

**ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНТИКИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**



ПІВЕНЬ Оксана Олександрівна

УДК 575+576.52+577+616.1

**Порушення експресії генів адгеринового комплексу у міокарді як
молекулярний механізм розвитку деяких патологій серця**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

Київ – 2019

–
Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий консультант: доктор біологічних наук,
професор, завідувач відділу генетики людини
заступник директора
Лукаш Любов Леонідівна.

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
завідувач відділу молекулярної генетики бактеріофагів,
заступник директора
Товкач Федір Іванович
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України;

член-кореспондент НАН України,
доктор медичних наук, професор, завідувач
відділу фізіології кровообігу
Сагач Вадим Федорович
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України;

доктор біологічних наук,
головний науковий співробітник
Ольхович Наталія Вікторівна
ДУ “Інституту генетичної та регенеративної медицини”
НАМН України.

Захист відбудеться «24» вересня 2019 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, 03143, м. Київ.

Автореферат розіслано “20” серпня 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,

к.б.н., с.н.с.



І. В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Згідно зі статистикою ВООЗ Україна посідає перше місце серед країн Європи і друге у світі в рейтингу смертності від серцево-судинних захворювань (*WHO Mortality Database*). Так, у нашій країні серцево-судинні захворювання (ССЗ) є причиною 67% усіх смертей (*Головне управління статистики в Харківській області*). Фактично кожен другий українець стикається із ССЗ. За даними Держслужби статистики лише у 2016 році від ССЗ померло 392 тисячі українців (*Головне управління статистики в Харківській області*). Тож протягом останніх десятиріч в Україні фактично склалася епідеміологічна ситуація щодо частоти виникнення ССЗ, а кількість смертельних випадків, які трапилися саме через ці хвороби, збільшилася. І хоча в інших країнах світу ССЗ менш поширені, все одно вони є першочерговою причиною смертності серед населення. Відповідно до статистики у світі щороку помирає близько 17 мільйонів осіб. Це більше ніж від респіраторних, інфекційних захворювань, діабету та онкології разом узятих (<https://www.world-heart-federation.org/world-heart-day/resources>).

Однак, при обговоренні проблеми важливо усвідомлювати, що мова йде не просто про цифри статистики. ССЗ – інвалідизація і смертність значної кількості населення і, оскільки більшою мірою це стосується працездатного населення, то проблема переходить із площини медичної і соціальної у площину економічну. Кожного року країни ЄС витрачають близько 196 мільярдів € на заходи, пов'язані з лікуванням, профілактикою та соціальними виплатами (*Wilkins E et al., 2017*). Вплив ССЗ на економіку України не менш вагомий. Оскільки наша країна належить до країн із низьким та середнім рівнями доходів, то негативний вплив ССЗ на економіку збільшується. За оцінками економістів неінфекційні захворювання, в тому числі і ССЗ, спричиняють зниження ВВП на 7%, що пояснюється, окрім витрат на медичні заходи, численими випадками смертності та інвалідизації працездатної частини населення (*Thakur Jet al., 2017*).

Звісно, вирішення цієї проблеми має бути системним і на державному рівні включати заходи щодо покращення діагностики, лікування, а також пропагування серед населення попередження виникнення і профілактики ССЗ.

Водночас є нагальною і проблема оновлення наших фундаментальних знань про причини виникнення ССЗ, молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні особливості розвитку міокарду, його функціонування та адаптації до дії несприятливих чинників. Саме розуміння таких механізмів дозволить у майбутньому покращити методи діагностики і терапії ССЗ. З огляду на це, надзвичайно цікавими і важливими є праці про з'ясування і доповнення функції окремих генів у контролюванні процесу кардіогенезу, постнатального розвитку та формування міокарду, а також його адаптацій до гормонального, гемодинамічного навантаження тощо. Незважаючи на те що нині вже ідентифіковано низку генів, мутації яких є причиною розвитку тих чи інших хвороб міокарду, а саме кардіоміопатії (аритмогенної, дилатаційної та гіпертрофічної), пошук та ідентифікація нових генів, порушення роботи яких може бути причиною патології міокарду, є нагальними.

Варто зауважити, що для розвитку, формування і функціонування серця, як і інших органів, надзвичайно важливою умовою є коректне утворення та підтримання міжклітинної адгезії. Тож не дивно, що серед генів, у яких уже ідентифіковано пов'язані із хворобами серця мутації, переважно ті, що кодуєть білки, присутні компоненти інтеркалярних дисків (ІД): демосом, порових з'єднань та адгеринового комплексу. Одним з основних компонентів ІД є адгериновий комплекс (АК), який власне і забезпечує щільну міжклітинну адгезію (*Noorman M et al., 2009*). Останній складається із трансмембранного білка N-кадгерину та його цитоплазматичних партнерів: β -катеніну та α -катеніну (*Vite A, Radice G., 2014*).

Порушення організації ІД досить часто спостерігається при патологіях міокарду і розглядаються переважно як наслідок виникнення та прогресування хвороби (*van den Borne SWM et al., 2008*). Однак, роботи із застосуванням генетичного нокауту в модельних тварин показали, що порушення структури ІД, а саме АК можуть бути першопричиною розвитку патології серця. Так, при нокауті гена *Cdh2* спостерігали розвиток спонтанної аритмогенної кардіоміопатії в серцях дорослих мишей, а також летальність таких мишей (*Kostetskii I et al., 2005*). Важливо також те, що нокаут гена *Cdh2* спричиняв порушення експресії та розподілу й інших білків компонентів ІД – коннексину 43 та β -катеніну. Такі результати вказують на існування більш складного зв'язку між генами білків міжклітинної адгезії та їхньої функції в міокарді.

Ускладнює ситуацію і той факт, що протягом останніх років для інших компонентів АК показана не лише адгезивна функція, а й участь у модуляції сигнальних каскадів клітин.

Так, білок β -катенін, що кодується геном *Ctnnb1*, є основним транскрипційним ко-фактором такого важливого регулятора клітинного циклу, росту та поділу клітин як канонічний Wnt-сигналінг (*Smith FD, Scott JD, 2013*). І, незважаючи на те що канонічному Wnt-сигналінгу присвячена величезна кількість праць, функція його, а відтак і β -катеніну, в серці не до кінця з'ясована (*Piven OO, Winata CL, 2017*). Достеменно невідома участь цього сигнального каскаду та його основного ко-фактора β -катеніну в регулюванні пізнього кардіогенезу, формуванні та розвитку постнатального міокарду та ремоделюванні серця в дорослому організмі. Дослідженню цих проблем присвячено багато робіт, однак одностайної думки стосовно ролі β -катеніну в регулюванні зазначених процесів донині не існує (*Piven OO, Winata CL, 2017*).

Цитоплазматичний партнер β -катеніну – α -Е-катенін, також не лише білок міжклітинної адгезії. Нещодавно було встановлено, що останній бере участь у регулюванні активності таких каскадів, як канонічний Wnt-, HIPPO-, MAPK-сигналінги (*Vite A, Li J, Radice GL, 2015*). Це надзвичайно важлива знахідка для розуміння біології серця, оскільки ці каскади регулюють ріст, проліферацію та розміри кардіоміоцитів, розмір серця та його метаболізм (*Zhang Y, Del Re DP, 2017; Cohen ED, Tian Y, Morrissey EE, 2008; Rose BA, Force T, Wang Y., 2010*). Однак, функція гена *Cttnb1* і його продукту α -Е-катеніну в серці дотепер розглядалася виключно в контексті міжклітинної адгезії: підтриманні та забезпеченні жорсткості та мобільності цитоскелету. Тоді як накопичені останніми десятиріччями дані примушують нас переглянути функцію цього гена і відповідно його продукту α -Е-

катеніну не лише в контексті утворення та підтримання міжклітинної адгезії, а і в регулюванні сигнальних каскадів клітин, залучених до контролю росту, диференціювання, розмірів клітин та інше.

Також варто зауважити, що наразі не ідентифіковано мутацій для генів цих білків, а саме *Ctnnb1* та *Cttna1*, що були б асоційовані з розвитком серцевих патологій у людини. Цікаво, що для гомологів β -катеніну та α -Е-катеніну – γ -катеніну та α -Т-катенін відповідно зв'язок мутацій їхніх генів із патологіями міокарду наразі встановлено. Так, мутація гену *Jup*, що кодує основний компонент десмосом та АК – γ -катенін, спричиняє розвиток аритмогенної кардіоміопатії шлуночків (*Protonotarios N, Tsatsopoulou A., 2004*). Розвиток дилатаційної кардіоміопатії, аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка, дефекти перегородки є наслідками мутацій гена *Cttna3*, продуктом якого є компонент АК – α -Т-катенін (*Chen VC, et al., 2008; Deng H. et al., 2008; Clevers H 2006; Kontaridis MI, Geladari E V., Geladari C V, 2015*). Уже під час виконання цього дисертаційного дослідження було ідентифіковано мутацію гена *Cdh2*, що кодує основний трансмембранний кадгерин серця, в пацієнтів із спадковою аритмогенною кардіоміопатією правого шлуночка (*Moyosi BM, et al., 2017*). Усе зазначене вище, вказує на те, що гени АК є критично важливими для розвитку та формування серця ссавців, а їхні продукти, білки N-кадгерин, β -катенін та α -Е-катенін, мають складнішу та ширшу функцію, ніж вважалося дотепер. З огляду на це, ми припускаємо, що порушення або повне пригнічення експресії генів АК: *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1* може призводити до патології розвитку та функціонування міокарду.

Тож, це дисертаційне дослідження присвячене детальному з'ясуванню функції генів *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1* та їхніх продуктів, білків: N-кадгерину, β -катеніну та α -Е-катеніну в кардіогенезі та постнатальному серці. Для виконання роботи о застосовано модель генетичного нокауту відповідних генів (*Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1*) виключно в кардіоміоцитах ембріонів мишей, що дало змогу аналізувати функцію окремого гена на рівні органу та організму за умови його гомозиготної або гетерозиготної делеції.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках науково-дослідних проектів відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, отриманих на конкурсних засадах: «Умовне видалення N-кадгерину як модель для досліджень серцевої аритмії» (грант CRDF № UK-B2-2577-KV-04); «Розробка фундаментальних основ клітинної терапії патологій серця» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (номер державної реєстрації 7/2015, 2010-2014) та «Дослідження регуляторної функції β - та α -катеніну у вікових та патологічних перебудовах/реконструкціях дорослого міокарду для потреб персоналізованої медицини та розробки сучасних методів профілактики, діагностики захворювань та лікування хвороб серця людини» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (номер державної реєстрації 40/2015, 2015-2019), проектів у рамках угоди про наукове

співробітництво між Національною академією наук України та Польською академією наук на 2015 – 2017 рр: «Значення β -катенінового сигналіну у метаболізмі серця та патологічній гіпертрофії лівого шлуночка» на 2018 – 2020 рр: «Сигнальна функція β -катеніну та α -Е-катеніну в регуляції метаболізму серця та патогенезі гіпертрофії лівого шлуночка», а також у рамках короткострокових стажувань в Інституті молекулярної та клітинної біології (Варшава, Польща) та Інституті дослідження легень і серця асоціації Макса Планка (Бад-Наухейм, Німеччина) за програмою EMBO Post-Doctoral Short –Term Fellowships (ASTF 518-2015 та ASTF 223.00-2011).

Мета і завдання дослідження. Дослідити порушення експресії генів адгеринового комплексу: *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1* та їхніх продуктів (білків N-кадгерину, β -катеніну та α -Е-катеніну) в розвитку та формуванні міокарду мишей.

Для досягнення мети поставлені наступні завдання:

1. Проаналізувати особливості ембріонального розвитку серця за умови делеції генів адгеринового комплексу *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1* в ембріональних кардіоміоцитах.

2. Дослідити вплив нокауту генів міжклітинної адгезії на формування та розвиток серця новонароджених мишей віком 1 – 3 доби (P1-3).

3. Проаналізувати участь білків β -катеніну та α -Е-катеніну в регулюванні сигнальних каскадів у постнатальному міокарді за умови делеції відповідних генів: *Ctnnb1* та *Cttna1*.

4. Встановити роль канонічного Wnt сигналіну та β -катеніну в адаптації серця до гіпертрофічних стимулів.

5. Встановити вплив гетерозиготної делеції гена *Ctnnb1* в ембріональних кардіоміоцитах на молекулярно-генетичні механізми формування атлетичного міокарду.

6. Дослідити функціонування міокарду та виживаність мишей за умови нокауту гена *Cttna1* в ембріональних кардіоміоцитах.

7. Вивчити активність сигнальних каскадів залучених до розвитку патологій міокарду в серцях дорослих мишей із нокаутом гена *Cttna1*.

8. Проаналізувати вплив нокауту гена *Cttna1* в ембріональних кардіоміоцитах на метаболізм нейтральних ліпідів у серцях дорослих тварин.

Об'єкт дослідження: кардіогенез, постнатальний міокард, фетальні гени, канонічний Wnt сигналінг, γ ар залежна транскрипція, метаболізм серця, АМРК, PPAR α , P3K/Akt, PKA та MEK1/Erk1/2 сигнальні каскади, гіпертрофія, серцева недостатність.

Предмет дослідження: особливості кардіогенезу та функціонування дорослого серця за умови ембріональної кардіоспецифічної гетерозиготної та гомозиготної делеції генів адгеринового комплексу: *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1*.

Методи дослідження: умовний генетичний нокаут під контролем специфічного серцевого промотора (α -МНС) для делеції досліджуваних генів, молекулярно-генетичні (виділення ДНК та РНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), зворотньотранскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР) в реальному часі, хроматинімунопреципітація з послідувальною ЗТ-ПЛР (ChIP-ЗТ-ПЛР), молекулярно-біологічні (Вестерн-блот), імуногістохімічні, гістологічні (гематоксилін-еозинове (ГЕ) забарвлення, трихром-Масонове забарвлення, забарвлення пікрофуксином за ван Гізеном та забарвлення жиривим червоним О, Х-гал забарвлення), методи клітинної біології (виділення первинних неонатальних кардіоміоцитів, МТТ-тест), фізіологічні методи (аналіз гемодинамічних показників міокарду, оперування тварин, індукція гіпертрофії, фізичне навантаження), методи математичної статистики (тест Д'Агостіно-Пірсона, однофакторний дисперсійний аналіз із *post hoc* тестом Тукея та Холма-Сідака, тест Краскела-Уолліса із *post hoc* тестом Дана, лог-ранговий тест, метод Каплан-Мейер).

Наукова новизна одержаних результатів. Запропоновано гіпотезу, згідно з якою гени адгеринового комплексу (*Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1*) мають критичне значення для нормального розвитку та функціонування серця. Пригнічення (або порушення) експресії генів *Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1* спричиняють летальність та молекулярно-генетичні патерни змін міокарду піддослідних мишей за рахунок порушення адгезивної та регуляторної функції їхніх продуктів (N-кадгерину, α -Е-катеніну та β -катеніну відповідно). Імовірно, мутації генів *Cttna1* та *Cttnb1* у людей також можуть бути асоційованими з порушеннями розвитку та функціонування серця.

З використанням умовного нокауту нами вперше показано, що N-кадгерин має критичне значення для формування серця в ембріогенезі, гомозиготний нокаут його гена (*Cdh2*) у кардіоміоцитах ембріонів спричиняє не лише порушення формування тканини міокарду, а й затримку розвитку ембріону і призводить до ембріональної летальності.

Доповнено і переглянуто роль канонічного Wnt-сигналіngu в кардіогенезі та розвитку міокарду. Застосування нокауту гена *Cttnb1* в ембріональних кардіоміоцитах показало, що активність канонічного Wnt-каскаду є необхідною умовою для пізнього кардіогенезу (після E12,5) та формування постнатального міокарду (P1 – 3). Пригнічення сигнального каскаду, за умови гомозиготної делеції гена *Cttnb1*, спричиняє летальність пізніх ембріонів; гетерозиготний нокаут гена, що кодує білок β -катеніну, призводить до порушення термінального диференціювання кардіоміоцитів, їхньої проліферативної активності та перемикання серця новонароджених тварин на дорослу генетичну програму (підвищення експресії фетальних генів *BNP*, β -МНС). Це зрештою спричиняє молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні патерни змін у серцях дорослих тварин (пригнічення активності канонічного Wnt-, MEK1-Erk1/2-, PI3K/Akt-, сигнальних каскадів).

Уточнено роль канонічного Wnt сигнального каскаду в гіпертрофічному ре моделюванні. Зокрема показано, що β -катенін залучено до формування гіпертрофії серця, хоч транскрипційна активність β -катеніну є необхідною на ранніх етапах

ремоделювання. Окрім того, нами було ідентифіковано відтворювані та адекватні гіпертрофічні маркери: SERCA, актин DIF, Axin-2, c-мус, CD1, BNP, ANP та індекс співвідношення білок/ДНК.

Уперше ідентифіковано сигнальну функцію γ -катеніну, його здатність регулювати транскрипційну активність канонічного Wnt сигналінгу і утворювати комплекс γ -катенін/TCF/LEF/ДНК, регулюючи рівень експресії генів *Axin2* та *c-Myc* у серці. Наші результати вказують на існування "неканонічної" регуляції канонічного Wnt сигнального каскаду, а також свідчать про те, що γ -катенін не здатний компенсувати сигнальну функцію β -катеніну. Нами встановлено, що сигнальної функції γ -катеніну не достатньо для забезпечення формування міокарду за умови генетичного гомозиготного нокауту його гомолога – β -катеніну.

На основі застосування моделі генетичного нокауту вперше показано, що продукт гена *Cttnn1*, α -Е-катенін пригнічує транскрипційну активність канонічного Wnt-сигналінгу в серцях новонароджених та дорослих тварин. Окрім того, підтверджено участь α -Е-катеніну в регуляції HIPPO сигнального каскаду. Показано, що α -Е-катенін є супресором транскрипційної активності основних медіаторів канонічного Wnt- та HIPPO-каскадів. Порушення супресорної функції α -Е-катеніну призводить до порушення термінального диференціювання кардіоміоцитів та їхньої проліферативної активності і збільшення маси серця в дорослих та новонароджених мишей. Уперше описано фенотип, типовий для серцевої недостатності, що призводив до передчасної летальності тварин і розвивався внаслідок нокауту гена *Cttnn1*.

Уперше охарактеризовано масивні молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні патерни змін у серцях із порушенням експресії гена *Cttnn1*: порушення активності PI3K/Akt-, MEK1-Erk1/2- та PKA – сигналінгів та накопичення ліпідів у кардіоміоцитах через специфічні порушення метаболізму (зниження вмісту PPAR α , інгібування AMPK та HSL та активації ACC).

Теоретичне значення одержаних результатів. У результаті проведених досліджень було отримано низку фундаментальних даних, які значно доповнюють та розширюють існуючі знання про роль генів адгеринового комплексу в кардіогенезі, формуванні та функціонуванні міокарду миші. А саме продемонстровано те, що продукт гена *Cdh2*, білок N-кадгерин, має критичне значення в кардіогенезі на відміну від його цитоплазматичних партнерів β -катеніну та α -Е-катеніну. З'ясовано важливу функцію канонічного Wnt сигналінгу в постнатальному розвитку міокарду, показано здатність γ -катеніну регулювати активність канонічного Wnt сигналінгу в серці. Виявлено участь β -катеніну та α -Е-катеніну (продуктів генів *Cttnb1* та *Cttnn1* відповідно) у контролюванні проліферативної активності та термінальної диференціації неонатальних кардіоміоцитів через модулювання активності канонічного Wnt – та HIPPO-сигнальних каскадів. Доповнено існуючі знання про роль канонічного Wnt сигналінгу в розвитку гіпертрофії міокарду. Показано універсальність механізмів формування гіпертрофії та ідентифіковано універсальні і відтворювані маркери патології. Доведено участь α -Е-катеніну, продукту гена *Cttnn1*, у регулюванні активності сигнальних систем клітини, а саме показано, що α -Е-катенін супресує

транскрипційну активність β -катеніну та *Yap*. Порушення сигнальної функції α -Е-катеніну призводить до розвитку серцевої недостатності та летальності тварин. Виявлено масивні молекулярні патерни змін у серцях тварин із нокаутом гена *Ctnnb1* та *Cttna1*.

Запропоновано і обґрунтовано гіпотезу, згідно з якою пригнічення експресії генів *Cdh2*, *Cttna1* та *Ctnnb1*, спричиняють летальність та молекулярно-генетичні патерни змін міокарду піддослідних мишей за рахунок порушення адгезивної та регуляторної функції їхніх продуктів (N-кадгерину, α -Е-катеніну та β -катеніну відповідно). Тож порушення експресії генів *Cdh2*, *Cttna1* та *Ctnnb1*, внаслідок мутації, можуть бути одним із молекулярно-генетичних механізмів розвитку патології серця. Імовірно, мутації генів *Cttna1* та *Ctnnb1* у людей також можуть бути асоційованими з порушеннями розвитку та функціонування серця.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані свідчать про критичну функцію генів адгеринового комплексу у формуванні та розвитку серця, а також його ремоделюванні. Дисертаційне дослідження містить ряд даних, корисних клініцистам для розуміння молекулярних механізмів розвитку та функціонування серця. Пояснюється зв'язок між певними генами (*Cdh2*, *Cttna1* та *Ctnnb1*) та порушеннями розвитку серця у ссавців на прикладі модельних тварин. Результати дослідження вказують на те, що мутації генів (*Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1*) можуть впливати на порушення формування серця та бути причиною серцевих патологій і в людей. Останнє є цікавим та перспективним напрямком практичних досліджень, а саме пошуку та аналізу мутацій у структурі генів *Ctnnb1* та *Cttna1* у пацієнтів із спадковими серцевими патологіями. Це дозволить покращити діагностику та персоналізацію терапії. Незважаючи на фундаментальність, дослідницька робота може бути підґрунтям для покращення діагностики та прогнозу серцево-судинних патологій, а також для персоналізованої терапії ССЗ.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є закінченим самостійним дослідженням, реалізацією ідей автора. Результати, викладені в дисертації, отримано автором особисто або за його безпосередньої участі.

Насамперед було сформовано ідею дослідження, дизайн експериментів, узагальнено отримані дані та сформовано концепцію роботи. Дисертантом виконано основну частину експериментальних досліджень за допомогою таких методів досліджень: виділення РНК, синтезу кДНК, кількісного ПЛР в реальному часі; виготовлення парафінових зрізів тканини міокарду та кріозрізів; виділення білка та Вестерн-блот, гематоксилін-еозинове забарвлення, Масон-трихромне забарвлення, X-гал забарвлення, ChIP-ЗТ-ПЛР; оперування тварин).

Частину експериментів (МТТ-тест, забарвлення пікрофуксином за ван Гізеном та забарвлення жиривим червоним О, плавальний тест та мета аналіз) проведено спільно зі співробітниками відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, які є співавторами опублікованих робіт. Дослідження кардіогемодинамічних показників проводилося спільно з колегами відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, які є співавторами публікації. У роботах, опублікованих у співавторстві, використано фактичний матеріал автора, а

узагальнення та висновки проведені сумісно. При написанні дисертації ідеї та розробки співавторів публікацій не були використані.

Автор висловлює подяку за критичне обговорення отриманих результатів науковому консультанту – д.б.н., професору Лукаш Л.Л., а також, д.м.н., професору Досенку В.Є., д.м.н., професору Томасу Брауну, д.б.н., професору Павлу Добжину та д.б.н Сесилії Вінаті. Автор безмежно вдячний за допомогу у виконанні експериментальної роботи співробітникам відділу генетики людини к.б.н. Балацькому В.В., к.б.н. Л.Л. Мацевич, к.б.н. Пальчевській О.Л., Т.П. Рубан та іншим. Також автор висловлює щирю подяку співробітникам лабораторії молекулярної медичної біохімії Інституту Експериментальної біології ім. Ненського ПАН та особисто керівнику лабораторії проф. Павлу Добжину за допомогу в проведенні експериментів з дослідження рівнів експресії білків; керівнику лабораторії розвитку та геноміки Danio Rerio Інституту молекулярної та клітинної біології Польща д.б.н. Сесилії Вінаті за допомогу у проведенні експериментів з хроматин-імунопреципітації; співробітникам відділу розвитку та ремоделювання серця Інституту дослідження легень та серця асоціації Макса Планка та особисто професору Томасу Брауну за допомогу у проведенні досліджень із індукованої гіпертрофії серця. Окрім того, автор висловлює вдячність співробітникам відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та особисто завідувачу відділу професору Досенку В.Є. за допомогу у виконанні досліджень гемодинамічних параметрів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на українських та міжнародних конференціях: EMBL Conference “Stem Cells, Tissue Homeostasis and Cancer” (Heidelberg, Germany, 2010), VII Parnas Conference (Warsaw, Poland, 2011), Actin-Based Motility: From Molecules to Model Organisms, (Stressa, Italy 2011), Матеріали VIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ БІОЛОГІЇ”. (Львів, 2012), Матеріали X міжнародної конференції студентів та молодих науковців “Шевченківська весна 2012: Біологічні науки” (Київ, 2012), VI International Conference of Young Scientists: Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution (Odesa, 2013), 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics “BIO 2014” (Warsaw, 2014), EMBO/EMBL Symposium Cardiac Biology: From Development to Regenerative Medicine (Heidelberg, 2013), 1st Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv, 2015), X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, 2016), Міжнародна науково-практична конференція “Актуальні питання розвитку біології та екології” (Вінниця, 2016), XI Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, 2017), Joint Meeting of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 26 наукових праць: 25 статей у профільних виданнях, затверджених ДАК України (з них 10, що входять до

міжнародних наукометричних баз), 15 тез доповідей у збірниках українських і міжнародних конференцій, конгресів та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 300 сторінках комп'ютерного набору. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріали та методи дослідження, 3-х розділів власних досліджень, розділу аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел, який налічує 262 посилання (3 кирилицею і 296 латиною), Додатків А, Б, В, Г та Д. Роботу ілюстровано 78 рисунками, 7 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Опис тваринної моделі. Усі дослідження на тваринах проводили згідно з європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також схвалені комісією з біоетики ІМБГ НАН України. Для проведення дослідження в ролі модельних об'єктів використовували колекцію лінійних (CB57BL), трансгенних та умовнонокаутних тварин (Rosa26R; αMHC-Cre; VATGAL; N-cad^{flox/flox}; α-E-catenin^{flox/flox}; β-catenin^{flox/flox}). Для отримання тварин із делецією гену-інтересу в ембріональних кардіоміоцитах схрещували тварин, що експресують ген фагової Cre-рекомбінази під контролем промотора гена важкого ланцюга міозину α (α-MHC-Cre), з тваринами іншої репортерної лінії мишей, а саме Rosa26R (при дослідженні функції генів у кардіогенезі). Rosa26R є Cre-репортерною лінією мишей і експресує бактеріальний ген *lacZ* у клітинах, де наявна експресія Cre-рекомбінази. Варто зауважити, що α-MHC промотор досить добре охарактеризований і експресується у ембріональному серці після закладки першого та другого серцевих полів виключно в кардіоміоцитах із 10,5 доби ембріонального розвитку. Застосування такої Cre-рекомбінази робить можливим вивчення функції цільового гену за умови його нокауту виключно в кардіоміоцитах. Такі тварини з генотипом Wt/Wt; α-MHC-Cre⁺; Rosa26R⁺ схрещувались із тваринами, що містять у своєму геномі loxP-сайти, тобто умовнонокаутними тваринами за генами *Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1*. Генотипування проводили із застосуванням ПЛР, в ролі матриці використовували ДНК виділену із кінчиків хвостів або амніонів (при роботі з ембріонами). У дослідженні використовували ембріони з такими генотипами: Flox/WT; αMHC-Cre⁺; Rosa26R⁺ – із гетерозиготною делецією досліджуваного гена (гетерозиготи), Flox/Flox; αMHC-Cre⁺; Rosa26R^{+/-} – із гомозиготною делецією гена інтересу (гомозиготи), Flox/WT; αMHC-Cre⁻; Rosa26R^{+/-} та Flox/Flox; αMHC-Cre⁻; Rosa26R^{+/-} – контрольна група. При дослідженні дорослих та новонароджених тварин: Flox/WT; αMHC-Cre⁺ – миші з гетерозиготною делецією досліджуваного гена (гетерозиготи), Flox/Flox; αMHC-Cre⁺ – миші з гомозиготною делецією гена-інтересу (гомозиготи), Flox/WT; αMHC-Cre⁻ та Flox/Flox; αMHC-Cre⁻ – тварини контрольної групи.

Аналіз особливостей кардіогенезу за умови делеції досліджуваних генів. Для вивчення впливу делеції досліджуваних генів (*Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1*) на формування серця в ембріогенезі, використовували ембріони терміном гестації 10,5; 12,5 та 14,5 діб (E10,5; E12,5 та E14,5 відповідно). На потрібних термінах вагітності самиць забивали методом церебральної дислокації, ембріони ізолювали, використовуючи амніони для генотипування ембріонів. Кількість ембріонів на кожному терміні спостереження для кожного генотипу становила більше 30 зразків.

Виділення та культивування неонатальних кардіоміоцитів. За допомогою методу холодної трипсинізації із сердець новонароджених мишей (P1) виділяли кардіоміоцити та вводили їх в культуру. Ізольовані серця контрольних та дослідних тварин тричі промивали в середовищі DMEM із додаванням 10-кратних розчинів пеніциліну (1000 МО/мл) та стрептоміцину (1000 мкг/мл) з наступною інкубацією протягом 20 хв. при +4°C. Проводили обробку тканини серця ферментами: 0,025% розчин трипсину та 0,01% EDTA в PBS протягом ночі при +4°C. Зразки дезінтегрували піпетуванням у середовищі DMEM з 10% ФБС і висівали в культуральні 12-лункові планшети. Додатково застосовували преплейтінг. Отримані таким чином неонатальні кардіоміоцити вирощувалися протягом 3–5 діб при температурі 37 °C та при 5% CO₂ у газовій суміші.

Морфологічний аналіз кардіоміоцитів in vitro. Для аналізу розмірів неонатальних кардіоміоцитів та їхньої морфології клітини попередньо висівали на стерильні покривні скельця і вирощували протягом 2 діб. Після чого клітини фіксували протягом 30 хв. при кімнатній температурі в суміші фіксаторів (80% спирт/4% параформальдегід/5% оцтова кислота). Клітини забарвлювали гематоксиліном-еозином (ГЕ). Аналіз морфології клітин проводили за допомогою світлового мікроскопу при збільшенні 1000^x. Визначали довжину та ширину клітин. У кожному варіанті аналізували більше ніж 100 клітин із трьох сердець кожного генотипу. Також аналізували частоту двоядерних клітин залежно від генотипу. Для цього культивовані ізольовані клітини фарбували розчином 20 мкг/мл акридинового оранжевого. Аналіз проводили на флуоресцентному мікроскопі. Підраховували кількість двоядерних та одноядерних кардіоміоцитів. У кожному варіанті аналізували не менше 50 клітин із трьох сердець кожного генотипу.

Аналіз проліферативної активності неонатальних кардіоміоцитів проводили із застосуванням МТТ-тесту. При аналізі сигнальної активності канонічного Wnt та проліферації кардіоміоцитів, клітини через 24 години після розсіву оброблялись хлоридом літію та ангіотензином (AngII) протягом трьох діб у концентраціях 20 мМ та 50 мМ відповідно.

Вивчення постнатального розвитку серця тварин за умови нокауту досліджуваного гена. Після генотипування формувалися відповідні дослідні та контрольні групи, кількість тварин кожного генотипу реєструвалася щотижнево. Для оцінки різниці у виживаності використовувався метод Каплан-Мейер. Для аналізу вікових особливостей формування міокарду чи моделюванні гіпертрофії, атлетичного серця використовували тварин відповідного віку/генотипу і методи подані нижче.

Мета-аналіз відтворюваних молекулярних маркерів гіпертрофії. Із використанням регресивного та дисперсійного аналізів нами було проаналізовано роль канонічного Wnt сигналіngu та β -катеніну в розвитку гіпертрофії тканини, незалежно від типу тканини та виду модельного об'єкту.

Індукція гіпертрофії. Самцям лінії BATGAL віком три місяці підшкірно вживлювали мініосмотичні насоси виробництва ALZET модель 2002 (кат №10251-11, США). Підготовку мініосмотичних насосів проводили згідно з рекомендаціями виробника, тварин перед операцією анестезували авертином інтраперитонеально (0,2 мкг/г). В якості гіпертрофічних стимулів використовували хлорид літію та Ang (Sigma, USA, A9525) II у концентраціях 20мМ та 1мМ відповідно. Контрольні тварини отримували фізіологічний розчин. Тварин виводили з досліду на 3-тю, 7-му та 14-ту добу спостережень. На кожному терміні спостережень проводили морфологічні, морфометричні, молекулярно-генетичні дослідження. Кількість тварин у кожній групі становила не менше п'яти самців лінії BATGAL. Ця низка експериментів виконувалася на базі Інституту дослідження легень та серця асоціації Макса Планка, Бад-Наухейм, Німеччина в рамках програми EMBO Post-Doctoral Short –Term Fellowships (ASTF 223.00-2011).

Моделювання атлетичного міокарду. Дослідження проводили з використанням дорослих самців мишей лінії CB57BL та самців із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* віком три місяці. Фізичне навантаження тварин моделювали із застосуванням плавального тесту за описаною та адаптованою методикою. Проводили морфометричні, морфологічні, молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні аналізи через 1,4 та 6-ти тижнів тренувань. Кількість тварин у кожній групі становила не менше десяти самців лінії CB57BL.

Дослідження кардіогемодинамічних показників. Для аналізу впливу нокауту досліджуваного гена на функціонування серця в дорослих тварин проводили аналіз кардіогемодинамічних показників. Для цього тварин віком 9 місяців відповідних генотипів анестезували інтраперитонеально уретаном (150 мг/г). Після цього проводили диссекцію правої каротидної артерії, що давало змогу вводити у лівий шлуночок, ретроградно через праву каротидну артерію, ультратонкий катетер (d 1,4F). Таким чином, одночасно реєстрували тиск та об'єм лівого шлуночка та візуалізацію кривих об'єм-тиск серцевого циклу. У роботі реєстрували наступні показники: частоту серцевих скорочень, кінцевий систолічний та діастолічний тиски лівого шлуночка, кінцевий систолічний та діастолічний об'єми лівого шлуночка, ударний об'єм, серцевий викид, фракцію викиду, dP/dt max, dP/dt min, dV/dt max, dV/dt min, and PdVdt max. Ефективну артеріальну жорсткість визначали за Sunagawa, як відношення кінцевого систолічного тиску до уданого об'єму. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення PVAN 3.6 (Millar Instruments, Houston, TX, USA) та переводили відносні одиниці об'єму в мікролітри.

Проведення морфометричного аналізу. Для оцінки розвитку постнатального міокарду чи гіпертрофічної відповіді аналізували індекси співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ, мг/г) та/або індекс маси серця до довжини гомілки (МС/ДГ) (мг/мм).

Проведення гістологічних та імуногістохімічних досліджень. Для аналізу змін структури серця як у дорослих тварин, так і ембріонів застосовували морфологічні та імуногістохімічні методи. Ізольовані серця, або ембріони, фіксували в 4% параформальдегіді та заключали в парафін і використовували для забарвлення гематоксилін/еозином, пікрофуксином за ван Гізоном, Масон-трихромного забарвлення та X-gal забарвлення. Для аналізу рівнів експресії та локалізації білків міжклітинної адгезії в серцях ембріонів застосовували метод імуногістохімічного аналізу. Окрім того, зразки поміщали в середовище для криозрізів для забарвлення жиром червоним О.

Аналіз змін експресії генів за допомогою ПЛР в реальному часі. Виділену з апексів серця РНК використовували для синтезу кДНК. Синтезовану кДНК використовували для ПЛР в реальному часі. Досліджували зміни рівнів експресії генів: *ANP, BNP, β -MHC, α -MHC, c-Fos, CyclinD1, c-Myc, TCF-4, Jup, Axin2, Lef, Ctgf, Il1rl1, Tnfrsf1b* та *Aurka*, для нормалізації рівня експресії використовували *Gapdh*. Обчислення результатів ПЛР в реальному часі проводили за стандартним методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Аналіз вмісту білків за допомогою Вестерн-блоту. Для аналізу змін вмісту білків білок виділяли з лівого шлуночка, розділяли в 10% поліакриламідному гелі та переносили на PVDF-мембрану. Та інкубували із відповідними первинними та вторинними антитілами. Досліджували вміст таких білків: β -катеніну, активного β -катеніну, N-кадгерину, GSK3 β , pGSK3 β , γ -катеніну, Akt1, pAkt Ser-473, pAkt Thr-308, ERK1/2, pERK1/2 Thr-202/Thr-204, AMPK α 1/2, pAMPK α Thr-172, PKA, pPKA, HSL, pHSL Ser-565, pHSL Ser-563, ACC, pACC Ser-79, Axin-1, PPR α для нормалізації використовували GAPDH.

Хроматинімунопреципітація (ChIP). Для проведення імунопреципітації з антитілами до β -та γ -катеніну проводили виділення хроматину з сердець новонароджених тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* та контрольної групи віком 2–3 доби (P2-3). Валідацію результатів IP проводили із застосуванням методу ПЛР у реальному часі, праймери підбирали специфічно до консервативних фрагментів ДНК у структурі генів, що містять Wnt responsible motive. Ця низка експериментів виконувалася на базі Інституті молекулярної та клітинної біології, Варшава, Польща в рамках програми EMBO Post-Doctoral Short –Term Fellowships (ASTF 518-2015).

Статистичний аналіз даних. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартне відхилення, якщо не вказане інше. Кількість тварин у групах та повторів незалежних експериментів вказана під рисунками. Аналіз статистичної достовірності відмінності виживаності між групами проводили із застосуванням лог-рангового тесту. Перевірку розподілу на нормальність здійснювали за допомогою тесту Д'Агостіно-Пірсона, у випадку, якщо розподіл нормальний, застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) із *post hoc* тестом Тукея або *post hoc* тестом Холма-Сідака, якщо ні – тест Краскела-Уолліса із *post hoc* тестом Данна. У підписах рисунків зазначали, який саме тест

використаний при аналізі даних. Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми GraphPad Prism7.

Результати досліджень та їх обговорення

Кадгерин-катеніновий комплекс у кардіогенезі та неонатальному серці

На першому етапі роботи ми дослідили вплив нокауту генів АК: *Cdh2*, *Cttnn1* та *Cttnb1* на розвиток та формування серця в ембріогенезі мишей. Виявили, що гомозиготний нокаут гена *Cdh2* в серці ембріонів спричиняє порушення розвитку серця, дезінтеграцію кардіоміоцитів, порушення розвитку структур голови та летальність ембріонів терміном гестації E10,5 (рис.1). Імуногістохімічний аналіз підтвердив відсутність експресії продукту гена *Cdh2* в ембріональному серці (рис.1 *д* та *е*). Морфогенез серця був не завершеним у таких ембріонів, а екстраембріональна циркуляторна система була слабо розвиненою, порівнюючи з контрольними ембріонами того ж віку. Загалом, нами вперше було показано критичне значення продукту гена *Cdh2* у кардіогенезі ссавців.

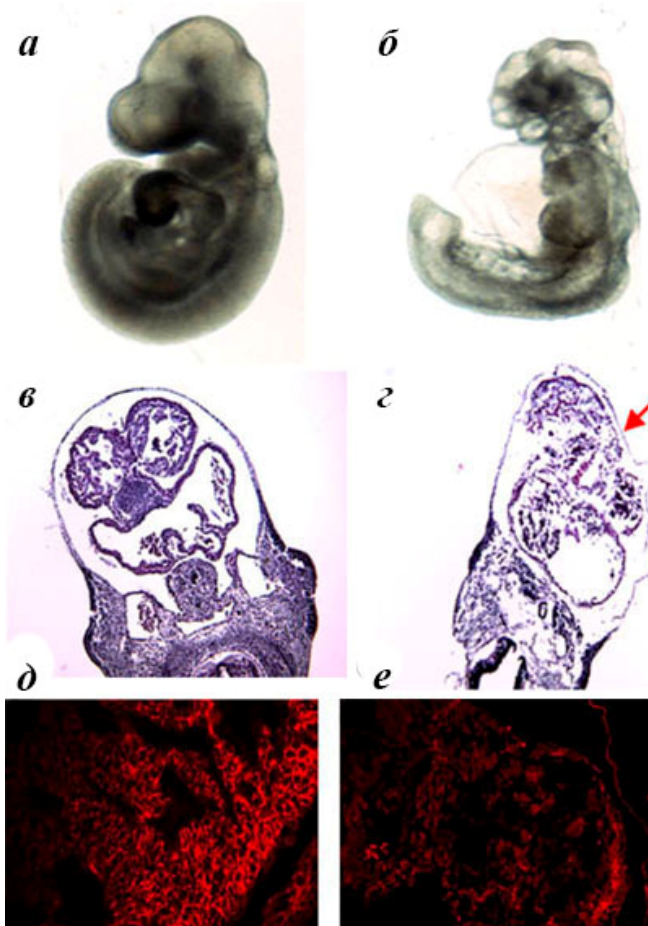


Рис.1. Нокаут гена *Cdh2* в ембріональних кардіоміоцитах спричиняє порушення адгезії кардіоміоцитів і призводить до летальності ембріонів. *а* – вигляд ембріону контрольної групи; *б* – вигляд ембріону з гомозиготним нокаутом гена *Cdh2*; *в-г* – гематоксилін-еозинове забарвлення зразків парафінових поперечних секцій ембріонів терміном гестації E10,5; *д-е* імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти N-кадгерину; *в, д* – аналіз поперечних зрізів тканини ембріону контрольної групи; *г, е* – аналіз поперечних зрізів тканини ембріону з нокаутом гена *Cdh2*. Примітка: стрілочкою вказано витончення стінки міокарду в мутантного ембріона (*г*)

При аналізі ембріонів з гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* та *Cttnb1* порушень розвитку та формування серця чи ембріону не виявили. Це, ймовірно, є наслідком функціональної компенсації делетованих α -Е-катеніну та β -катеніну (продуктів генів *Cttnn1* та

Cttnb1) їхніми гомологами α -Т-катеніном та γ -катеніном відповідно, про що свідчать і результати імуногістохімічного аналізу сердець ембріонів терміном гестації 10,5 (рис.2 *а-і*) та 14,5 (рис.2 *к-у*) діб. Незважаючи на підвищення експресії γ -катеніну (рис.2 *ж* та *с*), за умови гомозиготного нокауту гена *Cttnb1*, ми виявили летальність ембріонів на пізніх термінах гестації та новонароджених тварин з гомозиготним нокаутом гена *Cttnb1* у кардіоміоцитах (табл.1).

При дослідженні сердець новонароджених тварин ми виявили, що гетерозиготна і гомозиготна делеція гена *Cttnb1* у серці ембріонів спричиняє затримку росту міокарду новонароджених тварин (рис. 3 а). На противагу цим даним, як гетеро, так і гомозиготна делеція гена *Cttnn1* спричиняла підвищення маси серця новонароджених мишей віком P1, порівнюючи із контролем (рис. 3 б).

Таблиця 1

Вживаність ембріонів та новонароджених тварин за умови делеції досліджуваних генів у ембріональних кардіоміоцитах

Нокаутований ген	Термін гестації	Контроль виявлено	Контроль очікувано	Мутанти виявлено	Мутанти очікувано	Всього зразків
<i>Cttnn1</i>	E10,5	19	18	5	6	24
	E12,5	19	19,5	7	6,5	26
	E14,5	26	25,5	8	8,5	34
	NB	12	11,25	3	3,75	15
<i>Cttnb1</i>	E10,5	36	33,75	9	11,25	45
	E12,5	24	22,5	6	7,5	30
	E14,5	33	30	7 (3)	10	40 (3)
	NB	27 (1) [#]	22,5	3 (1)*	7,5	30 (2)
<i>Cdh2</i>	E10,5	26	25,5	8	8,5	34
	E12,5	21	20,25	6**	6,75	27
	E14,5	18	13,5	0	4,5	18

Примітки: 1) ембріони аналізували на 10,5, 12,5 та 14,5 добу гестації; 2) новонароджені (NB) тварини генотипувалися на 1,5 – 2 добу після народження (P 1,5-2); 3) мутантними зазначені тварини з делецією обох алелів досліджуваного гена; в дужках зазначена кількість аномальних/мертвих тварин; 4) [#] мертва новонароджена тварина була гетерозиготою за нокаутом гена *Cttnb1*; 5) * $p = 0.0578$, ** $p < 0.05$

Загалом спостерігали порушення проліферативної активності та розмірів міоцитів серця в новонароджених тварин P1-2 з нокаутом гена *Cttnn1* і *Cttnb1*. У першому випадку були поміченими зменшення розмірів мутантних кардіоміоцитів та підвищення темпу проліферації (рис. 3 з), що, вочевидь, спричиняло гіпоплазію сердець у мишенят як з гомо, так і гетерозиготним нокаутом *Cttnn1*. У випадку нокауту гена *Cttnb1* проліферація мутантних клітин була пригнічена (рис. 3 в), однак розміри таких кардіоміоцитів збільшувались порівняно з контролем. Окрім того, нокаут гена *Cttnn1* та *Cttnb1* спричиняв порушення визрівання неонатальних кардіоміоцитів, про що свідчить зменшення кількості двоядерних клітин серця (рис. 3 д та е) та підвищення експресії фетальних генів *ANP*, *BNP* та β -*MHC* у серцях з нокаутом *Cttnn1*; *ANP* та *BNP* у серцях ембріонів із нокаутом *Cttnb1*.

За допомогою ЗТ-ПЛР аналізу нами було показано, що за умови нокауту гена *Cttnn1* у серцях мишенят P1 відбувається підвищення експресії генів мішеней β -катеніну: *c-Myc* і *Axin2* (рис. 4 а). Це свідчить про підвищення сигнальної активності канонічного Wnt та β -катеніну, зокрема в неонатальних кардіоміоцитах із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1*. Аналіз рівнів експресії генів-мішеней *Yap*: *Ctgf*, *Tnfrsf1b* також виявив підвищення їхньої експресії в кардіоміоцитах із нокаутом гена *Cttnn1* (рис. 4 б). Отримані дані вказують на підвищення сигнальної

активності Yap у цих клітинах. Порушення активності канонічного Wnt сигналіngu виявили і в серцях ембріонів та новонароджених тварин з гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*. Так, у серцях ембріонів та новонароджених тварин відбувалося підвищення експресії генів: *TCF4*, *Axin2*, *c-Fos* і *CyclinD1* (рис.5 а), що свідчить про активацію канонічного Wnt сигналіngu та узгоджується з даними Вестерн блот аналізу (рис. 5 б та в).

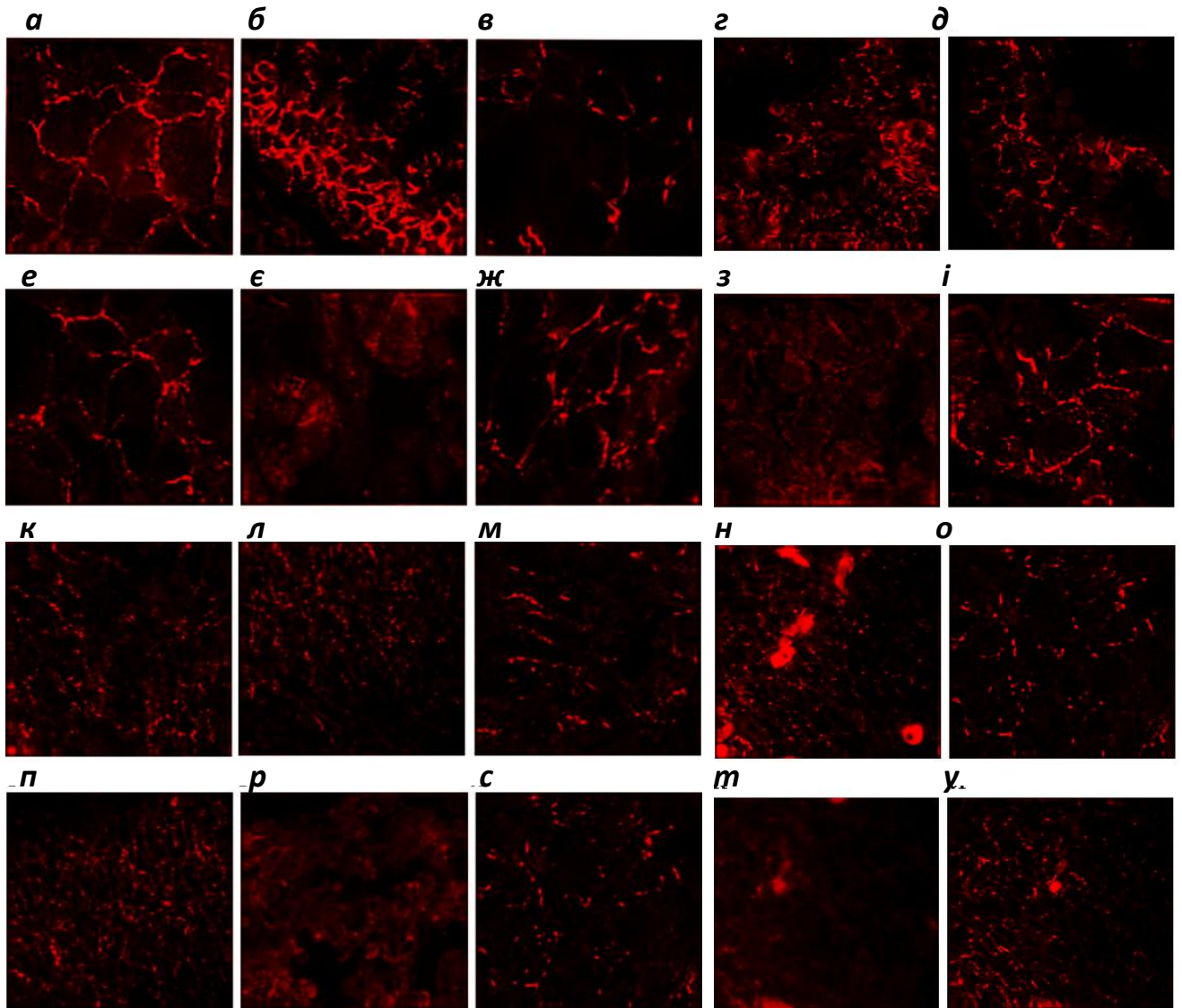


Рис. 2. Імуногістохімічний аналіз поперечних зрізів парафінових препаратів сердець ембріонів: *а-і* – серця терміном гестації E10,5; *к-у* – серця терміном гестації E14,5; *а-д, к-о* – зразки сердець контрольної групи; *є-ж, р-с* – зразки сердець із гомозиготною делецією гена *Ctnnb1*; *з-і, т-у* – зразки сердець із гомозиготною делецією гена *Ctnna1*; *а, е, к, п* – імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти N-кадгерину; *б, є, л, р* – імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти β -катеніну; *в, ж, м, с* – імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти γ -катеніну; *г, з, н, т* – імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти α -Е-катеніну; *д, і, о, у* – імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти α -Т-катеніну

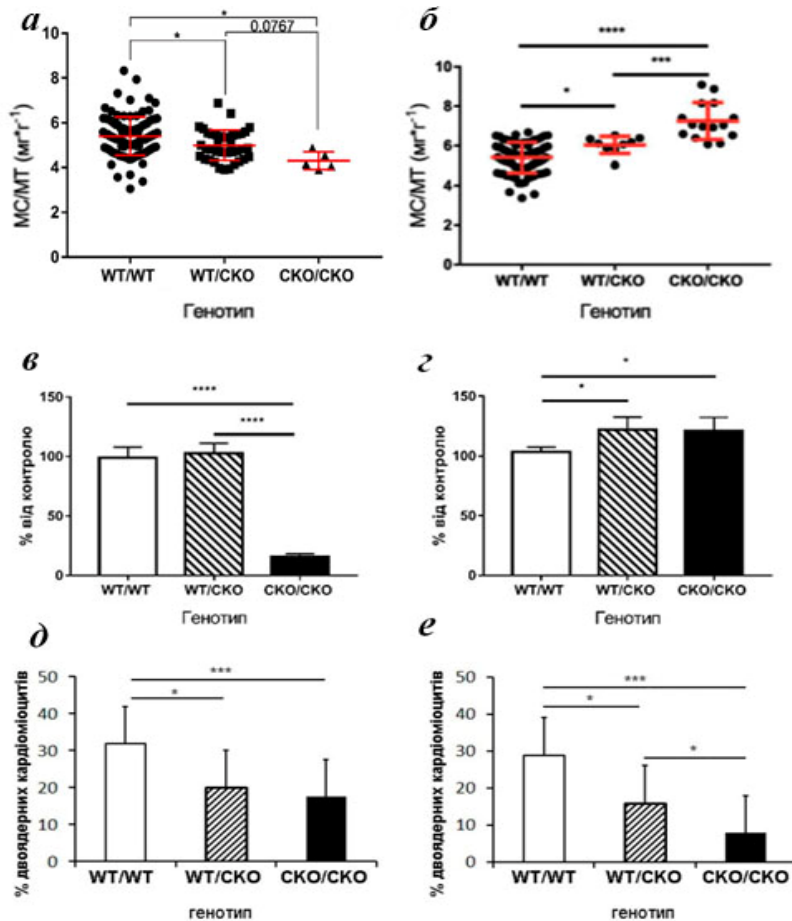


Рис.3. Аналіз впливу нокауту генів *Ctnnb1* та *Cttnn1* на ріст неонатального міокарду та кардіоміоцитів. Співвідношення маси серця до маси тіла тварин віком P1 з кардіоспецифічною делецією гена *Ctnnb1* (а) та гена *Cttnn1* (б); аналіз проліферативної активності КМ із кардіоспецифічною делецією гена *Ctnnb1* (в) та гена *Cttnn1* (г); аналіз частоти двоядерних кардіоміоцитів у клітинах із нокаутом *Cttnn1* (д) та *Ctnnb1* (е) WT/WT – контрольні тварини; WT/CKO- тварини з гетерозиготним нокаутом досліджуваного гена; CKO/CKO – тварини з гомозиготним нокаутом досліджуваного гена. Кількість тварин у кожній групі: *Ctnnb1* WT/WT – 66, WT/CKO – 21; *Cttnn1* WT/WT – 81, WT/CKO – 9 та CKO/CKO – 15. * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p < 0,005$, **** – $p < 0,001$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Спостерігали також підвищення вмісту фосфорильованих форм GSK3 α/β у лізатах сердець із гетерозиготним нокаутом *Ctnnb1*, що свідчить про руйнування β -катенін деградувального комплексу і пригнічення транскрипційної активності β -катеніну. У серцях мишенят із гомозиготним нокаутом *Ctnnb1* вміст фосфорильованої GSK3 β був статистично достовірно нижчим, порівнюючи з контролем та іншою дослідною групою, що свідчить про активацію канонічного Wnt-каскаду за умов експерименту *Ctnnb1* (рис. 5). Останнє, може бути наслідком залучення інших білків до регулювання Wnt-сигналіngu, наприклад, γ -катеніну.

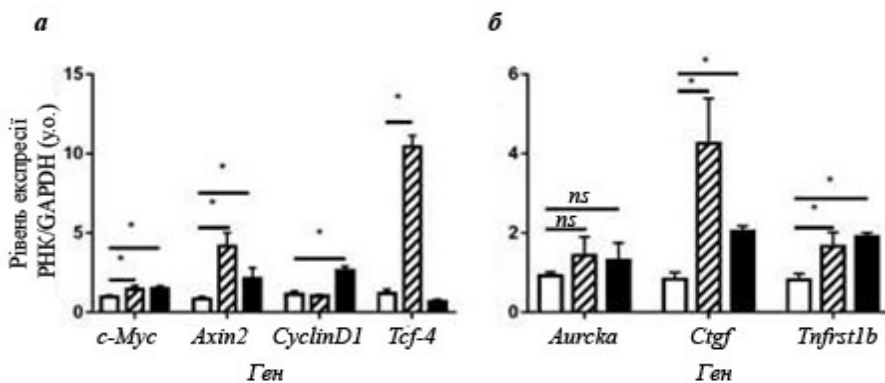


Рис.4. Аналіз активності канонічного Wnt - та HIPPO сигнальних каскадів у неонатальних кардіоміоцитах за умови нокауту гена *Cttnn1*: а – аналіз змін експресії генів, залучених до канонічного Wnt сигналіngu; б – аналіз змін експресії генів мішеней Yap; □ – WT/WT, ▨ – WT/CKO, ■ – CKO/CKO.

WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. ns – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

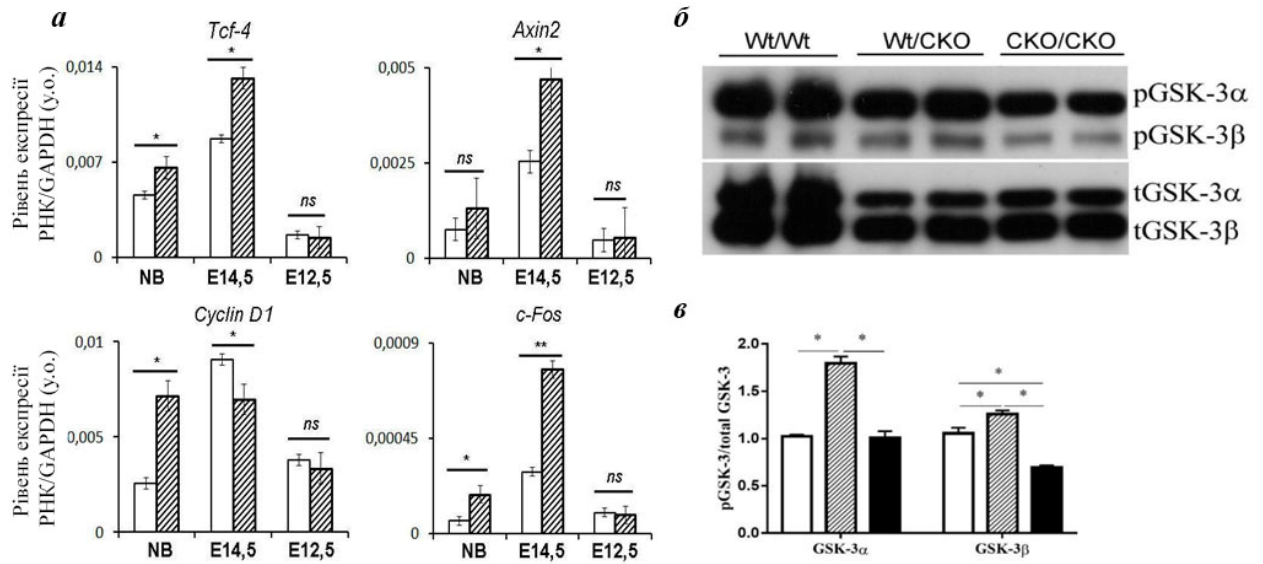


Рис. 5 Аналіз активності канонічного Wnt сигналіngu в лізатах сердець (P1-2) контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією *Ctnnb1*: **а** – аналіз експресії генів у реальному часі; **б-в** – Вестерн-блот аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої GSK3α/β **б** – типовий Вестерн блот, **в** – денситометрія експресії фосфорильованої GSK3α/β нормалізована відносно тотальної GSK3α/β. Дані експресії білка представлені як відносна зміна рівня, порівнюючи з контролем. □ – WT/WT, ▨ – WT/CKO, ■ – CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. n = 3-5 у всіх групах. * - p ≤ 0,05 за допомогою ANOVA

Аналіз вмісту та експресії інших білків АК, N-кадгерину та γ-катеніну показав, що за умов делеції гена *Ctnnb1* відбувається підвищення експресії його гомолога - гена *Jup* та вмісту його продукту - γ-катеніну (рис. 6). Це вказує на можливу функціональну компенсацію між γ-катеніном та β-катеніном. Проте, зниження вмісту N-кадгерину свідчить про неефективність такої компенсації та порушення формування міжклітинної адгезії у мутантних серцях.

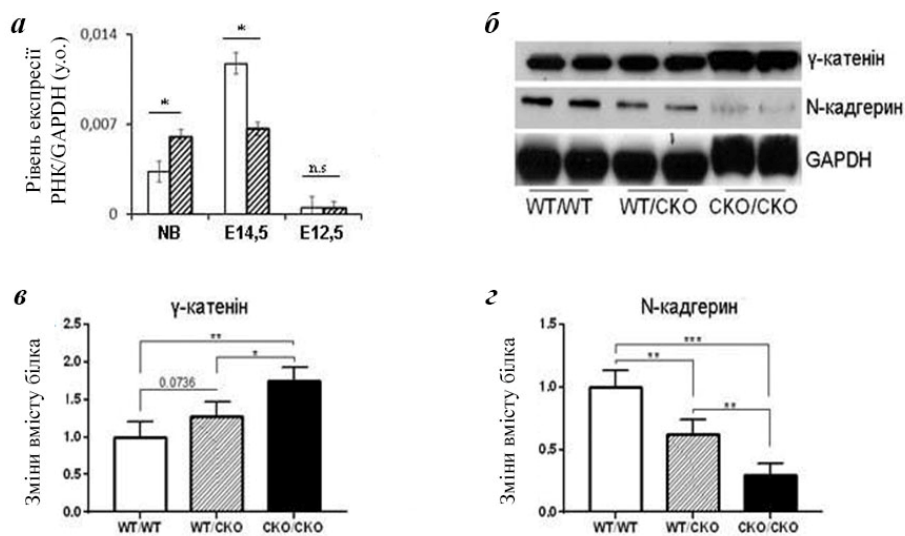


Рис. 6. Аналіз експресії білків АК у лізатах сердець новонароджених мишей (P1-2); **а** – аналіз зміни експресії гена *JUP* за умови кардіоспецифічної делеції гена *Ctnnb1* у серцях ембріонів (E14,5 та E12,5) та новонароджених мишей (NB); **б** – типовий вестерн блот; **в** – денситометрія експресії тотального γ-катеніну; **г** – денситометрія вмісту N-кадгерину. Дані експресії білка представлені

як відносна зміна рівня, порівнюючи з контролем. □ – WT/WT, ▨ – WT/CKO. WT/WT – контрольні зразки, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. n = 3-5 у всіх групах. ns – p > 0,05; * - p ≤ 0,05 за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

За допомогою ChIP-3Т-ПЛР аналізу нами показано, що γ -катенін здатен утворювати комплекси з TCF/LEF/ДНК та регулювати експресію деяких генів-мішеней канонічного Wnt-сигналіngu: *Axin*, *c-Myc* але не з *Lef1*, за умови гетерозиготного нокауту *Ctnnb1* в ембріональних кардіоміоцитах (рис. 7 б). Тож нами вперше показано участь γ -катеніну в регулюванні активності канонічного Wnt-сигналіngu у серцях новонароджених тварин з нокаутом *Ctnnb1*.

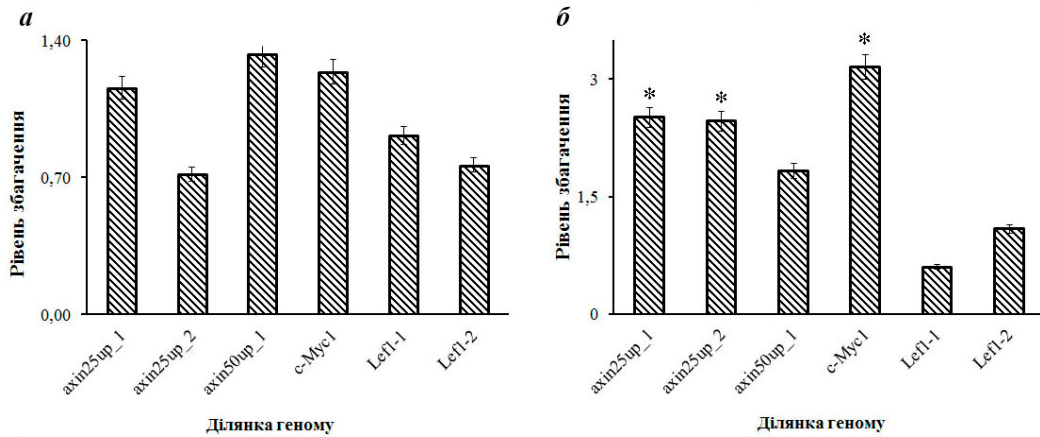


Рис. 7. Рівень зв'язування γ -катеніну з передбачуваними ділянками геному у зразках преципітату хроматину отриманого з контрольних сердець (а) та сердець із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* (б) новонароджених тварин (P3); кількість тварин у кожній групі – не менше 5; ns – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Проте зниження вмісту трансмембранного білка N-кадгерину свідчить про порушення формування інтеркалярних дисків (ІД) у серцях мишенят із нокаутом гена *Ctnnb1* (рис. 6). Тож компенсації γ -катеніном делетованого *Ctnnb1* недостатньо для формування постнатального серця.

Загалом, нами показано критичне значення цитоплазматичних партнерів N-кадгерину - β -катеніну та α -Е-катеніну, в контролюванні темпу проліферації, розмірів та термінальної диференціації міоцитів у серцях новонароджених мишей, вірогідно, через їхню участь у сигнальних каскадах клітини (рис.8).

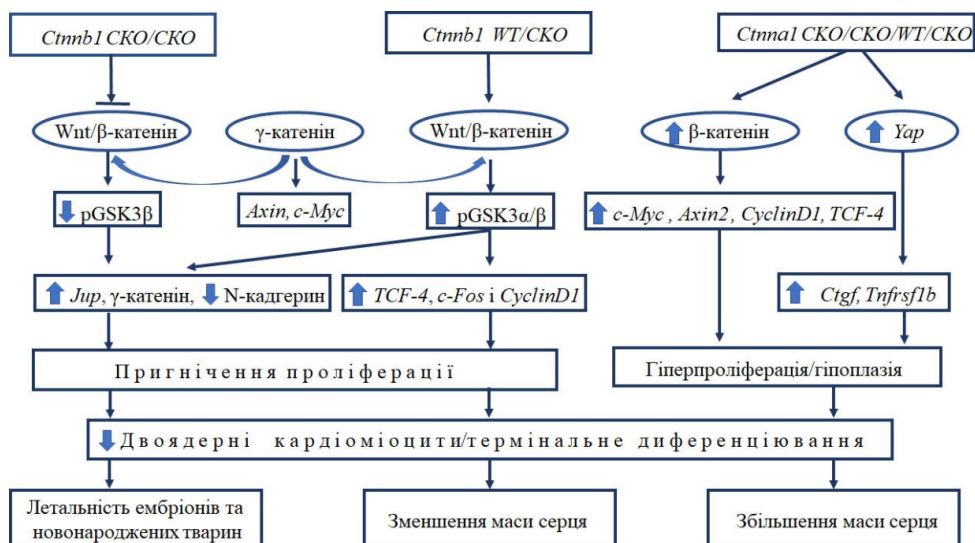


Рис. 8. Нокаут генів *Ctnna1* та *Ctnnb1* у кардіоміоцитах ембріонів (E10,5) спричиняє порушення розвитку неонатального серця внаслідок змін активності канонічного Wnt- та Hippo-сигнальних каскадів

Дослідження ролі канонічного Wnt сигнального каскаду в розвитку та ремоделюванні міокарду. Із застосуванням Мета-аналізу нами показано, що гіпертрофія має консервативний і універсальний молекулярний механізм, підвищення експресії β -катеніну чітко пов'язано з гіпертрофією серця (рис. 9, *a, б*). За допомогою дисперсійного аналізу нами виявлено статистично достовірний зв'язок рівню експресії β -катеніну та деяких маркерів гіпертрофії : *c-Myc* ($\eta^2=0,38$) та *ANP* ($\eta^2 = 0,095$) (рис. 9, *в, з*).

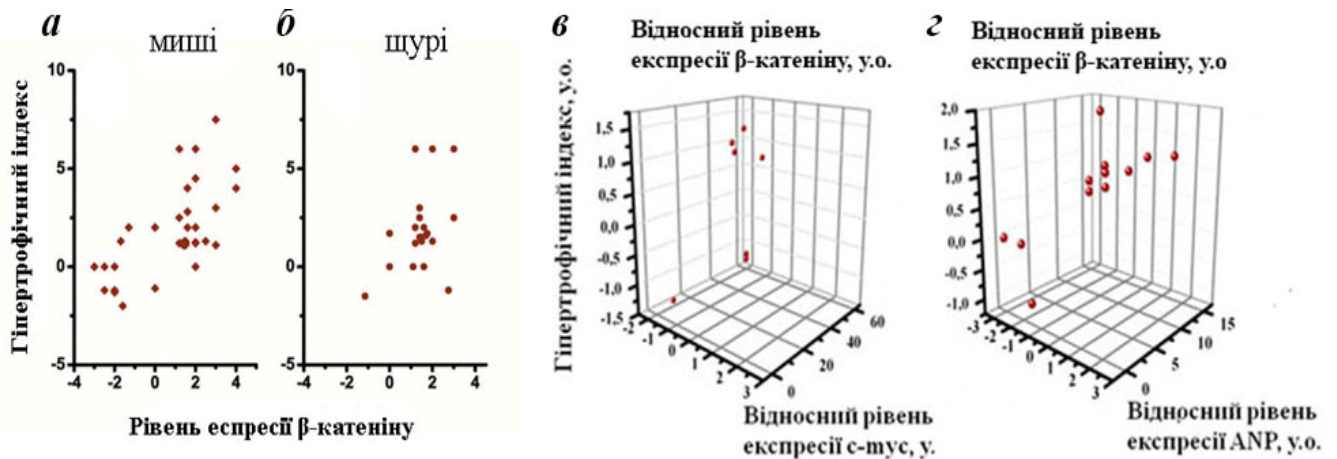


Рис. 9. Мета-аналіз канонічного Wnt-сигналіngu та гіпертрофії. Рівень експресії β -катеніну та гіпертрофічні індекси в мишей (*a*) та щурів (*б*) Зв'язок відносного рівня експресії *c-myc* (*в*) та *ANP* (*з*) з гіпертрофічними індексами та відносним рівнем експресії β -катеніну. Ступінь кореляції розраховувався за допомогою дисперсійного аналізу (two-way ANOVA)

Окрім того, було виявлено низку гіпертрофічних маркерів, що є найбільш відтворюваними і адекватними для дослідження функції β -катеніну у формуванні гіпертрофічної відповіді, а саме: SERCA, актин DIF, Axin-2, *c-Myc*, CD1, BNP, ANP та індекс співвідношення білок/ДНК. Дані отримані із застосуванням репортерних BATGAL мишей та мишей лінії CB57BL узгоджуються з результатами Мета-аналізу.

Так, нами показано, що інфузія репортерним BATGAL мишам LiCl та Ang II у концентраціях 20мМ та 1мМ відповідно спричиняє підвищення сигнальної активності β -катеніну, про що свідчить позитивне X-gal забарвлення зрізів сердець (рис. 10) на третю добу дії гіпертрофічних стимулів. Також спостерігали активацію експресії гіпертрофічних генів: *BNP* та β -*MHC* і генів мішеней канонічного Wnt каскаду: *c-Fos*, *c-Myc*, *CyclinD1* та *TCF4*. Результати РТ-ПЛР аналізу узгоджуються з даними Вестерн блот аналізу. Так, підвищений вміст сумарного та активованого β -катеніну та фосфорильованої GSK3 α/β у лізатах ізольованих кардіоміоцитів (рис. 10 *б*), оброблених гіпертрофічними стимулами свідчить про активацію канонічного Wnt-каскаду в ранні терміни дії гіпертрофічних стимулів: третя доба – *in vivo* та 24 год - *in vitro*.

Із застосуванням моделі тривалого фізичного навантаження ми дослідили механізми адаптації серця до тренувань або розвиток так званого «атлетичного

міокарду». Морфологічний аналіз парафінових препаратів зрізів сердець тварин не виявив порушень тканини серця ні через 1 тиждень ні через 1 місяць тренувань (рис. 11 *a*). Проте, зростання значення гіпертрофічного індексу свідчить про гіпертрофію серця дослідних мишей через місяць тренувань (рис. 11 *б*).

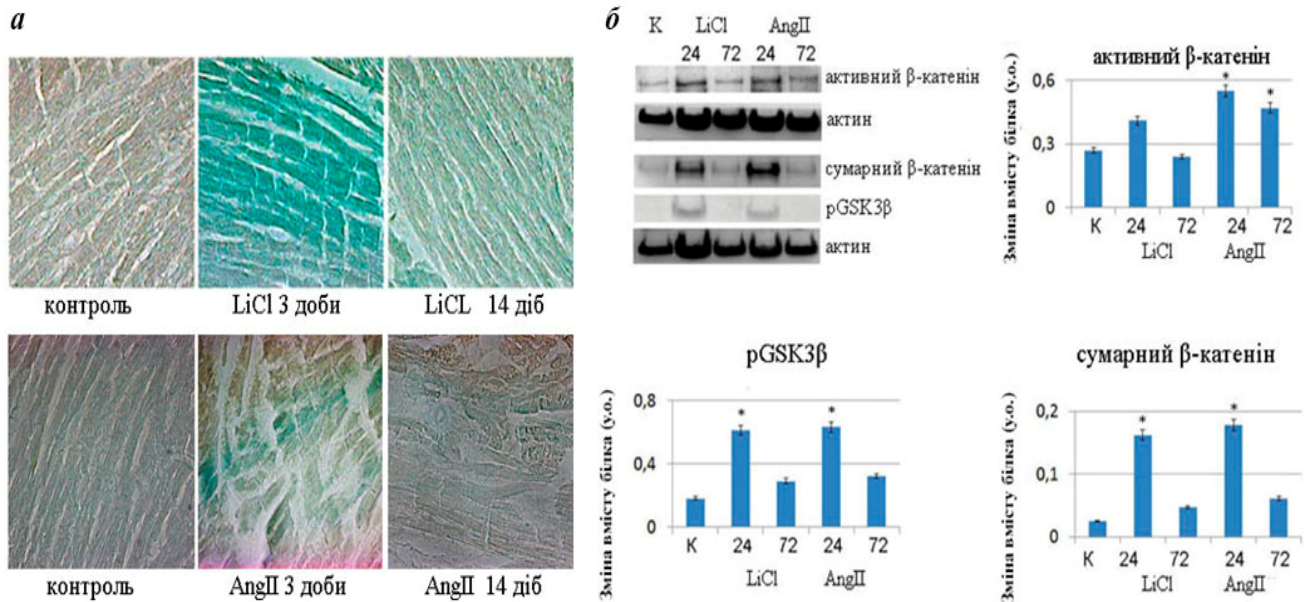


Рис. 10. Кінетика сигнальної активності β-катеніну під впливом гіпертрофічних стимулів: *a* – X-gal забарвлення парафінових секцій тканин міокарду після інфузії AngII та LiCl, 1000x; кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; *б* – Вестерн блот аналіз вмісту сумарного, активованого β-катеніну та фосфорильованої GSK-3β у лізатах ізольованих кардіоміоцитів після обробки гіпертрофічними стимулами (AngII і LiCl). Дані експресії білка представлені як відносна зміна рівня, порівнюючи з контролем. * - $p \leq 0,05$, * - $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Аналіз сигнальної активності канонічного Wnt–сигнального каскаду при моделюванні атлетичного міокарду також свідчить про активацію цього каскаду в ранні терміни перебудови серця, а саме, через тиждень фізичного навантаження та пригнічення його пізніше, через місяць тренувань. Про це свідчать підвищення експресії гена *Axin2* (рис. 11 *в*) та підвищення вмісту фосфорильованої GSK3β у зразках дослідних тварин саме через тиждень фізичного навантаження (рис. 11 *г* та *д*).

При аналізі тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* віком один, два, три місяці ми не виявили морфологічних порушень тканини серця, однак спостерігали затримку розвитку таких сердець у тварин віком один та три місяці. Окрім того, в серцях дорослих тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* спостерігали підвищення експресії гіпертрофічних або фетальних генів: *ANP*, *α-MHC* (рис.12 *б*) та пригнічення активності канонічного Wnt-каскаду, про що свідчить зниження вмісту активного β-катеніну і підвищення вмісту скефолдних білків APC та Axin1 (рис.13 *б* та *є*). Результати Вестерн блоту узгоджуються із дослідженнями експресії генів *TCF4* та *c-Myc* (рис. 13 *ж*) та свідчать про

пригнічення транскрипційної активності β -катеніну у мишей проаналізованих вікових груп навіть за умови відсутності додаткових стресових чинників.

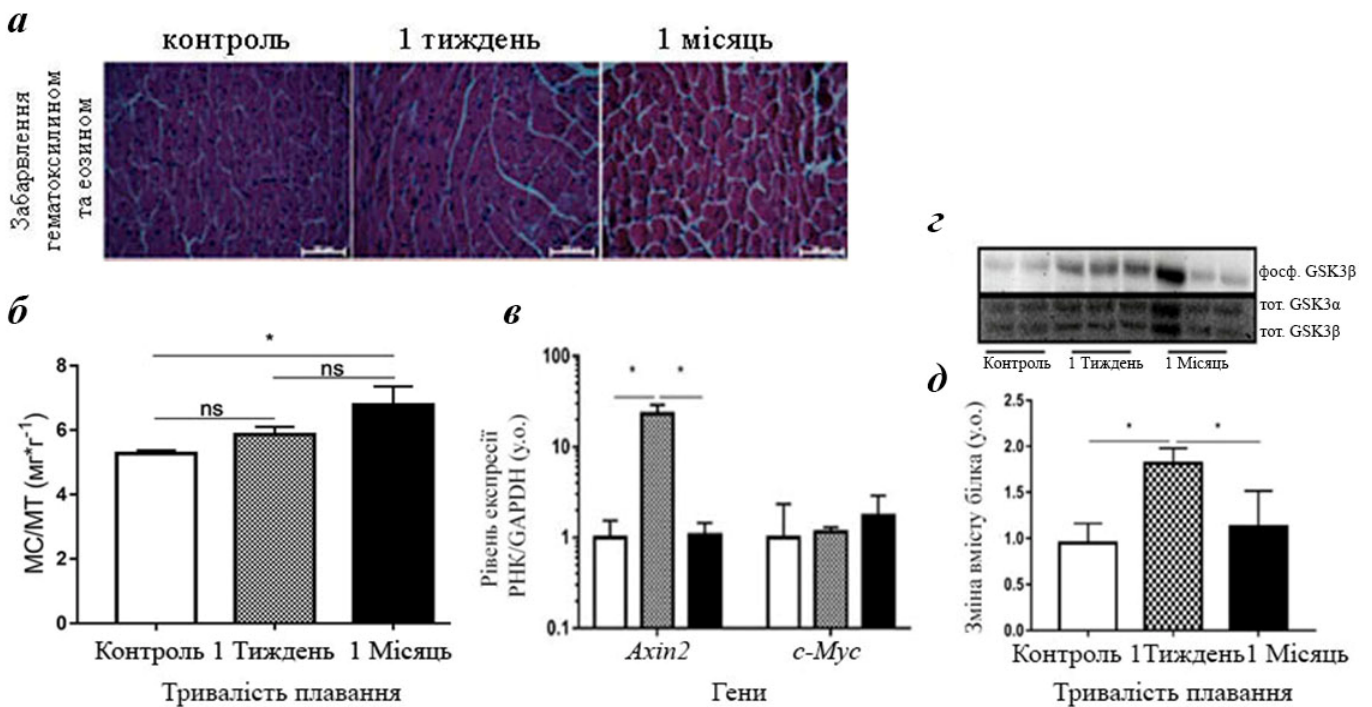


Рис.11. Короткотривале плавання спричиняє активацію Wnt-каскаду. **а**- гематоксилін-еозинове забарвлення парафінових зрізів тканини серця мишей; **б** - аналіз зміни рівня експресії генів-мішеней β -катеніну в серцях контрольної групи тварин та тварин, що тренувались один тиждень і один місяць. Дані експресії мРНК представлені як відносна зміна рівня, порівнюючи з контролем. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; * – $p < 0,05$; **в-г** Вестерн блот аналіз вмісту фосфорильованої та тотальної GSK3 β ; **в** – типовий Вестерн блот; **г** – денситограма вмісту фосфорильованої GSK3 β у лізатах сердець контрольних тварин та тварин, що тренувались один тиждень і один місяць нормалізована відносно тотальної GSK3 β . \square - контроль, \square - 1 тиждень тренувань, \blacksquare - 1 місяць тренувань. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; * – $p < 0,05$

Отримані дані разом із результатами дослідження сердець новонароджених тварин з нокаутом гена *Ctnnb1* свідчать про специфічні порушення їхнього розвитку в наслідок порушення переходу серця на «дорослу» генетичну програму.

При моделюванні атлетичного міокарду у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* ми так само не виявили морфологічних порушень тканини серця (рис.12 **а**). Однак, аналіз розмірів кардіоміоцитів виявив пригнічення гіпертрофічної відповіді в мутантних мишей через шість тижнів фізичних навантажень, порівняно з тваринами, що не містили нокауту досліджуваного гена і отримували фізичні навантаження (рис. 12 **б**). ЗТ-ПЛР аналіз виявив підвищення експресії гіпертрофічних генів у мишей при тривалому фізичному навантаженні, що також свідчить про ремоделювання серця тварин. Однак, у мутантних тварин рівні експресії гіпертрофічних (або фетальних) генів були статистично достовірно вищими, порівнюючи з мишами, що отримували фізичне навантаження та не містили нокауту *Ctnnb1* (рис.12 **в**).

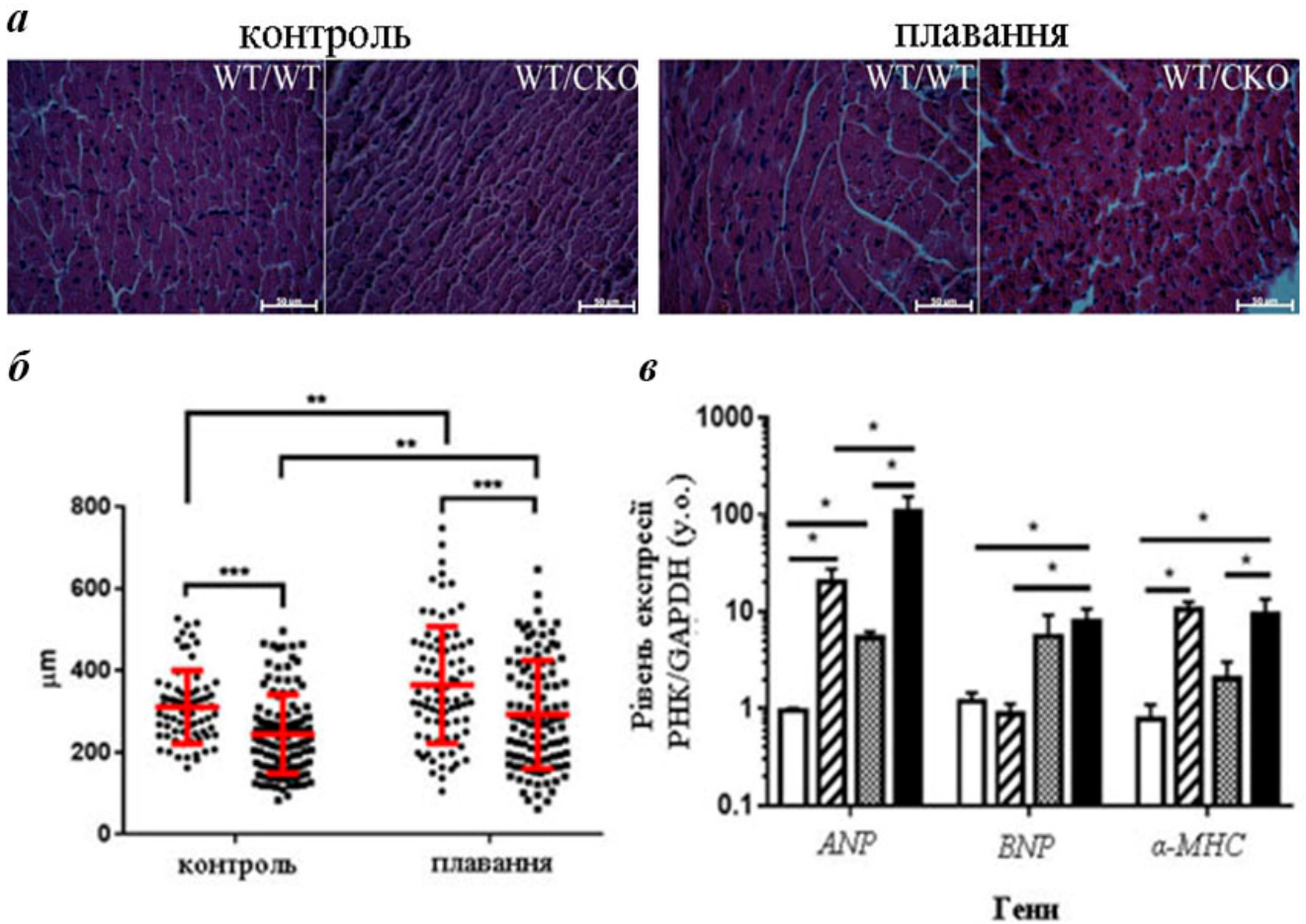


Рис. 12. Аналіз гіпертрофічної відповіді при тривалому фізичному навантаженні. **а** - гематоксилін-еозинове забарвлення парафінових зрізів тканини серця мишей; **б**- аналіз розмірів кардіоміоцитів, $n \geq 18$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,005$ за допомогою тесту Краскела-Уолліса з *post hoc* тестом Данна: ●- WT/WT, ■ - WT/CKO. **в** – дослідження рівнів експресії фетальних генів у серцях тварин при тривалому фізичному навантаженні: □ - WT/WT, ▨ - WT/CKO, ▩ - WT/WT плавання, ■ - WT/CKO плавання. WT/WT – тварини, що не містять нокауту гена *Cttnb1*, WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Cttnb1*, контроль – тварини, що не отримували фізичного навантаження, плавання – тварини, що отримували фізичне навантаження протягом 6 тижнів; $n \geq 4$; * – $p < 0,05$

За допомогою ЗТ-ПЛР та Вестерн блот аналізів нами показано, що адаптація тварин до тривалих фізичних навантажень супроводжувалася пригніченням активності канонічного Wnt-каскаду: зниженням експресії генів *TCF4* та *c-Myc*, вмісту активного β -катеніну і підвищенням вмісту скефолдних білків APC та Axin1 (рис.13 *е* та *є*). Це спостереження узгоджується із попередніми результатами і свідчить про пригнічення активності канонічного Wnt-каскаду у віддалені терміни формування атлетичного міокарду. Проте у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* у серці пригнічення активності Wnt/ β -катенінового сигналіну було статистично достовірно вищим, порівнюючи з тваринами контрольних генотипів (рис.13).

Відомо, що в контролюванні кардіогенезу та адаптації серця до дії несприятливих факторів беруть участь також інші сигнальні каскади, а саме РізК/Akt, MAPK та цАМФ/РКА-сигнальні каскади. До того ж ці сигнальні каскади взаємодіють із канонічним Wnt-сигналіном (Chaanine & Najjar, 2011; Lee et al.,

2017; Padala et al., 2017). Тож ми проаналізували їхню активність та виявили порушення активності Pi3K/Akt- та MAPK сигналінгів у серцях дорослих тварин із гетерозиготним нокаутом *Cttnb1* як при тривалому фізичному навантаженні, так і за умов нормального утримання тварин (рис. 14).

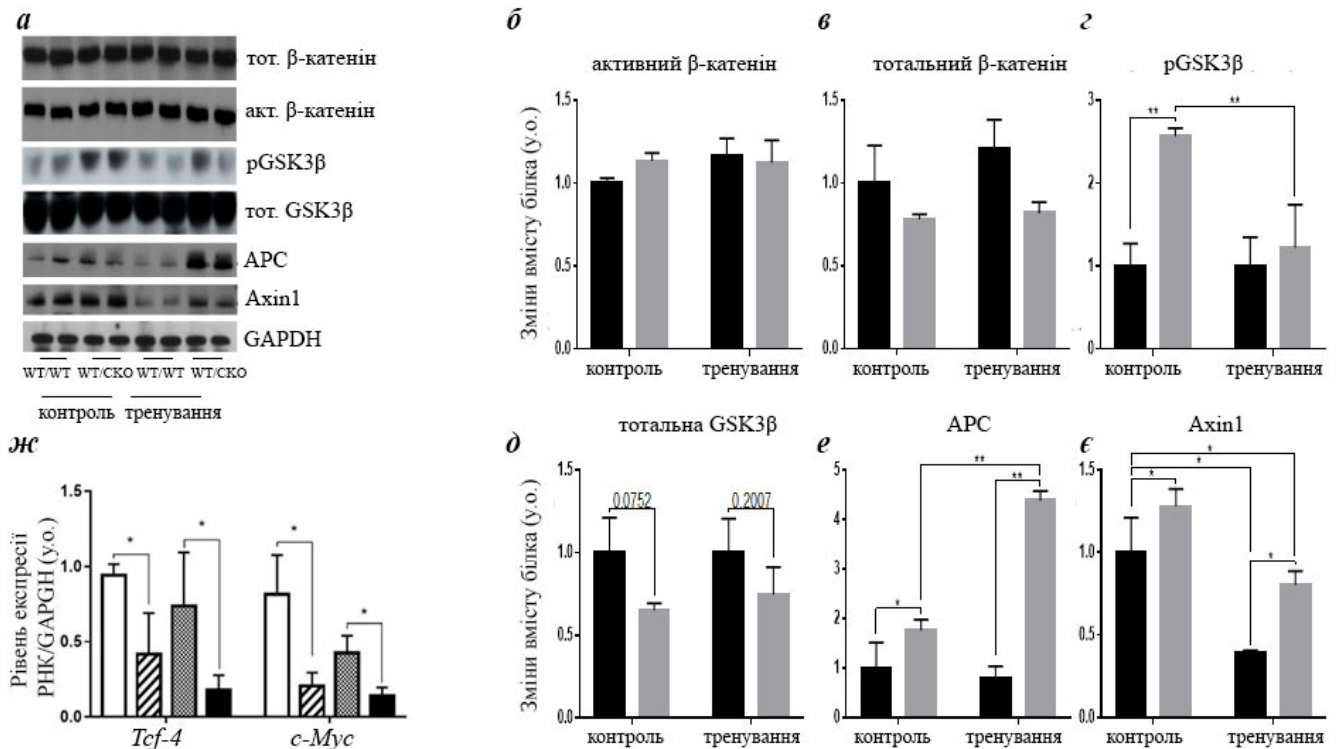


Рис.13. Вестерн блот аналіз кінетики канонічного Wnt сигналіngu у тварин з нормальним генотипом (WT/WT) та тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* (CKO/WT) при тривалому фізичному навантаженні (плавання) та без нього (контроль): **а** – Вестерн блот аналіз змін вмісту досліджуваних білків; **б** – вміст активованого білка β-катеніну; **в** – вміст сумарного β-катеніну; **г** – вміст активованої GSK3β; **д** – вміст тотальної GSK3β; **е** – вміст сумарного APC; **є** – вміст сумарного Axin1; ■ - WT/ WT, □ - WT/CKO; **ж** - дослідження рівнів експресії генів - мішеней β-катеніну у серцях тварин при тривалому фізичному навантаженні: □ - WT/WT контроль, ▨ - WT/CKO контроль, ▩ - WT/WT тренування, ■ - WT/CKO тренування. $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$, $n = 5$ у кожній групі; за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Так, спостерігали підвищення вмісту фосфорильованої GSK3β (рис.13 г) та вмісту фосфорильованої Akt за треоніном 308 і серином 473 у серцях дорослих тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* і при фізичному навантаженні, і без нього (рис. 14 б та в). Отримані дані вказують на активацію Pi3K/Akt сигналіngu в серцях дорослих мутантних мишей за умови нокауту *Cttnb1* та пригнічення Wnt/β-катенінового сигналіngu. Також ми виявили підвищення сигнальної активності MAPK сигналіngu, про що свідчить підвищення вмісту фосфорильованих ERK1/2 у серцях мутантних тварин як при навантаженні, так і в контролі (рис.13 з).

Отже, нами показано, що, генетичний нокаут однієї алелі гена *Cttnb1* спричиняє затримку розвитку атлетичного міокарду при тривалих фізичних навантаженнях, що, однак, супроводжується підвищенням експресії фетальних генів *ANP*, *VNP* та міозину дорослого серця *α-MHC* у серцях таких тварин. Окрім того, встановлено, що транскрипційна активність β-катеніну є необхідною умовою для адаптації міокарду до тривалих фізичних навантажень та врегулювання активності

інших сигнальних каскадів клітин, так навіть надмірна активації MAPK, PI3-кіназного сигналінгів у тварин гетерозиготних за нокаутом *Cttnb1* не сприяла формуванню атлетичного міокарду.

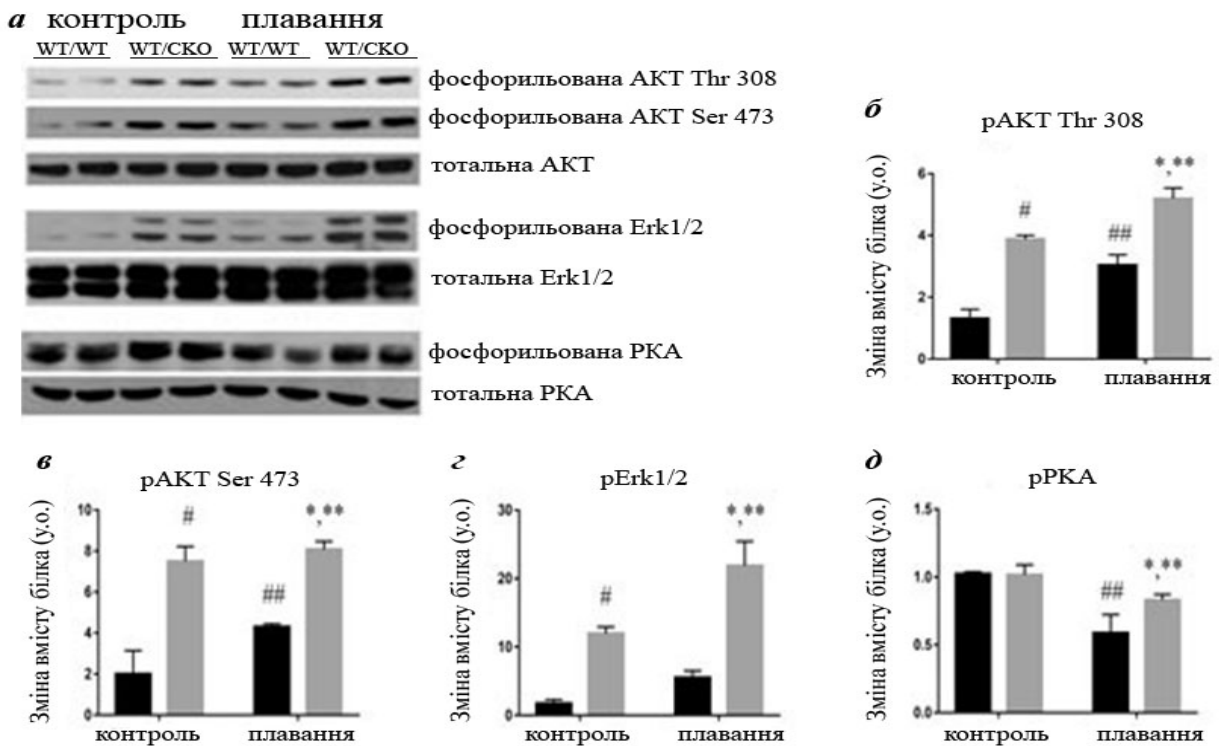


Рис.14. Вестерн блот аналіз гіпертрофічних сигнальних каскадів у тварин дикого типу (WT/WT) та з делецією однієї алелі гена *Cttnb1* (CKO/CKO) при тривалому фізичному навантаженні (плавання) та без нього (контроль): **а** – Вестерн блот аналіз змін вмісту досліджуваних білків; **б** – вміст фосфорильованої Akt Thr308; **в** – вміст фосфорильованої Akt; **г** – вміст фосфорильованої ERK1/2; **д** – вміст фосфорильованої PKA. ■ - WT/ WT, ▒ - WT/CKO. $n = 5$ у кожній групі; # – різниця між мутантними та дикотипними тваринами в контрольній групі; ## – різниця між дикотипними тваринами в контролі та досліді (при тривалому фізичному навантаженні); * – різниця між мутантними та дикотипними тваринами при фізичному навантаженні; ** – різниця між мутантними тваринами в контролі та досліді (при тривалому фізичному навантаженні) $P < 0.05$

Вивчення функції α -Е-катеніну в розвитку та функціонуванні міокарду за умови нокауту гена *Cttna1*. Аналіз тривалості життя тварин із гетеро- та гомозиготною делецією *Cttna1* виявив її достовірне скорочення порівняно з контрольними тваринами (рис. 15 **а**). Оскільки в роботі спостерігали летальність тварин віком 11 місяців, то далі використовували тварин віком 10 та 9 місяців (при аналізі кардіогемодинамічних показників). У тварин із гомо- та гетерозиготним нокаутом гена *Cttna1* виявили зростання індексу МС/МТ, порівнюючи з контрольними мишами (рис. 15 **б**). За допомогою РТ-ПЛР аналізу було показано підвищення експресії фетальних генів: β -МНС та *ANP* і пригнічення експресії міозину дорослого серця - α -МНС (рис. 15 **в**). Загалом це свідчить про гіпертрофічні зміни в серцях дорослих тварин із нокаутом *Cttna1*.

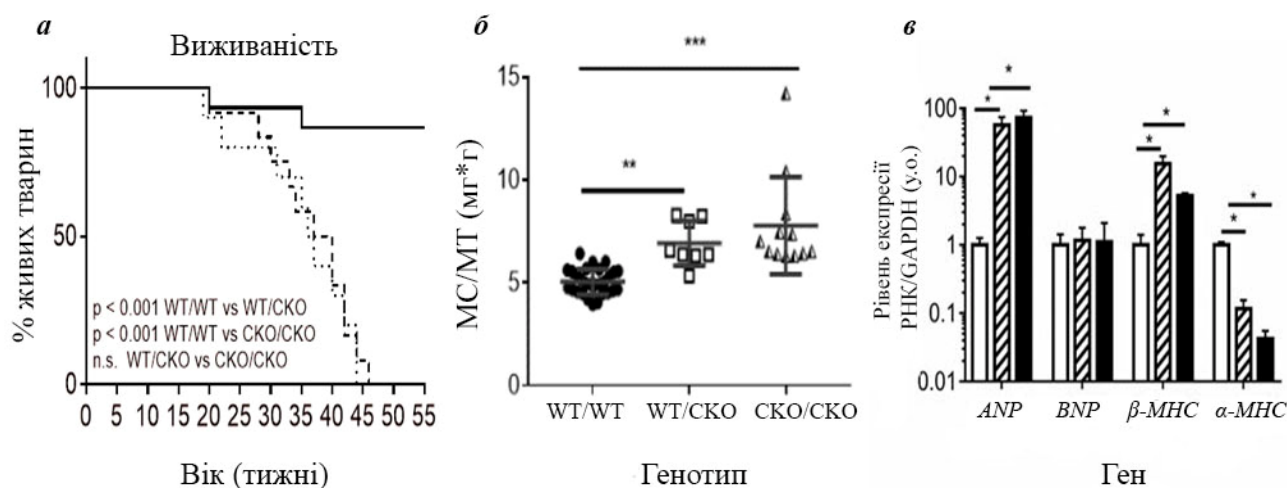


Рис. 15. Гетеро- та гомозиготна делеція *Cttna1* спричиняє гіпертрофічні зміни міокарду та летальність тварин. **а** – криві Каплан-Мейер, статистичний аналіз виживаності здійснювали за допомогою лог-рангового тесту; WT/WT, WT/CKO, CKO/CKO; **б** – індекс співвідношення МС/ДГ, ** $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,005$ за допомогою тесту Краскела-Уолліса із *post hoc* тестом Данна; **в** – рівень експресії гіпертрофічних (фетальних) генів: □ - WT/WT, ▨ - WT/CKO, ■ - CKO/CKO. * – $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея; WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією *Cttna1*, CKO/CKO – миші з гомозиготною делецією *Cttna1*

Морфологічний аналіз парафінових секцій сердець тварин контрольної групи та тварин із гетеро- і гомозиготним нокаутом гена *Cttna1* виявив суттєві порушення структури серця в мутантних тварин обох генотипів віком 10 місяців.

А саме, спостерігали “хвилясті” кардіоміоцити (рис. 16) та кардіоміоцити із гіпереозинофільною цитоплазмою (рис. 16), наявність таких клітин вказує на ішемічне ураження міокарду. Окрім того, виявили пошкодження коронарних судин, що є причиною ішемічного ушкодження серця (рис. 16); кардіоміоцити із вакуолізованими ядрами (рис. 16), що є ознакою загибелі клітин та дифузну інфільтрацію міокарда лімфоцитами (рис. 16). Останнє свідчить про запальні процеси.

Значні фіброзні ушкодження серця в мишей із гетеро- та гомозиготним нокаутом *Cttna1* виявили із застосуванням забарвлення за ван Гізеном (рис. 17). Замісний фіброз свідчить про загибель кардіоміоцитів та їхнє заміщення сполучною тканиною, а периваскулярний – про ушкодження судин та порушення кровообігу.

Аналіз інтенсивності фіброзу виявив залежність інтенсивності останнього від генотипу тварин, а саме в мишей із гомозиготним нокаутом *Cttna1* рівень фіброзу був достовірно вищим, порівнюючи з тваринами з гетерозиготним нокаутом *Cttna1* і становив – $2,4\% \pm 0,8\%$ (рис. 17 б).

При проведенні аналізу основних кардіогемодинамічних показників у тварин віком 9 місяців нами виявлено погіршення насосної та діастолічної функцій серця у тварин із гетерозиготною та гомозиготною делецією гена *Cttna1* (табл. 2).

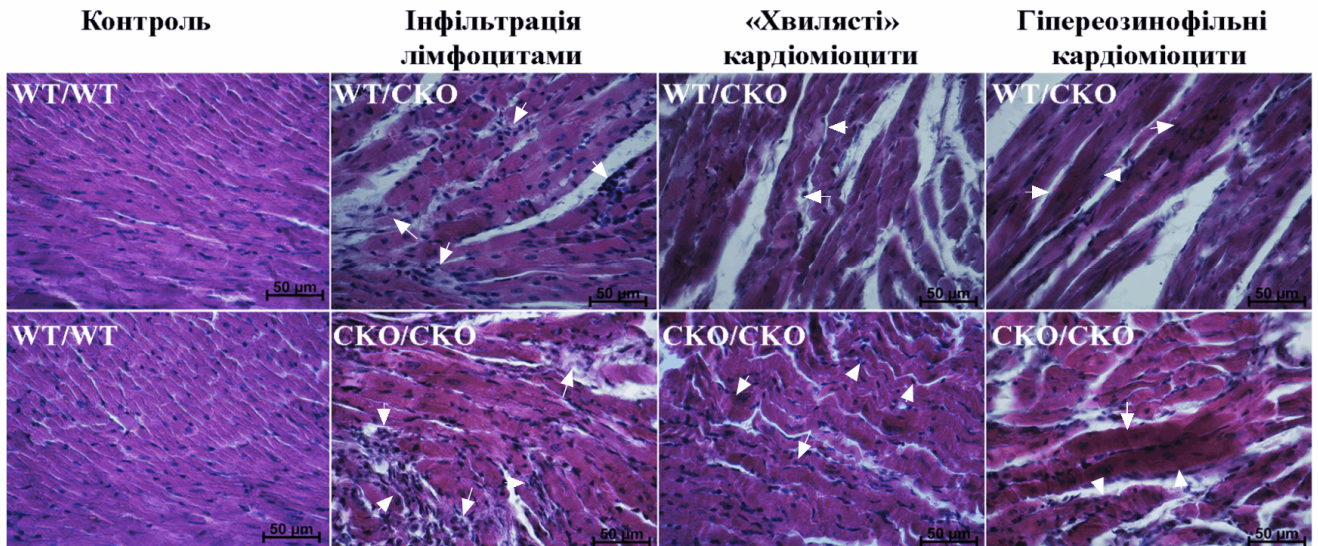


Рис. 16. Гетеро- та гомозиготна делеція *Cttnl1* призводить до гістопатологічних змін серця. Забарвлення гематоксилін/еозином. лінійка 50 мкм, збільшення 400^x. Усі гістопатологічні зміни вказані білими стрілками. WT/WT – контрольні миші, WT/СКО – миші з гетерозиготною делецією *Cttnl1*, СКО/СКО – миші із гомозиготною делецією *Cttnl1*.

Так, виявили зменшення частоти серцевих скорочень, як у гетерозигот, так і в гомозигот за нокаутом гена *Cttnl1* (на 21,5% та 22,4% відповідно), ударного об'єму (на 12,5% та 31,5% відповідно), фракції серцевого викиду (на 25,8% та 41,2% відповідно), ударної роботи (на 15,9% та 45,1% відповідно) (табл. 2). Також спостерігали погіршення скоротливої функції серця, про що свідчить зниження показників, як-от кінцевий систолічний тиск та $dPdt_{\text{максимальне}}$. (табл. 2).

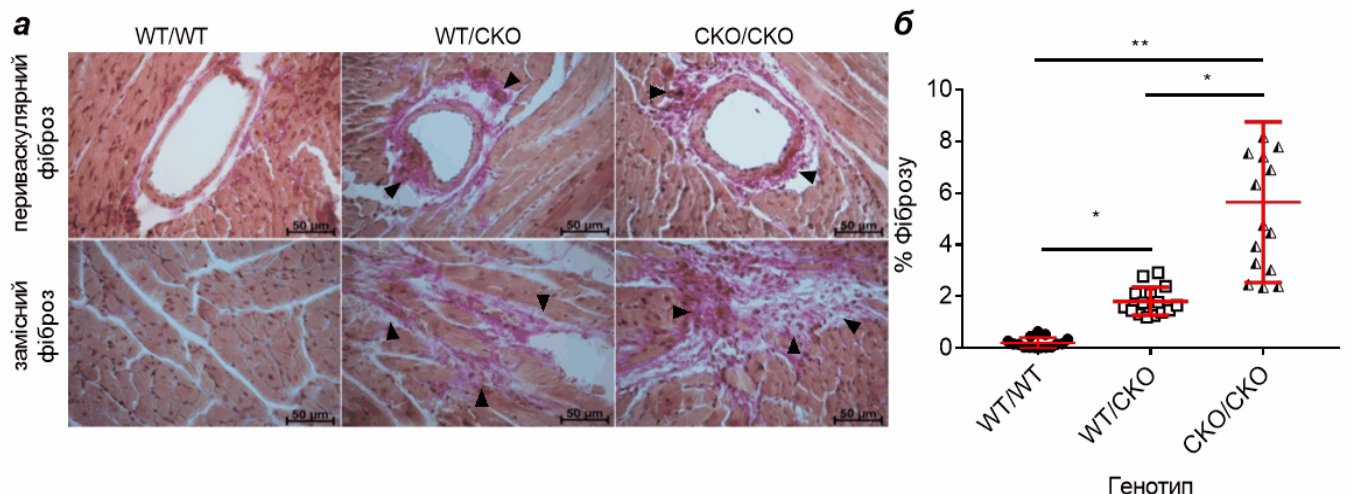


Рис. 17. Кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну призводить до розвитку периваскулярного та замісного фіброзу: **а** – забарвлення парафінових зрізів міокарда за ван Гізоном, лінійка 50 мкм, збільшення 400^x; **б** – результати вимірювання рівня фіброзу. WT/WT – контрольні миші, WT/СКО – миші з гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, СКО/СКО – миші з гомозиготною делецією α -Е-катеніну. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, за допомогою тесту Краскела-Уолліса з post hoc тестом Данна

Кардіогемодинамічні показники мишей із гетерозиготною і гомозиготною делецією гена *Cttna1*, у порівнянні з контрольними тваринами

Параметр	WT/WT	WT/СКО	СКО/СКО
Частота серцевих скорочень (уд*хв. ⁻¹)	626.8 ± 92	492.1 ± 106.2 *	486.1 ± 136.9 *
Максимальний об'єм (мкл)	23.1 ± 6.1	25.5 ± 7.9*	24.8 ± 9.9
Мінімальний об'єм (мкл)	12.7 ± 8.5	16.4 ± 10.9*	17.7 ± 8.7*
Кінцевий систолічний об'єм (мкл)	14.6 ± 9.6	17.8 ± 11.1*	20.4 ± 9.9*
Кінцевий систолічний тиск (мм.рт.ст)	87.2 ± 10.2	79.5 ± 20.9 *	84.3 ± 15.3
Кінцевий діастолічний об'єм (мкл)	21.2 ± 6.1	24.5 ± 8.1*	24.3 ± 10.1*
Кінцевий діастолічний тиск (мм.рт.ст.)	0.2 ± 2.5	9.1 ± 6.7 *	5.5 ± 8.1 * [#]
Ударний об'єм (мкл)	10.4 ± 4.2	9.1 ± 3.3 *	7.1 ± 3.3 * [#]
Фракція викиду (%)	51.6 ± 25.2	44.9 ± 26.3*	31.3 ± 17.3 * [#]
Серцевий викид (мкл*хв. ⁻¹)	6289.0 ± 2156.4	4663.7 ± 2224.1 *	3697.9 ± 1912.5 *

Примітки: 1) WT/WT – контрольні миші, WT/СКО – гетерозиготи, СКО/СКО – гомозиготи; 2) n = 5 у кожній групі, * – p ≤ 0,05 відносно контрольних мишей, # – p ≤ 0,05 відносно мишей із гетерозиготною делецією *Cttna1* за допомогою ANOVA з *post hoc* тестом Тукея

Отримані дані узгоджуються з аналізом вмісту фосфорильованої РКА, де ми виявили достовірне зниження її активності в обох групах мутантних тварин (рис.18 б та в), що доводить погіршення фосфорилування саркомерних білків. У цілому це говорить про послаблення насосної функції серця у тварин із делецією гена *Cttna1*, а також про розвиток серцевої недостатності в мутантних мишей.

Як було показано раніше, нокаут гена *Cttna1* спричиняв підвищення транскрипційної активності β-катеніну та Yap у неонатальних кардіоміоцитах, тож ми проаналізували їхню активність і в серцях дорослих мутантних тварин. У результаті ми виявили підвищення транскрипційної активності β-катеніну, про що свідчить підвищення вмісту активного β-катеніну (рис. 19 в) та фосфорильованої GSK-3β (рис. 19 з), а також зниження вмісту Axin1 – основного компонента деградувального комплексу β-катеніну (рис. 19 а та д) в міокарді мишей обох мутантних груп. Варто зауважити, що рівень активного β-катеніну та інгібованої GSK-3β був достовірно вищим у гомозигот, порівнюючи з гетерозиготами (рис. 19 а, в та з).

Результати Вестерн блот аналізу узгоджуються з даними аналізу рівнів експресії гена *Ctnnb1* та його генів-мішеней. Так, ми виявили підвищення експресії *Ctnnb1* як у лізатах сердець тварин із гетеро-, так і гомозиготним нокаутом *Cttnnal*, порівнюючи з контролем (рис. 20 *a*), а також зростання експресії гена *c-Myc* (рис. 20 *a*). У цілому це свідчить про активацію Wnt/ β -катенінового сигналіngu в серцях дорослих тварин з нокаутом *Cttnnal*. До того ж активність Wnt/ β -катенінового каскаду є вищою в гомозигот за нокаутом *Cttnnal*, у порівнянні з гетерозиготами.

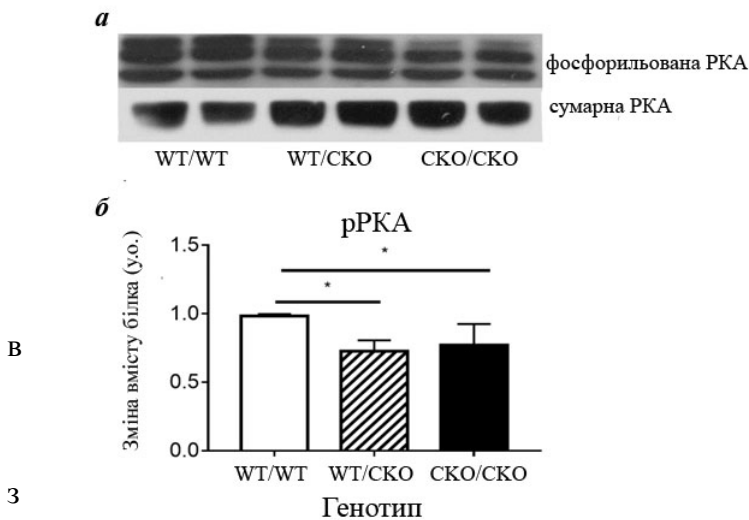


Рис. 18. Аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої РКА у лізатах сердець тварин із гетерозиготним та гомозиготним нокаутом гена *Cttnnal*, порівнюючи з контрольними мишами. *a* – типовий Вестерн блот, *b* – денситометрія експресії фосфорильованої РКА нормалізована відносно тотальної РКА. Дані експресії білка представлені як відносна зміна рівня порівнянні з контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA *post hoc* тестом Тукея.

Аналіз експресії генів-мішеней *Yap* у зразках сердець мутантних тварин вказує на підвищення транскрипційної активності *Yap* за умови нокауту *Cttnnal*. Так, ми спостерігали підвищення експресії генів *Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b* в обох дослідних групах (рис. 20 *b*).

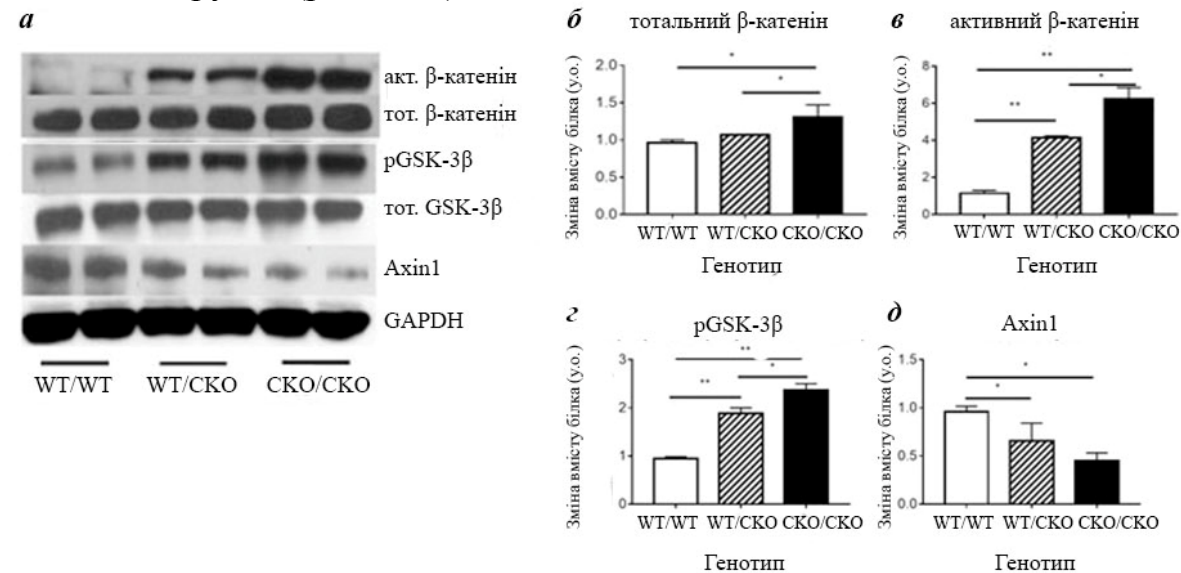


Рис.19. Нокаут *Cttnnal* спричиняє активацію канонічного Wnt- каскаду: *a* – Типовий Вестерн-блот; *b* – денситограма β -катеніну нормалізована відносно *Gapdh*; *c* – денситограма активного β -катеніну нормалізована відносно тотального β -катеніну; *d* – денситограма фосфорильованої за Сер 9 GSK-3 β нормалізована відносно тотальної GSK-3 β ; *e* – денситограма Axin1 нормалізована відносно *Gapdh*. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші з гетерозиготною делецією *Cttnnal*, CKO/CKO – миші з гомозиготною делецією *Cttnnal*. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ за допомогою ANOVA з *post hoc* тестом Тукея

На відміну від попередніх даних при аналізі експресії генів-мішеней γ ар лише ген *Il1r1* статистично достовірно експресувався на вищому рівні у тварин з гомозиготним нокаутом *Cttnn1*, порівнюючи з гетерозиготами (рис. 20 б). Отже, нами показано участь продукту гена *Cttnn1*, α -Е-катеніну в регулюванні активності Wnt/ β -катенінового та HIPPO каскадів у серцях дорослих тварин, що узгоджується з результатами аналізу сердець новонароджених мишей (P1-2).

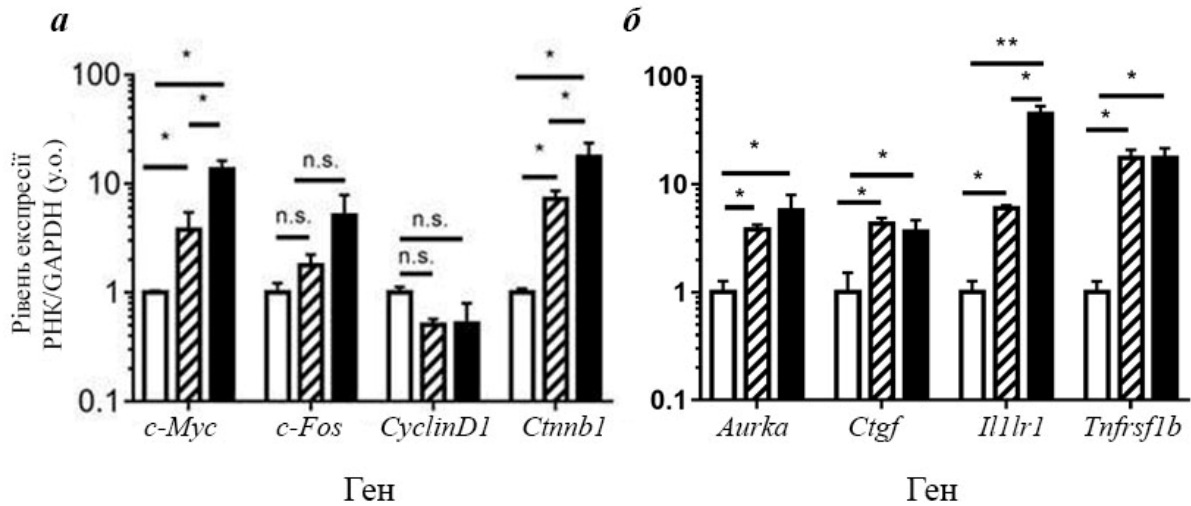


Рис. 20. Нокаут гена *Cttnn1* спричиняє підвищення транскрипційної активності β -катеніну та γ ар. **a** – аналіз експресії генів-мішеней Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду; **б** – аналіз експресії генів-мішеней γ ар. \square - WT/WT, \square (штрихуваний) - WT/CKO, \blacksquare - CKO/CKO. n = 5 у всіх групах. * - $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$ за допомогою ANOVA з *post hoc* тестом Тукея

Як згадувалося вище, функціонування міокарду регулюється багатьма сигнальними каскадами, що взаємодіють між собою: Wnt/ β -катеніновий та HIPPO-Pi3K/Akt-, PKA- та Mek1/Erk1/2-сигнальними каскадами. Тож ми проаналізували, як нокаут гена *Cttnn1* та порушення активності Wnt/ β -катенінового та HIPPO-каскадів у серцях дорослих тварин позначиться на активності Pi3K/Akt- і Mek1/Erk1/2- сигналінгів.

Аналіз вмісту тотальної Akt та фосфорильованої Akt за серином 473 у серцях тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом *Cttnn1* виявив його зростання вдвічі, порівнюючи з контролем (рис. 21 а, б та г), тоді як вміст Akt фосфорильованої за треоніном 308 навпаки знижувався у тварин із гомо- та гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1* (рис. 21 а та в). Загалом це може вказувати на mTORC2 залежну активацію Akt (Yang, Murashige, Humphrey, & James, 2015). Окрім того, за допомогою Вестерн блот аналізу виявили і порушення активності MAPK-каскаду в серцях дорослих тварин із нокаутом *Cttnn1*. Так, ми виявили, що в серцях тварин із гетерозиготним нокаутом *Cttnn1* вміст фосфорильованих Erk1/2 знижувався, водночас як у тварин із гомозиготним нокаутом – зростав (рис. 21 д).

Загалом нами було встановлено, що нокаут гена *Cttnn1* в ембріональних кардіоміоцитах спричиняє не лише підвищення транскрипційної активності β -катеніну

та Yap, а й порушення активності інших сигнальних каскадів, залучених до контролювання кардіогенезу та розвитку серцевої недостатності чи гіпертрофії.

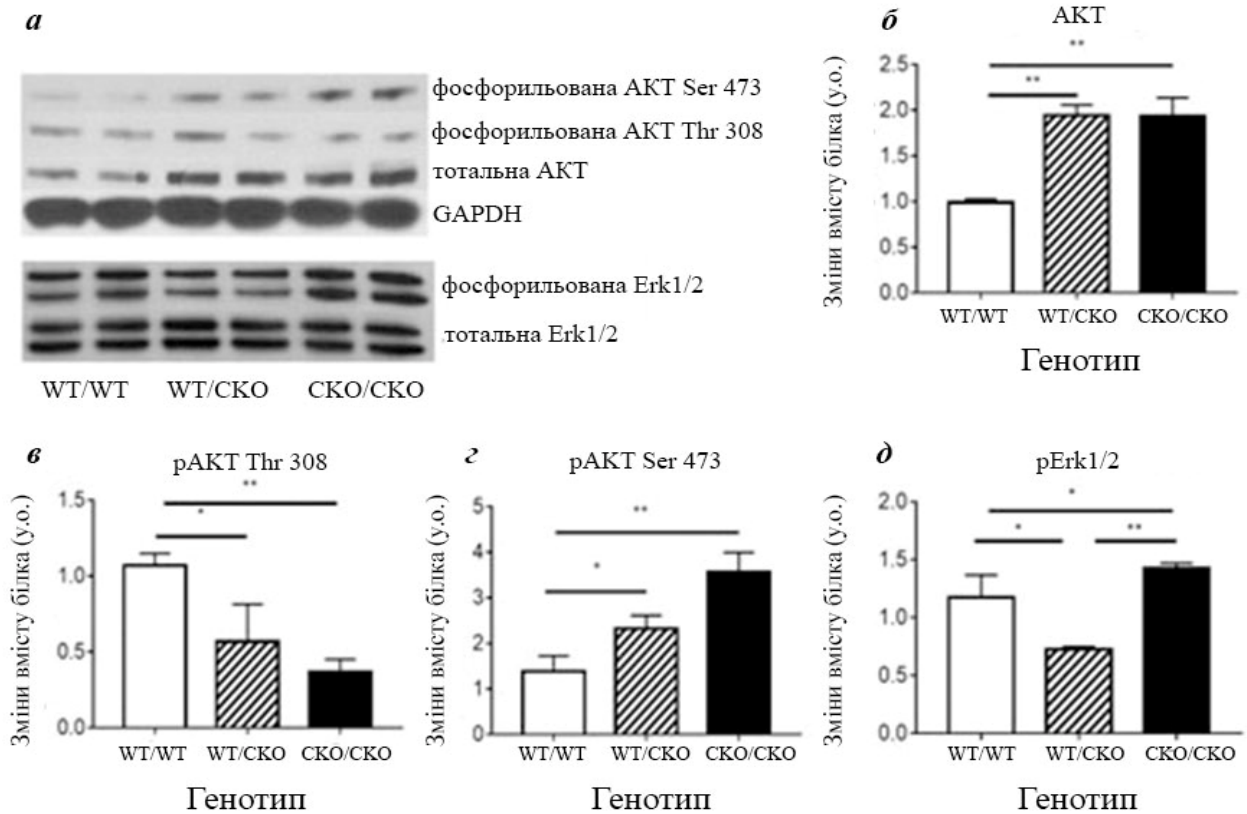


Рис. 21. Нокаут гена *Ctnn1* у призводить до порушень активності гіпертрофічних сигнальних каскадів. **а** – Типовий Вестерн-блот на вміст тотальних та фосфорильованих Erk1/2 та Akt. **б** – денситограма тотальної Akt нормалізована відносно Gapdh, **в** – денситограма фосфорильованої за Тре Akt нормалізована відносно тотальної Akt, **г** – денситограма фосфорильованої за Сер 473 Akt нормалізована відносно тотальної Akt, **д** – денситограма фосфорильованих Erk1/2 нормалізована відносно тотальних Erk1/2. □ - WT/WT, ▨ - WT/CKO, ■ - CKO/CKO. n = 5 у кожній групі. *p < 0.05, **p < 0.01 за допомогою ANOVA з *post hoc* тестом Тукея

Окрім того, у своїй роботі ми виявили накопичення нейтральних ліпідів у кардіоміоцитах мишей як із гомо-, так і з гетерозиготним нокаутом гена *Ctnn1*, про що свідчать результати забарвлення жиривим червоним O (рис. 22).

Оскільки серцева недостатність може супроводжуватися порушенням метаболізму ліпідів, а канонічний Wnt та Pi3K/Akt-сигнальні каскади здатні регулювати метаболізм у серці тварин (*Ahuja P et al, 2010, Clevers H, 2006*), то ми проаналізували активність його ключових регуляторів (AMPK, ACC, HSL та PPAR α) за умови нокауту *Ctnn1*.

У результаті нам вдалося виявити зниження вмісту PPAR α (транскрипційного фактора, який активує експресію генів, що залучені до катаболізму ліпідів) у лізатах сердець обох дослідних груп тварин вдвічі відносно контролю (рис. 23), що узгоджується з результатами гістологічного аналізу. Окрім того, ми виявили статистично достовірне інгібування активності ліпази, яка чутлива до гормонів

(HSL): вміст фосфорильованої HSL за серином 563 та серином 565 був статистично достовірно нижчим у тварин як із гомозиготним, так і з гетерозиготним нокаутом гена *Cttnal* (рис. 22).

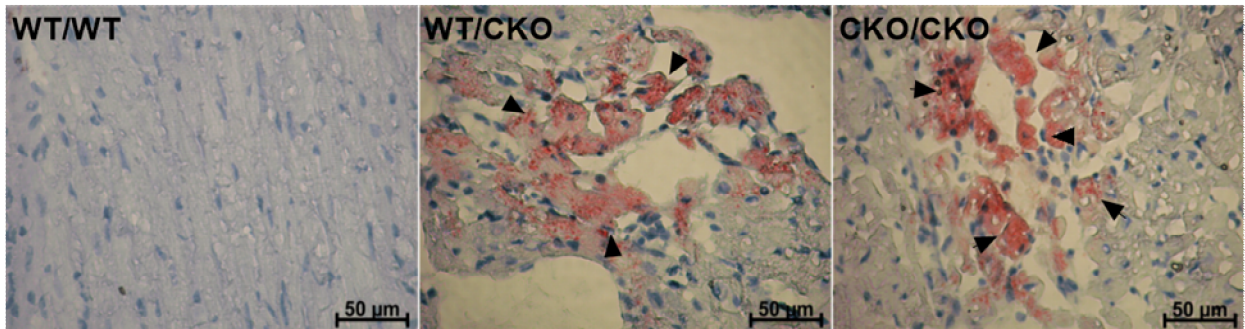


Рис. 22. Делеція гена *Cttnal* спричиняє накопичення нейтральних ліпідів у міокарді дорослих тварин. Забарвлення криозрізів тканини серця жировим червоним О. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші з гетерозиготною делецією *Cttnal*, CKO/CKO – миші з гомозиготною делецією *Cttnal*. Стрілки вказують на включення триацилгліцеридів у кардіоміоцитах. Лінійка 50 мкм. Збільшення 400^x

У цілому це свідчить про пригнічення активності HSL, яка лімітує швидкість гідролізу триацилгліцеридів. Тож зниження вмісту активної форми HSL свідчить про пригнічення гідролізу триацилгліцеридів і діацилгліцеридів, що узгоджується з їхнім накопиченням у міокарді. Також ми спостерігали підвищення вмісту тотальної AMPK у лізатах сердець тварин обох дослідних груп (рис.23).

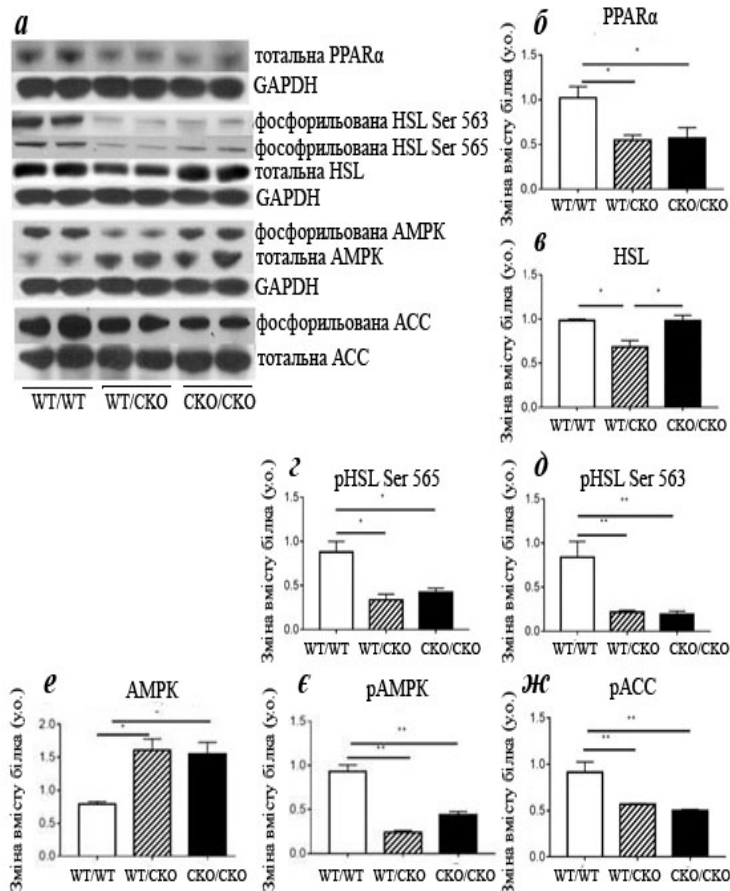


Рис. 23. Нокаут гена *Cttnal* у кардіогенезі (E10,5) спричиняє активність ключових регуляторів метаболізму ліпідів: **a** – Типовий Вестерн-блот, **б** – денситограма PPAR α нормалізована відносно Gapdh; **в** – денситограма тотальної HSL нормалізована відносно Gapdh; **г** – денситограма фосфорильованої за Сер 563 HSL нормалізована відносно тотальної HSL; **д** – денситограма фосфорильованої за Сер 565 HSL нормалізована відносно тотальної HSL; **е** – денситограма тотальної AMPK нормалізована відносно Gapdh; **є** – денситограма фосфорильованої AMPK нормалізована відносно тотальної AMPK; **ж** – денситограма фосфорильованої ACC нормалізована відносно тотальної ACC; n = 5 у кожній групі. □ - WT/WT, ▨ - WT/CKO, ■ - CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші з гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші з гомозиготною делецією α -Е-катеніну. *p < 0.05, **p <

0.01 за допомогою ANOVA з post hoc тестом Тукея

Проте, вміст фосфорильованої форми АМПК, навпаки, статистично достовірно знижувався у тварин з нокаутом гена *Cttnal*, в обох дослідних груп мишей (рис. 23). Це свідчить про пригнічення активності АМПК у тварин з нокаутом *Cttnal*. Пригнічення активності АМПК у серцях дослідних мишей узгоджується і з результатами аналізу вмісту її субстрату ацетил-СоА карбоксилази (АСС). Вміст фосфорильованої АСС був статистично достовірно нижчим у тварин як з гомозиготним, так і з гетерозиготним нокаутом гена *Cttnal*, порівнюючи з контрольними мишами (рис. 23). Останнє свідчить про активацію АСС і, як наслідок, порушення транспорту жирних кислот до мітохондрій.

Тож, нами показано, що нокаут гена *Cttnal* в ембріональних кардіоміоцитах (E10,5) призводить до накопичення ліпідів у міоцитах серця дорослих тварин та пригнічення β -окислення жирних кислот. З огляду на наші та літературні дані, ми припускаємо, що накопичення нейтральних ліпідів та порушення активності ферментів, що здійснюють їхній катаболізм є результатом нокауту гена *Cttnal*, та, як наслідок, є порушенням сигнальної функції його продукту – α -Е-катеніну. Оскільки зміни метаболізму нейтральних жирів, що описані в нашій моделі, не є типовими для серцевої недостатності, а спостерігаються у хворих на метаболічний синдром та/або діабет із серцевою недостатністю. На ґрунті наших даних нами запропоновано молекулярно-генетичний механізм розвитку серцевої недостатності при порушенні експресії/мутації гена *Cttnal* (рис. 24).

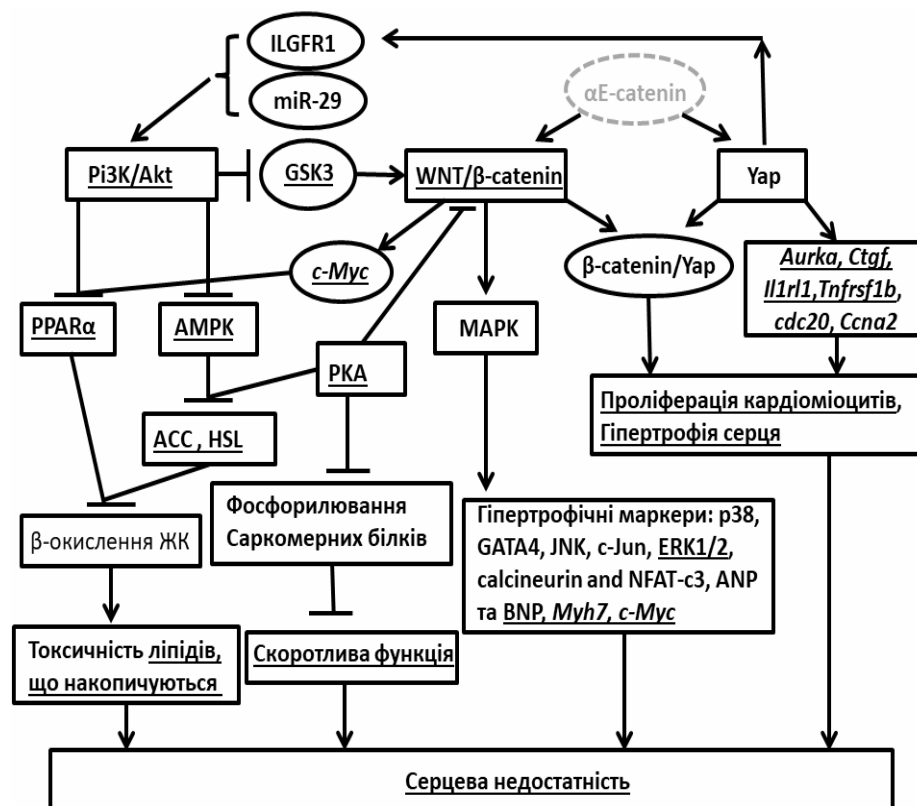


Рис. 24. Запропонована схема розвитку серцевої недостатності та порушення метаболізму серця за умови пригнічення чи повної відсутності експресії гена *Cttnal* у міокарді. Власні експериментальні дані підкреслено

Загалом наші результати вказують на те, що порушення експресії генів АК в ембріональному серці може бути одним із механізмів зміни його розвитку та функціонування.

ВИСНОВКИ

Пригнічення або повна відсутність експресії генів *Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1* спричиняє летальність тварин та молекулярно-генетичні патерни змін у міокарді дослідних мишей за рахунок порушення адгезивної та сигнально-регуляторної функції їхніх продуктів (N-кадгерину, α -Е-катеніну та β -катеніну відповідно). Тож порушення експресії генів *Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1* внаслідок мутації, можуть бути одним із молекулярно-генетичних механізмів виникнення патології серця.

1. Нами вперше показано, що N-кадгерин має критичне значення для формування ембріонального серця і гомозиготний нокаут його гена (*Cdh2*) в ембріональних кардіоміоцитах спричиняє летальність ембріонів (E10,5 - E12,5).

2. Цитоплазматичний партнер N-кадгерину β -катенін є необхідним для формування та розвитку міокарду після закладки першого та другого серцевих полів. Так, гомозиготний нокаут гена *Cttnb1* спричиняє летальність мутантних ембріонів на пізніх термінах гестації та новонароджених тварин (P1 – 3).

3. Уперше продемонстровано, що нокаут генів *Cttna1* та *Cttnb1* у кардіоміоцитах ембріонів (E10,5) спричиняє порушення проліферативної активності, термінальної диференціації кардіоміоцитів та розмірів міокарду в новонароджених мишей (P1-3).

4. Показано, що α -Е-катенін є супресором сигнальної функції ключових медіаторів канонічного Wnt та Нірро-сигнальних каскадів β -катеніну та Yap у серцях дорослих (10 місяців) та новонароджених тварин (P1-3).

5. Доповнено дані про роль канонічного Wnt сигналінгу в кардіогенезі, а саме показано його активацію в пізньому кардіогенезі (E14,5). Встановлено, що нокаут гена *Cttnb1* спричиняє порушення активності канонічного Wnt сигналінгу в серцях новонароджених (P1-2) та дорослих тварин (1, 3 та 6 місяців).

6. Уперше ідентифіковано сигнальну функцію γ -катеніну, його здатність регулювати транскрипційну активність канонічного Wnt сигналінгу і утворювати комплекс γ -катенін/TCF/LEF/ДНК, регулюючи рівень експресії генів *Axin2* та *c-Myc* у серці.

7. Сигнальна функція β -катеніну є необхідною умовою для адаптації міокарду до навантаження тиском та фізичними тренуваннями і активується на ранніх етапах ремоделювання дорослого серця (треть-сьома доба дії стресових факторів).

8. Нокаут однієї алелі гена *Cttnb1* спричиняє затримку розвитку атлетичного міокарду при тривалих фізичних навантаженнях, що, однак, супроводжується порушеннями експресії фетальних генів (*ANP*, *BNP* та α -MHC, пригніченням активності канонічного Wnt- та РКА сигнального каскаду; підвищенням активності MEK1-Erk1/2- та PI3K/Akt-кіназного сигнальних каскадів) у серцях таких тварин.

9. Нокаут гена *Cttnn1* у кардіогенезі (E10,5) спричиняє низку морфометричних, гістопатологічних і функціональних порушень типових для серцевої недостатності та призводить до ранньої летальності мишей (11 місяців).

10. Уперше показано, що нокаут гена *Cttnn1* у кардіоміоцитах ембріонів (E10,5) призводить до порушення активності сигнальних каскадів (PI3K/Akt-, MEK1-Erk1/2-сигналінгів) у серцях дорослих тварин (10 місяців), що є типовим для серцевої недостатності.

11. Уперше продемонстровано, що і повна, і часткова делеція гена *Cttnn1* у кардіоміоцитах ембріонів (E10,5) призводить до накопичення ліпідів у міоцитах серця дорослих тварин (10 місяців) внаслідок специфічних порушень метаболізму (зниження вмісту PPAR α , інгібування AMPK і HSL та активацію ACC).

СПИСОК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

- 1) Півень О. О., Костецький І.Є., Мацевич Л.Л., Коломієць Ю.М., Редіс Г., Лукаш Л. Л. Делеція гена N-кадгерину має критичне значення для ембріогенезу серця ссавців // Збірник наукових праць “Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики” Випуск 19. Київ-Луганськ 2010, С 374–380. (Особисто дисертантом проведено генотипування тварин, приготування парафінових зрізів ембріонів, ГЕ забарвлення та морфологічний аналіз, аналіз даних та написання статті).
- 2) Півень О. О., Мацевич Л. Л., Костецький І.Є., Редіс Г., Лукаш Л. Л. Роль N-кадгерин/катенінового комплексу у кардіогенезі ссавців // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ, ЛОГОС. – 2010. – том 9. – С. 429–433. (Особисто дисертантом проведено генотипування тварин, приготування парафінових зрізів ембріонів, ГЕ забарвлення та морфологічний аналіз, аналіз даних та написання статті).
- 3) Півень О. О. Зміни адгезивних комплексів у тканині міокарда як один з механізмів порушень функції серця // Український кардіологічний журнал. – 2010. – №.6 – С.110–117. (Дисертантом проведено аналіз та узагальнення наявних експериментальних даних, актуалізовано проблему).
- 4) Півень О. О. Міжклітинна адгезія у формуванні та функціонуванні серцево-судинної системи. Генетичні дефекти, що спричиняють вади розвитку та функціонування міокарда // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів – 2010 – том 8, № 2 – С. 320–33. (Дисертантом проведено аналіз та узагальнення наявних експериментальних даних, актуалізовано проблему).
- 5) Piven O., Kostetskii I, Macewicz L, Kolomijec Y, Radice G, Lukash L. Requirement for N-cadherin-Catenin Complex in Heart Development //Experimental Biology and Medicine. – 2011.– №6. – P.1–7. (Дисертантом виконано генотипування тварин, морфологічний та імуногістохімічний аналіз, аналіз даних та написання статті).
- 6) Palchevska O. L., V. V. Balatskii, A.O. Andrejeva, L. L. Macewicz, Piven O. O, Lukash L. L. Embryonically induced β -catenin haploinsufficiency attenuated postnatal heart development and caused the violation of foetal genes program expression // Biopolymers and Cell, 2013. Vol. 29. № 2. P. 124–130. (Особисто дисертантом

проведено планування експерименту, аналіз та узагальнення даних, написання статті, формування та генотипування експериментальних груп тварин, обрахунки даних ПЛР).

7) Piven O. O, Palchevska O. L, Lukash L. L. Role of Wnt/ β -catenin signaling in embryonic cardiogenesis, postnatal formation and reconstruction of myocardium // *Cytology and genetics*. – 2014. – 48 (5). – P. 333–343. (Дисертантом проведено аналіз та узагальнення наявних експериментальних даних, актуалізовано проблему, написання статті).

8) Пальчевська О. Л., Балацький В. В., Андреева А. О., Мацевич Л. Л., Півень О. О., Лукаш Л. Л. Дослідження активності канонічного Wnt-сигналіngu у тварин різного віку за умов ембріональної кардіоспецифічної делеції β -катеніну // *Цитологія та генетика*, – 2015. – 49(№ 1). – С. 10–17. (Дисертантом особисто проведено планування експерименту та аналіз і узагальнення отриманих даних, написання статті, генерація тварин різних вікових груп, ПЛР аналіз).

9) Пальчевська О. Л., Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Півень О. О., Лукаш Л. Л. Сигнальна функція β -катеніну при адаптації дорослого міокарду ссавців до фізичних навантажень // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2015. – Том 16. – С. 225–229. (Дисертантом особисто проведено планування експерименту та аналіз і обрахунки даних ПЛР аналізу, узагальнено отримані результати, написано статтю, також дисертант брала участь в експериментах із фізичного навантаження).

10) Palchevska O.L., Macewicz L.L, Piven O.O. A link between β -catenin and hypertrophy: Evaluation and meta-analysis// *Biopolymers and Cell*. – 2016. – 32(2). – P.150–157. (Дисертантом особисто проведено планування роботи, аналіз та обробку первинних літературних даних, обговорення та аналіз результатів Мета-аналізу, написання статті).

11) Півень О. О. Сигнальна функція β -катеніну важлива на початкових стадіях розвитку патологічної гіпертрофії дорослого серця // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2016. – том 14(1). – С. 44–51.

12) Пальчевська О. Л., Хазева А. А., Мачушинець Н. В., Рубан Т. П., Мацевич Л. Л., Півень О. О. Вплив делеції гена β -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії // *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 2016. – Т.18. – С. 242–47. (Дисертантом особисто проведено планування роботи, виділення і культивування клітин, генотипування, аналіз і обробку первинних даних, написання статті).

13) Пальчевська О. Л., Хазева А. А., Мачушинець Н. В., Балацький В. В, Рубан Т. П., Мацевич Л. Л., Півень О. О. Гетерозиготна делеція гену β -катеніну у ранньому кардіогенезі спричиняє затримку росту новонародженого серця і порушує кінетику канонічного WNT сигналіngu. // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2017. – Т. 20. – С84–89 (Дисертантом особисто проведено планування роботи, виділення білка та аналіз змін вмісту білків, аналіз і обробку первинних даних, написання статті).

14) Пальчевська О. О., Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Півень О. О. Кардіоспецифічна делеція гену β -катеніну пов'язана із порушеннями активності сигнальних каскадів, залучених до розвитку гіпертрофії міокарду. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2017. – Т. 15(2). – С.181–186. (Дисертантом особисто

проведено планування роботи, виділення білка та аналіз змін вмісту білків, аналіз і обробку первинних даних, написання статті).

15) Bortnichuk L.I., Myronova A.O., Avramets D.S., Balatskyi V.V., Macewicz L.L., Piven O. O. Canonical Wnt-Signaling Activity During the Athletic Heart Formation// *Experimental and clinical physiology and biochemistry*, ЕСПВ. – 2018. – 3(83). – С. 33–39. (Дисертантом особисто проведено планування роботи, виділення білка та аналіз змін вмісту білків, генотипування тварин, морфологічний та гістологічний аналіз, обробку даних, написання статті).

16) Balatskyi V. V., Ruban T. P., Macewicz L. L., Piven O. O. Cardiospecific knockout of α E-catenin leads to violation of the neonatal cardiomyocytes' maturation via β -catenin and Yap signalling // *Biopolym. Cell* – 2017. – Vol. 33. (№ 6) – P. 434–441. (Дисертантом заплановано експериментальну роботу, проведено аналіз та узагальнення даних, написання статті, виділення та культивування клітин, ПЛР аналіз).

17) Балацький В. В., Акименко І., Мацевич Л. Л., Півень О. О., Лукаш Л. Л. Альфа-Е-катенін у гістологічних перебудовах міокарда при старінні // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2016. – Т. 18. – С. 219–222. (Особисто дисертантом проведено планування експерименту, аналіз та узагальнення даних, написання статті, морфологічні дослідження та гістологічне забарвлення).

18) Балацький В. В., Пальчевська О. Л., Мацевич Л. Л., Півень О. О. α -Е-катенін потенційний регулятор канонічного Wnt та HIPPO- сигналінгів у міокарді // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2016. – Т. 14. (№ 2) – С. 168–173. (Особисто дисертантом проведено планування експерименту, аналіз та узагальнення даних, написання статті, ПЛР аналіз).

19) Piven O.O., Winata C. L. The canonical way to make a heart: β -catenin and plakoglobin in heart development and remodeling // *Experimental Biology and Medicine*. – 2017. – 242 (18). – P. 1735–1745. (Дисертантом проведено аналіз та узагальнення наявних експериментальних даних, актуалізовано проблему, сформульовано гіпотезу).

20) Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Півень О. О. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє зменшення експресії основного компонента десмосом γ -катеніну // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2017. – Т. 21. – С. 293–296. (Особисто дисертантом заплановано експериментальну роботу та проаналізовано отримані дані, проведено генотипування тварин, ПЛР та Вестерн блот).

21) Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Півень О. О. Кардіоспецифічна делеція гена α -Е-катеніну призводить до порушення метаболізму ліпідів дорослого серця // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій* – 2017. – Т. 22. (№ 2). – С. 65–68. (Особисто дисертантом проведено планування роботи та узагальнення отриманих даних, робота з тваринами, аналіз вмісту білків написання роботи).

22) Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Півень О. О. Активність гіпертрофічних сигнальних шляхів у серці регулюється α -Е-катеніном // *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки* – 2017. – Т. 20. (№ 2). – С. 42–48. (Особисто дисертантом проведено дослідження рівня білків).

- 23) Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Півень О. О. Кардіоспецифічна ембріональна делеція гена α -Е-катеніну призводить до гіпертрофії серця у дорослих мишей // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2018. – Випуск 77. – С. 62–69. (Дисертантом було заплановано експериментальну роботу, проведено аналіз експресії генів та морфологічний аналіз, узагальнення отриманих даних, написання статті).
- 24) Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Рубан Т. П., Півень О. О. Білки-компоненти комплексів міжклітинної адгезії залучені до проліферації та розміру неонатальних кардоіміоцитів MUS MUSCULUS//Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2018. – Т. 16(1).– С. 5–11. (Дисертантом особисто заплановано експериментальну роботу, проведено аналіз морфології та ПЛР, проведено узагальнення результатів та написання статті).
- 25) Balatskyi V V, Macewicz LL, Gan AM, Goncharov SV, Pawelec P, Portnichenko GV, Lapikova-Bryginska TYu, Navrulin VO, Dosenko VE, Olichwier A, Dobrzyn P, Piven OO. Cardiospecific deletion of α E-catenin leads to heart failure and lethality in mice// Pflügers Archiv – European Journal of Physiology. – 2018. – Vol.470(10). – P.1485–1499. (Автор ідеї дослідження та плану експерименту, аналіз отриманих даних, узагальнення та написання статті, вестерн блоти, приготування парафінових та кріоблоків і зрізів тканини).
- 26) Півень О. О. Оптимізація методу ChIP для дослідження регуляції генів-мішеней канонічного ВНТ сигналіngu у новонародженому серці // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2018. – Т. 22. – С.169–175.
- 27) Piven O., Mazewich L., Lukash L., Kostetskii I., G Radice. N- cadherin-mediated adhesion in early heart development // European Journal of clinical Investigation. – 2008 – Vol.38 (1). – P. 40.
- 28) Piven O. Requirement for N-cadherine-Catenin Complex in Cardiogenesis // EMBL Conference Stem Cells, Tissue Homeostasis and Cancer, 12–15 May 2010, EMBL Heidelberg, Germany.
- 29) Piven O., Kostetskii I, Macewicz L, Y, Radice G, Lukash L. B-catenin function in embryonic and postnatal heart formation //VII Parnas Conference, Warsaw, Poland, August 27–31. – 2011 – P. 43.
- 30) Piven O., Kostetskii I, Macewicz L, Y, Radice G, Lukash L. Beta-catenin is requirement for adult heart development// Actin-Based Motility: From Molecules to Model Organisms, 28 жовтня – 2 листопада, Стресса, Італія 2011, P 121.
- 31) Андреева А. О., Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Півень О.О., Лукаш Л. Л. Структурна функція β -катеніну у післянатальному розвитку міокарду. Матеріали Х міжнародної конференції студентів та молодих науковців “Шевченківська весна 2012: Біологічні науки”. 19 – 23 березня, Київ 2012, 38–39 с.
- 32) Балацький В. В., Андреева А. О., Мацевич Л. Л., Півень О. О., Лукаш Л. Л. Сигнальна функція β -катеніну у післянатальному розвитку та при старінні міокарду. Матеріали VIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ БІОЛОГІЇ”. 3–6 квітня, Львів 2012, 278 – 279 с.
- 33) Palchevska O. L., Balatskii V.V., Andreeva A. O., Macewicz L. L., Piven O. O., Lukash L. L. Embryonically induced cardiospecific b-catenin deficiency leads to violation

of adult heart grows and fetal genes expression. Tavrisheskiy Medico-Biologicheskii Vestnik. 2013, Vol 3, N 6. – P. 243.

34) Пальчевська О. Л., Балацький В. В., Андреева А. О., Мацевич Л. Л., Лукаш Л. Л. Ембріональна кардіоспецифічна делеція одного алелю β -катеніну призводить до зміни сигнальної активності Wnt/ β -катеніну у дорослому міокарді VI International Conference of Young Scientists: Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution. 13–17 May, 2013 – Odesa, p. 158–159.

35) Palchevska O. L., Balatskii V.V., Andreeva A.O., Macewicz L. L., Piven O. O., Lukash L. L Monitoring the postnatal heart development under the conditional knock-out of one allele of beta-catenin in cardiomyocytes. 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics “BIO 2014”. – 9–12 September, 2014 – Warsaw, p. 174.

36) Palchevska O. L., Macewicz L., Piven O. O., Lukash L. L. Embryonically induced cardiospecific β -catenin haploinsufficiency attenuated postnatal heart development and leads to violation of fetal program expression EMBO/EMBL Symposium Cardiac Biology: From Development to Regenerative Medicine, 7–10 June, 2013. – Heidelberg, p. 131.

37) Palchevska O. L., Balatskyi V., Piven O. O., Macewicz L. The requirement of beta-catenin in heart maturation and stress adaptation Conference for Young Scientists CYS-2015 – 21–25 September 2015 – Kyiv, p. 74.

38) Balatskyi V. V, Palchevska O. L., Macewicz L., Ruban T., Piven O.O, Lukash L. L. Alpha-E-catenin signaling function in cardiomyocytes proliferation/ 1st Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv. – 2015.

39) Balatskyi V. V, Palchevska O. L., Macewicz L., Piven O. O. Lukash L. L. Loss of alpha-e-catenin in embryonic heart leads to dramatic malformation of adult heart // X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. Kyiv. – 2016.

40) Balatskyi V. V, Palchevska O. L., Macewicz L., Gan A. M., Goncharov S., Pawelec P., Portnichenko G., Lapikova-Bryginska T., Navrulin V., Dosenko V., Dobrzyn P., Piven O. O. Alpha-E-catenin gene ablation leads to heart failure // X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. Kyiv. – 2017.

41) Vaskyvskyy V., Balatskyi V., Macewicz L., Ruban T., Piven O. Alpha-E-catenin in neonatal cardiomyocytes size regulation // Joint Meeting of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv.

АНОТАЦІЯ

Півень О.О. **Порушення експресії генів адгеринового комплексу в міокарді як молекулярний механізм розвитку деяких патологій серця.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – «молекулярна генетика». – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

Дисертація присвячена з'ясуванню ролі генів адгеринового комплексу: *Cdh2*, *Cttnb1* та *Cttna1* та їхніх продуктів (білків N-кадгерину, β -катеніну та α -Е-катеніну відповідно) у кардіогенезі та функціонуванні дорослого серця, дослідженню участі продуктів генів *Cttnb1* та *Cttna1* у регуляції активності сигнальних систем кардіоміоцитів (WNT/ β -катенінового, Hippo-, Pi3K/Akt-, MAPK-, цАМФ/РКА-сигнальних каскадів), а відповідно і їхньої участі в контролюванні проліферативної активності і термінальної диференціації неонатальних кардіоміоцитів.

У результаті виконання роботи були отримані фундаментальні дані, котрі значно доповнюють та розширюють сучасні знання та уяву про роль генів адгеринового комплексу: *Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1* і функцію їхніх продуктів, білків N-кадгерину, α -Е-катеніну та β -катеніну відповідно, в кардіогенезі, формуванні та функціонуванні серця дорослих тварин.

Ґрунтуючись на результатах дослідження ми висунули гіпотезу згідно якої гени адгеринового комплексу (*Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1*) мають критичне значення для нормального розвитку та функціонування серця. Пригнічення (чи порушення) експресії генів *Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1* спричиняють летальність та молекулярно-генетичні патерни змін міокарду у мишей за рахунок порушення адгезивної та регуляторної функції їхніх продуктів (N-кадгерину, α -Е-катеніну та β -катеніну відповідно). Ймовірно, мутації генів *Cttna1* та *Cttnb1* у людей, також можуть бути асоційованими з порушеннями розвитку та функціонування серця.

Ключові слова: кардіогенез, міжклітинна адгезія, кадгерин-катеніновий комплекс, N-кадгерин, β -катенін, α -Е-катенін, *Cdh2*, *Cttnb1*, *Cttna1*, канонічний Wnt сигналінг, HIPPO сигналінг, гіпертрофія, міокард.

АННОТАЦІЯ

Пивень О.А. Нарушение экспрессии генов адгеринового комплекса в миокарде как механизм развития некоторых патологий сердца. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертація на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019 год.

Диссертація посвящена выяснению роли генов адгеринового комплекса: *Cdh2*, *Cttnb1* и *Cttna1* и их продуктов (белков N-кадгерина, β -катенина и α -Е-катенина соответственно) в кардиогенезе и функционировании сердца, исследованию участия продуктов генов *Cttnb1* и *Cttna1* в регуляции активности сигнальных каскадов кардиомиоцитов (WNT/ β -катенинового-, Hippo-, Pi3K/Akt-, MAPK-, РКА-сигнальных каскадов), и их участие в контроле пролиферативной активности и терминальной дифференциации неонатальных кардиомиоцитов.

В результате проведения работы были получены фундаментальные данные, которые значительно дополняют и расширяют современные знания и представления о роли генов адгеринового комплекса: *Cdh2*, *Cttna1* и *Cttnb1* и функции их продуктов, белков N-кадгерина, α -Е-катенина и β -катенина, в кардиогенезе, формировании и функционировании сердца взрослых животных.

Основываясь на результатах исследования, мы предложили гипотезу, согласно которой гены адгеринового комплекса (*Cdh2*, *Cttna1* и *Cttnb1*) имеют критическое значение для нормального развития и функционирования сердца. Подавление (или нарушение) экспрессии генов *Cdh2*, *Cttna1* и *Cttnb1* вызывают летальность и молекулярно-генетические паттерны изменений миокарда у мышей за счет нарушения адгезивной и регуляторной функции их продуктов (N-кадгерина, α -Е-катенина и β -катенина соответственно). Вероятно, мутации генов *Cttna1* и *Cttnb1* у людей, также могут быть ассоциированными с нарушениями развития и функционирования сердца.

Ключевые слова: кардиогенез, межклеточная адгезия, кадгерин-катениновый комплекс, N-кадгерин, β -катенин, α -Е-катенин, *Cdh2*, *Cttnb1*, *Cttna1*, канонический Wnt сигналинг, HIPPO сигналинг, гипертрофия, миокард.

SUMMARY

Piven O.O. Violation of the adherin complex genes expression in the myocardium as a molecular mechanism of some heart pathologies development. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for the Degree of Doctor of Biological Sciences, Speciality 03.00.22 – Molecular Genetics. Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv – 2019.

The thesis is devoted to the analysis of the role of the genes of the adherin complex: *Cdh2*, *Cttnb1* and *Cttna1* and their products (N-cadherin, β -catenin and α -E-catenin proteins, respectively) in cardiogenesis and adult heart functioning, the study of the participation of *Cttnb1* and *Cttna1* genes in the regulation of the activity of cardiomyocyte signaling systems (WNT / β -catenin, Hippo, Pi3K / Akt-, MAPK-, PKA-signaling cascades) and, accordingly, their participation in control of proliferative activity and terminal differentiation of neonatal cardiomyocytes.

It has been shown for the first time that homozygous knockout of the *Cdh2* gene in embryo cardiomyocytes causes a violation of the formation of myocardial tissue, delayed embryo development and leads to lethality of embryos (E10.5 - E12.5) due to the violation of the adhesive function of its product, the transmembrane protein of N-cadherin.

The study has established that cytoplasmic partners of N-cadherin, β -catenin and α -E-catenin are involved in the formation of intercellular adhesion and in controlling of the size and proliferative activity of myocytes. Thus, the homozygous knockout of the *Cttnb1* gene encoding beta-catenin induced lethality of the mutant embryos in late gestation and in newborn animals (P1-3). Both the hetero- and homozygous knockout of the *Cttnb1*

gene caused the inhibition of proliferative activity of neonatal cardiomyocytes, an increase in their size and a decrease in the size of the hearts in newborn animals (P1-2). On the contrary, the knockout of the *Cttna1* gene in embryo cardiomyocytes led to hyperplasia - an increase in the rate of proliferation and a decrease in the size of neonatal cardiomyocytes and increased cardiac mass in newborn mice (P1-2). The inhibition of terminal differentiation of cardiomyocytes caused the knockout of the *Cttna1* gene and the *Cttnb1* gene.

It has been found that homozygous knockout of the *Cttnb1* gene leads to inhibition of the activity of the canonical Wnt cascade in the hearts of newborn (P1-2) animals: a decrease in the content of phosphorylated GSK3 β , which possibly causes their mortality. The heterozygous knockout of the *Cttnb1* gene also causes a malfunction of the Wnt / β -catenin cascade, in particular in the hearts of newborn mice - increase of its activity: increasing the content of phosphorylated GSK3 α / β , and expression of the *TCF4*, *Axin2*, *c-Fos* and *CyclinD1* genes; and in the hearts of adult animals - oppression: reduced expression of the *TCF4* and *c-Myc* genes, the content of active β -catenin, increased content of skeletal proteins APC and Axin1. Also, with the *Cttnb1* knockout and suppression of Wnt / β -catenin signaling, increased activity of Pi3K / Akt signaling (increase in the content of phosphorylated ACT for threonine 308 and serine 473) and MAPK signaling (increase in the content of phosphorylated ERK1 / 2) was observed in the hearts of adult animals.

We have specified the function of the canonic Wnt cascade in the formation of a hypertrophic response, using the Meta-analysis, revealed a relationship between expression of β -catenin and hypertrophy, proved conservatism of the molecular mechanisms of hypertrophy. Using the model of chronic hypertension (AngII infusion) and athletic myocardium, it has been shown that the activation of the signaling function of β -catenin is a necessary condition for adaptation of the heart to endurance training and occurs in the early stages of remodeling of adult myocardium (3 days under the influence of hypertrophic stimuli, and 7 days at physical activity)

It has been shown for the first time that heterozygous knockout *Cttnb1* causes delayed athletic myocardial development during prolonged physical activity, which is accompanied by increased expression of fetal genes (*ANP*, *BNP*) and adult myosin (α -MHC) and excessive activation of MAPK, PI3-kinase signaling in the hearts of such animals.

The present study has demonstrated for the first time that the knockout of the *Cttnb1* gene results in an increase in the expression of its homologue γ -catenin (Jup) in the myocardium of newborn mice. The latter is able to participate in the regulation of the activity of the canonical Wnt signaling cascade (regulates the expression of *Axin2* and *c-Myc*). However, the signaling function of γ -catenin alone is not sufficient to ensure the formation and function of the myocardium.

It has been shown that both heterozygous and homozygous cardiac-specific knockout *Cttna1* causes the activation of the Wnt / β -catenin signaling cascade, both in cardiomyocytes of newborn (P1-2) and adult (10 months) of animals. Also, the product of *Cttna1* gene (α -E-catenin protein) in modulating the transcriptional activity of the main mediator of the Hippo signaling pathway-Yap has been established. Increased expression of the target genes of Yap: *Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b* with *Cttna1* knockout was shown.

It has been demonstrated for the first time that the knockout of *Cttna1* in cardiogenesis results in the development of heart failure, and as a consequence, premature mortality of animals (11 months), accompanied by significant histopathological disorders ("wavy" cardiomyocytes, cardiomyocytes with hyperorexinophilic cytoplasm, substitution and perivascular fibrosis).

It has been found that both hetero- and homozygous knockout of *Cttna1* results in an increase in the activity of Pi3K / Akt signaling (increasing the content of phosphorylated AKT according to serine 473), MAPK cascade violation and inhibition of the cAMP / PKA signaling cascade (decrease in the content of phosphorylated PKA).

This study has established that knockout of *Cttna1* gene causes a violation of the molecular mechanisms regulating the metabolism of lipids in the heart. Namely, inhibition of β -oxidation of fatty acids (decrease in the content of active AMPK, inhibition of phosphorylation of HSL and increase in the content of active ACS, decrease in PPAR α) and, consequently, accumulation of neutral lipids in the hearts of mutant animals has been shown.

As a result of this study, a series of fundamental data was obtained, which greatly supplements and extends the current knowledge and understanding of the role of the genes of the adherin complex: *Cdh2*, *Cttna1* and *Cttnb1* as well as the functions of their products, N-cadherin, α -E-catenin and β -catenin proteins, in cardiogenesis, the formation and functioning of the heart of adult animals.

On the basis of the results of the study, a hypothesis according to which the genes of the adhereine complex (*Cdh2*, *Cttna1* and *Cttnb1*) have critical significance for normal development and functioning of the heart is proposed. The inhibition (or excitation) of the expression of the *Cdh2*, *Cttna1*, and *Cttnb1* genes causes lethality and molecular genetic patterns of myocardial changes in the experimental mice due to the violation of the adhesive and regulatory function of their products (N-cadherin, α -E-catenin and β -catenin, respectively). *Cttna1* and *Cttnb1* gene mutations in humans may also be associated with impaired cardiac development and function.

Key words: cardiogenesis, cells adhesion, cadherin-catenin complex, N-cadherin, β -catenin, α -E-catenin, *Cdh2*, *Cttnb1*, *Cttna1*, canonical Wnt signaling, HIPPO signaling, hypertrophy, myocardium.