

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

**Исследование потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов
при каналопатиях**

Зайцева Анастасия Константиновна

03.03.01 Физиология

Научный руководитель
д.б.н., член-корр. РАН, Тихонов Денис Борисович

Санкт-Петербург
2022

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Одной из ключевых проблем современной кардиологии является своевременная диагностика и адекватный подбор терапии для пациентов с наследственными нарушениями сердечного ритма, поскольку большинство данных патологий может приводить к внезапной сердечной смерти. Ежегодно на территории Российской Федерации регистрируется приблизительно 1,3 млн смертей в результате сердечно-сосудистых заболеваний, из которых более 100 тысяч приходятся на аритмии [1].

Дисфункция потенциал-зависимых каналов сердца может развиваться как вследствие мутаций в генах, кодирующих порообразующие и вспомогательные субъединицы ионных каналов, так и в генах, кодирующих белки-регуляторы ионного транспорта и структурные белки. Спектр генетических заболеваний, ассоциированных с дефектами ионного транспорта, включает в себя такие заболевания как синдром удлинённого интервала QT, синдром Бругада, прогрессирующая проводящая болезнь сердца (PCCD), аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) и др. PCCD – это наследственное заболевание, характеризующееся нарушением сердечной проводимости через систему Гиса-Пуркинье, прогрессирующее по мере старения. В результате PCCD может развиваться полная предсердно-желудочковая блокада, увеличение комплексов QRS, синкопы и внезапная сердечная смерть [2]. PCCD имеет сложный генетический фон и клинически схожа с другими структурными и электрическими заболеваниями сердца [3]. В качестве патофизиологических причин развития данного заболевания можно выделить дегенерацию миокарда, интенсификацию обмена коллагена в миокарде и фиброз проводящей системы, что приводит к аномалиям в работе проводящей системы. На текущий момент диагностирование данной патологии – это показатель необходимости имплантации кардио-вертер дефибриллятора. Несмотря на достигнутый в последние десятилетия прогресс в понимании молекулярных механизмов развития PCCD, идентификация новых генетических вариантов в различных генах, обнаруженных у пациентов с PCCD, иллюстрирует необходимость дальнейших исследований.

Аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) — генетическое заболевание, характеризующееся высоким риском развития жизнеугрожающих желудочковых аритмий и прогрессирующей сердечной недостаточности вследствие замещения сердечной мышцы жировой и фиброзной тканью [4]. АКМП имеет разнообразный генетический фон, частично перекрывающийся с другими наследственными заболеваниями сердца, такими как дилатационная кардиомиопатия, PCCD, синдром Бругада и другие. Наиболее распространёнными случаями являются мутации в генах структурных белков, в частности, генетические варианты в гене RCP2, кодирующем плакофилин-2 [5-7].

В последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов АКМП. Предполагается, что возникновение аритмии обусловлено нарушением организации коннексом – многомолекулярного белкового комплекса, соединяющего соседние кардиомиоциты и обеспечивающего быстрое распространение потенциала действия и быструю инициацию деполяризации мембраны [7-9]. Вероятно, снижение уровня десмосомальных белков связано с уменьшением ионных токов [9]. Было показано, что РКР2 колокализуется с натриевыми каналами в области вставочного диска и влияет на распределение каналов [7,9]. Также снижение экспрессии *PKP2* приводит к уменьшению амплитуды натриевого тока (I_{Na}). Аналогичное изменение характерно для синдрома Бругада, обычно связанному с мутациями в гене *SCN5A*, кодирующем α -субъединицу натриевого канала сердца [7]. В недавних исследованиях было показано, что дефицит РКР2 приводит к нарушению кальциевого гомеостаза, что может вносить вклад в возникновение аритмий [10,11]. Молекулярные механизмы повреждения миокарда, жировой инфильтрации и фиброза, связанные с АКМП, еще четко не определены.

Использование в качестве модельного объекта кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (КМ-иПСК), полученных от пациентов, позволяет изучать влияние потенциально патогенных генетических вариантов в нативном генетическом фоне с учётом тканеспецифичных особенностей. Большое значение имеет получение данных об активности ионных каналов с помощью метода локальной фиксации потенциала в отведении от целой клетки, так как данная методика позволяет оценить комплексные изменения биофизических характеристик ионных каналов и их влияние на потенциал действия в КМ-иПСК. Таким образом, актуальность данного исследования заключается в том, что была проведена электрофизиологическая характеристика потенциал-зависимых натриевых каналов в КМ-иПСК, полученных от здоровых доноров и пациентов с РССД и АКМП, и были сделаны выводы о потенциальных механизмах развития аритмии у данных пациентов. Мы предположили, что электрофизиологические нарушения в кардиомиоцитах пациентов могут быть вызваны нарушением структуры десмосомы. Использование КМ-иПСК, позволило нам продемонстрировать взаимодействие между РКР2 и работой $NaV1.5$ в АКМП-КМ и между DSP и $Nav1.5$ и $Cav1.2$ в РССД-КМ.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Установить влияние генетических вариантов в генах *DSP* и *PKP2* на активность ионных каналов с использованием кардиомиоцитов иПСК, специфичных для пациентов.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние генетического варианта DSP-H1684R на биофизические характеристики натриевых каналов $Na_v1.5$.
2. Провести анализ влияния DSP-H1684R на кальциевые токи (потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа).
3. Охарактеризовать эффект генетического варианта DSP-H1684R на параметры потенциалов действия на модели КМ-иПСК.
4. Проанализировать эффект генетических вариантов в гене *RKP2* с.354delT и K859R на активность $Na_v1.5$ на модели КМ-иПСК.
5. Охарактеризовать влияние генетических вариантов в гене *RKP2* с.354delT и K859R на параметры потенциалов действия на модели КМ-иПСК.
6. Провести анализ изменений плотности I_{Na} в КМ-иПСК донора и пациента с АКМП при лентивирусной трансдукции *RKP2*-WT.

Положения, выносимые на защиту

1. Плотность натриевого тока и кальциевого тока достоверно снижается в КМ-иПСК пациента с генетическим вариантом DSP-H1684R по сравнению с здоровыми донорами.
2. Генетический вариант DSP-H1684R оказывает влияние на параметры потенциалов действия КМ-иПСК: амплитуда ПД снижена и продолжительность ПД сокращалась.
3. Генетические варианты *RKP2* с.354delT и K859R идентифицированные у пациента с АКМП приводили к снижению плотности I_{Na} и замедлению нарастания ПД на модели КМ-иПСК.
4. Трансдукция КМ-иПСК пациента с АКМП лентивирусной конструкцией *RKP2* WT приводила к восстановлению плотности I_{Na} , что свидетельствует о взаимосвязи дисфункции *RKP2* и $Na_v1.5$
5. Полученные результаты согласуются с описанными в литературе данными о том, что аритмогенный эффект мутаций в генах белков десмосом связан с влиянием на активность и количество $Na_v1.5$ в плазматической мембране кардиомиоцитов. Таким образом, можно предположить некоторую общность механизма развития нарушений сердечного ритма в данных случаях.

Научная новизна исследования

Впервые проведено исследование биофизических механизмов развития аритмии вследствие генетического варианта DSP-H1684R, идентифицированного у пациента с РССД. Охарактеризованы изменения натриевого и кальциевых токов, а также параметров потенциалов действия. Описаны изменения натриевого тока и морфологии потенциала действия на модели КМ-иПСК у пациента, являющимся носителем генетических вариантов *RKP2* с.354delT и K859R. Наши результаты показывают, что генетические варианты в генах десмоплакина и плакофилина-2, помимо

замедления проводимости, вызванного структурным ремоделированием сердца, могут влиять на активность различных ионных каналов, внося вклад в проявления аритмии при РССД и АКМП.

Теоретическое и практическое значение работы

На основе анализа данных литературы установлено, что для изучения патогенеза врождённых аритмогенных синдромов, целесообразно использовать модель КМ-иПСК, полученных от пациентов-носителей исследуемых генетических вариантов. Модель КМ-иПСК наиболее достоверно воспроизводит тканеспецифичное белковое окружение ионных каналов и позволяет исследовать влияние генетических вариантов на активность различных ионных каналов, сохраняя генетический фон пациента. Вышеперечисленные преимущества делают выбор КМ-иПСК в качестве модельного объекта более предпочтительным по сравнению с использованием гетерологических систем экспрессии. Полученные данные о дисфункции натриевых и кальциевых каналов расширяют понимание молекулярных механизмов развития наследственных аритмий и потенциально могут быть использованы в поиске терапевтических мишеней для нехирургического лечения РССД и АКМП.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на Конгрессе Европейского общества кардиологии (ESC Congress, Paris, 2019), Международном Съезде Физиологов СНГ (Дагомыс, 2019), IV Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019) и Алмазовском Молодёжном Медицинском Форуме (Санкт-Петербург, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 2 печатные работы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Материалы и методы

1. Секвенирование ДНК и кДНК

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией и с одобрения местного этического комитета Национального медицинского исследовательского центра им. Алмазова (№13/19.06.2014). До начала исследования у всех испытуемых и их представителей было получено письменное информированное согласие.

Геномную ДНК выделяли из иПСК с использованием набора ДНК FlexiGene (Qiagen). Амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали по Сэнгеру с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator v3.1 и генетического анализатора 3130 (Applied Biosystems). Позже было выполнено целевое секвенирование 108 генов, связанных с кардиомиопатией

и аритмией, с использованием подхода NGS на приборе MiSeq (Illumina) после обогащения мишени Haloplex (Agilent), как описано ранее [12]. Для специфичного для пациента секвенирования кДНК РКР2 тотальную РНК экстрагировали с использованием реагента Extract RNA (Evrogen) и обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific). 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью набора MMLV RT (Evrogen) и фрагменту РКР2, соответствующему генетическому варианту РКР2 p.L859R, секвенировали по Сэнгеру.

2. Генерация индуцированных человеком плюрипотентных стволовых клеток

Линии иПСК для исследования механизма развития PCCD были созданы и охарактеризованы, как описано ранее [13]. В исследовании использовали четыре линии: две контрольные линии от неродственных здоровых доноров (FAMRCi003-A и FAMRCi008-A) и две линии от одного и того же пациента с PCCD, несущего генетический вариант DSP-H1684R (FAMRCi004-A и FAMRCi004-B). Экспериментальные данные двух линий ИПСК, специфичных для пациента, анализировали вместе. Подробную информацию и данные характеристики можно найти в базе данных hPSCreg (<https://hpscereg.eu/>). Все линии иПСК размножали в условиях без фидера на чашках, покрытых Geltrex, в среде Essential 8 (Thermo Fisher Scientific) и пассировали с использованием реагента ReleSR (Stem Cell Technologies) или Tryple select (Thermo Fisher Scientific).

Линии иПСК для исследования механизма развития АКМП были созданы и охарактеризованы, как описано ранее [14]. Были получены и совместно проанализированы экспериментальные данные двух линий иПСК пациента: FAMRCi001-A [14] и FAMRCi001-B, а также двух линий иПСК от совместимого по полу здорового донора FAMRCi003-A FAMRCi003-B. Все линии иПСК зарегистрированы в базе данных hPSCreg (<https://hpscereg.eu/>).

3. Кардиогенная дифференцировка

Кардиогенную дифференцировку иПСК проводили в соответствии с протоколом модуляции канонического пути Wnt, опосредованного малыми молекулами [15], с модификациями. После 14-го дня дифференцировки проводили метаболическую селекцию кардиомиоцитов: лактатная селекция в течение 3–5 дней [16]. Краткая схема, представляющая дифференцировку кардиомиоцитов иПСК, показана на рис. 1А. После метаболической селекции кардиомиоциты размножали в среде КМ (добавка GlutaMax RPMI1640, добавка B27, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific)). Кардиомиоциты после 24–30 дней дифференцировки использовали для экспериментов, если не указано иное. Для электрофизиологических измерений и иммунофлуоресцентного окрашивания кардиомиоциты диссоциировали как ферментативно, так и механически с использованием TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific), промывали средой КМ и пассировали на покровные стекла.

4. Иммуноцитохимия

Клетки фиксировали 4% PFA, пермеабелизировали 0,5% Triton X-100, блокировали 1% BSA и последовательно инкубировали с первичными и вторичными антителами. Ядра окрашивали DAPI (Sigma). Изображения были получены с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver Z1 с монокамерой AxioCam 506. Для обработки изображений использовалось программное обеспечение Zen (Zeiss).

5. Вестерн-блот

Клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Трис (pH 8), 140 мМ NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,5 мМ EGTA, 1 мМ EDTA и смесь ингибиторов протеазы (Roche). Образец кипятили в буфере для образцов Лэммли при 95°C в течение 5 мин. Белки разделяли в SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали 5% обезжиренным молоком и инкубировали с первичным антителом, специфичным к белку, а затем с вторичным антителом, конъюгированным с HRP.

6. Производство и трансдукция лентивирусных частиц

Лентивирусные частицы получали по протоколу, разработанному в лаборатории Д. Троно (<http://tcf.epfl.ch/>). Титр вируса определяли с помощью GFP-экспрессирующего вируса на основе вектора pLVTHM или с помощью иммунодетекции с соответствующими антителами и составляли около 7-7 ME/мл. Трансдукцию клеток проводили с MOI 10 в присутствии 10 мкг/мл полибрена. Для положительной селекции добавляли 5 мкг/мл гидрохлорида бластицидина S (Sigma-Aldrich) в течение 3–5 дней. Для контроля проводили трансдукцию соответствующим количеством лентивирусных частиц, несущих pLVTHM.

7. Электрофизиологические измерения

Измерения I_{Na}

Натриевые токи (I_{Na}) регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала в отведении от целой клетки. Микроэлектроды изготавливали из боросиликатного стекла с помощью пуллера (P-1000, Sutter Instrument). Сопротивление электродов составляло 1,5-2,5 МОм. Последовательное сопротивление компенсировалось на 75-80%. Сбор данных проводили с использованием усилителя Axopatch 200B и программного обеспечения Clampfit версии 10.3 (Molecular devices). Токи регистрировались на частоте 20 кГц и подвергались низкочастотной фильтрации на частоте 5 кГц с использованием аналого-цифрового интерфейса (система сбора данных Digidata 1440A, Molecular devices).

Внеклеточный раствор для регистрации I_{Na} содержал (мМ): 140 NaCl, 1 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Глюкозы (pH 7,4 CsOH). Внутриклеточный раствор содержал (мМ): 130 CsCl, 10 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7,3 CsOH).

При измерении I_{Na} токи через Ca^{2+} -каналы L-типа блокировались 10 мкМ нифедипина.

Амплитуды и свойства I_{Na} измеряли, как сообщалось ранее[17]. Измерения проводили при поддерживаемом потенциале -100 мВ. Вольт-амперная характеристика (ВАХ) оценивалась с помощью протокола с деполяризующим напряжением от -80 до 60 мВ в течение 40 мс при частоте 1 Гц с шагом 5 мВ. Проводимость I_{Na} (G) рассчитывали по уравнению: $G = I_{Na}/(V - V_{rev})$, где V — подаваемое напряжение, V_{rev} — потенциал реверсии. Стационарную инактивацию регистрировали путем измерения I_{Na} , вызванного шагом 20 мс до -15 мВ после варьирующего импульса продолжительностью 500 мс в диапазоне от -120 мВ до 0 мВ с шагом 5 мВ. Стационарные кривые активации и инактивации были получены как нормированный I_{Na} ($I_{Na}/I_{Na,max}$) в зависимости от значения поддерживаемого во время первого импульса потенциала. Стационарные активационные и инактивационные свойства были получены из отдельных соответствующих кривых, аппроксимированных функцией Больцмана: $G/G_{max} = 1/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$ и $I_{Na}/I_{Na,max} = 1/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$, соответственно, где G_{max} - максимальная проводимость, $V_{1/2}$ — напряжение, при котором активируется/инактивируется половина каналов, k — коэффициент наклона. Время восстановления после инактивации измеряли с использованием протокола с двумя импульсами: первый импульс 500 мс при -15 мВ с последующим восстановлением с помощью гиперполяризующего импульса на -100 мВ различной продолжительности от 1 мс до 3000 мс и последующего 20 мс тестового импульса при -15 мВ. I_{Na} , полученная из тестового импульса, была нормализована к I_{Na} из первого кондиционирующего импульса и была построена в зависимости от времени восстановления. Кривые аппроксимировались с помощью двойной экспоненциальной функции: $y = A_{fast} \times (1 - \exp(-t/t_{fast})) + A_{slow} \times (1 - \exp(-t/t_{slow}))$, где A_{fast} и A_{slow} — коэффициенты быстрой и медленной инактивирующих компонент соответственно, а t_{fast} и t_{slow} — их постоянные времени.

Измерения I_{CaL} и потенциалов действия

Электрофизиологические измерения токов через Ca^{2+} -каналы L-типа (I_{CaL}) выполняли с помощью усилителя EPC10 USB (НЕКА). Данные были записаны с помощью программного обеспечения для сбора данных PatchMaster (НЕКА). Сопротивление микропипеток составляло 2–5 МОм. I_{CaL} измеряли в режиме фиксации напряжения в конфигурации «целая клетка».

Внеклеточный раствор содержал (в mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 1 MgCl₂, 0,5 Na₂HPO₄, 1 CaCl₂, 10 Глюкозы, 10 HEPES-NaOH, pH 7,4. Внутриклеточный раствор для измерения I_{CaL} и ПД (в mM): 100 KAsp, 20 KCl, 5 Na₂ATP, 5,84 MgCl₂, 2,19 CaCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES-KOH. Расчетная концентрация свободного Mg²⁺ 1 mM, свободного Ca²⁺ 50 нМ (согласно расширенному WEBMAX от 03.07.2009).

Для измерения I_{CaL} поддерживаемый потенциал составлял -80 мВ. ВАХ оценивали с помощью деполяризующего импульса от -60 до +50 мВ в течение 250 мс после деполяризации 500 мс до -40 мВ для инактивации I_{Na} .

Деполаризующие шаги применялись с частотой 0,5 Гц. Фоновый ток, рассчитанный как установившийся ток при потенциалах ≤ -40 мВ и аппроксимированный линейной подгонкой к другим потенциалам, был вычтен перед оценкой пика I_{CaL} . Зарегистрированные токи были нормированы на емкость клетки, полученную при компенсации емкости клетки и последовательного сопротивления.

Потенциалы действия (ПД) в АКМП-КМ и КМ доноров регистрировали с использованием метода локальной фиксации потенциала в отведении от целой клетки при комнатной температуре. Внеклеточный раствор для регистрации ПД содержал 140 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 5,5 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES, pH 7,4 (NaOH). Внутриклеточный раствор содержал 105 мМ глюконата калия, 20 мМ KCl, 5 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 1,5 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, pH 7,2 (NaOH). Потенциал покоя был приведен к физиологическим потенциалам мембраны сердца в покое путем введения постоянного гиперполяризующего тока. ПД инициировали с помощью стимуляции частотой 1 Гц с импульсами продолжительностью 3 мс и амплитудой равной 1,2-кратному пороговому току. Скорость нарастания ПД и продолжительность ПД (APD) при реполяризации 30, 50 и 90% (APD₃₀, APD₅₀ и APD₉₀ соответственно) анализировали с использованием программного обеспечения IgorPro8 (WaveMetrics).

8. Анализ экспрессии генов

Тотальную РНК экстрагировали и подвергали обратной транскрипции, как описано выше (раздел секвенирования ДНК и кДНК). Праймеры для количественной ПЦР в реальном времени (qПЦР) на основе SYBR Green были разработаны с использованием программного обеспечения Primer-Blast [18]. Эффективность каждой пары праймеров проверяли методом стандартных кривых. qПЦР проводили с помощью qPCRmix-HS SYBR +ROX (Евроген) в соответствии с рекомендациями производителя. Относительную количественную оценку экспрессии генов проводили с использованием сравнительного метода $\Delta\Delta CT$ с последовательностью 18S РНК в качестве эталонного гена.

9. Статистический анализ

Для каждого измерения проводили не менее трех независимых экспериментов (не менее трех независимых кардиальных дифференцировок). Экспериментальные группы анализировали параллельно. Статистические сравнения D1, D2 и PCCD проводились либо с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони (для нормальных распределений с однородными дисперсиями), либо с помощью Н-критерия Крускала-Уоллиса с попарным анализом Манна-Уитни. Дискретные значения сравнивали с помощью t-критерия Фишера. Объединенные данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, где n представляет количество протестированных клеток. Значения $p < 0,05$

считались значимыми и обозначались (*), $p < 0,01$ и $p < 0,001$ обозначались (**) и (***) соответственно.

Статистический анализ для модели АКМП был выполнен с использованием GraphPad Prism версии 5.00 для Windows (GraphPad Software, www.graphpad.com) и R-Studio версии 1.0.153 с R версии 3.0.1. Для сравнения двух групп использовали критерий Манна–Уитни; для множественных сравнений использовали попарные критерии Манна-Уитни с последующей поправкой Бенджамини-Хохберга. Альфа-уровень 0,05 использовался для всех статистических анализов. Данные представлены как среднее \pm SEM.

Результаты и обсуждение

1. Характеристика кардиомиоцитов, несущих генетический вариант DSP-H1684R

Специфичные для пациента иПСК были получены от пациента с диагнозом PCCD, ассоциированным с генетическим вариантом DSP-H1684R, отсутствующим в базах данных ExAc0.2 и gnomAD (<https://exac.broadinstitute.org>, <https://gnomad.broadinstitute.org>). Согласно рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики и геномики (ACMG) 2018 года, этот вариант был классифицирован как вероятно патогенный.

Пациент-специфические иПСК-кардиомиоциты получали путем дифференцировки иПСК с использованием протокола модуляции сигнального пути Wnt/b-катенина с последующей метаболической очисткой. Кардиомиоциты иПСК, используемые в этом исследовании, дифференцировались в течение 24 дней. Кардиомиоциты иПСК человека окрашивали с помощью антител на сердечный саркомерный белок TNNI3 (сердечный тропонин I) и десмосомальные маркеры – DSP и PKP2. Распределение белков DSP и PKP2 не отличалось между контрольными кардиомиоцитами иПСК и кардиомиоцитами иПСК с PCCD (рис. 1Б). Вестерн-блот-анализ также не выявил различий в экспрессии DSP между кардиомиоцитами иПСК больных и здоровых людей (рис. 1В). Таким образом, мы не обнаружили морфологических различий между кардиомиоцитами пациента и здоровых доноров.

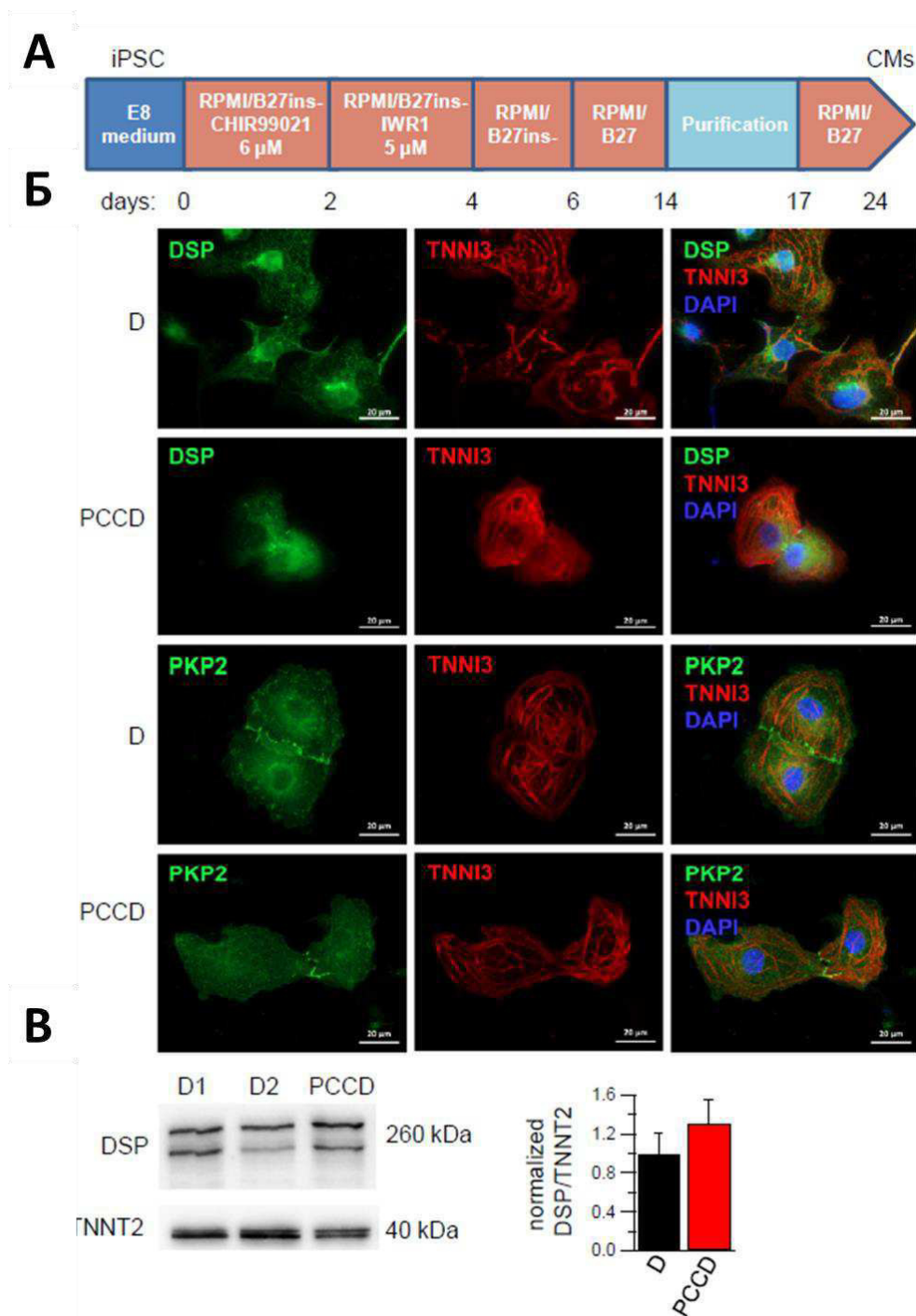


Рисунок 1. Характеристика кардиомиоцитов iPSC, полученных из клеток донора (D) и клеток больного пациента (PCCD). А. Упрощённая схема дифференцировки кардиомиоцитов из iPSC. Б. Иммуноокрашивание кардиомиоцитов (iPSC) на десмосомные маркеры десмоплакин (DSP) и плакофилин-2 (PKP2); маркер цитоскелета тропонин I типа 3 (TNNI3); и DAPI-меченая ядерная ДНК. В. Результаты вестерн-блота, показывающие экспрессию DSP и его суммарную экспрессию, нормализованную по отношению к сердечному тропонину T (TNNT2).

2. Измерения I_{Na} в КМ DSP-H1684R

Дифференцированные кардиомиоциты и ПСК пациента с генетическим вариантом DSP-N1684R сравнивали с клетками, полученными от здоровых доноров. Чтобы выяснить, связано ли замедление проводимости у пациента с генетическим вариантом DSP-N1684R с I_{Na} , мы исследовали активность ионных каналов в кардиомиоцитах и ПСК. Измерения натриевого тока через канал $Na_v1.5$ в кардиомиоцитах и ПСК человека выявили достоверное снижение плотности I_{Na} в кардиомиоцитах и ПСК, несущих генетический вариант DSP-N1684R, по сравнению со здоровыми донорами (рис. 2А, Б). Амплитуда пика I_{Na} уменьшилась с -420 ± 54 пА/пФ ($n=7$, D1), -471 ± 40 пА/пФ ($n=13$, D2) в донорских клетках до -226 ± 28 пА/пФ в клетках PCCD. ($n=12$, PCCD). Форма ВАХ не изменилась.

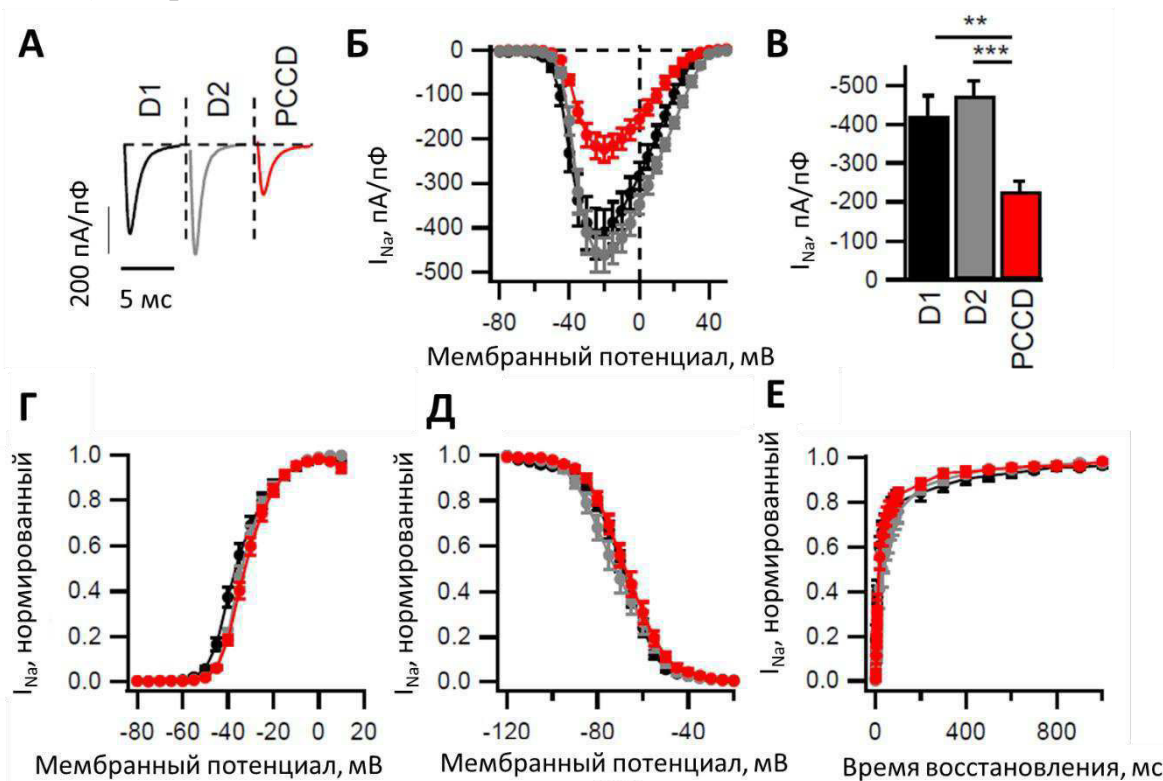


Рисунок 2. Влияние генетического варианта DSP-N1684R на плотность и биофизические свойства I_{Na} . А. Репрезентативные записи регистрации I_{Na} в кардиомиоцитах и ПСК донора (D1, черный; D2, серый) и в кардиомиоцитах пациента с PCCD (красный). Б. Вольтамперные кривые, отображающие плотность натриевого тока I_{Na} при различных потенциалах. В. Гистограмма максимальной плотности I_{Na} , полученная при регистрации зависимости тока от напряжения. Г. Стационарная активация. Д. Стационарная инактивация. Е. Кинетика восстановления из инактивированного состояния. Подробные значения параметров I_{Na} представлены в таблице 1. Звездочка отражает значимость ($p < 0,05$).

Снижение амплитуды I_{Na} может быть обусловлено не только уровнем экспрессии $Na_v1.5$, но и регуляцией электрофизиологических свойств канала. Кроме того, ранее было показано, что нокаут другого десмосомного гена *PKP2* влияет на электрофизиологические свойства I_{Na} [7,9]. С целью выявления

причин снижения амплитуды I_{Na} , мы зарегистрировали стационарную активацию, стационарную инактивацию и восстановление из инактивированного состояния в клетках с вариантом DSP-H1684R. Ни один из этих параметров не изменился по сравнению с контрольными клетками (рис. 2В; таблица 1).

		D1	n	D2	n	PCCD	n
Стационарная активация	$V_{1/2}$, мВ	-35.2 ± 1.2	13	-32.9 ± 1.0	11	-31.5 ± 0.98	12
	k	$6. \pm 0.4$		5.5 ± 0.3		5.8 ± 0.2	
Стационарная инактивация	$V_{1/2}$, мВ	-70.3 ± 0.9	13	-71.5 ± 2.4	11	-67.6 ± 1.5	12
	k	8.1 ± 0.3		8.5 ± 0.3		8.1 ± 0.3	
Восстановление из инактивированного состояния	τ_{fast} , мс	31.7 ± 11.3	10	32.5 ± 8.6	6	28.4 ± 8.7	9
	A_{fast}	0.75 ± 0.06		0.8 ± 0.06		0.83 ± 0.05	
	τ_{slow} , мс	435.6 ± 33.6		241.9 ± 38.3		317.2 ± 71.7	
	A_{slow}	0.3 ± 0.05		0.29 ± 0.04		0.23 ± 0.04	

Таблица 1. Биофизические характеристики натриевого тока в КМ-иПСК, полученных от здоровых доноров (D1 и D2) и пациента (PCCD).

3. Измерения I_{CaL} в КМ DSP-H1684R

В желудочковых миоцитах генерация и распространение ПД через сердце определяется главным образом I_{Na} , в то время как токи через Ca^{2+} -каналы L-типа (I_{CaL}) приводят к входу Ca^{2+} и сокращению желудочковых кардиомиоцитов. Однако в клетках водителя ритма I_{CaL} играет важную роль в запуске ПД [27]. Наши измерения показали, что I_{CaL} также был снижен в кардиомиоцитах iPSC с генетическим вариантом DSP-H1684R (рис. 3А, В). Максимальная амплитуда уменьшилась с $-12 \pm 1,5$ пА/пФ ($n=20$, D1), $-15,9 \pm 1,7$ пА/пФ ($n=25$, D2) в клетках донора до $-6,7 \pm 0,7$ пА/пФ в клетках пациента ($n=54$, PCCD) (рис. 3С).

В целом, мы наблюдали множественные нарушения активности различных ионных каналов в кардиомиоцитах iPSC, несущих генетический вариант DSP-H1684R.

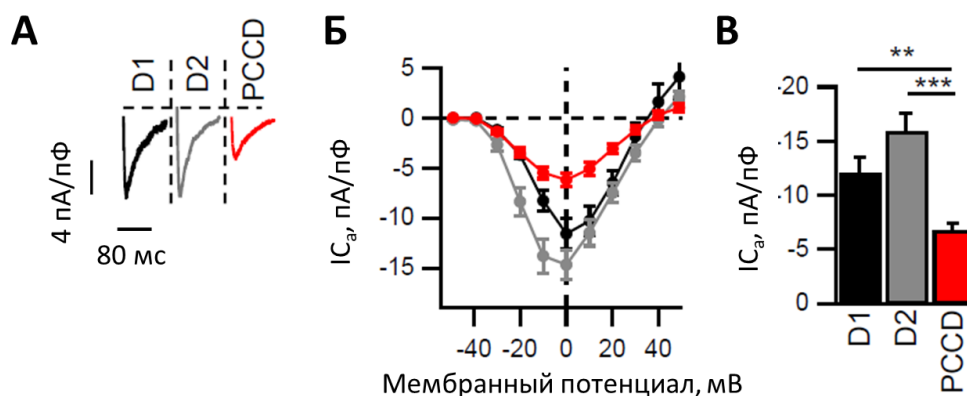


Рисунок 3. Влияние генетического варианта DSPH1684R на амплитуду I_{CaL} . А. Репрезентативные записи регистрации I_{CaL} в кардиомиоцитах ИПСК донора (D1, черный; D2, серый) и в кардиомиоцитах пациента с PCCD (красный). Б. Вольт-амперные характеристики для I_{CaL} . В. Гистограмма максимальной плотности I_{CaL} полученная при регистрации зависимости тока от напряжения.

4. Измерения потенциала действия в КМ DSP-H1684R

Чтобы проанализировать, как изменения натриевых и кальциевых токов влияют на ПД в кардиомиоцитах ИПСК, полученных от пациента с вариантом DSP-H1684R, мы применили постоянную инъекцию тока, чтобы зафиксировать мембранный потенциал около -70 мВ, что является близким к значению потенциала покоя взрослых кардиомиоцитов. Данная фиксация была выполнена в связи с тем, что ИПСК-кардиомиоциты, будучи не полностью зрелыми клетками, обладают более положительным значением потенциала покоя, который препятствует запуску ПД [19]. ПД инициировались подачей тока в течение 3 мс с частотой 1 Гц. Как показано на рис. 4, генетический вариант DSP-H1684R демонстрировал супрессивное действие на ПД. Однако нам не удалось инициировать ПД во всех клетках. Вероятность инициации ПД составила 83% (13/14 клеток) и 100% (24/24 клетки) в группах D1 и D2 соответственно. В то же время в клетках PCCD вероятность запуска ПД составила 73% (33/45 клеток), что значительно меньше, чем в донорских клетках. Кроме того, амплитуда ПД была снижена в клетках PCCD (D1: $102,1 \pm 5,6$ мВ; D2: $102,8 \pm 1,6$ мВ; PCCD: $94,4 \pm 3$ мВ, рис. 4). Несмотря на снижение I_{Na} , максимальная скорость нарастания (V_{max}) ПД достоверно не отличалась (D1: $35,3 \pm 10,9$ мВ/мс; D2: $29,3 \pm 5,6$ мВ/мс; PCCD: $21 \pm 4,3$ мВ/мс). Однако продолжительность ПД при 50% максимальной амплитуды была снижена в клетках с генетическим вариантом DSP-H1684R (D1: 486 ± 99 мс; D2 287 ± 21 мс; PCCD: 232 ± 22 мс). Таким образом, подавление I_{Na} и I_{CaL} приводило к выраженной модуляции ПД.

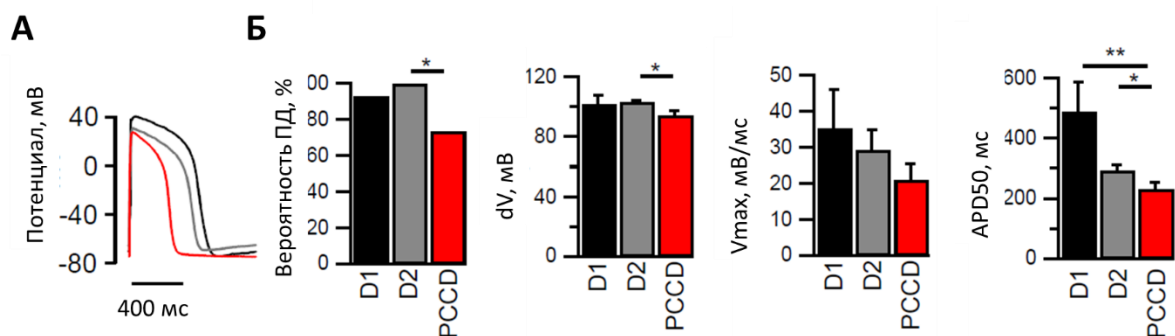


Рисунок 4. Влияние генетического варианта DSP-H1684R на ПД кардиомиоцитов. А. Репрезентативные потенциалы действия в кардиомиоцитах донора и ПСК (D1, черный; D2, серый) и в кардиомиоцитах PCCD (красный), представлены в виде суперпозиции для упрощения сравнения. Б. Усредненные параметры характеристик потенциала действия – вероятность инициации ПД, отражающая долю клеток, способных к генерации ПД в ответ на стимулы; амплитуда ПД; максимальная скорость ПД; продолжительность потенциала действия измеряется при 50% его амплитуды. Звездочка отражает значимость ($p < 0,05$).

Патогенные варианты в десмосомных генах являются преобладающей причиной развития АКМП. Однако варианты *DSP* составляют лишь 2-12% случаев, вероятно, из-за того, что мутации *DSP* приводят к более пенетрантному фенотипу, связанному с внезапной сердечной смертью [20-22]. В последнее время патогенные варианты гена *DSP* связывают также с дилатационной кардиомиопатией, некомпактной кардиомиопатией левого желудочка и нарушением сердечной проводимости, что указывает на сложность молекулярных механизмов, в которых участвует *DSP* [23-26]. Все вышеперечисленные нарушения склонны к ранним проявлениям жизнеугрожающих аритмий при отсутствии структурных пороков сердца. Более того, анализ мышинной модели с гаплонедостаточностью *DSP* и носителей мутации *DSP* показал, что электрофизиологические проявления заболевания могут предшествовать гистологическим изменениям [27].

Недавно был описан генетический вариант DSP-H1684R, связанный с прогрессирующим нарушением сердечной проводимости и высоким риском внезапной смерти [25]. Мы предположили, что этот вариант может приводить к ремоделированию десмосом и аномальной электрической активности кардиомиоцитов. Чтобы выяснить последствия DSP-H1684R, мы получили кардиомиоциты пациента, полученные из иПСК [13]. В качестве контрольных клеток использовали кардиомиоциты иПСК двух разных здоровых доноров. Наши результаты показали, что распределение десмоплакина, плакофилина-2 и тропонина I в клетках DSP-H1684R не отличалось от контрольных клеток

(рис. 1Б). Однако электрическая активность и ПСК-кардиомиоцитов пациента была изменена по сравнению с донором (рис. 4). Кроме того, были затронуты несколько токов, определяющих генерацию ПД и ее форму (рис. 2, 3). Это согласуется с предыдущими исследованиями мутации гена *DSG2*, ассоциированной с АКМП[28].

Генетический вариант DSP-H1684R уменьшал амплитуду тока $Na_v1.5$ (рис. 2, А-В). Аналогичные результаты ранее были получены для других десмосомных генов[28-31]. Снижение тока $Na_v1.5$ не было связано с изменениями в активации I_{Na} , стационарной инактивации или восстановлении после инактивации (рис. 2, таблица 1), что свидетельствует о уменьшении количества каналов $Na_v1.5$ на плазматической мембране кардиомиоцитов и ПСК пациента. Это наблюдение согласуется с уменьшением трафика $Na_v1.5$ в область вставочного диска, связанного с дефицитом PKP2, о котором сообщалось ранее[29].

Интересно, что кальциевый ток L-типа также был значительно снижен в нашей модели РССД (рис. 3), что указывает на аномальную передачу кальциевого сигнала в кардиомиоцитах пациента на уровне входа Ca^{2+} . По причине того, что мы компенсировали свободный цитозольный Ca^{2+} в наших условиях Ca^{2+} -буфером (10 мМ EGTA), полученные результаты не связаны с Ca^{2+} -зависимой модуляцией кальциевых каналов L-типа (такой как кальций-зависимая инактивация)[19].

Снижение токов ионов натрия и кальция может влиять на запуск ПД, особенно в клетках кардиостимулятора, где в фазу 0 ПД вовлечены как I_{Na} , так и I_{CaL} [19]. Помимо аномалий I_{Na} и I_{CaL} , КМ-и ПСК, полученные от пациента с РССД, также демонстрировали нарушение морфологии ПД. Мы наблюдали, что амплитуда ПД и его инициация угнетались в клетках DSP-H1684R, что также сопровождалось снижением продолжительности ПД (рис. 4).

Наше исследование имеет ряд ограничений, о которых следует упомянуть. КМ-и ПСК представляют не являются зрелыми клетками сердца и их фенотип отличается от зрелых кардиомиоцитов. Мы использовали две линии и ПСК в качестве контроля, полученные от двух неродственных здоровых доноров без каких-либо сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе и без семейного анамнеза сердечных заболеваний. Однако этот подход не может полностью исключить наличие каких-либо скрытых патологических мутаций в контрольных линиях и ПСК, поэтому использование изогенных линий и ПСК с отредактированным геном считается лучшей практикой для демонстрации того, что наблюдаемые эффекты опосредованы специфическими для пациента мутациями.

В целом, наши результаты показывают, что патогенные генетические варианты *DSP* могут влиять на множественные ионные токи в кардиомиоцитах. Эти токи в целом подавляют генерацию и продолжительность ПД, что может привести к прогрессирующему нарушению сердечной проводимости, развитию аритмогенной кардиомиопатии и к внезапной сердечной смерти.

5. Клинические данные пациентов и создание модели АКМП на основе иПСК

Пациент-специфические иПСК были получены от пациентки, имеющей сложные генетические варианты в гене *PKP2*: *PKP2* c.354delT и *PKP2* p.Lys859Arg. Диагноз АКМП был поставлен в возрасте 12 лет на основании повторяющихся желудочковых тахикардий и бивентрикулярной сердечной недостаточности по модифицированным критериям Task Force[32]. Наблюдалась выраженная дилатация правого желудочка (z-показатель RVDD = 4,5) наряду со снижением сердечной сократимости (ФВ ЛЖ = 30%, TAPSE = 0,9 см). В связи с прогрессирующей сердечной недостаточностью и поражением левого желудочка в возрасте 15 лет пациенту была проведена трансплантация сердца; морфологическое исследование эксплантированной сердечной ткани соответствовало диагнозу АКМП: определялось фиброзно-жировое замещение и обширные поля фиброза, площадь кардиомиоцитов свободной стенки ПЖ составляла менее 40%. Семейный генетический скрининг показал, что мать пробанда является носителем только варианта *PKP2* c.354delT без каких-либо аритмий в анамнезе, а ДНК отца для анализа недоступна. Анализ последовательности *PKP2* показал, что *PKP2* c.354delT представляет собой делецию сдвига рамки считывания, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона в положении 141 белка (p.(Tyr119MetfsTer23)). Оба варианта (*PKP2* c.354delT и *PKP2* p.Lys859Arg) отсутствовали в базах данных ExAc0.2 и gnomAD (<https://exac.broadinstitute.org>, <https://gnomad.broadinstitute.org>). Согласно рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики и геномики (ACMG) от 2018 г., оба варианта были классифицированы как варианты с неопределенной значимостью.

Для моделирования АКМП *in vitro* были получены и охарактеризованы две изогенные линии иПСК, специфичные для пациента, от одного и того же пациента, а также две контрольные линии от здорового донора соответствующего пола в соответствии с общими рекомендациями. Ранее была опубликована одна из линий полученных из клеток пациента[14]. Для каждого эксперимента использовали как контрольную, так и специфичные для пациента линии. Для дальнейших исследований иПСК были дифференцированы в кардиомиоциты (КМ) с последующей метаболической очисткой. Для последующих исследований использовали только лунки с высоким процентом Т-положительных клеток сердечного тропонина (TNNT2+). Конечный выход сердечных тропонин-Т-положительных

(TNNT2+) кардиомиоцитов составил $87 \pm 6\%$. Никаких изменений в эффективности дифференцировки между контрольными линиями и ПСК АКМП не наблюдалось по экспрессии *TNNT2*.

Иммунофлуоресцентное окрашивание кардиомиоцитов, полученных из иПСК, от пациента с АКМП (АКМП-КМ) продемонстрировало снижение содержания десмосомального РКР2 ($43,3 \pm 7,6\%$ от контрольного уровня) (рис. 5, А-В), что соответствовало снижению общего внутриклеточного уровня РКР2 ($24,6 \pm 2,4$. % от контрольного уровня), измеренного вестерн-блоттингом (рис. 5, Г). Секвенирование кДНК выявило наличие транскрипта РКР2 р.К859R, что указывает на трансаллельную конфигурацию генетических вариантов (рис. 5, Д). Следовательно, гаплонедостаточность РКР2 в сочетании с миссенс-вариантом в дальнейшем считалась основным эффектом генотипа АКМП-КМ.

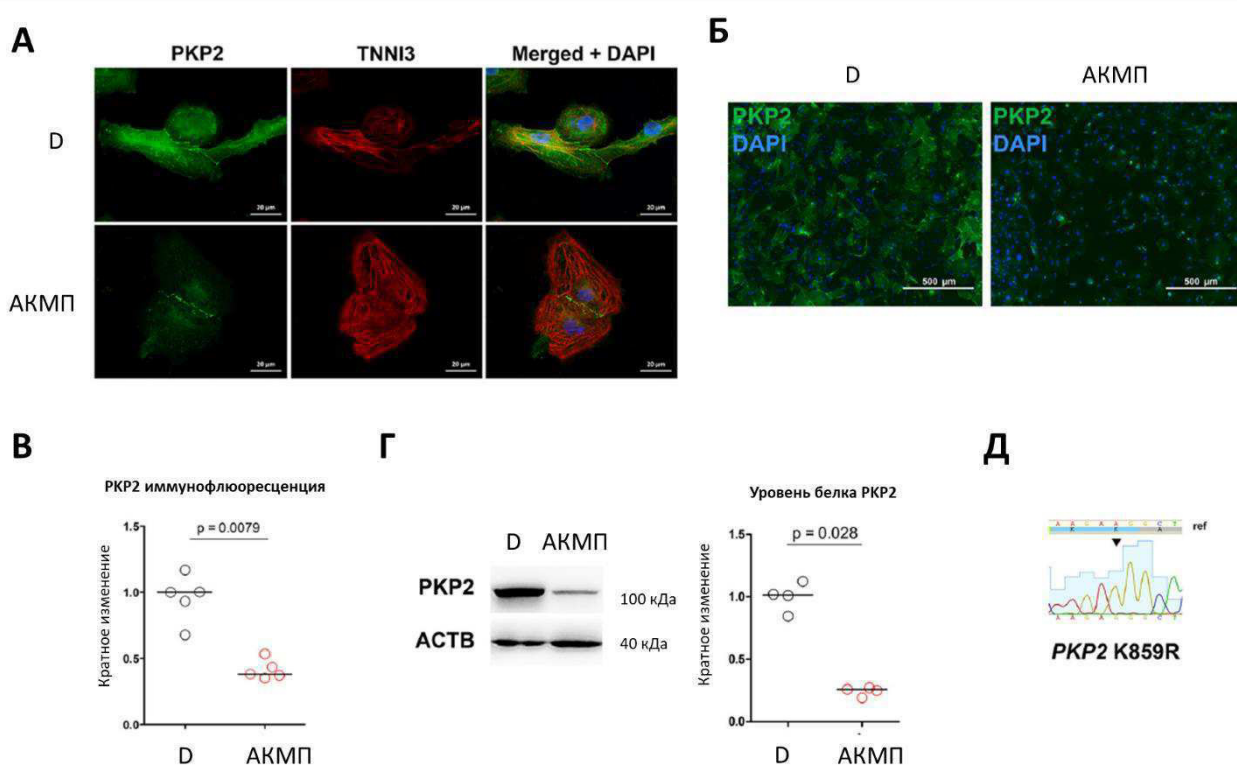


Рисунок 5. Характеристика кардиомиоцитов, полученных из иПСК. АКМП-кардиомиоциты, полученные из иПСК, продемонстрировали снижение уровня РКР2. А. Кардиомиоциты окрашены на плакофилин-2 (РКР2) и тропонин I (TNNI3). Ядра клеток контрастировали DAPI. Б. Срезы кардиомиоцитов, окрашенные на плакофилин-2 (РКР2). Ядра клеток с контрастным окрашиванием DAPI. В. Количественная оценка содержания РКР2 в десмосомах (медиана, $n = 5$ для каждой группы, критерий Манна-Уитни). Г. Репрезентативный вестерн-блот для РКР2. Для количественной оценки плотность бэндов нормировали по уровню β -актина (АСТВ) (медиана, $n = 4$ для каждой группы, критерий Манна-Уитни). Д. Хроматограмма, показывающая наличие варианта РКР2 р.Lys859Arg в кДНК, выделенной из АКМП-КМ. Замена обозначена стрелкой, «ref» указывает на референсные последовательности.

5. Анализ натриевых токов и ПД на модели АКМП-КМ

Ранее сообщалось, что дефицит РКР2 в кардиомиоцитах связан со снижением I_{Na} [7,9]. Мы обнаружили, что плотность I_{Na} была значительно снижена в АКМП-КМ (плотность тока при тестовом потенциале -15 мВ $-247,2 \pm 28,4$ пА/пФ в АКМП-КМ против $-464,2 \pm 56,8$ пА/пФ в контрольных КМ) (рис. 6, А-В).

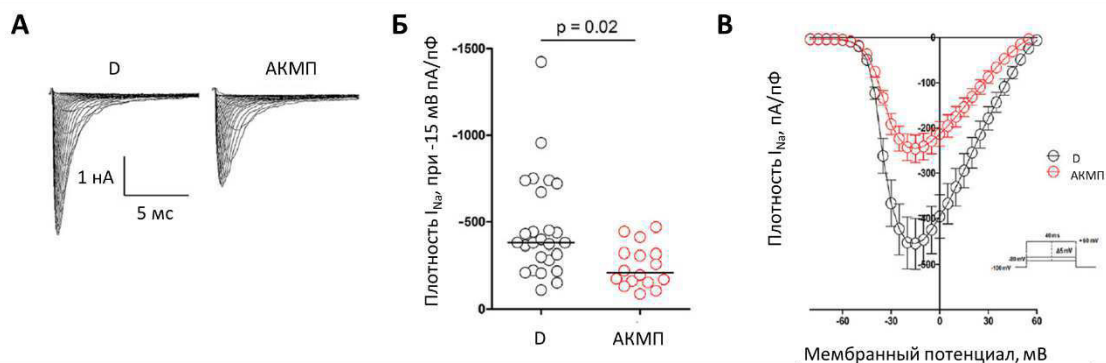


Рисунок 6. Плотность натриевого тока, экспрессия натриевых каналов сердца и потенциалы действия в кардиомиоцитах, полученных из иПСК.

АКМП-кардиомиоциты, полученные из иПСК, продемонстрировали сниженную плотность I_{Na} , которая могла быть восстановлена до контрольного уровня трансдукцией РКР2 дикого типа. А. Репрезентативные записи I_{Na} , регистрируемые от КМ-иПСК. Б. Плотность I_{Na} при тестовом потенциале -15 мВ в КМ (медиана, D: $n = 26$, АКМП: $n = 16$, критерий Манна-Уитни с последующей поправкой Бенджамини-Хохберга). В. Зависимость тока от напряжения для I_{Na} в КМ (среднее значение \pm SEM, D: $n = 26$, АКМП: $n = 16$).

Никаких существенных изменений в кинетике (стационарная активация, стационарная инактивация, восстановление после инактивации) не наблюдалось, что указывает на то, что снижение тока не было связано с модуляцией гейтинга натриевого канала (таблица 2).

		D	n	АКМП	n
Стационарная активация	$V_{1/2}$, мВ	-31.7 ± 0.4	26	-32.8 ± 0.7	12
	k	6.3 ± 0.2		5.7 ± 0.2	
Стационарная инактивация	$V_{1/2}$, мВ	-71.0 ± 1.0	16	-71.0 ± 1.2	12

	k	7.9 ± 0.2		7.7 ± 0.2	
Восстановление из инактивированного состояния	τ_{fast} , мс	15.6 ± 1.1 25.5	11	25.5 ± 6.0	8
	A_{fast}	0.74 ± 0.04		0.69 ± 0.07	
	τ_{slow} , мс	697.9 ± 49.4		904.9 ± 189.5	
	A_{slow}	0.3 ± 0.03		0.34 ± 0.03	

Таблица 2. Электрофизиологические характеристики натриевого тока в кардиомиоцитах, полученных из контрольных и иПСК пациентов.

Наблюдаемое снижение I_{Na} было связано со снижением скорости нарастания ПД без существенных изменений продолжительности ПД (рис. 7, А, Б).

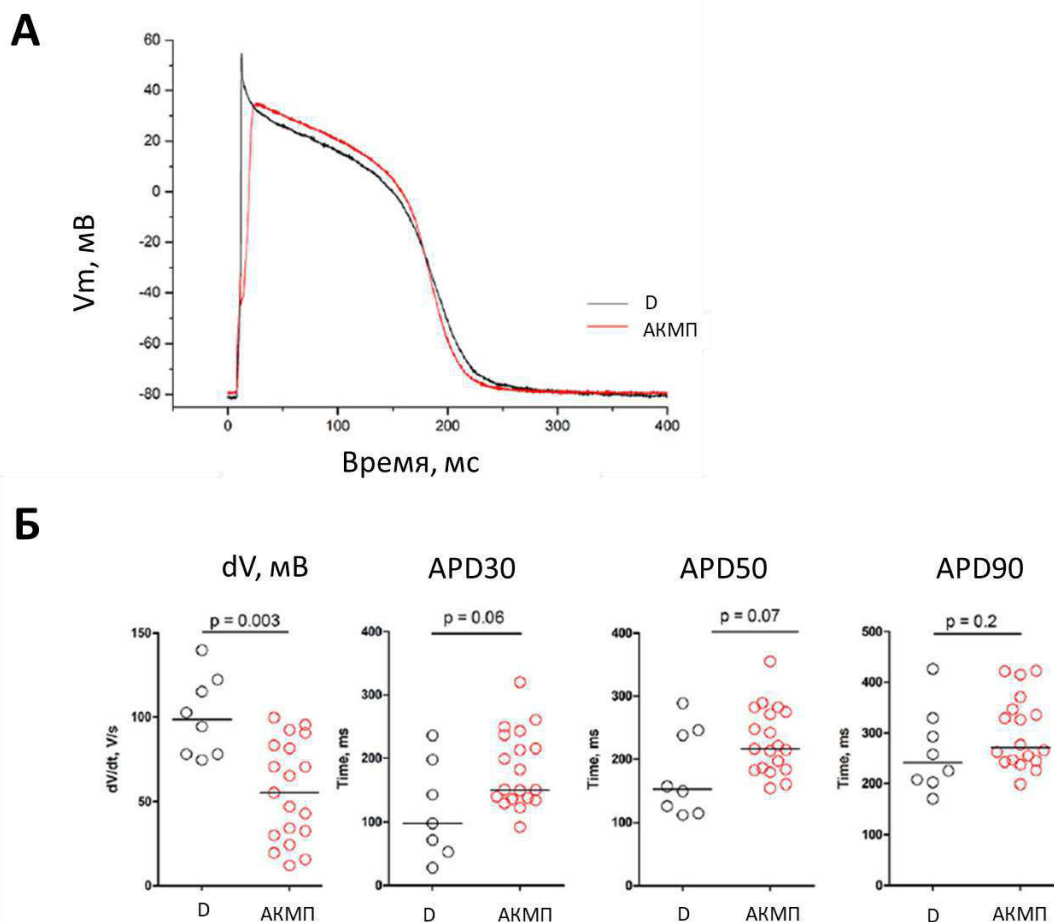


Рисунок 7. Характеристика ПД на модели АКМП-КМ. А. Репрезентативные следы потенциала действия, записанные в КМ. Б. Параметры потенциала действия, dV/dt – скорость нарастания потенциала действия, APD30, APD50, APD90 – продолжительность ПД при 30%, 50% и 90% реполяризации (медиана, D: n=8, АКМП: n= 18, критерий Манна-Уитни).

Иммунофлуоресцентное окрашивание одиночных КМ не выявило существенных изменений в распределении $Na_v1.5$ в АКМП-КМ по сравнению с контрольными КМ (рис. 8, А). Кроме того, экспрессия белка *SCN5A* и экспрессия соответствующего гена *SCN5A* не изменились в АКМП-КМ (рис. 8, Б, В, Г).

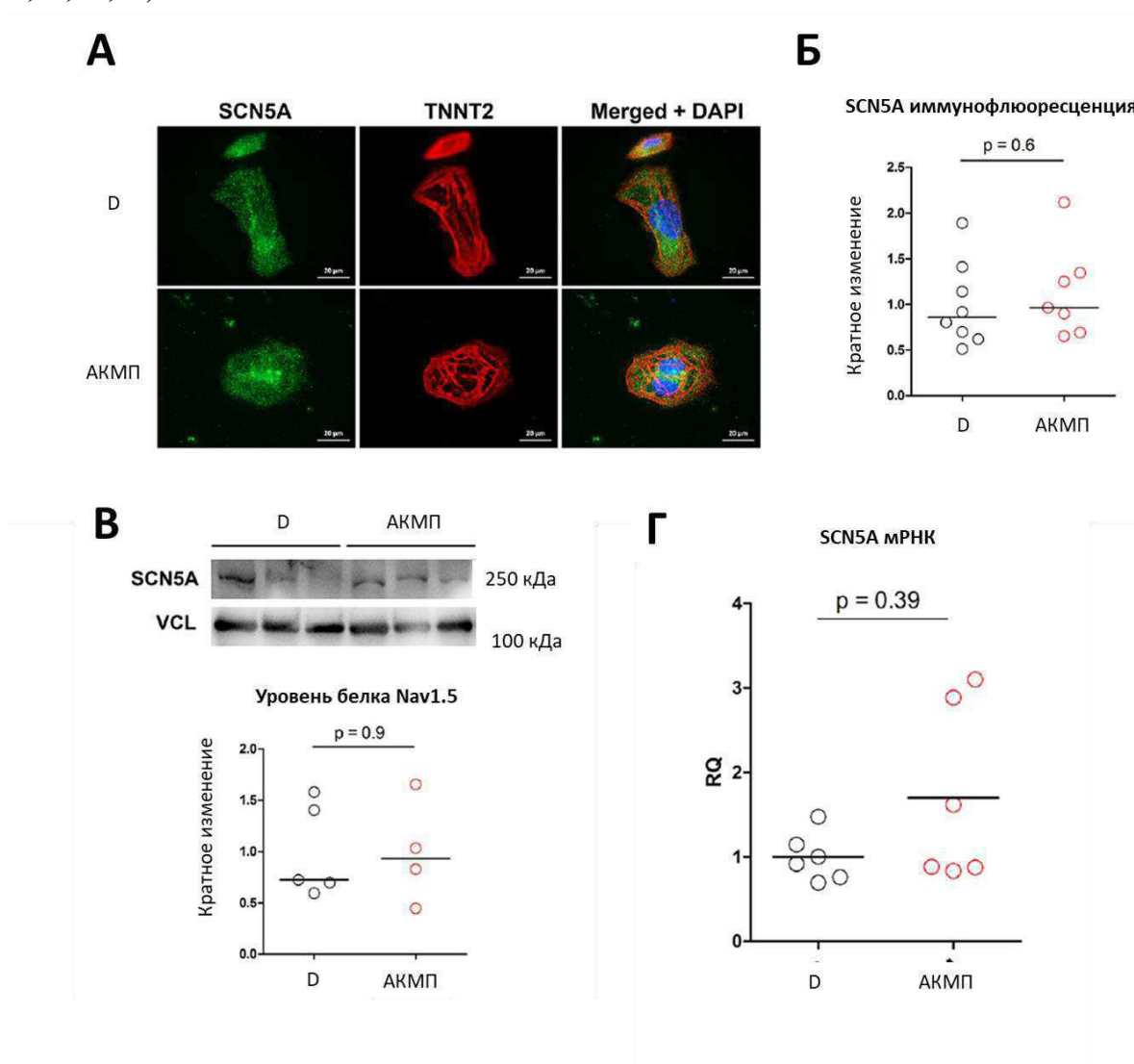


Рисунок 8. Распределение *SCN5A* и $Na_v1.5$ в КМ-иПСК. А. Кардиомиоциты окрашены на $Na_v1.5$ (*SCN5A*) и тропонин Т (*TNNT2*). Б. Количественная оценка уровня *SCN5A* иммуноокрашенных КМ (медиана, D: n = 8, АКМП: n = 7, критерий Манна-Уитни). В Пример вестерн-блоттинга для *SCN5A*. Для количественной оценки плотность полос нормировали по уровню винкулина (VCL) (медиана, D: n = 5, АКМП: n = 4, критерий Манна-Уитни). (Г) Уровень мРНК *SCN5A*, измеренный с помощью количественной ПЦР (медиана, n = 6 для каждой группы, критерий Манна-Уитни). RQ – относительное количество.

Чтобы продемонстрировать, что наблюдаемое снижение I_{Na} связано со сниженным уровнем РКР2 в АКМП-КМ, мы провели трансдукцию

дифференцированных СМ с помощью лентивирусной конструкции *RKP2*-WT, способной встраиваться в межклеточные контакты и повышать общий уровень *RKP2* в клетках. КМ. Экспрессия *RKP2*-WT в АКМП-КМ приводила к восстановлению I_{Na} (рис. 9 А, Б). Значительное снижение плотности I_{Na} в АКМП-КМ было восстановлено с помощью трансдукции *RKP2* WT.

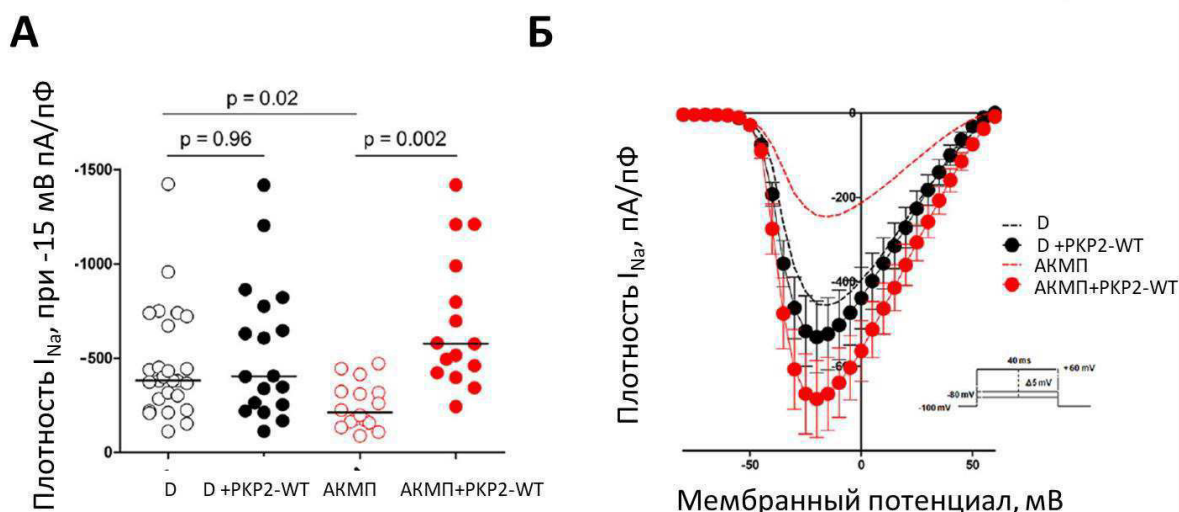


Рисунок 9. Изменение плотности I_{Na} в АКМП-КМ при трансдукции *RKP2*-WT. А. Восстановление плотности I_{Na} при тестовом потенциале -15 мВ в АКМП-КМ при экспрессии *RKP2* дикого типа (*RKP2*-WT) (медиана, D: n = 26, D + *RKP2*-WT: n = 18, АКМП: n = 16, АКМП + *RKP2*-WT: n = 15, критерий Манна-Уитни с последующей поправкой Бенджамини-Хохберга). (Б) Зависимость тока от напряжения для плотности I_{Na} в КМ, трансдуцированных *RKP2* дикого типа (среднее \pm SEM, D: n = 26, D + *RKP2*-WT: n = 18, АКМП: n = 16, АКМП + *RKP2*-WT: n = 15).

Таким образом была создана модель АКМП на основе иПСК для изучения молекулярных и функциональных последствий генетических вариантов *RKP2*, лежащих в основе развития АКМП. Генетический фон, связанный с АКМП, вызывает значительное ремоделирование всей физиологии кардиомиоцитов, проявляющееся в многочисленных внутриклеточных дефектах, связанных друг с другом. Однако в настоящем исследовании мы сосредоточились главным образом на электрофизиологических свойствах кардиомиоцитов. Все четыре исследованные линии иПСК были способны дифференцироваться в сторону кардиомиоцитов, нарушений в процессе дифференцировки не наблюдалось. Полученные АКМП-иПСК несли сложные генетические варианты в гене *RKP2*: делецию сдвига рамки считывания c.354delT, вызывающую предварительное образование стоп-кодона, и, возможно, повреждающий миссенс-вариант *RKP2* p.K859R. Принимая во внимание, что мать пробанда была носителем только варианта *RKP2* c.354delT и что вариант *RKP2* p.K859R

присутствовал в РНК, выделенной из специфических для пациента КМ, мы предположили трансаллельную конфигурацию этих двух вариантов. Учитывая значительное снижение содержания внутриклеточной РКР2 в АКМП-КМ с трансаллельной конфигурацией двух вариантов, основным эффектом генетических вариантов можно считать сочетание гаплонедостаточности с мутантным белком, экспрессируемым из второго аллеля. Полученная клеточная модель позволила оценить электрофизиологические последствия изучаемого генетического варианта.

В предыдущих исследованиях сообщалось о тесной связи дефицита РКР2 в кардиомиоцитах со снижением амплитуды I_{Na} , приводящим к АКМП-или Бругада-подобному проаритмогенному состоянию [7,9,33]. Как и ожидалось, мы наблюдали значительное снижение I_{Na} в дифференцированных АКМП-КМ. Плотность I_{Na} восстанавливалась за счет экзогенной экспрессии РКР2-WT, что можно объяснить восстановлением молекулярных взаимодействий, связанных с десмосомами. Несмотря на отсутствие существенных различий в экспрессии белка α -субъединицы $Nav1.5$ и соответствующего гена *SCN5A* между АКМП-КМ и контрольными КМ, нельзя было исключить аномалии мембранной локализации натриевых каналов, связанные с нарушением структуры десмосом. Кроме того, не было обнаружено различий в других биофизических свойствах $Nav1.5$ между АКМП-КМ и контрольными КМ. Скорость подъема ПД была значительно снижена в АКМП-КМ, что согласуется с данными литературы [33,34].

Настоящее исследование имеет ряд ограничений, на которые необходимо указать. Используемые в исследовании КМ демонстрировали незрелый фенотип, существенно отличающийся от взрослых кардиомиоцитов [35]. Кроме того, изоляция одноклеточных КМ для электрофизиологических экспериментов может влиять на взаимодействие между десмосомальными белковыми комплексами и натриевыми каналами. Также КМ-иПСК не сильно поляризованы, и мембрана КМ-иПСК не сегрегирована на вставочные диски и латеральную мембрану, и это может повлиять на распределение $Nav1.5$ в мембране. Тем не менее, КМ-иПСК, использованные в исследовании, воспроизводили фенотип АКМП, и полученные данные в значительной степени согласуются с ранее опубликованными результатами на клеточных и животных моделях АКМП.

В совокупности наши результаты демонстрируют, что генетические варианты *PKP2* могут вызывать электрофизиологические нарушения. Восстановление десмосомной структуры путем трансдукции *PKP2* дикого типа восстанавливало плотность натриевого тока.

Выводы

- 1) Плотность натриевого тока была достоверно снижена в КМ-иПСК пациента относительно значений для здоровых доноров. Параметры стационарной активации и стационарной инактивации натриевого тока,

зарегистрированные от КМ-иПСК пациента достоверно не отличались относительно соответствующих параметров для здоровых доноров. Отсутствие изменений кинетики натриевого тока позволяет предположить, что наиболее вероятным механизмом снижения натриевого тока является дефект транспорта каналов $Na_v1.5$ на плазматическую мембрану кардиомиоцитов.

- 2) Генетический вариант DSP-H1684R приводит к достоверному снижению кальциевого тока I_{CaL} .
- 3) Генетический вариант DSP-H1684R оказывает влияние на параметры потенциалов действия КМ-иПСК: амплитуда ПД снижена и продолжительность ПД сокращалась. Предположительно данный эффект связан с комплексным нарушением регуляции различных ионных каналов. Наиболее вероятно возникновение дефекта транспорта натриевых и кальциевых каналов на мембрану, что приводит к снижению количества функционально активных каналов и изменениям морфологии ПД, что может лежать в основе развития аритмии.
- 4) Генетические варианты *PKP2* с.354delT и K859R идентифицированные у пациента с АКМП приводили к снижению плотности I_{Na} на модели КМ-иПСК. При этом изменения параметров стационарной активации и инактивации идентифицировано не было.
- 5) Генетические варианты *PKP2* с.354delT и K859R идентифицированные у пациента с АКМП приводили к замедлению нарастания ПД.
- 6) Трансдукция КМ-иПСК пациента с АКМП лентивирусной конструкцией *PKP2* WT приводила к восстановлению плотности I_{Na} , что свидетельствует о взаимосвязи дисфункции *PKP2* и $Na_v1.5$
- 7) Полученные результаты согласуются с описанными в литературе данными о том, что аритмогенный эффект мутаций в генах белков десмосом связан с влиянием на активность и количество $Na_v1.5$ в плазматической мембране кардиомиоцитов. Таким образом, можно предположить некоторую общность механизма развития нарушений сердечного ритма в данных случаях.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Зайцева А.К., Карпушев А.В., Жоров Б.С., Костарева А.А. Биофизические механизмы натриевых каналопатий в миокарде: синдром удлиненного интервала QT // Российский физиологический журнал, т.105(1) 3-23. 2019
2. Zaytseva AK, Karpushev AV, Kiselev AM, Mikhaylov EN, Lebedev DS, Zhorov BS, Kostareva AA (2019). Characterization of a novel SCN5A genetic variant A1294G associated with mixed clinical phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.*; 516(3):777-783.
3. Khudiakov A, Zaytseva A, Perepelina K, Smolina N, Pervunina T, Vasichkina E, Karpushev A, Tomilin A, Malashicheva A, Kostareva A. Sodium current abnormalities and deregulation of Wnt/ β -catenin signaling in iPSC-derived

- cardiomyocytes generated from patient with arrhythmogenic cardiomyopathy harboring compound genetic variants in plakophilin 2 gene. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020 Nov 1;1866(11):165915.
4. Gusev K, Khudiakov A, Zaytseva A, Perepelina K, Makeenok S, Kaznacheeva E, Kostareva A. Impact of the DSP-H1684R Genetic Variant on Ion Channels Activity in iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2020 Jul 25;54(4):696-706.
 5. Zaytseva AK, Boitsov AS, Kostareva AA, Zhorov BS. Possible Interactions of Extracellular Loop IVP2-S6 With Voltage-Sensing Domain III in Cardiac Sodium Channel. *Front Pharmacol.* 2021 Oct 14;12:742508.
 6. Korkosh VS, Zaytseva AK, Kostareva AA, Zhorov BS. Intersegment Contacts of Potentially Damaging Variants of Cardiac Sodium Channel. *Front Pharmacol.* 2021 Nov 4;12:756415.
 7. Zaytseva AK, Kiselev AM, Boitsov AS, Fomicheva YV, Pavlov GS, Zhorov BS, Kostareva AA. Characterization of the novel heterozygous SCN5A genetic variant Y739D associated with Brugada syndrome. *Biochem Biophys Rep.* 2022 Mar 11;30:101249.
 8. Perepelina K, Zaytseva A, Khudiakov A, Neganova I, Vasichkina E, Malashicheva A and Kostareva A LMNA mutation leads to cardiac sodium channel dysfunction in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy patient. *Front. Cardiovasc.* 2022 Med. 9:932956.

Тезисы

1. Zaytseva A.K., Karpushev A.V., Fomicheva Y., Vasichkina E.S., Michaylov E.N., Kostareva A.A., Zhorov B.S.. Two novel mutations in SCN5A gene cause enhanced inactivation and lead to Brugada syndrome // *European Heart Journal* 40(S1):P1597 2019
2. Зайцева А.К., Фомичёва Ю.В., Михайлов Е.Н., Васечкина Е.С., Жоров Б.С., Костарева А.А. Стабилизация медленно-инактивированного состояния канала Nav1.5 как механизм развития синдрома Бругада при мутации Y739D // *Acta Naturae.* 2019.
3. Худяков А.А., Зайцева А.К., Перепелина К.И., Гусев К.О., Клаузен П.Е., Карпушев А.В., Томилин А.Н., Малашичева А.Б., Костарева А.А. Изучение молекулярных механизмов аритмогенной кардиомиопатии на модели ипск-кардиомиоцитов: фокус на GSK3В киназу // *Материалы IV Национального Конгресса по Регенеративной Медицине.* Москва, 20–23 ноября 2019 года
4. Худяков А.А., Зайцева А.К., Перепелина К.И., Гусев К.О., Клаузен П.Е., Карпушев А.В., Томилин А.Н., Малашичева А.Б., Костарева А.А. Изучение молекулярных механизмов аритмогенной кардиомиопатии на модели ИПСК-кардиомиоцитов: фокус на GSK3В киназу. *Гены и Клетки.* 2019; 14 (S):250-251.

Список цитируемой литературы

- [1] К.М.В. Тарловская Е. И., Лечение нарушений ритма. Учебное пособие для студентов медицинских вузов. , Киров: Кировская ГМА (2011) 132.
- [2] J.J. Schott, C. Alshinawi, F. Kyndt, V. Probst, T.M. Hoortje, M. Hulsbeek, A.A. Wilde, D. Escande, M.M. Mannens, H. Le Marec, Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A, *Nat Genet* 23 (1999) 20-21. 10.1038/12618.
- [3] B. Asatryan, A. Medeiros-Domingo, Molecular and genetic insights into progressive cardiac conduction disease, *Europace* 21 (2019) 1145-1158. 10.1093/europace/euz109.
- [4] D. Corrado, C. Basso, G. Thiene, Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update, *Heart* 95 (2009) 766-773. 10.1136/hrt.2008.149823.
- [5] B. Gerull, A. Heuser, T. Wichter, M. Paul, C.T. Basson, D.A. McDermott, B.B. Lerman, S.M. Markowitz, P.T. Ellinor, C.A. MacRae, S. Peters, K.S. Grossmann, B. Michely, S. Sasse-Klaassen, W. Birchmeier, R. Dietz, G. Breithardt, E. Schulze-Bahr, L. Thierfelder, Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Nature Genetics* 36 (2004) 1162-1164. 10.1038/ng1461.
- [6] T.-P. Alastalo, G. West, S.-P. Li, A. Keinänen, M. Helenius, T. Tyni, R. Lapatto, M. Turanlahti, P. Heikkilä, H. Kääriäinen, M. Laakso, M. Mauermann, H. Herrmann, J. Pihkala, P. Taimen, LMNA Mutation c.917T>G (p.L306R) Leads to Deleterious Hyper-Assembly of Lamin A/C and Associates with Severe Right Ventricular Cardiomyopathy and Premature Aging, *Human Mutation* 36 (2015) 694-703. <https://doi.org/10.1002/humu.22793>.
- [7] M. Cerrone, X. Lin, M. Zhang, E. Agullo-Pascual, A. Pfenniger, H.C. Gusky, V. Novelli, C. Kim, T. Tirasawadichai, D.P. Judge, E. Rothenberg, H.-S.V. Chen, C. Napolitano, S.G. Priori, M. Delmar, Missense Mutations in Plakophilin-2 Cause Sodium Current Deficit and Associate With a Brugada Syndrome Phenotype, *Circulation* 129 (2014) 1092-1103. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003077.
- [8] E. Agullo-Pascual, M. Cerrone, M. Delmar, Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: Diseases of the connexome, *FEBS Letters* 588 (2014) 1322-1330. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.008>.
- [9] P.Y. Sato, H. Musa, W. Coombs, G. Guerrero-Serna, G.A. Patiño, S.M. Taffet, L.L. Isom, M. Delmar, Loss of Plakophilin-2 Expression Leads to Decreased Sodium Current and Slower Conduction Velocity in Cultured Cardiac Myocytes, *Circulation Research* 105 (2009) 523-526. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201418.
- [10] M. Cerrone, J. Montnach, X. Lin, Y.-T. Zhao, M. Zhang, E. Agullo-Pascual, A. Leo-Macias, F.J. Alvarado, I. Dolgalev, T.V. Karathanos, K. Malkani, C.J.M. Van Opbergen, J.J.A. van Bavel, H.-Q. Yang, C. Vasquez, D. Tester, S. Fowler, F. Liang, E. Rothenberg, A. Heguy, G.E. Morley, W.A. Coetzee, N.A. Trayanova, M.J. Ackerman, T.A.B. van Veen, H.H. Valdivia, M. Delmar, Plakophilin-2 is required for transcription of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm, *Nature Communications* 8 (2017) 106. 10.1038/s41467-017-00127-0.

- [11] J.-C. Kim, M. Pérez-Hernández, F.J. Alvarado, S.R. Maurya, J. Montnach, Y. Yin, M. Zhang, X. Lin, C. Vasquez, A. Heguy, F.-X. Liang, S.-H. Woo, G.E. Morley, E. Rothenberg, A. Lundby, H.H. Valdivia, M. Cerrone, M. Delmar, Disruption of Ca^{2+} Homeostasis and Connexin 43 Hemichannel Function in the Right Ventricle Precedes Overt Arrhythmogenic Cardiomyopathy in Plakophilin-2 Deficient Mice, *Circulation* 140 (2019) 1015-1030. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039710.
- [12] A. Kostareva, A. Kiselev, A. Gudkova, G. Frishman, A. Ruepp, D. Frishman, N. Smolina, S. Tarnovskaya, D. Nilsson, A. Zlotina, T. Khodyuchenko, T. Vershinina, T. Pervunina, A. Klyushina, A. Kozlenok, G. Sjoberg, I. Golovljova, T. Sejersen, E. Shlyakhto, Genetic Spectrum of Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy Uncovered by Next-Generation Sequencing, *PLoS One* 11 (2016) e0163362. 10.1371/journal.pone.0163362.
- [13] A. Khudiakov, K. Perepelina, P. Klauzen, A. Zlotina, K. Gusev, E. Kaznacheeva, A. Malashicheva, A. Kostareva, Generation of two iPSC lines (FAMRCi004-A and FAMRCi004-B) from patient with familial progressive cardiac conduction disorder carrying genetic variant DSP p.His1684Arg, *Stem Cell Res* 43 (2020) 101720. 10.1016/j.scr.2020.101720.
- [14] A. Khudiakov, D. Kostina, A. Zlotina, N. Yany, A. Sergushichev, T. Pervunina, A. Tomilin, A. Kostareva, A. Malashicheva, Generation of iPSC line from patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy carrying mutations in PKP2 gene, *Stem Cell Res* 24 (2017) 85-88. 10.1016/j.scr.2017.08.014.
- [15] X. Lian, C. Hsiao, G. Wilson, K. Zhu, L.B. Hazeltine, S.M. Azarin, K.K. Raval, J. Zhang, T.J. Kamp, S.P. Palecek, Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012) E1848-1857. 10.1073/pnas.1200250109.
- [16] S. Tohyama, F. Hattori, M. Sano, T. Hishiki, Y. Nagahata, T. Matsuura, H. Hashimoto, T. Suzuki, H. Yamashita, Y. Satoh, T. Egashira, T. Seki, N. Muraoka, H. Yamakawa, Y. Ohgino, T. Tanaka, M. Yoichi, S. Yuasa, M. Murata, M. Suematsu, K. Fukuda, Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Cell Stem Cell* 12 (2013) 127-137. 10.1016/j.stem.2012.09.013.
- [17] A.K. Zaytseva, A.V. Karpushev, A.M. Kiselev, E.N. Mikhaylov, D.S. Lebedev, B.S. Zhorov, A.A. Kostareva, Characterization of a novel SCN5A genetic variant A1294G associated with mixed clinical phenotype, *Biochem Biophys Res Commun* 516 (2019) 777-783. 10.1016/j.bbrc.2019.06.080.
- [18] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T.L. Madden, Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics* 13 (2012) 134. 10.1186/1471-2105-13-134.
- [19] D.M. Bers, *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*, 2001.
- [20] S. Castelletti, A.S. Vischer, P. Syrris, L. Crotti, C. Spazzolini, A. Ghidoni, G. Parati, S. Jenkins, M.C. Kotta, W.J. McKenna, P.J. Schwartz, A. Pantazis, Desmoplakin missense and non-missense mutations in arrhythmogenic right

ventricular cardiomyopathy: Genotype-phenotype correlation, *Int J Cardiol* 249 (2017) 268-273. 10.1016/j.ijcard.2017.05.018.

[21] J.M. López-Ayala, I. Gómez-Milanés, J.J. Sánchez Muñoz, F. Ruiz-Espejo, M. Ortiz, J. González-Carrillo, D. López-Cuenca, M.J. Oliva-Sandoval, L. Monserrat, M. Valdés, J.R. Gimeno, Desmoplakin truncations and arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy: characterizing a phenotype, *Europace* 16 (2014) 1838-1846. 10.1093/europace/euu128.

[22] M. Norman, M. Simpson, J. Mogensen, A. Shaw, S. Hughes, P. Syrris, S. Sen-Chowdhry, E. Rowland, A. Crosby, W.J. McKenna, Novel mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy, *Circulation* 112 (2005) 636-642. 10.1161/circulationaha.104.532234.

[23] E. Gandjbakhch, A. Redheuil, F. Pousset, P. Charron, R. Frank, Clinical Diagnosis, Imaging, and Genetics of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: JACC State-of-the-Art Review, *J Am Coll Cardiol* 72 (2018) 784-804. 10.1016/j.jacc.2018.05.065.

[24] K. Heliö, T. Kangas-Kontio, S. Weckström, S.U.M. Vanninen, K. Aalto-Setälä, T.P. Alastalo, S. Myllykangas, T.M. Heliö, J.W. Koskenvuo, DSP p.(Thr2104Glnfs*12) variant presents variably with early onset severe arrhythmias and left ventricular cardiomyopathy, *BMC Med Genet* 21 (2020) 19. 10.1186/s12881-020-0955-z.

[25] A. Kiselev, E. Mikhaylov, E. Parmon, G. Sjoberg, T. Sejersen, S. Tarnovskaya, P. Nugnyi, L. Mitrofanova, D. Lebedev, A. Kostareva, Progressive cardiac conduction disease associated with a DSP gene mutation, *Int J Cardiol* 216 (2016) 188-189. 10.1016/j.ijcard.2016.04.164.

[26] S. Li, C. Zhang, N. Liu, H. Bai, C. Hou, J. Wang, L. Song, J. Pu, Genotype-Positive Status Is Associated With Poor Prognoses in Patients With Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy, *J Am Heart Assoc* 7 (2018) e009910. 10.1161/jaha.118.009910.

[27] J. Gomes, M. Finlay, A.K. Ahmed, E.J. Ciaccio, A. Asimaki, J.E. Saffitz, G. Quarta, M. Nobles, P. Syrris, S. Chaubey, W.J. McKenna, A. Tinker, P.D. Lambiase, Electrophysiological abnormalities precede overt structural changes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to mutations in desmoplakin-A combined murine and human study, *Eur Heart J* 33 (2012) 1942-1953. 10.1093/eurheartj/ehr472.

[28] I. El-Battrawy, Z. Zhao, H. Lan, L. Cyganek, C. Tombers, X. Li, F. Buljubasic, S. Lang, M. Tiburcy, W.H. Zimmermann, J. Utikal, T. Wieland, M. Borggrefe, X.B. Zhou, I. Akin, Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Europace* 20 (2018) f46-f56. 10.1093/europace/euy042.

[29] M. Cerrone, X. Lin, M. Zhang, E. Agullo-Pascual, A. Pfenniger, H. Chkourko Gusky, V. Novelli, C. Kim, T. Tirasawadichai, D.P. Judge, E. Rothenberg, H.S. Chen, C. Napolitano, S.G. Priori, M. Delmar, Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype, *Circulation* 129 (2014) 1092-1103. 10.1161/circulationaha.113.003077.

- [30] P.Y. Sato, H. Musa, W. Coombs, G. Guerrero-Serna, G.A. Patiño, S.M. Taffet, L.L. Isom, M. Delmar, Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes, *Circ Res* 105 (2009) 523-526. 10.1161/circresaha.109.201418.
- [31] Q. Zhang, C. Deng, F. Rao, R.M. Modi, J. Zhu, X. Liu, L. Mai, H. Tan, X. Yu, Q. Lin, D. Xiao, S. Kuang, S. Wu, Silencing of desmoplakin decreases connexin43/Nav1.5 expression and sodium current in HL-1 cardiomyocytes, *Mol Med Rep* 8 (2013) 780-786. 10.3892/mmr.2013.1594.
- [32] F.I. Marcus, W.J. McKenna, D. Sherrill, C. Basso, B. Bauce, D.A. Bluemke, H. Calkins, D. Corrado, M.G.P.J. Cox, J.P. Daubert, G. Fontaine, K. Gear, R. Hauer, A. Nava, M.H. Picard, N. Protonotarios, J.E. Saffitz, D.M.Y. Sanborn, J.S. Steinberg, H. Tandri, G. Thiene, J.A. Towbin, A. Tsatsopoulou, T. Wichter, W. Zareba, Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: Proposed Modification of the Task Force Criteria, *European Heart Journal* 31 (2010) 806-814. 10.1093/eurheartj/ehq025.
- [33] C. Kim, J. Wong, J. Wen, S. Wang, C. Wang, S. Spiering, N.G. Kan, S. Forcales, P.L. Puri, T.C. Leone, J.E. Marine, H. Calkins, D.P. Kelly, D.P. Judge, H.-S.V. Chen, Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs, *Nature* 494 (2013) 105-110. 10.1038/nature11799.
- [34] I. El-Battrawy, Z. Zhao, H. Lan, L. Cyganek, C. Tombers, X. Li, F. Buljubasic, S. Lang, M. Tiburcy, W.-H. Zimmermann, J. Utikal, T. Wieland, M. Borggrefe, X.-B. Zhou, I. Akin, Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *EP Europace* 20 (2018) f46-f56. 10.1093/europace/euy042.
- [35] S. Casini, A.O. Verkerk, C.A. Remme, Human iPSC-Derived Cardiomyocytes for Investigation of Disease Mechanisms and Therapeutic Strategies in Inherited Arrhythmia Syndromes: Strengths and Limitations, *Cardiovascular Drugs and Therapy* 31 (2017) 325-344. 10.1007/s10557-017-6735-0.