

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

Томилин Алексей Николаевич

кандидат биологических наук

Малашичева Анна Борисовна

Санкт-Петербург
2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
Актуальность исследования.....	8
Цели и задачи исследования	10
Основные положения, выносимые на защиту	11
Научная новизна исследования	11
Личный вклад автора.....	11
Теоретическая и практическая значимость работы.....	12
Апробация работы	12
Список работ, опубликованных по теме диссертации	12
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Десмосома	15
1.1.1 Структура и функции десмосом	15
1.1.2 Белки семейства armadillo	19
1.1.3 Плакофиллины. Плакофиллин-2	20
1.2 Сигнальный путь Wnt	22
1.1.1 Канонический сигнальный путь Wnt	24
1.3 Стволовые клетки	26
1.3.1 Понятие стволовой клетки	26
1.3.2 Резидентные стволовые клетки	27
1.3.3 Плюрипотентные стволовые клетки	28
1.3.4 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки	28
1.3.4.1 Индукция плюрипотентности.....	28
1.3.4.2 Методы получения iPСК человека	29
1.3.4.3 Характеристика iPСК человека	32
1.3.4.4 Дифференцировка iPСК в кардиомиоциты	33
1.3.4.5 Характеристика кардиомиоцитов, полученных из iPСК	34
1.4 Моделирование заболеваний человека с помощью iPСК.....	36
1.4.1 Моделирование кардиомиопатий с помощью iPСК	36
1.5 Аритмогенная кардиомиопатия	37

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1 Клеточные культуры, использовавшиеся в работе	43
2.1.1 Культивирование линии клеток HL-1	43
2.1.2 Получение, культивирование и криоконсервация ММСК жировой ткани	43
2.1.3 Получение, культивирование и криоконсервация мезенхимных клеток сердца	44
2.1.4 Иммунофенотипирование культур ММСК и мезенхимных клеток сердца	45
2.1.5 Индукция адипогенной дифференцировки ММСК и мезенхимных клеток сердца	45
2.1.6 Индукция кардиогенной дифференцировки мезенхимных клеток сердца	45
2.1.7 Получение, культивирование и дифференцировка иПСК	45
2.1.7.1 Получение иПСК	45
2.1.7.2 Культивирование иПСК	47
2.1.7.3 Криоконсервация иПСК	47
2.1.7.4 Формирование тератом из иПСК	47
2.1.7.5 Формирование эмбрионидных тел из иПСК	48
2.1.7.6 Дифференцировка иПСК в направлении кардиомиоцитов	48
2.2 Выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции	49
2.3 Полуколичественная ПЦР	50
2.4 ПЦР в режиме реального времени	50
2.5 Реакция на щелочную фосфатазу	51
2.6 Иммуноцитохимическая окраска клеток	51
2.7 Электронная микроскопия	52
2.8 Электрофорез в ПААГ и вестерн-блоттинг	52
2.9 Измерение люциферазной активности	53
2.10 Получение лентивирусных конструкций, несущих ген <i>PKP2</i> дикого типа и его мутантные формы	53
2.10.1 Клонирование кодирующей последовательности <i>PKP2</i> в лентивирусный вектор	53

2.10.2 Сайт-специфический мутагенез.....	54
2.10.3 Секвенирование участков плазмид	54
2.10.4 Продукция лентивирусных частиц.....	55
2.11 Трансдукция клеточных культур	56
2.12 Статистическая обработка данных	56
2.13 Последовательности праймеров и готовые смеси TaqMan	56
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	62
3.1 Идентификация носителей мутаций генов десмосомы среди пациентов с аритмогенной кардиомиопатией.....	62
3.2 Выбор экспериментальной модели для изучения патогенеза АКМП.....	63
3.3 Получение и характеристика первичных клеточных культур.....	64
3.3.1 Получение культуры ММСК жировой ткани.....	64
3.3.2 Получение культуры мезенхимных клеток сердца	65
3.4 Получение и дифференцировка линий иПСК	68
3.4.1 Получение и характеристика линий иПСК	68
3.4.2 Дифференцировка иПСК в направлении кардиомиоцитов	72
3.5 Характеристика кардиомиоцитов, полученных от пациентов с АКМП.....	74
3.5.1 Характеристика дифференцированных кардиомиоцитов пациента АКМП1	75
3.5.2 Сравнительная характеристика кардиомиоцитов от пациентов с АКМП.....	79
3.6 Изучение активности сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП	81
3.7 Поиск потенциальных мишеней сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП	84
3.8 Получение и характеристика лентивирусных конструкций, несущих ген <i>RKP2</i> дикого типа и его мутантные формы	87
3.8.1 Получение лентивирусных конструкций, несущих ген <i>RKP2</i> дикого типа и его мутантные формы	87
3.8.2 Характеристика экспрессии лентивирусных конструкций, несущих ген <i>RKP2</i> и его мутантные формы, в клетках линии HL1	88
3.8.3 Характеристика экспрессии лентивирусных конструкций, несущих ген	

<i>PKP2</i> дикого типа и его мутантные формы, в ИПСК.....	90
3.9 Изучение влияния мутаций гена <i>PKP2</i> на ультраструктурную организацию десмосом в клетках линии HL-1.....	92
3.10 Изучение влияния уровня экспрессии <i>PKP2</i> дикого типа на активность канонического сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки ИПСК	93
3.11 Изучение влияния мутаций гена <i>PKP2</i> на активность канонического сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки ИПСК.....	94
3.12 Оценка активности канонического сигнального пути Wnt в первичных клеточных культурах.....	96
ОБСУЖДЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	110
Благодарности	135

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- CD (cluster of differentiation) — кластер дифференцировки
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) — 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) — питательная среда Игла в модификации Дульбекко
- DMSO (dimethyl sulfoxide) — диметилсульфоксид
- FBS (fetal bovine serum) — бычья эмбриональная сыворотка
- HBS (HEPES buffered saline) — HEPES-солевой буфер
- HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) — 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота
- IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) — питательная среда Дульбекко в модификации Искова
- KO-DMEM (knockout DMEM) — нокаутная питательная среда Игла в модификации Дульбекко
- KOSR (knockout serum replacement) — нокаутный заменитель сыворотки
- MEM (minimal essential medium) — минимальная среда
- MOI (multiplicity of infection) — мультиплектность инфекции
- PBS (phosphate buffered saline) — фосфатно-солевой буфер
- PFA (paraformaldehyde) — параформальдегид (полиоксиметилен)
- SDS (sodium dodecyl sulfate) — додецилсульфат натрия
- ТАЕ (Tris-acetate-EDTA) — трис-ацетатный буфер с этилендиаминтетрауксусной кислотой
- TPBS — фосфатно-солевой буфер, содержащий 0.05% Tween-20
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) — 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол
- АКМП — аритмогенная кардиомиопатия
- БСА — бычий сывороточный альбумин
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- иПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- кДНК — комплементарная ДНК
- ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки
- МЭФ — мышечные эмбриональные фибробласты
- ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

п.о. — пар оснований

ПААГ — полиакриламидный гель

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РНК — рибонуклеиновая кислота

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) представляет собой наследственное аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся нарушением контактов между кардиомиоцитами, замещением миокарда жировой и соединительной тканью, аритмиями и внезапной смертью. Генетические исследования выявили ряд генов, мутации в которых ассоциированы с развитием заболевания. Среди них основную часть составляют гены, кодирующие белки, входящие в состав 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). Недостаточное количество белков десмосом или включение мутантных белков в десмосому 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. Природа этих процессов до сих пор не изучена.

In vitro на линии кардиомиоцитов мыши HL-1 и *in vivo* с использованием трансгенных мышей было показано, что плакоглобин, вследствие мутации или в отсутствие десмоплакина, лишённый способности входить в структуру десмосомы, может перемещаться в ядро, где он конкурирует с β -катенином за связывание с различными регуляторными участками ДНК, тем самым ингибируя сигнальный путь Wnt (Garcia-gras et al., 2006; Lombardi, Dong, 2009). В свою очередь, канонический сигнальный путь Wnt является своеобразным переключателем клеточной дифференцировки. Поскольку мутантная форма плакоглобина связывается с регуляторными последовательностями необратимо, происходит постоянное ингибирование Wnt, способствующее адипогенезу. На модели трансгенных мышей с индуцированным выключением *PKP2* была отмечена активация сигнального пути Wnt (Li J. et al., 2011). В другом подобном исследовании, несмотря на повышение уровня цитоплазматического β -катенина, сигнальный путь Wnt не был активирован, в то же

время наблюдалось повышение активности сигнального пути TGF- β , играющего важную роль в регуляции процессов апоптоза, некроза и гипертрофии кардиомиоцитов (Li D. et al., 2011). Другой группой исследователей была описана аномальная активация сигнального пути Hippo в клетках линии кардиомиоцитов мыши HL-1 в ответ на подавление экспрессии гена *PKP2*. Данные изменения были ассоциированы с нарушением структуры десмосомы и изменением локализации протеинкиназы PKC α (Chen et al., 2014).

Значительный прогресс в изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе АКМП, связан с изучением кардиомиоцитов, полученных в результате дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) от пациентов с АКМП. Полученные таким образом кардиомиоциты несут генотип пациента и воспроизводят в культуре характерные для АКМП признаки: реорганизацию десмосом, накопление липидных капель в цитоплазме, повышенный уровень апоптоза (Caspi et al., 2013). Изучение дифференцированных из иПСК кардиомиоцитов позволило предположить, что развитие заболевания связано с нарушением гормональной регуляции метаболизма кардиомиоцитов. В частности, патологическая совместная активация сигнальных путей PPAR α и PPAR γ приводит к накоплению липидов кардиомиоцитами, переключению метаболизма с окисления жирных кислот на гликолиз и, в конечном счёте, к запуску апоптоза (Djouadi et al., 2009; Kim et al., 2013). В исследовании Kim et al. (2013) также отмечалось снижение активности сигнального пути Wnt в дифференцированных кардиомиоцитах от пациентов с мутациями гена *PKP2*, вызванное перемещением плакоглобина в ядро.

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 одного из основных сигнальных путей, отвечающих за дифференцировку и рост кардиомиоцитов – канонического сигнального пути Wnt. Нами было сделано предположение, что нарушение регуляции этого сигнального пути может влиять на процессы клеточной дифференцировки и приводить к появлению в миокарде большого количества адипоцитов и фибробластов. 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, как для развития фундаментальных представлений о множественных функциях этих белков, так и 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 исследования

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

Личный вклад автора

Результаты, включённые в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в диссертацию, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные вносят существенный вклад в фундаментальные представления о роли белков десмосом в регуляции сигнальных путей, а также о разнообразии молекулярных механизмов, лежащих в основе развития аритмогенной кардиомиопатии. 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 4 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ. Основные положения работы были представлены на IV Конференции молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2014) и VII Ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова (Санкт-Петербург, 2015).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные 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.

Статьи, опубликованные в других рецензируемых изданиях

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 плакофилина –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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Десмосомы

1.1.1 Структура и функции десмосом

Десмосомы (от греческого *desmos* – связь и *soma* – тело) представляют собой точечные межклеточные контакты, связывающие соседние клетки, путём объединения сети их промежуточных филаментов (Calkins, Setzer, 2007). Эти структуры характерны для тканей, постоянно испытывающих механические нагрузки, таких как сердце, кожа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря. В миокарде, испытывающем постоянные циклические нагрузки, был обнаружен ещё один тип межклеточных контактов, специфичный только для сердечной ткани — *area composita*, представляющий собой смешанную структуру, сочетающую в своём составе десмосомы и адгезионные контакты (Franke et al., 2006). Адгезионные контакты связывают соседние клетки при помощи Ca^{2+} -зависимого взаимодействия N-кадгеринов, которые с помощью семейства катениновых белков (α T-катенин, α E-катенин, β -катенин, винкулин) объединены в единую сеть с актиновым цитоскелетом. Объединение различных типов межклеточных контактов в составе интеркалирующих дисков кардиомиоцитов обеспечивает эффективную передачу усилия сокращения, механически объединяя отдельные кардиомиоциты.

На ультраструктурном уровне десмосома представляет собой электронноплотную бляшку (0.2-0.5 мкм в диаметре), локализованную на внутренней стороне клеточной мембраны в районе межклеточного контакта (рис. 1).

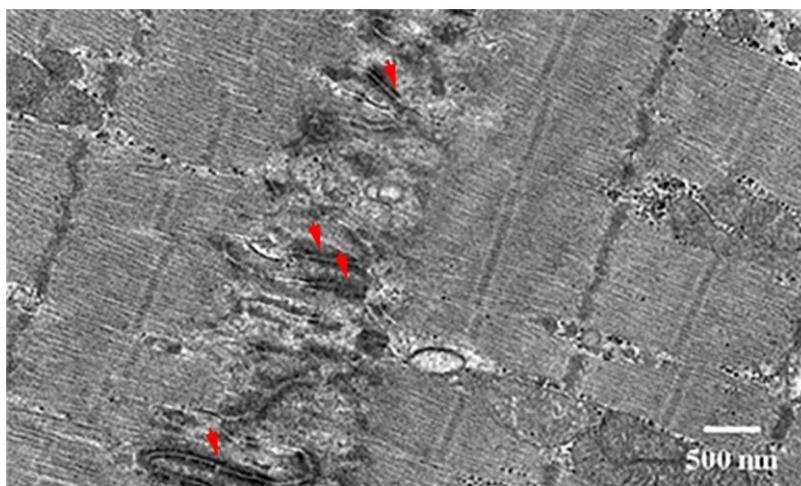


Рис. 1. Электронная микрофотография десмосом в составе интеркалирующего диска соседних кардиомиоцитов.

Электронноплотные бляшки десмосом отмечены красными стрелками. По Basso et al., 2006 с изменениями.

Впервые эти структуры были описаны итальянским патологом Giulio Bizzozero в шиповатом слое эпидермиса (подробно описано в Mazzarello et al., 2001). Уже тогда сформировалось представление о том, что эти «узелки Бидзодзеро» являются точками соединения соседних клеток, без объединения цитоплазмы. Подтверждение этому факту пришло с открытием электронной микроскопии. Ультраструктурно десмосома состоит из внеклеточной области, наружной и внутренней плотных бляшек (Kowalczyk et al., 1994) (рис. 2). Внеклеточная область представлена десмоглеинами и десмоколлинами, Ca^{2+} -зависимыми молекулами клеточной адгезии из семейства кадгеринов. Они содержат по 5 иммуноглобулин-подобных глобулярных домена, несущих сайты связывания кальция и способны как к гомофильному, так и гетерофильному взаимодействию с десмосомными кадгеринами соседней клетки (Waschke et al., 2005; Chitaev, Troyanovsky, 1997). Наружная плотная бляшка десмосомы состоит из внутриклеточных последовательностей кадгеринов, связанных с белками семейства armadillo — плакоглобином, плакофиллином и десмоплакином (Garrod, Chidgey, 2008). Структурная роль этих белков в десмосоме заключается в образовании упорядоченной, высокоорганизованной структуры (бляшки), которая прочно связывает кадгерин с сетью промежуточных филаментов. Связующим звеном между цитоплазматическим комплексом белков десмосомы и промежуточными филаментами служит десмоплакин. Молекула десмоплакина состоит из двух концевых глобулярных доменов с суперспиральным род-доменом между ними. С-конец десмоплакина содержит 3 плакиновых домена и Gly-Ser-Arg-богатый домен, которые связываются с промежуточными филаментами (кератином в эпителиальных тканях, десмином в мышечных, виментинном в дендритных клетках) и вместе с частью род-домена составляет внутреннюю плотную бляшку десмосомы (Stappenbeck et al., 1994; Choi et al., 2002).

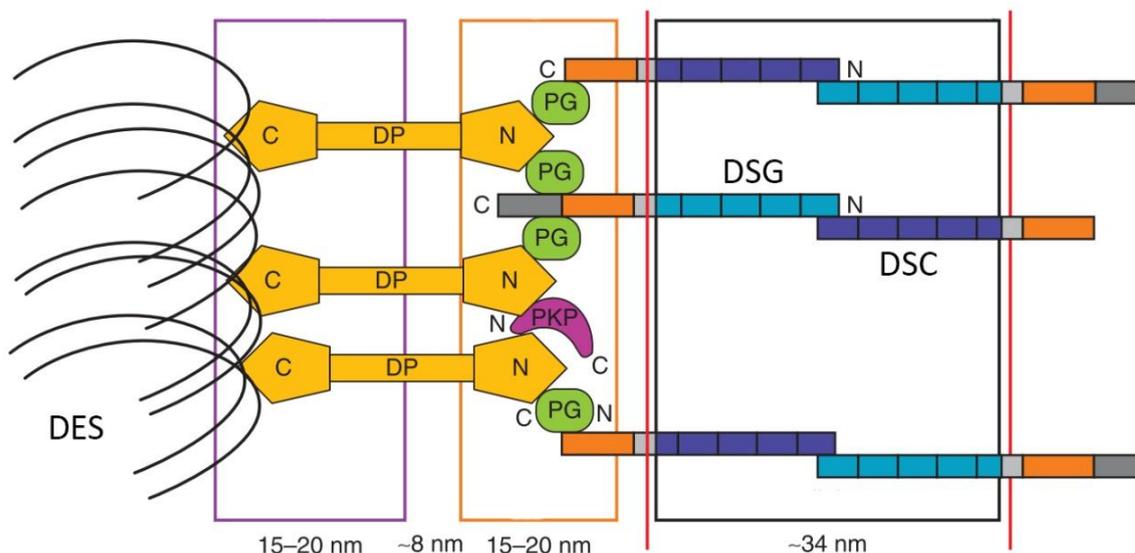


Рис. 2 Схематическое изображение структуры десмосомы.

DES – десминовые промежуточные филаменты, DP – десмоплакин, PKP – плакофилин, PG – плакоглобин, DSG – десмоглеин, DSC – десмоколлин, N и C – N- и C-концы белков соответственно. По Delva et al., 2009 с изменениями.

Исследования с мышами, нокаутными по генам, кодирующим белки десмосом, демонстрируют необходимость этих белков для полноценного эмбрионального развития. Отсутствие десмоглеина-2 приводит к ранней гибели мышинных эмбрионов после имплантации из-за нарушения пролиферации эмбриональных стволовых клеток (Eshkind et al., 2002). Нокаут по гену десмоколлина-3 (*DSC3*) приводит к гибели эмбрионов до имплантации (E2.5), что указывает на недесмосомные функции кодируемого этим геном белка (Den et al., 2006). Нокаутные по гену плакофилина-2 (*PKP2*) мыши погибают на средних стадиях гестации из-за нарушения формирования сердца и структуры миокарда (Grossmann et al., 2004). Дефицит эпидермальных форм плакофилина приводит к тяжёлым повреждениям кожных покровов (McGrath et al., 1997). Мыши, не экспрессирующие плакоглобин, погибают во время эмбрионального развития от летальных нарушений миокарда (Bierkamp et al., 1996; Ruiz et al., 1996). Мыши, нокаутные по гену десмоплакина (*DSP*) погибают вскоре после имплантации (день E6.5), причём их десмосомы неспособны связываться с промежуточными филаментами (Gallicano et al., 1998).

Подобно прочим межклеточным контактам, сборка десмосом происходит в ответ

на стимуляцию ростовыми факторами, межклеточное взаимодействие и повышение концентрации Ca^{2+} (Watt et al., 1984; Jones, Goldman, 1985). Десмосомные кадгерины транспортируются к мембране в комплексе с плакоглобином, отдельно от остальных компонентов десмосомы и промежуточных филаментов (Penn et al., 1987). После сборки десмосома остаётся чувствительной к концентрации Ca^{2+} , но затем созревает и перестаёт реагировать на изменения концентрации Ca^{2+} (Watt et al., 1984). Тем не менее, показано, что чувствительность к Ca^{2+} может регулироваться, в том числе при участии протеинкиназы PKC α (Wallis, S. et al., 2000). Сборка десмосомы тесно связана со сборкой адгезионных контактов, описано множество случаев смешивания компонентов этих межклеточных контактов и образования промежуточных структур (Schmelz, Franke, 1993; Kowalczyk et al., 1998). Таким образом, формирование десмосом является динамическим процессом, подверженным регуляции и способным изменяться в зависимости от стадии дифференцировки и положения клетки в составе ткани.

Долгое время считалось, что функция межклеточных контактов ограничивается поддержанием механического единства клеток в составе тканей, однако исследования последнего десятилетия демонстрируют возможность их функционирования как рецепторов механических стимулов и активных участников сигнальных путей, регулирующих пролиферацию и дифференцировку. Внутриклеточная часть десмосомы, помимо заякоривания промежуточных филаментов, способна принимать активное участие в процессах передачи сигналов.

В состав десмосом входят 3 белка, содержащих специфические arm-повторы – плакоглобин, плакофиллин и p120^{ctn}. Плакоглобин наиболее схож с β -катенином, белком, входящим в состав адгезионных контактов и являющимся ключевым участником канонического сигнального пути Wnt. Показано, что благодаря высокой гомологии с β -катенином плакоглобин может конкурировать с ним на всех стадиях сигнального пути Wnt. Плакоглобин, вследствие мутации или оверэкспрессии, может транслоцироваться в ядро и, имитируя β -катенин, инициировать сборку комплекса активации транскрипции генов-мишеней (Simcha et al., 1998; Zhurinsky et al., 2000). Кроме этого, имеются данные о том, что в районе межклеточных контактов помимо белков цитоскелета и промежуточных филаментов локализован целый ряд белков, выполняющих сигнальную функцию. Описано взаимодействие плакофиллина-2 с протеинкиназой PKC α (Bass-Zubek et al., 2008). Белок NF2, также известный как

мерлин, взаимодействует с β -катенином и кадгеринами в составе адгезионных контактов. Он принимает участие во множестве сигнальных каскадов, таких как сигнальный путь Hippo, сигнальные пути, связанные с протеинкиназой PKC α , Ras и Rac сигнальные пути, EGFR и др. (Morrow et al., 2012; Chen et al., 2014). Таким образом, десмосомы, являясь своеобразными концентраторами сигнальных молекул, могут регулировать внутриклеточные процессы.

Эти данные свидетельствуют том, что клеточные процессы могут регулироваться десмосомами, формирование которых, в свою очередь, зависит от положения клетки в ткани. Поскольку белки десмосом появились в эволюции сравнительно поздно, десмосомная регуляция осуществляется на поздних стадии развития и дифференцировки сложных тканей (Green, Gaudry, 2000). Нарушение структуры десмосом приводит к серьёзным нарушениям функций ткани и развитию различных патологий – так называемых "болезней десмосом". Недостаточность эпителиальных изоформ белков десмосомы, вызванная образованием аутоантител или мутациями соответствующих генов, приводит к различным патологиям кожи – пузырчатке или кератодермии (Aoyama et al., 1999; Armstrong et al., 1999; Rickman et al., 1999). Рецессивные мутации плакоглобина и десмоплакина вызывают болезнь острова Наксос, сопровождающуюся кератозом ладоней и подошв, кардиомиопатией и курчавостью волос (McKoy et al., 2000; Alcalai et al., 2003). Ряд мутаций в сердечных изоформах десмосомных генов ассоциированы с аритмогенной кардиомиопатией (Rampazzo et al., 2002; Syrris et al., 2006; Pilichou et al., 2006; McKoy et al., 2000; Gerull et al., 2004). Таким образом, межклеточные контакты выполняют важные сигнальные функции, нарушения которых могут приводить к различным патологическим состояниям.

1.1.2 Белки семейства *armadillo*

Белки семейства *armadillo* получили своё название от одноимённого белка дрозофилы, мутации в котором приводят к нарушению сегментации личинки дрозофилы (Gergen, Wieschaus, 1986). Ортологом белка *armadillo* у млекопитающих является β -катенин. Эти белки имеют схожую структуру, включающую N- и C- концевые домены, а также различное количество так называемых *arm*-повторов – последовательностей, состоящих из 42 аминокислот (Andrade et al., 2001), образующих 3 α -спирали (Huber et al., 1997) (рис. 3). Следующие друг за другом α -спирали формируют позитивно заряженную бороздку, которая способна взаимодействовать с различными белками.

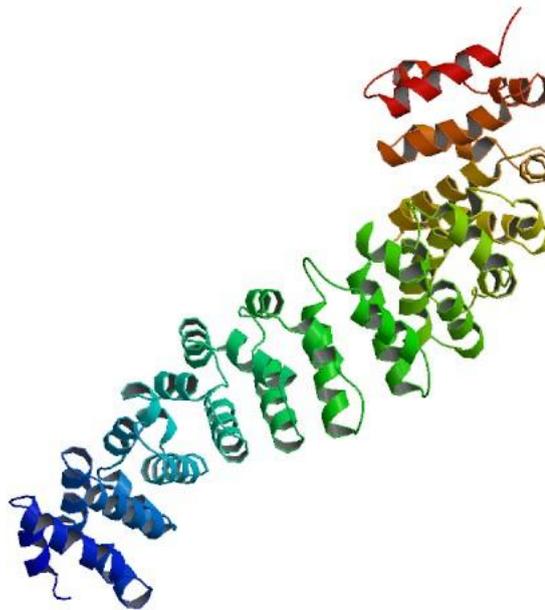


Рис. 3. Трёхмерная структура armadillo-повторов β -катенина мыши.

Huber et al., 1997.

Основными белками семейства являются β -катенин и плакоглобин. β -катенин входит в адгезионные контакты и соединяется с актиновым цитоскелетом через α -катенин. Плакоглобин входит в состав десмосом, где взаимодействует с десмосомными кадгеринами и десмоплакином, закрепляющим промежуточные филаменты. Плакоглобин высокоомологичен β -катенину (сходство белковых последовательностей 83%) и способен замещать его в адгезионных контактах. В состав семейства armadillo входит подсемейство p120^{ctn} включающее белки адгезионных контактов: p120^{ctn}, p0071, (δ -catenin), NPRAP (PKP4), ARVCF и группу десмосомных белков плакофиллинов 1–3 (PKP1-3). Белки семейства p120^{ctn} отличаются от β -катенина и плакоглобина меньшим количеством arm-повторов (количество повторов, предсказанное по аминокислотной последовательности, равно 10). Гены, кодирующие p120^{ctn} белки находятся на разных хромосомах (*CTNND1* (p120ctn) — 11q11, *PKP4* (p0071) — 2q24, *CTNND2* (NPRAP) — 5p15, *ARVCF* — 22q11, *PKP1* — 1q32, *PKP2* — 12p13, *PKP3* — 11p15), но обладают схожим разбиением на экзоны, отличным от β -катенина и плакоглобина, что указывает на независимое происхождение этого подсемейства (Hatzfeld, 2007).

1.1.3 Плакофиллины. Плакофиллин-2

Плакофиллины входят в состав десмосом, где связывают взаимодействующий с промежуточными филаментами десмоплакин с десмосомными кадгеринами —

десмоглеином и десмоколлином. Плакофиллины принимают важное участие в формировании электронноплотной бляшки десмосомы благодаря своей способности образовывать латеральные связи с другими белками десмосомы (Kowalczyk et al., 1999).

С помощью рентгено-структурного анализа установлено, что плакофиллины содержат 9 arm-повторов – на один повтор меньше, чем было предсказано теоретически, поскольку один из центральных повторов является подвижным линкером (Choi, Weis, 2005) (рис. 4). Благодаря этому линкеру arm-домен плакофиллина имеет характерную серповидную форму. Плакофиллины-1–3 гомологичны друг другу на 55% и имеют 50% сходство с содержащим arm-повторы доменом p120^{ctn} (Hatzfeld, 2007). *PKP1* и *PKP2* экспрессируются в виде двух изоформ, короткой “a” и длинной “b”, различающихся на 21 аминокислоту в третьем arm-повторе *PKP1* и на 44 аминокислот в 4 arm-повторе *PKP2* (Mertens et al., 1996; Schmidt et al., 1997).



Рис. 4. Схематическое изображение структуры плакофиллина-2.

Head и tail – головной и хвостовой домены соответственно. Тёмно-зелёные круги 1-9 – arm-повторы. Серый прямоугольник – линкерная последовательность.

По Delva et al., 2009 с изменениями.

Различные типы плакофиллинов характерны для различных тканей. *PKP1* экспрессируется в супрабазальном слое многослойного эпителия, в то время как *PKP2* экспрессируется во всех типах эпителия, а также в клетках неэпителиальных тканей, таких как кардиомиоциты и фолликулярные клетки лимфатических узлов, *PKP3* экспрессируется в однослойных и многослойных эпителиях (Heid et al., 1994; Mertens et al., 1996; Bonne et al., 1999; Schmidt et al., 1999). На уровне РНК невысокая экспрессия плакофиллинов выявлена практически во всех тканях, независимо от присутствия десмосом (<http://www.proteinatlas.org>). При этом помимо межклеточных контактов, отмечается ядерная локализация плакофиллинов (Mertens et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Ядерная функция плакофиллинов в ядре не изучена, существуют данные о том,

что плакофиллин-2 может взаимодействовать с RPC155 и входить в комплекс РНК-полимеразы III (Mertens et al., 2001).

В составе десмосомы плакофиллин-2 взаимодействует с десмоплакином и плакоглобином, причём в связывании этих белков принимает участие head-домен плакофиллина-2 (Chen et al., 2002). Также описано взаимодействие head-домена плакофиллина-2 с десмоглеинами 1 и 2 *in vitro*. Предполагается, что во время сборки десмосомы плакоглобин конкурирует с плакофиллином за связывание с десмоглеином (Chen et al., 2002).

Помимо десмосомных белков, плакофиллин-2 способен связываться с коннексином 43, входящим в состав щелевых контактов (Oxford et al., 2007), и α T-катенином, входящим в состав адгезионных контактов (Goossens et al., 2007), тем самым участвуя в образовании смешанных структур межклеточных контактов, таких как *area composita* кардиомиоцитов.

Плакофиллин-2 способен связываться с β -катенином, в мембрано-ассоциированной или свободной форме (Chen et al., 2002). При этом оверэкспрессия плакофиллина-2 способна повышать активность сигнального пути Wnt в культуре линии клеток рака прямой кишки SW480 (Chen et al., 2002), тем самым указывая на возможные сигнальные функции этого белка.

Таким образом, плакофиллины, подобно прочим белкам семейства armadillo, являются белками с множеством функций, многие из которых ещё предстоит обнаружить.

1.2 Сигнальный путь Wnt

Сигнальный путь Wnt является одним из ключевых путей, управляющих дифференцировкой, пролиферацией и миграцией клеток. Этот сигнальный путь появился на ранних этапах эволюции. По-видимому, его появление связано с возникновением многоклеточности, поскольку отдельные элементы этого сигнального пути встречаются у древних многоклеточных животных (Grimson et al., 2000; Hobmayer et al., 2000; Adell et al., 2003), в то время как у одноклеточных организмов они не обнаружены. Под термином “сигнальный путь Wnt” подразумевается сеть взаимодействующих сигнальных молекул, в основе которой лежит лиганд-рецепторное взаимодействие белков семейства Wnt с мембранными рецепторами семейства Frizzled. Название Wnt является комбинацией названия гена дрозофилы Wg (Wingless), мутации

в котором подавляет развитие крыльев (Sharma, Chopra, 1976), и его ортолога, протоонкогена *int1* мышей (Nusse, Varmus, 1982).

Первоначально был описан канонический путь передачи сигнала Wnt, в котором роль передатчика сигнала от клеточной мембраны к ядру играет белок β -катенин. Позже были описаны независимые от β -катенина неканонические сигнальные пути Wnt. В зависимости от способа передачи сигнала, выделяют Wnt/JNK сигнальный путь, активирующий малые G-белки семейства Rho (Simons et al., 2008), и Wnt/Ca²⁺ сигнальный путь, действующий через гетеротримерные G-белки и запускающий высвобождение кальция из депо (Slusarski et al., 1997a, 1997b). Компоненты Wnt/JNK сигнального пути во многом пересекаются с сигнальным путём планарной клеточной полярности. Роль этого сигнального каскада заключается в регуляции актинового цитоскелета, что влияет на форму клеток и их направленную миграцию и, в конечном счёте, приводит к формированию полярных клеток и образованию сложноорганизованной ткани. Wnt/Ca²⁺ сигнальный путь регулирует концентрацию Ca²⁺ в цитоплазме и принимает участие в процессах спецификации тканей во время эмбрионального развития. Также существуют менее изученные неканонические пути передачи сигнала через GSK3 β , Dishevelled, PKA, рецептор ROR2 и др. (Salinas et al., 1999; Chen et al., 2005; Salinas et al., 2007).

1.2.1 Канонический сигнальный путь Wnt

Упрощённая схема канонического сигнального пути Wnt представлена на рис. 5.

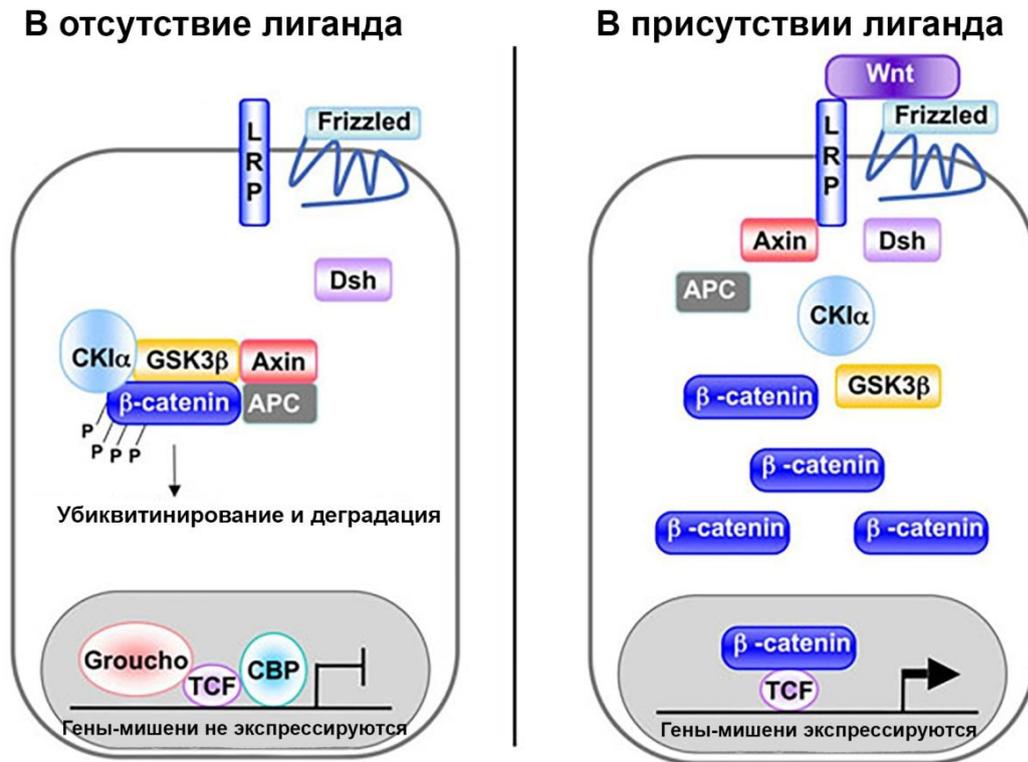


Рис. 5. Схема канонического сигнального пути Wnt.

В отсутствие лиганда (слева) СК1 α , GSK3 β , Axin, APC формируют комплекс деградации β -катенина. Фактор TCF связан с белком Groucho, что ингибирует экспрессию генов-мишеней Wnt. В присутствии лиганда, комплекс деградации β -катенина разбирается, β -катенин перемещается в ядро, где связывается с TCF и инициирует экспрессию генов-мишеней Wnt. По Eisenmann, 2005 с изменениями.

Лиганды, секретируемые одной клеткой, связываются с липопротеиновым рецепторным комплексом Frizzled/LRP на мембране другой клетки, причём белки семейства Wnt, активирующие сигнальный путь, связываются с Frizzled и LRP, формируя тримерный комплекс (Tamaï et al., 2000), а ингибиторы сигнального пути, такие как Wise (Itasaki et al., 2003) и Dickkopf (Glinka et al., 1998) — только с LRP. В результате связывания белков Wnt происходит изменение конформации Frizzled и последующее фосфорилирование взаимодействующего с ним цитоплазматического белка Dishevelled (Yanagawa et al., 1995). Активация сигнального пути Wnt характеризуется увеличением количества цитоплазматического белка β -катенина. В

отсутствие сигнала Wnt, β -катенин фосфорилируется, казеин киназой I α (CKI α) (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002; Yanagawa et al. 2002) и GSK3 β киназой (Yost et al. 1996), которые вместе с вспомогательными белками Axin и APC (Hart et al., 1998; Kishida et al., 1998) формируют так называемый комплекс деградации β -катенина. Фосфорилированный β -катенин распознаётся белком β -TrCP, убиквитинируется и подвергается протеасомной деградации (Aberle et al., 1997; Latres et al., 1999; Liu et al., 1999). При активации сигнального пути Wnt фосфорилирование и деградация β -катенина прекращается, и он начинает накапливаться в цитоплазме и транспортироваться в ядро (Tolwinski, Wieschaus 2004), где взаимодействует с транскрипционными факторами LEF/TCF (van de Wetering et al., 1997; Behrens et al. 1996). В отсутствие сигнала Wnt комплекс LEF/TCF ингибирует транскрипцию генов-мишеней за счёт связывания с белком Groucho (Cavallo et al., 1998), который, в свою очередь, взаимодействует с гистоновыми деацетилазами (Chen et al., 1999). Попав в ядро, β -катенин способствует выходу Groucho из комплекса и привлечению гистоновой ацетилазы CBP/p300 (Hecht et al., 2000; Takemaru, Moon, 2000). Другими белками, способствующими активации транскрипции генов-мишеней Wnt, являются компонент комплекса ремоделирования хроматина Brg-1 (Barker et al., 2001), Bcl9 и Pygopus (Kramps et al., 2002; Parker et al., 2002; Thompson et al., 2002).

Разнообразие функций, регулируемых сигнальным путём Wnt, во многом объясняется множеством генов-мишеней этого сигнального пути. Наиболее известными прямыми мишенями являются c-Myc, отвечающий за пролиферацию клеток (He et al., 1998), и циклин D1, участвующий в регуляции клеточного цикла (Shtutman et al., 1999). Список прямых мишеней, имеющих сайты связывания TCF в промоторной области, постоянно пополняется (http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes). Также существует множество непрямых мишеней сигнального пути Wnt, экспрессия которых обусловлена активацией его прямых мишеней. Экспрессия мишеней Wnt во многом зависит от клеточного контекста – состояния клетки, стадии её дифференцировки, внеклеточного окружения. Таким образом, сигнальный путь Wnt способен регулировать разнообразные, зачастую противоположные, процессы в различных клеточных популяциях.

1.3 Стволовые клетки

1.3.1 Понятие стволовой клетки

Стволовые клетки представляют собой первичные клетки, характерные для всех многоклеточных организмов и обладающие двумя свойствами - способностью к самообновлению в результате симметричного деления и дифференцировке в специализированные клетки различных типов. В зависимости от своей способности к дифференцировке (потентности), стволовые клетки делятся на следующие типы:

1. *тотипотентные*, способные дифференцироваться во все эмбриональные, а также внезародышевые ткани (такие как плацента, пуповина);
2. *плюрипотентные*, способные дифференцироваться в направлении трёх зародышевых листков — эктодерму, мезодерму и энтодерму;
3. *мультипотентные*, способные дифференцироваться в направлении некоторых типов клеток;
4. *унипотентные*, дифференцирующиеся преимущественно в один тип клеток.

У млекопитающих тотипотентностью обладает лишь зигота и эмбрион до стадии 8 бластомеров, плюрипотентностью — внутренняя масса клеток бластоцисты, мультипотентностью — так называемые взрослые стволовые клетки, такие как стволовые клетки крови и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки и унипотентностью — клетки-предшественницы входящие в состав различных тканей, например сперматогонии, дающие начало сперматозоидам или предшественники кератиноцитов, основных клеток эпидермиса. Во время эмбрионального развития происходит постепенная потеря потентности, сопровождающаяся изменением паттерна экспрессии генов и эпигенетических модификаций генома. В течение долгого времени данная специализация рассматривалась как необратимая, однако исследования, посвященные дедифференцировке, трансдифференцировке и репрограммированию соматических клеток коренным образом изменили представления о природе стволовых клеток и молекулярных механизмах, лежащих в основе их жизнедеятельности.

1.3.2 Резидентные стволовые клетки

Резидентные (взрослые) стволовые клетки являются недифференцированными клетками в составе ткани взрослого организма, способными к самоподдержанию и дифференцировке. Резидентные стволовые клетки обнаружены практически во всех тканях и органах человека, включая кожу, печень, поджелудочную железу, мозг, скелетную мускулатуру, сердце, костный мозг и жир (для обзора см. Passier, Mummery, 2003). Дифференцировочный потенциал резидентных клеток ограничен, в большинстве случаев они являются уни- или мультипотентными. Основной функцией резидентных стволовых клеток является постоянное обновление клеточных популяций, ремоделирование ткани или её восстановление после повреждения. Резидентные стволовые клетки являются привлекательным источником для клеточной терапии, поскольку они коммитированы к дифференцировке в определённом направлении, а также существует возможность использовать аутологичные клетки, полученные от самого пациента.

Особое внимание уделяется резидентным стволовым клеткам сердца, органа обладающего низкой способностью к регенерации. На сегодняшний день описано 5 основных популяций стволовых клеток сердца млекопитающих: side population (Hierlihy et al., 2002; Barile et al., 2007), СКИТ+ популяция (Ferreira-Martins et al., 2012), SCA1+ популяция (Oh et al., 2003), Islet1+ (Islet1+ СКИТ+) популяция (Laugwitz et al., 2005), популяция клеток, полученных из кардиосфер (Messina et al., 2004). Также описана WT1+ популяция клеток эпикарда, вносящая значительный вклад в формирование сердца при эмбриональном развитии (Singh, Epstein, 2012). Клетки этих популяций обладают способностью к самоподдержанию, клональному размножению и дифференцировке в кардиогенном направлении. Роль, выполняемая резидентными стволовыми клетками сердца, неясна, существуют данные о том, что кардиогенная спецификация, приводящая к образованию новых кардиомиоцитов, не является основной функцией этих клеток (Sultana et al., 2015).

Несмотря на существующие протоколы выделения резидентных стволовых клеток человека и их последующей кардиогенной дифференцировки (Messina et al., 2004; Bearzi et al., 2007; Pouly et al., 2008; Smits et al., 2009), эти клетки не получили широкого распространения как источник для получения культуры кардиомиоцитов. Это связано с тем, что результатом дифференцировки резидентных стволовых клеток сердца являются

клетки, подобные кардиомиоцитам, не обладающие всеми признаками кардиомиоцитов. Широкое распространение получили индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в кардиомиоциты, подобные зрелым кардиомиоцитам сердца.

1.3.3 Плюрипотентные стволовые клетки

Первыми плюрипотентными клетками, выведенными в культуру, являются клетки эмбриональной карциномы, выделенные из тератокарцином мышей (Kleinsmith, Pierce, 1964; Finch, Ephrussi, 1967). Клетки эмбриональной карциномы способны к дифференцировке в различных направлениях *in vitro*. Также они могут включаться в различные ткани химерных мышей. Однако они неприменимы для создания генетически модифицированных мышей, поскольку не дают начало предшественникам половых клеток и вызывают образование опухолей из-за существенных геномных перестроек (Papaioannou et al., 1978). Исследования, направленные на получение плюрипотентных клеток с нормальным генотипом, привели к выведению в культуру эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), клеточных линий эмбрионального происхождения, полученных из внутренней массы бластоцисты (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998). Ещё одним типом плюрипотентных клеток с нормальным кариотипом являются эмбриональные половые клетки, полученные из эмбрионального зачатка половых клеток (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992; Shambloott et al., 1998).

Эмбриональные стволовые клетки являются своеобразным стандартом плюрипотентных клеток. Возможность проведения генетических манипуляций с ЭСК и их способность к клональному размножению привели к бурному развитию технологии генного нокаута и, тем самым, позволили изучать функцию генов *in vivo*. Совершенствование методов дифференцировки ЭСК дало толчок к развитию клеточной терапии. Благодаря изучению механизмов, лежащих в основе самоподдержания ЭСК, стали известны ключевые регуляторы, лежащие в основе плюрипотентности.

1.3.4 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

1.3.4.1 Индукция плюрипотентности

В 1895 году Август Вейсман в «Зародышевой плазме» сформулировал принцип детерминанта (Weismann, 1893). Согласно его теории зародышевые клетки несут информацию о функциях и свойствах каждой соматической клетки. По мере деления

эмбриона детерминанты неравномерно распределяются по дочерним клеткам. Таким образом, клетки лишаются способности к дифференцировке и приобретают специализацию. На вопрос, теряет ли ядро дифференцирующейся клетки информацию, смогли ответить эксперименты по переносу ядра. Работы, посвящённые клонированию путём переноса ядра из соматической клетки в лишённый ядра ооцит, продемонстрировали, что ограничение потентности клеток во время эмбрионального развития является обратимым (Gurdon, 1962; Wilmut et al., 1997). Позже было показано, что слияние соматических клеток с различными типами плюрипотентных клеток (клетки эмбриональной карциномы, эмбриональные половые клетки, эмбриональные стволовые клетки) приводит к репрограммированию ядра соматической клетки, сопровождающемуся реактивацией X-хромосомы и активацией основного регулятора плюрипотентности — гена *OCT4* (Zwaka, Thomson, 2005; Solter, 2006; Tada et al., 2001).

В 2000-х годах группа японских учёных под руководством Shinya Yamanaka начала проверять гипотезу о возможности индуцировать плюрипотентность в соматических клетках при помощи активации генов, поддерживающих плюрипотентность в эмбриональных стволовых клетках. Оказалось, что для получения плюрипотентных стволовых клеток из эмбриональных фибробластов мыши достаточно экспрессии всего 4 транскрипционных факторов *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *CMYC* (Takahashi, Yamanaka, 2006). Эти клетки, названные индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК), обладают способностью к самоподдержанию, дифференцировке в направлении трёх зародышевых листков и развитию во взрослый организм в результате их инъекции в тетраплоидную бластоцисту (тетраплоидная комплементация) (Boland et al., 2009; Kang et al., 2009; Zhao et al., 2009).

Открытие иПСК изменило представления о необратимости эпигенетических модификаций и положило начало множеству исследований, посвящённых механизмам дедифференцировки и трансдифференцировки клеток.

1.3.4.2 Методы получения иПСК человека

иПСК человека впервые были получены двумя исследовательскими группами (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) с использованием различных наборов репрограммирующих факторов — *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *CMYC* и *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28* соответственно. Все гены, использованные для репрограммирования, являются необходимыми для поддержания плюрипотентности. *OCT4* является ключевым

компонентом сигнального каскада, ответственного за плюрипотентность клеток (Nichols et al., 1998). Он может регулировать свою собственную экспрессию с помощью петли позитивной обратной связи, в которую вовлечёт *SOX2*, кодирующий транскрипционный фактор, необходимый для эмбрионального развития (Avilion et al., 2003). Белок OCT4 в комплексе с *SOX2* способен связываться с промоторами различных генов и регулировать их экспрессию (Yuan et al., 1995; Tomioka et al., 2002). Одним из генов, находящихся под их регуляцией является *NANOG* (Rodda et al., 2005). Связываясь с белком SMAD1, *NANOG* препятствует BMP-зависимой мезодермальной дифференцировке плюрипотентных клеток (Suzuki et al., 2006). *СМУС* является протоонкогеном, способным изменять экспрессию многих мишеней, в том числе и опухолевых супрессоров. *KLF4* негативно регулирует опухолевый супрессор p53, способный подавлять экспрессию *NANOG* (Lin et al., 2005) и снижать эффективность репрограммирования (Kawamura et al., 2009). Возможно, белки *СМУС* и *KLF4* изменяют структуру хроматина, делая возможным связывание белков OCT4 и *SOX2* с их мишенями (Takahashi et al., 2007, Soufi et al., 2012), тем самым повышая эффективность репрограммирования. *LIN28* является белком, связывающим микро-РНК. Известно, что *LIN28* препятствует созреванию микро РНК let-7, подавляющей экспрессию *OCT4* и *NANOG* (Viswanathan et al., 2008).

В первых исследованиях по получению иПСК человека использовались ретровирусные (Takahashi et al., 2007) или лентивирусные (Yu et al., 2007) конструкции, обеспечивающие интеграцию трансгенов в геном клетки и их стабильную экспрессию, не меняющуюся при клеточном делении. Этот подход обладает высокой эффективностью (0.05–0.1% клеток дают начало колониям иПСК), однако встраивание трансгенов в геном носит случайный характер и может вызвать активацию различных генов и инсерционный мутагенез. Несмотря на то, что спустя некоторое время после получения линий иПСК трансгены подвергаются сайленсингу (Okita et al., 2007), возможна их реактивация, изменяющая дифференцировочный потенциал иПСК.

Чтобы избежать подобных побочных эффектов, были разработаны системы, обеспечивающие удаление трансгена из генома клетки. Были созданы лентивирусные вектора, несущие трансгены между loxP сайтами, что позволяет после репрограммирования удалить их из генома Cre-рекомбиназой (Soldner et al., 2009; Sommer et al., 2010). Несмотря на это, даже кратковременная интеграция потенциально

способна вызвать инсерционный мутагенез и изменение экспрессии затронутых генов. Полного удаления трансгена можно добиться при применении интегрирующихся плазмид, с последующей эксцизией, основанной на *piggyBac* транспозиции (Kaji et al. 2009; Woltjen et al. 2009; Yusa et al. 2009). Модификации генома позволяют избежать неинтегрирующие способы доставки, такие как аденовирусы (Stadtfield et al., 2008; Zhou & Freed, 2009), эписомальные плазмиды (Yu et al., 2009) и миникольцевые вектора (Jia et al., 2010).

Широкое распространение получили вектора на основе вирусов Сендай (Fusaki et al., 2009), представляющих собой РНК-вирусы с циклом репликации в цитоплазме. Такой подход сочетает в себе эффективную доставку и отсутствие геномных модификаций. Вирусы Сендай эффективно элиминируются из репрограммированных клеток после нескольких пассажей благодаря функциональным мутациям, в частности мутациям, придающим термочувствительность некоторым вирусным белкам.

Также опубликованы методики репрограммирования с помощью лизата ЭСК (Cho et al., 2010) и рекомбинантных белков (Kim et al., 2009; Zhou et al., 2009). Недостатком этих стратегий является низкая эффективность репрограммирования (0.000015-0.006%), ограничивающая их применение в рутинной лабораторной практике. Высокой эффективности репрограммирования позволяет добиться, использование модифицированных синтетических мРНК (Warren et al., 2010) или микроРНК (Anokye-Danso et al., 2011; Miyoshi et al., 2011), однако эти методы требуют повторных введений репрограммирующих молекул. Особое место занимают методы репрограммирования при помощи малых молекул, являющихся ингибиторами или активаторами определённых ферментов. Некоторые химические соединения способны заменять часть трансгенов, используемых для репрограммирования и существенно повышать эффективность этого процесса (Shi et al., 2008; Li et al., 2009; Maherali et al., 2009; Esteban et al., 2010). Также описано успешное репрограммирование при помощи 7 соединений: вальпроевая кислота, форсколин, CHIR99021, 616452, 3-деазанепланоцин, транилципромин, ТТНРВ (Hou et al., 2013).

1.3.4.3 Характеристика иПСК человека

Плюрипотентность клеток обуславливается их способностью к самоподдержанию и дифференцировке. Наиболее полно дифференцировочный потенциал иПСК выявляется в ходе тетраплоидной комплементации, процедуры, в ходе которой иПСК дают начало целому организму, способному к размножению. В случае иПСК человека такие манипуляции невозможны из-за практических и этических ограничений. Тем не менее, существует ряд параметров, оценивая которые, можно с уверенностью говорить о плюрипотентности полученных иПСК. Поскольку иПСК близки по своим свойствам к ЭСК, к ним применимы методы характеристики, разработанные для ЭСК.

Морфологическими критериями иПСК являются форма клеток, характеристики роста и внешний вид колоний. иПСК формируют округлые, светлые колонии с ровными краями. Колонии состоят из быстропролиферирующих мелких клеток с высоким соотношением объёма ядра к объёму цитоплазмы (Thomson et al., 1998). Плюрипотентность косвенно подтверждается деметелированием промоторов генов *OCT4* и *NANOG* и специфическим паттерном гистоновых модификаций (Wernig et al., 2007), а также экспрессией различных эндогенных маркеров: транскрипционных факторов *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, поверхностных антигенов *TRA1-60*, *TRA1-81*, *SSEA3*, *SSEA4*, ферментов щелочной фосфатазы и теломеразы (Thomson et al., 1998). Глобальный профиль экспрессии генов в иПСК в целом идентичен ЭСК, однако существуют некоторые различия (Chin et al., 2009).

Важным этапом характеристики является подтверждение сайленсинга трансгенов, использовавшихся для репрограммирования и/или их удаления из клетки (Maherali et al., 2008), оценка кариотипа и выявление возможных перестроек генома (Lowry et al., 2008).

Дифференцировочный потенциал иПСК человека оценивается *in vitro* при помощи формирования эмбриоидных тел и *in vivo* по способности формировать тератомы после инъекции в организм иммунодефицитной мыши (линии SCID, Nude). Полученные таким способом тератомы содержат ткани-производные трёх зародышевых листков (Gertow et al., 2007). Несмотря на то, что тератомный анализ рассматривается как “золотой стандарт” подтверждения плюрипотентности, он не является полным аналогом развития организма. Так, первые линии иПСК мыши были способны к формированию тератом, но не развивались в жизнеспособные химеры (Takahashi, Yamanaka, 2006). Возможно, дифференцировка иПСК в функциональные типы клеток *in vitro* с последующей их

трансплантацией животным является более надёжным методом оценки дифференцировочного потенциала (подробнее см. в обзоре Maherali, Hochedlinger, 2008).

1.3.4.4 Дифференцировка и ПСК в кардиомиоциты

и ПСК, как и ЭСК, способны дифференцироваться *in vitro* в различные типы клеток, включая кардиомиоциты (Takahashi et al., 2007), нейроны и клетки глии (Takahashi et al., 2007; Dimos et al., 2008; Hu et al., 2010), лимфоциты и эритроциты (Choi et al., 2009; Niwa et al., 2011), мегакариоциты и тромбоциты (Takayama et al., 2010), пигментный эпителий сетчатки (Buchholz et al., 2009), мужские половые клетки (Eguizabal et al., 2011; Panula et al., 2011; Easley et al., 2012), гепатоциты (Si-Tayeb et al., 2010) и др. Дифференцировка плюрипотентных клеток является основным методом получения кардиомиоцитов в культуре, поскольку процедура биопсии миокарда сопряжена с риском для донора, а изолированные из сердца зрелые кардиомиоциты гибнут или дедифференцируются в течение нескольких дней (Jacobson et al., 1985; Mitcheson et al., 2009).

Плюрипотентные клетки способны к спонтанной дифференцировке в направлении кардиомиоцитов в условиях, препятствующих их адгезии к поверхности. Диссоциация колоний плюрипотентных клеток и последующее их культивирование в висячих каплях или в культуральной посуде с низкой адгезией приводит к формированию сфероидов с внутренним слоем клеток эктодермы и наружным слоем энтодермальных клеток. Из-за сходства этих сфероидов с эмбрионом на ранних стадиях после имплантации они были названы эмбриоидными телами (Stevens, 1960). Клетки в составе эмбриоидных тел дифференцируются в направлении трёх зародышевых листков (Doetschman et al., 1985). Некоторые эмбриоидные тела содержат в своём составе участок, испытывающий спонтанные сокращения и содержащий кардиомиоциты. В дальнейшем методы спонтанной дифференцировки были усовершенствованы, благодаря стандартизации количества клеток в составе эмбриоидного тела, ускоренному формированию эмбриоидных тел и оптимизации состава среды (Ng et al., 2005; BurrIDGE et al., 2007; Yang et al., 2008).

Существенно повысить эффективность дифференцировки позволило воспроизведение регуляторных сигналов, обуславливающих дифференцировку различных клеточных популяций в ходе эмбриогенеза. Спецификация трёх

зародышевых листков происходит во время гаструляции, одной из важнейших стадий эмбрионального развития. Гаструляция у млекопитающих начинается с формирования первичной полоски в районе эпибласта. Клетки эпибласта мигрируют из зоны первичной полоски и специализируются в мезодерму или энтодерму, в зависимости от их положения. Этот процесс регулируется тремя основными сигнальными путями Activin/Nodal/TGF β , Wnt и BMP. Активация этих сигнальных путей белками активином и BMP4 в эмбриональных телах способствует появлению Flk-1/KDR⁺/PDGFR α ⁺ популяции клеток, являющихся клетками сердечной мезодермы. Добавление ингибитора Wnt DKK1 и фактора роста VEGF способствуют дальнейшей экспансии и дифференцировке этой популяции в кардиомиоциты (Laflamme et al., 2007; Yang et al., 2008; Kattman et al., 2011).

Другим популярным методом кардиомиоцитарной дифференцировки является сокультивирование ЭСК или иПСК с иммортализованной линией мышечных энтодермальных клеток END-2 в бессывороточной среде (Mummery et al., 2003; Passier et al., 2005; Freund et al., 2010). Роль END-2 в этой дифференцировке до конца не изучена, однако известно, что клетки линии END-2 способны удалять из среды инсулин и выделять простагландин I₂ (Xu et al., 2008). В ходе эмбриогенеза висцеральная энтодерма индуцирует дифференцировку предшественников кардиомиоцитов в составе прилегающей мезодермы. Клетки другой стромальной линии OP9 также способствует индукции дифференцировки в направлении кардиомиоцитов (Narazaki et al., 2008).

Альтернативным подходом является дифференцировка иПСК в монослое. Этот подход является предпочтительным в случае иПСК, растущих в безфидерных условиях. Высокой эффективности дифференцировки позволяет добиться метод с использованием последовательного ингибирования сигнального пути Wnt малыми молекулами, действующими на различные мишени и обеспечивающие спецификацию клеток мезодермы с последующей их дифференцировкой в направлении кардиомиоцитов (Lian et al., 2012; BurrIDGE et al., 2014).

1.3.4.5 Характеристика кардиомиоцитов, полученных из иПСК

Одновременно с получением кардиомиоцитов из плюрипотентных клеток началась процедура их характеристики и сравнения с взрослыми, изолированными из миокарда кардиомиоцитами. Выяснилось, что базовые характеристики полученных в результате дифференцировки кардиомиоцитов, такие как частота спонтанных сокращений,

потенциал действия, экспрессия кардиоспецифичных белков варьируют в широких пределах (Knollmann, 2013).

Кардиомиоциты, полученные из иПСК на ранних стадиях дифференцировки экспрессируют ряд кардиоспецифичных транскрипционных маркеров: ISL1, NKX2.5, GATA4, TBX6, MEF2C. Позже в процессе дифференцировки запускается экспрессия белков саркомера, таких как сердечный тропонин I и T, тяжёлые цепи миозина, предсердные и желудочковые формы лёгких цепей миозина, α -актинин, белки щелевых контактов – коннексины, различные ионные каналы (Tanaka et al., 2009; Yokoo et al., 2009; Zhang et al., 2009). В то же время начинает формироваться структура саркомера, и кардиомиоциты приобретают способность к спонтанным сокращениям. Структура саркомера дифференцированных кардиомиоцитов напоминает саркомер эмбриональных кардиомиоцитов, содержащих небольшое количество миофибрилл, беспорядочно распределённых по клетке.

Электрофизиологические характеристики кардиомиоцитов, полученных из иПСК, подобны характеристикам изолированных кардиомиоцитов. Основными отличиями являются меньший размер, следствием которого является меньшая амплитуда трансмембранных ионных токов, сниженный ток входящего выпрямления и наличие пейсмейкерных токов, приводящих к спонтанной деполяризации мембраны. Кардиомиоциты, полученные в результате дифференцировки могут быть классифицированы по потенциалу действия как желудочковые, предсердные и синусно-предсердные. Наиболее часто встречаются клетки с желудочковым потенциалом действия (Zhang et al., 2009). На сегодняшний день не существует методов дифференцировки, позволяющих получать чистые субпопуляции кардиомиоцитов. Механизм высвобождения кальция и сокращения дифференцированных кардиомиоцитов, также как и у изолированных взрослых кардиомиоцитов, основан на депонировании ионов кальция в саркоплазматическом ретикулуме и их высвобождении в ответ на активацию Ca^{2+} -каналов L-типа. Тем не менее, около половины кальциевых депо дифференцированных кардиомиоцитов чувствительны к инозитолтрифосфату, что характерно для взрослых кардиомиоцитов предсердий, но не желудочков (Itzhaki et al., 2011). Также в дифференцированных кардиомиоцитах отсутствуют поперечные T-трубочки, представляющие собой впячивания сарколеммы, подходящие к саркоплазматическому ретикулуму и обеспечивающие быструю передачу возбуждения

по всей клетке (Novak et al., 2012). Отсутствие этих структур приводит к нарушению циркуляции кальция и, как следствие, к нарушению сопряжения между возбуждением и сокращением кардиомиоцита.

1.4 Моделирование заболеваний человека с помощью iPСК

1.4.1 Моделирование кардиомиопатий с помощью iPСК

Увеличение количества генетических исследований, последовавшее вслед за развитием технологии геномного секвенирования, привело к описанию множества генов, мутации в которых ассоциированы с врождёнными заболеваниями сердца. Небольшая часть этих мутаций была подвергнута функциональному анализу *in vitro* и послужила основой для создания мышинных моделей. С развитием технологий репрограммирования и последующей дифференцировки iPСК стало возможным сравнительно быстрое получение культуры кардиомиоцитов от конкретного пациента. Несмотря на относительную незрелость получаемых кардиомиоцитов, их характеристики позволяют не только воспроизвести фенотип заболевания в культуре, но и изучить механизмы, лежащие в основе нарушения той или иной функции, а также протестировать потенциальные фармакологические агенты для её коррекции. На сегодняшний день, на основе iPСК созданы модели для таких заболеваний как синдром LQT1-3 (Moretti et al., 2010; Itzhaki et al., 2011; Malan et al., 2011), дилатационная кардиомиопатия (Sun et al., 2012), гипертрофическая кардиомиопатия (Lan et al., 2013), катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия (Itzhaki et al., 2012), аритмогенная кардиомиопатия (Caspi et al., 2013; Kim et al., 2013).

Таким образом, технология iPСК позволяет создавать модели сердечных заболеваний *in vitro*. Несмотря на высокое разнообразие линий iPСК, получаемых в различных лабораториях, и отсутствие единого стандарта проведения подобных экспериментов, накопление данных и создание банков iPСК, полученных от конкретных пациентов, позволит существенно расширить наши знания о механизмах заболеваний и влиянии второстепенных факторов на развитие патологии.

1.5 Аритмогенная кардиомиопатия

Аритмогенная кардиомиопатия представляет собой наследственное аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся аритмиями, сердечной недостаточностью и внезапной смертью. Частота встречаемости АКМП варьирует от 1:2000 до 1:5000 (Basso et al., 2009). Средний возраст постановки диагноза АКМП составляет 31 ± 13 лет (Nava et al., 2000), что указывает на развитие заболевания во взрослом возрасте. Терапия АКМП состоит в ограничении физической нагрузки и предотвращении аритмий с помощью фармакологических агентов, катетерной абляции или имплантации дефибриллятора, в некоторых случаях единственным способом избежать летального исхода является трансплантация сердца.

Первые описания этого заболевания относятся к 1736 г. (подробно описано в Thiene, 2015). В 1970-х годах Guy Fontaine описал характерную для АКМП картину аритмий и выявил наличие замедленной реполяризации желудочков, так называемой эpsilon-волны на электрокардиограмме (Fontaine et al., 1978). Позже, Marcus и Fontaine предложили термин «дисплазия», ошибочно предположив, что заболевание является следствием дефекта сердечного развития (Marcus et al., 1982). Современное наименование (ARVC, Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy, аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка) заболевание получило в 1995 году в отчёте Всемирной организации здравоохранения, посвящённом классификации кардиомиопатий (Richardson et al., 1996). В последнее время в русскоязычной литературе употребляется название «аритмогенная кардиомиопатия» (сокращённо АКМП), поскольку повреждение миокарда при этом заболевании не ограничивается правым желудочком.

Генетические исследования выявили ряд генов, мутации в которых, ассоциированы с развитием заболевания, в том числе, кодирующих белки, входящие в состав десмосомы: десмоплакин (ген *DSP*) (Rampazzo et al., 2002), десмоколлин-2 (ген *DSC2*) (Syrris et al., 2006), десмоглеин-2 (ген *DSG2*) (Pilichou et al., 2006), плакоглобин (ген *JUP*) (McKoy et al., 2000) и плакофиллин-2 (ген *PKP2*) (Gerull et al., 2004). Мутации в гене плакофиллина-2 встречаются наиболее часто и составляют примерно половину всех ассоциированных с АКМП мутаций (Gerull et al., 2004). С АКМП также ассоциированы мутации в недесмосомных генах, таких как *RYR2* (рианодинновый рецептор 2) (Tiso et al., 2001), *TGFB3* (трансформирующий фактор роста b3) (Beffagna et

al., 2005), *TMEM43* (трансмембранный белок 43) (Merner et al., 2008), *CTNNA3* (α -Т катенин) (van Hengel et al., 2013), *TTN* (тайтин) (Taylor et al., 2011), *DES* (десмин) (van Tintelen et al., 2009), *LMNA* (ламин А) (Quarta et al., 2012), *PLN* (фосфоламбан) (van der Zwaag et al., 2012). Такое широкое разнообразие генов, ассоциированных с АКМП, объясняется отсутствием строгих критериев заболевания. Также мутантные недесмосомные белки могут влиять на десмосому косвенным образом, регулируя кальциевый гомеостаз, транспорт и стабильность белков в составе межклеточных контактов.

Основным признаком заболевания является замещение кардиомиоцитов ткани сердечной мышцы фибробластами и жировыми клетками (рис. 6).

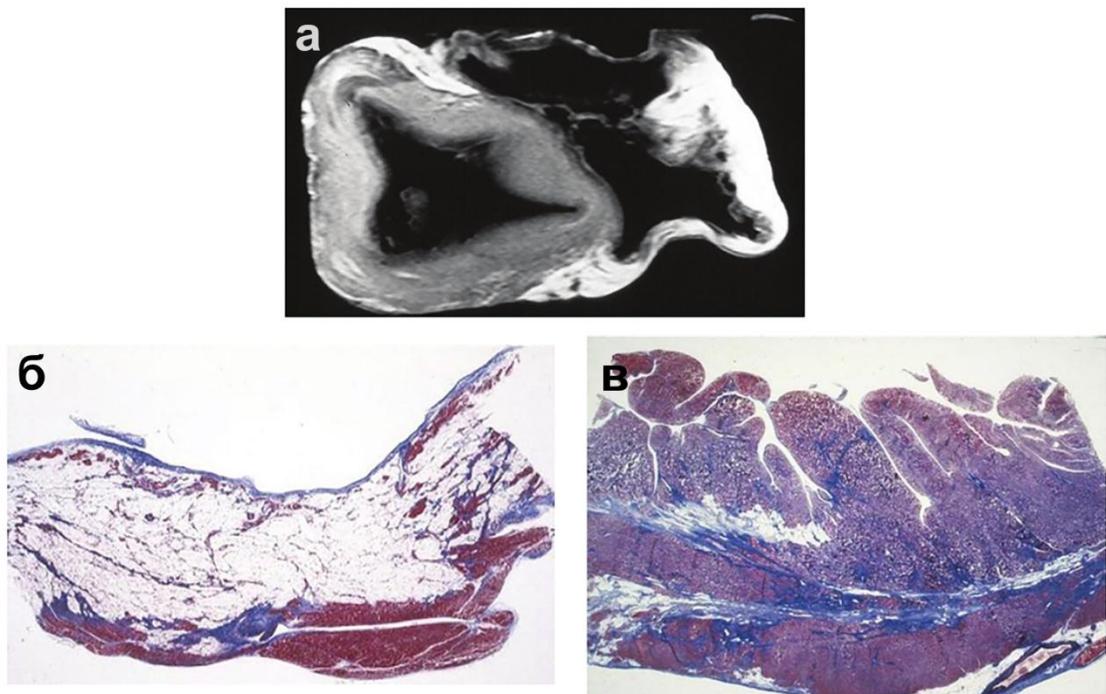


Рис. 6. Гистологические признаки поражения миокарда при аритмогенной кардиомиопатии.

а – изображение желудочков сердца пациента с АКМП, выполненное с помощью кардиомагнитного резонанса, б – жировая инфильтрация в стенке правого желудочка (гистологический срез, окраска трихромом), в – фиброз в стенке левого желудочка (гистологический срез, окраска трихромом). По Corrado et al., 2009 с изменениями.

Очаг заболевания чаще всего располагается в правом желудочке, однако поздние исследования указывают на возможность поражения, как левого, так и обоих желудочков (Corrado et al., 1997). Ассиметричный характер поражения миокарда может

быть объяснён неравномерностью механической нагрузки со стороны крови на стенки желудочков, вызванной разницей в их размерах (Thiene, Marcus, 2013). На роль механического стресса в прогрессии заболевания также указывает повышенная частота внезапной смерти спортсменов вследствие АКМП (22,4% против 8.2%) (Corrado et al., 1990; Corrado et al., 2003). Источником жировых клеток могут являться различные популяции некардиомиоцитарных клеток сердца. Согласно одной из теорий, адипоциты являются результатом дифференцировки клеток-предшественников вторичного сердечного поля, локализованных в районе эпикарда (Lombardi et al., 2009). В пользу этого предположения говорит направление распространения фронта жирового замещения: от эпикарда вглубь миокарда. Помимо фиброзной и жировой инфильтрации миокарда для АКМП характерно нарушение контактов между кардиомиоцитами, приводящее к нарушению механической и электрической целостности миокарда, апоптозу кардиомиоцитов и воспалению (Thiene et al., 1988; Basso et al. 1994).

Молекулярные механизмы, приводящие к развитию заболевания остаются неизученными, несмотря на значительные достижения в изучении АКМП за последние несколько лет. Отчасти это связано с высокой гетерогенностью заболевания — схожие фенотипы может быть обусловлены мутациями в генах, кодирующих белки с различными функциями. Тем не менее, была описана связь мутантных белков в составе десмосомы и аномальной активацией сигнальных путей. Так, было показано, что плакоглобин, вследствие мутации или в отсутствие десмоплакина, лишённый способности входить в структуру десмосомы, способен транслоцироваться в ядро, где он конкурирует с β -катенином за связывание с различными регулярными участками ДНК, тем самым ингибируя сигнальный путь Wnt (Garcia-gras et al., 2006). В свою очередь, канонический сигнальный путь Wnt является своеобразным переключателем клеточной дифференцировки. Поскольку мутантный плакоглобин связывается с регуляторными последовательностями необратимо, происходит постоянное ингибирование Wnt, способствующее адипогенезу (рис. 7).

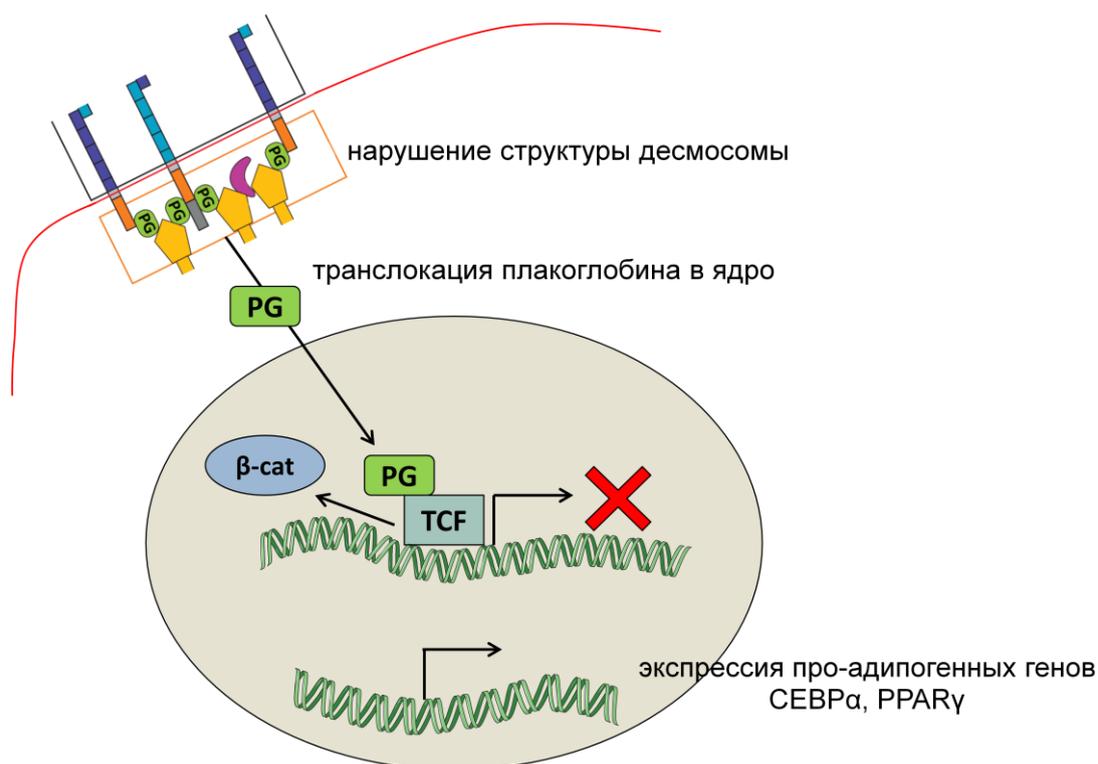


Рис. 7. Влияние транслокации плакоглобина на активность сигнального пути Wnt.

Вследствие нарушений в структуре десмосомы, плакоглобин (PG) способен перемещаться в ядро, где он конкурирует с β -катенином (β -cat) за связывание с комплексом TCF. Связывание плакоглобина ингибирует активность сигнального пути Wnt (красный крест) и вызывает экспрессию про-адипогенных генов CEBP α , PPAR γ и др. (по данным Garcia-gras et al., 2006)

На модели мышей с индуцированным нокаутом плакоглобина была отмечена активация сигнального пути Wnt (Li D. et al., 2011), приводящая к развитию признаков АКМП.

В другом подобном исследовании несмотря на повышение уровня цитоплазматического β -катенина, сигнальный путь Wnt не был активирован, в тоже время наблюдалось повышение TGF β сигнального пути, регулирующего апоптоз, фиброз и гипертрофию (Li J. et al., 2011).

Другой группой исследователей была описана аномальная активация Hippo сигнального пути в образцах миокарда пациентов с АКМП, мышинных моделях, а также на *in vitro* при нокауте гена *PKP2* в клетках линии HL-1. Механизмом активации сигнального пути Hippo, по видимому, является нарушение локализации протеинкиназы PKC α , вследствие аномальной структуры десмосом (Chen et al., 2014) (рис. 8).. В норме

сигнальный путь Hippo регулирует размер кардиомиоцитов и уровень их пролиферации, в то время как его аномальная активация может приводить к атрофии кардиомиоцитов. Также активация Hippo может приводить к подавлению сигнального пути Wnt, приводя к уже описанным выше эффектам без участия мутантного плакоглобина.

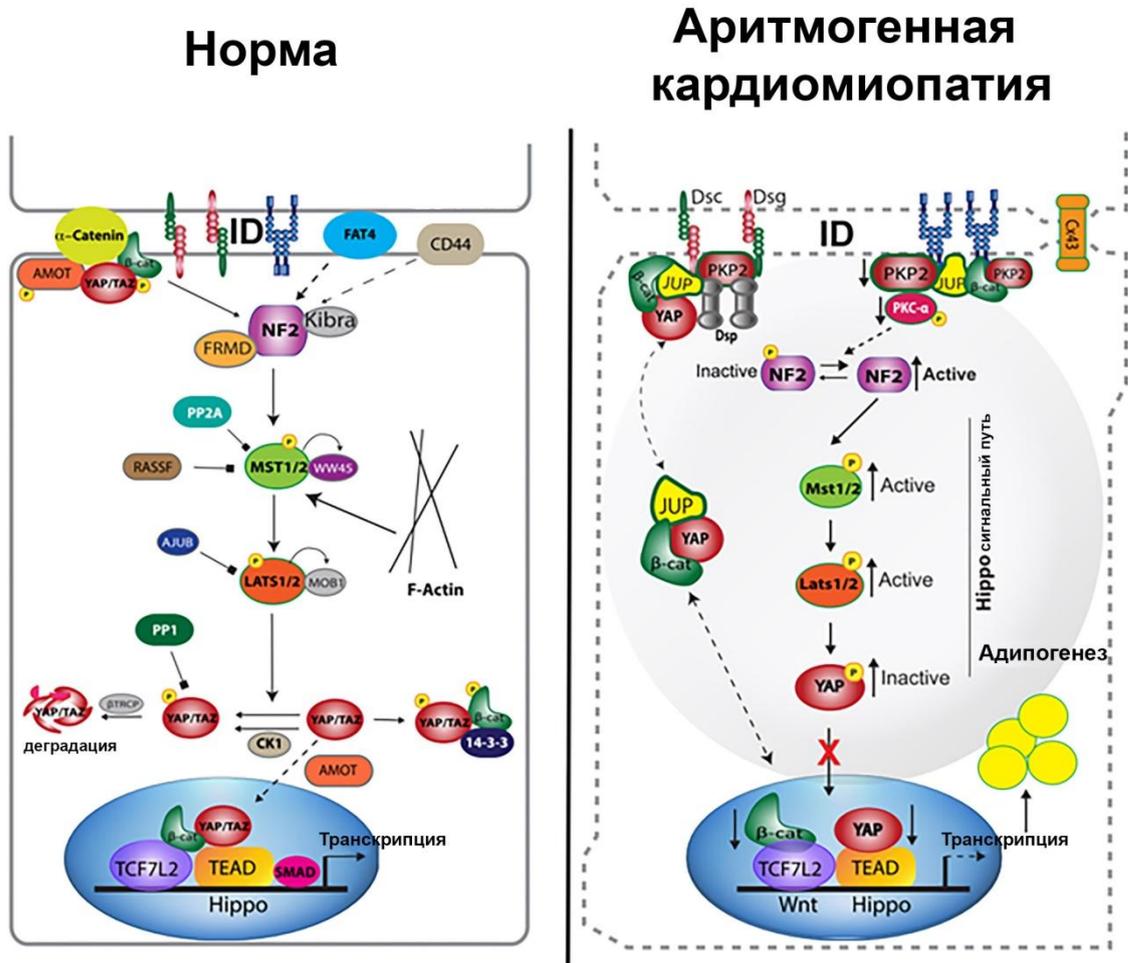


Рис. 8. Роль сигнального пути Hippo в развитии аритмогенной кардиомиопатии.

Изменение структуры десмосом при аритмогенной кардиомиопатии вызывает снижение фосфо-формы PKC α , связанной с межклеточными контактами, и активирует нейрофибромин (NF2), являющийся участником сигнального пути Hippo. Активация нейрофибромина приводит к фосфорилированию Mst1/2, Lats1/2, YAP, изменению TEAD-опосредованной экспрессии генов-мишеней сигнального пути Hippo и ингибированию сигнального пути Wnt, что приводит к адипогенезу. По Chen et al., 2014 с изменениями.

В другом исследовании отмечается важность метаболических изменений миокарда, на фоне которых происходит развитие заболевания. Сочетание активного PPAR α

сигнального пути, характерного для миокарда, с аномальной активностью PPAR γ на фоне мутации в гене *PKP2* приводит к апоптозу и повышенному накоплению липидных капель в культуре кардиомиоцитов, полученных из iPСК (Kim et al., 2013).

Важную роль в развитии АКМП могут играть белки-модуляторы, функция которых заключается в поддержании десмосомной структуры. Такими белками являются SAP97, регулирующий транспорт в районе интеркалирующего диска (Asimaki et al., 2014), и iASPP, формирующий комплекс с десмоплакином и десмином (Notari et al., 2015). Модуляторы десмосомы являются потенциальными мишенями для поиска фармакологических агентов, поскольку их активация может приводить к возвращению нормальной локализации белков в районе межклеточных контактов. Одним из веществ, способных предотвращать развитие аритмогенной кардиомиопатии на модели рыбы *Danio rerio* является SB216763, влияющий на локализацию белка SAP97 и активирующий сигнальный путь Wnt. (Asimaki et al., 2014).

Дальнейшие исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов десмосомной регуляции позволят расширить представления о роли десмосом в возникновении сердечной патологии и усовершенствовать терапию, направив её на восстановление функций десмосом.

2 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.

2.1 Клеточные культуры, использованные в работе

В работе использовались следующие культуры клеток: линия клеток эмбриональной почки человека НЕК 293Т, линия клеток HeLa, линия кардиомиоцитов мыши HL-1, ММСК жировой ткани, мезенхимные клетки сердца, мышечные эмбриональные фибробласты, линии ИПСК человека, линия клеток энтодермы мыши END-2.

2.1.1 Культивирование линии клеток HL-1

Линия кардиомиоцитов мыши HL-1 была любезно предоставлена Аркадием Рутковским, Университет Осло, Норвегия. Клетки линии HL-1 культивировали в среде Claycomb (Sigma-Aldrich, США), дополненной 10% сыворотки Nucleon (Thermo Scientific, США), 2мМ глутамина (Life Technologies, США), 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, США), 0.1мМ норэпинефрина и 0.3мМ аскобиновой кислоты. Клетки HL-1 культивировали на пластиковых чашках Петри (Corning, США), обработанных 0.1% раствором желатина на PBS, пассировали по достижении 90% конфлюэнтности в соотношении 1:4.

2.1.2 Получение, культивирование и криоконсервация ММСК жировой ткани

ММСК жировой ткани получали из биоптата жировой ткани согласно описанной ранее методике (Zuk et al., 2001). Жировую ткань 3 раза промывали PBS, измельчали и инкубировали в растворе, содержащем 1мг/мл коллагеназы I (Worthington Biochemical Corp, США) в среде DMEM (Life Technologies, США) в течение 30 мин. Затем к полученной суспензии добавляли среду для роста ММСК, содержащей α -MEM (Панэко, Россия), 10% сыворотки Nucleon (Thermo Scientific, США), 2мМ глутамина (Life Technologies, США), 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, США), центрифугировали при 300g 5 мин. Затем супернатант удаляли,

клетки ресуспендировали в свежей среде для роста ММСК и высаживали на пластиковую чашку Петри (Corning, США). ММСК рассеивали при достижении уровня конфлюентности клеток 80-90%, обрабатывая раствором 0.05% трипсина/ЭДТА (Life Technologies, США).

Для криоконсервации клетки снимали, обрабатывая раствором 0.05% трипсина/ЭДТА, ресуспендировали в среде для роста и центрифугировали при 300g в течение 5 мин. Затем супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в сыворотке Nucleon с 10% DMSO и переносили в криовials. Далее криовials инкубировали при -80°C в течение минимум 24 часов, в камере градиентной заморозки Mr. Frosty (Thermo Scientific, США), после чего переносили в жидкий азот.

Для размораживания криовials из жидкого азота переносили в водяную баню, инкубировали при 37°C до размораживания, далее раствор с клетками переносили в пробирки, добавляли среду для роста ММСК, перемешивали и центрифугировали при 300g 5 мин. Затем супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в свежей среде для роста ММСК и переносили в чашки Петри.

2.1.3 Получение, культивирование и криоконсервация мезенхимных клеток сердца

Мезенхимные клетки сердца получали из биоптата миокарда согласно описанной ранее методике (Smits et al., 2009). Ткань миокарда 3 раза промывали PBS, измельчали и инкубировали в растворе, содержащем 1мг/мл коллагеназы II (Worthington Biochemical Corp, США) в среде DMEM (Life Technologies, США) в течение 1 часа. Затем к полученной суспензии добавляли среду для роста мезенхимных клеток сердца, содержащую DMEM/F12, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ глутамин, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 1-кратный раствор инсулин-трансферрин-селен, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США), центрифугировали при 300g 5 мин. Затем супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в свежей среде для роста мезенхимных клеток сердца и высаживали на пластиковую чашку Петри (Corning, США).

Криоконсервацию мезенхимных клеток сердца осуществляли аналогично криоконсервации ММСК.

2.1.4 Иммунофенотипирование культур ММСК и мезенхимных клеток сердца

Иммунофенотипирование проводили на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 5 (Millipore, США) с использованием моноклональных антител против CD19, CD33, CD34, CD45, CD56CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, CD117 (Abcam, США), SKIT, ISL1, Sca1 (Santa Cruz, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

2.1.5 Индукция адипогенной дифференцировки ММСК и мезенхимных клеток сердца

Индукцию адипогенной дифференцировки проводили путём культивирования клеток в дифференцировочной среде 5F (ростовая среда, содержащая коктейль из 5 факторов дифференцировки: 5 мкг/мл инсулина, 0.25мМ дексаметазона, 5мМ розиглитазона, 0.5мМ 3-изобутила-1-метилксантина, 200мкМ индометацина (все Sigma-Aldrich, США).

2.1.6 Индукция кардиогенной дифференцировки мезенхимных клеток сердца

Для индукции кардиогенной дифференцировки клетки высевали в на чашки Петри в плотности 10^4 клеток/см², через сутки среду заменяли на дифференцировочную (47% IMDM, 47% F12, 2% лошадиной сыворотки, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 1-кратный раствор инсулин-трансферрин-селен, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США). Через 6–8 ч среду заменяли на дифференцировочную, содержащую 5мкМ 5-азацитидина (Sigma-aldrich, США). В течение следующих трёх суток в среду добавляли 5-азацитидин до 5мкМ. На 6 сутки с момента индукции дифференцировки к среде добавляли 10^{-4} М аскорбиновой кислоты (Sigma-aldrich, США) и 1 нг/мл TGF- β 1 (Peprotech, США). Начиная с этого момента, добавляли аскорбиновую кислоту один раз в двое суток и TGF- β 1 дважды в неделю. Замену среды проводили каждые 2–3 сут. Дифференцировку проводили в течение 24 суток.

2.1.7 Получение, культивирование и дифференцировка иПСК

2.1.7.1 Получение иПСК

иПСК получали путём репроеграмирования 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)), согласно

рекомендациям производителя. За день до трансдукции ММСК или мезенхимные клетки сердца высаживали в лунки 6-луночного планшета по 1.5×10^5 клеток/лунку в среде, содержащей DMEM, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, 55мкМ β -меркаптоэтанола, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США). В день трансдукции среду в лунках меняли на 1 мл среды и добавляли 0.5 мл среды, содержащей вирусные частицы из расчёта на 2.5×10^5 клеток (KOS MOI=5, hc-Мус MOI=5, hKlf4 MOI=3). На следующий день и далее раз в 2 дня среду меняли. На 7 день клетки снимали раствором 0.05% трипсина/ЭДТА (Life Technologies, США) и пересаживали на приготовленные заранее 6-луночные планшеты с фидерным слоем клеток. В качестве фидерного слоя использовали мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ), полученные из 14-суточных мышинных эмбрионов линии DBA/2JxBalb/c.

МЭФ растили на среде, содержащей DMEM, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США), пересевали в соотношении 1:4 с использованием раствора 0.05% трипсина/ЭДТА (Life Technologies, США) в течение 4 пассажей. Для приготовления фидерного слоя МЭФ (пассаж 2-4) обрабатывали 0.01 мг/мл митомицина С (Serva, Германия) в течение 2.5 часов и затем высаживали на планшеты, предварительно обработанные 0.1% раствором желатина на PBS, в плотности 25×10^3 клеток/см².

На следующий день после пересадки репрограммируемых клеток на фидерный слой и далее три раза в неделю среду меняли на среду для ЭСК, содержащую KO-DMEM, 20% заменителя сыворотки KOSR, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 55мкМ β -меркаптоэтанола, 2мМ глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США), 10 нг/мл человеческого β FGF (Peprotech, США). Спустя 3-4 недели после момента трансдукции начинали появляться колонии иПСК. Выросшие колонии клеток разделяли на части с помощью пластикового 200мкл наконечника для пипетки под микроскопом, находящимся в ламинаре, и переносили в лунки заранее подготовленного 6-луночного планшета с фидерным слоем (одну исходную колонию на одну лунку), изолируя тем самым отдельные линии иПСК.

2.1.7.2 Культивирование иПСК

Линии иПСК культивировали на слое МЭФ в среде для ЭСК. Среду меняли три раза в неделю. Пересадку иПСК осуществляли в соотношении 1:2 – 1:5. Для пересадки фидерный слой соскребали пластиковым наконечником и удаляли, затем иПСК обрабатывали раствором коллагеназы IV (Worthington Biochemical Corp, США) в среде DMEM/F12 в концентрации 200 ед/мл в течение 5 мин при 37°C, после чего соскребали пластиковым скребком (Sarstedt, США), осторожно ресуспендировали и переносили в лунки заранее приготовленных планшетов с фидерным слоем.

2.1.7.3 Криоконсервация иПСК

Для криоконсервации колонии иПСК обрабатывали коллагеназой IV как для посева и затем ресуспендировали в среде для замораживания, состоящей из сыворотки Nucleon и 10% DMSO (Sigma-Aldrich, США) и переносили в криовials. Далее криовials инкубировали при -80°C в течение минимум 24 часов, в камере градиентной заморозки Mr. Frosty (Thermo Scientific, США), после чего переносили в жидкий азот.

Для размораживания криовials из жидкого азота переносили в водяную баню, инкубировали при 37°C до размораживания, далее раствор с клетками переносили в пробирки, добавляли среду для ЭСК (не содержащую β FGF), перемешивали и центрифугировали при 300g 5 мин. Затем супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в свежей среде для ЭСК с добавлением 10мкМ ингибитора ROCK киназы Y27632 и переносили в лунки заранее приготовленного 6-луночного планшета с фидерным слоем. Среду меняли через 48 часов и далее три раза в неделю. Через 1-2 неделю в лунках появлялись колонии иПСК.

2.1.7.4 Формирование тератом из иПСК

Культуры иПСК обрабатывали раствором коллагеназы IV (Worthington Biochemical Corp, США) в среде DMEM/F12 в концентрации 200 ед/мл в течение 5 мин при 37°C, после чего соскребали пластиковым скребком (Sarstedt, США), ресуспендировали в среде для ЭСК, центрифугировали при 300g в течение 5 мин, супернатант удаляли. Полученный осадок ресуспендировали на льду в матригеле из расчета 5×10^6 клеток/мл. По 150-200 мкл полученной суспензии инъецировали подкожно в заднюю лапу мышам линии Nude. Через 1-3 месяца наблюдали развитие тератом. Мышей умерщвляли путём цервикальной дислокации, тератомы извлекали, фиксировали в 4% PFA на PBS, заключали в парафин и делали серийные срезы. Полученные срезы окрашивали

гематоксилин-эозином. Микрофотографии получали при помощи микроскопа AxioObserver D1 и программного обеспечения Zen (Zeiss, Германия).

2.1.7.5 Формирование эмбрионных тел из иПСК

Для формирования эмбрионных тел фидерный слой удаляли пластиковым наконечником, иПСК соскребали пластиковым скребком и переносили в низкоадгезивные планшеты (Corning, США) со средой, содержащей КО-DMEM (Life Technologies, США), 20% сыворотки Nucleon (Thermo scientific, США), 1-кратный раствор аминокислот MEM, 2мМ глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США). Среду меняли 1-2 раза в неделю, осторожно отбирая её из планшетов. Сформировавшиеся эмбрионные тела культивировали в течение 4-5 недель, после чего лизировали для выделения РНК.

2.1.7.6 Дифференцировка иПСК в направлении кардиомиоцитов

Дифференцировку иПСК осуществляли методом сокультивирования их с клеточной линией END-2 согласно описанной ранее методике (Mummery et al., 2003).

Клетки END-2 растили на среде, содержащей DMEM/F12, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США) на чашках Петри, предварительно обработанных 0.1% раствором желатина на PBS. Клетки пересеивали в соотношении 1:10 с использованием раствора 0.05% трипсина/ЭДТА (Life Technologies, США) в течение 4 пассажей. За день до начала дифференцировки иПСК клетки END-2 обрабатывали 0.01 мг/мл митомицина С (Serva, Германия) в течение 2.5 часов и затем высаживали на 12-луночные планшеты, предварительно обработанные 0.1% раствором желатина на PBS, в плотности 4.4×10^4 клеток/см². Для запуска дифференцировки иПСК пересеивали на слой клеток END-2, и культивировали в среде, содержащей КО-DMEM, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 0.2мМ бета-меркаптоэтанол, 2мМ глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, США) и 1.4 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США). В ходе дифференцировки иПСК формировали трёхмерные клеточные агрегаты. Через 7 сут и далее трижды в неделю среду заменяли на КО-DMEM, содержащую 10% KOSR, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 0.2мМ β-меркаптоэтанол, 2мМ глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (все Life Technologies, США). Дифференцировку осуществляли в течение 24 суток.

Для иммуноцитохимической окраски клеток агрегаты дифференцированных клеток разбивали, инкубируя последовательно в трёх растворах: в растворе, содержащем 0.12мМ NaCl, 5.4мМ KCl, 5мМ MgSO₄, 5мМ пирувата натрия, 200мМ таурина, 10мМ HEPES, 20мМ глюкозы (все Sigma-Aldrich, США), pH6.9, при комнатной температуре в течение 30 мин, затем в растворе, содержащем 0.12мМ NaCl, 30мкМ CaCl₂, 5.4мМ KCl, 5мМ MgSO₄, 5мМ пирувата натрия, 200мМ таурина, 10мМ HEPES, 20мМ глюкозы (все Sigma-Aldrich, США), 1мг/мл коллагеназы II (Worthington Biochemical Corp, США), pH6.9, при комнатной температуре в течение 45 мин, затем в растворе, содержащем 30мМ K₂HPO₄, 85мМ KCl, 2мМ натриевой соли АТФ, 5мМ MgSO₄, 1мМ ЭГТА, 5мМ пирувата натрия, 5мМ креатина, 200мМ таурина, 20мМ глюкозы (все Sigma-Aldrich, США), pH7.2, при комнатной температуре в течение 1 ч. Далее агрегаты ресуспендировали и полученную клеточную суспензию сажали на предварительно обработанные 0.1% желатином на PBS покровные стёкла в среду, содержащую КО-DMEM, 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 2мМ глутамина, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, США).

2.2 Выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции

РНК выделяли реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Осадок выделенной РНК растворяли в деионизованной воде, предварительно обработанной DEPC. DEPC (Sigma-Aldrich, США) добавляли в воду до получения 0.1% раствора, инкубировали 1ч при комнатной температуре, постоянно перемешивая, затем автоклавировали. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop 3300 (ThermoScientific, США). 1 мкг выделенной РНК обрабатывали 1 ед. ДНКазы I (ThermoScientific, США) в течение 30 мин при 37°С, после чего к смеси добавляли ЭДТА до 5мМ и инактивировали ДНКазу в течение 30 мин при 65°С. Затем РНК использовали в реакции обратной транскрипции, которую проводили при помощи набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали 1мкМ случайных декануклеотидных праймеров и 100 ед. обратной транскриптазы. Полученную кДНК разводили деионизованной водой в 6 раз и хранили при -20°С.

2.3 Полуколичественная ПЦР

Для проведения полуколичественной ПЦР использовали: 50 нг матрицы кДНК, полученной после реакции обратной транскрипции, по 0.8мкМ прямого и обратного праймеров, 0.4мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0.2мМ MgCl₂, 5 ед. Taq-полимеразы (все Силекс, Россия). Последовательности праймеров указаны в таблице 1. Амплификация проводилась по следующей схеме 95°C - 30с, затем 35 циклов (95°C - 30 с, T_m - 30 с , 72°C - 1 мин) и 72°C - 10 мин. Температуру отжига T_m праймеров определяли при помощи онлайн-сервиса <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. ПЦР проводили в ДНК-амплификаторе (Applied Biosystems, США). Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 1,5% агарозном геле на TAE буфере при напряженности электрического поля 10В/см. Для окрашивания ДНК в гель при приготовлении добавляли 0.2 мкг/мл бромистого этидия (Sigma-Aldrich, США). Размер ПЦР-продукта определяли по молекулярной массе, сравнивая его с ДНК-маркером 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Изображения гелей получали при помощи системы гель-документации (Vilber Lourmat, Германия).

2.4 ПЦР в режиме реального времени

Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали смесь qPCRmix-HS (Евроген, Россия) в сочетании с готовыми праймерами и пробой TaqMan (ThermoScientific, США) или готовую смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) в сочетании с синтезированными праймерами из базы данных Primer Depot (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>). Последовательности праймеров указаны в таблице 1, готовые смеси TaqMan указаны в таблице 2.

В случае системы TaqMan использовали 1 мкл смеси, содержащей праймеры и пробу на реакцию объемом 25 мкл и 50 нг кДНК. ПЦР проводили в амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) по следующей схеме 95°C- 5 мин, затем 40 циклов (95°C - 15 с, 60°C - 30 с , 70°C - 30с).

В случае системы Sybr Green использовали по 0.4мкМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК. ПЦР проводили в амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) по следующей схеме 95°C - 5 мин, затем 40 циклов (95°C - 15 с, 60°C - 30 с, 70°C - 30с). Специфичность праймеров определяли по кривой плавления амплифицированного продукта, а эффективность реакции по углу наклона стандартной кривой, полученной в результате измерения пороговых циклов амплификации серийных

разведений кДНК (тангенс угла наклона стандартной кривой находился в диапазоне -2.8 – -3.6).

Для расчета относительной экспрессии (количества) гена использовали $\Delta\Delta C_t$ метод, в качестве референсного гена использовали последовательность, кодирующую 18S РНК.

2.5 Реакция на щелочную фосфатазу

Клетки фиксировали 4% раствором PFA в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали в растворе, содержащем 100мМ Tris, pH 9.5, 50мМ $MgCl_2$, 100мМ NaCl, 0.4 мг/мл N-AS-MX 1 мг/мл Fast Red TR Salt (все Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин до появления окраски. Реакцию останавливали двукратной промывкой клеток PBS. Микрофотографии получали при помощи микроскопа AxioObserver.D1 (Carl Zeiss, Германия).

2.6 Иммуноцитохимическая окраска клеток

Для иммуноцитохимической окраски клетки выращивали на покровных стёклах и фиксировали 4% раствором PFA на PBS в течение 10 мин. Для пермеабиллизации мембраны клетки обрабатывали 0,05% раствором Тритона X-100 на PBS в течение 3 мин. Забивку проводили в течение 1 часа при комнатной температуре 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) на PBS. Раствор БСА удаляли и на внутренней стороне чашки с помощью гидрофобного маркера ограничивали область для окраски. Затем наносили первичные антитела в концентрации, рекомендованной производителем, разведенные на 1% БСА, и инкубировали во влажной камере в течение 1 часа при комнатной температуре. Использовали первичные антитела к следующим белкам: α -актинин (Santa Cruz, США), тропомиозин (Santa Cruz, США), тропонин I (Santa Cruz, США), тяжёлые цепи миозина (Abcam, США), OCT3/4 (Santa Cruz, США), NANOG (Millipore, США), TRA-1-81 (Millipore, США), TRA-1-60 (Millipore, США), ISL1 (Abcam, США), СКИТ (Santa Cruz, США), плакофиллин-2 (Progen, Германия), десмоглеин-2 (Santa Cruz, США), плакоглобин (Santa Cruz, США), тропонин Т (Santa Cruz, США), β -катенин (Santa Cruz, США), β -актин (Santa Cruz, США). После промывки стёкол PBS, наносили вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), и инкубировали в течение 40 минут в темноте при комнатной температуре. Промывали стёкла PBS, добавляли раствор DAPI на PBS (Invitrogen, США), не инкубируя, промывали PBS, после чего покровные стёкла с клетками монтировали на предметные стёкла с использованием среды Fluorescence Mounting

Medium (Dako, 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).

2.7 Электронная микроскопия

Для исследования ультраструктуры десмосом клетки линии HL-1, выращенные на покровных стёклах, фиксировали 2.5% глутаральдегидом на 0.1М какодилатном буфере, содержащем 0.15М сахарозы, pH7.4, в течение 1 ч, постфиксировали в 1% OsO₄, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне и заливали в смесь Эпона и Аралдита по стандартным протоколам. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью алмазного ножа на ультратоме LKB (LKB-Producter, Швеция) и контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца. Материал просматривали и фотографировали на электронном микроскопе Zeiss Lbra 120 при 80 kV (Carl Zeiss, Германия).

2.8 Электрофорез в ПААГ и вестерн блоттинг

Для приготовления белковых лизатов клетки промывали PBS, соскребали с чашек и лизировали в буфере, содержащем 50mM Tris, 10mM, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X 100 (все Sigma-Aldrich, США) и коктейль ингибиторов протеаз (Roche, Германия) в течение 30 мин при 4°C. Затем суспензию центрифугировали при 12000g при 4°C. Супернатант отбирали и хранили при -20°C. Концентрацию белка определяли при помощи набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США). К 80 мкг тотального белка, добавляли 25 мкл буфера для нанесения (200mM Tris (pH6.8), 4% SDS, 0.01% бромфенолового синего, 40% глицерина, 400mM β-меркаптоэтанола), доводили лизирующим буфером до 100 мкл и инкубировали при 100°C в течение 5 мин.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили в модификации Лэммли (Laemmli, 1970). Концентрирующий гель (pH 6.8) содержал 4% полиакриламида, разделяющий (pH 8.8) – 12.5%. В лунку наносили 20 мкг белка в составе пробы. Разделение белков проводили в геле, размером 90x60x1 мм при силе тока 40 мА. Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Applichem, США). Перенос белков на мембрану осуществляли при напряжении 100В в течение 2 ч в буфере для мокрого переноса (47.9mM Tris, 38.6mM глицин, 0.0385% SDS, 20% метанол). Для обратимой окраски белков на мембране использовали раствор Ponceau S (Sigma-Aldrich, США). Для окраски антителами

мембрану промывали PBS, содержащем 0.05% Tween-20 (TPBS), инкубировали в 5% растворе сухого обезжиренного молока в TPBS при комнатной температуре в течение часа. Затем мембрану помещали в раствор первичных антител (перечислены в разделе “Иммуноцитохимическая окраска клеток”) в 5% молоке в TPBS и инкубировали в течение 16ч при 4°C, постоянно перемешивая. Далее мембрану промывали TPBS и помещали на 1 час в раствор вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой (BioRad, США), в 5%-ном растворе молока в TPBS, после чего снова промывали мембрану. Для детекции пероксидазной активности использовали набор SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США). Хемилюминесцентное излучение регистрировали при помощи системы гель-документации (Vilber Lourmat, Германия).

2.9 Измерение люциферазной активности

Для оценки активности канонического сигнального пути Wnt использовали лентивирусный вектор на основе плазмиды 7TFC (Addgene 24307) (Fuerer, Nusse, 2010). Этот вектор содержит в своём составе конструкцию TopFlash, представляющую собой последовательность гена люциферазы под промотером с 7 сайтами связывания TCF/LEF, а также ген флюоресцентного белка mCherry. Приготовление клеточных лизатов и последующее измерение активности люциферазы проводили, используя набор Luciferase Assay System (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Интенсивность люминисценции, пропорциональную активности люциферазы и отражающую активность Wnt, измеряли при помощи спектрофотометра Synergy2 (BioTek, США). Для нормировки проб, люциферазную активность нормировали на концентрацию белка в пробах, которую определяли при помощи набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США).

2.10 Получение лентивирусных конструкций, несущих ген *PKP2* дикого типа и его мутантные формы

2.10.1 Клонирование кодирующей последовательности *PKP2* в лентивирусный вектор

Последовательность гена *PKP2*, несущая метку flag на 3'-конце, амплифицировали с плазмиды 915-Plakophilin 2a-Flag (Addgene 32230). Последовательности праймеров, использовавшихся для амплификации указаны в таблице 1. Полученный фрагмент клонировали по сайтам рестрикции AscI и EcoRI с использованием соответствующих

рестриктаз (ThermoScientific, США) и T4 лигазы (ThermoScientific, США) в лентивирусный вектор pLV-T7-lacZiresBla-5600, несущий ген устойчивости к бластицидину. Правильное расположение вставки подтверждали секвенированием участков плазмиды.

2.10.2 Сайт-специфический мутагенез

Для сайт-специфического мутагенеза проводили ПЦР, используя плазмиду в качестве матрицы и пары праймеров, несущих соответствующую мутацию (см. таблицу 1). Для амплификации использовали 0.8 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов и 2 ед высокоточной полимеразы Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, США). Амплификацию проводили по следующей схеме: 98°C - 5 мин, затем 14 циклов (98°C - 15с, 55°C - 1 мин, 72°C - 7 мин) и 72°C - 20 мин. ПЦР проводили в ДНК-амплификаторе (Applied Biosystems). 10 мкл реакционной смеси обрабатывали FastDigest DpnI (Thermo Scientific, США) при 37°C течение 1 ч. 5 мкл полученной смеси использовали для трансформации компетентных бактерий *E. coli*, штамм Top10. Наличие мутации подтверждали секвенированием участков плазмиды.

2.10.3 Секвенирование участков плазмид

Правильность встраивания вставки и наличие мутаций определяли путём секвенирования плазмидной ДНК. Секвенсовую реакцию проводили с использованием Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), согласно рекомендациям производителя. Смесь для реакции секвенирования включала в себя: 200 нг плазмидной ДНК, 1 мкл смеси BigDye, 0.1мкМ праймера (последовательности праймеров указаны в таблице 1), 1.3-кратный реакционный буфер. Реакцию проводили, используя стандартную программу: 96°C - 1мин, 25 циклов (96°C - 10 с, 50°C - 5 с, 60°C - 4 мин). После завершения реакции проводили очистку продуктов методом этанольной преципитации. К реакционной смеси добавляли 2.5 мкл 0.125М ЭДТА, 30 мкл 96% этанола, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1ч. Затем смесь центрифугировали при температуре при 3000g, при 4°C супернатант удаляли, осадок промывали 70% этанолом, центрифугируя при 1600g при 4°C. Супернатант удаляли, осадок высушивали при комнатной температуре, растворяли в 14 мкл деионизированного формамида и использовали для проведения капиллярного электрофореза в анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Полученные последовательности анализировали с помощью программы Geneious 7.

2.10.4 Продукция лентивирусных частиц

Продукцию лентивирусных частиц осуществляли согласно протоколу, разработанному в лаборатории Д. Троно (<http://http://tcf.epfl.ch>). Для продукции лентивирусных частиц использовалась линия клеток эмбриональной почки человека НЕК 293Т, любезно предоставленная доктором Н. Алениной (Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Германия). Клетки НЕК 293Т культивировали в среде, содержащей DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ глутамина, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, США). За сутки до трансфекции клетки рассеивали на 10-см чашки Петри в количестве 2.5×10^6 клеток на чашку. На следующие сутки осуществляли трансфекцию. В пробирке смешивали 3 плазмиды (из расчета на одну 10-см чашку Петри): psPAX2 (9.75 мкг), рMD2.G (5.27 мкг), рLVTHM-GFP или другая целевая плазида (15 мкг), добавляли 440 мкл буфера TE (0.1x) (10мМ Трис-НСl, 1мМ ЭДТА, рН 7.4), 73,5 мкл СаСl₂ (2.5М) и стерильную воду до конечного объёма 760 мкл. Полученную смесь по каплям вливали во вторую пробирку с HBS (280мМ NaCl, 1.5мМ Na₂HPO₄, 50мМ HEPES, рН7.00-7.11), постоянно перемешивая на вортексе, инкубировали течение 15 мин при комнатной температуре, затем по каплям добавляли в чашку Петри с клетками НЕК293Т. На следующие сутки среду меняли, через 48 ч после трансфекции среду собирали в отдельную пробирку, центрифугировали 5 мин при 300 g, супернатант отфильтровывали, используя 0.22 мкм нейлоновый фильтр. Далее фильтрованную среду, содержащую вирусные частицы центрифугировали при 70000g в течение 2ч при 4°C, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 1% БСА на PBS, растворяли в течение 1 ч при 4°C, аликвотили и хранили при -80°C. Одновременно с прочими векторами собирали вирус, несущий ген GFP.

Для определения концентрации вирусных частиц в растворе суспензию, содержащую вирус с геном GFP титровали. Для этого клетки линии НЕК 293Т высевали на 6-луночные планшеты по 10^5 клеток на лунку. В среду добавляли полибрен до концентрации 2 мкг/мл. Затем в лунки добавляли различные объёмы раствора с вирусом (10 мкл, 1 мкл, 0.1 мкл), в одну лунку (контрольную) вирусные частицы не добавляли. Через 3 суток клетки снимали трипсином и ресуспендировали в растворе, содержащем 1% FBS на PBS. Процент GFP-позитивных клеток определяли на проточном цитометре Guava easy Cyte 5, Millipore, США).

2.11 Трансдукция клеточных культур

Трансдукцию клеточных культур осуществляли с $MOI = 10$ в присутствии 2 мкг/мл полибрена. иПСК после трансдукции лентивирусными векторами, несущими *PKP2* дикого типа и его мутантные формы через 3 суток селектировали по устойчивости к бластицидину. Для селекции бластицидин в концентрации 10 мкг/мл добавляли в среду в течение 4 суток. При необходимости, в частности, после пересадки иПСК селекцию повторяли.

2.12 Статистическая обработка данных

Расчеты проводки в программе Microsoft Excel. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы GraphPad Prism 5. Для сравнения двух групп применяли критерий Манна-Уитни, для множественного сравнения применяли тест Краскела-Уоллиса с поправкой Данна.

2.13 Последовательности праймеров и готовые смеси TaqMan

Последовательности праймеров, использовавшихся для проведения различных типов ПЦР, представлены в таблице 1.

Ген	Последовательность праймера (5'-3')	Примечание
<i>PKP2</i>	TTGGCGCGCCACCATGGCAGCCCCCGGCG CCCCA	Клонирование (прямой праймер)
<i>PKP2</i>	TGCGAATTCATCTACTTGTCATCGTCGTCC TTGTA	Клонирование (обратный праймер)
<i>PKP2</i>	ACTGCATCATGCCTACAAGAGGGCTCAGT TTAAGAAGACAG	Мутация K859R (прямой праймер)
<i>PKP2</i>	CTGTCTTCTTAAACTGAGCCCTTTGTAGG CATGATGCAGT	Мутация K859R (обратный праймер)
<i>PKP2</i>	GGCACAACCTGCCACTATGAAGGTCGCTGG GAAGAGGAAC	Мутация delT (прямой праймер)
<i>PKP2</i>	CGACSTTCATAGTGGCAGTTGTGCCAGCCT TTAGCATGTC	Мутация delT (обратный праймер)
<i>PKP2</i>	CTCACTGATCCATTATGTCAGAGGAACCAT TGCAGATTAC	Мутация V587I (прямой праймер)
<i>PKP2</i>	TAATGGATCAGTGAGTCAATGAGTCCGTC ACATCTTCT	Мутация V587I (обратный праймер)

<i>PKP2</i>	CTCTGCCCGTTACACATTGAACAACATAAT CCAAAACA	Мутация С796R (прямой праймер)
<i>PKP2</i>	GTGTAACGGGCAGAGGCTGTAGTTTCAAT GAGAAGGTCAGTA	Мутация С796R (обратный праймер)
<i>PKP2</i>	ACAGCTCCCAGAAGTCCGTGGAA	Сиквенс (прямой праймер 1)
<i>PKP2</i>	TGCAGCCCGTCACTCAGAACA	Сиквенс (прямой праймер 2)
<i>PKP2</i>	TCCCCTTTTCTGGGTGGCCTGA	Сиквенс (прямой праймер 3)
<i>PKP2</i>	TGGCAGTCGAAGCAGGAAAGTAA	Сиквенс (прямой праймер 4)
<i>PKP2</i>	ACGGCTGACCCCCACGATCT	Сиквенс (обратный праймер 1)
<i>PKP2</i>	TGCTGTGGAAGGAGCTCTGAT	Сиквенс (обратный праймер 2)
<i>PKP2</i>	TGCAGCAGAAATCCTGGATGGCA	Сиквенс (обратный праймер 3)
<i>PKP2</i>	TCTGGCTGGTAATCTGCAATGGTT	Сиквенс (обратный праймер 4)
<i>PKP2</i>	TTCCGGCCGTGAGGTTCTGC	Сиквенс (обратный праймер 5)
-	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC	EF1 α промотор
<i>TRT</i>	GGCAGCGGAAGAGGATGCTGAA	Полуколичественная ПЦР
<i>TRT</i>	GAGGCACCAAGTTGGGCATGAACGA	Полуколичественная ПЦР
<i>NKX2.5</i>	GGCCTCAATCCCTACGGTTA	Полуколичественная ПЦР
<i>NKX2.5</i>	CACGAGAGTCAGGGAGCTGT	Полуколичественная ПЦР
<i>MEF2C</i>	GAACAATCCCGGTGTGTCAGGA	Полуколичественная

		ПЦР
<i>MEF2C</i>	CACCCAGTGGCAGCCTTTTACA	Полуколичественная ПЦР
<i>MHC</i>	GTCATTGCTGAAACCGAGAATG	Полуколичественная ПЦР
<i>MHC</i>	GCAAAGTACTGGATGACACGCT	Полуколичественная ПЦР
<i>MLC2V</i>	GGCGAGTGAACGTGAAAAAT	Полуколичественная ПЦР
<i>MLC2V</i>	CAGCATTTCCCGAACGTAAT	Полуколичественная ПЦР
<i>OCT3/4</i>	GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA	Полуколичественная ПЦР
<i>OCT3/4</i>	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG	Полуколичественная ПЦР
<i>SOX2</i>	AACCCCAAGATGCACAACCTC	Полуколичественная ПЦР
<i>SOX2</i>	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC	Полуколичественная ПЦР
<i>NANOG</i>	CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC	Полуколичественная ПЦР
<i>NANOG</i>	TGGAAGGTTCCCAGTCGGGTTCACC	Полуколичественная ПЦР
<i>GAPDH</i>	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	Полуколичественная ПЦР
<i>GAPDH</i>	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	Полуколичественная ПЦР
<i>KDR</i>	GTGACCAACATGGAGTCGTG	Полуколичественная ПЦР
<i>KDR</i>	TGCTTCACAGAAGACCATGC	Полуколичественная ПЦР
<i>ACTC</i>	GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC	Полуколичественная

		ПЦР
<i>ACTC</i>	AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA	Полуколичественная ПЦР
<i>AFP</i>	AGAACCTGTCACAAGCTGTG	Полуколичественная ПЦР
<i>AFP</i>	GACAGCAAGCTGAGGATGTC	Полуколичественная ПЦР
<i>SOX17</i>	CGCACGGAATTTGAACAGTA	Полуколичественная ПЦР
<i>SOX17</i>	CACACGTCAGGATAGTTGCAG	Полуколичественная ПЦР
<i>NESTIN</i>	CAGCTGGCGCACCTCAAGATG	Полуколичественная ПЦР
<i>NESTIN</i>	AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG	Полуколичественная ПЦР
<i>PAX6</i>	AACAGACACAGCCCTCACAAACA	Полуколичественная ПЦР
<i>PAX6</i>	CGGGAACTTGAAGTGGAACTGAC	Полуколичественная ПЦР
<i>PPARG</i>	AGCCTTCCAACCTCCCTCATGGCA	Количественная ПЦР
<i>PPARG</i>	TCCGGAAGAAACCCTTGCATCCT	Количественная ПЦР
<i>FABP4</i>	GCCAGGAATTTGACGAAGTC	Количественная ПЦР
<i>FABP4</i>	TGGTTGATTTTCCATCCCAT	Количественная ПЦР
<i>OPG</i>	AAACGGCAACACAGCTCACAAAGAA	Количественная ПЦР
<i>OPG</i>	GCACGCTGTTTTACAGAGGTCAA	Количественная ПЦР
<i>OPN</i>	TCACCTGTGCCATACCAGTAAA	Количественная ПЦР
<i>OPN</i>	TGGGTATTTGTTGTAAAGCTGCTT	Количественная ПЦР
<i>PKP2</i>	GCTGCTCCGTCCTTCTGTA	Количественная ПЦР
<i>PKP2</i>	GGAGTGGTAGGCTTTGGCA	Количественная ПЦР
<i>TRT</i>	TTCGACCTGCAGGAGAAGTT	Количественная ПЦР
<i>TRT</i>	GCGGGTCTTGGAGACTTTCT	Количественная ПЦР

<i>AXIN2</i>	AGTGTGAGGTCCACGGAAAC	Количественная ПЦР
<i>AXIN2</i>	CTGGTGCAAAGACATAGCCA	Количественная ПЦР
<i>SOX9</i>	GACGCTGGGCAAGCTCT	Количественная ПЦР
<i>SOX9</i>	GTAATCCGGGTGGTCCTTCT	Количественная ПЦР
<i>NF2</i>	GGGATTTTTGGCCCAAGAGGAATT	Количественная ПЦР
<i>NF2</i>	TGCGTACCAAGCAGTAATTCTCT	Количественная ПЦР
<i>MMP10</i>	GTGAAACAGTTTAGAAGAAAGGACA	Количественная ПЦР
<i>MMP10</i>	GGCAGAATCAACAGCATCTCT	Количественная ПЦР
<i>MMP24</i>	GATTGGAGGAGACACCCACTTTGA	Количественная ПЦР
<i>MMP24</i>	CATGCACAGCCACCAGGAAGA	Количественная ПЦР
<i>GREM1</i>	GGACCCGCCGCACTGACA	Количественная ПЦР
<i>GREM1</i>	CTTCAGCAGCCGGCAGCAG	Количественная ПЦР
<i>HEY1</i>	TGGATCACCTGAAAATGCTG	Количественная ПЦР
<i>HEY1</i>	CGAAATCCCAAACCTCCGATA	Количественная ПЦР
<i>HES1</i>	AGCACAGAAAGTCATCAAAG	Количественная ПЦР
<i>HES1</i>	AGGTGCTTCACTGTCATTTTC	Количественная ПЦР
<i>NOTCH1</i>	GTCAACGCCGTTAGATGACC	Количественная ПЦР
<i>NOTCH1</i>	TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG	Количественная ПЦР
<i>NOTCH3</i>	GGAGCCAATAAGGACATGCAGGAT	Количественная ПЦР
<i>NOTCH3</i>	GGCAAAGTGGTCCAACAGCAGC	Количественная ПЦР
<i>DLL1</i>	CTACTACGGAGAGGGCTGCT	Количественная ПЦР
<i>DLL1</i>	CCAGGGTTGCACACTTTCTC	Количественная ПЦР
<i>SNAI1</i>	CTCTTTCCTCGTCAGGAAGC	Количественная ПЦР
<i>SNAI1</i>	GGCTGCTGGAAGGTAAACTC	Количественная ПЦР
<i>SNAI2</i>	ATGAGGAATCTGGCTGCTGT	Количественная ПЦР
<i>SNAI2</i>	CAGGAGAAAATGCCTTTGGA	Количественная ПЦР
<i>ISL1</i>	GCGGAGTGTAATCAGTATTTGGA	Количественная ПЦР
<i>ISL1</i>	GCATTTGATCCCGTACAACCT	Количественная ПЦР
<i>GATA4</i>	CGACACCCCAATCTCGATATG	Количественная ПЦР
<i>GATA4</i>	GTTGCACAGATAGTGACCCGT	Количественная ПЦР
<i>NKX2.5</i>	CCAAGGACCCTAGAGCCGAA	Количественная ПЦР

<i>NKX2.5</i>	АТАGGCGGGGTAGGCGTTAT	Количественная ПЦР
<i>CCND1</i>	AGACCTTCGTTGCCCTCTGT	Количественная ПЦР
<i>CCND1</i>	AGTTGTTGGGGCTCCTCAG	Количественная ПЦР
<i>ATF2</i>	TCCAGGGGTGCTTTGTAAAC	Количественная ПЦР
<i>ATF2</i>	GCTTCCAGGAATACCTTAGCTG	Количественная ПЦР
<i>MEF2A</i>	ACTACAGACCTCACAGTGCCA	Количественная ПЦР
<i>MEF2A</i>	GCCTAAGCTATTTGCACCAGT	Количественная ПЦР
<i>MEF2C</i>	ССААСТTCGAGATGCCAGTCT	Количественная ПЦР
<i>MEF2C</i>	GTCGATGTGTTACACCAGGAG	Количественная ПЦР
<i>CEBPA</i>	ССТCAGCCTTGTTTGTACTGTATG	Количественная ПЦР
<i>CEBPA</i>	TTTGGAAGCTTGTСATAACTCCG	Количественная ПЦР

Таблица1. Последовательности праймеров, использовавшихся в работе.

Готовые смеси TaqMan, использовавшиеся для проведения ПЦР в режиме реального времени, представлены в таблице 2.

Ген	Микс TaqMan
SMAD6	Hs00178579_m1
STAT1	Hs01013996_m1
STAT6	Hs00598625_m1
TGFBR2	Hs00234253_m1
MMP2	Hs01548727_m1
TIMP1	Hs00171558_m1
TIMP3	Hs00165949_m1

Таблица2. Готовые смеси TaqMan, использовавшиеся в работе.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Идентификация носителей мутаций генов десмосомы среди пациентов с аритмогенной кардиомиопатией

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

У пациентов АКМП1 и АКМП3 и двух здоровых доноров была проведена биопсия жировой ткани. Далее из полученной жировой ткани выделяли первичные культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). У пациента АКМП2 была проведена процедура биопсии миокарда, материал которой послужил в дальнейшем для получения 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, использовавшихся в работе, обобщены в таблице 3.

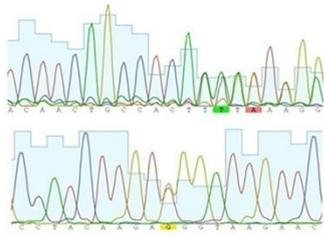
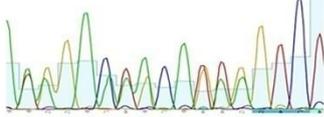
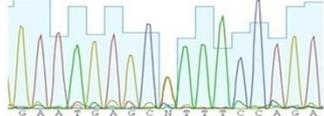
Пациент	Сиквенс	Мутация	Первичная культура клеток
АКМП1		<i>PKP2</i> с.23321delT  <i>PKP2</i> K859R 	ММСК жировой ткани
АКМП2		<i>PKP2</i> с.1521-1536del 	Мезенхимные клетки сердца
АКМП3		<i>DSP</i> H1684R 	ММСК жировой ткани

Таблица 3. Данные о пациентах с АКМП и полученных от них первичных культурах клеток.

Приведены сиквенсы участков, содержащих мутации. Красными прямоугольниками схематично показано положение мутации в кодирующей части гена.

3.2 Выбор экспериментальной модели для изучения патогенеза АКМП

Поскольку основными процессами в ходе прогрессии АКМП является гибель кардиомиоцитов в результате апоптоза, а также появление в миокарде жировой и соединительной ткани (Thiene et al., 1988, Corrado et al., 1997), мы предположили, что эти процессы являются результатом нарушения клеточной дифференцировки, вызванного нарушением регуляции канонического сигнального пути Wnt. Канонический сигнальный путь Wnt является одним из ключевых путей, регулирующих переключение между мышечной (кардиогенной) и адипоцитарной дифференцировкой (Ross et al., 2000). Появление жировой ткани в миокарде может являться следствием активации адипогенной дифференцировки клеток миокарда. В свою очередь, в результате нарушения кардиогенной дифференцировки резидентных стволовых клеток может происходить формирование популяции клеток соединительной ткани.

Для воспроизведения процессов дифференцировки в культуре мы остановились на трёх клеточных моделях. Для моделирования процесса кардиогенной дифференцировки нами были выбраны индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), способные к дифференцировке в направлении кардиомиоцитов с достаточно высокой эффективностью. Иммуортилизованная линия кардиомиоцитов мыши HL-1 использовалась для характеристики экспрессии мутантных форм *PKP2* с лентивирусных конструкций и оценки морфологических изменений ультраструктуры десмосом при введении в клетки мутантных форм *PKP2*. Культуры ММСК жировой ткани и мезенхимных клеток сердца были выбраны для оценки активности сигнального пути Wnt в первичных клеточных культурах, а также для воспроизведения адипогенной дифференцировки, поскольку существующие протоколы позволяют осуществлять дифференцировку ММСК в адипоциты с высокой эффективностью. В то же время, дифференцировка ММСК в направлении кардиомиоцитов не является эффективной и приводит лишь к увеличению экспрессии некоторых кардиоспецифичных генов. Привлекательной моделью кардиогенной дифференцировки представляется культура клеток-предшественниц кардиомиоцитов, популяции клеток миокарда, или культура

клеток субэпикардальной жировой ткани. Эти клетки экспрессируют кардиоспецифичные маркеры, характерные для ранних стадий спецификации кардиомиоцитов, что позволяет сделать предположение о том, что эти клетки коммитированны к дифференцировке в направлении кардиомиоцитов. Однако дифференцировка выделенных нами культур клеток миокарда приводила к формированию кадиомиоцит-подобных клеток, не обладающими всеми характеристиками кардиомиоцитов. Таким образом, эта модель нами далее не использовалась.

3.3 Получение и характеристика первичных клеточных культур

3.3.1 Получение культуры ММСК жировой ткани

Из биопсии жировой ткани пациентов АКМП1 и АКМП3 и двух здоровых доноров были получены культуры ММСК жировой ткани. Полученные культуры представляли собой однородную популяцию адгезивных клеток, позитивных по характерным для ММСК маркерам: CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 и негативных по гематопозитическим маркерам CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117. Гистограммы, показывающее отсутствие или наличие основных маркеров представлены на рис. 9.

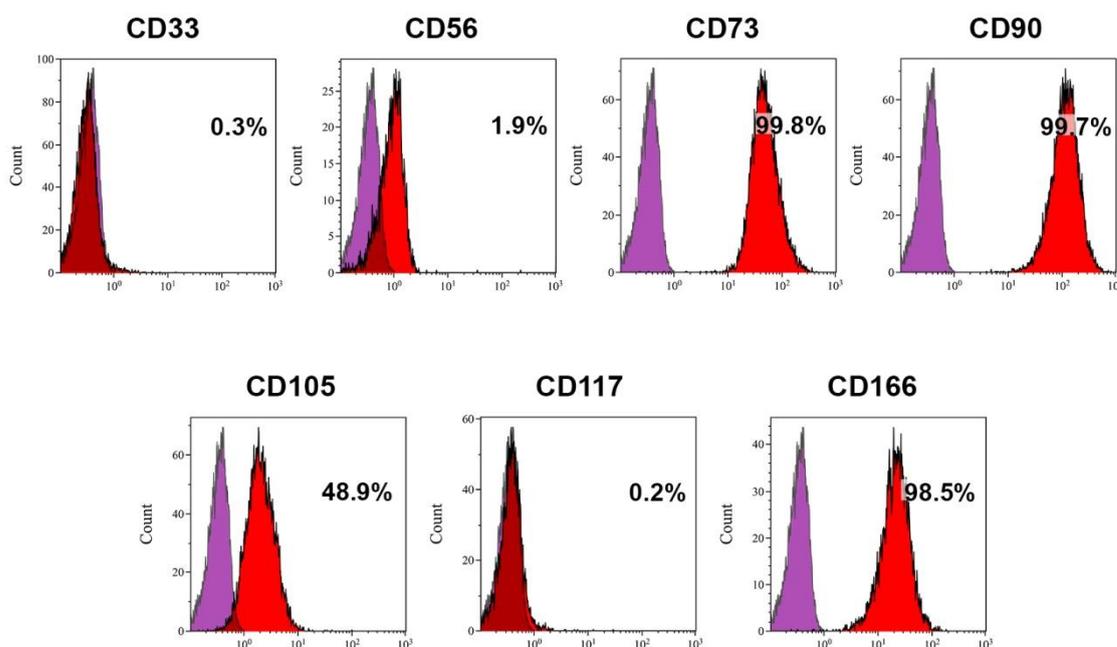


Рис. 9. Характеристика поверхностных маркеров ММСК

Красным цветом представлена популяция ММСК, окрашенная специфическими антителами, сиреневым – изотипический контроль.

ММСК служили источником для получения ИПСК. Кроме того, ММСК жировой ткани использовали далее для оценки активности сигнального пути Wnt в недифференцированных ММСК и ММСК, дифференцированных в адипогенном направлении.

3.3.2 Получение культуры мезенхимных клеток сердца

Культуры мезенхимных клеток сердца выделяли из биопсийного материала миокарда пациента АКМП2 и здорового донора, используя метод ферментативной диссоциации (Smits et al., 2009). Полученные культуры представляли собой неоднородную популяцию быстропролиферирующих адгезивных клеток. Иммунофенотипирование культур мезенхимных клеток сердца показало, что эти клетки позитивны по маркерам, характерным для ММСК: CD73, CD90, CD105, CD166 негативны по гематопозитическим маркерам CD33, CD56, CD117, а также негативны по CD146, белку, участвующему в клеточной адгезии. Гистограммы, показывающее отсутствие или наличие основных маркеров представлены на рис. 10.

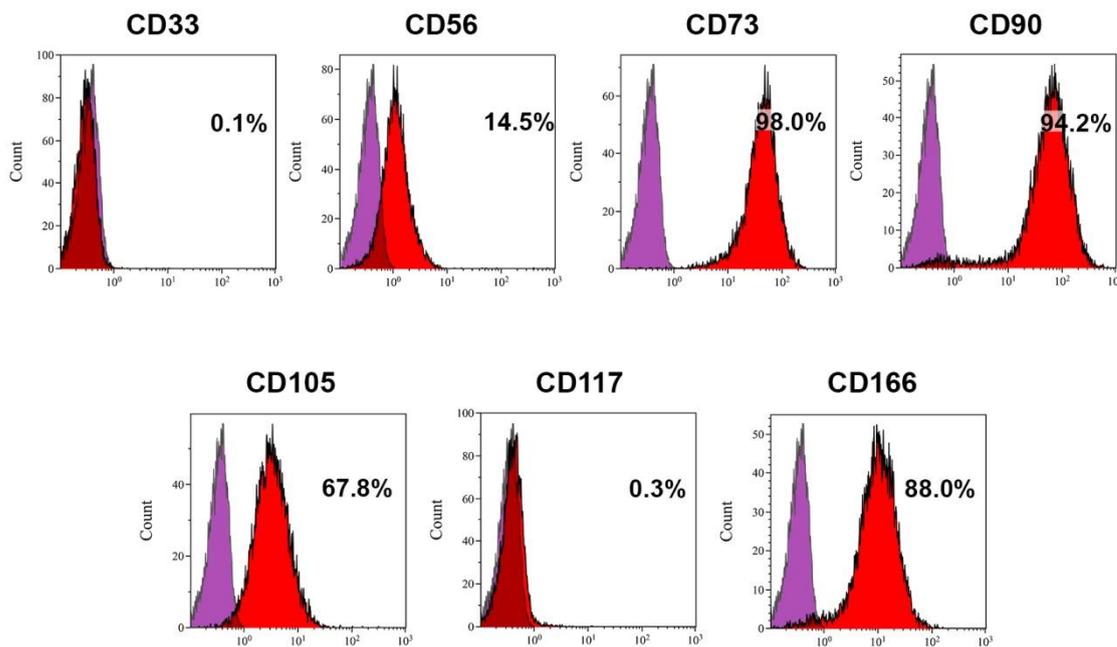


Рис. 10. Характеристика поверхностных маркеров мезенхимных клеток сердца.

Красным цветом представлена популяция мезенхимных клеток сердца, окрашенная специфическими антителами, сиреневым – изотипический контроль.

Также нам не удалось выявить экспрессию маркеров, характерных для описанных в литературе популяций клеток-предшественников кардиомиоцитов, таких как SKIT, ISL1 и Sca-1.

Для оценки дифференцировочного потенциала в культурах мезенхимных клеток сердца индуцировали кардиогенную, адипогенную и остеогенную дифференцировки. В результате кардиогенной дифференцировки увеличивалась экспрессия некоторых кардиоспецифичных маркеров: α -актинин, тропонин I, тропонин T, MEF2C (рис. 11).

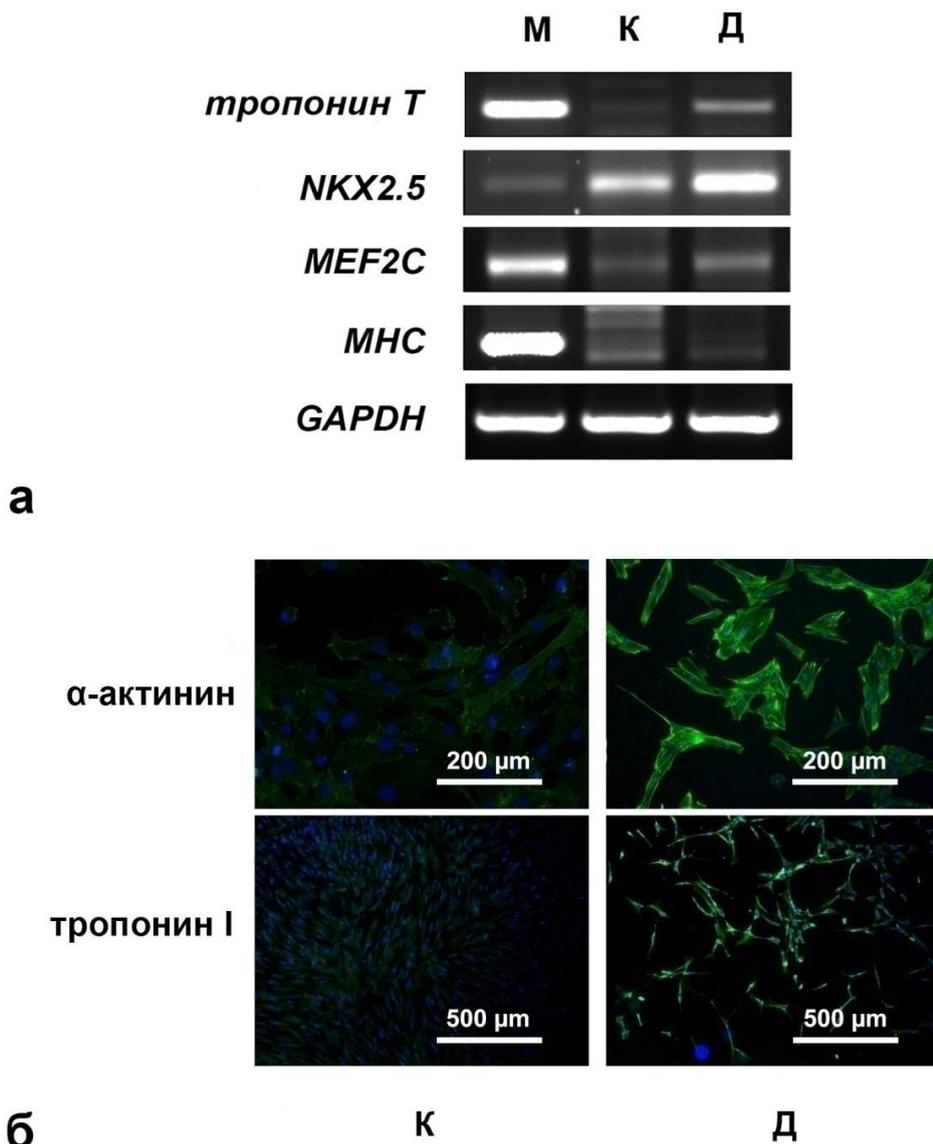


Рис. 11. Дифференцировка мезенхимных клеток сердца в кардиогенном направлении.

а – экспрессия маркеров кардиогенной дифференцировки на уровне мРНК.; *б* – иммуноцитохимическая окраска дифференцированных мезенхимных клеток сердца; К1, К2 – недифференцированные клетки, Д1, Д2 –клетки, дифференцированные кардиогенном направлении (24 сутки диффеернцировки); М – миокард человека.

Тем не менее, дифференцированные клетки не экспрессировали тяжёлые цепи миозина, в них отсутствовала поперечная исчерченность, характерная для сократительного аппарата кардиомиоцитов, и не наблюдались спонтанные сокращения. Индукция адипогенной дифференцировки приводила к увеличению экспрессии специфических маркеров жировой дифференцировки — *PPARG*, *FABP4* на уровне мРНК (рис. 12, а, б) и способствовала накоплению жировых капель в цитоплазме клеток. Индукция остеогенной дифференцировки вызывала увеличение экспрессии специфических маркеров остеогенеза — *OPN* и *OPG* на уровне мРНК (рис. 12, в, г).

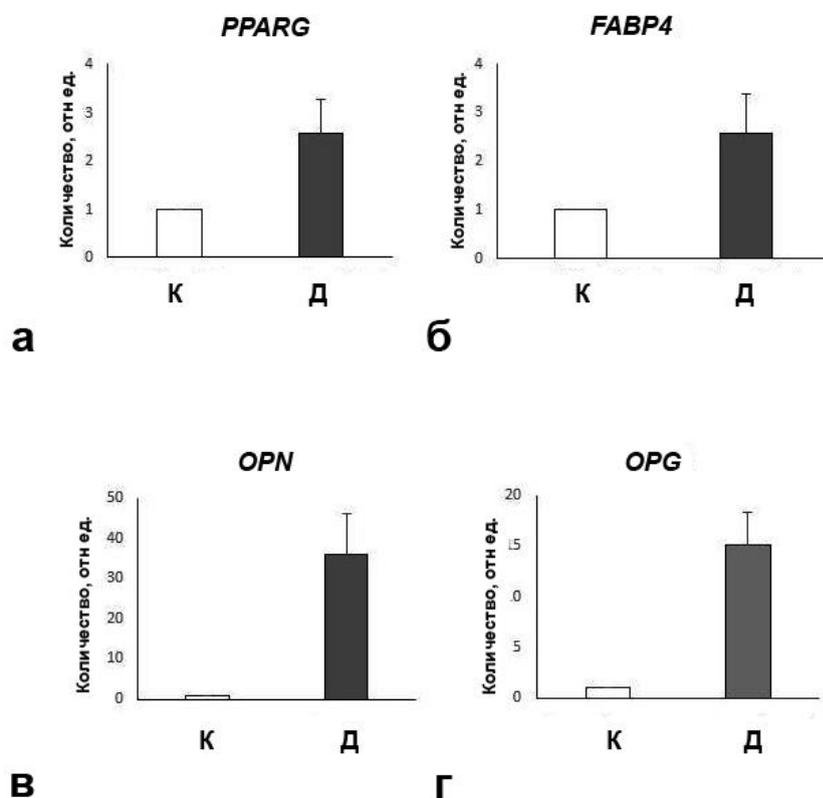


Рис. 12. Экспрессия маркеров адипогенной и остеогенной дифференцировки мезенхимными клетками сердца.

а, б – экспрессия маркеров адипогенной дифференцировки на уровне мРНК; в, г – экспрессия маркеров остеогенной дифференцировки на уровне мРНК. К – недифференцированные клетки, Д – клетки, дифференцированные в адипогенном или остеогенном направлении.

В совокупности, полученные нами данные свидетельствуют о мультипотентности мезенхимных клеток сердца. Мезенхимные клетки сердца служили источником для

получения иПСК. Кроме того, их также как и ММСК использовали для оценки активности сигнального пути Wnt в первичных культурах клеток.

Таким образом, мы получили и охарактеризовали культуры ММСК жировой ткани и мезенхимных клеток сердца от пациентов с АКМП и здоровых доноров.

3.4 Получение и дифференцировка линий иПСК

3.4.1 Получение и характеристика линий иПСК

Следующий этап работы был посвящён получению и характеристике линий иПСК, поскольку эти клетки несут все изменения генома, присутствующие у пациента, и способны дифференцироваться в направлении кардиомицитов с большей эффективностью по сравнению с ММСК или мезенхимными клетками сердца.

иПСК получали путём репрограммирования первичной культуры клеток от пациентов с АКМП и трёх здоровых доноров. Репрограммирование осуществляли путём трансдукции клеток первичной культуры вирусами Сендай. Особенность этих вирусов состоит в том, что они являются РНК-вирусами, не встраивают свой генетический материал в ДНК клетки и элиминируются в течение месяца после трансдукции. Использование этих вирусов позволило избежать неконтролируемого встраивания трансгенов в геном клетки и их последующего влияния на дифференцировочную способность полученных линий иПСК.

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 ЭСК морфологические характеристики (рис. 13, *а*) и демонстрировали позитивную окраску на щелочную фосфатазу (рис. 13, *б*). Эндогенная экспрессия транскрипционных факторов – основных регуляторов плюрипотентности OCT3/4, NANOG, SOX2 была подтверждена методом ОТ-ПЦР (рис. 13, *в*).

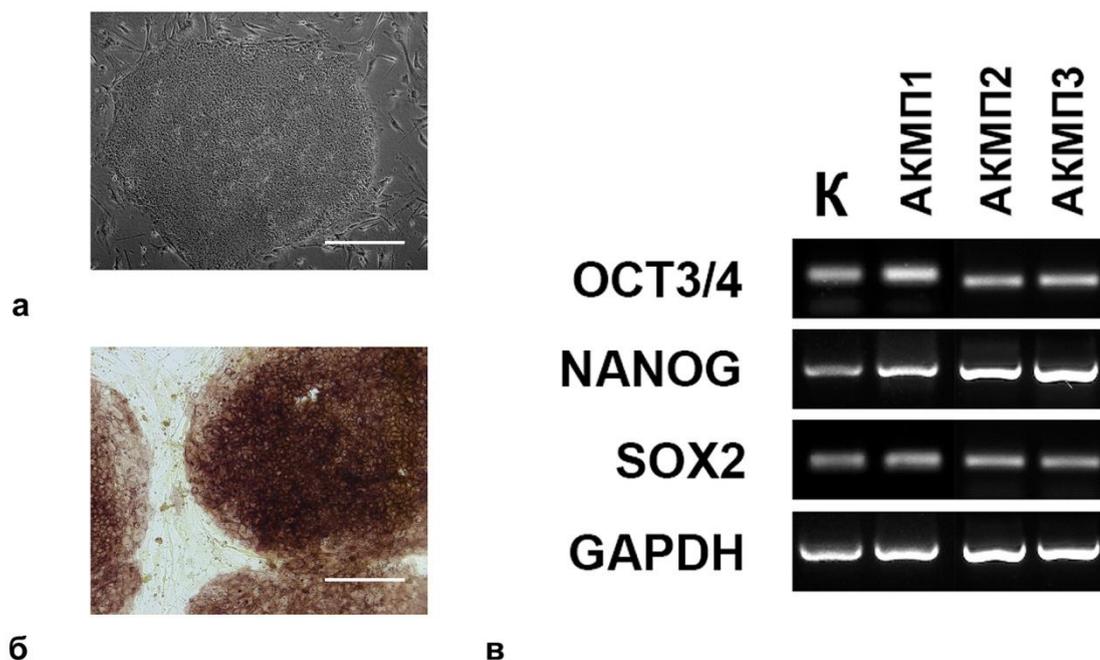


Рис. 13. Характеристика линий иПСК.

а – внешний вид колонии иПСК; *б* – окраска колоний иПСК на щелочную фосфатазу; *в* – анализ экспрессии основных маркеров плюрипотентности. К – контрольные линии иПСК, АКМП1-3 – линии иПСК, полученные от пациентов с АКМП. Длина масштабной линейки 200 мкм.

Также полученные иПСК демонстрировали ядерную локализацию транскрипционных факторов OCT3/4 и NANOG, и наличие поверхностных маркеров TRA-1-60 и TRA-1-81 (рис. 14).

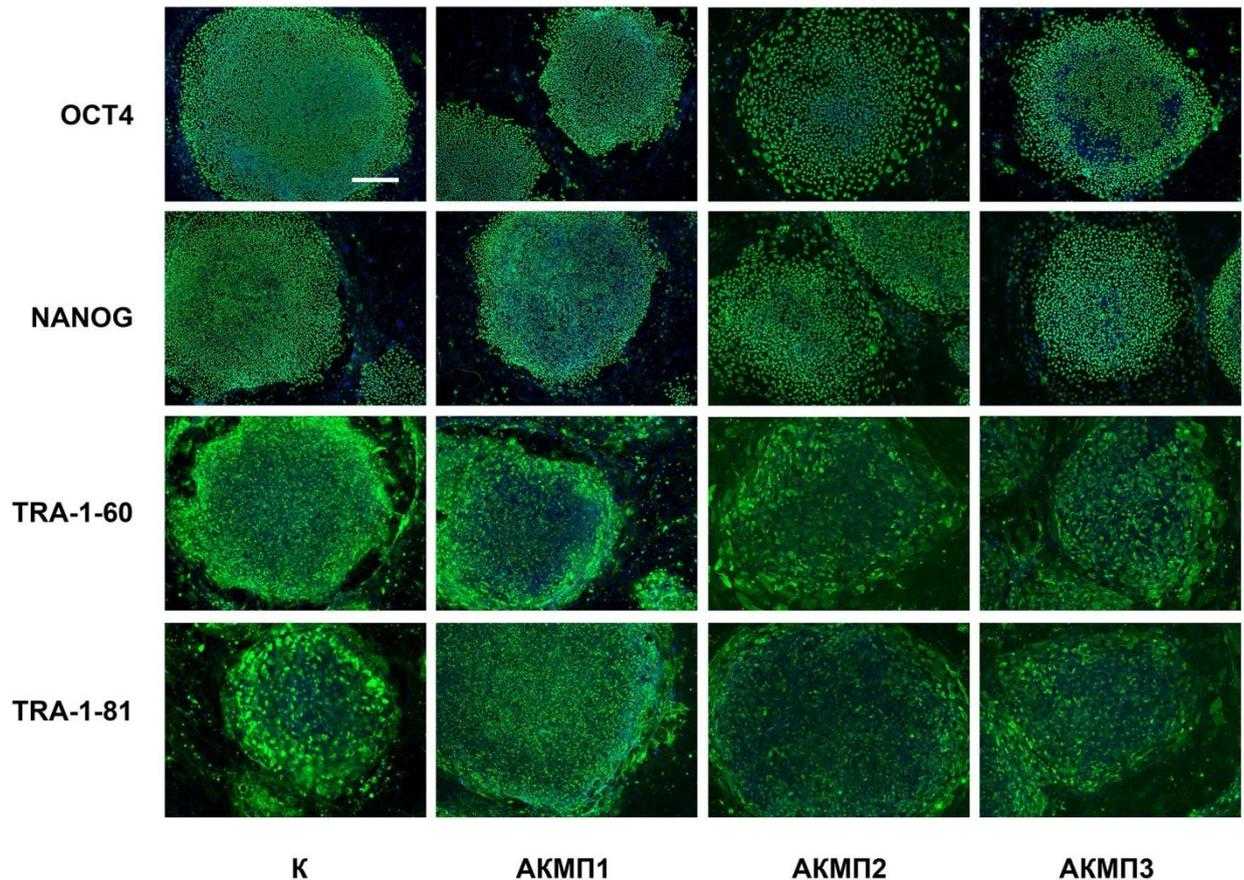


Рис. 14. Характеристика линий иПСК.

Иммуноцитохимическая окраска линий иПСК. К – контрольные линии иПСК, АКМП1-3 – линии иПСК, полученные от пациентов с АКМП. Длина масштабной линейки 300 мкм.

Помимо этого, была проведена оценка плюрипотентности *in vivo* и *in vitro* двух линий иПСК — контрольной линии от здорового донора и линии от пациента АКМП1. Инъекция иПСК иммунодефицитным мышам линии nude приводила к образованию тератом. Гистохимический анализ тератом показал, что они содержат ткани-производные трёх зародышевых листков – эктодермы (многослойный эпителий, пигментные клетки), мезодермы (хрящ, рыхлая соединительная ткань) и энтодермы (кишечный эпителий) (рис. 15).

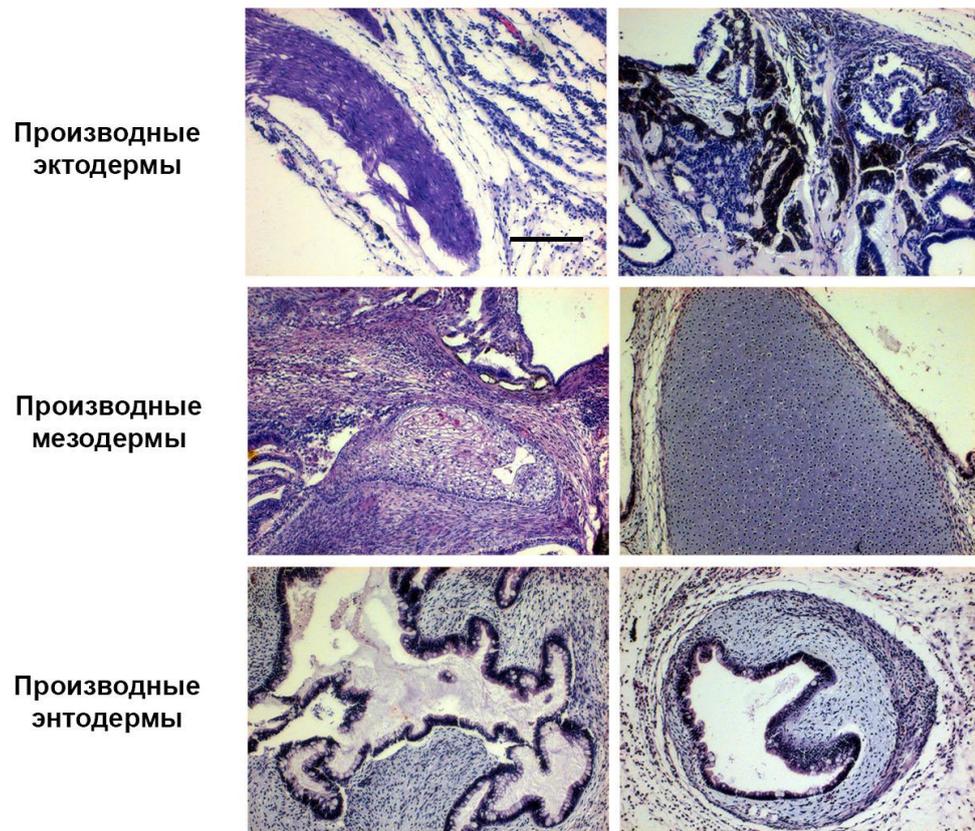
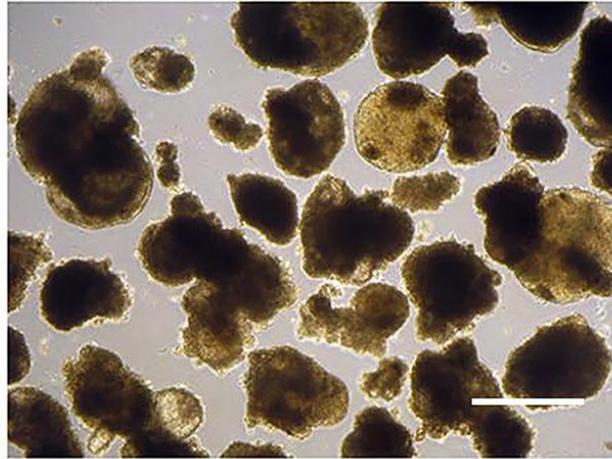


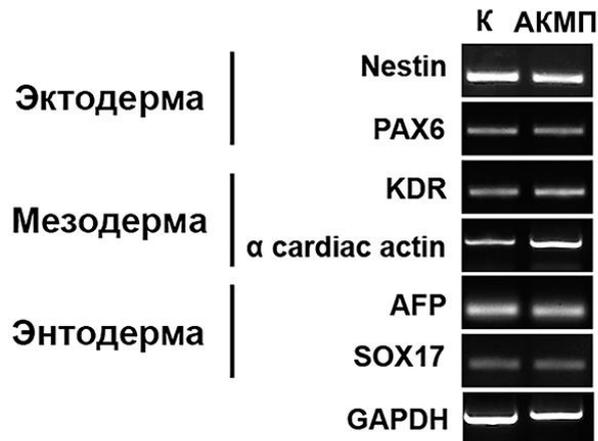
Рис. 15. Оценка плюрипотентности полученных линий иПСК *in vivo*.

Окраска срезов тератом, образованных иПСК гематоксилин-эозином. Длина масштабной линейки 200 мкм.

иПСК дифференцированные *in vitro*, путём формирования эмбриоидных тел (рис. 16, *a*), экспрессировали маркеры трёх зародышевых листков на уровне мРНК – эктодермы (Nestin, PAX6), мезодермы (KDR, α cardiac actin) и энтодермы (AFP, SOX17), что подтверждалось с помощью ОТ-ПЦР (рис. 16, *б*).



а



б

Рис. 16. Оценка плюрипотентности полученных линий iPСК in vitro.

а – внешний вид эмбриоидных тел сформированных iPСК; *б* – экспрессия эмбриоидными телами тканеспецифичных генов на уровне мРНК. К – контрольная линия iPСК, АКМП – линии iPСК, полученная от пациента АКМП1. Длина масштабной линейки 200 мкм.

Таким образом, полученные линии iPСК являются плюрипотентными и могут использоваться для моделирования аритмогенной кардиомиопатии.

3.4.2 Дифференцировка iPСК в направлении кардиомиоцитов

Дифференцировку полученных линий iPСК в кардиомиоциты осуществляли с помощью сокультивирования их с клетками мышечной энтодермальной линии END-2 (Mummeу et al., 2003). В ходе дифференцировки из колоний iPСК формировались

трёхмерные клеточные агрегаты, которые, начиная с 14 дня дифференцировки, начинали спонтанно сокращаться. Агрегаты клеток содержали в своём составе дифференцированные кардиомиоциты, позитивные по основному маркеру кардиомиоцитов – тропонину Т (рис. 17).

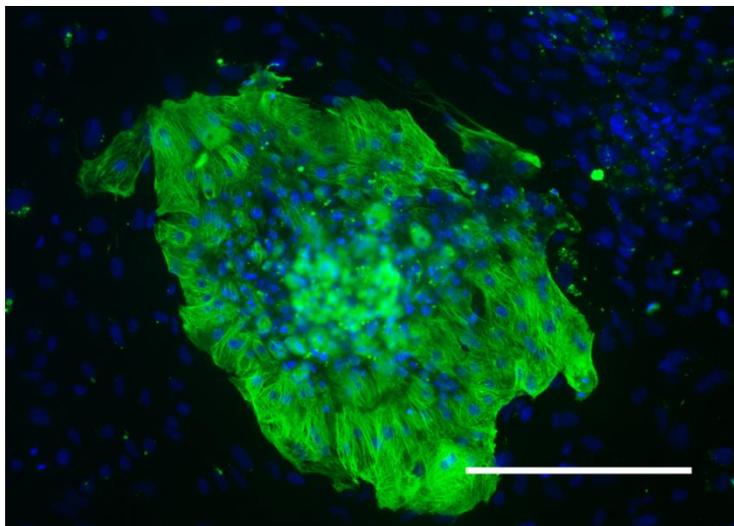


Рис. 17. Кластер дифференцированных из иПСК кардиомиоцитов, окрашенных на тропонин Т.

Длина масштабной линейки 150 мкм.

Полученные в результате дифференцировки двух линий иПСК от здорового донора кардиомиоциты экспрессировали сердечные изоформы тропомиозина и тропонина Т, образующие характерную поперечную исчерченность, α -актинин, десмин (рис. 18, а).

Также в ходе 24 суток дифференцировки наблюдали экспрессию ряда кардиоспецифичных генов на уровне мРНК (рис.18, б). Свою экспрессию до уровня, сопоставимого с уровнем экспрессии этих генов в миокарде, увеличивали тропонин Т, *MEF2C*, миозин (тяжёлые и лёгкие цепи). В дифференцированных кардиомиоцитах из иПСК, в отличие от миокарда, присутствовала экспрессия транскрипционного фактора *NKX2.5*, что указывает на определённую степень незрелости кардиомиоцитов.

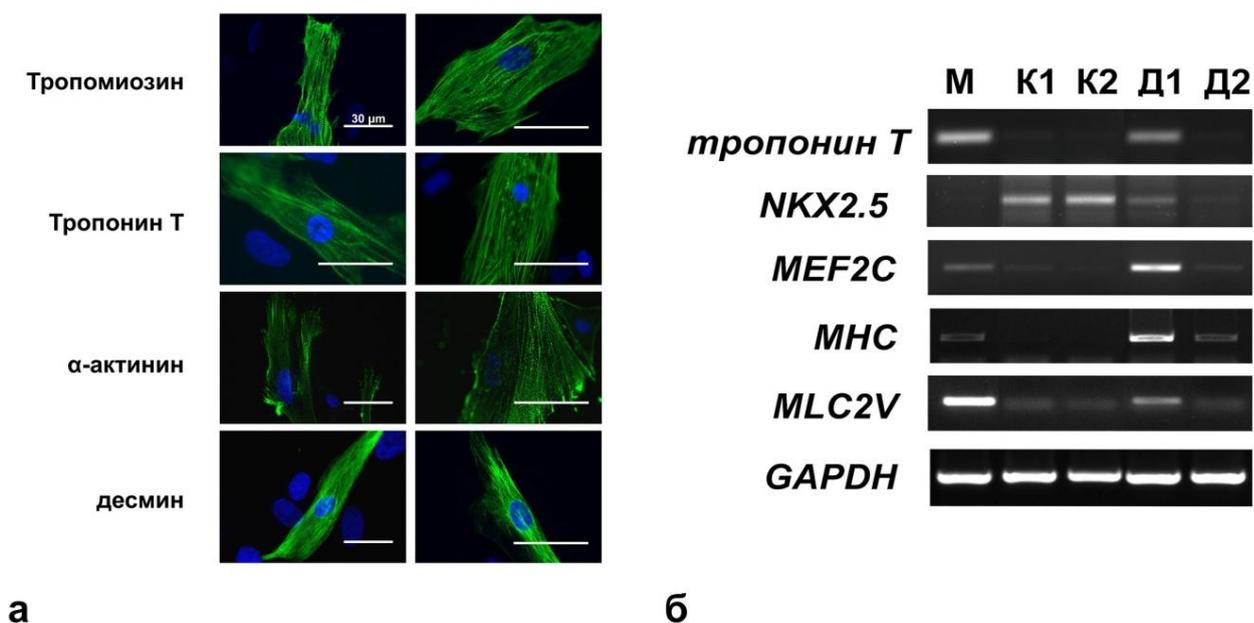


Рис. 18. Характеристика кардиомиоцитов, полученных из иПСК.

а – иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов (24 сутки дифференцировки); *б* – экспрессия маркеров кардиодифференцировки на уровне мРНК (24 сутки дифференцировки). 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.

3.5 Характеристика кардиомиоцитов, полученных от пациентов с АКМП

Получив дифференцированные кардиомиоциты от пациентов с АКМП мы решили оценить, насколько они способны воспроизводить морфологические признаки сердечной ткани пациентов, исследовать, влияют ли мутации гена *PKP2* на его экспрессию и экспрессию других генов десмосом, на экспрессию и внутриклеточную локализацию β-катенина, ключевого участника сигнального пути Wnt, а также различается ли эффективность кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП и контрольных линий иПСК.

3.5.1 Характеристика дифференцированных кардиомиоцитов пациента АКМП1

В дифференцированных кардиомиоцитах, полученных от пациента АКМП1, плакофиллин-2 был локализован в районе межклеточных контактов (рис.19, *а*). Уровень плакофиллина-2 в кардиомиоцитах, полученных в результате дифференцировки iPSC от пациента АКМП1, был существенно ниже, чем в контроле (рис.19).

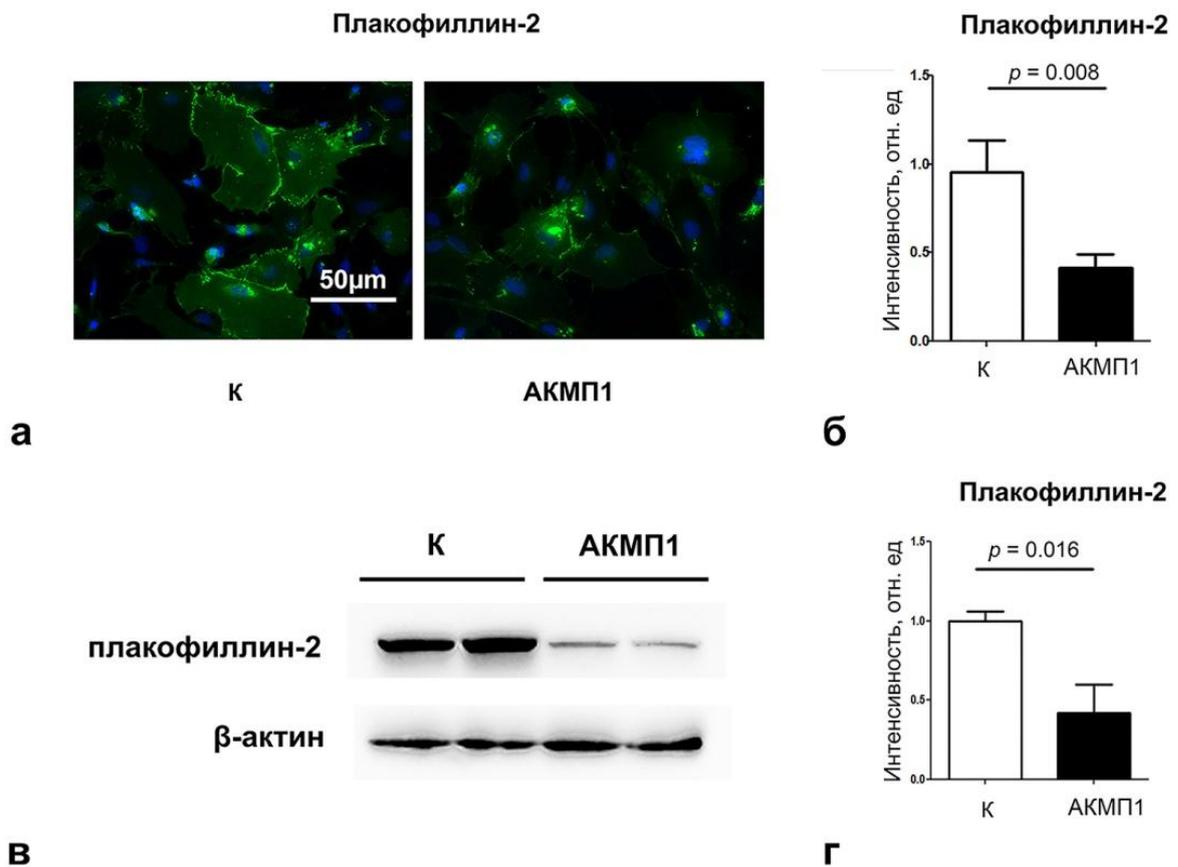


Рис. 19. Локализация и уровень плакофиллина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКМП1.

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 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 концентрации в районе ядра обнаружено не было (рис. 20, *a*), уровень плакоглобина в дифференцированных кардиомиоцитах АКМП1 не отличался от контроля (рис. 20, *б*, *в*).

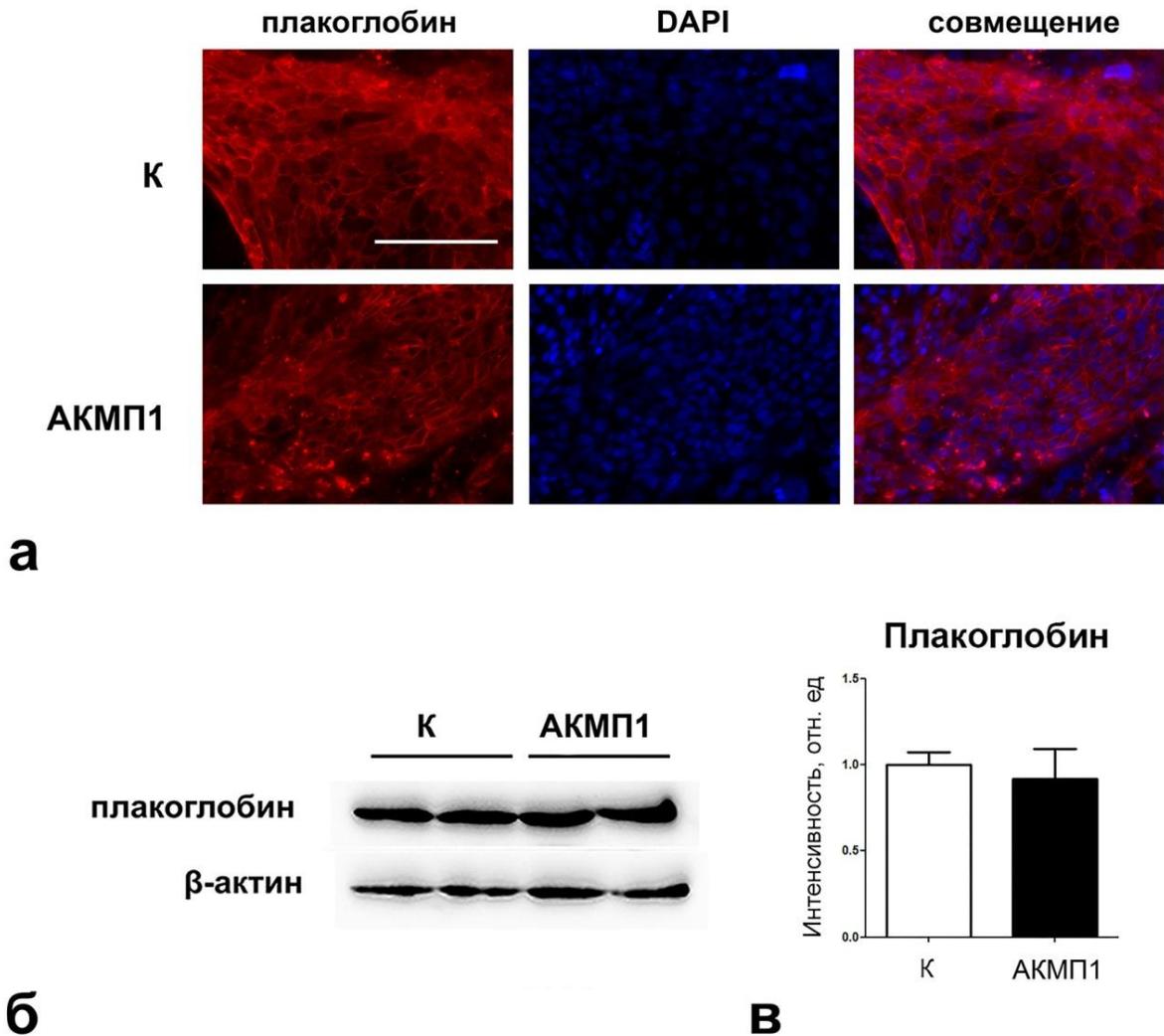


Рис. 20. Локализация и уровень плакоглобина в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКМП1.

a – иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов; *б* – идентификация плакоглобина в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноблоттинга; *в* – результат измерения интенсивности бэндов, соответствующих плакоглобину. Длина масштабной линейки 150 мкм.

Помино плакоглобина мы оценили уровень другого белка десмосом – десмоглеина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах. Было идентифицировано две изоформы десмоглеина – низкомолекулярная (1) и высокомолекулярная (2) с молекулярными массами около 75 и 150 КДа соответственно. В дифференцированных кардиомиоцитах пациента АКМП1 наблюдали некоторое повышение уровня низкомолекулярной изоформы десмоглеина (рис. 21).



Рис. 21. Уровень десмоглеина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКМП1.

а – идентификация десмоглеина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноблоттинга; *б*, *в* – результат измерения интенсивности бэндов, соответствующих изоформам 1 и 2 десмоглеина-2 соответственно.

Изменение межклеточных контактов, вследствие сниженного уровня плакофиллина-2 в составе десмосом, может затрагивать β -катенин, ассоциированный с адгезионными контактами, ядерная транслокация которого способна влиять на активность сигнального пути Wnt (Oxford et al., 2014). Нами была выполнена оценка уровня и внутриклеточной локализации β -катенина в дифференцированных

низкомолекулярной изоформы десмоглеина-2 был несколько повышен. Внутриклеточная локализация плакоглобина и β -катенина, а также уровень этих белков не был изменён в дифференцированных кардиомиоцитах пациента АКМП1 по сравнению с контролем.

3.5.2 Сравнительная характеристика кардиомиоцитов от пациентов с АКМП

Далее была осуществлена оценка экспрессии *PKP2* в ходе дифференцировки иПСК от пациентов АКМП1-3 по сравнению с контрольными клетками. Экспрессия *PKP2* на уровне мРНК в кардиомиоцитах, полученных от пациента АКМП1, была снижена по сравнению с контролем на 7 сутки дифференцировки иПСК (рис. 23, а), в то время как экспрессия *PKP2* в кардиомиоцитах, полученных от пациентов АКМП2 и АКМП3, не была изменена по сравнению с контролем (рис. 23, б, в).

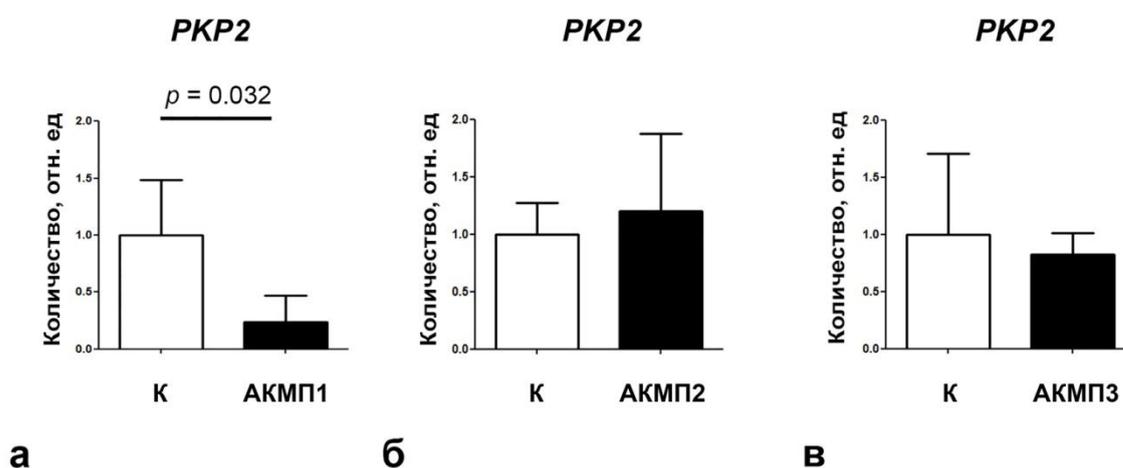


Рис. 23. Экспрессия *PKP2* на уровне мРНК на 7 сутки кардиодифференцировки иПСК от пациентов с АКМП и контрольных линий иПСК.

Иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов от пациентов АКМП1-3 показала, что уровень плакофиллина-2 понижен по сравнению с контролем в кардиомиоцитах пациента АКМП1, в то время как в в кардиомиоцитах пациентов АКМП2 и АКМП3 уровень плакофиллина-2 не изменён по сравнению с контролем (рис. 24). Уровень и локализация плакоглобина и β -катенина в дифференцированных кардиомиоцитах пациентов с АКМП не были изменены по сравнению с контролем (рис. 24).

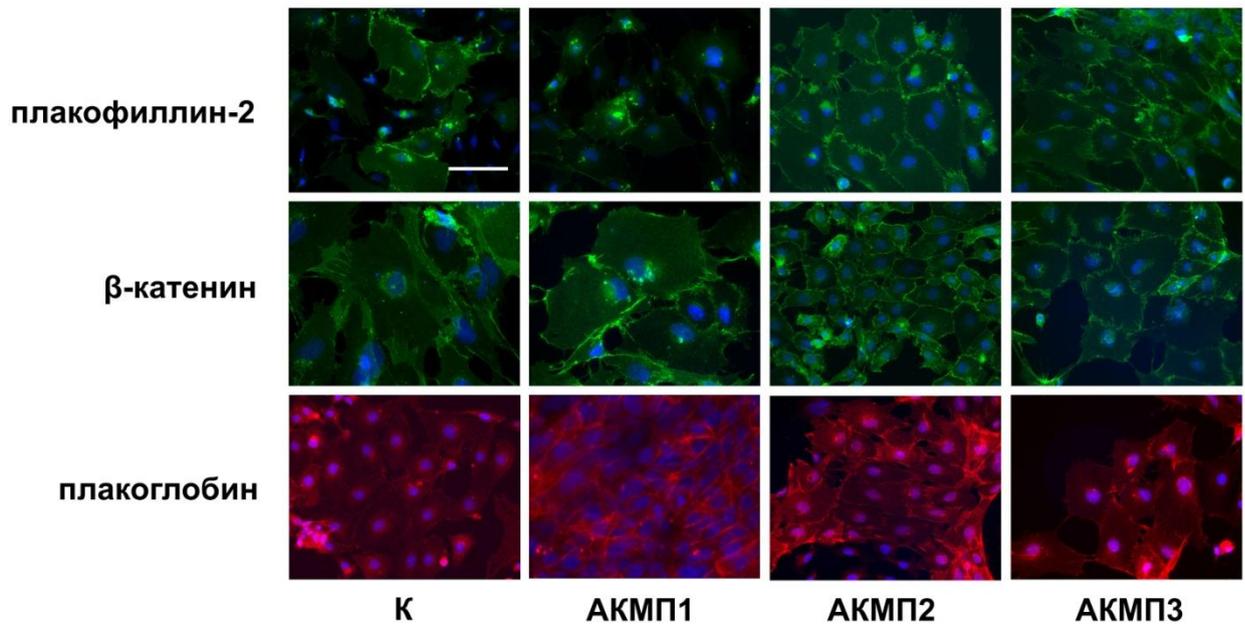


Рис. 24. Характеристика кардиомиоцитов, полученных из иПСК от пациентов с АКМП.

Длина масштабной линейки 50 мкм.

Для изучения эффективности кардиогенной дифференцировки иПСК, мы оценили уровень экспрессии белка саркомера тропонина Т. Тропонин Т является общепринятым маркером кардиогенной дифференцировки, количество этого белка или экспрессия соответствующего гена пропорциональна количеству и степени дифференцировки кардиомиоцитов.

Экспрессия тропонина Т на уровне мРНК не различалась между линиями иПСК от пациентов АКМП1-3 и контрольными линиями на 7 сутки дифференцировки иПСК (рис. 25).

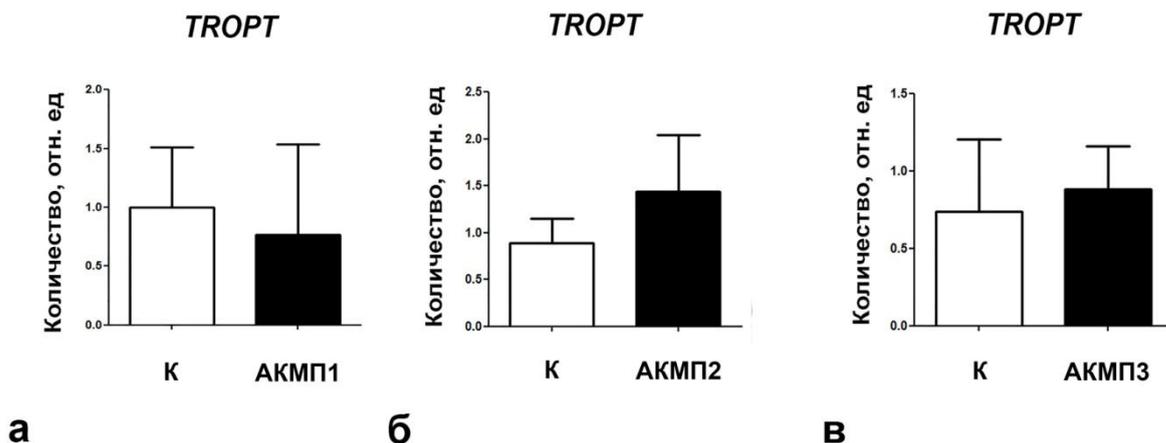


Рис. 25. Экспрессия тропонина Т на уровне мРНК на 7 сутки кардиодифференцировки и ПСК от пациентов с АКМП и контрольных линий и ПСК.

Таким образом, можно заключить, что процесс кардиогенной дифференцировки линий и ПСК от пациентов с АКМП не нарушен.

3.6 Изучение активности канонического сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки и ПСК

Основой настоящего исследования являлось предположение о том, что мутации гена *PKP2* могут приводить к изменению активности сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки. Для проверки этого предположения 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 и ПСК.

В ходе дифференцировки и ПСК наблюдали характерное изменение активности люциферазного репортера. На 7 сутки дифференцировки происходила активация репортера в дифференцирующихся клетках по сравнению с и ПСК, которая затем сменялась постепенным снижением активности репортера. Активность репортера в дифференцированных кардиомиоцитах была в 3.8 ± 2.0 раза ниже, чем в недифференцированных и ПСК.

Линии, полученные от пациента с АКМП1, имели пониженный уровень активности репортера с 7 по 24 сутки кардиодифференцировки по сравнению с контрольными линиями и ПСК (рис. 26).

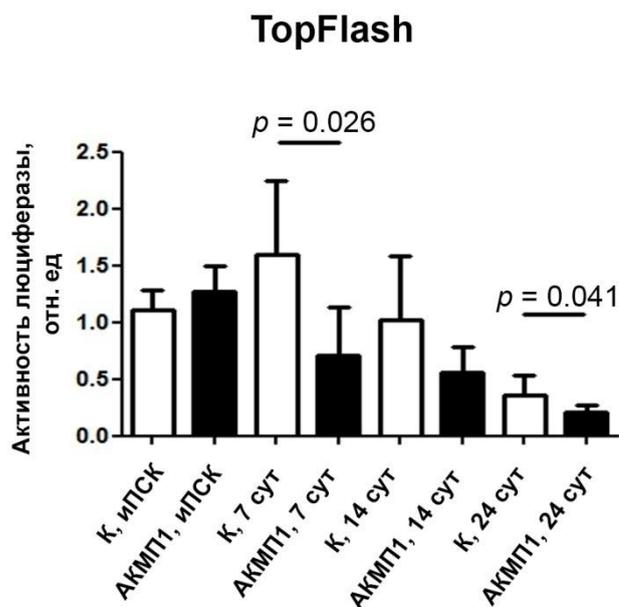


Рис. 26. Активность канонического сигнального пути Wnt в ходе кардиодифференцировки иПСК от пациента АКМП1.

Далее точка 7 суток кардиогенной дифференцировки была выбрана в качестве наиболее информативной для оценки активности сигнального пути Wnt. На 7 сутки дифференцировки 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.26, *д*), также как и экспрессия генов-мишеней сигнального пути Wnt (рис. 27, *е-з*). Активность люциферазного репортера и экспрессия генов-мишеней сигнального пути Wnt на 7 сутки дифференцировки иПСК АКМП3 была несколько понижена (рис. 27, *и-м*).

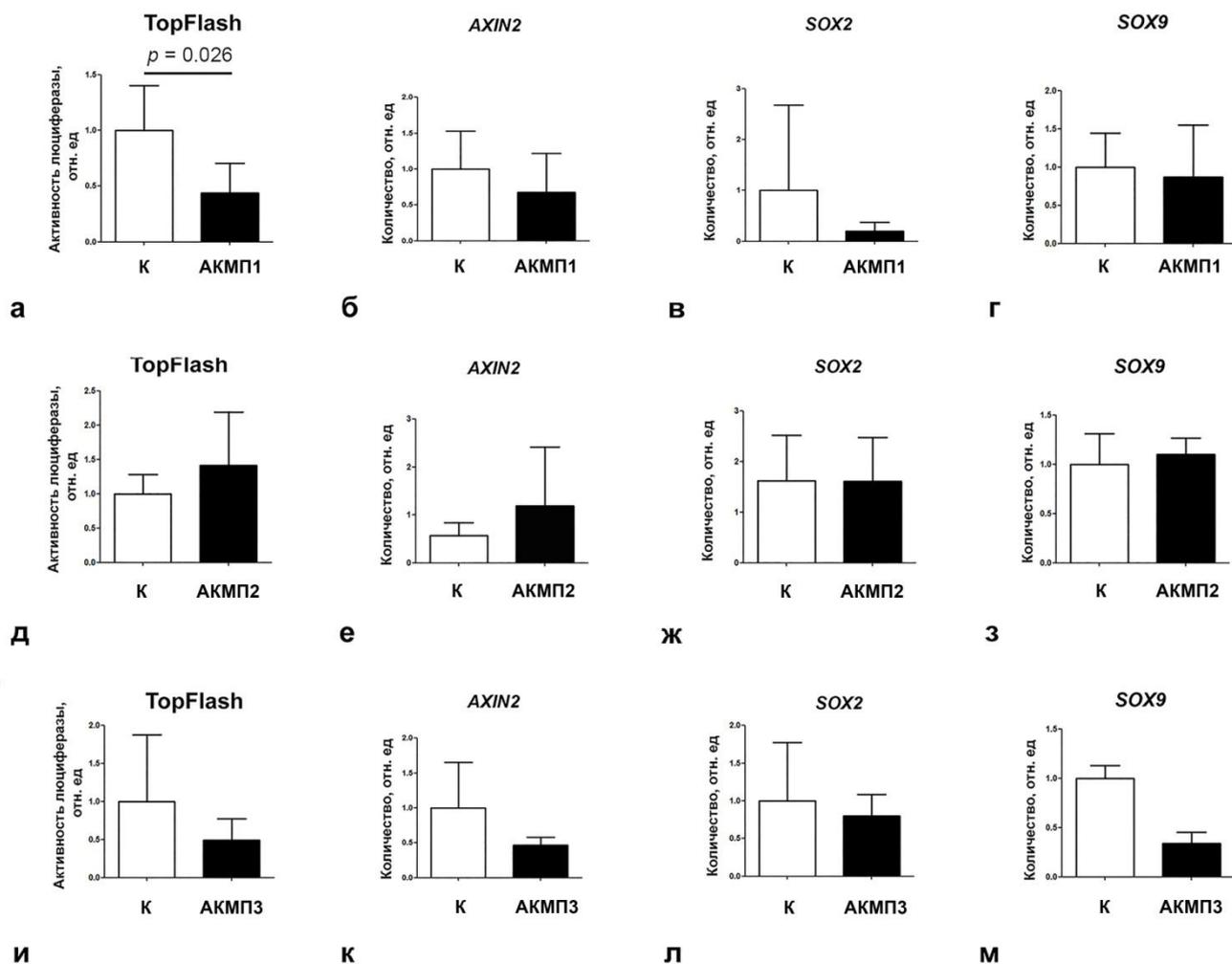


Рис. 27. Активность канонического сигнального пути Wnt на 7 сутки кардиогенной дифференцировки и ПСК от пациентов с АКМП.

а, д, и – активность люциферазного репортера TopFlash на 7 сутки кардиогенной дифференцировки и ПСК; *б, е, и* – экспрессия гена *AXIN2* на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки и ПСК; *в, ж, л* – экспрессия гена *SOX2* на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки и ПСК; *г, з, м* – экспрессия гена *SOX9* на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки и ПСК.

Таким образом, активность сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки и ПСК от пациентов АКМП1 и АКМП3 была снижена, тогда как активность этого сигнального пути в ходе дифференцировки и ПСК, полученных от пациентов АКМП2, не была снижена по сравнению с контрольными линиями.

3.7 Поиск потенциальных мишеней сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП

Для поиска потенциальных мишеней, изменяющих свою экспрессию в результате сниженной активности сигнального пути Wnt, а также для определения новых сигнальных путей, играющих роль в развитии АКМП, мы оценили экспрессию 26 генов, являющихся участниками или мишенями различных сигнальных путей. (Wnt, Notch, Hippo, TGF β , MAPK, IFN γ) и регулирующих различные клеточные процессы (клеточный цикл, эпителиально-мезенхимный переход, развитие фиброза, ранняя спецификация кардиомиоцитов) на 7 сутки кардиогенной дифференцировки линий иПСК от пациента АКМП1 и контрольных линий иПСК. Список генов и соответствующих сигнальных путей представлен в таблице 4.

Ген	Сигнальный путь/Процесс	Изменение экспрессии (АКМП1)
<i>TIMP1</i>	EMT, фиброз	нет
<i>TIMP3</i>	фиброз	нет
<i>TGFBR1</i>	TGF β , фиброз	нет
<i>STAT1</i>	IFN γ , фиброз	нет
<i>SMAD6</i>	TGF β , фиброз	нет
<i>MMP2</i>	EMT, TGF β , Wnt, фиброз	нет
<i>MMP10</i>	фиброз	нет
<i>MMP24</i>	фиброз	нет
<i>GREM1</i>	TGF β , фиброз	нет
<i>HEY1</i>	Notch	повышена
<i>HES1</i>	Notch	повышена
<i>NOTCH1</i>	Notch	нет
<i>NOTCH3</i>	Notch	нет
<i>DLL1</i>	Notch	нет
<i>SNAI1(SNAIL)</i>	EMT, TGF β , фиброз	нет
<i>SNAI2(SLUG)</i>	EMT	нет
<i>NF2</i>	Hippo	повышена

<i>ISL1</i>	Wnt, кардио ТФ	понижена
<i>GATA4</i>	кардио ТФ	нет
<i>NKX2.5</i>	кардио ТФ	нет
<i>CCND1</i>	MAPK, Wnt, Notch, клеточный цикл	нет
<i>ATF2</i>	MAPK	нет
<i>MEF2A</i>	MAPK	нет
<i>MEF2C</i>	MAPK, кардио ТФ	понижена
<i>CEBPA</i>	ISP, PPAR γ , адиподифференцировка	нет
<i>FABP4(aP2)</i>	PPAR γ , адиподифференцировка	нет

Таблица 4. Список генов, экспрессия которых была изучена на модели кардиогенной дифференцировки и ПСК от пациентов с АКМП.

На 7 сутки кардиогенной дифференцировки в иПСК от АКМП1 была заметно изменена экспрессия генов *NF2*, *HEY1*, *HES1* на уровне мРНК по сравнению с контрольными кардиомиоцитами. Экспрессия этих генов была затем оценена на 7 сутки кардиогенной дифференцировки и ПСК от пациентов АКМП2 и АКМП3.

В ходе дифференцировки и ПСК от пациентов АКМП1 и АКМП2 экспрессия гена *NF2*, участника сигнального пути Hippo, была повышена по сравнению с контролем (рис. 28, а, б).

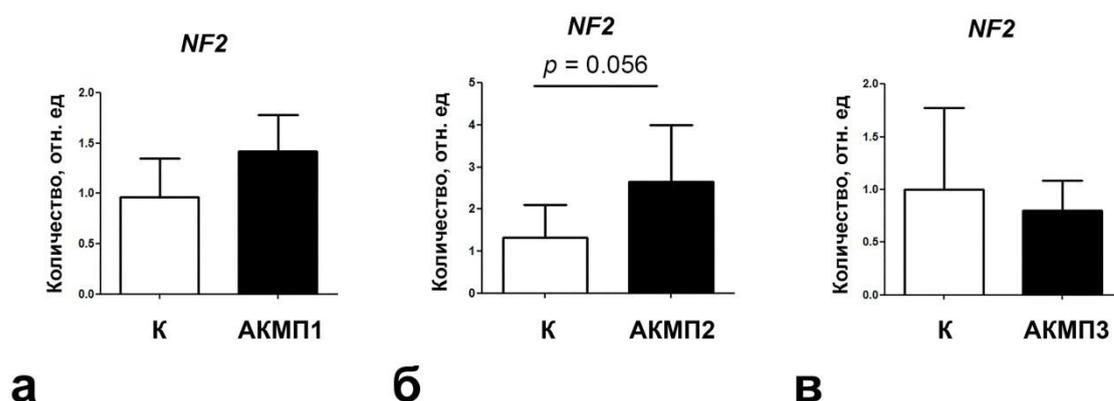


Рис. 28. Экспрессия гена *NF2* на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки и ПСК от пациентов с АКМП.

В ходе кардиогенной дифференцировки и ПСК от пациента АКМП1 и АКМП2 была повышена экспрессия мишеней сигнального пути Notch — генов, кодирующих

транскрипционные факторы *HEY1* и *HES1* (рис. 29, а-г). В ходе дифференцировки иПСК от пациента АКМП3 наблюдали некоторое снижение экспрессии гена *HEY1* (рис. 29, д).

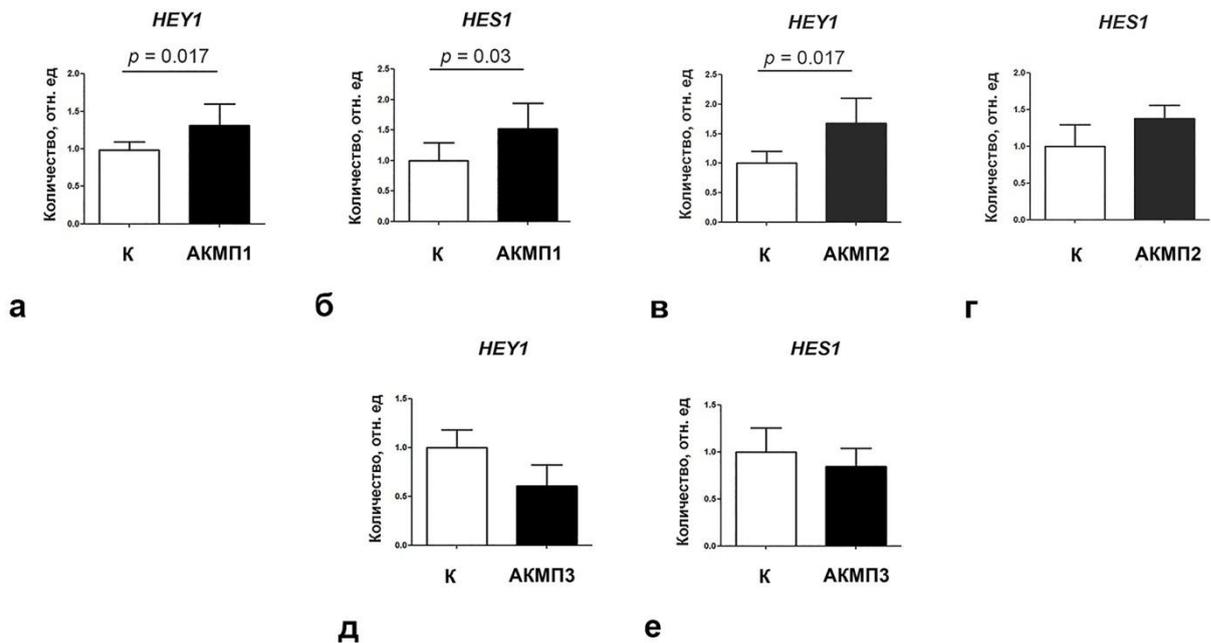


Рис. 29. Экспрессия генов-мишеней сигнального пути Notch *HEY1* и *HES1* на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП.

Помимо вышеописанных генов в ходе дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП имели тенденция к снижению экспрессии на уровне мРНК генов, кодирующих кардиоспецифичные транскрипционные факторы — *ISL1* и *MEF2C*. В ходе дифференцировки иПСК от пациента АКМП1 и АКМП3 была несколько снижена экспрессия генов *ISL1* и *MEF2C* (рис. 30, а, в). В ходе дифференцировки иПСК от пациента АКМП2 была несколько снижена экспрессия гена *ISL1* (рис. 30, б).

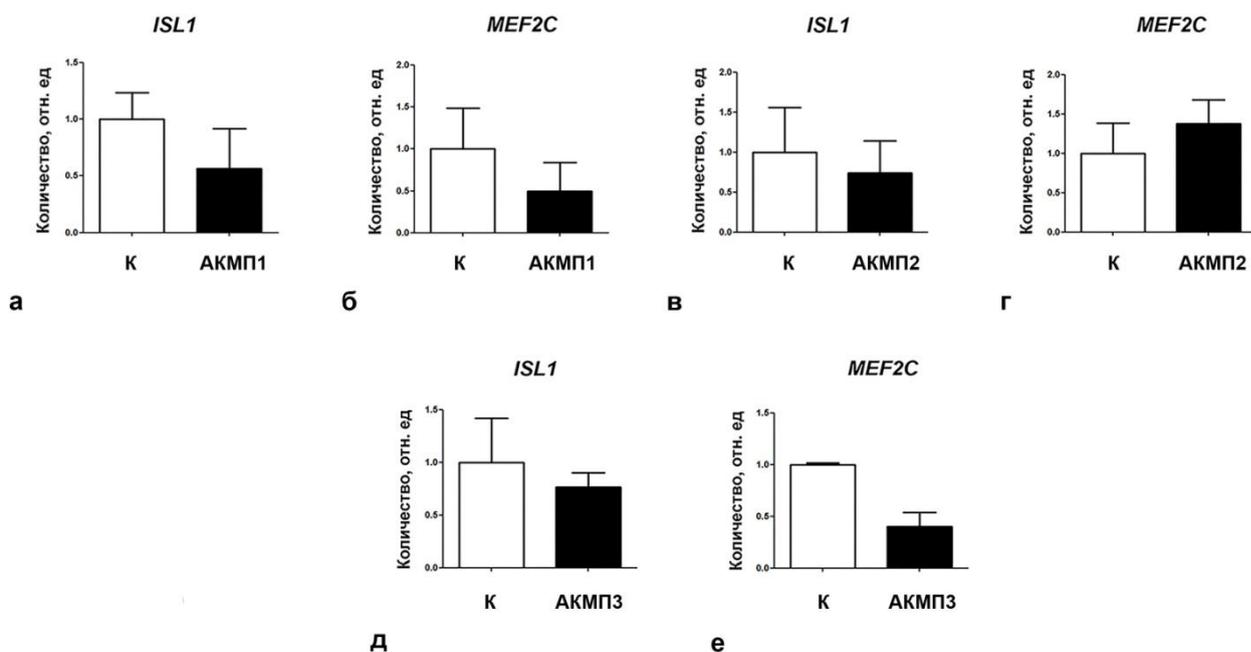


Рис. 30. Экспрессия генов, кодирующих кардиоспецифичные транскрипционные факторы *ISL1* и *MEF2C*, на уровне мРНК на 7 сутки кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП.

Таким образом, помимо сигнального пути Wnt в процесс развития АКМП могут быть вовлечены сигнальный путь Hippo, сигнальный путь Notch и транскрипционные факторы, регулирующие ранние стадии кардиогенеза.

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

3.8.1 Получение лентивирусных конструкций, несущих ген *PKP2* дикого типа и его мутантные формы

Для изучения вклада отдельных мутаций гена *PKP2* в регуляцию активности сигнального пути Wnt мы переклонировали кодирующую последовательность гена *PKP2* дикого типа (изоформа *PKP2a*, преобладающая в ткани миокарда), несущую метку flag на 3' конце, из плазмиды 915-Plakophilin-2a-Flag в лентивирусный вектор. Экспрессию плакофиллина-2 с полученного вектора проверяли с помощью трансдукции клеток линии HeLa, не экспрессирующих эндогенный плакофиллин-2 различным количеством вирусных частиц, несущих *PKP2* дикого типа. Уровень плакофиллина-2 в клетках HeLa, трансдуцированных вирусными частицами через 72 ч значительно

повышался и зависел от количества вирусных частиц приходящихся на одну клетку (MOI) в (рис. 31).

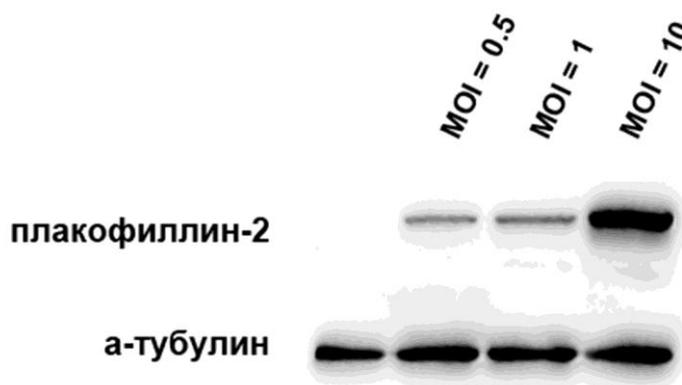


Рис. 31. Уровень экзогенного плакофиллина-2 в клетках HeLa, трансдуцированных различным количеством вирусных частиц.

MOI – мультиплексность инфекции, количество вирусных частиц в расчёте на одну клетку.

На основании вектора, несущего *PKP2* дикого типа, методом сайт-специфического мутагенеза были получены конструкции, несущие различные мутантные формы *PKP2*: идентифицированные у пациента АКМП1 мутации K859R (обозначаемую далее “KR”) и c.23321delT (обозначаемую далее “delT”), а также две мутации, описанные в литературе, мутацию V587I (обозначаемую далее “VI”) с неизвестным эффектом и предположительно высокопатогенную мутацию C796R (обозначаемую далее “CR”) (Kirchner et al., 2012).

3.8.2 Характеристика экспрессии лентивирусных конструкций, несущих ген *PKP2* дикого типа и его мутантные формы, в клетках линии HL-1.

Для проверки экспрессии полученных конструкций в клетках культуры кардиомиоцитов использовали клетки линии кардиомиоцитов мыши HL-1.

Трансдукция клеток HL-1 лентивирусными частицами, несущими *PKP2* дикого типа и его мутантные формы, вызывала существенное увеличение экспрессии *PKP2* на уровне мРНК (рис. 32, а). Уровень плакофиллина-2 дикого типа в клетке был также существенно повышен по сравнению с нетрансдуцированным контролем (рис. 32, б).

При этом плакофиллин-2 дикого типа был локализован преимущественно в зоне межклеточных контактов (рис. 32, в).

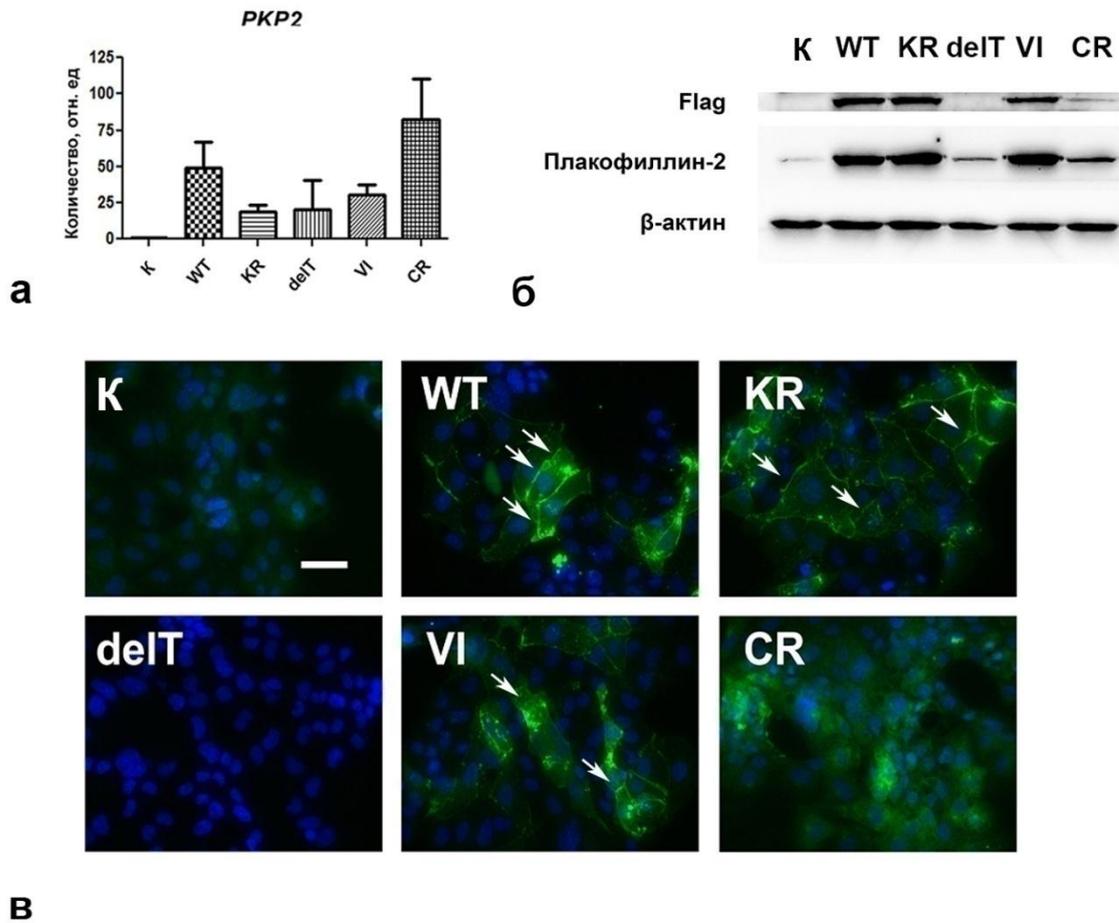


Рис. 32. Экспрессия *PKP2* дикого типа и его мутантных форм в клетках линии HL-1.

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; WT — клетки HL-1, трансдуцированные вирусными частицами, несущим *PKP2* дикого типа, KR, delT, VI, CR — клетки HL-1, трансдуцированные вирусными частицами, несущим *PKP2* с соответствующими мутациями. Длина масштабной линейки 40 мкм.

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. 32, б). Плакофиллин-2, несущий эти мутации, был также локализован преимущественно в зоне межклеточных контактов (рис. 32, в).

В то же время трансдукция клеток лентивирусными частицами, несущими *PKP2* с мутацией CR, приводила к небольшому увеличению уровня плакофиллина-2 в клетках (рис. 32, б). Плакофиллин-2, несущий аминокислотную замену CR, был распределён в цитоплазме клеток и не входил в состав межклеточных контактов (рис. 32, 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. 32, а). Тем не менее, соответствующий вектор использовался в дальнейших экспериментах для оценки возможного влияния мРНК с мутацией delT.

Таким образом, мы получили лентивирусные конструкции, несущие *PKP2* дикого типа и различные мутантные формы *PKP2*, обеспечивающие их эффективную экспрессию в различных типах клеток.

3.8.3 Характеристика экспрессии лентивирусных конструкций, несущих гена *PKP2* дикого типа и его мутантные формы, в иПСК.

Для проверки экспрессии полученных конструкций в ходе кардиогенной дифференцировки, иПСК трансдуцировали соответствующими лентивирусными частицами, селектировали по устойчивости к бластицидину в течение 48 ч, после чего запускали кардиогенную дифференцировку.

На уровне мРНК наибольший уровень экспрессии *PKP2* наблюдали на 7 сутки дифференцировки иПСК. Экспрессия *PKP2* в трансдуцированных клетках в 2-3 раза превышала уровень эндогенной экспрессии *PKP2* (рис. 33, а). Локализация экзогенного плакофиллина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах в точности соответствовала картине, наблюдаемой на клетках линии HL-1 (рис. 33, б).

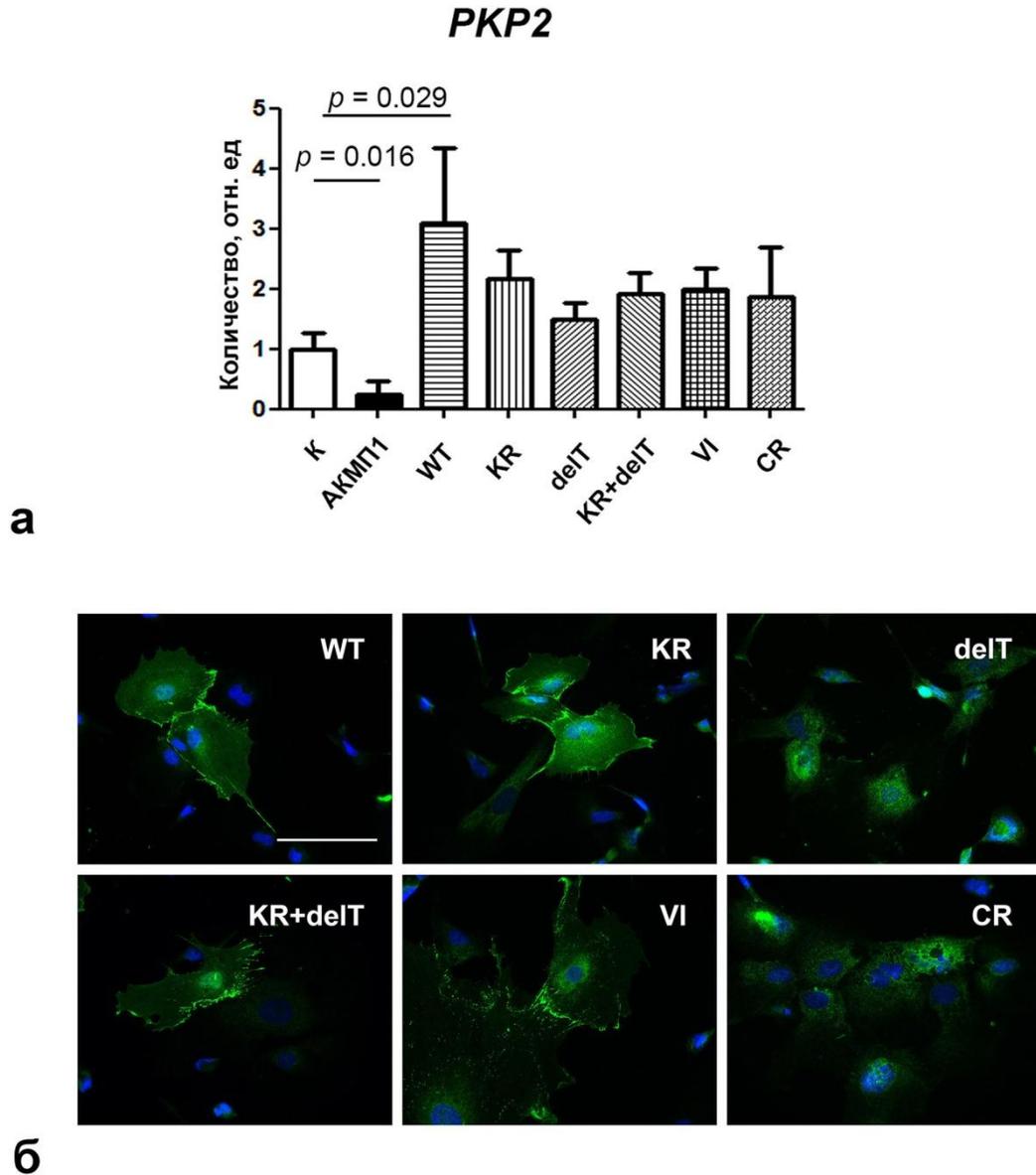


Рис. 33. Экспрессия *PKP2* дикого типа и его мутантных форм в ходе кардиодифференцировки и ПСК.

а – экспрессия *PKP2* дикого типа и его мутантных форм на 7 сутки кардиодифференцировки и ПСК на уровне мРНК; *б* – идентификация метки flag на плакофиллине-2 дикого типа и его мутантных формах в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноцитохимической окраски клеток на 24 сутки кардиодифференцировки и ПСК. К – нетрансдуцированные контрольные линии и ПСК; АКМП1 – нетрансдуцированные линии и ПСК от пациента АКМП1; WT — контрольные линии и ПСК, трансдуцированные вирусными частицами, несущим *PKP2* дикого типа, KR, delT, VI, CR — контрольные линии и ПСК, трансдуцированные вирусными частицами, несущим *PKP2* с соответствующими мутациями.

Таким образом, полученные лентивирусные конструкции, несущие *PKP2* дикого типа и различные мутантные формы *PKP2*, были способны эффективно экспрессироваться в ходе кардиогенной дифференцировки иПСК.

3.9 Изучение влияния мутаций гена *PKP2* на ультраструктурную организацию десмосом в клетках линии HL-1

Мы предположили, что введение полученных конструкций, несущих мутантные формы *PKP2*, в клетки линии HL-1 будет приводить к включению в состав десмосомы мутантных белков и, как следствие, изменению ультраструктурной организации десмосом.

Трансдукция клеток линии HL-1 полученными нами конструкциями не приводила к каким-либо значительным изменениям в структуре десмосом. Также не наблюдалось увеличение межклеточного пространства в области десмосомы (рис. 34).

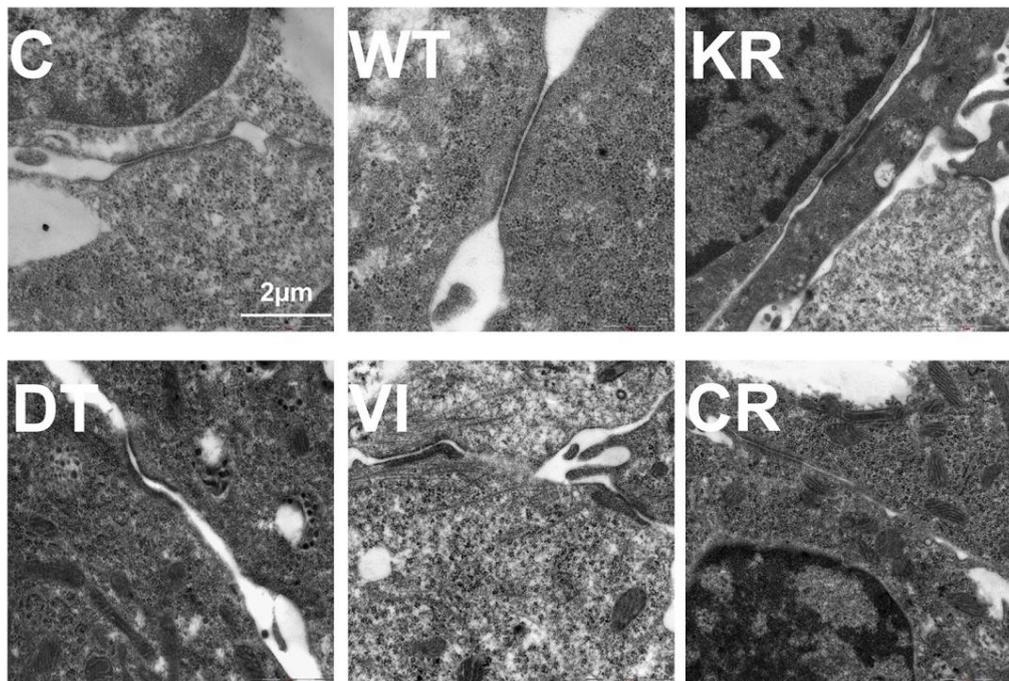


Рис. 34. Электронные микрофотографии десмосом в клетках HL-1, трансдуцированных мутантными формами *PKP2*.

3.10 Изучение влияния уровня экспрессии *PKP2* дикого типа на активность канонического сигнального пути Wnt в ходе дифференцировки иПСК

Поскольку в ходе дифференцировки иПСК от пациента АКМП1 была обнаружена сниженная экспрессия *PKP2* и сниженная активность сигнального пути Wnt, следующей задачей было определить, будет ли повышение уровня экспрессии *PKP2* в этих клетках влиять на активность сигнального пути Wnt.

Для этого иПСК от пациента АКМП1 трансдуцировали вирусными частицами, несущими *PKP2* дикого типа, и дифференцировали в направлении кардиомиоцитов. Экспрессия *PKP2* на 7 день дифференцировки иПСК от пациента АКМП1 повышалась после трансдукции, но не достигала уровня экспрессии *PKP2* в контроле (рис. 35, а).

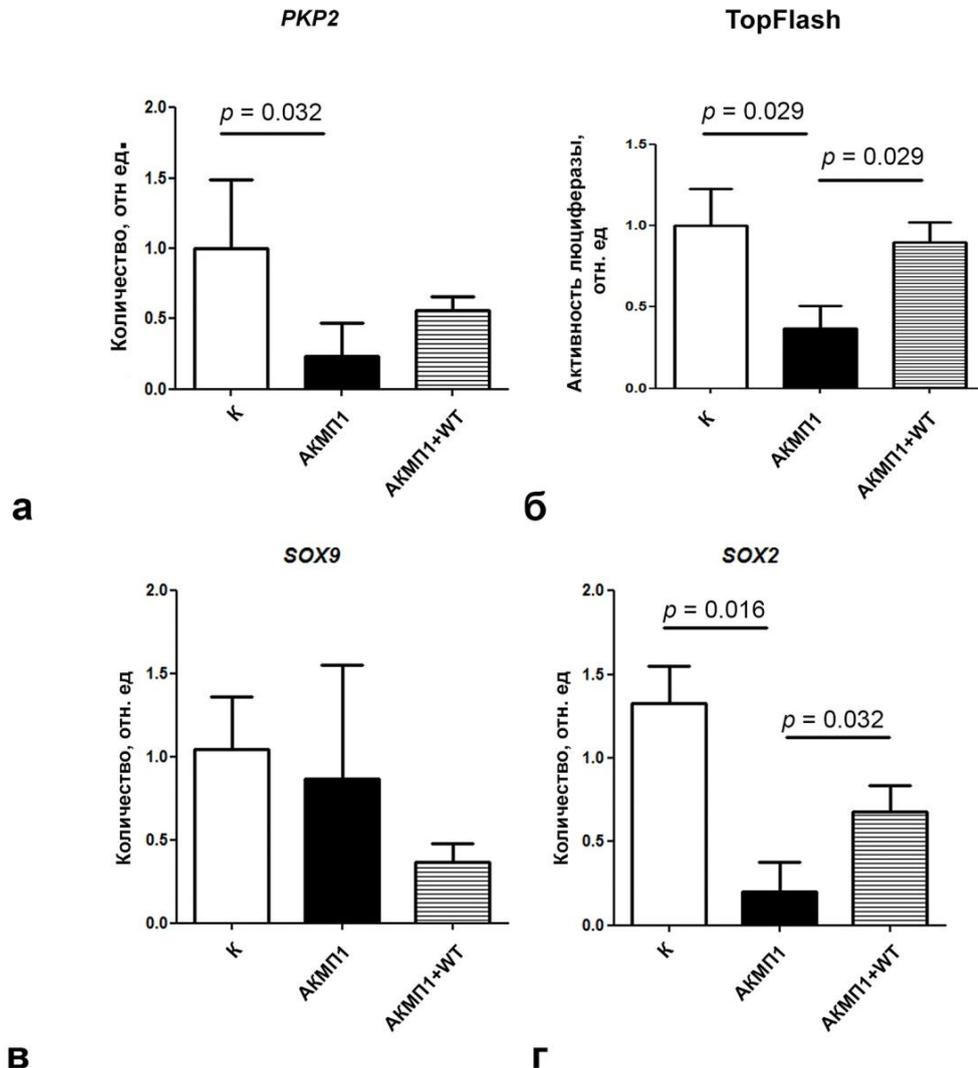


Рис. 35. Влияние уровня экспрессии *PKP2* дикого типа на активность сигнального пути Wnt на 7 сутки кардиодифференцировки иПСК.

а – Экспрессия *PKP2* на уровне мРНК; б – активность люциферазного репортера TopFlash на 7 сутки кардиодифференцировки иПСК; в – экспрессия гена *SOX9* на 7

сутки кардиодифференцировки иПСК; *z* – экспрессия гена *SOX2* на 7 сутки кардиодифференцировки иПСК. К – нетрансдуцированные контрольные линии иПСК; АКМП1 – нетрансдуцированные линии иПСК от пациента АКМП1; АКМП1+WT — линии иПСК от пациента АКМП1, трансдуцированные вирусными частицами, несущим *PKP2* дикого типа.

Далее на 7 день дифференцировки иПСК оценивали активность люциферазного репортера и экспрессию генов-мишеней сигнального пути Wnt. Введение *PKP2* дикого типа в иПСК от пациента с АКМП1 повышало активность люциферазного репортера (рис. 35, б) и экспрессию гена *SOX2* до уровня, сопоставимого с контрольными линиями иПСК (рис. 35, з), свидетельствуя о повышении активности сигнального пути Wnt.

Таким образом, введение *PKP2* дикого типа в иПСК с пониженным уровнем его эндогенной экспрессии способствовало восстановлению активности Wnt.

3.11 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 кардиодифференцировки иПСК (рис. 36). Напротив, в случае мутаций KR и delT прослеживалась тенденция к увеличению активности сигнального пути Wnt.

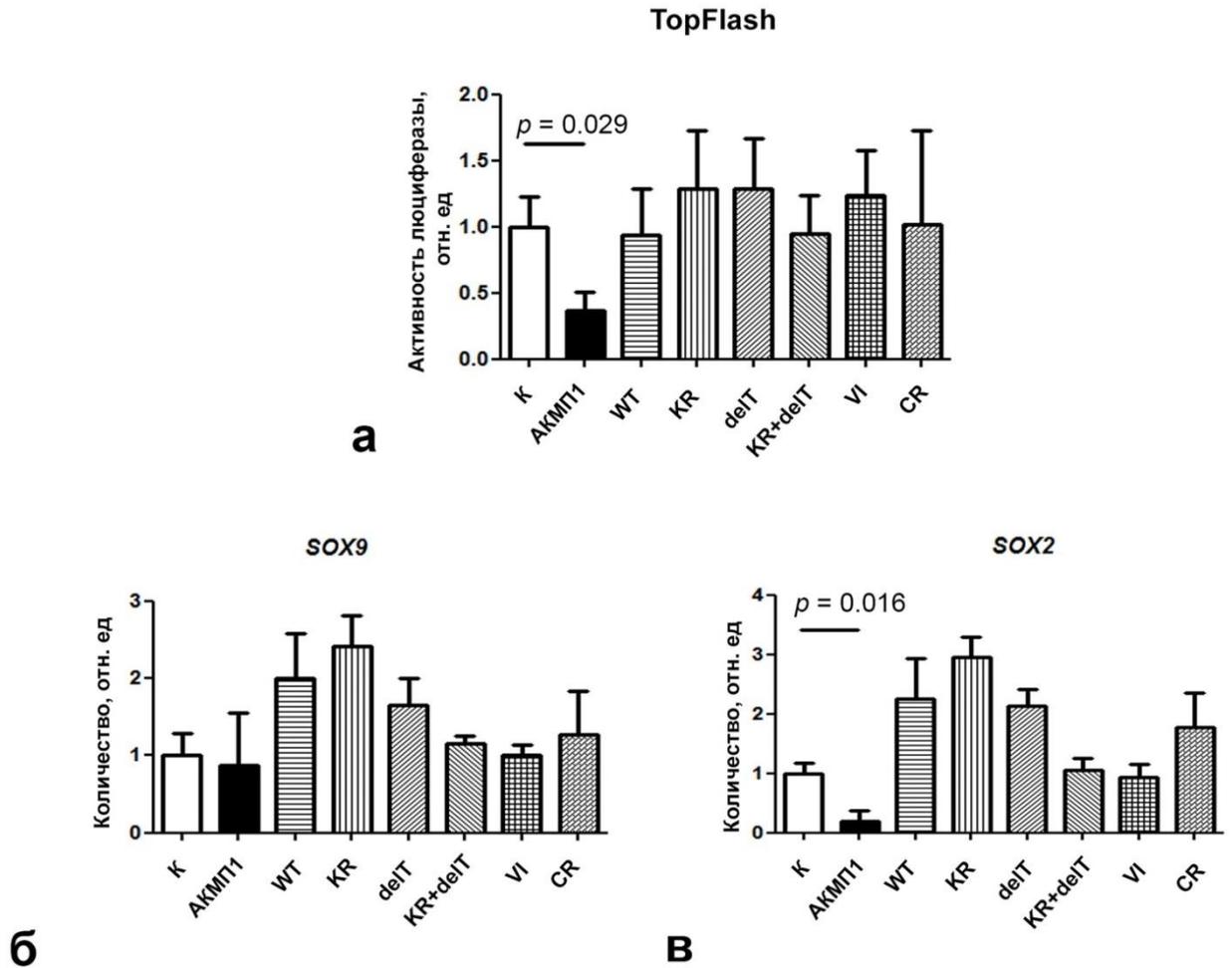


Рис. 36. Активность канонического сигнального пути Wnt на 7 сутки кардиодифференцировки iPСК, экспрессирующих PKP2 дикого типа и его мутантные формы.

а – активность люциферазного репортера TopFlash; *б* – экспрессия гена *SOX9*; *в* – экспрессия гена *SOX2*. К – нетрансдуцированные контрольные линии iPСК; АКМП1 – нетрансдуцированные линии iPСК от пациента АКМП1; WT — контрольные линии iPСК, трансдуцированные вирусными частицами, несущим *PKP2* дикого типа, KR, delT, KR+delT, VI, CR — контрольные линии iPСК, трансдуцированные вирусными частицами, несущим *PKP2* с соответствующими мутациями.

Таким образом, мутантные формы *PKP2* способны модулировать активность сигнального пути Wnt.

3.12 Оценка активности канонического сигнального пути Wnt в первичных клеточных культурах

Следующей задачей являлась оценка активности сигнального пути Wnt в ММСК и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с АКМП. Эти клетки не образуют десмосом, однако в них наблюдается слабая (по сравнению с богатой десмосомами тканью миокарда) экспрессия *PKP2* (рис. 37).

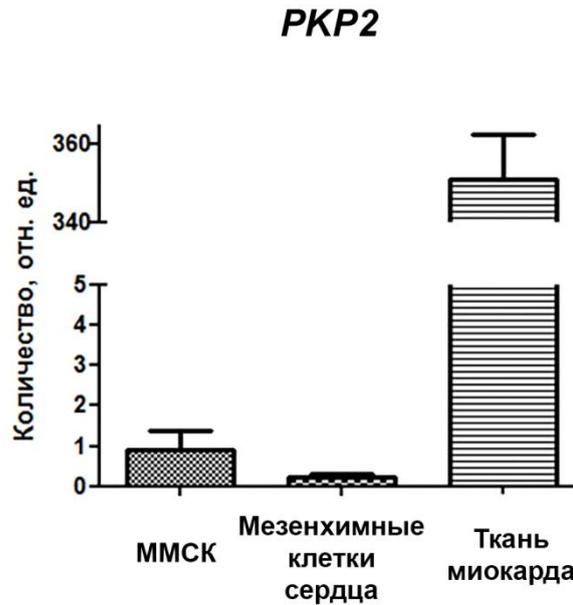


Рис. 37. Экспрессия *PKP2* на уровне мРНК.

Из-за невысокого базового уровня сигнального пути Wnt в ММСК и мезенхимных клетках сердца эксперименты по измерению его активности проводили в присутствии 10 мкМ ингибитора GSK3 β киназы CHIR99021 (рис. 38).

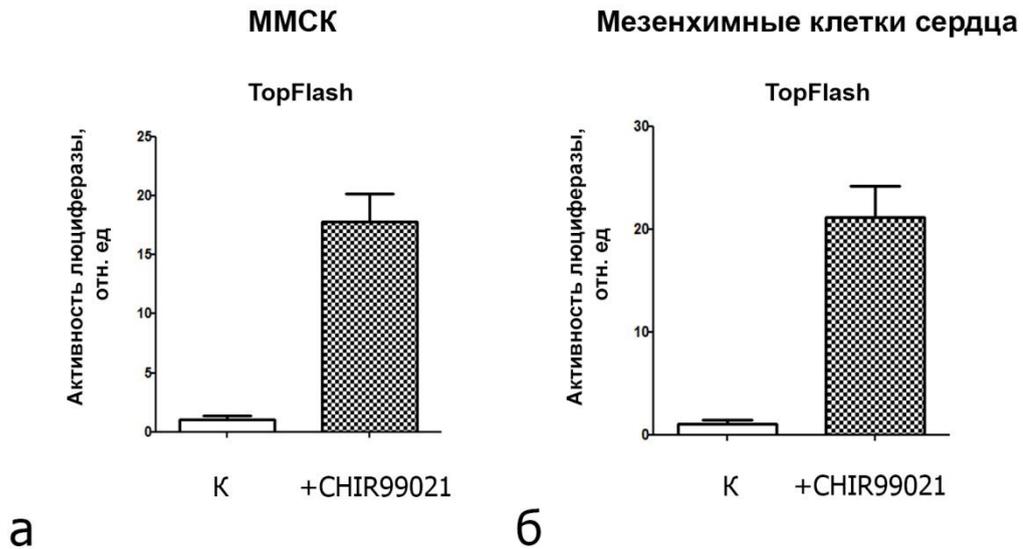


Рис. 38. Повышение активности сигнального пути Wnt в первичных клеточных культурах в ответ на стимуляцию CHIR99021.

Добавление 10 мкМ ингибитора GSK3 β киназы CHIR99021 существенно повышает активность люциферазного репортера в MMCK и мезенхимных клетках сердца спустя 72 ч.

Сначала мы оценили активность сигнального пути Wnt в MMCK и мезенхимных клетках сердца после обработки CHIR99021.

В MMCK, полученных от пациента АКМП1, и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациента АКМП2, наблюдали пониженный уровень активности люциферазного репортера по сравнению с контролем (рис. 39, а, б), что указывает на сниженную транскрипционную активность TCF/LEF комплекса и сниженную активность канонического сигнального пути Wnt. В MMCK, полученных от пациента АКМП3, напротив, наблюдали повышенный уровень активности люциферазного репортера по сравнению с контролем (рис. 39, в).

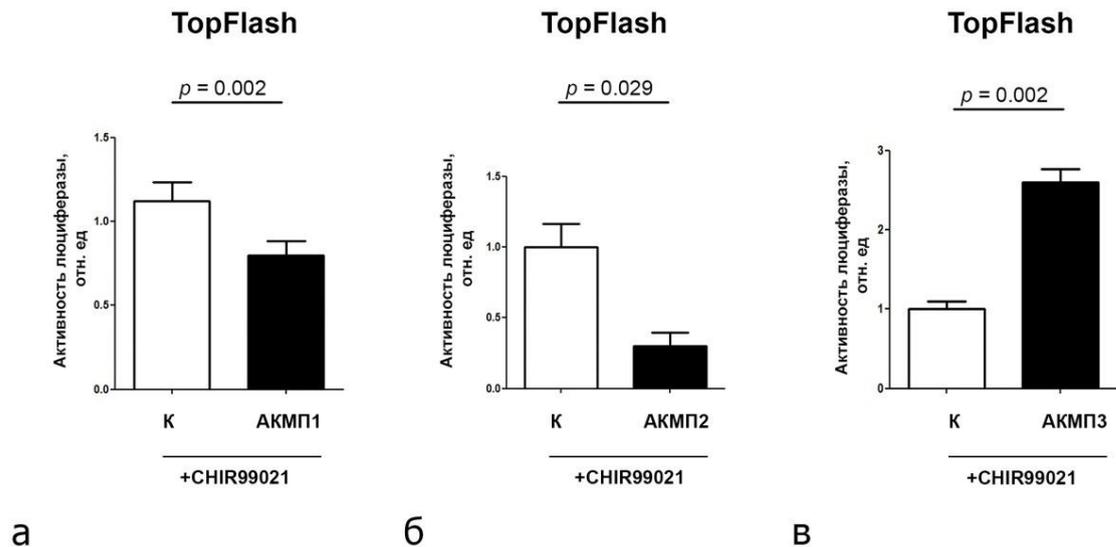


Рис. 39. Активность канонического сигнального пути Wnt в ММСК и мезенхимных клетках сердца.

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).

Одним из ключевых регуляторов адипогенной дифференцировки является сигнальный путь PPAR γ . Ранее было показано, что именно активация несвойственного кардиомиоцитам PPAR γ вызывает характерные для АКМП изменения: накопление липидных капель, апоптоз, сдвиг метаболизма в сторону использования глюкозы вместо окисления жирных кислот (Kim et al., 2013). Исходя из этих данных, было принято решение оценить влияние адипогенной стимуляции на активность сигнального пути Wnt на модели ММСК и мезенхимных клеток сердца, полученных от пациентов с АКМП.

Чтобы оценить возможные изменения активности сигнального пути Wnt в процессе адипогенной дифференцировки в клетках от пациентов с АКМП по сравнению с контрольными клетками, несущими *PKP2* дикого типа, ММСК и мезенхимные клетки сердца культивировали в присутствии CHIR99021 и специфических факторов адипогенной дифференцировки, индуцирующих активацию PPAR γ .

Индукция адипогенной дифференцировки приводила к снижению активности люциферазного репортера в первичных культурах клеток в результате подавления сигнального пути Wnt при активации PPAR γ . При этом в мезенхимных клетках сердца,

полученных от пациента АКМП2 и ММСК, полученных от пациента АКМП3, при индукции адипогенной дифференцировки наблюдали повышение уровня активности люциферазного репортера по сравнению с контролем (рис. 40, б, в).

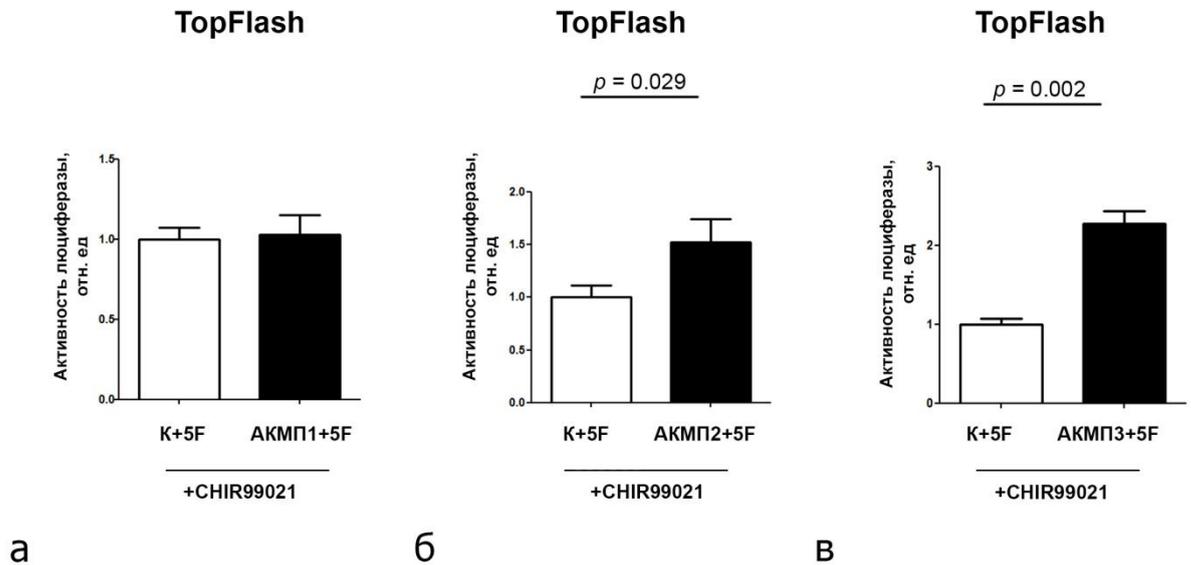


Рис. 40. Активность канонического сигнального пути Wnt в ММСК и мезенхимных клетках сердца индуцированных к адипогенной дифференцировке.

а – активность люциферазного репортера TopFlash в ММСК пациентов АКМП1; б – активность люциферазного репортера TopFlash в мезенхимных клетках сердца пациента АКМП2; в – активность люциферазного репортера TopFlash в ММСК пациента АКМП3. Клетки индуцировали к адипоцитарной дифференцировке с помощью специфических факторов (+5F). Сигнальный путь Wnt активировали, добавляя 10 мкМ CHIR99021 (+CHIR99021).

Помимо активности люциферазного репортера экспрессию генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt – *AXIN2* и *SOX9*. Экспрессия этих генов в ММСК и мезенхимных клетках сердца от пациентов АКМП1 и АКМП3 была снижена по сравнению с контролем. Наибольшую разницу в экспрессии этих генов на уровне мРНК между контрольными клетками и клетками от пациентов с АКМП наблюдали при индукции адипогенной дифференцировки. Экспрессия генов *AXIN2* и *SOX9* была снижена в ММСК от пациентов АКМП1 и АКМП3 и повышена в мезенхимных клетках сердца от пациента АКМП2 по сравнению с контролем (рис. 41).

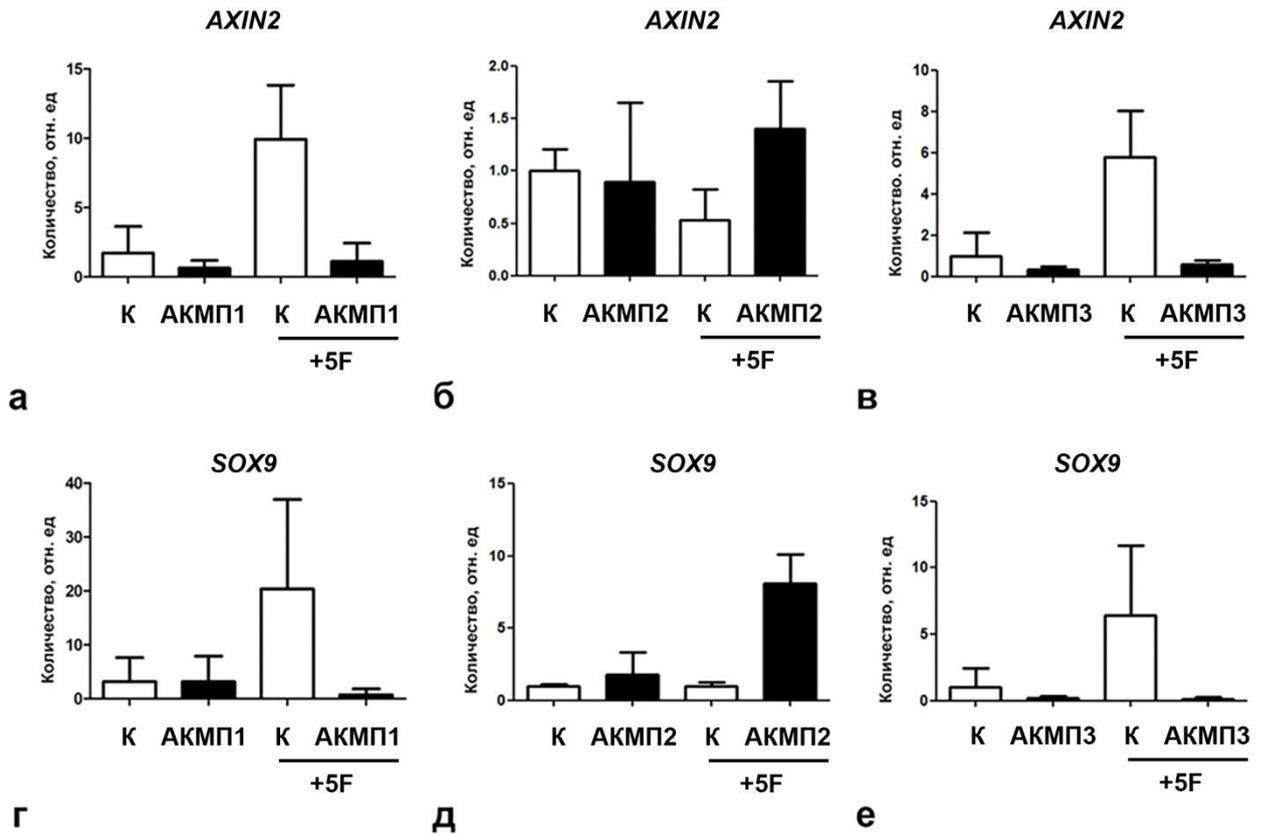


Рис. 41. Экспрессия генов-мишеней канонического сигнального пути *Wnt* на уровне мРНК в ММСК и мезенхимных клетках сердца, неиндуцированных и индуцированных к адипогенной дифференцировке.

Таким образом, в первичных культурах клеток, полученных от пациентов с АКМП, активность сигнального пути *Wnt* изменена по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование заболеваний при помощи iPSC является перспективным методом, позволяющим изучить влияние отдельных мутаций на разнообразные процессы, проходящие на клеточном уровне. Культура кардиомиоцитов, полученных из iPSC зарекомендовала себя как надёжная модель, применимая для изучения наследственных заболеваний сердца. Применение iPSC позволяет не только получить культуру кардиомиоцитов конкретного пациента, но и изучить процесс кардиогенной дифференцировки, включающий формирование клеток мезодермы, спецификацию прогениторных клеток и постепенное образование дифференцированных кардиомиоцитов. Такой подход позволяет оценить изменения активности сигнальных путей на ранних стадиях дифференцировки и определить, на каком этапе происходят нарушения, вызванные наличием мутаций в геноме пациента. Также данная методика позволяет изучать и терминально дифференцированные кардиомиоциты с целью воспроизведения фенотипа заболевания *in vitro* и оценки качества полученной клеточной модели.

Получение нами дифференцированных кардиомиоцитов от пациентов с АКМП позволило оценить уровень и внутриклеточную локализацию белков десмосомы плакофиллина-2, десмоглина-2, плакоглобина. Наиболее выраженные изменения были обнаружены в кардиомиоцитах, полученных от пациента АКМП1, являющегося носителем двух мутаций в гене *RKP2*, и имеющим тяжёлую форму АКМП.

Существуют данные о повышенной способности кардиомиоцитов от пациентов с АКМП к адипогенной трансформации, накоплению липидных капель в цитоплазме и возможному сдвигу кардиогенной дифференцировки в сторону адипоцитов (Caspri et al., 2013; Ma et al., 2013). Эффективность кардиогенной дифференцировки iPSC от пациентов с АКМП, принимающих участие в нашем исследовании, не была изменена по сравнению с контрольными iPSC. Также не наблюдалось изменения направления дифференцировки iPSC от пациентов с АКМП или повышенного содержания липидных капель в дифференцированных кардиомиоцитах от пациентов с АКМП. Возможно, адипогенная трансформация кардиомиоцитов происходит на фоне аномальной активации PPAR γ сигнального пути (Kim et al., 2013). Активация PPAR γ может быть вызвана искусственно в ответ на стимуляцию кардиомиоцитов специфическими факторами, такими как розиглитазон и индометацин, или их

природным аналогом 13-гидроксиоктадекаеновой кислотой. Однако на сегодняшний день нет данных о повышении активаторов сигнального пути PPAR γ в крови или ткани миокарда пациентов с АКМП.

Существует множество публикаций, посвящённых роли канонического сигнального пути Wnt в развитии АКМП (Garcia-gras et al., 2006; Li J. et al., 2011; Oxford et al., 2014). По-видимому, этот сигнальный путь играет важную роль в развитии этой патологии сердца. В настоящей работе мы сфокусировались на изучении канонического сигнального пути Wnt в процессе дифференцировки iPСК в кардиомиоциты. Регуляция этого сигнального пути в процессе кардиогенной дифференцировки имеет характерный двухфазный профиль (Ueno et al., 2007). На ранних стадиях кардиогенной дифференцировки происходит активация сигнального пути Wnt, необходимая для формирования мезодермы и последующей индукции прогениторных клеток. На поздних стадиях дифференцировки активность Wnt снижается, его роль на этом этапе сводится к регуляции размера дифференцирующихся кардиомиоцитов.

Основным эффектом мутаций десмосомных генов, наблюдаемым нами, являлось понижение активности сигнального пути Wnt. Необходимо отметить, что понижение активности сигнального пути Wnt не сопровождалось ядерной транслокацией десмосомного белка плакоглобина, неоднократно описанной в литературе (Garcia-gras et al., 2006; Lombardi R., Dong, J. 2009; Kim et al., 2013). Это наблюдение говорит о существовании плакоглобин-независимого пути десмосомной регуляции сигнального пути Wnt

Различия в активности сигнального пути Wnt и экспрессии изученных нами генов среди пациентов с АКМП объясняются различным эффектом мутаций десмосомных белков, носителями которых они являются. Пациент АКМП1 является носителем двух мутаций в гене *PKP2*: делеции с.23321delT и аминокислотной замены K859R. Эти мутации могут располагаться на одном аллеле (цис-положение) или на разных (транс-положение) аллелях гена *PKP2*. В случае цис-положения двух мутаций один из аллелей гена *PKP2* не несёт мутаций, и с него возможна экспрессия плакофилина-2 дикого типа; в случае транс-положения двух мутаций оба аллеля несут мутации. Делеция с.23321delT расположена на расстоянии 354 п.о. от старт-кодона мРНК *PKP2*. Отсутствие нуклеотида в этом положении приводит к образованию стоп-кодона на расстоянии 421 п.о. от старт-кодона. мРНК, несущая эту делецию, может подвергаться

нонсенс-опосредованной деградации, тем самым не приводя к образованию укороченного белкового продукта. В пользу этого говорит обнаруженное нами пониженное по сравнению с контрольными кардиомиоцитами количество мРНК *PKP2* и пониженный уровень плакофиллина-2 в кардиомиоцитах от пациента АКМП1. Таким образом, основным эффектом мутаций пациента АКМП1 является гаплонедостаточность *PKP2*. Кардиомиоциты от АКМП1 демонстрировали наиболее выраженные изменения в активности сигнальных путей по сравнению с контролем, что может быть вызвано нехваткой плакофиллина-2 в составе десмосом.

Мутация, носителем которой является пациент АКМП2, также приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона, однако она расположена дальше от начала кодирующей части гена *PKP2*, по сравнению с мутацией АКМП1 – на расстоянии 1521 п.о. от старт-кодона (1389 п.о. в изоформе *PKP2a*). Таким образом, возможен синтез белкового продукта длиной 470 аминокислот, содержащего полноценный head-домен (длиной 377 аминокислот). Наличие полноценного head-домена позволяет плакофиллину-2 включаться в состав десмосом и выполнять свои функции. Мы не обнаружили сниженной экспрессии *PKP2* в дифференцированных кардиомиоцитах от этого пациента и снижения активности сигнального пути Wnt. Это говорит о возможности выполнения укороченным белком своих функций или об эффекте компенсации нонсенс-опосредованной деградации мРНК, транскрибированной с мутантного аллеля, путём повышения экспрессии *PKP2* с аллеля дикого типа.

Миссенс-мутация в гене *DSP*, носителем которой является пациент АКМП3, приводит к замене гистидина на схожую с ним аминокислоту аргинин. Наличие этой мутации также не влияло на экспрессию *PKP2* в ходе дифференцировки иПСК, однако 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.

Введение *PKP2* дикого типа в иПСК от пациента АКМП1 со сниженной экспрессией этого гена повышало активность сигнального пути Wnt в ходе кардиодифференцировки. Можно предположить, что активность сигнального пути Wnt регулируется уровнем плакофиллина-2 в клетке. Механизм регуляции активности Wnt

ещё предстоит выяснить. Принципиально возможно наличие у плакофиллина-2 собственной недесмосомной сигнальной функции, на что указывает его способность связываться с β -катенином (Chen et al., 2002) и РНК-полимеразой III (Mertens et al., 2001). Высока вероятность существования других взаимодействующих с плакофиллином-2 цитоплазматических или ядерных белков, поскольку исследования с использованием масс-спектрометрического анализа полного спектра белков, связывающихся с плакофиллином-2, не проводились.

Альтернативной моделью является регуляция сигнального пути Wnt, опосредованная белками, локализованными в районе десмосом. Реорганизация десмосом вследствие включения в её состав мутантного белка может приводить к изменениям локализации и количества ассоциированных с десмосомой белков, выполняющих сигнальные функции, и, в конечном итоге, изменениям их активности. Среди них белок интеркалирующих дисков кардиомиоцитов – Myo2ap, взаимодействующий с рядом белков межклеточных контактов, в том числе с β -катенином, плакофиллином-2 и десмоплакином и способный активировать Rho-зависимый SRF сигнальный путь (Seeger et al., 2010). В области десмосом локализована протеинкиназа PKC α , заякоренная за счёт взаимодействия с плакофиллином-2 (Bass-Zubek et al., 2008). Снижение количества ассоциированной с десмосомами PKC α способно активировать сигнальный каскад Hippo (Chen et al., 2014). Другим белком, участвующим в регуляции сборки десмосом и активности сигнальных путей является белок iASPP, взаимодействующий с десмоплакином и десмином (Notari et al., 2015). iASPP является ингибитором p53 и p63 (Bergamaschi et al., 2003; Notari et al., 2011) и способен регулировать апоптоз кардиомиоцитов и p53-опосредованную активацию PPAR γ (Assaily et al., 2011).

Отдельного внимания заслуживают белки, регулирующие транспорт молекул в область межклеточного контакта. Одним из них является SAP97, регулирующий транспорт ионных каналов Nav1.5 и Kir2.1 к мембране (Asimaki et al., 2014). Важную роль в формировании структуры десмосомы играет ассоциированный с актиновым цитоскелетом малый G-белок RhoA (Godsel et al., 2010), также являющийся компонентом сигнального пути Wnt/JNK и сигнального пути планарной клеточной полярности.

Таким образом, регуляция сигнальных путей десмосомными белками может осуществляться как через прямые белковые взаимодействия, так и опосредованно через белки-участники сигнальных путей, локализованные в области десмосомы (рис. 42).

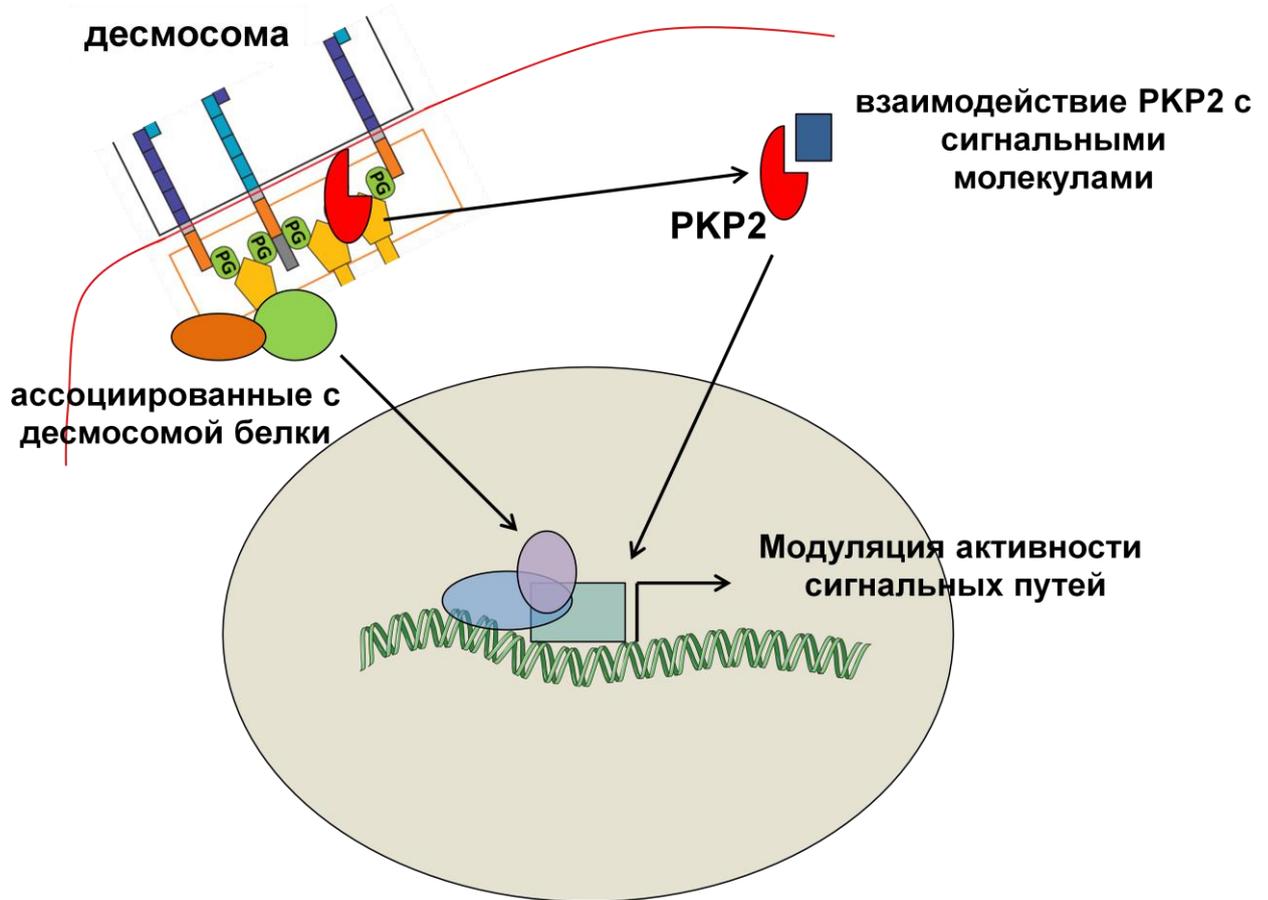


Рис. 42. Молекулярные механизмы десмосомной регуляции активности сигнальных путей.

Предметом отдельного изучения являются методы устранения признаков АКМП на клеточном уровне. Введение *PKP2* дикого типа в иПСК от пациента АКМП1 не повышало экспрессию *PKP2* до уровня контрольных линий иПСК. Также оставалась пониженной экспрессия генов-мишеней сигнального пути Wnt. Таким образом, экспрессия трансгена методом лентивирусной трансдукции не может полностью восполнить утрату одного аллеля гена *PKP2*.

Существуют данные об увеличении ширины межклеточного промежутка в области десмосом и увеличении общей ширины десмосом в кардиомиоцитах полученных из иПСК от пациентов с АКМП (Caspi et al., 2013). Однако введение и последующая экспрессия мутантных форм *PKP2* в клетки линии HL-1 не приводило к заметным изменениям ультраструктуры десмосом. Возможно, экзогенный мутантный

плакофиллин-2 не способен вытеснить эндогенный плакофиллин-2 дикого типа из десмосомы и тем самым не оказывает значительного влияния на её структуру.

Введение мутантного *PKP2* в контрольные iPСК с последующей их дифференцировкой в кардиомиоциты не приводило к падению активности сигнального пути Wnt. Напротив, наблюдали тенденцию к увеличению активности этого сигнального пути. Одним из объяснений этого эффекта может являться высокий уровень экспрессии *PKP2* дикого типа в исходных клетках. Введение экзогенного *PKP2* (дикого типа или мутантного) приводит к оверэкспрессии *PKP2*, которая способна приводить к повышению активности сигнального пути Wnt (Chen et al., 2002). Также повышение активности Wnt может являться эффектом мутации на фоне нормального уровня экспрессии *PKP2* дикого типа. Известно, что развитие признаков АКМП у мышей может сопровождаться повышением активности Wnt (Li J. et al., 2011). В совокупности полученные данные свидетельствуют в пользу того, что регуляция этого сигнального пути как в одну, так и в другую сторону носит аномальный характер.

Также мы изучили экспрессию генов, являющихся участниками или мишенями различных сигнальных путей, предположив, что дифференцировка iPСК от пациентов с АКМП может сдвигаться в направлении адипоцитов или фибробластов, что сопровождается изменением активности соответствующих сигнальных путей. Обнаруженное нами повышение экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch и ключевого участника сигнального пути Hippo говорит о том, что в процесс развития АКМП вовлечена целая сеть сигнальных каскадов.

Сигнальный путь Notch подобно Wnt является важнейшим регулятором развития сердца в эмбриогенезе. В процессе кардиогенной дифференцировки эти сигнальные пути действуют совместно, в частности канонический сигнальный путь Wnt и сигнальный путь Notch взаимно активируют друг друга на ранних стадиях дифференцировки линии клеток P19CL6 (Li et al., 2012). Тем не менее, существуют данные и о реципрокной активации этих сигнальных путей (Sanders et al., 2009). Наблюдаемое нами повышение активности сигнального пути Notch в процессе кардиогенной дифференцировки iPСК от пациентов с АКМП может быть вызвано как понижением активности сигнального пути Wnt в процессе дифференцировки, так и независимой десмосомной регуляцией сигнального пути Notch.

Несмотря на то, что эффективность кардиодифференцировки иПСК от пациентов с АКМП не была изменена по сравнению с контрольными линиями иПСК, мы обнаружили понижение экспрессии транскрипционных факторов *ISL1* и *MEF2C*, регулирующих раннюю кардиогенную спецификацию. Во время развития сердца ген *ISL1*, кодирующий LIM-гомеодомен содержащий транскрипционный фактор, является маркером вторичного сердечного поля, дающего начало правому желудочку, популяции клеток левого желудочка, выводящему тракту и, отчасти, предсердиям (Cai et al., 2003). Сохранившиеся во взрослом сердце *ISL1*⁺ клетки рассматриваются как одна из популяций прогениторных клеток (Laugwitz et al., 2005). Также ген *ISL1* является мишенью сигнального пути Wnt (Lin L. et al., 2007) и снижение его экспрессии может быть обусловлено общим снижением активности этого сигнального пути в ходе дифференцировки иПСК.

MEF2C является активатором транскрипции, сайты связывания которого расположены в регуляторных областях генов, регулирующих миогенез и развитие сердца. Также как и *ISL1*, *MEF2C*⁺ клетки дают начало правому желудочку, и выводящему тракту формирующегося в эмбриогенезе сердца (Lin et al., 1997). Схожесть паттернов экспрессии этих двух факторов объясняется тем, что *MEF2C* является прямой мишенью *ISL1* и *GATA4* (Dodou et al., 2004).

Пониженная по сравнению с контролем экспрессия *ISL1* и *MEF2C* в процессе дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП может являться признаком изменения процесса ранней кардиогенной дифференцировки и спецификации прогениторных клеток.

Несомненный интерес представляют собой обнаруженные изменения сигнального пути Wnt в культуре ММСК и мезенхимных клеток сердца. Эти клетки не образуют десмосом и имеют низкий базовый уровень сигнального пути Wnt. Вероятно, этот сигнальный путь не играет существенной роли при их пролиферации и дифференцировке. Тем не менее, активность Wnt в ММСК и мезенхимных клетках сердца от пациентов с АКМП была изменена по сравнению с контролем. Кроме того, индукция в этих клетках адипогенной дифференцировки также приводила к различиям в активности сигнального пути Wnt.

Не вызывает сомнения, что десмосомные белки и комплекс белков, ассоциированных с десмосомой, играют чрезвычайно важную роль в составе

сигнальных путей, обеспечивающих формирование и функционирование кардиомиоцитов. Не менее важную роль в прогрессии АКМП играет наличие постоянного механического стресса, вызванного сокращениями миокарда. Дальнейшие исследования с оказанием механического воздействия на существующие клеточные модели позволят максимально точно определить, что является инициатором АКМП, пролить свет на 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A., Kemler R. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16: 3797–3804.
2. Adell T., Nefkens I., Muller W.E. 2003. Polarity factor ‘Frizzled’ in the demosponge *Suberites domuncula*: identification, expression and localization of the receptor in the epithelium/pinacoderm. *FEBS Lett.* 554: 363–368.
3. Alcalai R., Metzger S., Rosenheck S., Meiner V., Chajek-Shaul T. 2003 A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder, and woolly hair. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42: 319–327.
4. Amit S., Hatzubai A., Birman Y., Andersen J.S., Ben-Shushan E., Mann M., Ben-Neriah Y., Alkalay I. 2002. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 16: 1066–1076.
5. Andrade M.A., Petosa C., O’Donoghue S.I., Muller C.W., Bork P. 2001. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J. Mol. Biol.* 309: 1–18.
6. Anokye-Danso F., Trivedi C.M., Jühr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y., Zhang Y., Yang W., Gruber P.J., Epstein J.A., Morrisey E.E. 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell.* 84: 376-88.
7. Aoyama Y., Owada M. K., Kitajima Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris–IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. 1999. *Eur. J. Immunol.* 29: 2233–2240.
8. Armstrong D.K., McKenna K.E., Purkis P.E., Green K.J., Eady R.A., Leigh I.M., Hughes A.E. 1999. Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. *Hum. Mol. Genet.* 8: 143–148.
9. Asimaki A., Kapoor S., Plovie E., Karin Arndt A., Adams E., Liu Z., James C.A., Judge D.P., Calkins H., Churko J., Wu J.C., MacRae C.A., Kléber A.G., Saffitz J.E. 2014. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Sci Transl Med.* 11: 6. doi: 10.1126/scitranslmed.3008008.
10. Assaily W., Rubinger D.A., Wheaton K., Lin Y., Ma W., Xuan W., Brown-Endres L., Tsuchihara K., Mak T.W., Benchimol S. 2011. ROS-mediated p53 induction of Lpin1 regulates fatty acid oxidation in response to nutritional stress. *Mol Cell.* 44: 491–501.

11. Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17: 126–140.
12. Azaouagh A., Churzidse S., Konorza T., Erbel R. 2011. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a review and update. *Clin Res Cardiol.* 100: 383–94.
13. Barile L., Messina E., Giacomello A., Marbán E. 2007. Endogenous cardiac stem cells. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 50: 31–48.
14. Barker N., Hurlstone A., Muisi H., Miles A., Bienz M., Clevers H. 2001. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* 20: 4935–4943.
15. Basso C., Corrado D., Marcus F.I., Nava A., Thiene G. 2009. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet.* 373: 1289–1300.
16. Basso C., Czarnowska E., Della Barbera M., Bauce B., Beffagna G., Wlodarska E.K., Pilichou K., Ramondo A., Lorenzon A., Wozniak O., Corrado D., Daliento L., Danieli G.A., Valente M., Nava A., Thiene G., Rampazzo A. 2006. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J.* 27: 1847–54.
17. Bass-Zubek A.E., Hobbs R.P., Amargo E.V., Garcia N.J., Hsieh S.N., Chen X., Wahl J.K. 3rd, Denning M.F., Green K.J. 2008. Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol.* 181: 605–613.
18. Bearzi C., Rota M., Hosoda T., Tillmanns J., Nascimbene A., De Angelis A., Yasuzawa-Amano S., Trofimova I., Siggins R.W., LeCapitaine N., Cascapera S., Beltrami A.P., D'Alessandro D.A., Zias E., Quaini F., Urbanek K., Michler R.E., Bolli R., Kajstura J., Leri A., Anversa P. 2007. Human cardiac stem cells. *PNAS.* 104: 14068–14073.
19. Beffagna G., Occhi G., Nava A., Vitiello L., Ditadi A., Basso C., Bauce B., Carraro G., Thiene G., Towbin J.A., Danieli G.A., Rampazzo A. 2005. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta 3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res.* 65: 366–373.
20. Behrens J., von Kries J.P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., Birchmeier W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638–642.

21. Bergamaschi D., Samuels Y., O'Neil N.J., Trigiante G., Crook T., Hsieh J.K., O'Connor D.J., Zhong S., Campargue I., Tomlinson M.L., Kuwabara P.E., Lu X. 2003. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet.* 33:162–167.
22. Bierkamp C., McLaughlin K.J., Schwarz H., Huber O., Kemler R. 1996. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Developmental biology.* 180: 780–785.
23. Boland M.J., Hazen J.L., Nazor K.L., Rodriguez A.R., Gifford W., Martin G., Kupriyanov S., Baldwin K.K. 2009. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature.* 461: 91–94.
24. Bonne S., van Hengel J., Nollet F., Kools P., van Roy F. 1999. Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci* 112: 2265–2276.
25. Buchholz D.E., Hikita S.T., Rowland T.J., Friedrich A.M., Hinman C.R., Johnson L.V., Clegg D.O. 2009. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 27: 2427–2434.
26. Burridge P.W., Anderson D., Priddle H., Barbadillo Muñoz M.D., Chamberlain S., Allegrucci C., Young L.E., Denning C. 2007. Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability. *Stem Cells.* 25: 929–938.
27. Burridge P.W., Matsu E., Shukla P., Lin Z.C., Churko J.M., Ebert A.D., Lan F., Diecke S., Huber B., Mordwinkin N.M., Plews J.R., Abilez O.J., Cui B., Gold J.D., Wu J.C. 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods.* 11: 855–60.
28. Cai C.-L., Liang X., Shi Y., Chu P.-H., Pfaff S.L., Chen J., Evans S. 2003. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell.* 5: 877–889.
29. Calkins C.C., Setzer S.V. 2007. Spotting desmosomes: The first 100 years. *J Invest Dermatol.* 127: E2–E3. doi: 10.1038/sj.skinbio.6250010.
30. Caspi O., Huber I., Gepstein A., Arbel G., Maizels L., Boulos M., Gepstein L. 2013. Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells. *Circ Cardiovasc Genet.* 6: 557–568.

31. Cavallo R., Cox R., Moline M., Roose J., Polevoy G., Clevers H., Peifer M., Bejsovec A. 1998. *Drosophila* TCF and Groucho interact to repress wingless signaling activity. *Nature* 395: 604–608.
32. Chen A.E., Ginty D.D., Fan C.M. 2005. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature*. 433: 317–322.
33. Chen G., Fernandez J., Mische S., Courey A.J. 1999. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 13: 2218–2230.
34. Chen S.N., Gurha P., Lombardi R., Ruggiero A., Willerson J.T., Marian A.J. 2014. The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Res.* 114: 454–468.
35. Chen X., Bonne S., Hatzfeld M., van Roy F., Green K.J. 2002. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *J Biol Chem.* 277: 10512–10522.
36. Chin M.H., Mason M.J., Xie W., Volinia S., Singer M., Peterson C., Ambartsumyan G., Aimiwu O., Richter L., Zhang J., Khvorostov I., Ott V., Grunstein M., Lavon N., Benvenisty N., Croce C.M., Clark A.T., Baxter T., Pyle A.D., Teitell M.A., Pelegri M., Plath K., Lowry W.E. 2009. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell.* 5: 111–123.
37. Chitaev N.A., Troyanovsky S.M. 1997. Direct Ca^{2+} - dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 138: 193–201.
38. Cho H.J., Lee C.S., Kwon Y.W., Paek J.S., Lee S.H., Hur J., Lee E.J., Roh T.Y., Chu I.S., Leem S.H., Kim Y., Kang H.J., Park Y.B., Kim H.S. 2010. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood.* 116: 386–395.
39. Choi H.J., Park-Snyder S., Pascoe L.T, Green K.J., Weis W.I. 2002. Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure. *Nat. Struct. Biol.* 9: 560–562.
40. Choi H.J., Weis W.I. 2005. Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol.* 346: 367–376.

41. Choi K.D., Yu J., Smuga-Otto K., Salvagiotto G., Rehrauer W., Vodyanik M., Thomson J., Slukvin I. 2009. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 27: 559–567.
42. Corrado D., Basso C., Rizzoli G., Schiavon M., Thiene G. 2003. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? *J Am Coll Cardiol.*;42: 1959–1963.
43. Corrado D., Basso C., Thiene G. 2009. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update. *Heart*. 95: 766–773.
44. Corrado D., Thiene G., Nava A., Rossi L., Pennelli N. 1990. Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlations in 22 cases. *Am J Med*. 89: 588–596.
45. Delva E., Tucker D.K., Kowalczyk A.P. 2009. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. doi: 10.1101/cshperspect.a002543
46. Den Z., Cheng X., Merched-Sauvage M., Koch P.J. 2006. Desmocollin 3 is required for pre-implantation development of the mouse embryo. *J Cell Sci*. 119: 482–489.
47. Dimos JT, Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., Wichterle H., Henderson C.E., Eggan K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 321: 1218–1221.
48. Djouadi F., Lecarpentier Y., Hébert J.L., Charron P., Bastin J., Coirault C. 2009. A potential link between peroxisome proliferator-activated receptor signalling and the pathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 84: 83–90.
49. Dodou E., Verzi M.P., Anderson J.P., Xu S.-M., Black B.L. 2004. Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*. 131: 3931–3942.
50. Doetschman T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*. 87: 27–45.
51. Easley C.A. IV, Phillips, B.T., McGuire, M.M., Barringer, J.M., Valli, H., Hermann, B.P., Simerly, C.R., Rajkovic, A., Miki, T., Orwig, K.E., Schatten G.P. 2012. Direct

- Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Haploid Spermatogenic Cells. *Cell Rep.* 2: 440–446.
52. Eguizabal C., Montserrat N., Vassena R., Barragan M., Garreta E., Garcia-Quevedo L., Vidal F., Giorgetti A., Veiga A., Izpisua Belmonte J.C. 2011. Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 29: 1186–1195.
53. Eisenmann D.M. 2005. Wnt signaling. *WormBook*, ed. The *C.elegans* Research Community, *WormBook*. doi/10.1895/wormbook.1.7.1
54. Eshkind L., Tian Q., Schmidt A., Franke W.W., Windoffer R., Leube R.E. 2002. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol.* 81: 592–598.
55. Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., Chen K., Li Y., Liu X., Xu J., Zhang S., Li F., He W., Labuda K., Song Y., Peterbauer A., Wolbank S., Redl H., Zhong M., Cai D., Zeng L., Pei D. 2010. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 6: 71–79.
56. Evans M.J., Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292: 154–156.
57. Ferreira-Martins J., Ogórek B., Cappetta D., Matsuda A., Signore S., D'Amario, D., Kostyla J., Steadman E., Ide-Iwata N., Sanada F., Iaffaldano G., Ottolenghi S., Hosoda T., Leri A., Kajstura J., Anversa P., Rota M. 2012. Cardiomyogenesis in the developing heart is regulated by c-kit-positive cardiac stem cells. *Circ. Res.* 110: 701–715.
58. Finch B.W., Ephrussi B. 1967. Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines. *PNAS.* 57: 615–621.
59. Fontaine G., Frank R., Gallais-Hamonno F., Allali I., Phan-Thuc H., Grosogeat Y. 1978. Electrocardiography of delayed potentials in post-excitation syndrome. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 71: 854–864.
60. Franke W.W., Borrmann C.M., Grund C., Pieperhoff S. 2006. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur J Cell Biol.* 85: 69–82.

61. Freund C., Davis R.P., Gkatzis K., Ward-van Oostwaard D., Mummery C.L. 2010. The first reported generation of human induced pluripotent stem cells (iPS cells) and iPS cell-derived cardiomyocytes in the Netherlands. *Neth Heart J.* 18: 51–54.
62. Fuerer C., Nusse R. 2010. Lentiviral Vectors to Probe and Manipulate the Wnt Signaling Pathway. *PLoS ONE.* 5. doi: 10.1371/journal.pone.0009370.
63. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85: 348–362.
64. Gallicano G.I., Kouklis P., Bauer C., Yin M., Vasioukhin V., Degenstein L., Fuchs E. 1998. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol.* 143: 2009–2022.
65. Garcia-Gras E., Lombardi R., Giocondo M.J., Willerson J.T., Schneider M.D., Khoury D.S., Marian A.J. 2006. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 116: 2012–2021.
66. Garrod D., Chidgey M. 2008. Desmosome structure, composition and function. *Bioch biophys Acta.* 1778: 572–587.
67. Gergen J.P., Wieschaus E.F. 1986. Localized requirements for gene activity in segmentation of *Drosophila* embryos: analysis of armadillo, fused, giant and unpaired mutations in mosaic embryos. *Roux's archives of developmental biology.* 195: 49–62.
68. Gertow K., Przyborski S., Loring J.F., Auerbach J.M., Epifano O., Otonkoski, T., Damjanov I., Ahrlund-Richter L. 2007. Isolation of human embryonic stem cell-derived teratomas for the assessment of pluripotency. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* Chapter 1, Unit1B.4. doi: 10.1002/9780470151808.sc01b04s3
69. Gerull B., Heuser A., Wichter T., Paul M., Basson C.T., McDermott D.A., Lerman B.B., Markowitz S.M., Ellinor P.T., MacRae C.A., Peters S., Grossmann K.S., Michely B., Sasse-Klaassen S., Birchmeier W., Dietz R., Breithardt G., Schulze-Bahr E., Thierfelder L. 2004. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet.* 36: 1162–1164.

70. Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan A.P., Blumenstock C., Niehrs C. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391: 357–362.
71. Godsel, L.M., Dubash A.D., Bass-Zubek A.E., Amargo E.V., Klessner J.L., Hobbs R.P., Chen X., Green K.J. 2010. Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol. Biol. Cell.* 21: 2844–2859.
72. Goossens S., Janssens B., Bonn e S., De Rycke R., Braet F., van Hengel J., van Roy F. 2007. A unique and specific interaction between alphaT-catenin and plakophilin-2 in the area composita, the mixed-type junctional structure of cardiac intercalated discs. *J Cell Sci.* 120: 2126–2136.
73. Green K.J., Gaudry C.A. 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1: 208–216.
74. Grimson M.J., Coates J.C., Reynolds J.P., Shipman M., Blanton R.L., Harwood A.J. 2000. Adherens junctions and beta-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. *Nature.* 408: 727–731.
75. Grossmann K.S., Grund C., Huelsken J., Behrend M., Erdmann B., Franke W.W., Birchmeier W. 2004. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol.* 167: 149–160.
76. Gurdon J.B. 1962. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol.* 4: 256–273.
77. Hart M.J., de los Santos R., Albert I.N., Rubinfeld B., Polakis P. 1998. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol.* 8: 573–81.
78. Hatzfeld M. 2007. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Bioch Biophys Acta.* 1773: 69–77.
79. He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 281: 1509–1512.
80. Hecht A., Vleminckx K., Stemmler M.P., van Roy F., Kemler R. 2000. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 19: 1839–1850.

81. Heid H.W., Schmidt A., Zimbelmann R., Schafer S., Winter-Simanowski S., Stumpp S., Keith M., Figge U., Schnolzer M., Franke W.W. 1994. Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: Plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation*. 58: 113–131.
82. Hierlihy, A.M., Seale, P., Lobe, C.G., Rudnicki, M.A., and Megey, L.A. 2002. The postnatal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett*. 530: 239–243.
83. Hobmayer B., Rentzsch F., Kuhn K., Happel C.M., von Laue C.C., Snyder P., Rothbacher U., Holstein T.W. 2000. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature*. 407: 186–189.
84. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., Deng H. 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 341: 651–654.
85. Hu B.Y., Weick J.P., Yu J., Ma L.X., Zhang X.Q., Thomson J.A., Zhang S.C. 2010. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *PNAS*. 107: 4335–4340.
86. Huber A.H., Nelson W. J., Weis W. I. 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of b-catenin. *Cell*. 90: 871–882.
87. Itasaki N., Jones C.M., Mercurio S., Rowe A., Domingos P.M., Smith J.C., Krumlauf R. 2003. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development*. 130: 4295–305.
88. Itzhaki I., Maizels L., Huber I., Gepstein A., Arbel G., Caspi O., Miller L., Belhassen B., Nof E., Glikson M., Gepstein L. 2012. Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells. *J Am Coll Cardiol*. 60: 990–1000.
89. Itzhaki I., Maizels L., Huber I., Zwi-Dantsis L., Caspi O., Winterstern A., Feldman O., Gepstein A., Arbel G., Hammerman H., Boulos M., Gepstein L. 2011. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells // *Nature*. 471: 225–229.
90. Itzhaki I., Rapoport S., Huber I., Mizrahi I., Zwi-Dantsis L., Arbel G., Schiller J., Gepstein L. 2011. Calcium handling in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *PLoS ONE*. 6. doi: 10.1371/journal.pone.0018037
91. Jacobson S.L., Banfalvi M., Schwarzfeld T.A. 1985. Long-term primary cultures of adult human and rat cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*. 80. Suppl 1: 79–82.

92. Jia F., Wilson K.D., Sun N., Gupta D.M., Huang M., Li Z., Panetta N.J., Chen Z.Y., Robbins R.C., Kay M.A., Longaker M.T., Wu J.C. 2010. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*. 7: 197–199.
93. Jones J.C., Goldman R.D. 1985. Intermediate filaments and the initiation of desmosome assembly. *J. Cell Biol.* 101: 506–517.
94. Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 458: 771–775.
95. Kang L., Wang J., Zhang Y., Kou Z., Gao S. 2009. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*. 5:135–138.
96. Kattman S.J., Witty A.D., Gagliardi M., Dubois N.C., Niapour M., Hotta A., Ellis J., Keller G. 2011. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 8: 228–240.
97. Kawamura T., Suzuki J., Wang Y.V., Menendez S., Morera L.B., Raya A, Wahl G.M., Izpisua Belmonte J.C. 2009. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*. 460: 1140–1144.
98. Kim C., Wong J., Wen J., Wang S., Wang C., Spiering S., Kan N.G., Forcales S., Puri P.L., Leone T.C., Marine J.E., Calkins H., Kelly D.P., Judge D.P., Chen H.S. 2013. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 494: 105–110.
99. Kim D., Kim C.H., Moon J.I., Chung Y.G., Chang M.Y., Han B.S., Ko S., Yang E., Cha K.Y., Lanza R., Kim K.S. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 4: 472–476.
100. Kishida S., Yamamoto H., Ikeda S., Kishida M., Sakamoto I., Koyama S., Kikuchi A. 1998. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 273: 10823–10826.
101. Kleinsmith L.J., Pierce G.B. Jr. 1964. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 24: 1544–1551.
102. Knollmann B.C. 2013. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: boutique science or valuable arrhythmia model? *Circ Res.* 112: 969–976.

103. Kowalczyk A.P., Hatzfeld M., Bornslaeger E.A., Kopp D.S., Borgwardt J.E., Corcoran C.M., Settler A., Green K.J. 1999. The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *J Biol Chem.* 274: 18145–18148.
104. Kowalczyk A.P., Navarro P., Dejana E., Bornslaeger E.A., Green K.J., Kopp D.S., Borgwardt J.E. 1998. VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J. Cell Sci.* 111: 3045–3057.
105. Kowalczyk A.P., Stappenbeck T.S., Parry D.A., Palka H.L., Virata M.L., Bornslaeger E.A., Nilles L.A., Green K.J. 1994. Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophys Chem.* 50: 97–112.
106. Kramps T., Peter O., Brunner E., Nellen D., Froesch B., Chatterjee S., Murone M., Züllig S., Basler K. 2002. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell.* 109: 47–60.
107. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–685.
108. Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V., Muskheli V., Fugate J.A., Dupras S.K., Reinecke H., Xu C., Hassanipour M., Police S., O'Sullivan C., Collins L., Chen Y., Minami E., Gill E.A., Ueno S., Yuan C., Gold J., Murry C.E. 2007. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 25: 1015–1024.
109. Lan F., Lee A.S., Liang P., Sanchez-Freire V., Nguyen P.K., Wang L., Han L., Yen M., Wang Y., Sun N., Abilez O.J., Hu S., Ebert A.D., Navarrete E.G., Simmons C.S., Wheeler M., Pruitt B., Lewis R., Yamaguchi Y., Ashley E.A., Bers D.M., Robbins R.C., Longaker M.T., Wu J.C. 2013. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 12: 101–113.
110. Latres E., Chiaur D.S., Pagano M. 1999. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene.* 18: 849–854.
111. Laugwitz K.-L., Moretti A., Lam J., Gruber P., Chen Y., Woodard S., Lin L.Z., Cai C.L., Lu M.M., Reth M., Platoshyn O., Yuan J.X., Evans S., Chien K.R. 2005. Postnatal

- isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 433: 647–653.
112. Li B., Jia Z., Wang T., Wang W., Zhang C., Chen P., Ma K., Zhou C. 2012. Interaction of Wnt/ β -catenin and notch signaling in the early stage of cardiac differentiation of P19CL6 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 113: 629–639.
113. Li D., Liu Y., Maruyama M., Zhu W., Chen H., Zhang W., Reuter S., Lin S.F., Haneline L.S., Field L.J., Chen P.S., Shou W. 2011. Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*. 20: 4582–4596.
114. Li J., Swope D., Raess N., Cheng L., Muller E.J., Radice G.L. 2011. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of beta-catenin signaling. *MolCellBiol*. 31: 1134–1144.
115. Li W., Zhou H., Abujarour R., Zhu S., Young Joo J., Lin T., Hao E., Schöler H.R., Hayek A., Ding S. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells*. 27: 2992–3000.
116. Lian X., Hsiao C., Wilson G., Zhu K., Hazeltine L.B., Azarin S.M., Raval K.K., Zhang J., Kamp T.J., Palecek S.P. 2012. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *PNAS*. 109: 1848–1857.
117. Lin Q., Schwarz J., Bucana C., Olson E.N. 1997. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*. 276: 1404–1407.
118. Lin T., Chao C., Saito S., Mazur S.J., Murphy M.E., Appella E., Xu Y. 2005. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*. 7: 165–171.
119. Liu C., Kato Y., Zhang Z., Do V.M., Yankner B.A., He X. 1999. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *PNAS*. 96: 6273–6278.
120. Liu C., Li Y., Semenov M., Han C., Baeg G.H., Tan Y., Zhang Z., Lin X., He X. 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 108: 837–47.

121. Lombardi R., Dong J., Rodriguez G., Bell A., Leung T.K., Schwartz R.J., Willerson J.T., Brugada R., Marian A.J. 2009. Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Res.* 104:1076–1084.
122. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., Pyle A.D., Tchieu J., Sridharan R., Clark A.T., Plath K. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *PNAS.* 105: 2883–2888.
123. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. 2008. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 3: 340–345.
124. Maherali N., Hochedlinger K. 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 3: 595–605.
125. Maherali N., Hochedlinger K. 2009. Tgf[β] signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Current Biology.* 19: 1718–1723.
126. Malan D., Friedrichs S., Fleischmann B.K., Sasse P. 2011. Cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical disease-specific features in vitro. *Circ Res.* 109: 841–847.
127. Marcus F.I., Fontaine G., Guiraudon G., Frank R., Laurenceau J.L., Malergue S., Grosgeat Y. 1982. Right ventricular dysplasia. A report of 24 adult cases. *Circulation.* 65: 384–398.
128. Martin G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS.* 78: 7634–7638.
129. Matsui Y., Zsebo, K., Hogan, B.L. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* 70: 841–847.
130. Mazzarello P., Calligaro A.L., Calligaro A. 2001. Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 776–81.
131. McGrath J.A., McMillan J.R., Shemanko C.S., Runswick S.K., Leigh I.M., Lane E.B., Garrod D.R., Eady R.A. 1997. Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Gen.* 17: 240–244.
132. McKoy G., Protonotarios N., Crosby A., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Coonar A., Norman M., Baboonian C., Jeffery S., McKenna W.J. 2000. Identification of a deletion in

- plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet*. 355: 2119–2124.
133. Merner N.D., Hodgkinson K.A., Haywood A.F., Connors S., French V.M., Drenckhahn J.D., Kupprion C., Ramadanova K., Thierfelder L., McKenna W., Gallagher B., Morris-Larkin L., Bassett A.S., Parfrey P.S., Young T.L. 2008. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet*. 82: 1–13.
134. Mertens C., Hofmann I., Wang Z., Teichmann M., Sepeshri Chong S., Schnölzer M., Franke W.W. 2001. Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *PNAS*. 98: 7795–7800.
135. Mertens C., Kuhn C., Franke W.W. 1996. Plakophilins 2a and 2b: Constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol*. 135: 1009–1025.
136. Messina E., De Angelis L., Frati G., Morrone S., Chimenti S., Fiordaliso F., Salio M., Battaglia M., Latronico M.V., Coletta M., Vivarelli E., Frati L., Cossu G., Giacomello A. 2004. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 95: 911–921.
137. Mitcheson J.S., Hancox J.C., Levi A.J. 1998. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc. Res*. 39: 280–300.
138. Miyoshi N., Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dewi D.L., Kano Y., Nishikawa S., Tanemura M., Mimori K., Tanaka F., Saito T., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. 2011. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*. 8: 633–638.
139. Moretti A., Bellin M., Welling A., Jung C.B., Lam J.T., Bott-Flügel L., Dorn T., Goedel A., Höhnke C., Hofmann F., Seyfarth M., Sinnecker D., Schömig A., Laugwitz K-L. 2010. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 363: 1397–1409.
140. Morrow K.A., Shevde L.A. 2012. Merlin: the wizard requires protein stability to function as a tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta*. 1826: 400–406.

141. Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spijker R., van den B.S., Hassink R., van der H.M., Opthof T., Pera M., de la Riviere A.B., Passier R., Tertoolen L. 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*. 107: 2733–2740.
142. Narazaki G., Uosaki H., Teranishi M., Okita K., Kim B., Matsuoka S., Yamanaka S., Yamashita J.K. 2008. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 118: 498–506.
143. Nava A., Bauce B., Basso C., Muriago M., Rampazzo A., Villanova C., Daliento L., Buja G., Corrado D., Danieli G.A., Thiene G. 2000. Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 36: 2226–2233.
144. Ng E.S., Davis R.P., Azzola L., Stanley E.G., Elefanty A.G. 2005. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood*. 106: 1601–1603.
145. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Schöler H., Smith A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 95: 379–391.
146. Niwa A., Heike T., Umeda, K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.K. 2011. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One*. 6. doi: 10.1371/journal.pone.0022261
147. Notari M., Hu Y., Koch .S, Lu M., Ratnayaka I., Zhong S., Baer C., Pagotto A., Goldin R., Salter V., Candi E., Melino G., Lu X. 2011. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification. *PNAS*. 108: 16645–16650.
148. Notari M., Hu Y., Sutendra G., Dedeić Z., Lu M., Dupays L., Yavari A., Carr C.A., Zhong S., Opel A., Tinker A., Clarke K., Watkins H., Ferguson D.J., Kelsell D.P., de Noronha S., Sheppard M.N., Hollinshead M., Mohun T.J., Lu X. 2015. iASPP, a previously unidentified regulator of desmosomes, prevents arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)–induced sudden death. *PNAS*. 112: 973–981.

149. Novak A., Barad L., Zeevi-Levin N., Shick R., Shtrichman R., Lorber A., Itskovitz-Eldor J., Binah O. 2012. Cardiomyocytes generated from CPVTD307H patients are arrhythmogenic in response to β -adrenergic stimulation. *J Cell Mol Med.* 16: 468–482.
150. Nusse R., Varmus H.E. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* Nov. 31: 99–109.
151. Oh H., Bradfute S. B., Gallardo T.D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina, Y., Pocius J., Michael L.H., Behringer R.R., Garry D.J., Entman M.L., Schneider M.D. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *PNAS.* 100: 12313–12318.
152. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313–317.
153. Oxford E.M., Musa H., Maass K., Coombs W., Taffet S.M., Delmar M. 2007. Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circ Res.* 101: 703–711.
154. Panula S., Medrano J.V., Kee, K., Bergström, R., Nguyen, H.N., Byers, B., Wilson, K.D., Wu, J.C., Simon, C., Hovatta, O., Reijo Pera R.A. 2011. Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 20: 752–762.
155. Papaioannou V.E., Gardner R.L., McBurney M.W., Babinet C., Evans M.J. 1978. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 44: 93–104.
156. Parker D.S., Jemison J., Cadigan K.M. 2002. Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wntless signaling in *Drosophila*. *Development* 129: 2565–2576.
157. Passier R., Mummery C. 2003. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res.* 58: 324–335.
158. Passier R., Oostwaard D.W., Snapper J., Kloots J., Hassink R.J., Kuijk E., Roelen B., de la Riviere A.B., Mummery C. 2005. Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells.* 23: 772–780.
159. Penn E.J., Hobson C., Rees D.A., Magee A.I. 1987. Structure and assembly of desmosome junctions: biosynthesis, processing, and transport of the major protein and glycoprotein components in cultured epithelial cells. *J. Cell Biol.* 105: 57–68.

160. Pilichou K., Nava A., Basso C., Beffagna G., Bauce B., Lorenzon A., Frigo G., Vettori A., Valente M., Towbin J., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A. 2006. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 113: 1171–1179.
161. Pouly J., Bruneval P., Mandet C., Proksch S., Peyrard S., Amrein C., Bousseaux V., Guillemain R., Deloche A., Fabiani J.N., Menasché P. 2008. Cardiac stem cells in the real world. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 135: 673–678.
162. Quarta G., Syrris P., Ashworth M., Jenkins S., Zuborne Alapi K., Morgan J., Muir A., Pantazis A., McKenna W.J., Elliott P.M. 2012. Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 33: 1128–1136.
163. Rampazzo A., Nava A., Malacrida S., Beffagna G., Bauce B., Rossi V., Zimbello R., Simionati B., Basso C., Thiene G., Towbin J.A., Danieli G.A. 2002. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 71: 1200–1206.
164. Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L., Donovan P.J. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. 359: 550–551.
165. Richardson P., McKenna W.J., Bristow M., Maisch B., Mautner B., O’Connell J., Olsen O., Thiene G., Goodwin J., Gyarfás I., Martin I., Nordet P. 1996. Report of the 1995 WHO/ISFC Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 93: 841–842.
166. Rickman L., Simrak D., Stevens H.P., Hunt D.M., King I.A., Bryant S.P., Eady R.A., Leigh I.M., Arnemann J., Magee A.I., Kelsell D.P., Buxton R.S. 1999. N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum. Mol. Genet*. 8: 971–976.
167. Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H., Loh Y.H., Wang B., Ng H.H., Robson P. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 280: 24731–24737.
168. Ruiz P., Brinkmann V., Ledermann B., Behrend M., Grund C., Thalhammer C., Vogel F., Birchmeier C., Gunthert U., Franke W.W., Birchmeier W. 1996. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol*. 135: 215–225.

169. Salinas P.C. 1999. Wnt factors in axonal remodelling and synaptogenesis. *Biochem Soc Symp.* 65: 101–109.
170. Salinas P.C. 2007. Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends Cell Biol.* 17: 333–342.
171. Sanders P.G., Munoz-Descalzo S., Balayo T., Wirtz-Peitz F., Hayward P., Arias A.M. 2009. Ligand-independent traffic of Notch buffers activated Armadillo in *Drosophila*. *PLoS Biol* 7.. doi: 10.1371/journal.pbio.1000169
172. Schmelz M., Franke W.W. 1993. Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: The syndesmos connecting rethelial cells of lymph nodes. *Eur. J. Cell Biol.* 61: 274–289.
173. Schmidt A., Langbein L., Pratzel S., Rode M., Rackwitz H.R., Franke W.W. 1999. Plakophilin 3 – a novel cell-type- specific desmosomal plaque protein. *Differentiation.* 64: 291–306.
174. Schmidt A., Langbein L., Rode M., Pratzel S., Zimbelmann R., Franke W.W. 1997. Plakophilins 1a and 1b: Widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res.* 290: 481–499.
175. Seeger T.S., Frank D., Rohr C., Will R., Just S., Grund C., Lyon R., Luedde M., Koegl M., Sheikh F., Rottbauer W., Franke W.W., Katus H.A., Olson E.N., Frey N. 2010. Myozap, a novel intercalated disc protein, activates serum response factor-dependent signaling and is required to maintain cardiac function in vivo. *Circ Res.* 106: 880–890.
176. Shambloott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *PNAS.* 95: 13726–13731.
177. Sharma R.P., Chopra V.L. 1976. Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 48: 461–465.
178. Shi Y., Do J.T., Despons C., Hahm H. S., Schöler H.R., Ding S. 2008. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2: 525–528.
179. Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D’Amico M., Pestell R, Ben-Ze'ev A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *PNAS.* 96: 5522–5527.

180. Simcha I., Shtutman M., Salomon D., Zhurinsky J., Sadot E., Geiger B., Ben-Ze'ev A. 1998. Differential nuclear translocation and transactivation potential of β -catenin and plakoglobin. *J. Cell Biol.* 141: 1433–1448.
181. Simons M., Mlodzik M. 2008. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet.* 42: 517–540.
182. Singh M.K., Epstein J.A. 2012. Epicardium-derived cardiac mesenchymal stem cells: expanding the outer limit of heart repair. *Circ Res.* 110: 904–906.
183. Si-Tayeb K., Noto F.K., Nagaoka M., Li J., Battle M.A., Duris C., North P.E., Dalton S., Duncan S.A. 2010. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology.* 51: 297–305.
184. Slusarski D.C., Corces V.G., Moon R.T. 1997a. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature.* 390: 410–413.
185. Slusarski D.C., Yang-Snyder J., Busa W.B., Moon R.T. 1997b. Modulation of embryonic intracellular Ca^{2+} signaling by Wnt-5A. *Dev Biol.* 182: 114–120.
186. Smits A.M., van Vliet P., Metz C.H., Korfage T., Sluijter J.P., Doevendans, P.A., Goumans M.-J. 2009. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nature protocols.* 4: 232–243.
187. Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G.W., Cook E.G., Hargus G., Blak A., Cooper O., Mitalipova M., Isaacson O., Jaenisch R. 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell.* 136: 964–977.
188. Solter D. 2006. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat. Rev. Genet.* 7: 319–327.
189. Sommer C.A., Sommer A.G., Longmire T.A., Christodoulou C., Thomas D.D., Gostissa M., Alt F.W., Murphy G.J., Kotton D.N., Mostoslavsky G. 2010. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells.* 28: 64–74.
190. Soufi A., Donahue G., Zaret K.S. 2012. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell.* 151: 994–1004.

191. Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 322: 945–949.
192. Stappenbeck T.S., Lamb J.A., Corcoran C.M., Green K.J. 1994. Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament network *J. Biol. Chem.* 269: 29351–29354.
193. Stevens L.C. 1960. Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse. *Dev Biol.* 2: 285–297.
194. Sultana N., Zhang L., Yan J., Chen J., Cai W., Razzaque S., Jeong D., Sheng W., Bu L., Xu M., Huang G.Y., Hajjar R.J., Zhou B., Moon A., Cai C.L. 2015. Resident c-kit(+) cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun.* 6. doi: 10.1038/ncomms9701
195. Sun N., Yazawa M., Liu J., Han L., Sanchez-Freire V., Abilez O.J., Navarrete E.G., Hu S., Wang L., Lee A., Pavlovic A., Lin S., Chen R., Hajjar R.J., Snyder M.P., Dolmetsch R.E., Butte M.J., Ashley E.A., Longaker M.T., Robbins R.C., Wu J.C. 2012. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med.* 4. doi: 10.1126/scitranslmed.3003552
196. Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., Morita M., Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodríguez-Esteban C., Izpisua Belmonte J.C. 2006. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *PNAS.* 103: 10294–10299.
197. Syrris P., Ward D., Evans A., Asimaki A., Gandjbakhch E., Sen-Chowdhry S., McKenna W.J. 2006. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet.* 79: 978–984.
198. Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 11: 1553–1558.
199. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131: 861–872.
200. Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126: 663–676.
201. Takayama N., Nishimura S., Nakamura S., Shimizu T., Ohnishi R., Endo H., Yamaguchi T., Otsu M., Nishimura K., Nakanishi M., Sawaguchi A., Nagai R., Takahashi K.,

- Yamanaka S., Nakauchi H., Eto K. 2010. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J. Exp. Med.* 207: 2817–2830.
202. Takemaru K.I., Moon R.T. 2000. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* 149: 249–254.
203. Tamai K., Semenov M., Kato Y., Spokony R., Liu C., Katsuyama Y., Hess F., Saint-Jeannet J.P., He X. 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 407:530–35.
204. Tanaka T., Tohyama S., Murata M., Nomura F., Kaneko T., Chen H., Hattori F., Egashira T., Seki T., Ohno Y., Koshimizu U., Yuasa S., Ogawa S., Yamanaka S., Yasuda K., Fukuda K. 2009. In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 385: 497–502.
205. Taylor M., Graw S., Sinagra G., Barnes C., Slavov D., Brun F., Pinamonti B., Salcedo E.E., Sauer W., Pyxaras S., Anderson B., Simon B., Bogomolovas J., Labeit S., Granzier H., Mestroni L. 2011. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation.* 124: 876–885.
206. Thiene G. 2015. The research venture in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a paradigm of translational medicine. *Eur Heart J.* 36: 837–846.
207. Thiene G., Marcus F. 2013. Arrhythmogenic cardiomyopathy: a biventricular disease in search of a cure. *Heart Rhythm.* 10: 290–291.
208. Thiene G., Nava A., Corrado D., Rossi L., Pennelli N. 1988. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med.* 318: 129–133.
209. Thompson B., Townsley F., Rosin-Arbesfeld R., Muisi H., Bienz M. 2002. A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* 4: 367–373.
210. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282: 1145–1147.
211. Tiso N., Stephan D.A., Nava A., Bagattin A., Devaney J.M., Stanchi F., Larderet G., Brahmbhatt B., Brown K., Baucé B., Muriago M., Basso C., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A. 2001. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet.* 10: 189–194.

212. Tolwinski N.S., Wieschaus E. 2004. A nuclear function for Armadillo/beta-Catenin. *PLoS Biol.* 2. doi: 10.1371/journal.pbio.0020095
213. Tomioka M., Nishimoto M., Miyagi S., Katayanagi T., Fukui N., Niwa H., Muramatsu M., Okuda A. 2002. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res.* 30: 3202–3213.
214. Ueno S., Weidinger G., Osugi T., Kohn A.D., Golob J.L., Pabon L., Reinecke H., Moon R.T., Murry C.E. 2007. Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *PNAS.* 104: 9685–9690.
215. van de Wetering M., Cavallo R., Dooijes D., van Beest M., van Es J., Loureiro J., Ypma A., Hursh D., Jones T., Bejsovec A., Peifer M., Mortin M., Clevers H. 1997. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell.* 88: 789–99.
216. van der Zwaag P.A., van Rijsingen I.A., Asimaki A., Jongbloed J.D., van Veldhuisen D.J., Wiesfeld A.C., Cox M.G., van Lochem L.T., de Boer R.A., Hofstra R.M., Christiaans I., van Spaendonck-Zwarts K.Y., Lekanne dit Deprez R.H., Judge D.P., Calkins H., Suurmeijer A.J., Hauer R.N., Saffitz J.E., Wilde A.A., van den Berg M.P., van Tintelen J.P. 2012. Phospholamban R14del mutation in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: evidence supporting the concept of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 14: 1199–1207.
217. van Hengel J., Calore M., Baucé B., Dazzo E., Mazzotti E., De Bortoli M., Lorenzon A., Li Mura I.E., Beffagna G., Rigato I., Vleeschouwers M., Tyberghein K., Hulpiau P., van Hamme E., Zaglia T., Corrado D., Basso C., Thiene G., Daliento L., Nava A., van Roy F., Rampazzo A. 2013. Mutations in the area composita protein α T-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 34: 201–210.
218. van Tintelen J.P., Van Gelder I.C., Asimaki A., Suurmeijer A.J., Wiesfeld A.C., Jongbloed J.D., van den Wijngaard A., Kuks J.B., van Spaendonck-Zwarts K.Y., Notermans N., Boven L., van den Heuvel F., Veenstra-Knol H.E., Saffitz J.E., Hofstra R.M., van den Berg M.P. 2009. Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene. *Heart Rhythm.* 6: 1574–1583.

219. Viswanathan S.R., Daley G.Q., Gregory R.I. 2008. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 320: 97–100.
220. Wallis S., Lloyd S., Wise I., Ireland G., Fleming T.P., Garrod D. 2000. The α isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*. 11: 1077–1092.
221. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., Daley G.Q., Brack A.S., Collins J.J., Cowan C., Schlaeger T.M., Rossi D.J. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 7: 618–630.
222. Waschke J., Bruggeman P., Baumgartner W., Zillikens D., Drenckhahn D. 2005. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest*. 115: 3157–3165.
223. Watt F.M., Matthey D.L., Garrod D.R. 1984. Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes. *J. Cell Biol*. 99: 2211–2215.
224. Weismann A. 1893. *The Germ-Plasm: A Theory of Heredity*. Charles Scribner's Sons., New York.
225. Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 448: 318–324.
226. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385: 810–813.
227. Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., Desai R., Mileikovsky M., Hamalainen R., Cowling R., Wang W., Liu P., Gertsenstein M., Kaji K., Sung H.K., Nagy A. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 458: 766–770.
228. Xu X.Q., Graichen R., Soo S.Y., Balakrishnan T., Rahmat S.N., Sieh S., Tham S.C., Freund C., Moore J., Mummery C., Colman A., Zweigerdt R., Davidson B.P. 2008. Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Differentiation*. 76: 958–970.

229. Yanagawa S., Matsuda Y., Lee J.S., Matsubayashi H., Sese S., Kadowaki T., Ishimoto A. 2002. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J.* 21: 1733–1742.
230. Yanagawa S., van Leeuwen F., Wodarz A., Klingensmith J., Nusse R. 1995. The dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1: 1087–1097.
231. Yang L., Soonpaa M.H., Adler E.D., Roepke T.K., Kattman S.J., Kennedy M., Henckaerts E., Bonham K., Abbott G.W., Linden R.M., Field L.J., Keller G.M. 2008. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic stem cell-derived population. *Nature.* 453: 524–528.
232. Yokoo N., Baba S., Kaichi S., Niwa A., Mima T., Doi H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T. 2009. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 387:482–488.
233. Yost C., Torres M., Miller J.R., Huang E., Kimelman D., Moon R.T. 1996. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10: 1443–1454.
234. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science.* 324: 797–801.
235. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318: 1917–1920.
236. Yuan H., Corbi N., Basilico C., Dailey L. 1995. Developmental-specific activity of the FGF4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9: 2635–2645.
237. Yusa K., Rad R., Takeda J., Bradley A. 2009. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nature methods.* 6: 363–369.
238. Zhang J., Wilson G.F., Soerens A.G., Koonce C.H., Yu J., Palecek S.P., Thomson J.A., Kamp T.J. 2009. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res.* 104: 30–41.

239. Zhao X.Y., Li W., Lv Z., Liu L., Tong M., Hai T., Hao J., Guo CL., Ma Q.W., Wang L., Zeng F., Zhou Q. 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 461: 86–90.
240. Zhou H., Wu S., Joo J.Y., Zhu S., Han D.W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., Siuzdak G., Scholer H.R., Duan L., Ding S. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 4: 381–384.
241. Zhou W., Freed C.R. 2009. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem cells*. 27: 2667–2674.
242. Zhurinsky J., Shtutman M., Ben-Ze'ev A. 2000. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol*. 20: 4238–4252.
243. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7: 211–228.
244. Zwaka T.P., Thomson J.A. 2005. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development*. 132: 227–233.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям Анне Борисовне Малашичевой и Алексею Николаевичу Томилину за помощь на всех этапах работы и в процессе написания диссертации, критическую оценку результатов и моральную поддержку.

Автор сердечно благодарит директора Института молекулярной биологии и генетики Анну Александровну Костареву за предоставленную возможность работать с интереснейшим клиническим материалом и всестороннюю поддержку.

Автор выражает глубокую благодарность коллективу Лаборатории молекулярной кардиологии и Лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток за помощь в проведении экспериментов, обсуждение результатов, доброжелательную атмосферу и ненаучное общение.

Автор чрезвычайно признателен Марине Георгиевне Мартыновой за помощь с получением электронных микрофотографий.

Автор выражает глубокую благодарность Kaomei Guan (Медицинский университет Гёттингена), Katriina Aalto-Setälä (Университет Тампере) и Henna Venäläinen (Университет Тампере) за обучение методам работы с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками человека.

Автор благодарит Олега Шувалова и Марину Антонову за совместный спортивный и неспортивный досуг.

Автор глубоко признателен своей замечательной семье за поддержку и понимание.