



ХУДЯКОВ

Александр Александрович

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ WNT В
РАЗВИТИИ АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ НА
МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург и Федеральном государственном бюджетном учреждении “Северо-западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург.

Научные руководители:

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН
Томилин Алексей Николаевич
руководитель лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

кандидат биологических наук
Малашичева Анна Борисовна
заведующая научно-исследовательской лабораторией молекулярной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения “Северо-западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Лагарькова Мария Андреевна
заведующая лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства”, Москва

доктор медицинских наук, профессор
Парфенова Елена Викторовна
руководитель лаборатории ангиогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения “Российский кардиологический научно-производственный комплекс” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится “___” _____ 2016 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д.4.

E-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте Института.

Автореферат разослан “___” _____ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) является наследственным аутосомно-доминантным заболеванием, которое характеризуется нарушением контактов между кардиомиоцитами, замещением ткани миокарда на жировую и соединительную ткани, аритмиями и внезапной смертью (Thiene et al., 1988; Corrado et al., 1997). Генетические исследования пациентов выявили ряд генов, мутации в которых ассоциированы с развитием АКМП. Среди них основную часть составляют гены, кодирующие белки десмосомы: десмоплакин (Rampazzo et al., 2002), десмоколлин-2 (Syrris et al., 2006), десмоглеин-2 (Pilichou et al., 2006), плакоглобин (McKoy et al., 2000) и плакофиллин-2 (Gerull et al., 2004). Мутации в гене плакофиллина-2 (*PKP2*) встречаются наиболее часто и составляют примерно половину всех ассоциированных с АКМП мутаций (Gerull et al., 2004). Включение мутантных белков в десмосому или нарушение синтеза белков десмосом, вызванное мутацией, приводят к перестройке межклеточных контактов, ослаблению связи между соседними кардиомиоцитами, нарушению электрической и механической целостности миокарда. Помимо структурных изменений развитие АКМП сопровождается нарушением функционирования внутриклеточных сигнальных каскадов (Garcia-Gras et al., 2006; Oxford et al., 2014; Chen et al., 2014). Механизмы регуляции сигнальных путей белками десмосом до сих пор не изучены.

In vitro на линии кардиомиоцитов мыши HL-1 и *in vivo* с использованием трансгенных мышей было показано, что плакоглобин, лишённый способности входить в структуру десмосомы в результате мутации или при отсутствии в клетке десмоплакина может перемещаться в ядро, где он конкурирует с β -катенином за связывание с различными регуляторными участками ДНК, тем самым ингибируя канонический сигнальный путь Wnt (Garcia-Gras et al., 2006; Lombardi, Dong, 2009). В свою очередь, канонический сигнальный путь Wnt регулирует клеточную дифференцировку, его ингибирование может приводить к адипогенезу (Ross et al., 2000; Garcia-Gras et al., 2006). В другом исследовании на модели трансгенных мышей с индуцированным выключением гена плакоглобина было отмечено развитие АКМП, сопровождающееся активацией сигнального пути Wnt (Li et al., 2011). Таким образом, как ингибирование, так и активация сигнального пути Wnt может приводить к появлению признаков АКМП.

Несмотря на то, что наиболее частой причиной развития АКМП являются мутации гена *PKP2*, основной эффекторный механизм этих мутаций до сих пор неизвестен. Настоящая работа посвящена изучению роли мутаций *PKP2* в регуляции активности канонического сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). Было сделано предположение, что нарушение регуляции этого сигнального пути может влиять на кардиогенную дифференцировку иПСК и сдвигать её в адипоцитарном и фиброзном направлении. Впервые проведена оценка активности сигнального пути Wnt в первичных культурах клеток, полученных от пациентов с АКМП, а также применён подход внесения мутантных вариантов гена *PKP2* в иПСК с их последующей дифференцировкой в кардиомиоциты.

Идентификация сигнальных каскадов, в которых участвуют белки десмосомы, важна для развития фундаментальных представлений о функциях этих белков, а также для разработки фармакологической терапии АКМП, направленной на восстановление не только структурных, но и сигнальных функций десмосом.

Цели и задачи исследования

Цель:

Изучить механизмы влияния мутантного плакофиллина-2 на активность сигнального пути Wnt при аритмогенной кардиомиопатии, смоделированной с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

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.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с аритмогенной кардиомиопатией, изменена активность сигнального пути Wnt.
2. Активность сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток регулируется уровнем экспрессии *PKP2*.
3. Мутантные формы плакофиллина-2 способны модулировать активность сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.
4. Активность сигнального пути Wnt изменена в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках жировой ткани и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с аритмогенной кардиомиопатией.
5. В ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с аритмогенной кардиомиопатией, изменена активность сигнального пути Notch.

Научная новизна работы

В работе впервые показано, что в ходе кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП изменена активность сигнальных путей Wnt и Notch. Обнаружена связь между уровнем экспрессии *PKP2* дикого типа и активностью сигнального пути Wnt. Также впервые показано изменение активности сигнального пути Wnt в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках жировой ткани и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с АКМП.

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные данные вносят существенный вклад в фундаментальные представления о роли белков десмосомы в регуляции сигнальных путей, а также о разнообразии молекулярных механизмов, лежащих в основе развития АКМП. Результаты исследования

демонстрируют необходимость сочетания генетических и функциональных исследований с применением различных клеточных моделей для оценки роли генетических изменений. Результаты настоящей работы могут быть использованы в курсах лекций по клеточной биологии и трансляционной медицине.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 9 статей (в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ) и 3 тезисов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 244 наименования. Материалы диссертации изложены на 135 страницах машинописного текста и иллюстрированы 42 рисунками и 4 таблицами. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 14-50-00068 и 14-15-00745).

Личный вклад автора

Большая часть экспериментальных процедур, описанных в работе, были проведены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова, у всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в генетическом исследовании и биопсию жировой ткани или миокарда. В исследование были включены три пациента с диагнозом аритмогенная кардиомиопатия в соответствии с общепринятыми критериями (Azaouagh et al., 2011) и три здоровых донора, биоматериал от которых использовался в качестве контроля.

Культуры клеток. В работе использовали следующие культуры клеток: линия клеток эмбриональной почки человека HEK 293T, линия клеток HeLa, линия кардиомиоцитов мыши HL-1, линия клеток энтодермы мыши END-2, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) жировой ткани, мезенхимные клетки сердца, мышечные эмбриональные фибробласты, линии iPСК человека.

Культивирование клеток линий HEK 293T и HeLa. Клетки линий HEK 293T и HeLa культивировали на среде, содержащей DMEM, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 2 mM глутамина, 50 ME/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США).

Культивирование линии клеток END-2. Клетки линии END-2 культивировали на среде, содержащей DMEM/F12, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2мМ L-глутамина, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США).

Культивирование линии кардиомиоцитов мышцы HL-1. Линия HL-1 была любезно предоставлена Аркадием Рутковским, Университет Осло, Норвегия. Клетки линии HL-1 культивировали в среде Claycomb (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Получение и культивирование ММСК жировой ткани. ММСК жировой ткани получали из биоптата жировой ткани и культивировали согласно ранее описанной методике (Zuk et al., 2001).

Получение и культивирование мезенхимных клеток сердца. Мезенхимные клетки сердца получали из биоптата миокарда или участка миокарда, полученного в рамках трансплантации сердца согласно описанной ранее методике (Smits et al., 2009).

Получение и культивирование иПСК. иПСК получали путём репрограммирования ММСК жировой ткани и мезенхимных клеток сердца путём трансдукции их вирусами Сендай, несущими “коктейль Яманаки” (Cyto Tune 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Life Technologies, США)), отдельные линии изолировали и культивировали согласно рекомендациям производителя. иПСК культивировали на фидерном слое мышечных эмбриональных фибробластов, полученных из 14-суточных мышечных эмбрионов линии DBA/2JxBalb/c.

Дифференцировка иПСК в направлении кардиомиоцитов. Дифференцировку иПСК осуществляли методом сокультивирования их с клеточной линией END-2, согласно описанной ранее методике (Mummary et al., 2003).

Выделение РНК из клеток и проведение реакции обратной транскрипции. РНК из клеток выделяли реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия) и обрабатывали ДНКазой I (ThermoScientific, США). Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полуколичественная ПЦР. Полуколичественную ПЦР проводили с использованием Taq-полимеразы (Силекс, Россия) согласно рекомендациям производителя.

ПЦР в режиме реального времени. Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали смесь qPCRmix-HS (Евроген, Россия) в сочетании с готовой смесью праймеров и пробы TaqMan (Thermo Scientific, США) или готовую смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) в сочетании с синтезированными праймерами из базы данных Primer Depot (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>).

Иммуноцитохимическая окраска клеток. Белки выявляли в клетках, фиксированных 4 % раствором параформальдегида, при помощи первичных антигенспецифичных антител и вторичных антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США). Ядра клеток окрашивали DAPI (Invitrogen, США). Микрофотографии получали при помощи микроскопа AxioObserver.D1 (Carl Zeiss, Германия). Обработку изображений производили в программах Axiovision Rel.4.7 и Zen 2012 (Carl Zeiss, Германия).

Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн блоттинг. Электрофорез в

полиакриламидном геле проводили в модификации Лэммли (Laemmli, 1970). Далее белки переносили на мембрану и выявляли при помощи первичных антигенспецифичных антител и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой (BioRad, США). Хемилюминесцентное излучение регистрировали при помощи системы гель-документации (Vilber Lourmat, Германия). Интенсивность бэндов оценивали при помощи программы ImageJ (Schneider et al., 2012).

Измерение активности люциферазы. Для оценки активности канонического сигнального пути Wnt использовали лентивирусный вектор на основе плазмиды 7TFC (Addgene 24307) (Fuerer, Nüsse, 2010) и набор Luciferase Assay System (Promega, США).

Клонирование кодирующей последовательности *PKP2* в лентивирусный вектор. Кодирующую последовательность гена *PKP2*, несущую фрагмент flag на 3'-конце, амплифицировали, используя в качестве матрицы плазмиду 915-Plakophilin 2a-Flag (Addgene 32230). Полученный фрагмент клонировали по сайтам рестрикции AscI и EcoRI в лентивирусный вектор pLV-T7-lacZiresBla-5600.

Сайт-специфический мутагенез. Для сайт-специфического мутагенеза проводили ПЦР, используя плазмиду pLV-T7-PKP2iresBla в качестве матрицы и пару праймеров, несущих соответствующую мутацию, после чего исходную плазмиду удаляли, обрабатывая реакционную смесь FastDigest DpnI (Thermo Scientific, США). Полученную смесь в количестве 5 мкл использовали для трансформации компетентных бактерий *E. coli*, штамм Top10. Наличие мутации подтверждали секвенированием.

Продукция лентивирусных частиц. Продукцию лентивирусных частиц осуществляли согласно протоколу, разработанному в лаборатории Д. Троно (<http://tcf.epfl.ch>).

Трансдукция клеточных культур. Трансдукцию клеточных культур вирусными частицами осуществляли с MOI = 10 в присутствии 2 мкг/мл полибрена. Селекцию и ПСК проводили через 72 часа после трансдукции лентивирусными векторами в течение 4 суток, добавляя в среду бластицидин в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, США). Для сравнения двух групп применяли критерий Манна-Уитни, для множественного сравнения применяли тест Краскела-Уоллиса с поправкой Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Идентификация носителей мутаций генов десмосомы среди пациентов с АКМП

В ходе генетических исследований пациентов с диагнозом аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) с применением целевого секвенирования кандидатных генов были идентифицированы носители мутаций генов белков десмосомы — плакофиллина-2 (*PKP2*) и десмоплакина (*DSP*). Пациент, обозначаемый далее АКМП1, являлся носителем двух мутаций в гене *PKP2*: c.354delT — делеции, приводящей к сдвигу рамки считывания,

и миссенс-мутации K859R. Пациент, обозначаемый далее АКМП2, являлся носителем делеции с.1521-1536del в гене *PKP2*, приводящей к сдвигу рамки считывания. Пациент, обозначаемый далее АКМП3, являлся носителем миссенс-мутации H1684R гена *DSP*.

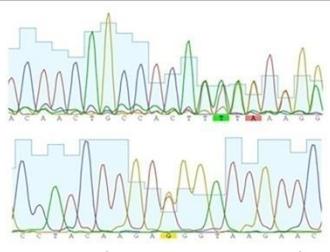
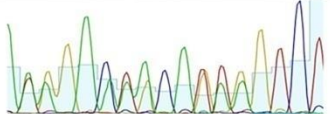
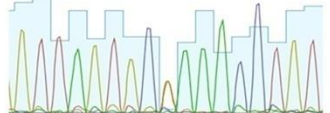
Пациент	Сиквенс	Мутация	Первичная культура клеток
АКМП1		<i>PKP2</i> с.23321delT  <i>PKP2</i> K859R 	ММСК жировой ткани
АКМП2		<i>PKP2</i> с.1521-1536del 	Мезенхимные клетки сердца
АКМП3		<i>DSP</i> H1684R 	ММСК жировой ткани

Таблица 1. Данные о пациентах с АКМП и полученных от них первичных культурах клеток. Прямоугольниками схематично показано положение мутации в кодирующей части гена.

У пациентов АКМП1 и АКМП3 и двух здоровых доноров была проведена биопсия жировой ткани. Из полученной жировой ткани выделяли первичные культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). Материал, полученный при биопсии миокарда пациента АКМП2, использовали для выделения культуры мезенхимных клеток сердца. Также был получен участок миокарда от здорового донора, служивший источником контрольной культуры мезенхимных клеток сердца. Данные о мутациях и первичных культурах клеток от пациентов обобщены в таблице 1.

2. Получение и дифференцировка линий иПСК

2.1. Получение и характеристика линий иПСК

иПСК получали путём репрограммирования первичных культур клеток от трёх пациентов с АКМП и трёх здоровых доноров. Всего от пациентов АКМП1, АКМП2 было получено и охарактеризовано по 5 индивидуальных линий иПСК, от пациента АКМП3 — 3 линии иПСК, от здоровых доноров — 8 контрольных линий иПСК (5 линий из ММСК жировой ткани и 3 линии из мезенхимных клеток сердца).

Полученные колонии иПСК проявляли характерные для эмбриональных стволовых клеток морфологические характеристики и экспрессировали маркеры плюрипотентности:

транскрипционные факторы OCT3/4 и NANOG, поверхностные маркеры TRA-1-60 и TRA-1-81, а также демонстрировали позитивную окраску на щелочную фосфатазу. Эндогенная экспрессия основных маркеров плюрипотентности также была подтверждена методом ПЦР с обратной транскрипцией. Помимо этого, плюрипотентность двух линий иПСК (контрольной линии и линии от пациента АКМП1) была подтверждена *in vivo* при помощи анализа тератом, сформировавшихся в результате инъекции иПСК иммунодефицитным мышам линии Nude, и *in vitro* при помощи анализа тканеспецифичной экспрессии генов в эмбрионидных телах, сформированных из иПСК.

2.2. Дифференцировка иПСК в направлении кардиомиоцитов

Дифференцировку полученных линий иПСК в кардиомиоциты осуществляли с помощью сокультивирования их с клетками мышечной энтодермальной линии END-2. Полученные в результате дифференцировки контрольных линий иПСК кардиомиоциты демонстрировали позитивную окраску на сердечные изоформы тропомиозина и тропонина Т, демонстрировавшие характерную поперечную исчерченность, α -актинин и десмин (рис. 1, а); на уровне мРНК наблюдали экспрессию тропонина Т (*TNNT2*), *MEF2C*, тяжёлых и лёгких цепей миозина (*MHC* и *MLC2V*) (рис. 1, б).

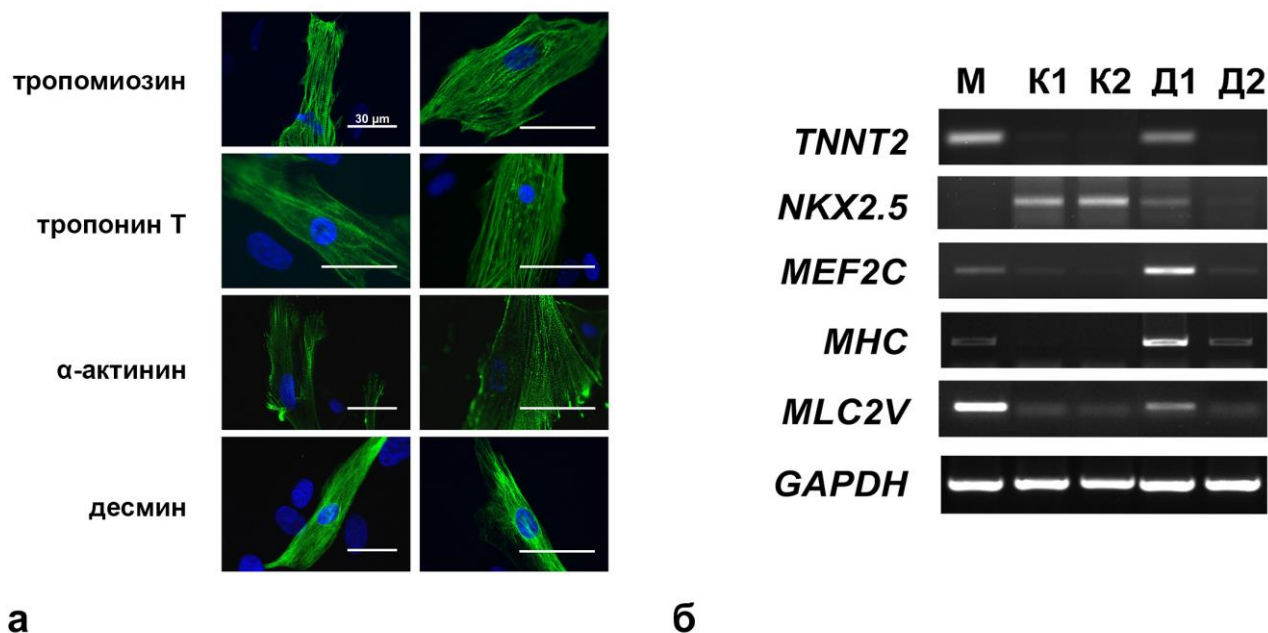


Рис. 1. Характеристика кардиомиоцитов, полученных из иПСК. а — иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов; б — экспрессия маркеров кардиогенной дифференцировки на уровне мРНК. К1, К2 — недифференцированные контрольные линии иПСК; Д1, Д2 — эти же линии иПСК, дифференцированные в кардиомиоциты; М — миокард человека. Длина масштабной линейки 30 мкм.

Таким образом, иПСК способны эффективно дифференцироваться в направлении кардиомиоцитов, характеристики которых сопоставимы с терминально дифференцированными кардиомиоцитами миокарда.

3. Характеристика кардиомиоцитов, полученных от пациентов с АКМП

3.1. Характеристика дифференцированных кардиомиоцитов пациента

АКМП1

В дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКМП1 плакофиллин-2 был локализован в районе межклеточных контактов (рис.2, а). Уровень плакофиллина-2 в кардиомиоцитах, полученных в результате дифференцировки иПСК от пациента АКМП1, был существенно ниже, чем в контроле (рис. 2).

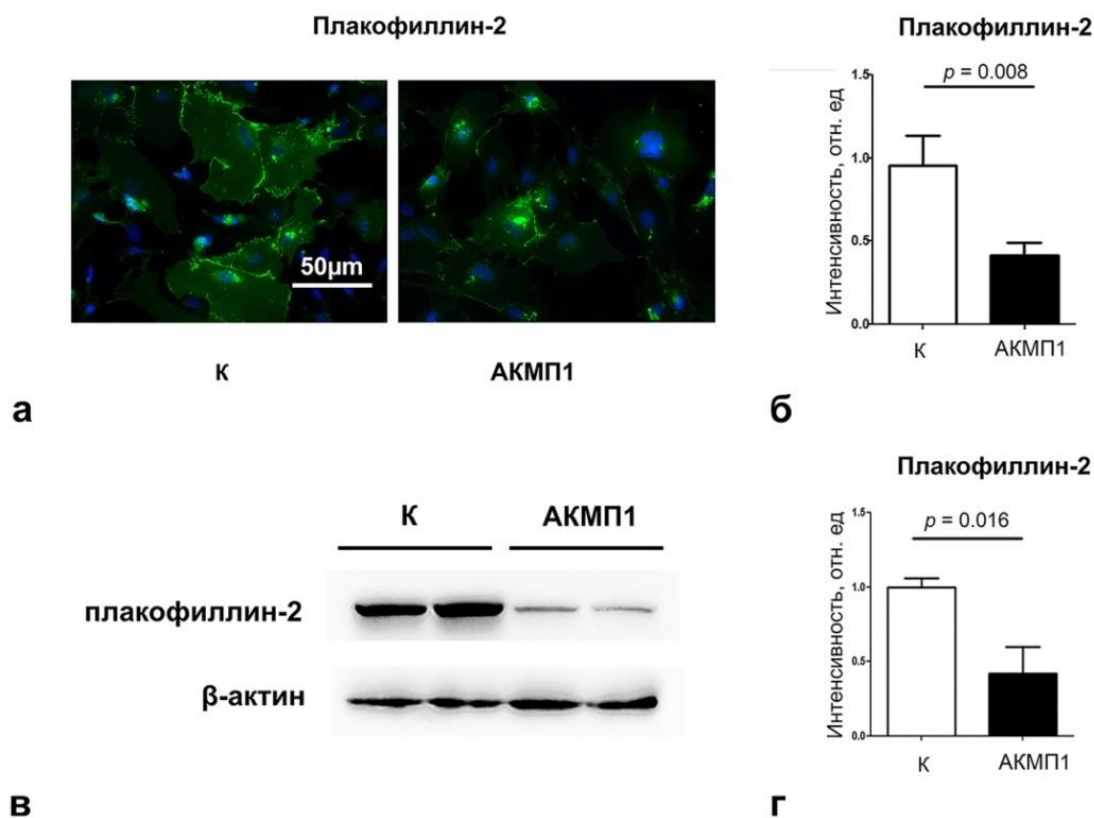


Рис. 2. Уровень плакофиллина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКМП1 и в контроле. а — иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов; б — результат измерения интенсивности иммуноцитохимической окраски; в — идентификация плакофиллина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноблоттинга; г — результат измерения интенсивности бэндов, соответствующих плакофиллину-2.

Поскольку в составе десмосомы плакофиллин-2 связан с плакоглобином, а ядерная транслокация последнего может являться причиной негативной регуляции сигнального пути Wnt при АКМП (Garcia-Gras et al., 2006; Kim et al., 2013), мы оценили уровень и локализацию плакоглобина в дифференцированных кардиомиоцитах. Плакоглобин в дифференцированных кардиомиоцитах пациента АКМП1 был ассоциирован с межклеточными контактами, его локализации в районе ядра обнаружено не было (рис. 3, а). Уровень плакоглобина в дифференцированных кардиомиоцитах АКМП1 не отличался от контроля (рис. 3, б, в).

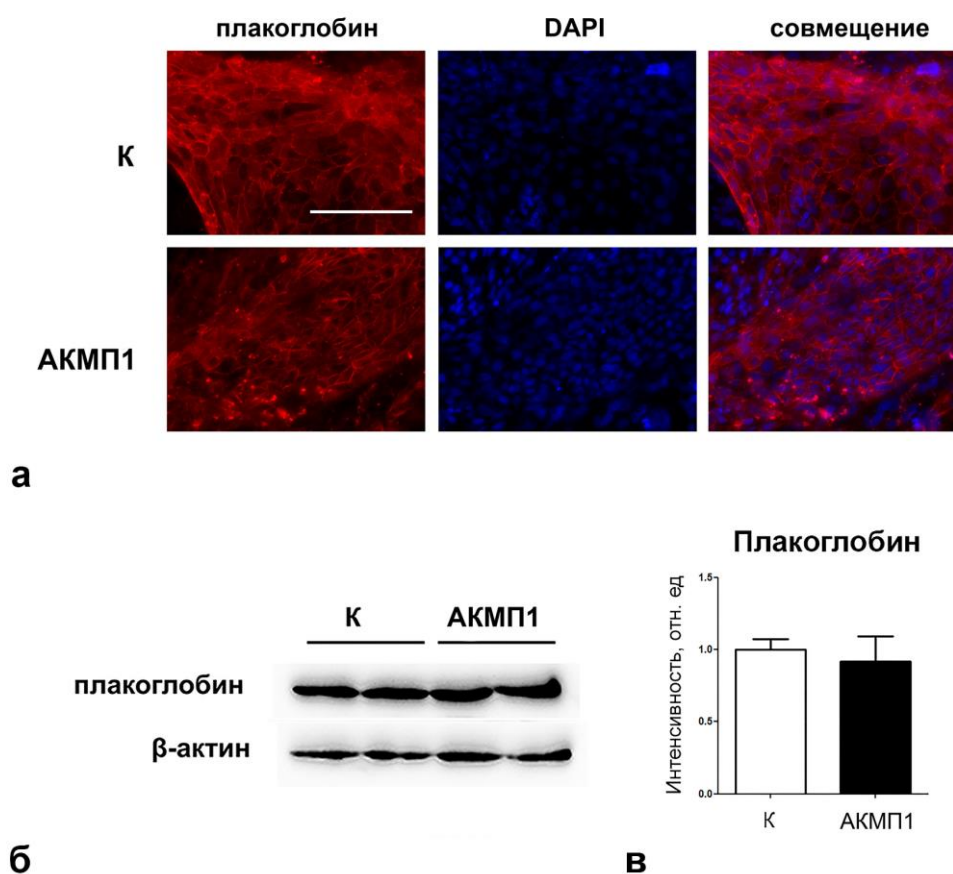


Рис. 3. Локализация плакоглобина в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКМП1 и в контроле. а — иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов; б — идентификация плакоглобина в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноблоттинга; в — результат измерения интенсивности бэндов, соответствующих плакоглобину. Длина масштабной линейки 150 мкм.

Ранее было показано, что снижение уровня плакофиллина-2 в составе десмосом ведет к структурному и функциональному изменению межклеточных контактов, а также может затрагивать β-катенин, ассоциированный с адгезионными контактами, ядерная

транслокация которого влияет на активность сигнального пути Wnt (Oxford et al., 2014). Нами была выполнена оценка уровня и внутриклеточной локализации β -катенина в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКМП1 и контрольных линий иПСК. β -катенин был локализован в районе межклеточных контактов и в перинуклеарной части цитоплазмы (рис. 4, а), различия в его количестве между линиями иПСК не наблюдали (рис. 4, б, в).

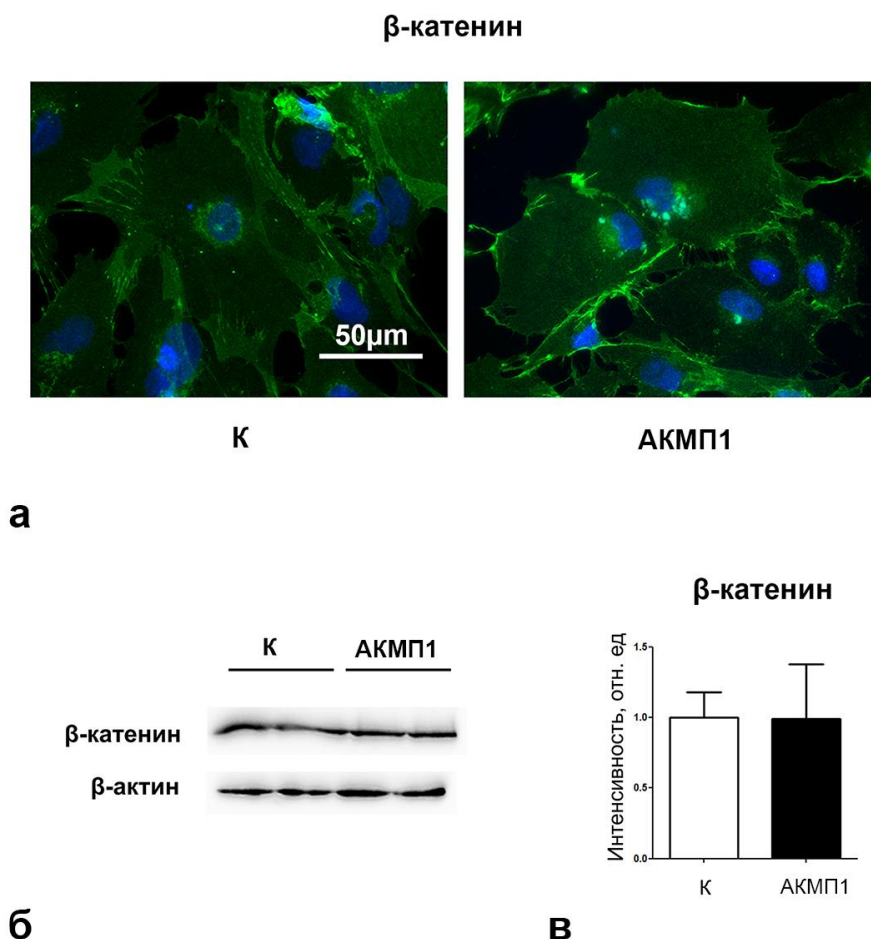


Рис. 4. Локализация и уровень β -катенина в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКМП1 и в контроле. а — иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов; б — идентификация β -катенина в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноблоттинга; в — результат измерения интенсивности бэндов, соответствующих β -катенину.

3.2. Экспрессия *PKP2* в ходе кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП

Далее было осуществлено сравнение экспрессии *PKP2* в ходе дифференцировки иПСК от пациентов АКМП1–3 и контрольных линий. Экспрессия *PKP2* на уровне мРНК в

кардиомиоцитах, полученных от пациента АКМП1, была снижена по сравнению с контролем на 7 сутки дифференцировки иПСК (рис. 5, а), в то время как экспрессия *PKP2* в кардиомиоцитах, полученных от пациентов АКМП2 и АКМП3, не была изменена по сравнению с контролем (рис. 5, б, в).

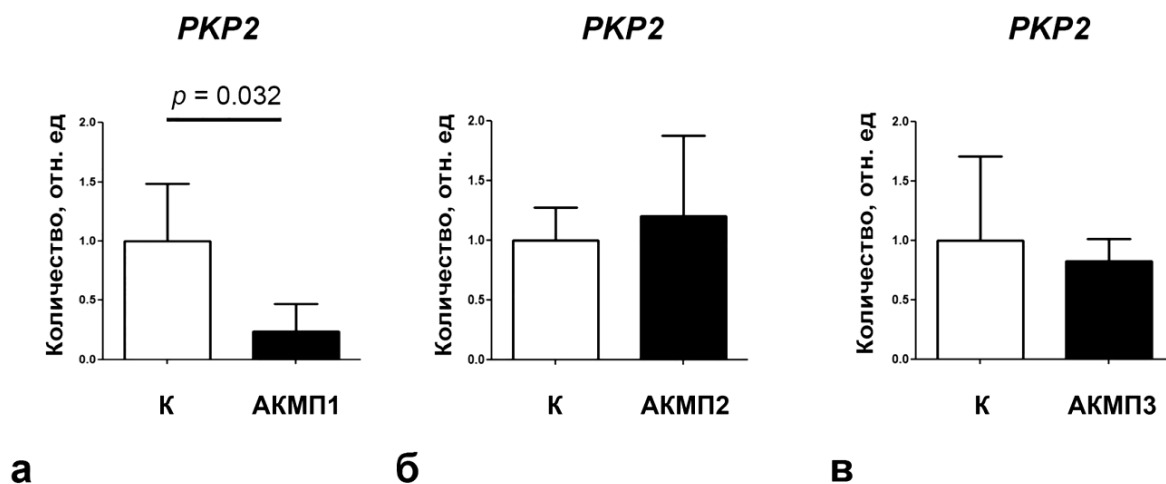


Рис. 5. Экспрессия *PKP2* на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП и контрольных линий иПСК.

3.3. Оценка эффективности кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП

Для изучения эффективности кардиогенной дифференцировки иПСК мы оценили уровень экспрессии белка саркомера тропонина Т. Экспрессия тропонина Т, не различалась между линиями иПСК от пациентов АКМП1–3 и контрольными линиями на 7 сутки дифференцировки иПСК (рис. 6).

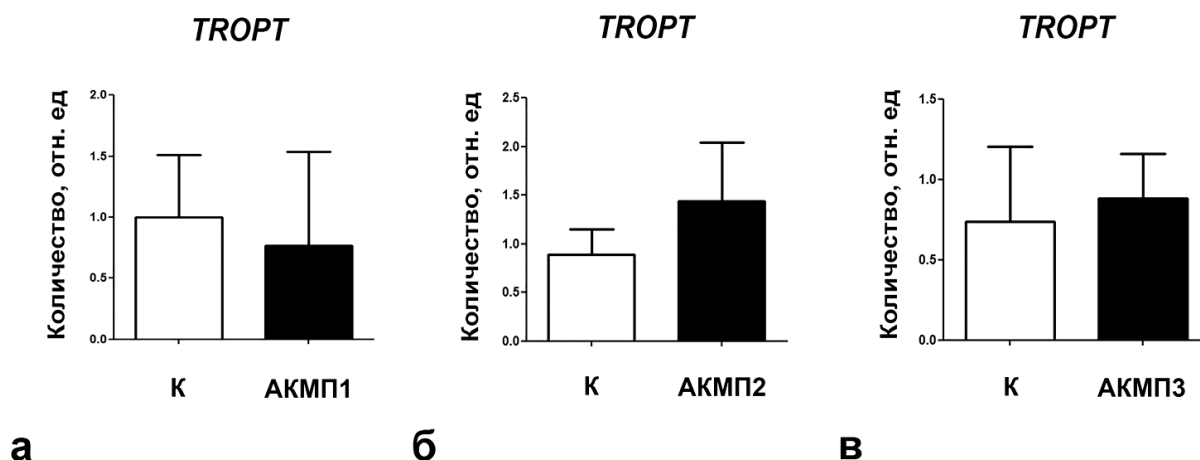


Рис. 6. Экспрессия гена тропонина Т на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП и контрольных линий иПСК.

4. Изучение активности канонического сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК

Для проверки предположения о том, что мутации гена *PKP2* могут приводить к изменению активности канонического сигнального пути Wnt, мы провели оценку активности канонического сигнального пути Wnt с помощью репортерной конструкции TopFlash, несущей ген люциферазы под промотором с сайтами связывания комплекса TCF/LEF, а также оценили экспрессию генов-мишеней Wnt — *AXIN2*, *SOX2* и *SOX9* при индукции кардиогенной дифференцировки иПСК.

Линии, полученные от пациента с АКМП1, имели пониженный уровень активности репортера с 7 по 24 сутки кардиогенной дифференцировки (рис. 7).

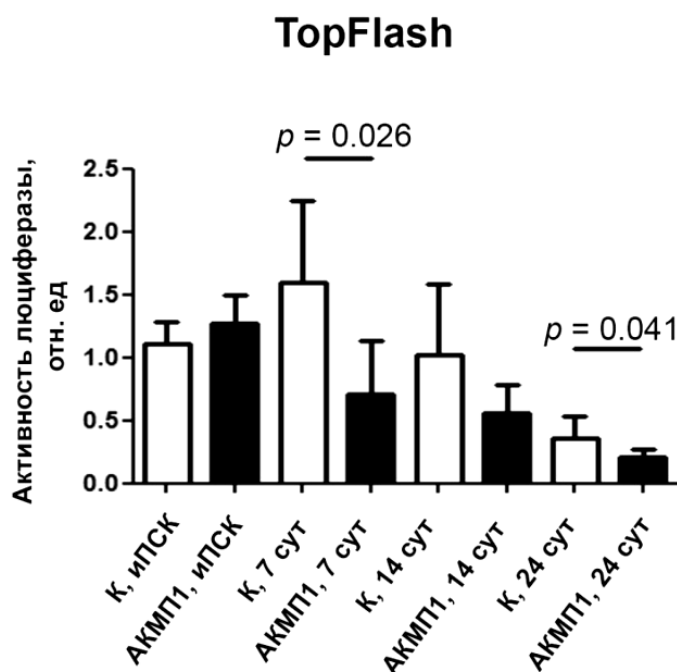


Рис. 7. Активность канонического сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки иПСК от пациента АКМП1 и контрольных линий иПСК.

Далее была проведена оценка активности этого сигнального пути в процессе дифференцировки иПСК от пациентов АКМП2 и АКМП3. Активность люциферазного репортера на 7 сутки дифференцировки иПСК АКМП2 не была снижена по сравнению с контролем (рис. 8, д), также как и экспрессия генов-мишеней сигнального пути Wnt (рис. 8, е–з). Активность люциферазного репортера и экспрессия генов-мишеней сигнального пути Wnt на 7 сутки дифференцировки иПСК АКМП3 была несколько понижена (рис. 8, и–м).

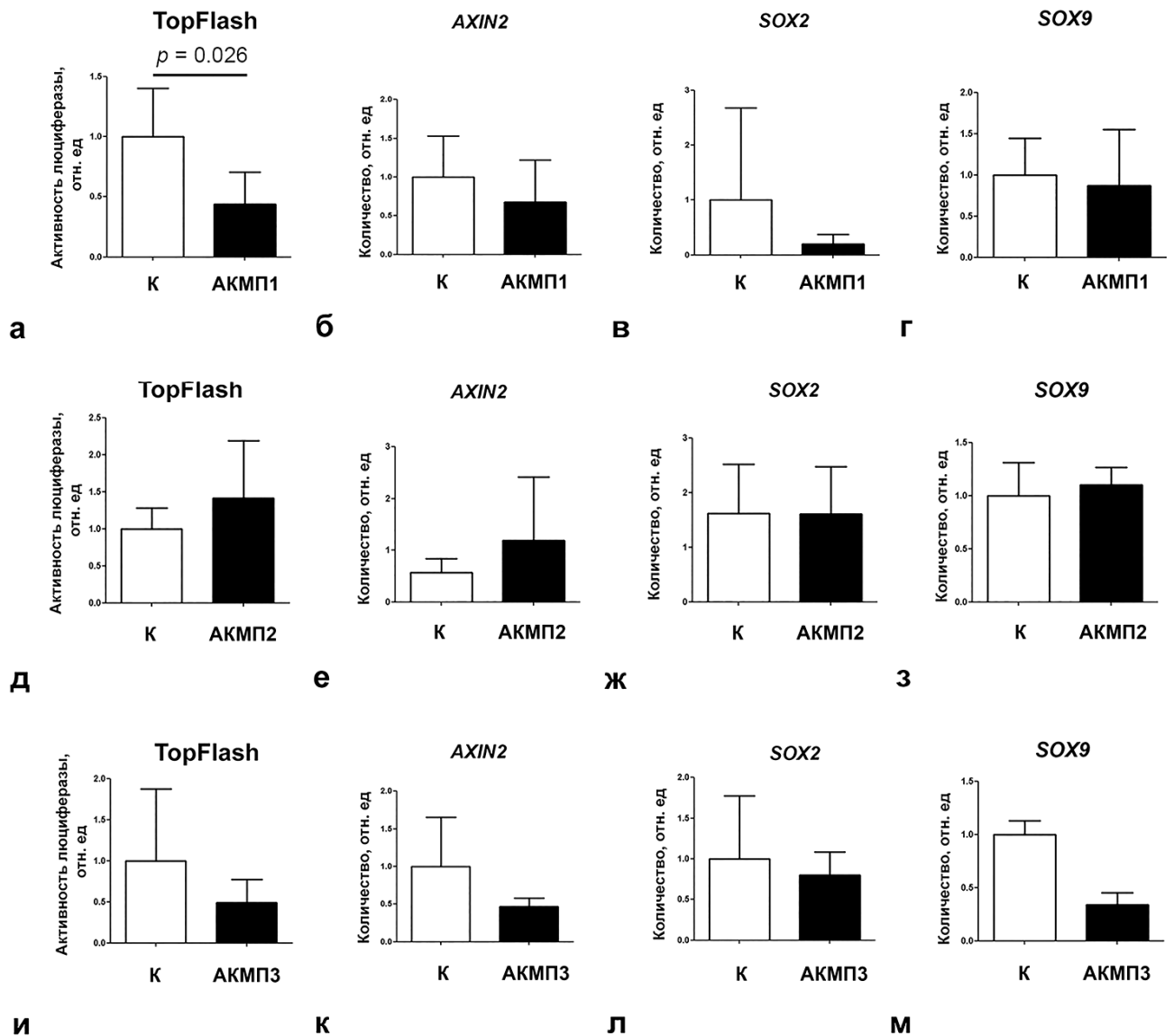


Рис. 8. Активность канонического сигнального пути Wnt на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП и контрольных линий иПСК. а, д, и — активность люциферазного репортера TopFlash; б, е, к — экспрессия гена *AXIN2* на уровне мРНК; в, ж, л — экспрессия гена *SOX2* на уровне мРНК; г, з, м — экспрессия гена *SOX9* на уровне мРНК.

5. Поиск потенциальных мишеней сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК от пациента АКМП1

Для поиска потенциальных мишеней, изменяющих свою экспрессию в результате сниженной активности сигнального пути Wnt, мы оценили экспрессию 26 генов, являющихся участниками или мишенями различных сигнальных путей Wnt, Notch, Hippo, TGF β , MAPK и др. на 7 сутки кардиогенной дифференцировки линий иПСК от пациента АКМП1 и контрольных линий иПСК. На 7 сутки кардиогенной дифференцировки в иПСК от АКМП1 была заметно изменена экспрессия генов *NF2*, *HEY1* и *HES1* по сравнению с

контрольными кардиомиоцитами. Затем экспрессия этих генов была оценена на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК, полученных от пациентов АКМП2 и АКМП3.

В ходе дифференцировки иПСК от пациентов АКМП1 и АКМП2 экспрессия гена *NF2*, участника сигнального пути Hippo, была повышена по сравнению с контролем (рис. 9, а, б).

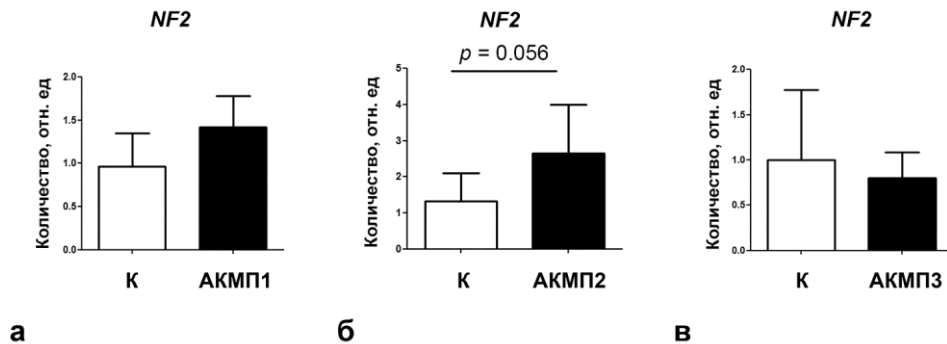


Рис. 9. Экспрессия гена *NF2* на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП и контрольных линий иПСК.

В ходе дифференцировки иПСК от пациента АКМП1 и АКМП2 была повышена экспрессия мишеней сигнального пути Notch — транскрипционных факторов *HEY1* и *HES1* (рис. 10, а–г).

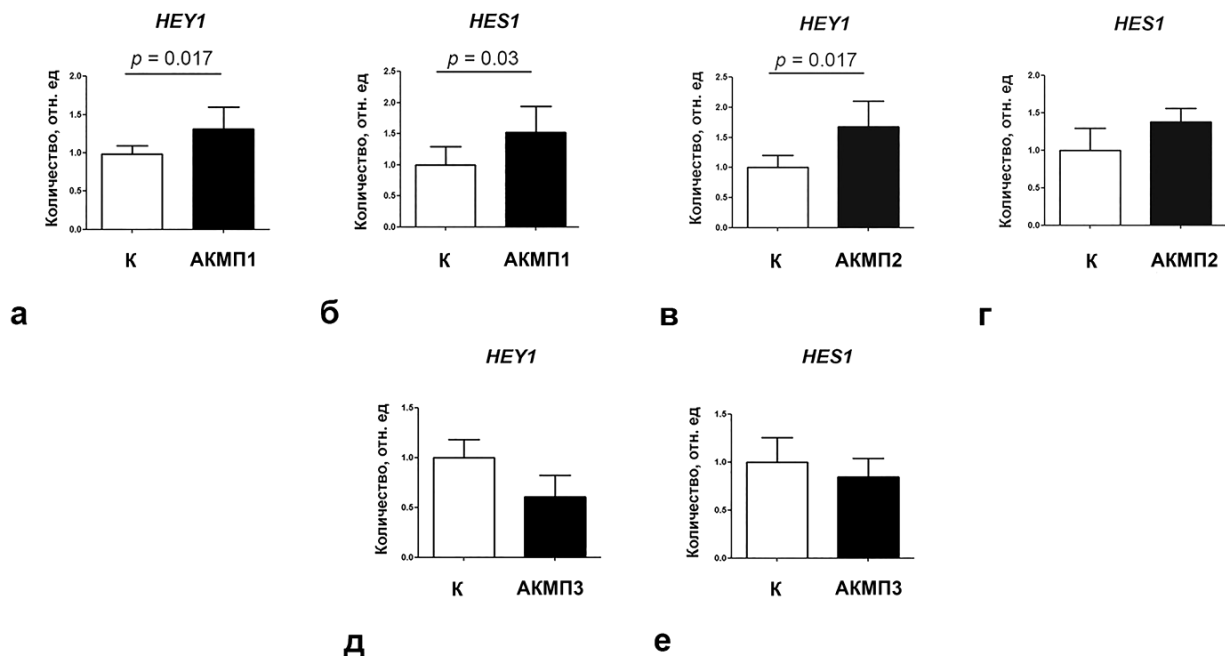


Рис. 10. Экспрессия мишеней сигнального пути Notch *HEY1* и *HES1* на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП и контрольных линий иПСК.

В ходе дифференцировки и ПСК от пациента АКМПЗ наблюдали некоторое снижение экспрессии *HEY1* (рис. 10, д).

Обнаруженное нами повышение экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch и ключевого участника сигнального пути *Hippo* говорит о том, что в развитие АКМП, помимо канонического сигнального пути *Wnt*, вовлечена целая сеть сигнальных каскадов.

6. Получение и характеристика лентивирусных конструкций, несущих ген *PKP2* дикого типа и его мутантные формы

Для изучения влияния экзогенной экспрессии *PKP2* дикого типа и его мутантных форм были получены соответствующие лентивирусные конструкции. Мутантные формы *PKP2* были представлены идентифицированными у пациента АКМП1 мутациями K859R (обозначаемой далее “KR”) и c.23321delT (обозначаемой далее “delT”), а также двумя мутациями, описанными в литературе, V587I (обозначаемой далее “VI”) и C796R (обозначаемой далее “CR”) (Kirchner et al., 2012).

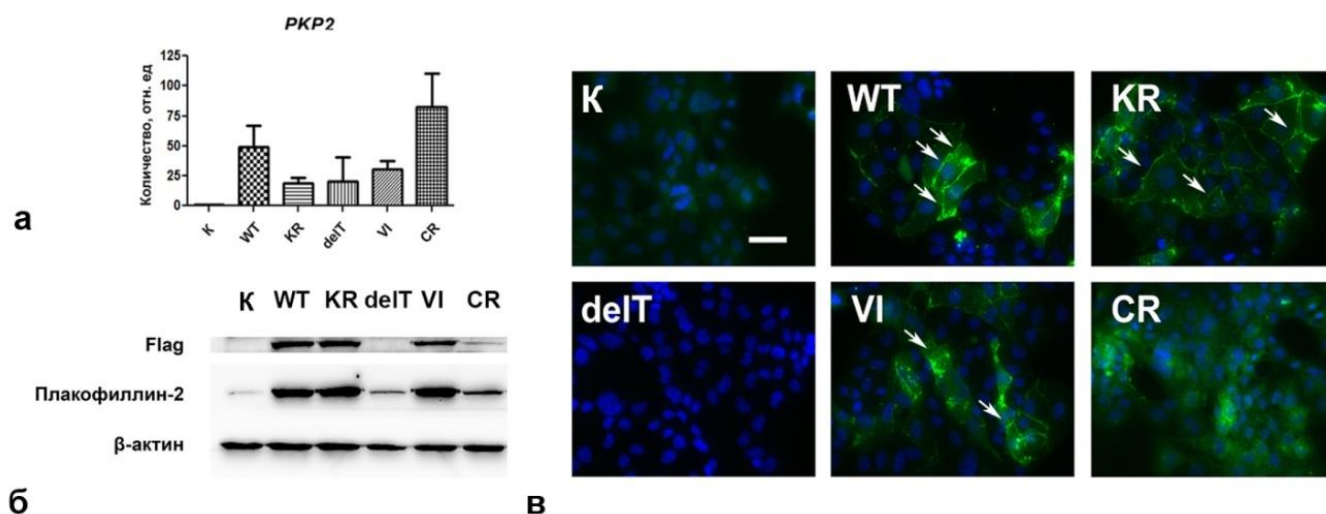


Рис. 11. Экспрессия *PKP2* дикого типа и его мутантных форм в клетках линии HL-1. а — экспрессия *PKP2* дикого типа и его мутантных форм на уровне мРНК; б — идентификация экспрессии *PKP2* дикого типа и его мутантных форм методом иммуноблоттинга; в — идентификация метки flag на плакофиллине-2 дикого типа и его мутантных формах методом иммуноцитохимической окраски клеток. Стрелками показана локализация плакофиллина-2 в районе межклеточных контактов. К — нетрансдуцированные клетки HL-1; WT — клетки HL-1, трансдуцированные вирусными частицами, несущими *PKP2* дикого типа; KR, delT, VI, CR — клетки HL-1, трансдуцированные вирусными частицами, несущими *PKP2* с соответствующими мутациями. Длина масштабной линейки 40 мкм.

Для проверки полученных конструкций осуществляли трансдукцию клеток линии кардиомиоцитов мыши HL-1 лентивирусными частицами, несущими *PKP2* дикого типа и его мутантные формы. Трансдукция вызывала существенное увеличение экспрессии *PKP2* на уровне мРНК (рис 11, а). Уровень плакофиллина-2 дикого типа в клетке был существенно повышен по сравнению с нетрансдуцированным контролем (рис 11, б). При этом плакофиллин-2 дикого типа был локализован преимущественно в зоне межклеточных контактов (рис 11, в).

Трансдукция клеток лентивирусными частицами, несущими *PKP2* с мутациями KR и VI, вызывала увеличение содержания плакофиллина-2 в клетках до уровня, сравнимого с содержанием плакофиллина-2 дикого типа (рис 11, б). Плакофиллин-2, несущий эти мутации, был также локализован преимущественно в зоне межклеточных контактов (рис 11, в).

В то же время трансдукция клеток лентивирусными частицами, несущими *PKP2* с мутацией CR, приводила к небольшому увеличению уровня плакофиллина-2 в клетках (рис 11, б). Плакофиллин-2, несущий аминокислотную замену CR, был распределён в цитоплазме клеток и не входил в состав межклеточных контактов (рис 11, в). Это согласуется с опубликованными ранее данными о том, что замена C796R в гене *PKP2* приводит к формированию нестабильного белка, неспособного входить в состав десмосомы и подверженного протеасомной деградации (Kirchner et al., 2012).

Экспрессию *PKP2* с мутацией delT удалось выявить только на уровне мРНК (рис 11, а). Тем не менее, соответствующий вектор использовался в дальнейших экспериментах для оценки возможного влияния мРНК *PKP2* с мутацией delT.

7. Влияние уровня экспрессии *PKP2* дикого типа на активность канонического сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК

Для определения связи между уровнем экспрессии *PKP2* и активностью сигнального пути Wnt иПСК от пациента АКМП1, обладающего сниженной экспрессией *PKP2*, трансдуцировали вирусными частицами, несущими *PKP2* дикого типа, и дифференцировали в направлении кардиомиоцитов. Экспрессия *PKP2* на 7 сутки дифференцировки иПСК от пациента АКМП1 повышалась после трансдукции, но не достигала уровня экспрессии *PKP2* в контроле (рис. 12, а).

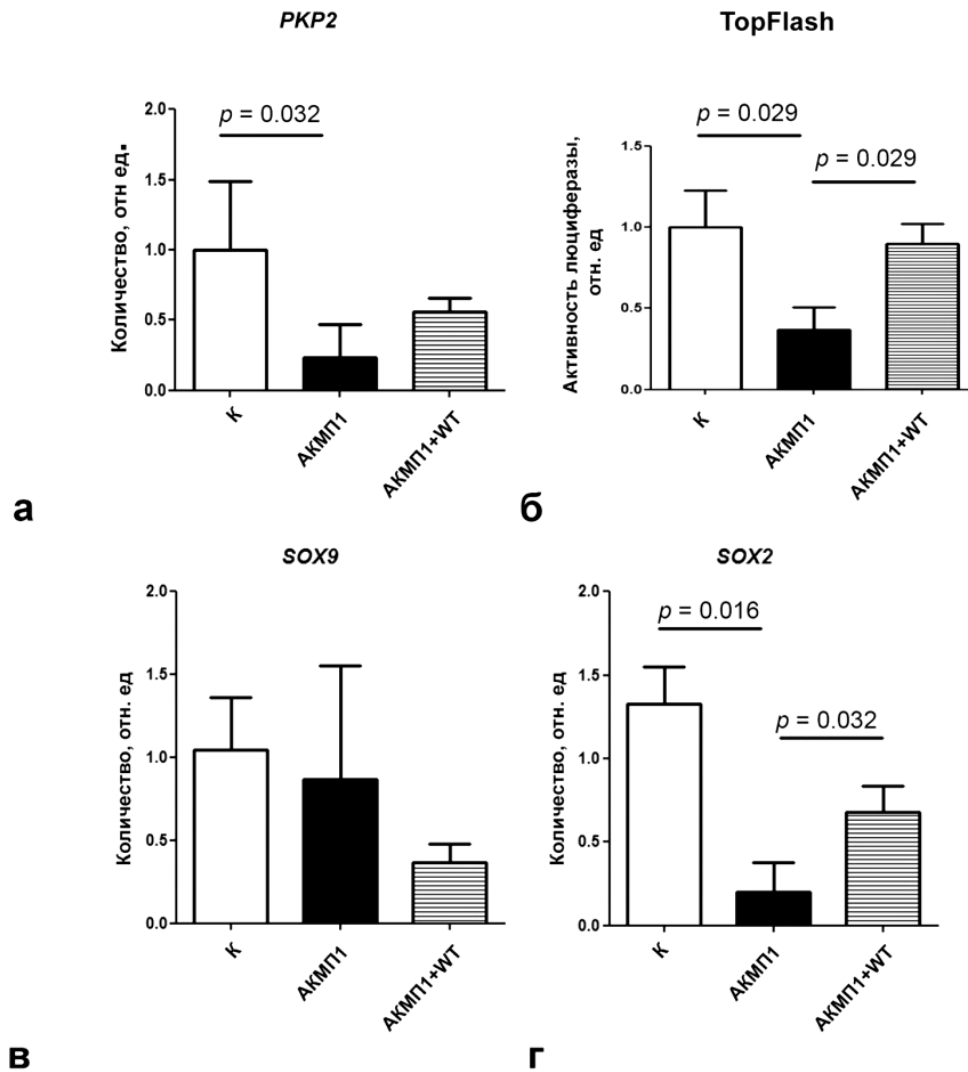


Рис. 12. Влияние уровня экспрессии *PKP2* дикого типа на активность сигнального пути Wnt на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК. а — экспрессия *PKP2* на уровне мРНК; б — активность люциферазного репортера TopFlash; в — экспрессия гена *SOX9* на уровне мРНК; г — экспрессия гена *SOX2* на уровне мРНК. К — нетрансдуцированные контрольные линии иПСК; АКМП1 — нетрансдуцированные линии иПСК от пациента АКМП1; АКМП1+WT — линии иПСК от пациента АКМП1, трансдуцированные вирусными частицами, несущими *PKP2* дикого типа.

Далее на 7 сутки дифференцировки иПСК оценивали активность люциферазного репортера и экспрессию генов-мишеней сигнального пути Wnt. Введение *PKP2* дикого типа в иПСК от пациента АКМП1 повышало активность люциферазного репортера (рис. 12, б) и экспрессию гена *SOX2* до уровня, сопоставимого с контрольными линиями иПСК (рис. 12, г), свидетельствуя о восстановлении активности сигнального пути Wnt.

8. Изучение влияния мутаций гена *PKP2* на активность канонического сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК

Для изучения роли мутаций *PKP2* в регуляции активности сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки контрольные иПСК трансдуцировали вирусами, несущими *PKP2* дикого типа и его мутантные формы. Далее линии иПСК дифференцировали в направлении кардиомиоцитов и оценивали активность люциферазного репортера и экспрессию генов-мишеней сигнального пути Wnt.

Введение мутантных форм *PKP2* в контрольные иПСК не снижало активность люциферазного репортера и уровень экспрессии генов-мишеней сигнального пути Wnt *SOX9* и *SOX2* на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК (рис. 13).

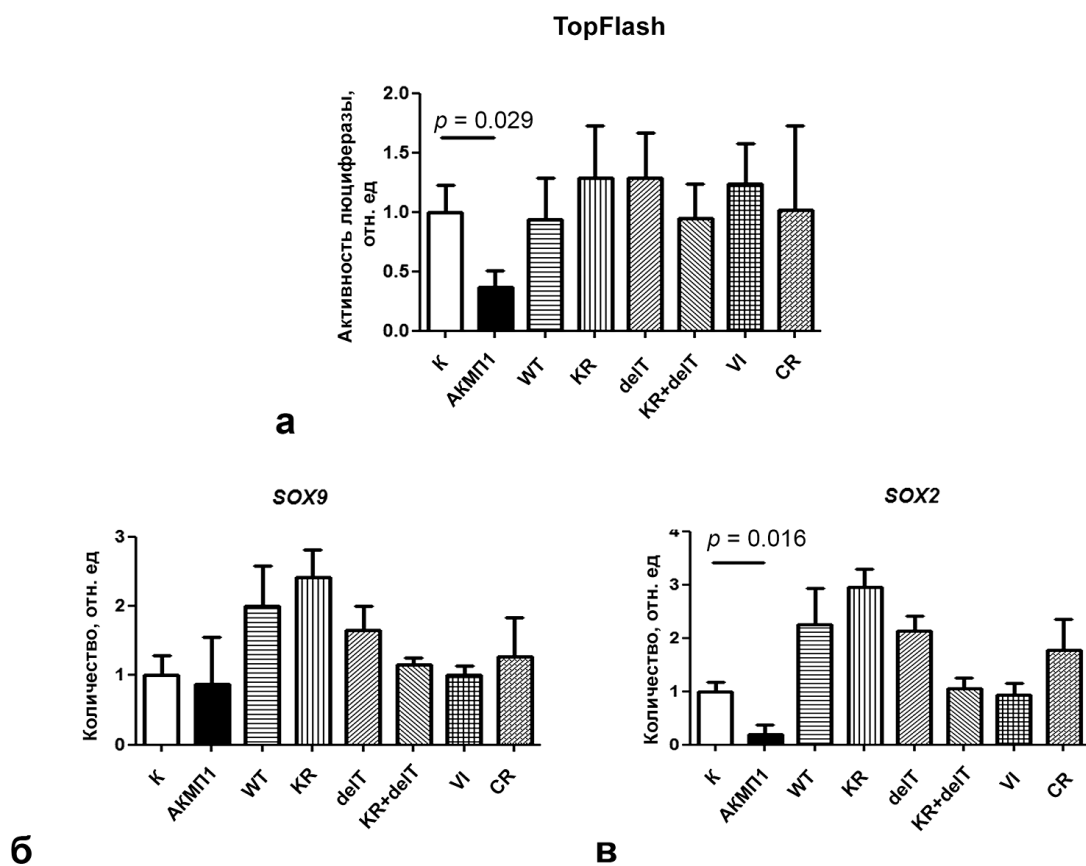


Рис. 13. Активность канонического сигнального пути Wnt на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК, экспрессирующих *PKP2* дикого типа и его мутантные формы. а — активность люциферазного репортера TopFlash; б — экспрессия гена *SOX9*; в — экспрессия гена *SOX2*. К — нетрансдуцированные контрольные линии иПСК; АКМП1 — нетрансдуцированные линии иПСК от пациента АКМП1; WT — контрольные линии иПСК, трансдуцированные вирусными частицами, несущим *PKP2* дикого типа; KR, delT, KR+delT, VI, CR — контрольные линии иПСК, трансдуцированные вирусными частицами, несущими *PKP2* с соответствующими мутациями.

Напротив, в случае мутаций KR и delT прослеживалась тенденция к увеличению активности сигнального пути Wnt.

Одним из объяснений этого эффекта может являться высокий уровень экспрессии *PKP2* дикого типа в исходных клетках, препятствующий действию мутантных форм *PKP2*. Также существуют данные о повышении активности Wnt при моделировании АКМП на мышах (Li et al., 2011). В совокупности эти данные позволяют говорить о том, что регуляция этого сигнального пути как в одну, так и в другую сторону носит аномальный характер.

9. Оценка активности канонического сигнального пути Wnt в первичных клеточных культурах

Эксперименты по измерению активности сигнального пути Wnt в культурах ММСК и мезенхимных клеток сердца проводили в присутствии 10 мкМ ингибитора GSK-3 β киназы CHIR99021, чтобы повысить низкий базовый уровень сигнального пути Wnt в этих клетках.

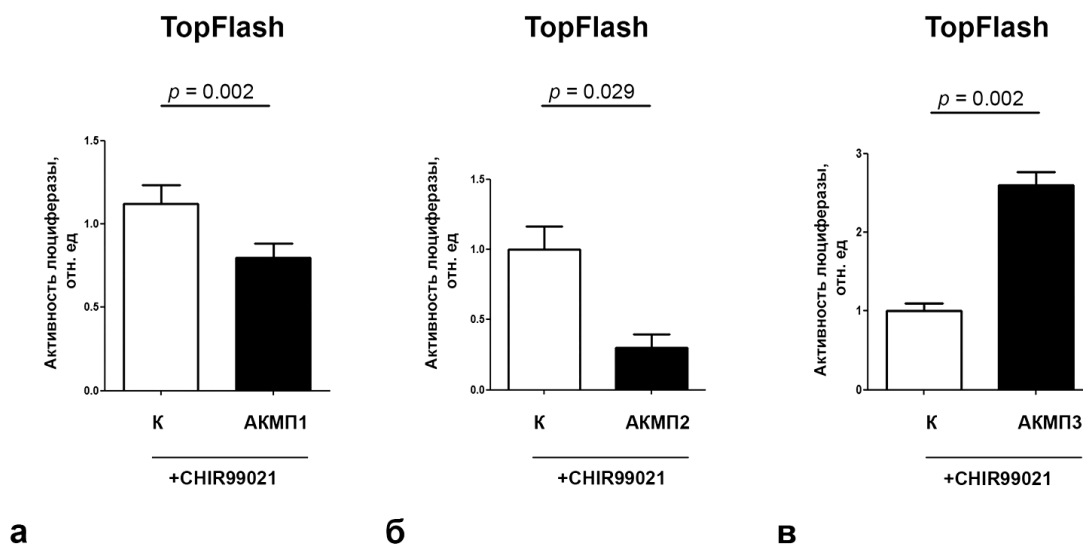


Рис. 14. Активность канонического сигнального пути Wnt в ММСК и мезенхимных клетках сердца. а — активность люциферазного репортера TopFlash в ММСК пациента АКМП1; б — активность люциферазного репортера TopFlash в мезенхимных клетках сердца пациента АКМП2; в — активность люциферазного репортера TopFlash в ММСК пациента АКМП3. Сигнальный путь Wnt активировали, добавляя 10 мкМ CHIR99021 (+CHIR99021).

В ММСК, полученных от пациента АКМП1, и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациента АКМП2, наблюдали пониженный уровень активности люциферазного репортера по сравнению с контролем (рис.14, а, б), что указывает на

сниженную транскрипционную активность TCF/LEF комплекса и сниженную активность канонического сигнального пути Wnt. В ММСК, полученных от пациента АКМПЗ, напротив, наблюдали повышенный уровень активности люциферазного репортера по сравнению с контролем (рис.14, в). Таким образом, активность сигнального пути Wnt была изменена по сравнению с контролем в первичных культурах клеток от пациентов с АКМП, несмотря на то, что эти клетки не образуют десмосом и обладают невысокой экспрессией *PKP2*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе результаты позволяют говорить о том, что в развитие аритмогенной кардиомиопатии вовлечена целая сеть сигнальных путей — канонический сигнальный путь Wnt, сигнальные пути Notch и Hippo.

Различия в активности этих сигнальных путей среди пациентов с АКМП объясняются различным эффектом мутаций генов десмосомы, носителями которых они являются. Кардиомиоциты, полученные от АКМП1, демонстрировали наиболее выраженные изменения в активности сигнальных путей по сравнению с контролем. Это можно объяснить тем, что мутации в геноме этого пациента приводят к гаплонедостаточности гена *PKP2* и, как следствие, нехватке плакофиллина-2 в составе десмосом. Мутация, носителем которой является пациент АКМП2, приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона, однако, мы не обнаружили сниженной экспрессии *PKP2* в дифференцированных кардиомиоцитах от этого пациента и снижения активности сигнального пути Wnt. Миссенс-мутация в гене *DSP*, носителем которой является пациент АКМПЗ, приводит к замене гистидина на схожую с ним аминокислоту аргинин. Наличие этой мутации также не влияло на экспрессию *PKP2* в ходе дифференцировки иПСК, но приводило к снижению активности сигнального пути Wnt. Таким образом, предсказание патогенности мутаций, основанное на оценке изменений в структуре мутантного белка, не всегда соответствует их эффекту на клеточных моделях. Это наблюдение указывает на важность сочетания генетических исследований с функциональными для понимания патогенеза заболевания.

Не вызывает сомнения, что белки десмосомы и комплекс белков, ассоциированных с десмосомой, играют чрезвычайно важную роль в сигнальных путях, обеспечивающих формирование и функционирование кардиомиоцитов. Не менее важную роль в прогрессии АКМП играет постоянный механический стресс, вызванный сокращениями миокарда.

Дальнейшие исследования с применением механического воздействия на существующие клеточные модели позволят точнее определить, какие именно внешние и внутренние факторы инициируют развитие АКМП, а также более детально описать участие десмосом в процессах механотрансдукции и создать научную базу для ранней диагностики и терапии АКМП.

ВЫВОДЫ

1. Активность сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с аритмогенной кардиомиопатией, изменена по сравнению с контролем:
 - а. Активность сигнального пути Wnt снижена в клетках, несущих мутации с.354delT и K859R в гене *PKP2* или мутацию H1684R в гене *DSP*;
 - б. Активность сигнального пути Wnt повышена в клетках, несущих мутацию с.1521–1536del в гене *PKP2*.
2. Активность сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток регулируется уровнем экспрессии *PKP2*.
3. Мутантные формы плакофиллина-2 способны модулировать активность сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на уровне активности люциферазного репортера и экспрессии генов-мишеней *SOX2* и *SOX9*.
4. Активность сигнального пути Wnt в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках жировой ткани и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с аритмогенной кардиомиопатией, изменена по сравнению с контролем:
 - а. Активность сигнального пути Wnt снижена в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках, несущих мутации с.354delT и K859R в гене *PKP2*, и в мезенхимных клетках сердца, несущих мутацию с.1521–1536del в гене *PKP2*.
 - б. Активность сигнального пути Wnt повышена в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках, несущих мутацию H1684R в гене *DSP*.
5. Активность сигнального пути Notch повышена в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, несущих мутации с.354delT и K859R или мутацию с.1521–1536del в гене *PKP2*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**В изданиях, рекомендованных ВАК РФ:**

1. **Худяков А.А.**, Костина Д.А., Костарева А.А., Томилин А.Н., Малашичева А.Б. 2015. Влияние мутаций в гене плакофиллина-2 на активность канонического сигнального пути Wnt. Цитология. 57: 868–875.
2. Малашичева А.Б., Сабирова А.А., Козырев И.А., Головкин А.С., **Худяков А.А.**, Костарева А.А. 2015. Сравнительная характеристика стволовых клеток сердца, полученных из миокарда детей и взрослых. Региональное кровообращение и микроциркуляция. 14: 52–58.
3. Крылова Т.А., Быстрова О.А., **Худяков А.А.**, Малашичева А.Б., Моисеева О.М., Зенин В.В., Мартынова М.Г. 2014. Сравнительные характеристики стволовых клеток, изолированных из подкожной и субэпикардальной жировой ткани. Цитология. 56: 212–217.
4. **Худяков А.А.**, Курапеев Д.И., Костарева А.А., Малашичева А.Б. 2013. Сравнение эффективности методов получения функционально активных кардиомиоцитов человека. Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия. 8: 47–55.

В других рецензируемых научных журналах:

1. **Худяков А.А.**, Костарева А.А., Малашичева А.Б. 2015. Индуцированные плюрипотентные клетки и их применение в кардиологических исследованиях. Трансляционная медицина. Сборник статей под ред. В.Е. Шляхто. 1: 105–118.
2. **Худяков А.А.**, Малашичева А.Б., Костарева А.А. 2015. Современные представления о роли десмосом в развитии аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка. Трансляционная медицина. Сборник статей под ред. В.Е. Шляхто. 1: 521–528.
3. **Худяков А.А.**, Курапеев Д.И., Костарева А.А., Малашичева А.Б. 2013. Получение предшественников кардиомиоцитов человека из ткани миокарда. Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. 1: 17–20.
4. Малашичева А.Б., **Худяков А.А.**, Костарева А.А. 2012. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и их роль в регенеративной медицине. Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. 6: 49–52.
5. Малашичева А.Б., **Худяков А.А.**, Костарева А.А. 2012. Значение генетических аномалий в развитии врожденных пороков сердца. Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. 5: 49–55.

Тезисы конференций:

1. **Худяков А.А.**, Томилин А.Н., Малашичева А.Б. 2015. Нокаут гена плакофиллина-2 на основе системы CRISPR-Cas9. Тезисы VII Ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова. Трансляционная медицина. 3: 107–108.
2. **Худяков А.А.**, Костина А.С., Малашичева А.Б. 2014. Дифференцировка индуцированных плюрипотентных клеток человека в направлении эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Тезисы IV Конференции молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре. Цитология. 56. С. 385.
3. **Худяков А.А.**, Малашичева А.Б. 2014. Исследование роли сигнального пути PPAR-GAMMA в развитии аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка. Тезисы IV Конференции молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре. Цитология. 56: 385–386.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Azaouagh A. et al. 2011.** Clin. Res. Cardiol. 100: 383–394. 2. **Chen S.N. et al. 2014.** Circ. Res. 114: 454–468. 3. **Corrado D. et al. 1997.** J. Am. Coll. Cardiol. 30: 1512–1520. 4. **Fuerer C., Nusse R. 2010.** PLoS ONE. 5. doi: 10.1371/journal.pone.0009370. 5. **Garcia-Gras E. et al. 2006.** J. Clin. Invest. 116: 2012–2021. 6. **Gerull B. et al. 2004.** Nat. Genet. 36: 1162–1164. 7. **Kim C. et al. 2013.** Nature. 7435: 105–110. 8. **Kirchner F. et al. 2012.** Circulation. Cardiovascular genetics. 5: 400–411. 9. **Laemmli U.K. 1970.** Nature. 227: 680–685. 10. **Li J. et al. 2011.** Mol. Cell. Biol. 31: 1134–1144. 11. **Lombardi R., Dong J. 2009.** Circulation. 104: 1076–1084. 12. **McKoy G. et al. 2000.** Lancet. 355: 2119–2124. 13. **Mummery C. et al. 2003.** Circulation. 107: 2733–2740. 14. **Oxford E.M. et al. 2014.** J. Vet. Intern. Med. 28: 92–101. 15. **Pilichou K. et al. 2006.** Circulation. 113: 1171–1179. 16. **Rampazzo A. et al. 2002.** Am. J. Hum. Genet. 71: 1200–1206. 17. **Ross S.E. et al. 2000.** Science. 289: 950–953. 18. **Schneider C.A. et al., 2012.** Nat. Methods 9: 671–675. 19. **Smits A.M. et al. 2009.** Nature protocols. 4: 232–243. 20. **Syrris P. et al. 2006.** Am. J. Hum. Genet. 79: 978–984. 21. **Thiene G. et al. 1988.** N. Engl. J. Med. 318: 129–133. 22. **Zuk P.A. et al. 2001.** Tis. Eng. 7: 211–226.