

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ПЛАКОФИЛЛИНА-2 НА АКТИВНОСТЬ КАНОНИЧЕСКОГО ПУТИ WNT

© А. А. Худяков,^{1, 2} Д. А. Костина,² А. А. Костарева,²
А. Н. Томилини,¹ А. Б. Малашичева^{2, 3, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

²Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова,
Санкт-Петербург, 197341,

и ³С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034;

*электронный адрес: amalashicheva@gmail.com

Плакофиллин-2, кодируемый геном *PKP2*, является одним из белков десмосомы. Ранее полагали, что этот белок, как и другие белки десмосом, выполняет исключительно структурную функцию, входя в состав межклеточных контактов. Однако недавно было показано, что мутации в генах, кодирующих белки десмосом, могут быть причиной наследственного заболевания сердца — аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка, и что это заболевание связано с нарушением дифференцировки кардиомиоцитов в ткани сердца. Одним из возможных сигнальных путей, вовлеченных в нарушение дифференцировки при мутациях в *PKP2*, считают сигнальный путь Wnt. Связь мутаций в гене *PKP2* и изменения активности сигнального пути Wnt на клетках человека ранее не были исследованы. Целью настоящего исследования являлась оценка активности сигнального пути Wnt в процессе адипогенной и кардиомиоцитарной дифференцировок в клетках, несущих *PKP2* дикого типа, и в клетках, несущих *PKP2* с мутацией. В ходе работы использовали культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, несущие мутации в гене *PKP2*. В работе показано, что в клетках, несущих мутантный ген *PKP2*, снижены транскрипционная активность основного участника сигнального пути Wnt β-катенина, а также экспрессия транскрипционных мишеней β-катенина — *SOX2* и *SOX9*. Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что плакофиллин-2 может регулировать активность сигнального пути Wnt и, таким образом, выполнять не только структурную функцию в составе десмосомы, но и регуляторную.

Ключевые слова: плакофиллин, сигнальный путь Wnt, мутации.

Принятые сокращения: АКПЖ — аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка, иПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, GSK3b — glycogen synthase kinase 3 beta (киназа гликогенсинтазы 3-бета), PPARγ — peroxisome proliferator-activated receptor gamma (рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма).

Десмосомы представляют собой точечные межклеточные контакты, связывающие соседние клетки путем объединения сети их промежуточных филаментов. Эти структуры характерны для тканей, постоянно испытывающих механические нагрузки, таких как сердце, кожа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, мочевой пузырь. На молекулярном уровне десмосома состоит из кадгеринов, Са-зависимых молекул клеточной адгезии, связанных с белками семейства Armadillo — плакофиллином и плакоглобином. Плакофиллин и плакоглобин в свою очередь взаимодействуют с десмоплакином, белком, связывающим промежуточные филаменты — кератин в эпителиальных клетках или десмин в мышечных (Delva et al., 2009). В миокарде, испытывающем постоянные циклические нагрузки, был обнаружен еще один тип межклеточных контактов, специфичный только для сердечной ткани, — *area composita*, представляющий собой смешанную структуру, сочетающую в своем

составе десмосомы и адгезионные контакты (Franke et al., 2006).

Долгое время считали, что функция межклеточных контактов ограничивается поддержанием механического единства клеток в составе тканей, однако исследования последнего десятилетия показывают возможность их функционирования как рецепторов механических стимулов и активных участников сигнальных путей, регулирующих пролиферацию и дифференцировку. В состав межклеточных контактов входят ключевой участник канонического сигнального пути Wnt β-катенин и высокоомологичный ему γ-катенин. Известно, что эти белки могут транслоцироваться в ядро и инициировать сборку комплекса активации транскрипции генов-мишеней (Zhurinsky et al., 2000; Neuberger, Birchmeier, 2010). Кроме этого, в районе межклеточных контактов локализованы белки, выполняющие только сигнальную функцию (Chen et al., 2014). Межклеточные контакты участву-

ют в рецепции взаимодействия между соседними клетками и механических стимулов, в частности инициируют сокращение мышечной клетки в ответ на растяжение (Leckband et al., 2011). Нарушения межклеточных контактов могут приводить к различным заболеваниям. Одной из «болезней десмосом» является патология сердечной мышцы — аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПЖ).

АКПЖ представляет собой наследственное аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся аритмиями, сердечной недостаточностью и внезапной смертью. На гистологическом уровне наблюдаются замещение миоцитов ткани сердечной мышцы фибробластами и жировыми клетками, нарушение контактов между миоцитами, что приводит к нарушению электрической целостности миокарда (Thiene et al., 1988; Basso et al., 1996). Очаг заболевания чаще всего располагается в правом желудочке, однако поздние исследования указывают на поражения как левого, так и обоих желудочков (Coggado et al., 1997). Генетические исследования выявили ряд генов, мутации в которых ассоциированы с развитием заболевания, в том числе кодирующих белки, входящие в состав десмосомы: десмоплакин, десмоколлин-2, десмоглеин-2, плакоглобин и плакофилин-2 (Awad et al., 2008). Мутации в гене плакофилина-2 (*PKP2*) встречаются наиболее часто и составляют примерно половину всех ассоциированных с АКПЖ мутаций (Gerull et al., 2004). Молекулярные механизмы, приводящие к развитию заболевания, остаются неясными, несмотря на значительные достижения в изучении АКПЖ за последние несколько лет. Отчасти это связано с высокой гетерогенностью заболевания: схожие фенотипы могут быть обусловлены мутациями в генах, кодирующих белки с различными функциями. Тем не менее была описана связь мутантных белков в составе десмосомы с аномальной активацией сигнальных путей (Garcia-gras et al., 2006). Последствия этого процесса могут приводить к апоптозу и индукции пролиферации и дифференцировки (Lombardi, Marian, 2011).

Роль мутантного плакофилина-2 в развитии АКПЖ до сих пор не изучена. Важным представляется вопрос о том, способен ли мутантный плакофилин-2 непосредственно участвовать в сигнальных каскадах или его действие носит опосредованный характер за счет нарушения структуры десмосомы? Кроме того, неизвестно, какие клетки являются источником жировой ткани, замещающей кардиомиоциты, и почему мутация в структурном гене десмосомы *PKP2* приводит к сдвигу дифференцировки клеток в адипогенном или фиброзном направлении. Известно, что ядерная транслокация другого белка десмосом — плакоглобина — может приводить к адипогенной трансформации клетки вследствие ингибирования сигнального пути Wnt (Garcia-gras et al., 2006). Поскольку белки плакофилин-2 и плакоглобин схожи, оба состоят из armadillo-повторов — структур, способных выполнять сигнальные функции, можно предположить, что и плакофилин-2 участвует в сигнальных каскадах. Мы предположили, что мутации гена *PKP2* могут влиять на активность канонического сигнального пути Wnt, что в свою очередь может индуцировать адипогенную трансформацию различных клеток сердца — кардиомиоцитов, фибробластов, клеток-предшественников и др.

Целью настоящего исследования являлась оценка активности сигнального пути Wnt в процессе адипогенной и кардиомиоцитарной дифференцировок в клетках, несущих

PKP2 дикого типа, и в клетках, несущих *PKP2* с мутацией.

Клеточной моделью служили мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) жировой ткани. Клеточную культуру ММСК можно получить непосредственно от пациента с идентифицированной мутацией *PKP2*. ММСК способны быстро и эффективно дифференцироваться в адипоциты, что позволяет изучать механизмы этой дифференцировки. Второй клеточной моделью служила культура индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), полученных в результате репрограммирования ММСК. иПСК способны к дифференцировке в кардиомиоциты. Разные стадии этой дифференцировки отражают процессы спецификации клеток-предшественников кардиомиоцитов с последующим их созреванием. Благодаря этому можно оценить нарушения дифференцировки и активности сигнальных путей, лежащих в ее основе. Неоспоримым достоинством иПСК является то, что можно изучать пути дифференцировки клеток с выявленной мутацией, полученных от конкретного пациента.

Материал и методика

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом СЗФМИЦ, у всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в генетическом исследовании и биопсию жировой ткани.

Культуры ММСК жировой ткани получали из биоптата жировой ткани согласно описанной ранее методике (Zuk et al., 2001). Культуры вели в ростовой среде для ММСК (α -MEM; Панэко, Россия), содержащей 10 % сыворотки Hyclone (Thermo Scientific, США), 2 мМ глутамина (Life Technologies, США), 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, США). Для характеристики полученных культур проводили иммунофенотипирование с использованием антител к маркерам CD73, CD90 и CD105 по стандартной методике на цитофлюориметре Millipore Guava easyCyte.

Индукцию адипогенной дифференцировки проводили путем культивирования клеток в дифференцировочной среде 5F (ростовая среда, содержащая коктейль из 5 факторов дифференцировки: 5 мкг/мл инсулина, 0,25 мМ дексаметазона, 5 мМ розиглитазона, 0,5 мМ 3-изобутила-1-метилксантина и 200 мкМ индометацина (все от Sigma-Aldrich, США)).

иПСК получали путем репрограммирования ММСК жировой ткани с помощью вирусов Сендай, несущих «коктейль Яманаки» (Cyto Tune 2.0 Sendai Reprogramming Kit; Life Technologies, США), согласно рекомендациям фирмы-производителя. Дальнейшее культивирование осуществляли в среде для эмбриональных стволовых клеток (ЭСК; KO-DMEM, 20 % KOSR и 1-кратный раствор аминокислот MEM (Life Technologies, США)), содержащей 0,2 мМ бета-меркаптоэтанол, 2 мМ глутамина, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (все от Life Technologies, США) и 10 нг/мл фактора роста bFGF (Peprotech, США) на слое мышечных эмбриональных фибробластов, инактивированных 0,01 мкг/мл митомицина С (Serva, Германия).

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

том, что иПСК пересевали на слой клеток END-2, инактивированных митомизином С (Serva, Германия), и культивировали в среде, содержащей КО-DMEM, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 0,2 мМ бета-меркаптоэтанол, 2 мМ глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, США) и 1,4 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США). Через 7 сут и далее трижды в неделю среду заменяли на КО-DMEM, содержащую 10 % KOSR, 1-кратный раствор аминокислот MEM, 0,2 мМ бета-меркаптоэтанол, 2 мМ глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все от Life Technologies, США).

Клонирование кодирующей последовательности *PKP2*. Последовательность гена *PKP2*, несущая метку flag на 3'-конце, амплифицировали с плазмиды 915-Plakophilin 2a-Flag (Addgene 32230) с помощью праймеров TTGGCGCGCCACCATGGCAGCCCCCGGCCCCCA и TGCGAATTCATCTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTA. Полученный фрагмент клонировали по сайтам рестрикции *Ascl* и *EcoRI* в лентивирусный вектор pLV-T7-lacZiresBla-5600.

Для сайт-специфичного мутагенеза проводили ПЦР, используя плазмиду в качестве матрицы и пары праймеров, несущие мутацию (с.23321delT) (5'-3'): GGCACAAGTCCACTATGAAGTTCGCTGGGGAA-GAGGAAC и CGACSTTCATAGTGGCAGTTGTGCCAGCCTTTAGCATGTC; K859R (5'-3'): STACAAGAGGGC-TCAGTTTAAGAAGACAGATTTTGTCAACAG и CTGAGCCCTCTTGTAGGCATGAT GCAGTTCGTTGTGTC-CC). Затем реакционную смесь обрабатывали *FastDigest DpnI* (Thermo Scientific, США) в течение 1 ч. Полученную смесь (5 мкл) использовали для трансформации компетентных бактерий *Escherichia coli*, штамм Top10. Наличие мутации подтверждали секвенированием.

Для оценки активности канонического сигнального пути Wnt использовали лентивирусный вектор на основе плазмиды 7TFC (Addgene 24307) (Fuerer, Nusse, 2010). Этот вектор содержит в своем составе так называемую конструкцию TopFlash, представляющую собой последовательность гена люциферазы под промотером с 7 сайтами связывания TCF/LEF. При активации сигнального пути Wnt происходит ядерная транлокация бета-катенина, его связывание с сайтами TCF/LEF и активация экспрессии люциферазы. Клеточные лизаты собирали, используя набор Luciferase Assay System (Promega, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Интенсивность люминесценции, пропорциональную активности люциферазы и отражающую активность Wnt, измеряли при помощи спектрофотометра Gen5 (BioTek, США).

Продукция лентивирусных частиц и вирусная трансдукция. Для внесения мутантных форм *PKP2* и *PKP2* дикого типа и их стабильной экспрессии в иПСК использовали лентивирусные частицы. Продукцию лентивирусных частиц осуществляли согласно протоколу, разработанному в лаборатории Д. Троне ([http:// tcf.epfl.ch/](http://tcf.epfl.ch/)). Трансдукцию клеточных культур осуществляли с MOI = 10 в присутствии 2 мкг/мл полибрана.

Анализ экспрессии генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt методом ПЦР в режиме реального времени. РНК из клеток выделяли при помощи TRIzol® Reagent (Invitrogen, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. 1 мкг выделенной РНК использовали в реакции обратной транскрипции, используя MMLV RT kit (Eurogen, Рос-

сия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. ПЦР в режиме реального времени проводили, используя готовую смесь qPCRmix-HS SYBR (Eurogen, Россия) и праймеры из базы данных Primer Depot (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>) следующих последовательностей (5'-3'): для амплификации участка кДНК гена *AXIN2* — прямой AGTGTGAGGTCCACGGAAAC и обратный CTGGTGC AAAGACATAGCCA; для амплификации участка кДНК гена *SOX9* — прямой GACGCTGG-GCAAGCTCT и обратный GTAATCCGGGTGGTCTTCT; для амплификации участка кДНК гена *SOX2* — прямой AACCCCAAGATGCACAATC и обратный: GCTTAGCCTCGTCGATGAAC. Температура отжига праймеров составляла 60 °C.

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.

Результаты

Идентификация носителя мутации в гене *PKP2* и получение от него культуры ММСК жировой ткани. В ходе генетических исследований пациентов с АКПЖ был идентифицирован носитель мутаций в гене плакофиллина-2. Пациент, обозначаемый далее «пациент с АКПЖ», являлся носителем двух мутаций (с.23321delT, K859R) — делеции, приводящей к сдвигу рамки считывания и аминокислотной замены. Была проведена биопсия жировой ткани и выделена первичная культура ММСК. Таким же образом была получена культура ММСК от здорового донора. Полученные культуры были позитивны по характерным для ММСК маркерам — CD73, CD90 и CD105. ММСК жировой ткани использовали далее для оценки активности сигнального пути Wnt в недифференцированных ММСК и ММСК, дифференцированных в адипогенном направлении. Кроме того, ММСК служили источником для получения иПСК.

Оценку активности канонического сигнального пути Wnt проводили путем измерения активности люциферазы, наработанной в результате внесения репортерной конструкции в клетки. Поскольку базовый уровень канонического сигнального пути Wnt в ММСК оказался невысоким, его активировали, добавляя в среду 10 мкМ CHIR99021 (ингибитор киназы GSK3b), препятствуя тем самым фосфорилированию и последующей протеасомной деградации бета-катенина. В ММСК, полученных от пациента с АКПЖ, наблюдали пониженный уровень активности люциферазного репортера по сравнению с контролем (рис. 1, а) и сниженный уровень экспрессии гена *AXIN2*, что указывает на сниженную активность сигнального пути Wnt в этих клетках (рис. 1, а, в).

Чтобы оценить возможные изменения активности сигнального пути Wnt в процессе адипогенной дифференцировки в клетках с мутацией по сравнению с контрольными клетками, несущими *PKP2* дикого типа, ММСК культивировали в присутствии специфических факторов адипогенной дифференцировки. Это приводило к активации в клетках сигнального пути PPAR γ — одного из путей, регулирующих накопление жирных кислот и метаболизма глюкозы, характерного для жировой ткани. Ранее было показано, что именно активация несвойствен-

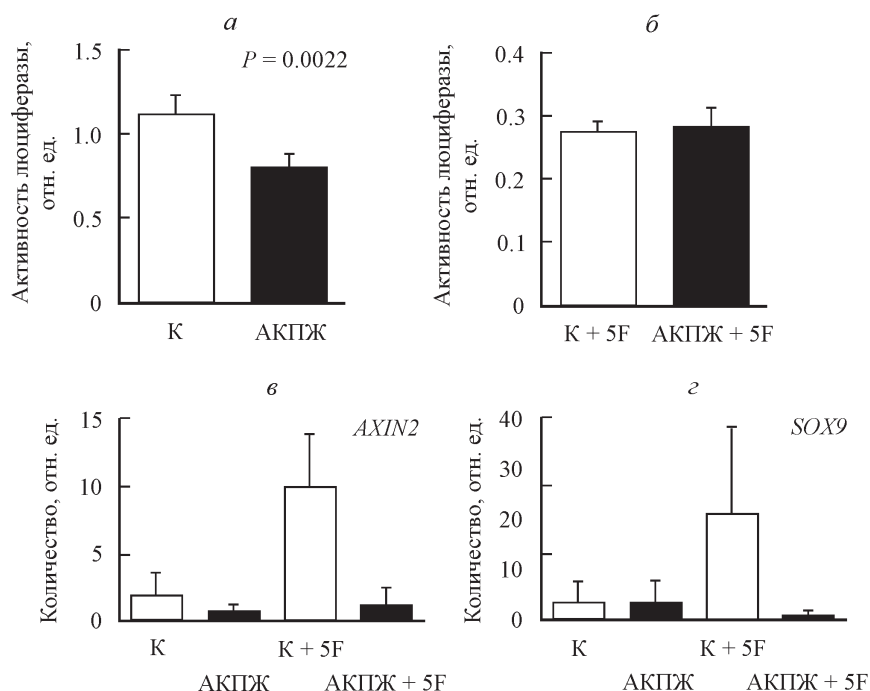


Рис. 1. Активность канонического сигнального пути Wnt в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках (ММСК) от здорового донора (К) и от пациента с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка (АКПЖ).

а — активность люциферозного репортера TopFlash в ММСК в присутствии 10 мкМ CHIR99021 (ингибитора киназы GSK3b). *б* — то же в ММСК, обработанных ингибитором CHIR99021 и дополнительно индуцированных к адипоцитарной дифференцировке с помощью специфических факторов 5F (К + 5F и АКПЖ + 5F). Активность репортера TopFlash нормирована на активность репортера в ММСК от здорового донора (К). *в*, *г* — экспрессия генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt — *AXIN2* и *SOX9* соответственно.

ного кардиомиоцитам PPAR γ вызывает характерные для АКПЖ изменения — накопление липидных капель, апоптоз, сдвиг метаболизма в сторону использования глюкозы вместо окисления жирных кислот (Kim et al., 2013).

Индукция адипогенной дифференцировки приводила к снижению активности люциферозного репортера в культуре клеток как от здорового донора, так и от пациента (рис. 1, б). При этом различия наблюдали на уровне экспрессии отдельных генов-мишеней сигнального пути Wnt — *AXIN2* и *SOX9*. Экспрессия этих генов была заметно снижена в ММСК, несущих мутантный *PKP2* (рис. 1, в, г).

Таким образом, мы показали, что в первичной культуре ММСК, несущих мутацию в гене *PKP2*, активность сигнального пути Wnt снижена. Помимо этого, в культуре ММСК, несущих мутацию, стимуляция сигнального пути PPAR γ не вызывала увеличения экспрессии мишеней Wnt *AXIN2* и *SOX9* в отличие от клеток, несущих ген дикого типа.

Следующая задача состояла в оценке влияния мутаций в гене *PKP2* на кардиогенную дифференцировку иПСК. Несмотря на существующие протоколы, дифференцировка ММСК в направлении кардиомиоцитов не является достаточно эффективной (Худяков и др., 2013), в то время как иПСК способны дифференцироваться в кардиомиоциты. иПСК получали путем репрограммирования первичной культуры ММСК жировой ткани от пациента с мутациями в гене *PKP2* (АКПЖ) и двух здоровых доноров. От каждого пациента было получено и охарактеризовано 5 индивидуальных линий иПСК. Полученные колонии проявляли характерные для ЭСК морфологические характеристики и экспрессировали маркеры плюрипотентности — транскрипционные факторы

OCT3/4 и NANOG, а также поверхностный маркер TRA-1-60. Пример иммуноцитохимической окраски двух линий (одной от здорового донора и одной от пациента с мутациями в гене *PKP2*) представлен на рис. 2. Дифференцировку полученных линий иПСК в кардиомиоциты осуществляли с помощью сокультивирования их с клетками линии END-2. В ходе дифференцировки наблюдали формирование из колоний иПСК трехмерных клеточных агрегатов, в части из которых наблюдали спонтанные сокращения.

Оценку активности канонического сигнального пути Wnt в процессе дифференцировки иПСК проводили с помощью вышеописанной репортерной конструкции TopFlash. Линии, полученные от пациента с АКПЖ, имели пониженный уровень активности репортера на 7-е сут кардиодифференцировки (рис. 3, а). Экспрессия мишеней сигнального пути Wnt (генов *AXIN2*, *SOX9* и *SOX2*) также была снижена в случае АКПЖ, но на более поздних сроках дифференцировки — на 14-е и 24-е сут (рис. 3, б—г). Таким образом, активность сигнального пути Wnt в линиях, полученных от пациента с АКПЖ, была снижена на протяжении 24 сут кардиодифференцировки.

Чтобы изучить роль мутаций в гене *PKP2* в изменении активности сигнального пути Wnt, мы ввели в иПСК от здорового донора *PKP2* дикого типа и мутантные формы *PKP2*, соответствующие пациенту с АКПЖ. Далее линии иПСК дифференцировали в направлении кардиомиоцитов и оценивали экспрессию генов-мишеней сигнального пути Wnt. Введение мутаций в иПСК от здорового донора повышало уровень экспрессии генов *SOX9* и *SOX2* на 7-е сут кардиодифференцировки иПСК (рис. 4, а, б). Однако уровень экспрессии этих генов при введе-

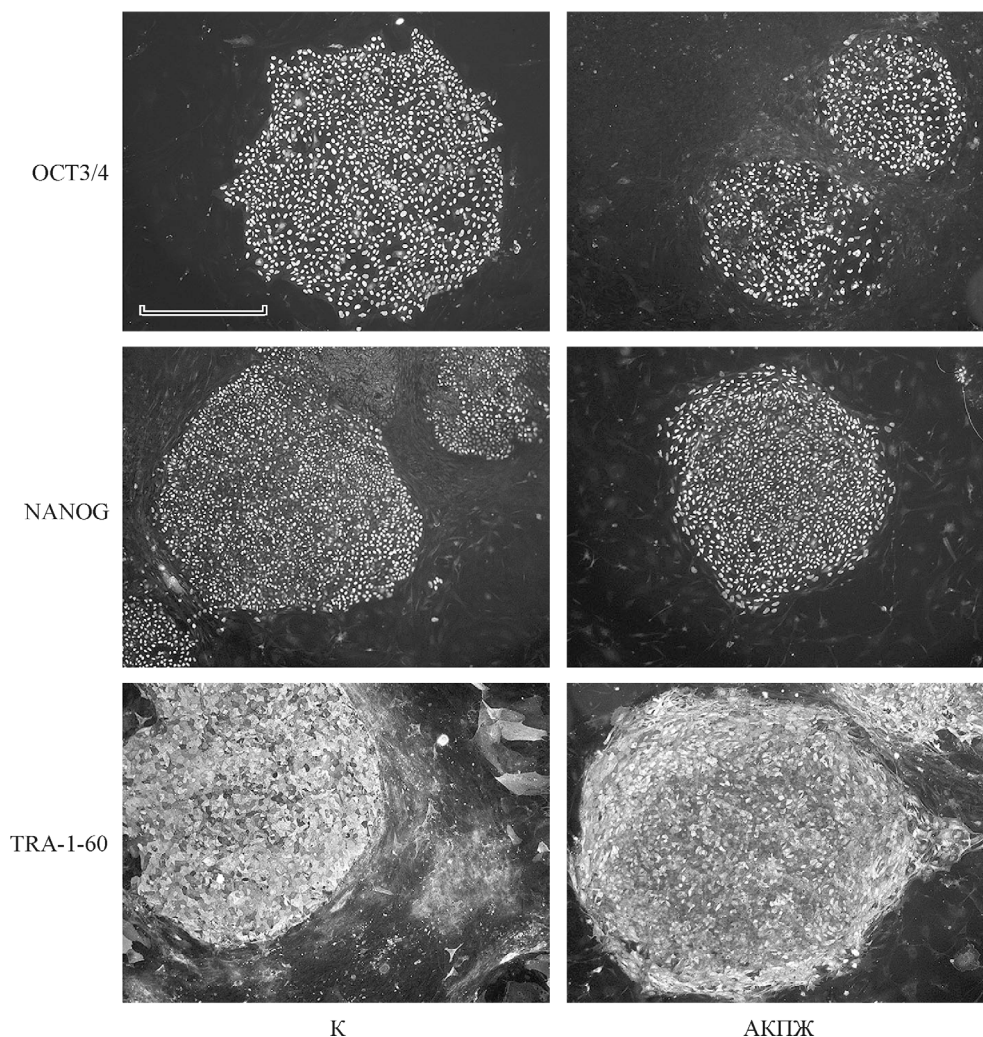


Рис. 2. Характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК).

Иммуноцитохимическая окраска колоний иПСК от здорового донора (К) и от пациента с АКПЖ. Клетки позитивны по основным маркерам плюрипотентности (OCT3/4, NANOG и TRA-1-60). Масштабный отрезок — 300 мкм.

нии двух мутаций совместно был понижен по сравнению с иПСК, несущими *PKP2* дикого типа. В то же время введение *PKP2* дикого типа в иПСК от пациента с АКПЖ повышало экспрессию гена *SOX2* до уровня, сравнимого с экспрессией *SOX2* в линиях иПСК от здорового донора (рис. 4, з), что может быть связано с повышением активности сигнального пути Wnt.

Таким образом, мы показали, что присутствие мутации в гене *PKP2* приводит к понижению активности сигнального пути Wnt в ММСК жировой ткани и иПСК, дифференцированных в кардиомиоциты. Экзогенное введение мутантного *PKP2* в иПСК от здорового донора не воспроизводило наблюдаемого эффекта, в то время как введение *PKP2* дикого типа способствовало повышению активности Wnt в иПСК, несущих мутантный *PKP2*.

Обсуждение

Существует множество публикаций, посвященных роли канонического сигнального пути Wnt в развитии аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (Garcia-gras et al., 2006; Li et al., 2011; Oxford et al., 2014).

По-видимому, этот сигнальный путь играет важную роль в развитии патологии сердца.

Несомненный интерес представляют обнаруженные изменения сигнального пути Wnt в культуре ММСК жировой ткани. 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, несущих мутацию в гене *PKP2*, оказалась ниже, чем в клетках, несущих *PKP2* дикого типа. Кроме того, одновременная стимуляция ММСК в присутствии ингибитора киназы GSK3b и специфических факторов адипоцитарной дифференцировки приводила к отрицательной регуляции мишеней Wnt в ММСК, несущих мутацию. В связи с этим можно предположить, что действие мутантного плакофилина-2 не требует наличия десмосом в клетке и осуществляется на уровне цитоплазматического межбелкового взаимодействия.

Культура кардиомиоцитов из иПСК зарекомендовала себя как надежная модель, применимая для изучения наследственных заболеваний сердца. Несмотря на имеющиеся недостатки, такие как незрелость кардиомиоцитов и их высокая вариабельность, полученные модели отража-

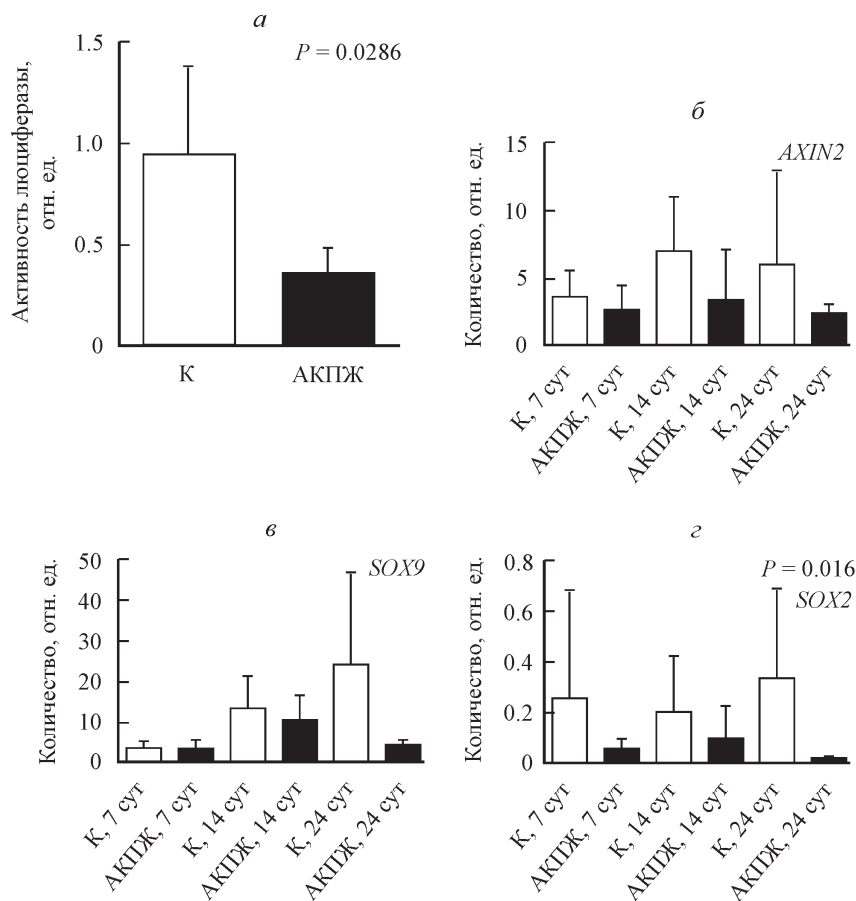


Рис. 3. Активность канонического сигнального пути Wnt при кардиомиоцитарной дифференцировке иПСК (на 7, 14 и 24-е сут), полученных от здорового донора (К) и пациента с АКПЖ.

a — активность люциферазного репортера TopFlash в линиях иПСК на 7-е сут кардиомиоцитарной дифференцировки, нормированная на активность репортера в иПСК от здорового донора (К); *b–d* — экспрессия генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt в процессе кардиомиоцитарной дифференцировки иПСК — *AXIN2*, *SOX9* и *SOX2* соответственно.

ют фенотип заболевания и позволяют успешно изучать процессы, лежащие в его основе. Полученные таким образом различными исследователями кардиомиоциты от пациентов с АКПЖ несли все признаки, характерные для кардиомиоцитов пораженного миокарда, — сниженную экспрессию генов, кодирующих десмосомные белки, накопление липидных капель в цитоплазме и увеличенную ширину межклеточного пространства в области десмосом (Caspi et al., 2013; Ma et al., 2013).

В настоящей работе мы сфокусировались на изучении сигнального пути Wnt не только в зрелых, терминально дифференцированных, кардиомиоцитах, но и в процессе дифференцировки. Наблюдаемое снижение активности сигнального пути Wnt в присутствии мутантного плакофиллина-2, зарегистрированное с помощью люциферазной репортерной конструкции, имело место уже на 7-е сут дифференцировки. Можно предположить, что плакофиллин-2 участвует в регуляции сигнальных путей с ранних этапов дифференцировки. Снижение экспрессии мишеней сигнального пути Wnt (*AXIN2*, *SOX9* и *SOX2*) в присутствии мутантного плакофиллина-2 наблюдали позже, с 14-х сут дифференцировки. Это может говорить о том, что данные мишени играют роль на поздних стадиях дифференцировки, в то время как на ранних экспрессируются другие, не обнаруженные нами гены.

Введение мутантного *PKP2* в иПСК от здорового донора с последующей их дифференцировкой в кардиомио-

циты не привело к падению экспрессии мишеней сигнального пути Wnt. Одним из объяснений этого эффекта может являться наличие двух аллелей дикого типа *PKP2* в исходных клетках, в то время как в иПСК от пациента с АКПЖ одна из аллелей несет делецию и не кодирует полноценный белковый продукт. Существуют данные о повышении активности Wnt в мышечной модели АКПЖ (Li et al., 2011). Все это свидетельствует в пользу того, что регуляция этого сигнального пути как в одну, так и в другую сторону носит аномальный характер. Напротив, введение *PKP2* дикого типа в определенной степени повышало активность сигнального пути Wnt. Тем не менее экспрессия мишеней этого сигнального пути оставалась пониженной по сравнению с дифференцированными иПСК от здорового донора. Возможно, лентивирусная трансдукция не может полностью восполнить утрату одной аллели или же существует механизм отрицательной регуляции Wnt, препятствующий его выходу на нормальный уровень.

Изучение механизмов, посредством которых *PKP2* осуществляет регуляцию сигнального пути Wnt, будет являться предметом нашей дальнейшей работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проекты 14-50-00068 и 14-15-00745).

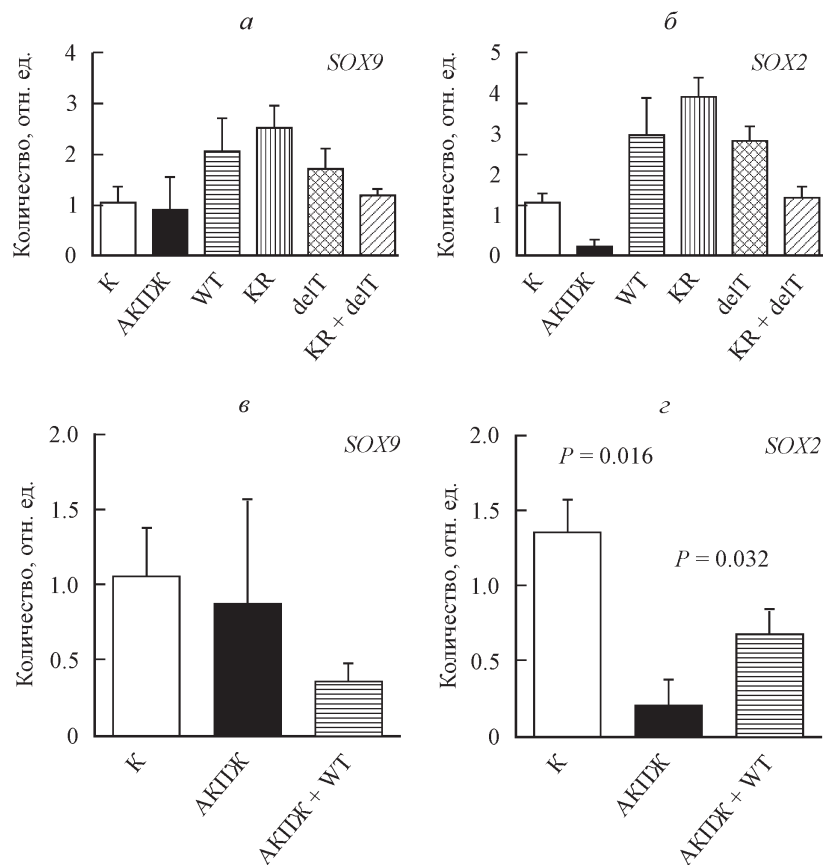


Рис. 4. Влияние *PKP2* дикого типа и мутантного *PKP2* на мишени сигнального пути Wnt при кардиомиоцитарной дифференцировке иПСК.

а—г — экспрессия генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt на 7-е сут кардиомиоцитарной дифференцировки иПСК. WT — линии иПСК, несущие *PKP2* дикого типа, KR — линии иПСК, несущие *PKP2* с мутацией K859R, delT — линии иПСК, несущие *PKP2* с мутацией delT с.23321, KR + delT — линии иПСК, несущие *PKP2* с мутациями K859R и delT с.23321, АКПЖ + WT — линии иПСК от пациента с АКПЖ, трансдуцированные *PKP2* дикого типа.

Список литературы

- 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 (2) : 47—55. (Khudiakov A. A., Kurapeev D. I., Kostareva A. A., Malashicheva A. B. 2013. Comparison of different methods for generation of functional human cardiomyocytes. Cell. Transplant. Tissue Eng. 8 (2) : 46—54.)
- Awad M. M., Calkins H., Judge D. P. 2008. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Nature Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 5 : 258—267.
- Basso C., Thiene G., Corrado D., Angelini A., Nava A., Valente M. 1996. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy or myocarditis? Circulation. 94 : 983—991.
- 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.
- 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.
- Corrado D., Basso C., Thiene G., McKenna W. J., Davies M. J., Fontaliran F., Nava A., Silvestri F., Blomstrom-Lundqvist C., Wlodarska E. K., Fontaine G., Camerini F. 1997. Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study. J. Amer. Coll. Cardiol. 30 : 1512—1520.
- Delva E., Tucker D. K., Kowalczyk A. P. 2009. The desmosome. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 1. Cold Spring Harbor; doi: 10.1101/cshperspect.a002543.
- 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.
- Fuerer C., Nusse R. 2010. Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. PLoS ONE. 5 : 1—7.
- 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/ β -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. J. Clin. Invest. 116 : 2012—2021.
- 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., Drenckhahn J., 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.
- Heuberger J., Birchmeier W. 2010. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. Cold Spring Harbor. Perspect. Biol. 2; doi: 10.1101/cshperspect.a002915.
- 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., Cal-

kins H., Kelly D. P., Judge D. P., Chen H.-S. V. 2013. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 494 : 105—110.

Leckband D. E., le Duc Q., Wang N., de Rooij J. 2011. Mechanotransduction at cadherin-mediated adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 : 523—530.

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. *Mol. Cell. Biol.* 31 : 1134—1144.

Lombardi R., Marian A. J. 2011. Molecular genetics and pathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a disease of cardiac stem cells. *Pediatr. Cardiol.* 32 : 360—365.

Ma D., Wei H., Lu J., Ho S., Zhang G., Sun X., Oh Y., Tan S. H., Ng M. L., Shim W., Wong P., Liew R. 2013. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 34 : 1122—1123.

Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spjilker R., van den Brink S., Hassink R., van der Heyden 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.

Oxford E. M., Danko C. G., Fox P. R., Kornreich B. G., Moise N. S. 2014. Change in β -catenin localization suggests involvement of the canonical wnt pathway in boxer dogs with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 28 : 92—101.

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.

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.

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—226.

Поступила 17 VIII 2015

THE EFFECT OF PLAKOPHILIN-2 GENE MUTATIONS ON ACTIVITY OF THE CANONICAL Wnt SIGNALING PATHWAY

A. A. Khudiakov,^{1,2} D. A. Kostina,² A. A. Kostareva,² A. N. Tomilin,¹ A. B. Malashicheva^{2,3,*}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

² Federal V. A. Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341, and ³ St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034;

* e-mail: amalashicheva@gmail.com

Plakophilin-2 is a desmosomal protein encoded by *PKP2* gene. Desmosomal proteins are usually considered as structural proteins with the main function of maintaining intercellular interactions. Genetic studies revealed that mutations in desmosomal genes could lead to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, heart disease characterized by substitution of cardiomyocytes by adipose and fibrotic tissue predominantly in right ventricle. Wnt signaling pathway is one of the signal transduction pathways which could be involved in the formation of the pathology. The purpose of this study was to investigate Wnt activity changes caused by *PKP2* mutations during adipogenic and cardiomyogenic differentiation. We used multipotent mesenchymal stromal cells and iPS cells generated from patient carrying *PKP2* gene mutation. We show that Wnt activity is lower in the cells with mutant *PKP2*. This data indicate a possible signaling role of plakophilin-2 by regulating Wnt activity.

Key words: plakophilin, Wnt signaling, mutations.