

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Худякова Александра Александровича на тему: «Изучение роли сигнального пути Wnt в развитии аритмогенной кардиомиопатии на модели индуцированных плюрипотентных стволовых клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04. - клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность и новизна диссертационного исследования

Диссертационная работа Худякова А.А. представляет собой фундаментальное исследование, посвященное изучению роли мутаций в гене, кодирующем один из белков десмосом, плакофиллин-2 (*PKP2*), в регуляции активности канонического сигнального пути Wnt, отвечающего за дифференцировку кардиомиоцитов. Данное исследование направлено на решение проблемы, актуальной как для медицины (кардиологии), так и для клеточной биологии.

Актуальность работы для медицины обусловлена тем, что с мутациями в гене *PKP2* связано развитие более чем половины случаев тяжелого наследственного заболевания – аритмогенной кардиомиопатии (АКМП), или дисплазия, правого желудочка, которое характеризуется прогрессирующим замещением миокарда правого желудочка жировой и соединительной тканью и проявляется желудочковыми аритмиями и высокой частотой внезапной смерти. Заболевание не имеет патогенетического лечения, и перспективы разработки такого лечения лежат в области раскрытия эффекторных механизмов мутаций, являющихся причиной АКМП. Изучение молекулярных механизмов развития АКМП на линиях кардиомиоцитов и трансгенных мышах показало, что мутации в генах белков десмосом (плакоглобине или десмоплакине) приводят не только к нарушениям функции межклеточных контактов, что ведет к ослаблению связи между кардиомиоцитами, и как следствие – к нарушениям электрического и механического сопряжения между ними, но и сопровождаются нарушением функционирования важнейших внутриклеточных сигнальных каскадов в клетках миокарда. Вследствие мутаций плакоглобин не способен входить в структуру десмосомы, перемещается в ядро и конкурирует с бета-катенином за связывание с регуляторными участками ДНК, что приводит к ингибированию сигнального пути Wnt, отвечающего за дифференцировку кардиомиоцитов, что в свою очередь способствует адипогенезу (Garcia-gras, 2006; Lombardi, Dong, 2009).

Самой частой причиной АКМП являются мутации в гене плакофиллина-2, однако механизм их влияния на развитие этого заболевания не изучен. Автором высказана гипотеза о том, что мутации в гене *PKP2* также могут приводить к нарушениям функции сигнального пути Wnt, что может влиять на процессы клеточной дифференцировки и способствовать жировому и фиброзному перерождению миокарда. Для проверки этой гипотезы автор использовал современный подход, основанный на получении кардиомиоцитов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), полученных от больных АКМП с верифицированными мутациями в гене *PKP2*. Такой подход позволяет не только получить

культуру кардиомиоцитов конкретного пациента, но и изучить процесс кардиомиоцитарной дифференцировки в динамике, что дает возможность оценить изменения активности сигнальных путей на ранних стадиях дифференцировки и определить, на каком этапе происходят нарушения, вызванные конкретными мутациями в геноме пациента.

Роль мутаций в гене *PKP2* в регуляции активности сигнального пути Wnt в процессе дифференцировки иПСК в кардиомиоцитарном направлении была исследована автором впервые, и для этого был применен сравнительный анализ клеток, полученных от больных АКМП и здоровых доноров, и метод внесения мутантных вариантов гена *PKP2* в иПСК с последующей дифференцировкой в кардиомиоциты. Полученные результаты позволили идентифицировать сигнальные каскады, регулируемые плакофиллином-2, что важно для понимания фундаментальных механизмов реализации множественных функций белков десмосом и определяет актуальность работы для фундаментальной науки - клеточной биологии.

Для достижения основной цели работы – идентификации механизмов влияния мутантного плакофиллина-2 на активность сигнального пути Wnt на клеточной модели АКМП, основанной на использовании иПСК больных с этим заболеванием, автором решались следующие задачи:

1. Оценить активность канонического сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с аритмогенной кардиомиопатией и здоровых доноров.
2. Оценить влияние уровня экспрессии плакофиллина-2 дикого типа на активность канонического сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.
3. Оценить влияние экзогенной экспрессии мутантных форм плакофиллина-2 на активность канонического сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.
4. Оценить активность канонического сигнального пути Wnt в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с аритмогенной кардиомиопатией и здоровых доноров.
5. Выявить другие сигнальные пути-регуляторы клеточной дифференцировки, активность которых изменена в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с аритмогенной кардиомиопатией и здоровых доноров.

В ходе выполнения диссертационной работы А.А. Худякову удалось впервые показать связь между уровнем экспрессии гена *PKP2* и активностью сигнального пути Wnt при кардиомиоцитарной дифференцировке иПСК, что указывает на роль плакофиллина-2, как регулятора этого сигнального каскада в кардиомиоцитах и их предшественниках. Более того, в иПСК, полученных от больных АКМП, имеющих мутации в гене *PKP2*, обнаружены изменения в активности сигнального пути Wnt, а также сигнального пути Notch в ходе дифференцировки в

кардиомиоциты, что также свидетельствует в пользу регуляторной роли плакофиллина-2 для этих сигнальных путей. Эта роль плакофиллина-2 подтверждается и тем, что мутантные формы плакофиллина-2 модулируют активность сигнального пути Wnt при кардиомиоцитарной дифференцировке иПСК. Приоритетным является и вывод диссертанта о том, что в мезенхимных стромальных клетках жировой ткани и сердца, полученных от больных АКМП с мутациями в гене плакофиллина-2, также изменена активность сигнального пути Wnt. Эти результаты создают основу для нового направления в изучении механизмов развития АКМП, а именно роли нарушений функций мезенхимных клеток миокарда, обусловленных мутациями в генах, ответственных за развитие АКМП.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа А.А. Худякова, изложенная на 135 страницах, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, полученных результатов, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 244 источника. Работа иллюстрирована 42 рисунками и 4 таблицами. В обзоре литературы подробно рассматриваются структура и функционирование десмосом, роль белков семейства armadillo в функционировании десмосом, особое внимание уделяется плакофиллинам, их роли в функционировании десмосом в различных тканях, множественным функциям этих белков. Автор подробно останавливается на описании сигнального пути Wnt, включая канонические и неканонические пути передачи сигнала, что собственно является предметом данной работы. Довольно большой раздел в обзоре посвящен стволовым клеткам, с акцентом на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, методах их получения, дифференцировки в кардиомиоциты и их использовании для моделирования заболеваний. Завершается обзор описанием аритмогенной кардиомиопатии, включая нерешенные вопросы патогенеза этого заболевания. Обзор включает самые современные данные и полную информацию по исследуемой проблеме, которая необходима для дальнейшего анализа полученных результатов и оценки роли плакофиллина-2 в регуляции сигнального пути Wnt и мутаций в гене этого белка десмосом в нарушениях функционирования данного сигнального пути при дифференцировке иПСК в кардиомиоциты. Обзор хорошо иллюстрирован 8 цветными рисунками-схемами.

В главе «Материалы и методы» представлен широкий набор современных методов получения, культивирования и характеристики различных клеточных культур, включая методы получения и характеристики индуцированных плюрипотентных клеток, их дифференцировки в кардиомиоциты; биохимических и молекулярно-биологических методов, включая целевое секвенирование кандидатных генов, сайт-специфический мутагенез, применение репортерного вектора с геном люциферазы для оценки активности сигнального пути Wnt, использованных автором диссертации при выполнении работы. Все методы абсолютно адекватны задачам работы.

Глава «Результаты» содержит 12 разделов, в которых подробно описаны результаты исследования. В первом разделе была проведена идентификация носителей мутаций генов

белков десмосомы среди пациентов с АКМП с помощью целевого секвенирования кандидатных генов (плакофилина-2 и десмоплакина). Во втором и третьем разделах описывается выбор клеточной модели для изучения патогенеза АКМП, получение и характеристика первичных культур мезенхимных стромальных клеток жировой ткани и миокарда и получение и дифференцировка иПСК от пациентов с АКМП и здоровых людей. Выбор клеточных моделей тщательно обоснован автором и основывается на исходной гипотезе работы о роли нарушений функционирования канонического сигнального пути Wnt, регулирующего переключение между кардиогенной и адипоцитарной дифференцировкой в кардиомиоцитах, в развитии жирового перерождения миокарда, характерного для АКМП. Культуры ММСК жировой ткани и мезенхимных клеток сердца, полученные из материалов биопсии соответствующих тканей, охарактеризованы по набору классических мезенхимных маркеров, способностям к соответствующим дифференцировкам, а также способности к кардиомиоцитарной дифференцировке.

Четвертый раздел работы посвящён получению и характеристике линий иПСК, несущих все изменения генома, присутствующие у пациента, и способных дифференцироваться в направлении кардиомиоцитов. Следует отметить, что иПСК получали путём репрограммирования первичной культуры клеток от пациентов с АКМП и здоровых доноров с помощью трансдукции клеток РНК-вирусом Сендай, который не встраивается в геном и элиминируется в течение месяца после трансдукции, что позволяет избежать неконтролируемого встраивания и его влияния на дифференцировочную способность полученных линий иПСК. Линии иПСК имели все признаки плюрипотентности, идентифицированные по экспрессии соответствующих маркеров, способности к дифференцировкам в направлении трех зародышевых листков и образованию тератом. Для дифференцировки в кардиомиоциты автор использовал хорошо известный способ со-культивирования иПСК с клетками мышечной энтодермальной линии END-2 (Mummary et al., 2003), что позволяло получить сокращающиеся клеточные агрегаты, содержащие дифференцированные кардиомиоциты.

В разделе 5 автор исследовал локализацию и уровень плакофилина-2 в кардиомиоцитах, дифференцированных из иПСК больных АКМП и здоровых людей (контроль). Было показано, что уровень плакофилина-2 в кардиомиоцитах, полученных в результате дифференцировки иПСК от пациента с АКМП, был существенно ниже, чем в контроле только в клетках пациента, являющегося носителем двух мутаций в гене *PKP2*: c.354delT, делеции, приводящей к сдвигу рамки считывания, и аминокислотной замены K859R, и не был изменен в клетках пациента с другими мутациями в гене *PKP2*. При этом отсутствовали какие-либо изменения уровней и локализации плакоглобина и β -катенина, а также нарушения кардиогенной дифференцировки линий иПСК от пациентов с АКМП.

Раздел 6 посвящен изучению активности канонического сигнального пути Wnt в ходе кардиомиоцитарной дифференцировки иПСК, для чего использовали репортерную конструкцию

TopFlash, несущую ген люциферазы под промотором с сайтами связывания комплекса TCF/LEF, и оценили экспрессию генов-мишеней Wnt *AXIN2*, *SOX2* и *SOX9*. Полученные результаты показали, что активность сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки иПСК была снижена в клетках пациентов с мутациями в гене *PKP2*, сочетающимися со сниженным уровнем плакофиллина-2, и в гене десмоплакина, и не была изменена в клетках, полученных от пациента с мутацией в гене *PKP2*, сочетающейся с неизменным уровнем плакофиллина-2. Различия в активности сигнального пути Wnt и экспрессии гена плакофиллина-2 среди пациентов с АКМП автор объясняется различным эффектом мутаций десмосомных белков. Так у носителя двух мутаций в гене *PKP2* выраженные изменения в активности пути Wnt могли быть обусловлены нехваткой плакофиллина-2 в составе десмосом в как результате мутаций, приводящих к гаплонедостаточности *PKP2*. У другого пациента мутация приводила к синтезу укороченного белка, но, вероятно, способного выполнять свои функции, что сочеталось с неизменной активностью сигнального пути Wnt.

Седьмой раздел посвящен поиску потенциальных мишеней сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП, для чего автор оценил экспрессию 26 генов, являющихся участниками или мишенями различных сигнальных путей и регулирующих различные клеточные процессы. Полученные результаты показали, что помимо сигнального пути Wnt в процесс развития АКМП могут быть вовлечены сигнальный путь Hippo, сигнальный путь Notch и транскрипционные факторы, регулирующие ранние стадии кардиогенеза.

Для изучения вклада отдельных мутаций гена *PKP2* в регуляцию активности сигнального пути Wnt в разделе 8 были получены и охарактеризованы лентивирусные конструкции, несущие ген *PKP2* дикого типа, а также его мутантные формы, для чего использовали сайт-специфический мутагенез. В следующем разделе было исследовано влияние введения полученных конструкций в клетки линии кардиомиоцитов мыши HL-1 на ультраструктурную организацию десмосом. Несмотря на эффективную экспрессию лентивирусных конструкций, несущих мутантные формы гена *PKP2*, в клетках HL-1 ожидаемых изменений в ультраструктурной организации десмосом или увеличения межклеточного пространства в области десмосомы обнаружено не было.

В разделе 10 автор отвечает на закономерный вопрос о том, может ли повышение экспрессии *PKP2* в иПСК от пациента с АКМП, у которого обнаружена сниженная экспрессия *PKP2* и сниженная активность сигнального пути Wnt, восстанавливать его активность. Используя трансдукцию иПСК лентивирусными конструкциями с геном *PKP2* дикого типа и оценку активности люциферазного репортера и экспрессию генов-мишеней сигнального пути Wnt автор убедительно показал, что введение *PKP2* дикого типа в иПСК с пониженным уровнем его эндогенной экспрессии способствовало повышению активности Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки. Это подтверждает предположение автора о регуляции активности сигнального пути Wnt уровнем плакофиллина-2 в клетке.

Раздел 11 посвящен изучению влияния мутаций гена *PKP2* на активность канонического сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК, полученных от людей без мутаций в гене *PKP2*. Было установлено, что введение мутантных форм *PKP2* в контрольные иПСК не снижало активность люциферазного репортера и уровень экспрессии генов-мишеней сигнального пути Wnt *SOX9* и *SOX2* в ходе кардиогенной дифференцировки иПСК, а в случае некоторых мутаций прослеживалась даже тенденция к увеличению активности этого сигнального пути, указывающая на модулирующее действие экспрессии мутантных форм *PKP2*.

В заключительном 12-м разделе главы «Результаты» решается задача оценки активности сигнального пути Wnt в мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с АКМП. Поскольку эти клетки не образуют десмосом, экспрессия *PKP2* в них слабая, а базовый уровень активности сигнального пути Wnt невысокий, вполне оправданно, что эксперименты проведены автором в присутствии ингибитора GSK3 β киназы CHIR99021, существенно повышающего эту активность. Было установлено, что в первичных культурах ММСК и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с мутациями в гене *PKP2*, активность канонического сигнального пути Wnt снижена.

В главе «Обсуждение» проводится сопоставление полученных данных об изменении активности сигнального пути Wnt в клетках больных с АКМП с имеющимися в литературе данными по влиянию различных мутаций в генах белков десмосом на этот сигнальный путь и известными данными о механизмах регуляции его активности. Этот раздел убедительно демонстрирует основные достижения диссертанта, владение информацией в данной области и его умение интерпретировать полученные результаты.

Выводы вполне обоснованы и полностью соответствуют представленным результатам, достоверность которых не вызывает сомнения. Автореферат полностью отражает результаты работы.

Материалы диссертации изложены в 12 публикациях, 9 из которых – статьи в научных журналах, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций, 3 – тезисы конференций.

Принципиальных замечаний по работе нет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Худякова Александра Александровича на тему: «Изучение роли сигнального пути Wnt в развитии аритмогенной кардиомиопатии на модели индуцированных плюрипотентных стволовых клеток», содержит новые, приоритетные данные фундаментального плана, касающиеся механизмов реализации множественных функций белков десмосом и, в частности, влияния плакофиллина-2 на функционирование сигнального пути Wnt, играющего

важную роль в регуляции кардиомиоцитарной дифференцировки. Диссертация решает актуальные задачи как общебиологической, так и медицинской значимости, раскрывая механизмы влияния мутаций в белках десмосом на развитие аритмогенной кардиомиопатии. По своей новизне, научной ценности, объему выполненных исследований и достоверности полученных результатов диссертация полностью соответствует основным квалификационным критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Худяков Александр Александрович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Руководитель лаборатории ангиогенеза
Института экспериментальной кардиологии
ФГБУ «Российский кардиологический
научно-производственный комплекс» МЗ РФ,
доктор медицинских наук, профессор



Е.В. Парфенова

Адрес: 121552, Москва, 3-я Черепковская улица, 15-а,
ФГБУ «Российский кардиологический
научно-производственный комплекс» МЗ РФ,
тел.+7(495)414-67-13; e-mail: yeparfyon@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора Е.В. Парфеновой заверяю.
Ученый секретарь
Института экспериментальной кардиологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский кардиологический научно-производственный комплекс»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



С.А. Левашова