Молекулярно-генетические механизмы развития идиопатической рестриктивной кардиомиопатии Костарева Анна Александровна

ОГЛАВЛЕНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

доктор наук Костарева Анна Александровна

Введение

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Идиопатическая рестриктивная кардиомиопатия и спектр ее генетических причин

1.2. Кардиомиопатии и нейромышечные заболевания

1.3. Особенности течения сердечной недостаточности и прогноз

для пациентов с РКМП

1.4. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных

с мутациями в гене десмина (DES)

1.5. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных

с мутациями в гене ламина А/С (LMNA)

1.6. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных

с мутациями в гене сердечного тропонина I (TNNI3)

1.7. Роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции

1.8. Перспективы дальнейших научных исследований

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Формирование группы пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией (РКМП)

2.2. Формирование группы пациентов с ХСН с целью изучения ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции функционирования саркомера, с развитием рестриктивного фенотипа

2.3. Секвенирование нового поколения

2.4. Создание генетических конструкций, несущих мутации гена десмина, для последующей генетической модификации мышечных клеток

2.5. Клонирование гена десмина с использованием конструкции

на основе лентивирусного вектора

2.6. Мутагенез на основе плазмиды с геном десмина

2.7. Продукция лентивирусных конструкций, содержащих ген десмина

2.8. Получение индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК)

и их дифференцировка в кардиогенном направлении

2.9. Получение первичной культуры мышечных клеток мыши

2.10. Культивирование клеток линии С2С12 и миогенная дифференцировка сателлитных клеток и клеток линии С2С12

2.11. Трансдукция первичных миофибрилл мыши и клеток линии

С2С12 лентивирусными конструкциями

2.12. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток

2.13. ПЦР в реальном времени для определения экспрессии

миогенных маркеров

2.14. Оценка внутримитохондриального уровня кальция

2.14.1. Применение флюоресцентных красителей и стимуляция митохондриального захвата кальция

2.14.2. Конфокальная лазерная микроскопия

2.15. Исследование функции клеточного дыхания в культуре клеток

с использованием прибора «Sea horse»

2.16. Исследование функции потенциалзависимого натриевого канала (Nav1.5) с помощью методики локальнй фиксации мембранного потенциала

2.17. Создание генетических конструкций, несущих мутации гена LMNA, для последующей модификации мезенхимных стволовых клеток

2.18. Культивирование ММСК и их дифференцировка

2.19. Подсчет эффективности дифференцировки

2.20. Определение колониеобразующей способности ММСК

методом предельных разведений

2.21. Анализ экспрессии остеогенных и адипогенных маркеров

2.22. Множественный анализ экспрессии генов

2.23. Вестерн-блоттинг с применением антител к ламину А/С

и оценка общей активности гистоновых деацетилаз

2.24. Конструирование вектора и мутагенез мутантных форм

гена TNNI3

2.25. Выделение белка для исследований in vitro

2.26. Коседиментация

2.27. Поверхностный плазмонный резонанс

2.28. Оценка активности актин-миозиновой-S! АТФ-азы в восстановленном комплексе и силы сокращения изолированных миофибрилл

2.29. Определение аллелей и генотипов методом полимеразной

цепной реакции в реальном времени

2.30. Статистическая обработка данных

2.30.1. Статистическая обработка данных ПЦР в реальном

времени

2.30.2. Статистическая обработка данных генотипирования и сравнение частот единичных нуклеотидных полиморфизмов

2.30.3. Статистическая обработка данных расчета риска исхода

ХСН с применением расчетных шкал

Глава 3. Клиническая характеристика пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией

3.1. Описание исследуемой когорты пациентов

3.2. Анализ кривых выживаемости пациентов с РКМП

3.3. Анализ возможности использования шкал прогноза ХСН

в когорте пациентов с идиопатической РКМП

Глава 4. Генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии

4.1. Качество проведенного секвенирования, глубина покрытия

и классификация новых и ранее описанных генетических вариантов

4.2. Анализ генетических вариантов в соответствии

с классификацией ACMG

4.3. Моделирование основных белковых взаимодействий

и сигнальных связей, ассоциированных с РКМП

4.4. Анализ влияния патогенных и вероятно-патогенных вариантов

в группе пациентов с РКМП на клиническое течение заболевания... 142 Глава 5. Исследование генетической этиологии РКМП в сочетании с признаками поражения нейромышечной системы

5.1. РКМП, ассоциированная с мутацией в гене DES

5.2. РКМП, ассоциированная с мутацией в гене BAG3

5.3. РКМП, ассоциированные с мутациями в гене FLNC

Глава 6. Разработка оптимальной схемы генетической диагностики

у пациентов с идиопатической РКМП

Глава 7. Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена десмина DES

7.1. Оценка влияния мутантных форм гена десмина на изменение концентрации митохондриального Са2+ в первичной культуре мышечных клеток

7.2. Эффект мутаций гена десмина на внутримитохондриальный

захват кальция под воздействием электрического тока

7.3. Влияние мутаций гена десмина на внутримитохондриальный

захват кальция вследствие активации рианодинового рецептора

7.4. Эффект мутаций гена десмина на уровень цитоплазматического кальция

7.5. Оценка методом «Sea horse» функции клеточного дыхания в культуре миотрубок после трансдукции нормальными

и мутантными формами гена десмина

7.6. Оценка функции потенциалзависимых натриевых каналов (Nav1.5)

в кардиомиоцитах, несущих c.735+1G>A мутацию в гене DES

Глава 8. Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена LMNA

8.1. Характеристика мезенхимных стволовых клеток и уровень экспрессии LMNA после лентивирусной трансдукции

8.2. Влияние мутации гена ламина на колониеобразующую способность ММСК

8.3. Влияние мутаций гена ламина на адипогенную и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток

8.4. Влияние мутаций гена ламина на экспрессию маркеров адипогенной дифференцировки ММСК

8.5. Влияние мутаций гена ламина на экспрессию маркеров остеогенной дифференцировки ММСК

8.6. Влияние мутации LMNA на экспрессионный профиль при дифференцировке ММСК

8.7. Оценка влияния мутаций гена LMNA на дифференцировку сателлитных мышечных клеток в миогенном направлении

и формирование миотрубок

8.8. Влияние мутаций LMNA на экспрессию маркеров миогенной дифференцировки

8.9. Эффект мутаций LMNA на активность гистондеацетилазы

Глава 9. Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена тропонина I (TNNI3)

9.1. Клиническая картина РКМП на фоне мутаций в гене TNNI3

9.2. Исследование взаимодействия мутантных форм тропонина I с белками тонких филаментов методом коседиментации и плазмонного резонанса

9.3. Оценка активности актин-миозиновой-S! АТФ-азы

9.4. Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции функционирования саркомера,

с развитием рестриктивного фенотипа у пациентов с ХСН

Глава 10. Обсуждение

10.1. Особенности клинического течения и информативность шкал расчета риска ХСН при идиопатической РКМП в различных возрастных группах

10.2. Генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии

10.3. Исследование генетической этиологии РКМП, протекающей

в сочетании с поражением нейромышечной системы

10.4. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных

с патологическими вариантами в гене DES

10.5. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных

с патологическими вариантами в гене LMNA

10.6. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных

с патологическими вариантами в гене TNNI3

10.7. Роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции

Выводы

Практические рекомендации

Список условных сокращений

Список литературы