

Poster P.14.106

OXIDIZED LDL/CD36/PPAR γ CIRCUITRY IS A TRIGGER OF ADIPOGENESIS IN ARRHYTHMOGENIC CARDIOMYOPATHY

Sommariva E.^[1], Stadiotti I.^[1], Casella M.^[1], Catto V.^[1], Dello Russo A.^[1], Arnaboldi L.^[3], Milano G.^[1], Scopece A.^[1], Koenig E.^[2], Meraviglia V.^[2], De Musso M.^[2], Volani C.^[2], Turnu L.^[1], Andreini D.^[1], Corsini A.^[3], Tondo C.^[1], Rossini A.^[2], Pompilio G.^[1]

^[1]Centro Cardiologico Monzino IRCCS ~ Milano ~ Italy, ^[2]Institute for Biomedicine, Eurac Research ~ Bolzano ~ Italy, ^[3]Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy

Background. Arrhythmogenic Cardiomyopathy (ACM) is a genetic condition hallmarked by fibro-fatty replacement of the ventricular myocardium and malignant arrhythmias¹. Cardiac mesenchymal stromal cells (C-MSC) differentiate into adipocytes in ACM patient hearts, through the activation of PPAR γ , caused by ACM mutations (e.g. PKP2)². The clinical phenotype of ACM is highly variable for poorly understood reasons and PPAR γ modulation has never been investigated. 13-hydroxy-octadecadienoic acid (13HODE), a component of oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) is a direct activator of PPAR γ . In other cell models 13HODE creates a feed-forward loop increasing both PPAR γ and the oxLDL receptor CD36, resulting in fat accumulation³.

Purpose. To investigate the effects of oxLDL and PPAR γ agonists on ACM adipogenesis and to dissect the involved pathways.

Results. We observed higher plasma oxLDL in ACM patients compared to HC. oxLDL levels also discriminate between ACM patients with overt phenotype and their unaffected relative carriers of the same causative mutations. We observed higher oxidative stress and CD36 concentration in ACM ventricular tissue, compared to HC.

In basal conditions, ACM C-MSC showed greater oxidative stress, higher expression of PPAR γ and a trend of higher expression of CD36 compared to HC C-MSC. The adipogenic stimulation led to a parallel increase of CD36 and lipid accumulation, mainly in ACM C-MSC. OxLDL and 13HODE administration increased lipid accumulation in ACM C-MSC. On the contrary, the antioxidant N-Acetylcysteine (NAC) prevented lipid accumulation in ACM C-MSC. Through CD36 silencing of ACM C-MSC, we obtained a significantly lower lipid accumulation if compared to non-silenced cells.

Spontaneous lipid accumulation in ACM iPSC-CM cultured in basal medium was limited. In agreement to what observed in C-MSC, CD36 membrane expression showed a trend of higher concentration in ACM iPSC-CM than in controls. When exposed to adipogenic medium containing a PPAR γ agonist (rosiglitazone), ACM iPSC-CM exhibited a higher content of intracellular lipid accumulation compared to HC iPSC-CM. The treatment with adipogenic medium led to an increase of CD36 expression both in HC and ACM iPSC-CM.

Heterozygous Pkp2 knock-out mice (Pkp2^{+/-}) mice do not spontaneously accumulate adipocytes in the heart⁴, however murine Pkp2^{+/-} C-MSC are more prone to lipid accumulation in vitro than WT cells. Accordingly, mice have low plasma oxLDL and cardiac oxidative stress. By increasing plasma cholesterol and oxidative stress through the administration of a high fat diet, we observed fibro-fatty substitution in the heart of Pkp2^{+/-} mice.

Conclusions. These findings reveal a modulatory role of oxidative stress and oxidized lipids in ACM cardiac adipogenesis at a cellular, tissue and clinical level, enlightening novel targets for pharmacological strategies to prevent adipogenic substitution and consequent ACM clinical phenotypes.

Contributo dello stress ossidativo e dei lipidi ossidati nella patogenesi della Cardiomiopatia Aritmogena.

La cardiomiopatia aritmogena (ACM) è una malattia genetica che può portare a morte improvvisa caratterizzata da aritmie e da accumulo di grasso nel cuore. Ad oggi, non esistono terapie capaci di prevenirla/rallentarne la progressione.

A causa del difetto genetico dei pazienti ACM, le loro cellule mesenchimali stromali cardiache (C-MSK) differenziano in cellule adipose, attraverso l'aumento di PPAR γ , il principale mediatore del processo adipogenico. La mutazione genetica però spesso non è sufficiente per la manifestazione clinica dell'ACM, suggerendo il coinvolgimento di altri fattori. Il ruolo di modulatori di PPAR γ non è mai stato investigato. L'acido 13-idrossi-octadecadienoico (13HODE) è un attivatore di PPAR γ ed è un componente delle LDL ossidate (oxLDL). In altre patologie, il 13HODE crea un circolo vizioso che porta all'aumento dei livelli di PPAR γ e di CD36, recettore delle oxLDL, causando ulteriore entrata di 13HODE nelle cellule e stimolandole all'adipogenesi.

L'obiettivo di questo progetto è di investigare il ruolo delle oxLDL e di attivatori di PPAR γ nel processo adipogenico ACM e di capirne i meccanismi.

I nostri risultati dimostrano più elevati livelli plasmatici di oxLDL nei pazienti ACM, sia se paragonati a controlli sani sia ai loro famigliari mutati ma senza sintomi della patologia. Inoltre, nel tessuto cardiaco, lo stress ossidativo e l'espressione di CD36 sono più alti.

Anche le C-MSK ACM hanno elevato stress ossidativo, alta espressione di PPAR γ e un trend di maggiore espressione di CD36, se comparate a cellule di controllo. Stimolando le C-MSK a differenziare in senso adipogenico, abbiamo ottenuto un parallelo aumento di CD36 e accumulo lipidico, soprattutto nelle cellule ACM. Il trattamento di C-MSK ACM con oxLDL o 13HODE provoca un aumento di accumulo lipidico che è invece prevenuto dal trattamento con un antiossidante. Inoltre, silenziando l'espressione di CD36 nelle cellule ACM, si osserva minore accumulo lipidico, rispetto a cellule non silenziate.

Come per le C-MSK, anche cardiomiociti ACM derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-CM), mostrano trend di maggiore espressione di CD36. Stimolandole con un agonista di PPAR γ , iPSC-CM ACM sono più predisposti all'accumulo e ad un aumento di CD36 rispetto ai controlli.

Il modello murino di ACM non accumula spontaneamente adipociti nel cuore, ma le C-MSK isolate da questi topi sono più predisposte all'accumulo lipidico in vitro rispetto ai controlli. In accordo con la nostra ipotesi, i topi hanno bassi oxLDL plasmatiche e stress ossidativo cardiaco. Inducendo un aumento di colesterolo e stress ossidativo, abbiamo osservato sostituzione adiposa nel cuore dei topi ACM.

In conclusione, i dati ottenuti dimostrano il contributo di stress ossidativo e lipidi ossidati nell'adipogenesi cardiaca ACM, aprendo prospettive per nuove terapie per i pazienti.

1. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*. 2009;373:1289-1300
2. Sommariva E, Brambilla S, Carbucicchio C, Gambini E, Meraviglia V, Dello Russo A, Farina FM, Casella M, Catto V, Pontone G, Chiesa M, Stadiotti I, Cogliati E, Paolin A, Ouali Alami N, Preziuso C, d'Amati G, Colombo GI, Rossini A, Capogrossi MC, Tondo C, Pompilio G. Cardiac mesenchymal stromal cells are a source of adipocytes in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2016;37:1835-1846
3. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized ldl regulates macrophage gene expression through ligand activation of ppargamma. *Cell*. 1998;93:229-240
4. Cerrone M, Noorman M, Lin X, Chkourko H, Liang FX, van der Nagel R, Hund T, Birchmeier W, Mohler P, van Veen TA, van Rijen HV, Delmar M. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc Res*. 2012;95:460-468

Cardiomiopatia Aritmogena

Coordinator: Giulio Pompilio

Partners: Alessandra Rossini, Alberto Corsini

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

Telethon Project (nr):

GGP16001

Disease Name:

Arrhythmogenic Cardiomyopathy

Keywords:

oxLDL, PPAR?, pathogenesis cofactor