

Poster P.02.15

A NOVEL IN VITRO DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY CARDIOMYOPATHY MODEL: HUMAN IPSC-DERIVED CARDIOMYOCYTES FOR MECHANISTIC STUDIES

Pioner J.M.*^[1], Santini L.^[2], Palandri C.^[2], Martella D.^[3], Lupi F.^[3], Langione M.^[1], Querceto S.^[1], Grandinetti B.^[3], Balducci V.^[2], Mazzantini C.^[1], Donati M.A.^[4], Sartiani L.^[2], Tesi C.^[1], Cerbai E.^[2], Poggesi C.^[1], Parmeggiani C.^[3], Coppini R.^[2], Sacconi L.^[3], Ferrantini C.^[1]

^[1]Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Div. di Scienze Fisiologiche, Università degli studi di Firenze ~ Firenze ~ Italy, ^[2]Dipartimento di NeuroFarBa, Università degli studi di Firenze, ~ Firenze ~ Italy, ^[3]European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy ~ Sesto Fiorentino ~ Italy, ^[4]Metabolic and Neuromuscular Unit, AOU Meyer Hospital ~ Firenze ~ Italy

A severe cardiomyopathy invariably affects patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD), but the onset and molecular sequelae resulting from dystrophin deficiency in DMD heart tissue are poorly understood. For modelling the earliest phase of DMD cardiomyopathy, we studied human cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (hiPSC-CMs) obtained from urine or blood of DMD patients. We investigated the contractile function and calcium handling of hiPSC-CMs on custom made biomimetic substrates with micropatterned topography and tunable stiffness to mimic the interplay between the extracellular matrix and individual cardiomyocytes in the absence of full-length dystrophin.

Action potential and calcium transient of control-, patient-specific and isogenic control hiPSC-CMs were simultaneously analyzed by fluorescent indicators. Contractile properties of cell and isolated myofibrils were explored.

A DMD-patient cell line with no detectable dystrophin (DMD-CMs; Δexon 50) were compared to one pair of

isogenic hiPSC-CMs from a healthy control and the CRISPR-Cas9-genome edited with lack of full-length dystrophin (DMD-c.Δ263G-CMs). Our results demonstrated that lack of dystrophin results in reduced myofibril tension and slower relaxation kinetics due to both Ca²⁺ handling abnormalities and myofibril properties. This study offers new insights into the functional consequences of dystrophin deficiency at an early stage of cardiomyocyte development in both patient derived-and isogenic-hiPSC-CM models of DMD cardiomyopathy. Our DMD-hiPSC models support the hypothesis that the absence of full-length dystrophin is sufficient to perturb cardiomyocyte function without the effect of the progressive systemic alteration as previously proposed.

Un nuovo modello in vitro, basato su cardiomiociti derivati da cellule ips, per studiare i meccanismi della cardiomiopatia associata alla distrofia muscolare

Pazienti con Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) sviluppano inevitabilmente un progressiva disfunzione del muscolo cardiaco responsabile di scompenso cardiaco. Tuttavia, ancora poco è noto sulle conseguenze primarie o secondarie funzionali e molecolari della deficienza di distrofina che portano a questa cardiomiopatia. Come modello delle fasi più precoci dello sviluppo della DMD nel cuore, abbiamo studiato cardiomiociti differenziati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-CM) generati da cellule nucleate ottenute da urina o sangue di pazienti DMD. Abbiamo quindi studiato la funzione contrattile e la regolazione del calcio di iPSC-CM che grazie ad un processo di maturazione (80-100 giorni) su substrati di coltura che mimano la morfologia e la rigidità della matrice extracellulare. Abbiamo confrontato le caratteristiche funzionali di una linea cellulare da paziente DMD portatore della Delezione dell'esone 50 con quelle ottenute da una coppia di controlli isogenici ottenute da soggetto sano con normale distribuzione della distrofina (CTRL-CM) e il suo corrispettivo

con modificazione genica con la tecnica CRISPR-Cas9 in cui è stata inserita una mutazione puntiforme nell'esone 1 del gene DMD che ha comportato la mancanza della isoforma lunga di distrofina (Dp427). I nostri risultati hanno mostrato che la mancanza di distrofina è associata ad una ridotta forza contrattile esercitata dalle miofibrille a cui si associa un prolungamento della cinetica di rilasciamento del cardiomiocita dovuta sia all' alterata funzione miofibrillare che ad anomalie dell'omeostasi del calcio intracellulare. Questo studio offre nuove prospettive sulle conseguenze della mancanza di distrofina nelle fasi precoci dello sviluppo della cardiomiopatia associata a DMD. I dati ottenuti dalle linee iPSC da pazienti DMD suggeriscono che la mancanza della forma intera di distrofina è sufficiente ad alterare le caratteristiche contrattili di cardiomiociti cresciuti in assenza di altri degenerazioni sistemiche che ne possono compromettere, in maniera secondaria, la funzione.

Pioner JM. et al., Absence of full-length dystrophin impairs normal maturation and contraction of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells, Cardiovasc Res, 2019

Distrofia Muscolare di Duchenne

Coordinator: Cecilia Ferrantini

Partner Leonardo Sacconi

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

GGP16191

Disease Name:

Duchenne Muscular Dystrophy

Keywords:

Duchenne Muscular Dystrophy, dystrophin, cardiomyopathy