

УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора

Федерального государственного бюджетного
научного учреждения "Институт
экспериментальной медицины"

профессор д.м.н. Е.В. Шайдаков

28 марта 2016 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Институт экспериментальной медицины" о диссертации А.А. Худякова «ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ WNT В РАЗВИТИИ АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ НА МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность исследования.

Первым проявлением аритмогенной кардиомиопатии (АКМП) может быть внезапная смерть. Это определяет важность понимания механизмов, лежащих в основе названного аутосомно-доминантного заболевания. Мутации при АКМП обнаруживаются в целом ряде генов, кодирующих белки десмосом. Более половины генетически охарактеризованных случаев АКМП связано с мутациями в гене плакофиллина-2 (*PKP2*). Включение белков - продуктов мутантных генов в десмосому или недостаточность отдельных белков десмосом приводит к нарушению межклеточных контактов, связей между соседними кардиомиоцитами, и, таким образом, патологическим дефектам в электрической и механической целостности миокарда. Несколько линий доказательств свидетельствует о вовлеченности сигнального пути Wnt в развитие АКМП. На трансгенных мышцах *in vivo*, а также на линии кардиомиоцитов мыши HL-1 *in vitro* было показано, что при мутациях в гене плакоглобина или при отсутствии десмоплакина, плакоглобин может транспортироваться в ядро, где он конкурирует с β -катенином за взаимодействие с регуляторными элементами в ДНК и может ингибировать

сигнальный путь Wnt. Связывание измененных мутациями форм плакоглобина с регуляторными элементами может быть необратимым, что ведет к постоянному подавлению пути Wnt и адипогенезу. Напротив, на трансгенных мышцах с условным нокаутом *PKP2* была отмечена активация сигнального пути Wnt. В мировых исследованиях имеются неоднозначные суждения об активации сигнального пути Wnt при индуцированном тканеспецифичном выключении *PKP2* в кардиомиоцитах. Наблюдаемое при этом повышение уровня цитоплазматического β -катенина шло параллельно с увеличением активности сигнального пути TGF- β , имеющего большое значение для регуляции процессов апоптоза и гипертрофии кардиомиоцитов. Подавление экспрессии гена *PKP2* другими исследователями было связано с аномальной активацией сигнального пути Hippo. Новые возможности изучения молекулярных механизмов АКМП связаны со ставшими доступными кардиомиоцитами, полученными при дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). Эти клетки воспроизводят в культуре типичные для АКМП черты: реорганизацию десмосом, накопление липидных капель в клетках, повышенный уровень апоптоза. Мутации в гене *PKP2*, приводящие к перемещению плакоглобина в ядро, имеют результатом снижение в кардиомиоцитах сигнального пути Wnt. Поскольку механизм реализации мутаций в гене *PKP2* при АКМП остается неизвестным, следует признать изучение роли мутаций *PKP2* в реализации сигнального пути Wnt в кардиомиоцитах актуальной и нерешенной задачей.

Научная новизна работы.

В диссертационной работе впервые произведена оценка активности сигнального пути Wnt в первичных культурах клеток, полученных от пациентов с АКМП, а также изучены последствия внесения мутантных вариантов гена *PKP2* в иПСК с их последующей дифференцировкой в кардиомиоциты. Целью работы стало изучение механизмов влияния измененного мутациями плакофиллина-2 на сигнальный путь Wnt в иПСК от пациентов с АКМП. В соответствии с целью были сформулированы задачи работы, в числе которых было исследование влияния уровня экспрессии плакофиллина-2 дикого типа и его мутантных форм на активность канонического сигнального пути Wnt при дифференцировке иПСК в

кардиомиоциты, а также в мезенхимных стромальных клетках и мезенхимных клетках сердца от пациентов с АКМП и здоровых доноров. В работе предполагалось и удалось дополнительно изучить другие сигнальные пути-регуляторы клеточной дифференцировки, в частности, пути Notch, активность которых могла отличаться у пациентов с АКМП и у здоровых доноров. В диссертации впервые показано, что в ходе кардиогенной дифференцировки иПСК от пациентов с АКМП изменена активность сигнальных путей Wnt и Notch, причем впервые установлена связь между уровнем экспрессии гена плакофилина и активностью сигнального пути Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки иПСК.

Практическая значимость. Результаты исследования показывают необходимость сочетания генетических и функциональных исследований с применением различных клеточных моделей для оценки роли наследуемых мутаций. В частности, определено, что мутация H1684R в гене десмоплакина (*DSP*) не влияет на уровень экспрессии *PKP2* в ходе дифференцировки иПСК, но приводит к снижению активности сигнального пути Wnt. Результаты работы могут быть использованы в курсах лекций по клеточной биологии и трансляционной медицине.

Достоверность результатов исследования основана на надежности примененных экспериментальных методик и на надлежащей статистической обработке данных.

Оформление работы и ее содержание. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из следующих глав: “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы исследования”, “Результаты”, “Обсуждение”, “Выводы”. Материалы диссертации изложены на 135 страницах машинописного текста и иллюстрированы 42 рисунками и 4 таблицами. Список литературы содержит 244 наименования, все исключительно на иностранных языках, оформлен тщательно. Работа написана хорошим ясным научным языком, аккуратно выверена на предмет опечаток. Переходя к анализу отдельных разделов диссертации, следует отметить, что все части написаны с достаточной степенью детализации и полноты, вместе с тем вполне лаконично, что говорит о профессионализме и зрелости исследователя. Раздел “Материалы и методы исследования” содержит детальное

описание всех проведенных в работе процедур, необходимые сведения о культивировании клеток, индукции плюрипотентности, примененных праймерах для количественной и полуколичественной ПЦР, а также для секвенирования. Активность канонического сигнального пути Wnt осуществляли с помощью репортерной конструкции TopFlash, в которой ген люциферазы находился под контролем промотора с сайтами связывания TCF/LEF, а также оценивая экспрессию генов-мишеней Wnt *AXIN2*, *SOX2* и *SOX9* при индукции кардиогенной дифференцировки и ПСК. В процессе дифференцировки обнаруживалось однотипное изменение активности люциферазного репортера, которая повышалась на 7 сутки дифференцировки, а затем постепенно снижалась, что позволило выбрать точку 7 суток кардиогенной дифференцировки как наиболее информативную для оценки сигнального пути Wnt. В числе важнейших результатов диссертации отметим следующие. В клетках, несущих мутации с.354delT или K859R в гене *PKP2*, активность сигнального пути Wnt оказалась сниженной, а в клетках, несущих мутацию с.1521-1536del в том же гене, - повышенной. Автор предположительно связывает различные эффекты мутаций с.345delT и с.1521-1536del, обе из которых приводят к сдвигу рамки считывания в мРНК плакофиллина и, как следствие, к нефункциональному белку с тем, что во втором случае образуется более длинный белок, включающий 470 аминокислот и полноценный head-домен (длиной 377 аминокислот). Диссертант предполагает, что наличие полноценного head-домена позволяет плакофиллину-2 включаться в состав десмосом и выполнять присущие ему функции. К сожалению, в работе не установлено, находились ли мутации с.354delT (вероятно, ее обозначение как с.23321delT на страницах 62 и 102 следует читать как g.23321delT) и K859R у пациента с АКМП1 в одном аллеле или в разных. Это можно было проверить на кДНК плакофиллина, выделенной из тканей больного АКМП1, с помощью аллель-специфичной ПЦР или путем анализа ДНК родственников больного. Из текста не понятно, вносились ли эти мутации в клетки в составе одной вирусной конструкции или разных. В работе установлено, что уровень экспрессии *PKP2* регулирует сигнальный путь Wnt в ходе кардиогенной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток. Как определено по изменению активности репортерного гена

люциферазы и экспрессии генов *SOX2* и *SOX9*, патологические формы плакофиллина способны модулировать активность сигнального пути Wnt. Понижение активности сигнального пути Wnt, по наблюдениям диссертанта, не сопровождалось перемещением в ядро десмосомного белка плакоглобина, что свидетельствует о существовании плакоглобин-независимого пути десмосомной регуляции сигнального пути Wnt.

Выводы диссертации полностью отражают главные результаты проведенного исследования, основаны на оригинальном экспериментальном материале автора, обоснованы. Опубликованные научные работы и автореферат достаточно хорошо отражают содержание диссертации.

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертаций. Основные положения работы прошли апробацию на научных конференциях.

Работа выполнена на высоком уровне, отвечает современным направлениям в развитии молекулярной и клеточной биологии. Замечаний по существу работы не имеется. Имеются небольшие стилистические погрешности, в частности, неудачным с точки зрения русского языка является словосочетание “мутантные белки”; следует говорить о белках-продуктах мутантных генов. Полученные данные представляют интерес для специалистов-генетиков, кардиологов, клеточных биологов, молекулярных биологов и биохимиков и могут быть использованы в соответствующих учреждениях РАН (Институт биологии гена, Институт молекулярной генетики, Москва, Институт цитологии и генетики, Новосибирск), МЗ РФ (НИИ экспериментальной кардиологии РКНПК в Москве, СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова в Санкт-Петербурге), а также на кафедрах генетики и клеточной биологии университетов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

На основании вышеизложенного считаем, что представленная к защите диссертационная работа А.А. Худякова “Изучение роли сигнального пути Wnt в развитии аритмогенной кардиомиопатии на модели индуцированных

плюрипотентных стволовых клеток”, выполненная под руководством д.б.н., член-корр. РАН А.Н. Томилина и к.б.н. А.Б. Малашичевой является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новый подход к решению актуальной научной задачи – исследованию сигнальных путей в дифференцирующихся клетках человека.

По своей актуальности, объему проведенного исследования, научной новизне, теоретической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а ее автор Худяков Александр Александрович заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании Отдела молекулярной генетики ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины” (протокол №1 от 21 марта 2016 года).

Заведующий Отделом молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”
доктор медицинских наук по специальности 03.00.04 “биохимия”
профессор *В. Васильев* Вадим Борисович.Васильев
21 марта 2016 г.

Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Тел: (812)234-66-75; e-mail: vadim@biokemis.ru; сайт института:
www.iemrams.spb.ru

Ведущий научный сотрудник Отдела молекулярной генетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
“Институт экспериментальной медицины”
доктор биологических наук по специальности 03.00.04 “биохимия”
доцент *Мандельштам* Михаил Юрьевич Мандельштам
21 марта 2016 г.

Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Тел: (812)234-33-56; e-mail: michail@MM13666.spb.edu; сайт института:
www.iemrams.spb.ru

