L7, codificante la proteina ribosomale 60S L7, è stato utilizzato come gene *housekeeping* per la normalizzazione dei dati. Per ciascun gene d'interesse, viene calcolata la media dei Ct dei replicati tecnici e successivamente questa viene normalizzata sulla media dei

triplicati tecnici del gene *housekeeping*. Si ottiene quindi il ΔCt , che corrisponde alla differenza del Ct del gene d'interesse e il Ct del gene *housekeeping* per lo stesso campione. Successivamente, viene calcolato il $\Delta\Delta Ct$ ovvero la differenza tra il ΔCt della condizione presa in esame e il ΔCt del campione di controllo. Infine, l'espressione di ciascun gene preso in analisi è stata ottenuta dividendo ciascun $2^{(-\Delta Ct)}$ per la media dei $2^{(-\Delta Ct)}$ delle condizioni di controllo.

3.9 Immunofluorescenza

Il terreno di coltura viene rimosso dal pozzetto e sostituito con DPBS 1X. Il vetrino viene fissato mediante l'aggiunta di paraformaldeide (PFA, Sigma-Aldrich, P-6148) al 4% in DPBS. Il processo di fissazione viene svolta sotto cappa chimica e ha una durata di circa 15 minuti. Vengono eseguiti 3 lavaggi da 5 minuti con DPBS per assicurare la completa rimozione della PFA. A questo punto i vetrini possono essere conservati, parafilmati, a 4°C o si può procedere immediatamente con la fase di permeabilizzazione. L'aggiunta di Triton (Fluka, 93426) allo 0,1% in DPBS, per 15 minuti, garantisce la solubilizzazione delle proteine di membrana e permette quindi la permeazione degli anticorpi all'interno della cellula, qualora questi siano diretti contro antigeni citoplasmatici o nucleari. In seguito ad un lavaggio di 5 minuti con DPBS, ad ogni pozzetto viene aggiunto, FBS (Gibco, A5256701) al 10% (in DPBS); ciò permette la saturazione dei siti di legami aspecifici. Il *blocking* avviene per 1 ora a temperatura ambiente. Si effettua un lavaggio di 5 minuti con DPBS e si procede alla diluizione degli anticorpi primari in BSA (Sigma-Aldrich, A7906) al 3% in DPBS. Gli anticorpi devono essere mantenuti in ghiaccio e al buio. A ciascun pozzetto vengono aggiunti 40 μ l di anticorpo primario, ad eccezione dei controlli negativi a cui si aggiungono 40 μ l di DPBS. La lista degli anticorpi primari utilizzati, con le rispettive diluizioni, è riportata in *Tabella 10*. Gli anticorpi vengono incubati overnight, al buio, a 4°C.

Target	Fornitore	N. catalogo	Specie	Diluizione	Usato per...
COL1A1	Sigma-Aldrich	MAB3391	Mouse	1:100	Fibroblasti
CX43	Sigma-Aldrich	HPA035097	Rabbit	1:100	Epicardial Fibroblasti
DSG2	Santa Cruz	sc-80663	Mouse	1:300	Epicardial Fibroblasti
DSP	Abcam	ab71690	Rabbit	1:100	Epicardial Fibroblasti
GATA4	Santa Cruz	sc-25310	Mouse	1:100	Fibroblasti
JUP	Sigma-Aldrich	HPA032047	Rabbit	1:100	Epicardial Fibroblasti
TBX18	Abcam	ab115262	Rabbit	1:200	Epicardial

WT1	Abcam	ab89901	Rabbit	1:250	Epicardial
VIM	Sigma-Aldrich	V6630	Mouse	1:100	Fibroblasti
ZO-1	Thermo Fisher Scientific	33-9100	Mouse	1:100	Epicardial

Tabella 10. In tabella sono riportati gli anticorpi primari utilizzati per la visualizzazione delle proteine dei dischi intercalari (DSP, DSG2, JUP, CX43, DSC, DES, PKP2), di marker caratteristici delle cellule epicardiche (ZO-1, TBX18, WT1) e marker caratteristici dei fibroblasti (GATA4, COL1A1, VIM). Inoltre, viene indicato il produttore, il numero di catalogo e la diluizione alla quale vengono utilizzati.

Il giorno seguente, vengono effettuati 3 lavaggi da 5 minuti con DPBS, successivamente ai quali vengono aggiunti, ad ogni pozzetto, 40 μ l di anticorpo secondario, diluito in BSA al 3% in DPBS. In *Tabella 11* vengono riportati gli anticorpi secondari utilizzati e le rispettive diluizioni. L'incubazione avviene per 1 ora, al buio, a temperatura ambiente.

Specie target	Fornitore	N. catalogo	Diluizione	Specie
Alexa 488 Anti-mouse	Jackson ImmunoResearch	715605150	1:200	Asino
Alexa 647 Anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch	712545150	1:200	Asino

Tabella 11. In tabella sono riportati gli anticorpi secondari utilizzati nella reazione di immunofluorescenza. Viene indicato il produttore, il numero di catalogo e la diluizione alla quale vengono utilizzati.

In seguito a 3 lavaggi da 5 minuti con DPBS, ciascun pozzetto viene incubato per 15 minuti a temperatura ambiente con 40 μ l di DAPI (Invitrogen, 00-4959-52) diluito 1:500 in DPBS. Il DAPI si lega a specifiche regioni del DNA, garantendo così la colorazione del nucleo. Vengono eseguiti gli ultimi 3 lavaggi da 5 minuti con DPBS. Infine, il vetrino contenente DPBS può essere conservato in frigo a 4°C al buio o analizzato immediatamente mediante microscopio confocale invertito Leica SP5.

3.10 Analisi statistiche

Tutti i risultati vengono presentati come la media \pm l'errore standard della media (SEM). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad™ Prism. Il test di normalità Shapiro-Wilk ha permesso di verificare la distribuzione normale dei gruppi presi in analisi. Per il confronto a coppie è stato utilizzato il test t di Student per campioni con distribuzione normale e il test t non parametrico di Mann-Whitney per campioni che non superano il test di normalità. Per il confronto

multiplo è stato utilizzato l'ANOVA per i campioni con distribuzione normale e il Kruskal-Wallis test per i campioni che non superano il test di normalità.

Le differenze vengono considerate significative quando il p-value $< 0,05$. Nei grafici viene riportato (*) quando il p-value $< 0,05$, (**) quando il p-value $< 0,01$, (***) quando il p-value $< 0,001$ e (****) quando il p-value $< 0,0001$.

4. RISULTATI

In questa tesi, hiPSCs ottenute da un paziente con una mutazione patogena nel gene codificante la desmoplachina (DSP c.817C>T hiPSCs), e i rispettivi controlli isogenici (DSP ISO hiPSCs), sono state differenziate in cellule epicardiche (hiPSCs-EPI) e fibroblasti cardiaci (hiPSCs-CFs). Successivamente, entrambi i tipi cellulari sono stati caratterizzati mediante Real-Time PCR e tecniche di immunofluorescenza.

4.1 Differenziamento di hiPSCs in cellule epicardiche

Il differenziamento di hiPSCs in cellule epicardiche è stato ottenuto applicando un protocollo pubblicato da Campostrini et. al, che prevede la somministrazione di fattori che regolano la via di segnalazione Wnt/ β -catenina, pathway chiave nell'embriogenesi cardiaca (23) (Figura 3).

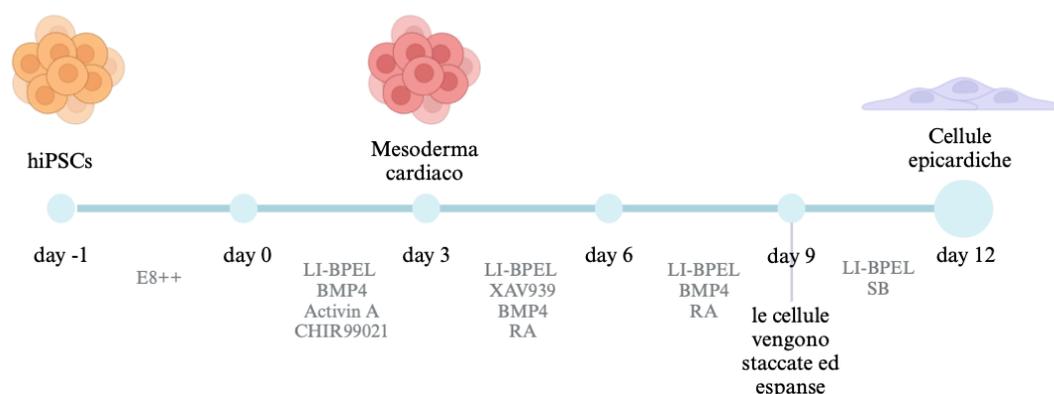


Figura 3. Rappresentazione schematica del protocollo utilizzato per il differenziamento di DSP ISO hiPSCs e DSP c.817C>T hiPSCs in cellule epicardiche. In figura sono indicati il mezzo di coltura e i supplement utilizzati. Adattato da (21) mediante l'utilizzo di BioRender.

In preparazione al differenziamento, le hiPSCs sono state splittate e seminate con un seeding di $1,2 \times 10^5$ cellule/pozzetto, per quanto riguarda le hiPSCs mutate, e 10^5 cellule/pozzetto per i rispettivi controlli isogenici. Il seeding ottimale è stato inizialmente testato mediante differenziamenti di prova.

Al giorno 0 di differenziamento, è stato somministrato CHIR 99021, un fattore che inibisce la GSK3 β , portando all'attivazione del pathway Wnt, fondamentale per la specificazione a mesoderma cardiaco. CHIR 99021 agisce in maniera sinergica con le citochine BMP4 e Activin A, che attraverso la regolazione della via Smad e della via TGF β /Activin/Nodal promuovono l'espressione di geni mesodermici.

Al terzo giorno di differenziamento, è stato aggiunto al mezzo di coltura XAV 939, una molecola che causa la destabilizzazione della β -catenina e quindi lo

spegnimento della via Wnt, necessario all'induzione del differenziamento in cellule pro-epicardiche.

Il terzo e il sesto giorno sono stati somministrati BMP4 e RA, i quali promuovono l'espressione di geni pro-epicardici e bloccano il differenziamento in cardiomiociti. Il giorno 9 le cellule sono state splittate, espanse e risospese in un mezzo di coltura contenente SB431542, un inibitore della via di segnalazione TGF β . Tale terreno di coltura è stato mantenuto fino al giorno 12 (24).

Le hiPSCs-EPI al giorno 12 di differenziamento appaiono con una forma più allungata e affusolata rispetto alla tipica forma rotondeggiante delle hiPSCs indifferenziate (Figura 4).

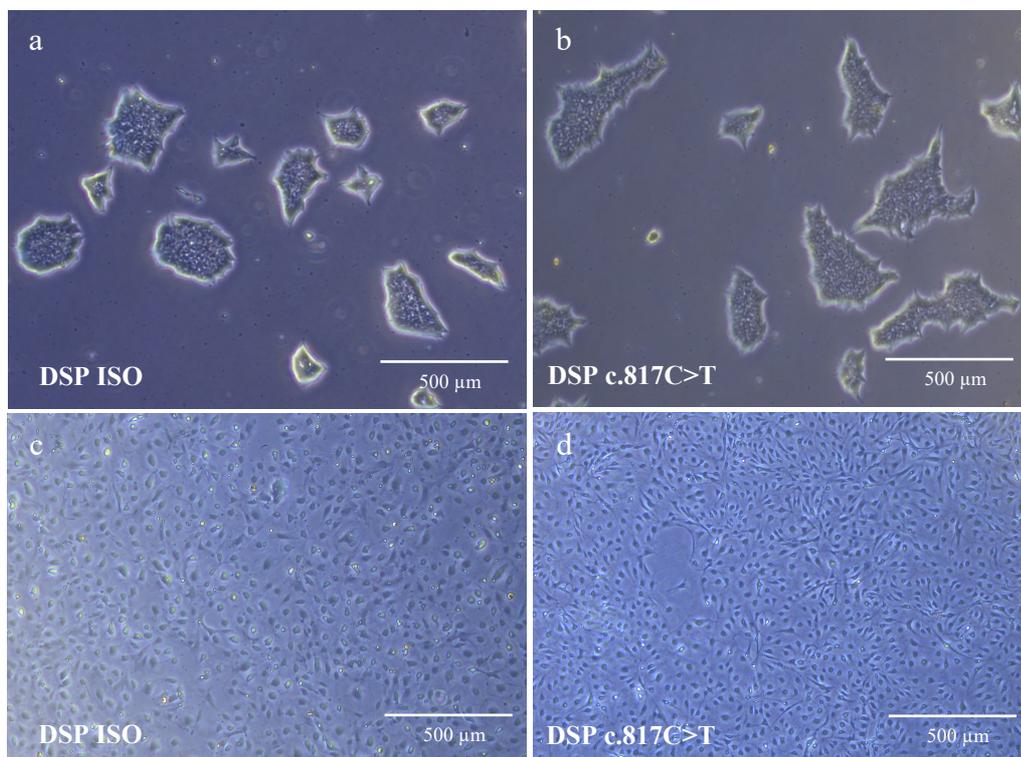


Figura 4. Immagini al microscopio ottico di DSP ISO hiPSCs (a) e DSP c.817C>T hiPSCs (b) al giorno -1 di differenziamento e di DSP ISO hiPSCs-EPI (c) e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI (d) al giorno 12 di differenziamento.

Al termine del differenziamento, ho proceduto alla caratterizzazione delle cellule differenziate mediante immunofluorescenza e Real-Time PCR.

4.1.1 Analisi di proteine *markers* di cellule epicardiche e di proteine dei dischi intercalari mediante immunofluorescenza

Al termine del differenziamento, una parte delle cellule ottenute è stata seminata su vetrini e sono state eseguite analisi di immunofluorescenza.

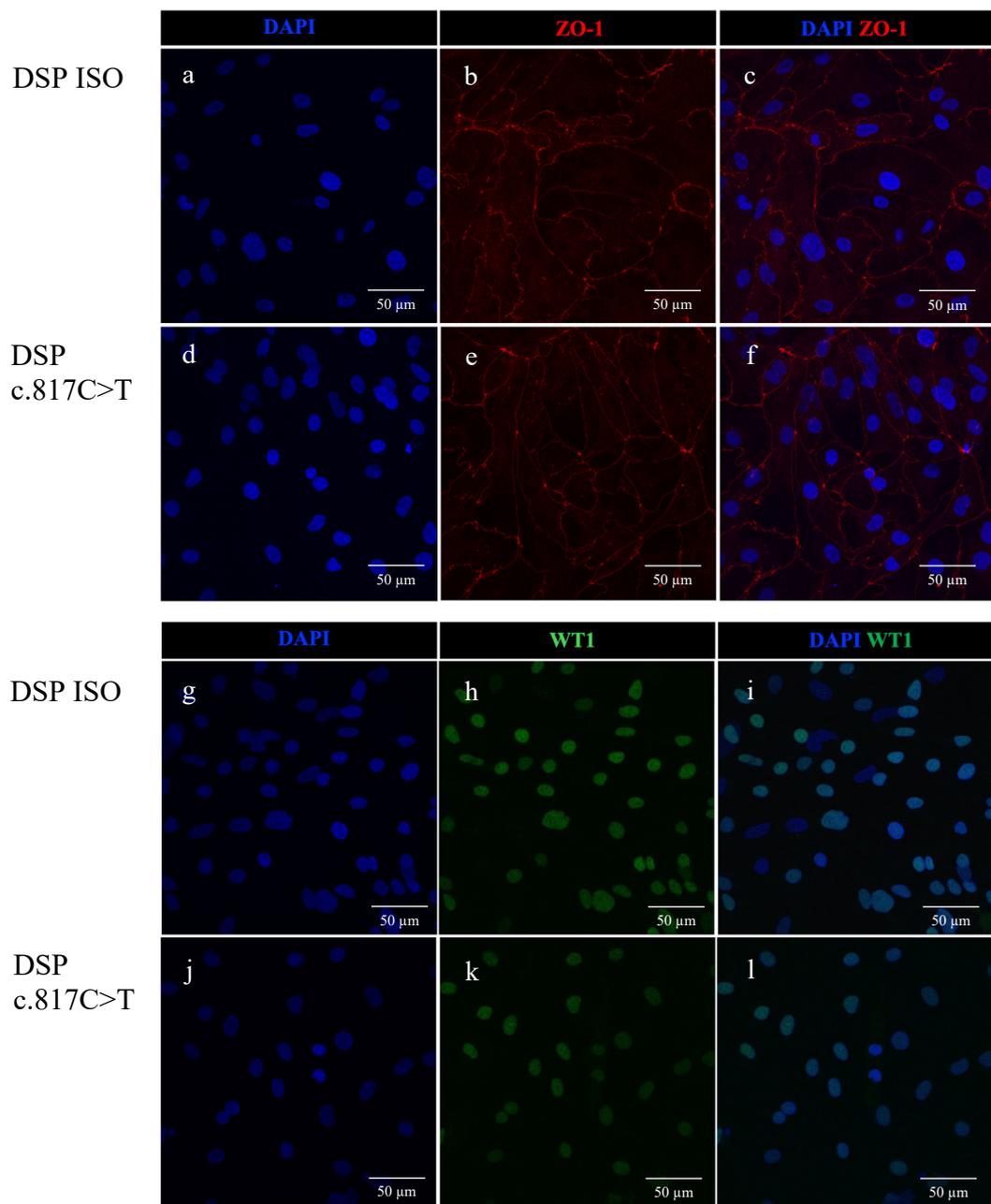
Al fine di verificare la riuscita del differenziamento, è stata valutata la presenza di marcatori di cellule epicardiche quali i fattori di trascrizione proteina del tumore di

Wilms (WT1) e il T-Box Transcription Factor 18 (TBX18) e la proteina giunzionale Zonula Occludens 1 (ZO-1).

Inoltre, sono state eseguite analisi di immunofluorescenza atte a valutare la presenza e la localizzazione delle proteine desmosomali JUP, DSP, DSG2 e della proteina delle giunzioni comunicanti CX43.

Le analisi di immunofluorescenza sono state eseguite su quattro repliche biologiche di cellule mutate e sui rispettivi controlli isogenici.

L'esito delle analisi ha evidenziato la presenza dei marcatori caratteristici di cellule epicardiche in hiPSCs-EPI al termine del differenziamento. La proteina giunzionale ZO-1 è stata localizzata in membrana, il fattore di trascrizione WT1 a livello nucleare e TBX18 nel nucleo e a livello citosolico (Figura 5).



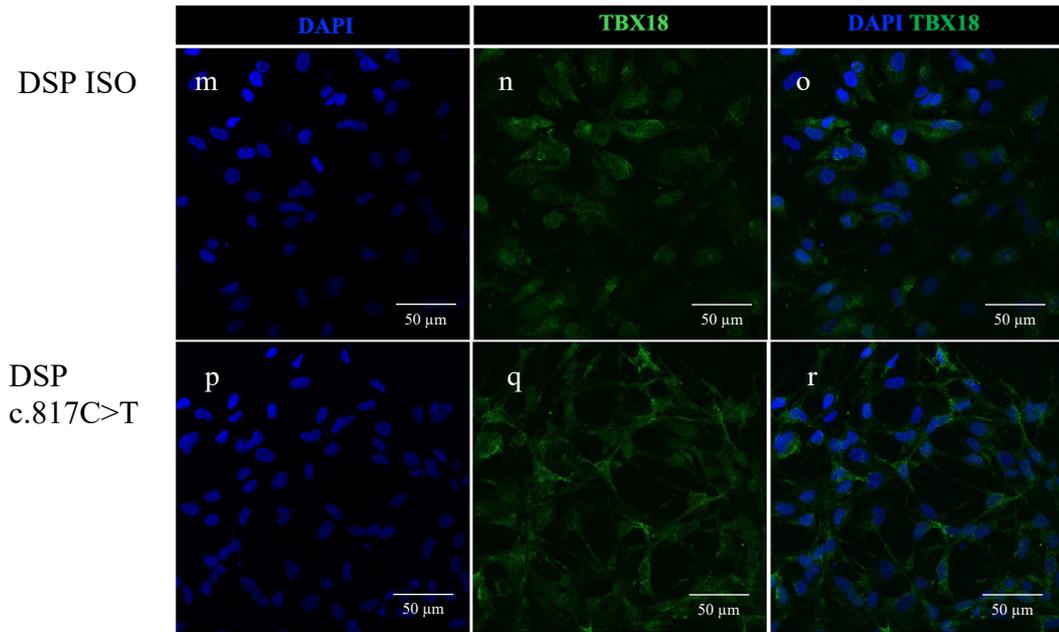


Figura 5. Immagini rappresentative di analisi di immunofluorescenza dei marcatori epicardici ZO-1 (a-f), WT1 (g-l) e TBX18 (m-r) in DSP ISO (a-c, g-i, m-o) e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI (d-f, j-l, p-r) al termine del differenziamento.

Per ciascuna replica, la conta dei nuclei positivi per WT1 e delle cellule positive per TBX18 ha evidenziato che almeno il 70% delle cellule differenziate esprime questi marcatori di differenziamento (Figura 6). Inoltre, non si evidenziano differenze significative tra cellule mutate e controlli isogenici.

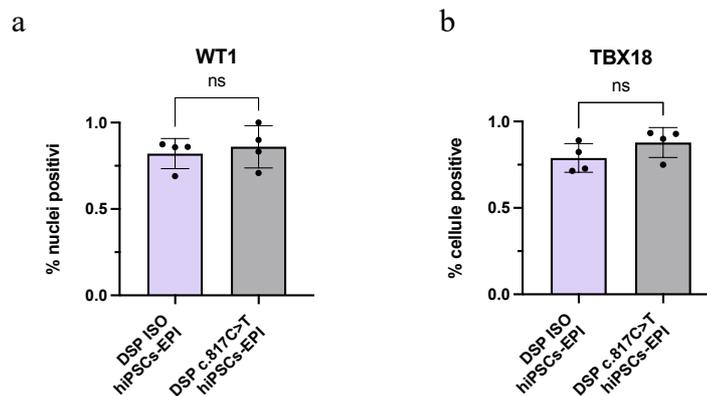
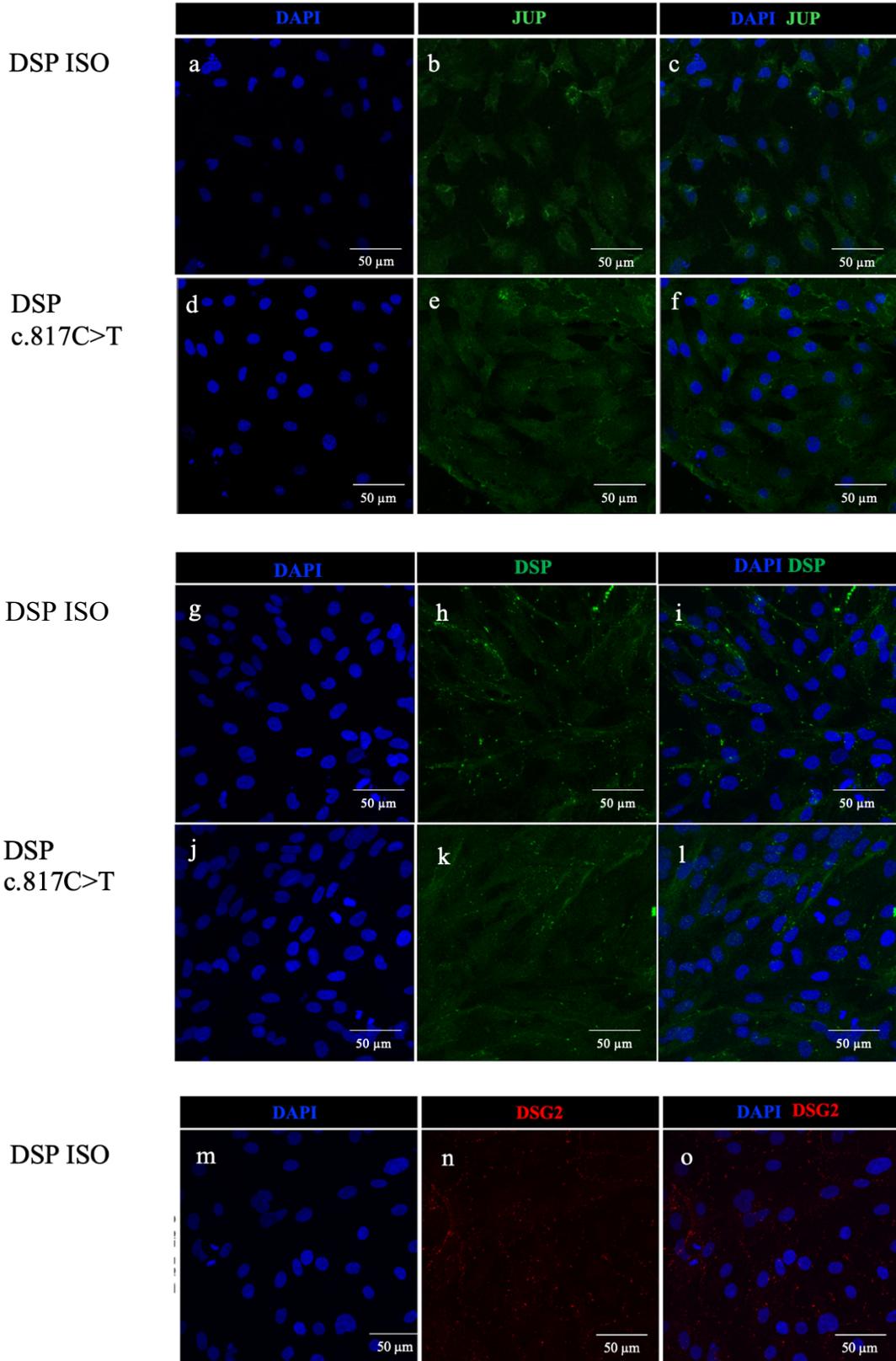


Figura 6. I grafici riportano la percentuale di nuclei positivi per WT1 (a) e di cellule positive per TBX18 (b) in DSP ISO hiPSCs-EPI [n = 4] vs. DSP c.817C>T hiPSCs-EPI [n = 4]. I risultati sono rappresentati come la media dei valori e l'errore standard dalla media. Le analisi statistiche sono state svolte con il test t di Student e il test t non parametrico di Mann-Whitney.

Le analisi di immunofluorescenza hanno evidenziato la presenza di proteine dei dischi intercalari in DSP ISO hiPSCs-EPI e DSP c.817c>T hiPSCs EPI. Per quanto riguarda la localizzazione, JUP e DSP si trovano principalmente nel citosol e concentrate in alcuni punti in membrana. JUP può trovarsi anche in zona

perinucleare mentre DSG2 sembra essere presente perlopiù a livello di membrana. CX43 si localizza principalmente in membrana e in alcuni casi si osserva un accumulo in zona perinucleare (Figura 7).



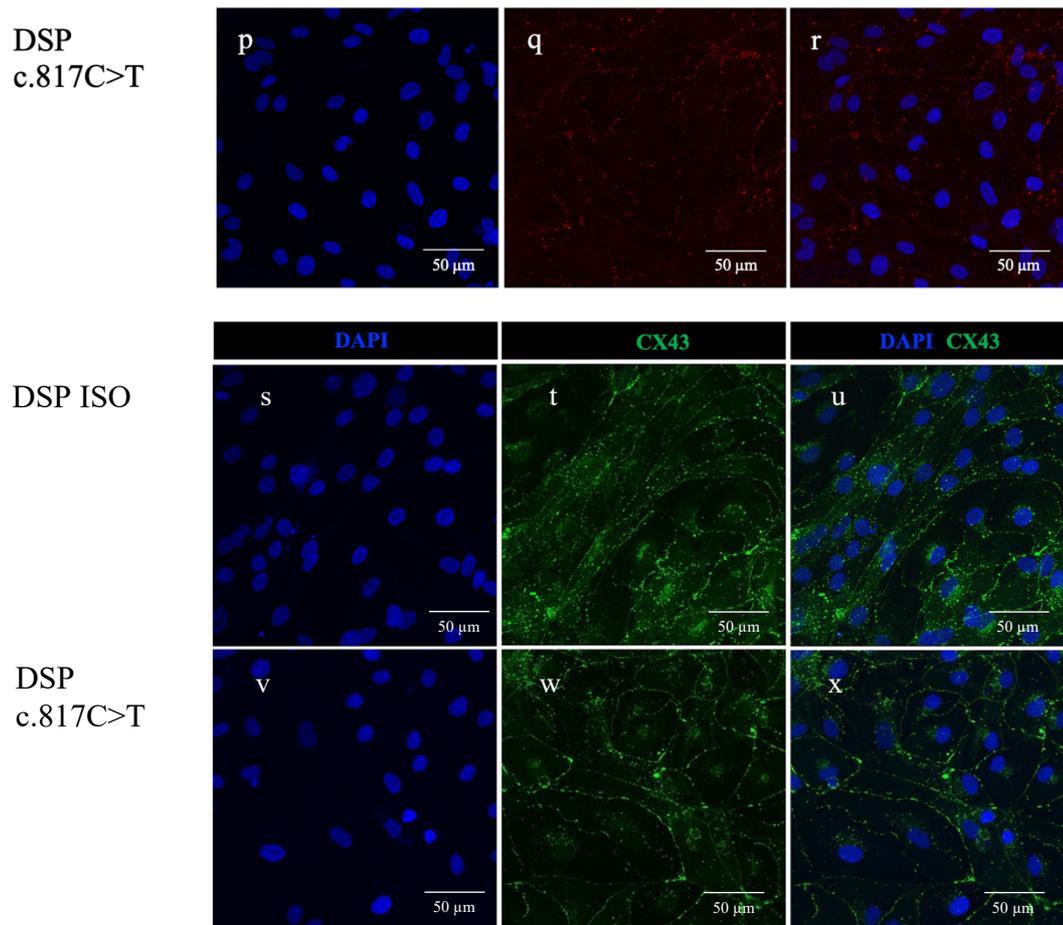


Figura 7. Immagini rappresentative di analisi di immunofluorescenza delle proteine desmosomali JUP (a-f), DSP (g-l) e DSG2 (m-r) e della proteina delle giunzioni comunicanti CX43 (s-x) in DSP ISO (a-c, g-i, m-o, s-u) e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI (d-f, j-l, p-r, v-x) al giorno 12 di differenziamento.

4.1.2 Valutazione dell'espressione di geni *markers* di cellule epicardiche, di geni desmosomali e di geni *markers* di altri tipi cellulari mediante Real-Time PCR

Al termine del differenziamento in cellule epicardiche, per ciascuna replica ottenuta, parte delle cellule sono state messe in Trizol ed è stata eseguita l'estrazione di RNA mediante il protocollo TRIzol™ (Invitrogen™). Successivamente, mediante retrotrascrizione, è stato ottenuto il cDNA, da utilizzare come template nella reazione di Real-Time PCR.

La tecnica di Real-Time PCR ha permesso di verificare l'efficacia del differenziamento attraverso la valutazione dell'espressione di *markers* caratteristici di cellule epicardiche quali i fattori di trascrizione *WT1*, *TBX18* e il *Transcription Factor 21 (TCF21)*.

Al fine di accertare la purezza del differenziamento è stata inoltre analizzata l'espressione di *markers* caratteristici di altri tipi cellulari. In particolare, sono stati presi in considerazione *PECAM*, un marcatore delle cellule endoteliali; *GATA4*, un

marcatore dei fibroblasti cardiaci; la *Troponina I* (*TNNI*), un marcatore dei cardiomiociti; e il marcatore di pluripotenza *NANOG*.

Infine, è stata valutata l'espressione dei geni desmosomali *JUP*, *DSP*, *DSG2* e del gene codificante la proteina delle giunzioni comunicanti *CX43* allo scopo di ottenere maggiori informazioni sull'espressione di geni codificanti proteine dei dischi intercalari in cellule epicardiche.

I dati ottenuti derivano dall'analisi di 8 repliche biologiche di cellule mutate e controlli isogenici.

Le analisi di Real-Time PCR hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo dell'espressione dei *markers* di cellule epicardiche *WT1*, *TBX18* e *TCF21* in DSP ISO hiPSCs-EPI e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI rispetto ad hiPSCs indifferenziate. Non si evidenziano differenze significative per alcuno dei marcatori, tra DSP ISO hiPSCs-EPI e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI (Figura 8).

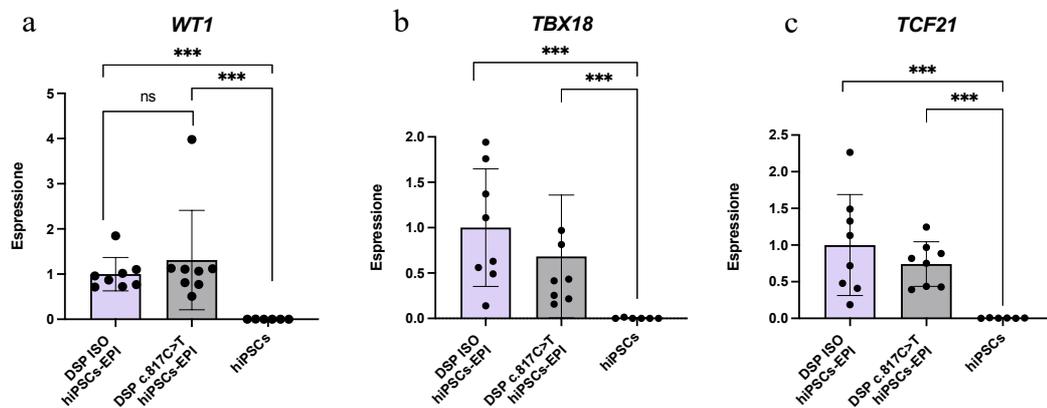


Figura 8. I grafici riportano i livelli di espressione dei geni *markers* delle cellule epicardiche *WT1* (a), *TBX18* (b) e *TCF21* (c) in DSP ISO hiPSCs-EPI [n = 8], DSP c.817C>T hiPSCs-EPI [n = 8] e hiPSCs indifferenziate [n = 6]. I risultati sono rappresentati come la media dei valori e l'errore standard dalla media. Le analisi statistiche sono state svolte con il test parametrico ANOVA e il test non parametrico di Kruskal-Wallis. *** *p*-value < 0,001.

Dall'analisi dei marcatori di altri tipi cellulari è emersa una marcata riduzione dell'espressione del marcatore di pluripotenza *NANOG* in hiPSCs-EPI rispetto ad hiPSCs indifferenziate. Inoltre, non si osservano differenze significative tra hiPSCs-EPI e hiPSCs indifferenziate nell'espressione del marcatore delle cellule endoteliali *PECAM*. Per quanto riguarda, invece, i livelli del marcatore dei fibroblasti *GATA4* e del marcatore dei cardiomiociti *TNNI*, questi risultano aumentati in hiPSCs-EPI rispetto ad hiPSCs indifferenziate. Tra DSP ISO hiPSCs-EPI e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI non sono state osservate differenze significative nell'espressione di alcuno dei marcatori di altri tipi cellulari analizzato (Figura 9).

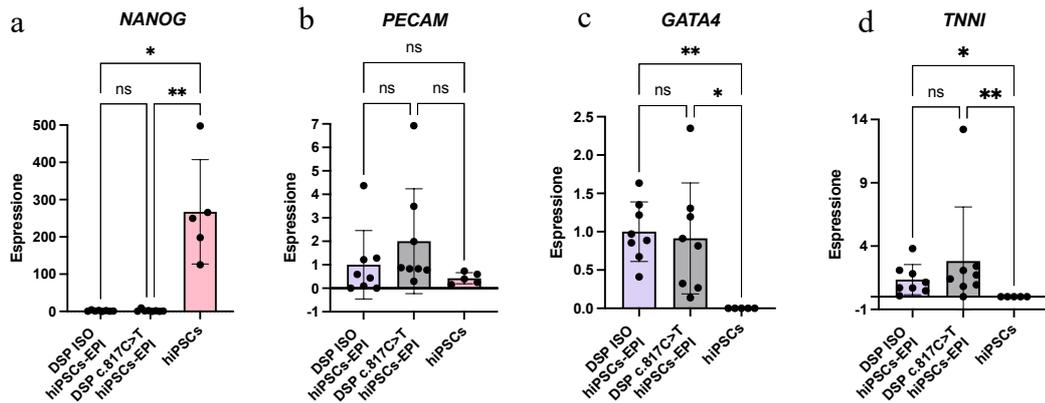


Figura 9. I grafici riportano i livelli di espressione del marcatore di pluripotenza *NANOG* (a), del marcatore delle cellule endoteliali *PECAM* (b), del marcatore dei fibroblasti *GATA4* (c) e del marcatore dei cardiomiociti *TNNT1* (d) in DSP ISO hiPSCs-EPI [n = 8], DSP c.817C>T hiPSCs-EPI [n = 8] e hiPSCs indifferenziate [n = 5]. I risultati sono rappresentati come la media dei valori e l'errore standard dalla media. Le analisi statistiche sono state svolte con il test parametrico ANOVA e il test non parametrico di Kruskal-Wallis. **p*-value < 0,05, ** *p*-value < 0,01.

Le analisi di Real-Time PCR hanno evidenziato che i geni dei dischi intercalari *JUP*, *DSP*, *DSG2* e *CX43* risultano essere espressi nelle hiPSCs-EPI. Per ciascun gene dei dischi intercalari analizzato, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa tra DSP ISO hiPSCs-EPI e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI (Figura 10). In *Tabella 12* sono riportati i valori in media dei Ct ottenuti.

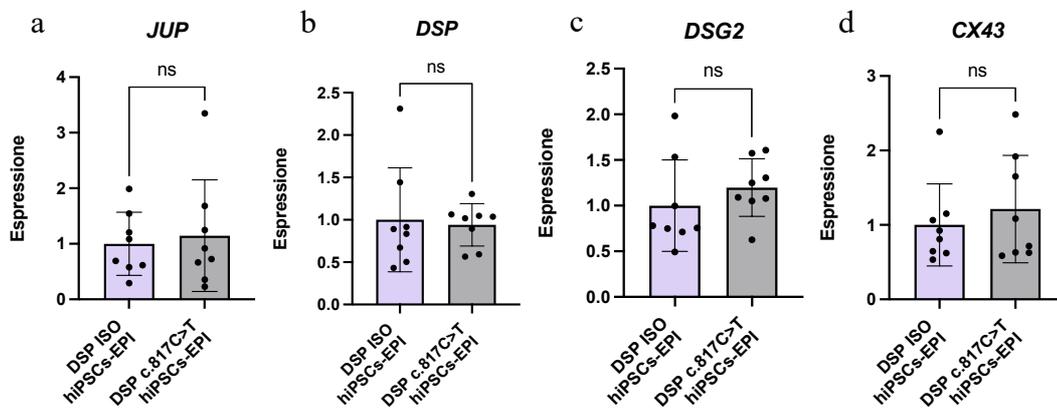


Figura 10. I grafici riportano i livelli di espressione dei geni desmosomali *JUP* (a), *DSP* (b), *DSG2* (c) e del gene codificante la proteina delle giunzioni comunicanti *CX43* (d), in DSP ISO hiPSCs-EPI [n = 8] e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI [n = 8]. I risultati sono rappresentati come la media dei valori e l'errore standard dalla media. Le analisi statistiche sono state svolte con il test t di Student e il test t non parametrico di Mann-Whitney.

<i>JUP</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
DSP ISO hiPSCs-EPI	23,02	24,51	25,20	23,20	22,44	23,63	22,64	22,68
DSP c.817C>T hiPSCs-EPI	24,99	23,48	23,81	23,89	23,88	23,36	23,10	23,8

DSP	1	2	3	4	5	6	7	8
DSP ISO hiPSCs-EPI	23,52	24,44	26,21	23,99	22,70	24,08	23,17	23,15
DSP c.817C>T hiPSCs-EPI	26,4	23,59	23,65	24,27	24,46	23,59	23,59	23,63
DSG2	1	2	3	4	5	6	7	8
DSP ISO hiPSCs-EPI	24,75	25,48	28,12	25,21	23,48	25,92	24,34	23,86
DSP c.817C>T hiPSCs-EPI	27,40	24,52	24,77	24,84	26,2	23,71	24,05	24,83
CX43	1	2	3	4	5	6	7	8
DSP ISO hiPSCs-EPI	22,42	23,21	24,91	22,6	22,77	23,20	23,19	22,20
DSP c.817C>T hiPSCs-EPI	24,00	23,13	20,73	21,30	23,30	21,36	22,97	24,43

Tabella 12. Valori in media dei Ct ottenuti dalle analisi di Real-Time PCR per i geni dei dischi intercalari *JUP*, *DSP*, *DSG2* e *CX43* in DSP ISO hiPSCs-EPI [n = 8] e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI [n = 8].

4.2 Differenziamento di hiPSCs-EPI in fibroblasti cardiaci

Una volta terminato il differenziamento delle hiPSCs in cellule epicardiche, le cellule ottenute sono state differenziate in fibroblasti cardiaci. Anche in questo caso il differenziamento è stato conseguito mediante l'applicazione del protocollo di differenziamento pubblicato da Campostrini et. al (23) (Figura 11).



Figura 11. Rappresentazione schematica del protocollo utilizzato per il differenziamento di DSP ISO hiPSCs-EPI e DSP c.817C>T hiPSCs-EPI in hiPSCs-CFs. In figura sono indicati il mezzo di coltura e i supplementi utilizzati. Adattato da (21) mediante l'utilizzo di BioRender.

Le cellule epicardiche neoformate sono state splittate e risospese in un terreno di induzione costituito da LI-BPEL addizionato a FGF-2, un fattore di crescita che promuove la proliferazione e la sopravvivenza dei fibroblasti. Tale mezzo di coltura è stato mantenuto fino al giorno 19, a partire dal quale è stato sostituito con il terreno FGM3, contenente nutrienti essenziali al mantenimento dei fibroblasti.

Il giorno 28, le cellule sono state splittate, espanse, e mantenute in mezzo di coltura FGM3 fino al giorno 33.

Le hiPSCs al giorno 28 di differenziamento (Figura 12) appaiono con una forma più allungata e fusiforme, tipica dei fibroblasti, rispetto alle hiPSCs al giorno 12 di differenziamento (Figura 4).

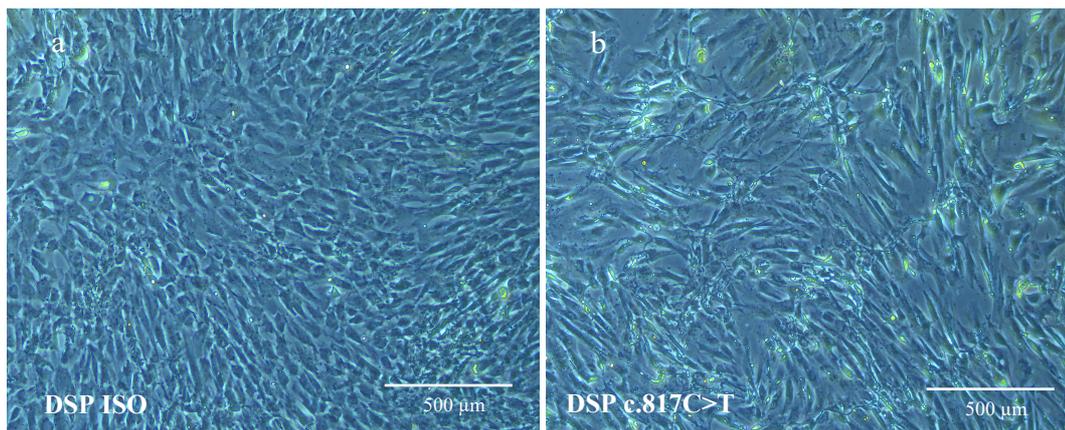


Figura 12. Immagine al microscopio ottico di DSP ISO hiPSCs (a) e DSP c.817C>T hiPSCs (b) al giorno 28 di differenziamento in fibroblasti cardiaci.

Al termine del differenziamento, le cellule ottenute sono state caratterizzate mediante immunofluorescenza e Real-Time PCR.

4.2.1 Analisi di proteine *markers* di fibroblasti cardiaci e di proteine dei dischi intercalari mediante immunofluorescenza

Parte delle cellule ottenute al termine del differenziamento in fibroblasti cardiaci, è stata seminata su vetrini per immunofluorescenza.

Al fine di valutare l'efficacia del differenziamento è stata analizzata la presenza di proteine presenti tipicamente nei fibroblasti. In particolare, sono stati presi in considerazione il fattore di trascrizione GATA4; la catena $\alpha 1$ del collagene di tipo I (COL1A1); e la proteina citoscheletrica vimentina (VIM).

Inoltre, è stata valutata la presenza e la localizzazione delle proteine desmosomali JUP, DSP, PKP2, DSC2, della proteina delle giunzioni comunicanti CX43 e del filamento intermedio desmina.

Le indagini sono state eseguite su tre repliche biologiche di cellule mutate e controlli isogenici.

Le analisi di immunofluorescenza eseguite al termine del differenziamento in fibroblasti cardiaci hanno evidenziato l'espressione dei marcatori caratteristici dei fibroblasti cardiaci in DSP ISO e DSP c.817C>T hiPSCs CFs. In ciascuna replica è stata osservata la presenza di GATA4, espresso principalmente a livello nucleare, COL1A1, espresso sia a livello citosolico che nel nucleo, e di VIM, localizzata a livello citoscheletrico (Figura 13).

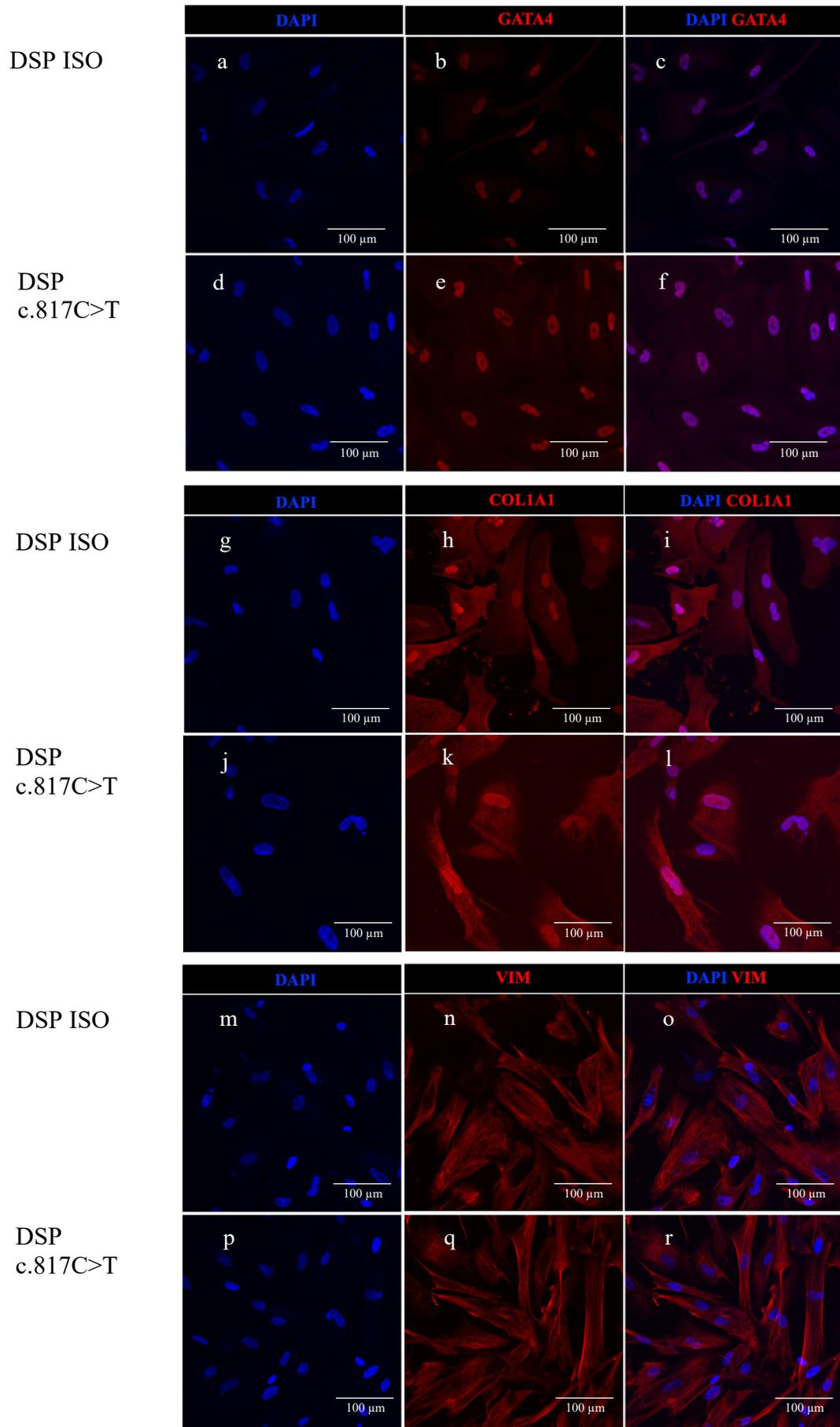
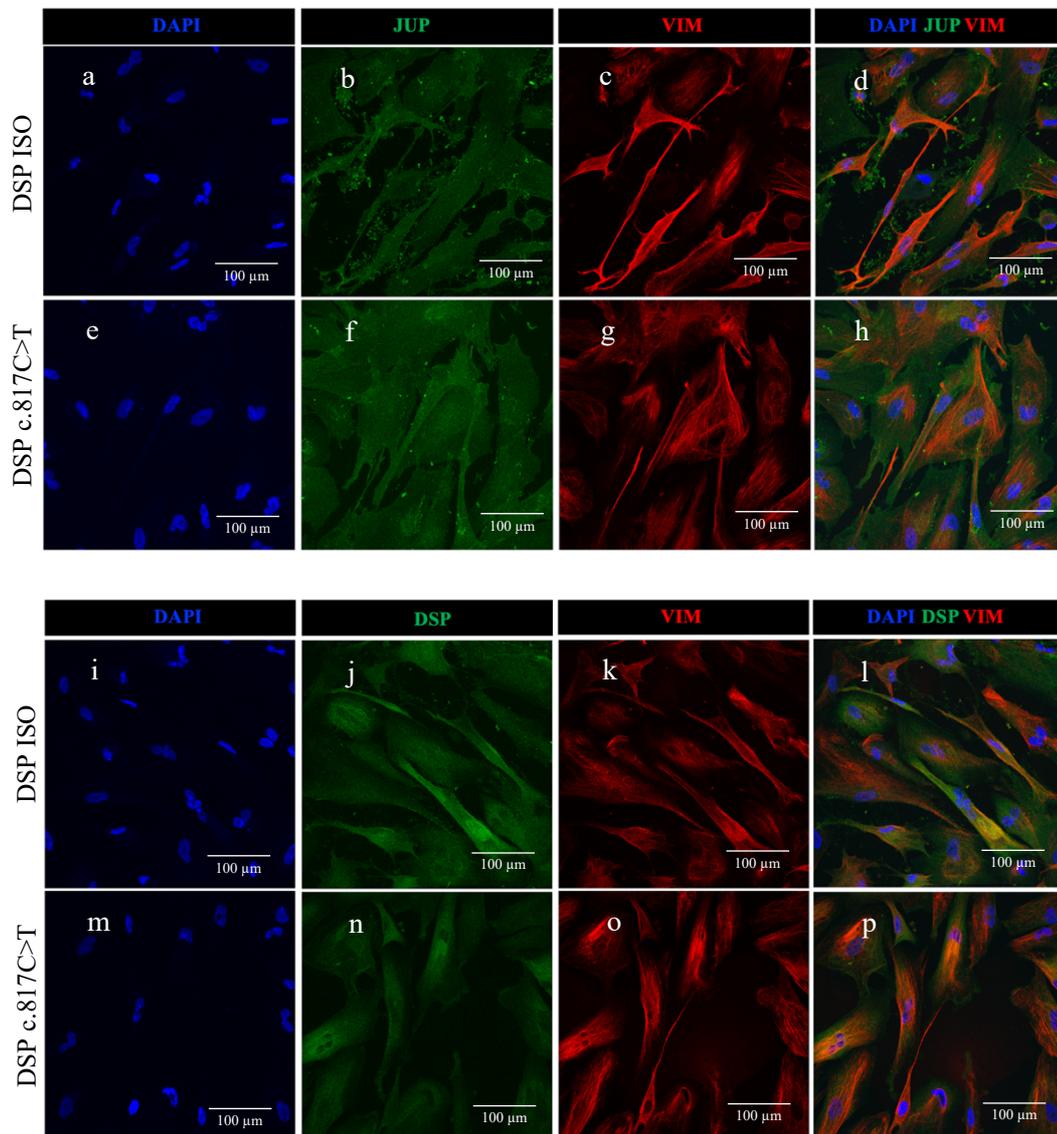


Figura 13. Immagini rappresentative di analisi di immunofluorescenza dei marcatori dei fibroblasti cardiaci GATA4 (a-f), COL1A1 (g-l) e VIM (m-r) in DSP ISO (a-c, g-i, m-o) e DSP c.817C>T (e-f, j-l, p-r) hiPSCs al termine del differenziamento in fibroblasti cardiaci.

Le analisi di immunofluorescenza hanno evidenziato l'espressione delle proteine desmosomali JUP e DSP e della proteina delle giunzioni comunicanti CX43 in hiPSCs-CFs. JUP e DSP si localizzano principalmente a livello citosolico mentre CX43 si trova a livello di membrana e in alcuni punti concentrata in vescicole (Figura 14).



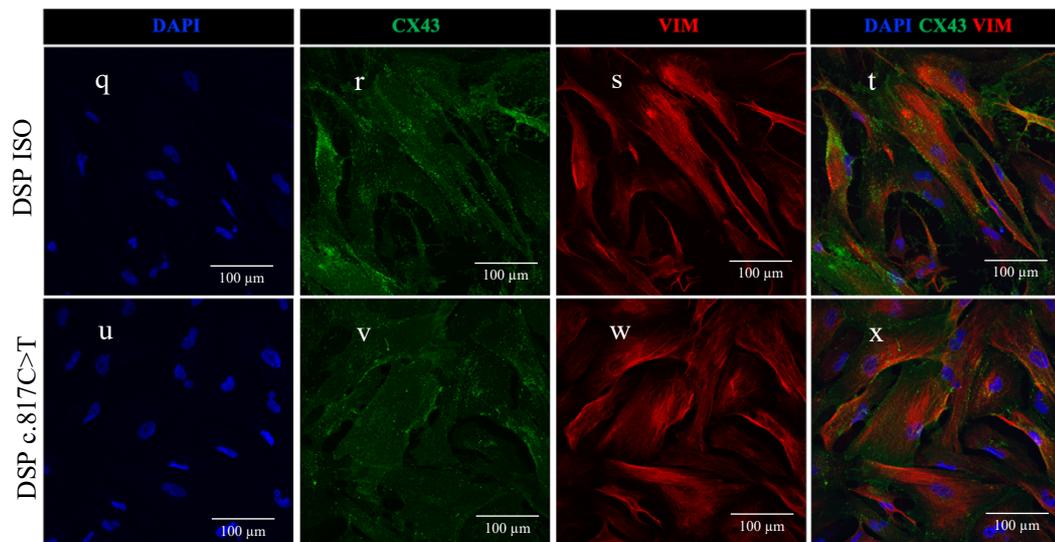


Figura 14. Immagini rappresentative di analisi di immunofluorescenza delle proteine desmosomali DSP (a-h) e JUP (i-p) e della proteina delle giunzioni comunicanti CX43 (q-x), insieme alla proteina citoscheletrica VIM in DSP ISO (a-d, i-l, q-t) e DSP c.817C>T hiPSCs (e-h, m-p, u-x) al termine del differenziamento in fibroblasti cardiaci.

4.2.2 Valutazione dell'espressione di geni *markers* di fibroblasti cardiaci, di geni desmosomali e di geni *markers* di altri tipi cellulari mediante Real-Time PCR

Mediante la tecnica di Real-Time PCR è stata valutata l'espressione dei geni *markers* dei fibroblasti cardiaci *GATA4*, *VIM*, *COL1A1* e la catena $\alpha 1$ del collagene di tipo III (*COL3A1*).

Inoltre, al fine di verificare la purezza del differenziamento sono stati analizzati geni *markers* di altri tipi cellulari quali *WT1*, marcatore delle cellule epicardiche, *TTNI*, marcatore dei cardiomiociti, *PECAM*, marcatore di cellule endoteliali e il marcatore di pluripotenza *NANOG*.

Infine, è stata valutata l'espressione dei geni desmosomali *DSP* e *JUP* e del gene codificante la proteina delle giunzioni comunicanti *CX43*.

Le analisi di Real-Time PCR hanno confermato l'espressione dei markers tipici dei fibroblasti in hiPSCs-CFs. L'espressione del gene *GATA4* risulta essere mediamente inferiore in cellule mutate rispetto ai controlli isogenici, mentre *COL1A1*, *COL3A1* e *VIM* hanno un'espressione mediamente maggiore in DSP c.817C>T hiPSCs-CFs rispetto a DSP ISO hiPSCs-CFs (Figura 15). Tuttavia, le differenze osservate non raggiungono la significatività statistica.

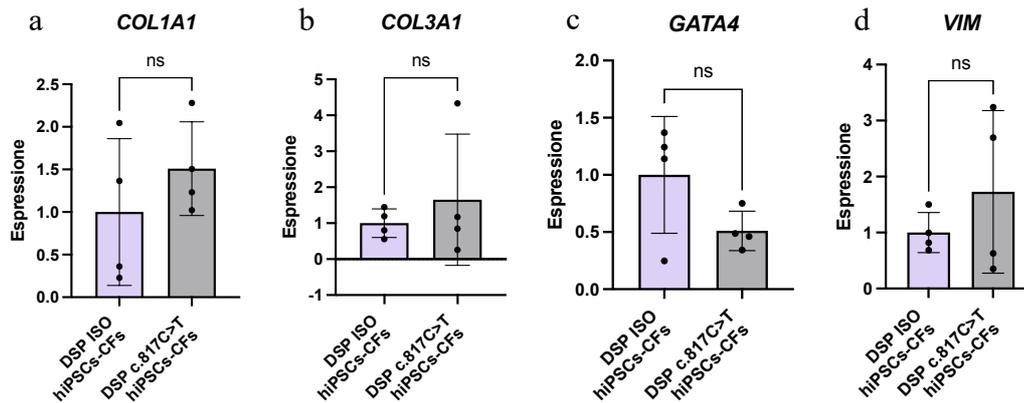


Figura 15. I grafici riportano i livelli di espressione dei *markers* dei fibroblasti *COL1A1* (a), *COL3A1* (b), *GATA4* (c) e *VIM* (d) in DSP ISO hiPSCs-CFs [n = 4] e DSP c.817C>T hiPSCs-CFs [n = 4]. I risultati sono rappresentati come la media dei valori e l'errore standard dalla media. Le analisi statistiche sono state svolte con il test t di Student e il test t non parametrico di Mann-Whitney.

Le analisi di Real-Time PCR hanno evidenziato una riduzione significativa dell'espressione del marcatore di pluripotenza *NANOG* in hiPSCs-CFs rispetto ad hiPSCs indifferenziate e del marcatore delle cellule epicardiche *WT1* in hiPSCs-CFs rispetto ad hiPSCs-EPI. Non si osservano differenze significative tra hiPSCs-CFs e hiPSCs indifferenziate nell'espressione del marcatore delle cellule endoteliali *PECAM*. Per quanto riguarda il marcatore dei cardiomiociti *TNNI*, le analisi di Real-Time PCR, per ciascuna replica, sono risultate in valori di Ct in media superiori a 38, indice di una quantità di template iniziale molto bassa o assente. Non si osservano differenze statisticamente significative nell'espressione dei marcatori di altri tipi cellulari analizzati tra DSP ISO hiPSCs-CFs e DSP c.817C>T hiPSCs-CFs (Figura 16).

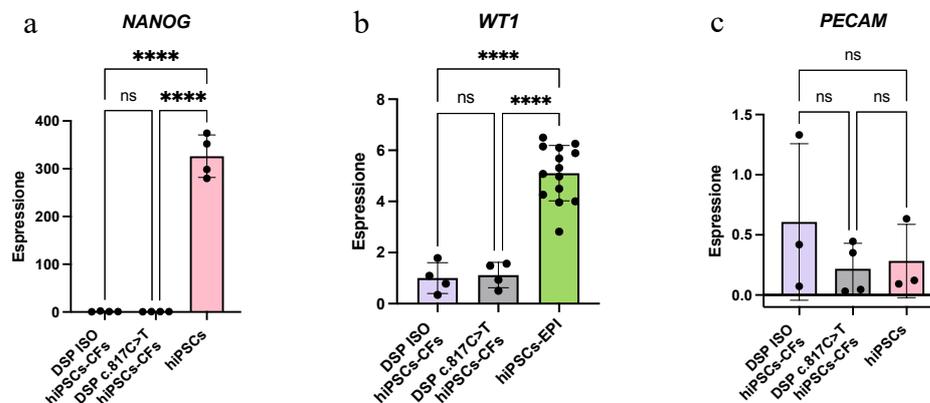


Figura 16. I grafici riportano l'espressione del marcatore di pluripotenza *NANOG* in DSP ISO hiPSCs-CFs [n = 3], DSP c.817C>T hiPSCs-CFs [n = 4] e hiPSCs indifferenziate [n = 4] (a), l'espressione del marcatore delle cellule epicardiche *WT1* in DSP ISO hiPSCs-CFs [n = 4], DSP c.817C>T hiPSCs-CFs [n = 4] e hiPSCs-EPI [n = 14] (b) e l'espressione del marcatore di cellule endoteliali *PECAM* in DSP ISO hiPSCs-CFs [n = 4], DSP c.817C>T hiPSCs-CFs [n = 4] e hiPSCs

indifferenziate [n = 3] (c). I risultati sono rappresentati come la media dei valori e l'errore standard dalla media. Le analisi statistiche sono state svolte con il test parametrico ANOVA e il test non parametrico di Kruskal-Wallis. ** *p-value* < 0,01, **** *p-value* < 0,0001.

Le analisi di Real-Time PCR hanno evidenziato che ciascuno dei geni dei dischi intercalari considerato, risulta essere espresso in hiPSCs-CFs. Per ciascuno dei geni analizzato l'espressione risulta essere mediamente maggiore in DSP ISO hiPSCs-CFs rispetto a DSP c.817C>T hiPSCs-CFs, tuttavia, le differenze osservate non raggiungono la significatività statistica (Figura 17). In *Tabella 13* sono riportati i valori in media dei Ct ottenuti per ciascuna replica.

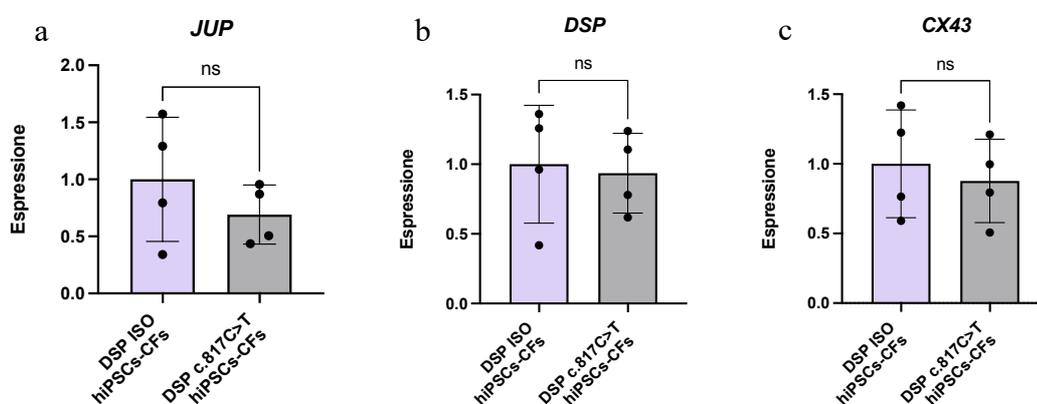


Figura 17. I grafici riportano i livelli di espressione dei geni desmosomali *JUP* (a) e *DSP* (b) e del gene codificante la proteina delle giunzioni comunicanti *CX43* (c), in DSP ISO hiPSCs-CFs [n = 4] e DSP c.817C>T hiPSCs-CFs [n = 4]. I risultati sono rappresentati come la media dei valori e l'errore standard dalla media. Le analisi statistiche sono state svolte con il test t di Student e il test t non parametrico di Mann-Whitney.

<i>JUP</i>	1	2	3	4
DSP ISO hiPSCs-EPI	22,41	23,06	23,13	23,54
DSP c.817C>T hiPSCs-EPI	21,54	21,52	22,59	22,34
<i>DSP</i>	1	2	3	4
DSP ISO hiPSCs-EPI	25,76	26,63	25,98	26,03
DSP c.817C>T hiPSCs-EPI	24,18	24,45	24,89	25,20
<i>CX43</i>	1	2	3	4
DSP ISO hiPSCs-EPI	23,31	25,05	23,15	23,74
DSP c.817C>T hiPSCs-EPI	26,53	23,30	22,09	23,20

Tabella 13. Valori in media dei Ct ottenuti dalle analisi di Real-Time PCR per i geni dei dischi intercalari *JUP*, *DSP* e *CX43* in DSP ISO hiPSCs-CFs [n = 4] e DSP c.817C>T hiPSCs-CFs [n = 4].

5. DISCUSSIONE

La cardiomiopatia aritmogena è una malattia genetica rara, caratterizzata dalla perdita di cardiomiociti, a cui segue la sostituzione con tessuto fibro-adiposo, nel tentativo di riparare al danno. L'alterazione della normale architettura del miocardio che ne consegue, si riflette in anomalie strutturali ed elettriche che possono innescare aritmie ventricolari. In alcuni casi, l'esito di questi eventi è la morte cardiaca improvvisa, che si verifica in particolar modo nei giovani adulti (3). La maggior parte delle mutazioni causative la patologia risiede in geni codificanti proteine dei dischi intercalari, che sono complessi giunzionali caratteristici del miocardio, fondamentali a garantire l'adesione tra cellule e la propagazione del segnale elettrico. Mutazioni in geni che codificano proteine che partecipano alla formazione di queste strutture, tra cui le proteine desmosomali, portano ad una perdita di adesione dei cardiomiociti, che si risolve nella loro morte per necrosi o apoptosi. Nella patogenesi della cardiomiopatia aritmogena sono coinvolti, inoltre, altri meccanismi molecolari, tra cui l'alterazione di vie di segnalazione, la fibrosi e l'infiammazione (4).

Gli studi condotti su modelli animali hanno fornito, negli anni, un grande contributo all'elucidazione dei processi coinvolti nella patologia. Tuttavia, le differenze elettrofisiologiche rispetto all'uomo e la mancanza di infiltrazione adiposa, che si osservano nei modelli animali, rappresentano delle limitazioni che spingono a cercare modelli malattia alternativi.

Nell'ultimo decennio, la possibilità di ottenere cellule staminali pluripotenti mediante *reprogramming* di cellule differenziate ha condotto a innumerevoli progressi in campo medico. La generazione di hiPSCs-CMs a partire da hiPSCs derivanti da paziente ha permesso di ampliare la comprensione della fisiopatologia genetica e molecolare dei disturbi cardiaci. Tuttavia, lo stato di parziale immaturità mantenuto dagli hiPSCs-CMs nelle colture 2D rappresenta un ostacolo importante alla creazione di un modello malattia adeguato (20).

Tra le cellule non miocitiche, i fibroblasti cardiaci rappresentano la popolazione cellulare più abbondante nel miocardio. Sono responsabili della sintesi e della degradazione della matrice extracellulare e svolgono un ruolo significativo nei meccanismi di mecano-trasduzione e nella conduzione elettrica cardiaca. Studi recenti hanno evidenziato un aumento della maturazione di hiPSCs-CMs, sia dal punto di vista strutturale che elettrico, quando presenti in co-cultura con altri tipi cellulari, tra cui i fibroblasti cardiaci derivanti da hiPSCs (25).

L'epicardio è lo strato più esterno del cuore, costituito da cellule mesoteliali che nella fase post-embryonale mantengono uno stato pressoché quiescente. Tuttavia, lesioni cardiache possono indurre l'attivazione, la proliferazione e la transizione

epitelio-mesenchimale (EMT), mediante la quale hanno origine diverse popolazioni di cellule cardiache. Dato il loro potenziale multipotente, la predominanza subepicardica di infiltrati fibro-adiposi nei pazienti con ACM e l'elevata espressione epicardica di geni desmosomali, le cellule epicardiche sono state proposte come protagoniste del rimodellamento fibro-adiposo tipico dell'ACM (26,27). Diversi studi hanno evidenziato che in cellule epicardiche con mutazioni in geni desmosomali si verifica un incremento dell'espressione del gene codificante la proteina α -actina del muscolo liscio (α -SMA), la quale rappresenta un marcatore di fibrosi. Inoltre, è stata osservata una maggior tendenza di hiPSCs-EPI con mutazione nel gene desmosomale *PKP2* a differenziare spontaneamente in fibroblasti e cellule adipose, rispetto ai controlli isogenici (22,28).

La fibrosi cardiaca svolge un ruolo centrale nello sviluppo delle disfunzioni elettriche e meccaniche tipiche dell'ACM. La massiccia deposizione di matrice extracellulare (ECM) porta alla distruzione della citoarchitettura cardiaca, causando una propagazione anomala dell'impulso elettrico tra cardiomiociti. Tra i responsabili dell'eccessiva produzione di ECM si riconoscono i fibroblasti attivati, definiti comunemente "miofibroblasti". Queste cellule sono normalmente assenti nel miocardio funzionante ma possono comparire in seguito a insulti cardiaci di varia natura. I miofibroblasti sono caratterizzati dall'espressione di α -SMA, che conferisce loro una maggiore contrattilità, e sintetizzano collagene di tipo I e III, favorendo così la deposizione di ECM (29). In fibroblasti cardiaci con mutazioni in geni desmosomali è stata evidenziata una maggior espressione di α -SMA rispetto alle cellule di controllo. Recentemente, inoltre, è emerso, che il ruolo dei fibroblasti cardiaci nell'ACM non si limita alla formazione di cicatrici fibrose in risposta ad un danno. In microtessuti composti da fibroblasti cardiaci derivanti da hiPSCs con mutazione nel gene *PKP2*, nonostante i cardiomiociti fossero sani, è stata infatti osservata la manifestazione di fenomeni aritmici (22).

Alla luce del coinvolgimento di cellule epicardiche e fibroblasti cardiaci nel contesto patologico della ACM, lo studio di questi tipi cellulari potrebbe risultare molto utile nell'approfondimento dei meccanismi alla base della malattia.

In questo progetto di tesi, ho proceduto al differenziamento, e successivamente alla caratterizzazione, di cellule epicardiche e fibroblasti cardiaci a partire da hiPSCs derivanti da un paziente con una mutazione nel gene *DSP*, e i rispettivi controlli isogenici. Questo studio ha la doppia valenza di approfondire le conoscenze sulla presenza e la localizzazione di proteine dei dischi intercalari in cellule epicardiche e fibroblasti cardiaci e caratterizzare i fibroblasti cardiaci ottenuti al termine del differenziamento. Le hiPSCs-CFs ottenute parteciperanno infatti alla costituzione di un microtessuto cardiaco, al fine di generare un modello che riproduca le caratteristiche fisiologiche e patologiche del cuore umano in modo più realistico rispetto ai tradizionali modelli bidimensionali.

Le hiPSCs-EPI sono state ottenute a partire da hiPSCs indifferenziate mediante l'applicazione di un protocollo di differenziamento pubblicato da Campostrini et. al (23). La riuscita del differenziamento è stata confermata innanzitutto dalla morfologia delle cellule, che rispecchia la classica forma a ciottolo delle cellule epicardiche, più allungata e affusolata rispetto alla tipica forma rotondeggiante delle hiPSCs indifferenziate. Inoltre, come atteso, in hiPSCs-EPI è stata osservata una drastica riduzione dell'espressione del marcatore di pluripotenza *NANOG* e un aumento significativo dell'espressione dei geni *markers* di cellule epicardiche *WT1*, *TBX18* e *TCF21*. Tuttavia, con particolare riferimento a *TBX18* e *TCF21*, è stata evidenziata un'elevata eterogeneità nell'espressione di questi geni nelle diverse repliche biologiche. La variabilità dei risultati potrebbe essere in parte dovuta allo stadio maturativo delle cellule al momento della raccolta dell'RNA. Diversi fattori possono, inoltre, influenzare la riuscita del differenziamento, *in primis* la somministrazione tempestiva e precisa dei fattori di induzione.

L'espressione dei marcatori *WT1* e *TBX18* in hiPSCs-EPI è stata confermata da analisi di immunofluorescenza, mediante le quali è stata osservata anche la presenza del marcatore epicardico *ZO-1*. La localizzazione di queste proteine rispecchia quella attesa riportata in letteratura con *ZO-1* localizzata in membrana e i fattori di trascrizione *WT1* e *TBX18* a livello nucleare (23). La presenza di *TBX18* è stata individuata anche a livello citosolico. In ciascuna delle repliche analizzate mediante immunofluorescenza la percentuale di nuclei positivi per *WT1* e di cellule positive per *TBX18* ha superato il 70%. Questo risultato è indice di una buona efficacia del differenziamento ma dovrebbe essere consolidato mediante l'analisi di più repliche.

Un limite emerso da questo studio risiede nella purezza del differenziamento. Dall'osservazione al microscopio ottico, è stata identificata, in alcune repliche biologiche, la presenza di gruppi di cardiomiociti in grado di battere spontaneamente. Nonostante l'esclusione di queste repliche dalle analisi, nelle hiPSCs-EPI sottoposte a Real-Time PCR, è stato osservato un incremento dell'espressione del gene *marker* dei cardiomiociti *TNNI*. La ragione potrebbe risiedere nell'iniziale step di induzione a mesoderma cardiaco, a partire dal quale le cellule potrebbero andare incontro ad un differenziamento spontaneo in altri tipi cellulari. Al fine di ottenere colture cellulari più pure ed eseguire quindi una caratterizzazione più attendibile, sarebbe stato utile l'utilizzo della citometria a flusso o la selezione magnetica, in modo da separare le cellule in base a specifici marcatori. Per quanto riguarda il *marker* delle cellule endoteliali *PECAM* non è stato osservato alcun aumento della sua espressione in hiPSCs-EPI rispetto ad hiPSCs indifferenziate.

Le analisi hanno evidenziato un incremento di espressione del gene *marker* dei fibroblasti *GATA4*, probabilmente indice del fatto che parte delle cellule

epicardiche sono andate autonomamente incontro al differenziamento in fibroblasti. Diversi studi hanno osservato che cellule epicardiche con mutazioni in geni desmosomali vanno incontro con maggior frequenza al differenziamento in fibroblasti e in adipociti rispetto ai controlli isogenici (22,28). In questo studio non è stata evidenziata alcuna differenza significativa nell'espressione del marcatore dei fibroblasti *GATA4* tra hiPSCs-EPI mutate e controlli isogenici, ma l'indagine di altri marcatori di fibroblasti e marcatori di adipogenesi potrebbe fornire informazioni interessanti sugli effetti di mutazioni desmosomali sul destino delle cellule epicardiche.

Un limite delle indagini condotte è la mancata analisi, in parallelo, di hiPSCs-CMs, hiPSCs-CFs e cellule endoteliali derivanti da hiPSCs, che fungano da controllo positivo per l'espressione dei marcatori *TNNI*, *GATA4* e *PECAM*.

Le informazioni reperibili in letteratura sull'espressione e il ruolo delle proteine desmosomali in cellule epicardiche sono, ad oggi, estremamente ridotte. Le analisi di Real-Time PCR hanno evidenziato l'espressione dei geni desmosomali *JUP*, *DSG2* e *DSP* e del gene codificante la proteina delle giunzioni comunicanti *CX43* in hiPSCs-EPI. Questo risultato è stato confermato da analisi di immunofluorescenza. Le proteine desmosomali JUP e DSP mostrano una localizzazione perlopiù citosolica e concentrata in alcuni punti in membrana, mentre DSG2 sembra essere presente principalmente in membrana. L'occasionale presenza di JUP nella zona perinucleare potrebbe essere correlata al suo coinvolgimento in meccanismi di trasduzione del segnale (4). CX43 è presente maggiormente in membrana ma in alcuni punti può trovarsi concentrata nella zona perinucleare. Questo risultato rispecchia le recenti scoperte che vedono questa proteina coinvolta non soltanto nella formazione di giunzioni comunicanti ma anche in altre funzioni biologiche, tra cui la regolazione dell'espressione genica. Analisi di microscopia elettronica a trasmissione hanno dimostrato la localizzazione di CX43 a livello nucleare in diversi tipi di cellule, tra cui le cellule cardiache, mentre analisi di *patch clamp* dimostrano che CX43 forma canali attivi nell'involucro nucleare. Oltre che nel nucleo, CX43 può essere presente anche in membrane di vescicole citosoliche, del reticolo endoplasmatico e mitocondriali (30).

Per quanto riguarda i livelli di espressione dei geni codificanti proteine desmosomali, dall'analisi dei risultati di Real-Time PCR, non è stata osservata alcuna differenza significativa tra cellule mutate e controlli isogenici. Le cellule utilizzate in questo progetto di tesi derivano da un paziente con una mutazione non senso (c.817C>T) nel gene codificante la desmoplachina, che causa la sostituzione di un codone codificante per un amminoacido con un codone di stop prematuro (p.Q273*). La presenza di un codone di stop prematuro in alcuni casi può risolversi nella produzione di una proteina tronca. Ciò non si verifica nel momento in cui

entra in atto un meccanismo noto come *nonsense-mediated decay*, che causa la degradazione degli mRNA nei quali si è verificata l'inserzione di un codone di stop prematuro. Questo comporta la non produzione del prodotto proteico derivante dall'mRNA soggetto alla mutazione. Le cellule mutate utilizzate in questo progetto di tesi portano la mutazione in eterozigosi, di conseguenza, se entrasse in atto il meccanismo di *nonsense-mediated decay* dovremmo assistere ad una riduzione di circa il 50% di mRNA codificante la desmoplachina nelle cellule mutate rispetto ai controlli isogenici. Dai risultati di Real-Time PCR non è possibile osservare questa differenza. Saranno pertanto necessarie ulteriori analisi, per esempio attraverso la tecnica biochimica Western blot, al fine di valutare gli effetti della mutazione a livello proteico.

Dopo aver caratterizzato le hiPSCs-EPI ottenute, a partire da queste sono stati generati i fibroblasti cardiaci. Le hiPSC-CFs sono contraddistinte dalla tipica forma allungata e fusiforme e dalla presenza di prolungamenti citoplasmatici che si estendono dal corpo cellulare principale (29). Anche in questo caso, è stata osservata una drastica riduzione dell'espressione del marcatore di pluripotenza *NANOG* in hiPSCs-CFs rispetto ad hiPSCs indifferenziate. Le analisi di Real-Time PCR hanno, inoltre, evidenziato l'espressione dei marcatori dei fibroblasti *COL1A1*, *COL3A1*, *GATA4* e *VIM* in hiPSCs-CFs. Per quanto questi *markers* risultino espressi in ciascuna replica biologica, analogamente a quanto osservato per le cellule epicardiche, dalle analisi eseguite è emersa un'elevata eterogeneità tra repliche diverse. Ancora una volta, la variabilità osservata potrebbe essere sintomo di un diverso stato di maturazione dei fibroblasti al momento dell'estrazione dell'RNA o di una diversa efficacia del differenziamento. A causa della disomogeneità dei dati è difficile fare inferenze sulle differenze, seppur non significative, osservate tra cellule mutate e isogeniche. Per quanto riguarda, ad esempio, il marcatore *COL1A1*, si nota un aumento nei fibroblasti mutati rispetto agli isogenici ma, data l'eterogeneità dei dati, al fine di ottenere dei risultati più affidabili bisognerebbe ampliare l'indagine ad ulteriori repliche biologiche.

L'espressione dei marcatori dei fibroblasti da parte di hiPSCs-CFs è stata confermata mediante analisi di immunofluorescenza; la localizzazione, inoltre, rispecchia quanto riportato in letteratura. In particolare, il fattore di trascrizione *GATA4* si trova a livello nucleare, la proteina citoscheletrica vimentina si estende in tutta la cellula a formare una rete di filamenti intermedi che attraversa il citoplasma mentre la proteina *COL1A1* si localizza nel citoplasma e a livello nucleare (23). Un limite di queste analisi risiede nella mancanza di *markers* specifici per i fibroblasti cardiaci. La vimentina, ad esempio, è un marcatore comunemente usato per il riconoscimento dei fibroblasti ma è espresso anche da altri tipi cellulari, tra cui le cellule endoteliali. Per supplire a questo limite sono stati analizzati più marcatori caratteristici di questo tipo cellulare.

In linea con quanto atteso, in hiPSCs-CFs si osserva una marcata riduzione dell'mRNA codificante il *marker* di cellule epicardiche WT1, rispetto ad hiPSCs-EPI. L'espressione di *WT1* da parte di hiPSCs-CFs, per quanto minima, potrebbe indicare il mancato differenziamento di parte delle hiPSCs-EPI in fibroblasti cardiaci. A differenza di quanto osservato in hiPSCs-EPI, le analisi di Real-Time PCR hanno rilevato un'espressione molto bassa o assente del marcatore dei cardiomiociti *TNNI* in hiPSCs-CFs. Ciò potrebbe essere dovuto all'utilizzo di un terreno di coltura specifico per i fibroblasti, che limita quindi il mantenimento e la sopravvivenza dei cardiomiociti, e al passaggio dei fibroblasti in piastre prive di coating durante lo step finale di differenziamento. La purificazione mediante adesione selettiva sfrutta l'incapacità di molte cellule non fibroblastiche di aderire alla superficie in polistirene delle piastre e consente quindi il raggiungimento di una popolazione relativamente pura di fibroblasti, grazie alla loro abilità di attaccarsi al supporto di plastica anche in assenza di coating (31). Infine, per quanto riguarda il marcatore di cellule endoteliali *PECAM*, non si evidenzia alcuna differenza significativa di espressione tra hiPSCs-CFs e hiPSCs indifferenziate. L'espressione di questo *marker* è mediamente maggiore in DSP ISO hiPSCs-CFs rispetto a DSP c.817C>T hiPSCs-CFs ma, ancora una volta, la distribuzione dei risultati è troppo disomogenea per apprezzare una differenza significativa.

La presenza e l'eventuale ruolo delle proteine desmosomali in fibroblasti cardiaci è un argomento ancora poco esplorato dalla letteratura scientifica. In hiPSCs-CFs ottenute in questo progetto di tesi è stata confermata l'espressione dei geni desmosomali *JUP* e *DSP* mediante analisi di Real-Time PCR e la loro presenza in forma di prodotto proteico mediante analisi di immunofluorescenza. Queste ultime analisi hanno evidenziato una localizzazione perlopiù citosolica di queste proteine. Analogamente a quanto emerso dall'analisi delle hiPSC-EPI, non è stata osservata una differenza significativa nell'espressione dei geni desmosomali tra cellule mutate e controlli isogenici. La scoperta che fibroblasti cardiaci con mutazioni in geni desmosomali sembrano avere una predisposizione all'attivazione in miofibroblasti potrebbe rappresentare un punto chiave nell'elucidazione dei meccanismi molecolari alla base della ACM. In futuro, potrebbe essere pertanto interessante indagare l'espressione del marcatore dei miofibroblasti α -SMA in DSP ISO hiPSC-CFs e DSP c.817C>T hiPSCs-CFs, al fine di verificare se nei fibroblasti mutati si assiste ad un suo incremento rispetto ai controlli isogenici (22).

Per quanto riguarda la proteina CX43, è stato recentemente dimostrato che questa si trova abbondantemente espressa nei fibroblasti cardiaci e che permette non solo la formazione di giunzioni comunicanti tra i fibroblasti stessi, ma anche con i cardiomiociti adiacenti. È noto che i fibroblasti cardiaci possono modulare passivamente l'elettrofisiologia cardiaca, per esempio ostacolando la propagazione

del segnale elettrico mediante la formazione di cicatrici fibrotiche tra fasci di cardiomiociti, con conseguente innesco di fenomeni aritmici. La scoperta della presenza di giunzioni comunicanti nei fibroblasti cardiaci suggerisce un ruolo più attivo di questo tipo cellulare nella modulazione dell'elettrofisiologia cardiaca (32). Giacomelli et. al hanno evidenziato il manifestarsi di fenomeni aritmici, in associazione ad una riduzione dell'espressione di CX43, in microtessuti cardiaci costituiti da hiPSCs-CMs e hiPSCs-CFs con una mutazione nel gene desmosomale *PKP2*, nonostante i cardiomiociti fossero cardiomiociti di controllo. Inoltre, hanno dimostrato il ruolo di CX43 nella promozione della maturazione dei cardiomiociti, evidenziando che il miglioramento delle caratteristiche strutturali ed elettriche che si verifica in hiPSCs-CMs in coltura con hiPSCs-CFs, si osserva esclusivamente nel caso in cui i fibroblasti esprimano CX43 (22). In questo progetto di tesi, le analisi di Real-Time PCR hanno confermato l'espressione del gene *CX43* in hiPSCs-CFs, mentre mediante analisi di immunofluorescenza è stato possibile apprezzare la sua localizzazione, principalmente in membrana e in alcuni punti concentrata in vescicole.

Sebbene non sia stata evidenziata alcuna differenza significativa nell'espressione dei geni dei dischi intercalari tra DSP ISO hiPSC-CFs e DSP c.817C>T hiPSCs-CFs, è probabile che le differenze vengano esacerbate, e quindi si evidenzino, nel contesto del microtessuto cardiaco, in quanto la distruzione dei segnali paracrini e delle interazioni cellula-cellula risulta fondamentale per l'esibizione del fenotipo patologico (20).

In conclusione, possiamo affermare che l'applicazione del protocollo ha portato con successo al differenziamento delle hiPSCs indifferenziate in hiPSCs-EPI e hiPSCs-CFs. Ampliare le indagini a più repliche biologiche, in particolar modo nel caso delle hiPSCs-CFs, potrebbe rivelarsi utile al consolidamento dei risultati ottenuti e alla riduzione dell'eterogeneità osservata. A tal proposito, la variabilità nei risultati costituisce un limite alle analisi condotte ed è probabilmente risultato di un sistema biologico complesso influenzato da molteplici fattori, tra cui le condizioni di coltura ma anche la variabilità clonale e l'instabilità genomica ed epigenetica delle hiPSCs (33).

Alla luce delle scoperte emerse sugli effetti di mutazioni in geni desmosomali in cellule epicardiche e fibroblasti cardiaci, l'approfondimento del ruolo di questi tipi cellulari nella cardiomiopatia aritmogena risulta più che mai interessante. Le hiPSCs rappresentano un modello malattia ideale in quanto permettono lo studio degli effetti di una mutazione mantenendo il *background* genetico del paziente donatore. Inoltre, la possibilità di creare modelli tridimensionali, costituiti da più tipi cellulari, che mimino la fisiologia cardiaca umana, non solo rappresenta uno strumento importante per lo studio dei meccanismi molecolari alla base della

patologia, ma potrebbe acquistare un ruolo centrale nello sviluppo di farmaci e nell'ambito della terapia personalizzata (20).

La ricerca di trattamenti farmacologici è un processo costoso e lungo, con un tasso di fallimento molto elevato, in parte a causa dell'utilizzo di modelli animali, i quali presentano differenze intrinseche nella fisiologia cardiaca rispetto all'uomo e non si adattano ad *high-throughput screening* a causa di problemi etici e dei costi elevati. Per tali motivi, la Food and Drug Administration ha promulgato una normativa che autorizza gli enti regolatori a prendere in considerazione nuove metodologie per stabilire la sicurezza e l'efficacia dei farmaci. Tra queste, i microtessuti cardiaci derivanti da hiPSCs risultano di grande interesse in virtù della possibilità di ottimizzare i trattamenti in sistemi in grado di ricapitolare le malattie umane e alla possibilità di eseguire *high-throughput screening*. La tecnologia hiPSCs ha inoltre un enorme potenziale nello sviluppo di terapie specifiche per il paziente come oligonucleotidi antisenso, RNA non codificanti, anticorpi e terapie geniche sviluppate attorno ad uno specifico genoma umano (34,35).

BIBLIOGRAFIA

1. Salemi VMC, Mohty D, Altavila SLL de, Melo MDT de, Kalil R, Bocchi EA. Insights into the Classification of Cardiomyopathies: Past, Present, and Future Directions. *Clinics*. 2021;76:e2808.
2. Chua CJ, Morrissette-McAlmon J, Tung L, Boheler KR. Understanding Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Advances through the Use of Human Pluripotent Stem Cell Models. *Genes*. 2023;14:1864.
3. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*. 2009;373.
4. Austin KM, Trembley MA, Chandler SF, Sanders SP, Saffitz JE, Abrams DJ, et al. Molecular mechanisms of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16:519–37.
5. Ciarambino T, Menna G, Sansone G, Giordano M. Cardiomyopathies: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2021;22:7722.
6. Rootwelt-Norberg C, Lie ØH, Chivulescu M, Castrini AI, Sarvari SI, Lyseggen E, et al. Sex differences in disease progression and arrhythmic risk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy. *EP Eur*. 2021;23:1084–91.
7. Wlodarska EK, Konka M, Zaleska T, Ploski R, Cedro K, Pucilowska B, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in two pairs of monozygotic twins. *Int J Cardiol*. 2005;105:126–33.
8. James CA, Syrris P, van Tintelen JP, Calkins H. The role of genetics in cardiovascular disease: arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2020;41:1393–400.
9. Corrado D, Perazzolo Marra M, Zorzi A, Beffagna G, Cipriani A, Lazzari MD, et al. Diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy: The Padua criteria. *Int J Cardiol*. 2020;319:106–14.
10. Bhonsale A, Groeneweg JA, James CA, Dooijes D, Tichnell C, Jongbloed JDH, et al. Impact of genotype on clinical course in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated mutation carriers. *Eur Heart J*. 2015;36:847–55.
11. Vencato S, Romanato C, Rampazzo A, Calore M. Animal Models and Molecular Pathogenesis of Arrhythmogenic Cardiomyopathy Associated with Pathogenic Variants in Intercalated Disc Genes. *Int J Mol Sci*. 2024;25:6208.
12. Calore M, Lorenzon A, De Bortoli M, Poloni G, Rampazzo A. Arrhythmogenic cardiomyopathy: a disease of intercalated discs. *Cell Tissue Res*. 2015;360:491–500.
13. van der Voorn SM, Te Riele ASJM, Basso C, Calkins H, Remme CA, van Veen TAB. Arrhythmogenic cardiomyopathy: pathogenesis, pro-arrhythmic

- remodelling, and novel approaches for risk stratification and therapy. *Cardiovasc Res.* 2020;116:1571–84.
14. Reisqs JB, Moreau A, Sleiman Y, Boutjdir M, Richard S, Chevalier P. Arrhythmogenic cardiomyopathy as a myogenic disease: highlights from cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Front Physiol.* 2023;14:1191965.
 15. Stadiotti I, Catto V, Casella M, Tondo C, Pompilio G, Sommariva E. Arrhythmogenic Cardiomyopathy: the Guilty Party in Adipogenesis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2017;10:446–54.
 16. Lorenzon A, Calore M, Poloni G, De Windt LJ, Braghetta P, Rampazzo A. Wnt/ β -catenin pathway in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Oncotarget.* 2017;8:60640–55.
 17. Hu Y, Pu WT. Hippo Activation in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2014;114:402–5.
 18. Lin YN, Ibrahim A, Marbán E, Cingolani E. Pathogenesis of arrhythmogenic cardiomyopathy: role of inflammation. *Basic Res Cardiol.* 2021;116:39.
 19. Mavroidis M, Davos CH, Psarras S, Varela A, Athanasiadis N, Katsimpoulas M, et al. Complement system modulation as a target for treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2015;110:27.
 20. Sacchetto C, Vitiello L, De Windt LJ, Rampazzo A, Calore M. Modeling Cardiovascular Diseases with hiPSC-Derived Cardiomyocytes in 2D and 3D Cultures. *Int J Mol Sci.* 2020;21:3404.
 21. Funakoshi S, Yoshida Y. Recent progress of iPSC technology in cardiac diseases. *Arch Toxicol.* 2021;95:3633–50.
 22. Giacomelli E, Meraviglia V, Campostrini G, Cochrane A, Cao X, van Helden RWJ, 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.
 23. Campostrini G, Meraviglia V, Giacomelli E, van Helden RWJ, Yiangou L, Davis RP, et al. Generation, functional analysis and applications of isogenic three-dimensional self-aggregating cardiac microtissues from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2021;16:2213–56.
 24. Guadix JA, Orlova VV, Giacomelli E, Bellin M, Ribeiro MC, Mummery CL, et al. Human Pluripotent Stem Cell Differentiation into Functional Epicardial Progenitor Cells. *Stem Cell Rep.* 2017;9:1754–64.
 25. Saini H, Navaei A, Van Putten A, Nikkhah M. 3D cardiac microtissues encapsulated with the co-culture of cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Adv Healthc Mater.* 2015;4:1961–71.
 26. Kohela A, van Rooij E. Fibro-fatty remodelling in arrhythmogenic

- cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2022;117:22.
27. Kohela A, van Kampen SJ, Moens T, Wehrens M, Molenaar B, Boogerd CJ, et al. Epicardial differentiation drives fibro-fatty remodeling in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Sci Transl Med.* 2021;13:eabf2750.
 28. Matthes SA, Taffet S, Delmar M. Plakophilin-2 and the migration, differentiation and transformation of cells derived from the epicardium of neonatal rat hearts. *Cell Commun Adhes.* 2011;18:73–84.
 29. Rohr S. Arrhythmogenic implications of fibroblast-myocyte interactions. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5:442–52.
 30. Martins-Marques T, Witschas K, Ribeiro I, Zuzarte M, Catarino S, Ribeiro-Rodrigues T, et al. Cx43 can form functional channels at the nuclear envelope and modulate gene expression in cardiac cells. *Open Biol.* 2023;13:230258.
 31. Melzer M, Beier D, Young PP, Saraswati S. Isolation and Characterization of Adult Cardiac Fibroblasts and Myofibroblasts. *J Vis Exp JoVE.* 2020; :10.3791/60909.
 32. Johnson RD, Camelliti P. Role of Non-Myocyte Gap Junctions and Connexin Hemichannels in Cardiovascular Health and Disease: Novel Therapeutic Targets? *Int J Mol Sci.* 2018;19:866.
 33. Ross SB, Fraser ST, Semsarian C. Induced pluripotent stem cells in the inherited cardiomyopathies: From disease mechanisms to novel therapies. *Trends Cardiovasc Med.* 2016;26:663–72.
 34. Liu C, Feng X, Li G, Gokulnath P, Xiao J. Generating 3D human cardiac constructs from pluripotent stem cells. *EBioMedicine.* 2022;76:103813.
 35. Wu X, Swanson K, Yildirim Z, Liu W, Liao R, Wu JC. Clinical trials in-a-dish for cardiovascular medicine. *Eur Heart J.* 2024;45:4275–90.