

ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНТИКИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПІВЕНЬ ОКСАНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 575+576.52+577+616.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПОРУШЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ АДГЕРИНОВОГО КОМПЛЕКСУ У
МІОКАРДІ ЯК МОЛЕКУЛЯРНИЙ МЕХАНІЗМ РОЗВИТКУ ДЕЯКИХ
ПАТОЛОГІЙ СЕРЦЯ**

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.О. Півень

Науковий консультант Лукаш Любов Леонідівна, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Півень О.О. Порухення експресії генів адгеринового комплексу у 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.

Уперше показано, що гомозиготний нокаут гена *Cdh2* в ембріональних кардіоміоцитах спричиняє порушення формування тканини міокарду, затримку розвитку ембріону і призводить до летальності ембріон – трансмембранного білка N-кадгерину.

Встановлено, що цитоплазматичні партнери N-кадгерину: β -катенін та α -Е-катенін беруть участь в утворенні міжклітинної адгезії і в контролюванні розмірів та проліферативної активності міоцитів. Так, гомозиготний нокаут гена *Cttnb1*, що кодує β -катенін, спричиняв летальність мутантних ембріонів на пізніх термінах гестації та новонароджених тварин (P1 – 3). І гетеро-, і гомозиготний нокаут гена *Cttnb1* породжував пригнічення проліферативної активності неонатальних кардіоміоцитів, збільшення їхніх розмірів та зменшення розмірів сердець у новонароджених тварин (P1-3). Показано, що нокаут гена *Cttna1* в ембріональних кардіоміоцитах, навпаки, спричиняв

гіперплазію – підвищення темпу проліферації та зменшення розмірів неонатальних кардіоміоцитів і збільшення маси серця в новонароджених мишей (P1-3). Пригнічення термінального диференціювання кардіоміоцитів спричиняли нокаут і гена *Cttna1* і гена *Cttnb1*.

З'ясовано, що гомозиготний нокаут гена *Cttnb1* призводить до пригнічення активності канонічного Wnt-каскаду в серцях новонароджених (P1-3) тварин: зниження вмісту фосфорильованої GSK3 β . Гетерозиготний нокаут гена *Cttnb1* також спричиняє порушення функціонування Wnt/ β -катенінового каскаду, а саме у серцях новонароджених мишей – підвищення його активності: збільшення вмісту фосфорильованих GSK3 α/β , та експресії генів *TCF-4*, *Axin2*, *c-Fos* і *CyclinD1*; а у серцях дорослих тварин – пригнічення: зниження експресії генів *TCF4* та *c-Myc*, вмісту активного β -катеніну, підвищення вмісту скефолдних білків APC та *Axin1*. Також, за умови нокауту *Cttnb1* та пригнічення Wnt/ β -катенінового сигналіну, в серцях дорослих тварин спостерігали підвищення активності РіЗК/Akt сигналіну (зростання вмісту фосфорильованої АКТ за треоніном 308 і серином 473) та MAPK сигналіну (збільшення вмісту фосфорильованих ERK1/2).

Нами було уточнено функцію канонічного Wnt-каскаду у формуванні гіпертрофічної відповіді, за допомогою Мета-аналізу показано зв'язок експресії β -катеніну та гіпертрофії, виявлено консервативність молекулярних механізмів гіпертрофії. Із застосуванням моделі хронічної гіпертензії (інфузія AngII) та атлетичного міокарду показано, що активація сигнальної функції β -катеніну є необхідною умовою адаптації серця до навантажень і відбувається на ранніх етапах ремоделювання дорослого міокарду (3 доби при дії гіпертрофічних стимулів та 7 діб при фізичному навантаженні).

Уперше продемонстровано, що гетерозиготний нокаут *Cttnb1* спричиняє затримку розвитку атлетичного міокарду при тривалих фізичних навантаженнях, що супроводжується підвищенням експресії фетальних генів (*ANP*, *BNP*), міозину дорослого серця (α -MHC) та надмірною активацією MAPK, РіЗК/Akt- сигналінів у серцях таких тварин.

Уперше показано, що нокаут гена *Ctnnb1* зумовлює підвищення експресії його гомологу γ -катеніну (*Jup*) у міокарді новонароджених мишей. Останній здатний брати участь у регулюванні активності канонічного Wnt сигнального каскаду (регулює експресію *Axin2* та *c-Myc*). Однак сигнальної функції γ -катеніну не достатньо для забезпечення формування і функціонування міокарду.

Показано, що і гетерозиготний, і гомозиготний кардіоспецифічні нокаути *Ctnna1* спричиняють активацію Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду як у кардіоміоцитах новонароджених (P1-3), так і дорослих (10 місяців) тварин. Також встановлено участь продукту гена *Ctnna1* (білка α -Е-катеніну) у модуляції транскрипційної активності основного медіатора Hippo-сигнального шляху – Yarp. Виявлено підвищення експресії генів-мішеней Yarp: *Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b* за умови нокауту *Ctnna1*.

Уперше показано, що нокаут *Ctnna1* у кардіогенезі спричиняє розвиток серцевої недостатності і, як наслідок, передчасної летальності тварин (11 місяців), що супроводжується значними гістопатологічними порушеннями ("хвилясті" кардіоміоцити, кардіоміоцити з гіпереозинофільною цитоплазмою, замісний та периваскулярний фіброз).

Виявлено, що і гетеро-, і гомозиготні нокаути *Ctnna1* викликають підвищення активності Pi3K/Akt-сигналіngu (підвищення вмісту фосфорильованої АКТ за серином 473), порушення MAPK-каскаду та пригнічення цАМФ/РКА-сигнального каскаду (зменшення вмісту фосфорильованої РКА).

Встановлено, що нокаут гена *Ctnna1* спричиняє порушення молекулярних механізмів, що регулюють метаболізм ліпідів у серці. Зокрема показано інгібування β -окислення жирних кислот (зменшення вмісту активної АМПК, пригнічення фосфорилування HSL та підвищення вмісту активної АСС, зниження рівня PPAR α), та, як наслідок, накопичення нейтральних ліпідів у серцях мутантних тварин.

У результаті проведення роботи отримано низку фундаментальних даних, які значно доповнюють та розширюють сучасні знання та уявлення щодо ролі генів адгеринового комплексу: *Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1* та функцій їхніх продуктів, білків N-кадгерину, α -Е-катеніну та β -катеніну, в кардіогенезі, формуванні та функціонуванні серця дорослих тварин.

На ґрунті результатів дослідження 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 дослідних 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 функціонуванням 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.

Список публікацій здобувача

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.

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.

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.
4. Півень О.О. Міжклітинна адгезія у формуванні та функціонуванні серцево-судинної системи. Генетичні дефекти, що спричиняють вади розвитку та функціонуванні міокарда//Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів – 2010– том 8, № 2 – с.320 – 333.
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.
6. Palchevska O.L., V. V. Balatskii, A.O. Andrejeva, L.L. Macewicz, Piven OO, 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.
7. OO Piven, OL Palchevska, LL Lukash. Role of Wnt/ β -catenin signaling in embryonic cardiogenesis, postnatal formation and reconstruction of myocardium//Cytology and genetics.- 2014. - 48 (5). – P. 333-343.
8. Пальчевська О.Л., Балацький В.В., Андрєєва 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.
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.
10. Palchevska O.L., Macewicz L.L, Piven O.P. A link between β -catenin and hypertrophy: Evaluation and meta-analysis// Biopolymers and Cell.- 2016. - 32(2). – P.150-157.

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., Хазєва А.А., Мачушинець Н.В., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Півень О.А. Вплив делеції гена β -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії//Фактори експериментальної еволюції організмів, 2016. – Т.18. - С. 242-247.

13. Пальчевська О.Л., Хазєва А.А., Мачушинець Н.В., Балацький В.В., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Півень О.А. Гетерозиготна делеція гену β -катеніну у ранньому кардіогенезі спричиняє затримку росту новонародженого серця і порушує кінетику канонічного WNT сигналіngu// Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. - Т20. – С84 - 89

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. - том 15(2). – С.181 – 186.

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.

16. V. V. Balatskyi, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, O. O. Piven. 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.

17. В. В. Балацький, І. Акименко, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень, Л. Л. Лукаш. Альфа-Е-катенін у гістологічних перебудовах міокарда при старінні// Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 18. – С. 219-222.

18. В. В. Балацький, О. Л. Пальчевська, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень. 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.

19. O.O Piven, CL Winata. 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.

20. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє зменшення експресії основного компонента десмосом γ -катеніну//*Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2017. – Т. 21. – С. 293-296.

21. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень. 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.

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

23. В. Балацький, Л. Мацевич, О. Півень 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.

24. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, Т. П. Рубан, О. О. Півень Білки-компоненти комплексів міжклітинної адгезії залучені до проліферації та розміру неонатальних кардіоіміоцитів MUS MUSCULUS//*Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2018. - том 16(1).– С.5-11.

25. V V Balatskyi, LL Macewicz, AM Gan, SV Goncharov, P Pawelec, GV Portnichenko, TYu Lapikova-Bryginska, VO Navrulin, VE Dosenko, A Olichwier, P Dobrzyn, OO Piven. 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.

26. О.О. Півень. 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. O.Piven, L. Mazewich, L. Lukash, I. Kostetskii, G Radice N-cadherin-mediated adhesion in early heart development// European Journal of clinical Investigation. – 2008 – Vol.38 (1). – P.40.

28. O.Piven Requirement for N-cadherine-Catenin Complex in Cardiogenesis// EMBL Conference Stem Cells, Tissue Homeostasis and Cancer, 12-15 May 2010, EMBL Heidelberg, Germany.

29. O.Piven , 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. O.Piven , Kostetskii I , Macewicz L , 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., Балацкий 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. 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

34. Балацький В.В., Пальчевська О.Л., Мацевич Л.Л., Півень О.О. Ембріональна кардіоспецифічна делеція альфа-Е-катеніну призводить до активації експресії генів-мішеней HIPPO-сигналіngu, Актуальні питання розвитку біології та екології. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції (3-7 жовтня 2016 р., м.Вінниця) – с.19-22

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., L. Macewicz, Piven O.O., L. Lukash Embrionically 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., Balatskyy 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. V. Balatskyi, O. Palchevska, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven, L. Lukash V. 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. V. V. Balatskyi, O. L. Palchevska, L. L. Macewicz, O. O. Piven, L. L. Lukash. Loss of alpha-e-catenin in embrionic 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. V. Balatskyi, O. Palchevska, L. Macewicz, A. M. Gan, S. Goncharov, P. Pawelec, G. Portnichenko, T. Lapikova-Bryginska, V. Navrulin, V. Dosenko, P.

Dobrzyn, O. Piven 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. V. Vaskyvskyy, V. Balatskyi, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven 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.

SUMMARY

Piven O.O. Violation of the adherin complex genes expression in the myocardium as a molecular mechanism of some heart pathologies development. – Manuscript.

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 *Ctnnb1* 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 *Ctnnb1* 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 *Ctnnb1* gene.

It has been found that homozygous knockout of the *Ctnnb1* 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 *Ctnnb1* 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 *Ctnnb1* 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 canonical 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 *Ctnnb1* 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 *Ctnnb1* 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 *Cttnn1* 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 *Cttnn1* 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 *Cttnn1* knockout was shown.

It has been demonstrated for the first time that the knockout of *Cttnn1* 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 *Cttnn1* 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 adherein 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.

List of Publications

1. Півень О.О, Костецький І.Є., Мацевич Л.Л., Коломієць Ю.М., Редіс Г., Лукаш Л.Л. Делеція гена N-кадерину 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.

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.

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.

4. Півень О.О. Міжклітинна адгезія у формуванні та функціонуванні серцево-судинної системи. Генетичні дефекти, що спричиняють вади розвитку та функціонуванні міокарда//Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів – 2010– том 8, № 2 – с.320 – 333.

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.

6. Palchevska O.L., V. V. Balatskii, A.O. Andrejeva, L.L. Macewicz, Piven OO, 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.

7. OO Piven, OL Palchevska, LL Lukash. Role of Wnt/ β -catenin signaling in embryonic cardiogenesis, postnatal formation and reconstruction of myocardium//Cytology and genetics.- 2014. - 48 (5). – P. 333-343.

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.

9. Пальчевська О.Л., Балацький В.В., Мацевич Л.Л., Півень О.О., Лукаш Л.Л. Сигнальна функція β -катеніну при адаптації дорослого міокарду

савців до фізичних навантажень//Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. -Том 16. – С. 225-229.

10. Palchevska O.L., Macewicz L.L, Piven O.P. A link between β -catenin and hypertrophy: Evaluation and meta-analysis// Biopolymers and Cell.- 2016. - 32(2). – P.150-157.

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., Хазєва А.А., Мачушинець Н.В., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Півень О.А. Вплив делеції гена β -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії//Фактори експериментальної еволюції організмів, 2016. – Т.18. - С. 242-247.

13. Пальчевська О.Л., Хазєва А.А., Мачушинець Н.В., Балацький В.В., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Півень О.А. Гетерозиготна делеція гену β -катеніну у ранньому кардіогенезі спричиняє затримку росту новонародженого серця і порушує кінетику канонічного WNT сигналінгу.// Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. - Т20. – С84 - 89

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. - том 15(2). – С.181 – 186.

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, ECPB. - 2018. - 3(83). – С. 33–39.

16. V. V. Balatskyi, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, O. O. Piven. 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.

17. В. В. Балацький, І. Акименко, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень, Л. Л. Лукаш. Альфа-Е-катенін у гістологічних перебудовах міокарда при старінні// Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 18. – С. 219-222.
18. В. В. Балацький, О. Л. Пальчевська, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень. 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.
19. O.O Piven, CL Winata. 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.
20. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє зменшення експресії основного компонента десмосом γ -катеніну//Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – Т. 21. – С. 293-296.
21. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень. 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.
22. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень. Активність гіпертрофічних сигнальних шляхів у серці регулюється α -Е-катеніном// Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки – 2017. – Т. 20. (№ 2). – С. 42-48.
23. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень. 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.
24. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, Т. П. Рубан, О. О. Півень Білки-компоненти комплексів міжклітинної адгезії залучені до проліферації та

розміру неонатальних кардоіміоцитів MUS MUSCULUS//Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2018. - том 16(1).– С.5-11.

25. V V Balatskyi, LL Macewicz, AM Gan, SV Goncharov, P Pawelec, GV Portnichenko, TYu Lapikova-Bryginska, VO Navrulin, VE Dosenko, A Olichwier, P Dobrzyn, OO Piven. 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.

26. О.О. Півень. 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. O.Piven,L. Mazewich, L. Lukash, I. Kostetskii, G Radice N- cadherin-mediated adhesion in early heart development// European Journal of clinical Investigation. – 2008 – Vol.38 (1). – P.40.

28. O.Piven Requirement for N-cadherine-Catenin Complex in Cardiogenesis// EMBL Conference Stem Cells, Tissue Homeostasis and Cancer, 12-15 May 2010, EMBL Heidelberg, Germany.

29. O.Piven , 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. O.Piven , Kostetskii I , Macewicz L , 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., Балацкий В.В., Мацевич Л.Л., Півень О.О., Лукаш Л.Л. Структурна функція β -катеніну у післянатальному розвитку міокарду. Матеріали X міжнародної конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: Біологічні науки». 19 – 23 березня, Київ 2012, 38 – 39 с.

32. Балацкий 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. 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

34. Балацький В.В., Пальчевська О.Л., Мацевич Л.Л., Півень О.О. Ембріональна кардіоспецифічна делеція альфа-Е-катеніну призводить до активації експресії генів-мішеней HIPPO-сигналіну, Актуальні питання розвитку біології та екології. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції (3-7 жовтня 2016 р., м.Вінниця) – с.19-22

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., L. Macewicz, Piven O.O., L. Lukash Embrionically 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., Balatskyu 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. V. Balatskyi, O. Palchevska, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven, L. Lukash V. 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. V. V. Balatskyi, O. L. Palchevska, L. L. Macewicz, O. O. Piven, L. L. Lukash. Loss of alpha-e-catenin in embrionic 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. V. Balatskyi, O. Palchevska, L. Macewicz, A. M. Gan, S. Goncharov, P. Pawelec, G. Portnichenko, T. Lapikova-Bryginska, V. Navrulin, V. Dosenko, P. Dobrzyn, O. Piven 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. V. Vaskyvskyy, V. Balatskyi, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	26
ВСТУП	29
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	42
1.1 Організація та структура інтеркалярних дисків	42
1.1.1 Адгеринний комплекс	43
1.1.2 Десмосоми	47
1.1.3 Порів'яз'єднання	49
1.2 Мутації генів ІД та патології серця	52
1.3 Участь білків ІД у регулюванні сигнальних каскадів клітини	55
1.3.1 Канонічний Wnt сигналінг та сигнальна функція β -катеніну	56
1.3.2 Участь γ -катеніну у регулюванні активності каноїчного Wnt сигналінгу	60
1.3.3 Канонічний Wnt сигналінг та α -катенін	62
1.3.4 NIPPO-сигнальний каскад та участь α -катеніну у його регулюванні	65
1.3.5 Сигнальна активність інших білків ІД	67
1.4 Сигнальна регуляція кардіогенезу та перебудов серця	68
1.4.1 Кардіогенез та його сигнальна регуляція	68
1.4.2 Канонічний Wnt та NIPPO сигнальні каскади у дорослому міокарді	73
1.5 Дослідження функції генів АК у розвитку та функціонуванні міокарду	76
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	80
2.1. Матеріали та обладнання	80
2.1.1. Біологічні матеріали	80
2.1.2. Реактиви	81
2.1.3. Застосовані праймери	81

2.1.4. Обладнання	85
2.2. Опис тварин, та схем схрещування, використаних при проведенні дослідження	86
2.2.1. Експериментальні моделі	86
2.2.2. Схеми схрещувань трансгенних тварин	88
2.2.3. Генотипування тварин	91
2.3. Аналіз особливостей кардіогенезу за умови делеції досліджуваних генів	92
2.4. Виділення та культивування неонатальних кардіоміоцитів	92
2.5. Морфологічний аналіз кардіоміоцитів <i>in vitro</i>	93
2.6. Аналіз проліферативної активності неонатальних кардіоміоцитів	94
2.7. Вивчення постнатального розвитку серця тварин за умови нокауту досліджуваного гена	95
2.8. Мета-аналіз відтворюваних молекулярних маркерів гіпертрофії	95
2.9. Індукція гіпертрофії	97
2.10. Моделювання атлетичного міокарду	97
2.11. Дослідження кардіогемодинамічних показників	99
2.12. Проведення морфометричного аналізу	100
2.13. Проведення гістологічних та імуногістохімічних досліджень	100
2.14. Аналіз змін експресії генів за допомогою ПЛР в реальному часі	104
2.15. Аналіз вмісту білків за допомогою Вестерн-блоту	105
2.16. Хроматинімунопреципітація (ChIP)	106
2.17. Статистична обробка даних	109
РОЗДІЛ 3 КАДГЕРИН-КАТЕНІНОВИЙ КОМПЛЕКС У	110
КАРДІОГЕНЕЗИ ТА НЕОНАТАЛЬНОМУ СЕРЦІ	
3.1. Дослідження функції генів адгеринового комплексу у кардіогенезі	112
3.1.1. Нокаут гена <i>Cdh2</i> у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє порушення кардіогенезу та призводить до летальності ембріонів	112

3.1.2. Делеція гена <i>Cttnn1</i> у клітинах серця ембріонів не	115
призводить до порушень кардіогенезу та ембріогенезу	
3.1.3. Нокаут гена <i>Cttnb1</i> у ембріональному серці не спричиняє	119
виражених морфологічних вад але призводить до пізньої	
ембріональної летальності	
3.2. Дослідження ролі цитоплазматичних партнерів N-кадгерину у	122
неонатальному міокарді.	
3.2.1. Аналіз контролю проліферації та розміру кардіоміоцитів	123
серцець новонароджених тварин білками-компонентами	
комплексів міжклітинної адгезії	
3.2.2. Делеція цитоплазматичних партнерів N-кадгерину пригнічує	128
визрівання постнатальних кардіоміоцитів	
3.2.3. Нокаут гена <i>Cttnn1</i> спричиняє порушення активності	131
канонічного Wnt – та HIPPO сигнальних каскадів у неонатальних	
кардіоміоцитах	
3.2.4. Делеція гена <i>Cttnb1</i> у ембріональних кардіоміоцитах	133
призводить до порушень активності канонічного Wnt сигналіngu у	
серцях ембріонів і новонароджених мишей	
3.3. Вивчення особливостей регулювання активності канонічного	140
Wnt сигналіngu у кардіоміоцитах за умови нокауту гена <i>Cttnb1</i>	
РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ КАНОНІЧНОГО WNT	148
СИГНАЛЬНОГО КАСКАДУ В РОЗВИТКУ ТА	
РЕМОДЕЛЮВАННІ МІОКАРДУ	
4.1. Дослідження ефекту гетерозиготного нокауту гена <i>Cttnb1</i> у	149
постнатальному міокарді	
4.1.1. Аналіз формування постнатального міокарду за умови	149
гетерозиготної делеції гена <i>Cttnb1</i> у ембріональних кардіоміоцитах	
4.1.2. Дослідження активності канонічного Wnt сигнального	155
каскаду у міокарді дорослих тварин за умови гетерозиготної делеції	
гена <i>Cttnb1</i> у ембріональних кардіоміоцитах	

4.2	Дослідження ролі Wnt/ β -катенінового сигналіngu у гіпертрофічному ремоделюванні серця	160
4.2.1	Мета-аналіз молекулярних маркерів гіпертрофії і їхнього зв'язку зі змінами експресії β -катеніну	162
4.2.2	Аналіз сигнальної функції β -катеніну на початкових стадіях розвитку патологічної гіпертрофії серця	167
4.2.3	Вивчення активності канонічного Wnt сигналіngu при формуванні атлетичного міокарду	176
4.3.	Аналіз особливостей формування атлетичного міокарду за умови гетерозиготного нокауту гена <i>Ctnnb1</i> у ембріональних кардіоміоцитах	181
4.3.1.	Аналіз розвитку атлетичного міокарду у тварин із делецією гена <i>Ctnnb1</i> при тривалому фізичному навантаженні	182
4.3.2.	Дослідження активності канонічного Wnt сигналіngu у тварин при тривалому фізичному навантаженні за умови гетерозиготного нокауту гена <i>Ctnnb1</i>	190
4.3.3.	Аналіз активності сигнальних каскадів залучених до розвитку гіпертрофії у серцях тварин із гетерозиготною делецією гена <i>Ctnnb1</i>	194
РОЗДІЛ 5 ВИВЧЕННЯ ФУНКЦІЇ α-Е-КАТЕНІНУ В РОЗВИТКУ ТА ФУНКЦІОНУВАННІ МІОКАРДУ ЗА УМОВИ НОКАУТУ ГЕНА <i>Ctnna1</i>		201
5.1.	Аналіз впливу гомо- і гетерозиготного нокауту гена <i>Ctnna1</i> на постнатальний розвиток серця та тривалість життя тварин	202
5.1.1.	Дослідження тривалості життя тварин із гетеро- та гомозиготною делецією гена <i>Ctnna1</i> у ембріональних кардіоміоцитах	202
5.1.2.	Вивчення ремоделювання серця дорослих тварин за умови гетеро- та гомозиготного нокауту гена <i>Ctnna1</i>	204
5.2.	Дослідження гемодинамічної функції серця за умови делеції	209

гена <i>Cttnn1</i>	
5.3. Дослідження сигнальної функції α -Е-катеніну за умови нокауту його гена	214
5.3.1. Дослідження активності канонічного WNT сигналінгу у серцях тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена <i>Cttnn1</i>	215
5.3.2. Аналіз активності HIPPO сигналінгу у серцях тварин із нокаутом гена <i>Cttnn1</i>	219
5.4. Вивчення впливу гетеро- та гомозиготного нокауту гена <i>Cttnn1</i> на активність гіпертрофічних сигнальних каскадів у серцях мишей	221
5.5. Дослідження метаболізму ліпідів у серцях тварин із делецією гена <i>Cttnn1</i>	224
5.5.1. Аналіз окислення ліпідів у серцях дорослих мишей за умови нокауту гена <i>Cttnn1</i>	225
5.5.2. Дослідження активності основних регуляторів метаболізму нейтральних ліпідів у серцях тварин за умови нокауту гена <i>Cttnn1</i>	228
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	234
ВИСНОВКИ	262
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	264
ДОДАТОК А	288
ДОДАТОК Б	296
ДОДАТОК В	297
ДОДАТОК Г	298
ДОДАТОК Д	299

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AЗ – адгеринові з'єднання

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЗТ-ПЛР – зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція

ІД – інтеркалярні диски

МС/МТ – індекс співвідношення маси серця (мг) до маси тіла (г)

МС/ДГ – індекс співвідношення маси серця (мг) до довжини гомілки (мм)

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ССЗ – серцево-судинні захворювання

Сер – серин

Тре – треонін

ФБС – фетальна бича сироватка

ФСБ – фосфатний сольовий буфер

АКТ (Akt) – protein kinase B (протеїнкіназа B (протеїнкіназа, споріднена до протеїнкіназ A та C))

ANP – A-type natriuretic peptide (натрійуретичний пептид типу A)

АМПК – 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (протеїн кіназа, що активується 5'-аденозин монофосфатом)

APC – adenomatous poliposus coli

ARVC – аритмогенна кардіоміопатія правого шлуночку

β -cat – β -catenin

β -МНС – β -form of myosin heavy chains (β -форма важкого ланцюга міозина)

BMP – bone morphogenic proteins

BNP – B-type natriuretic peptide (натрійуретичний пептид B)

BW – body weight (маса тіла)

СКО/СКО – conditional knock out/conditional knock out (умовний нокаут/умовний нокаут, тварини із гомозиготною делецією)

Cx43 – connexin 43 (конексин 43)

DMEM – Dulbecco`s modified Eagle Medium (мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбеко)

Dvl – білок Dishelved

ERK1/2 – extracellular signal–regulated kinases (кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами)

FGF – fibroblast growth factor (фактор росту фібробластів)

FHF - Перше серцеве поле

Fz – білок Frizzled

GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа)

GSK – glycogen-syntase-kinase (кіназа глікогенсинтази)

HIPPO – Про-протеїнкіназний сигнальний шлях

HSL – hormone sensitive lipase (ліпаза, що чутлива до гормонів)

HW – heart weight (маса серця)

JNK – c-Jun N-terminal kinases (c-Jun N-термінальна кіназа)

Lrp – low-density lipoprotein receptor-related protein (білки, споріднені з рецепторами до ліпопротеїнів низької щільності)

MAPK – mitogen-activated protein kinases (протенкіназа, що активується мітогеном)

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (3-(4,5-диметилтіазоліл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід)

Na₂EDTA – disodium ethylenediaminetetraacetate (динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти)

PI3K – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат 3-кіназа)

PKA – protein kinase A, cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (протеїн кіназа А, протеїн кіназа, що залежить від циклічного аденозинмонофосфату)

PKC – protein kinase C (протеїн кіназа С)

PPAR α – peroxisome proliferator-activated receptor alpha (α рецептор, що активується проліфератором перексисом)

SCD – раптова кардіальна летальність

SHF – друге серцеве поле

Ser – serine (умовне позначення амінокислоти серин)

sFRP – secreted frizzled-related protein (секреторні білки, споріднені з білками Frizzled)

TAC – transverse aortic constriction (перетискання аорти)

TCF/LEF – T-cell factor/ Lymphoid enhancer-binding factor

TCF4 – T-cell factor 4

Thr – threonin (умовне позначення амінокислоти треонін)

UTR – untranslated region

wg - wingless

Wnt – wingless

WT/CKO – wild type/conditional knock out (дикий тип/умовний нокаут, тварини із гетерозиготною делецією)

WT/WT – wild type/wild type (тварини дикого типу, контрольні тварини)

α -MHC – α -form of myosin heavy chains (α -форма важкого ланцюга міозина)

ВСТУП

Актуальність проблеми. Згідно зі статистикою ВООЗ Україна посідає перше місце серед країн Європи і друге у світі в рейтингу смертності від серцево-судинних захворювань [281]. Так, в нашій країні, серцево-судинні захворювання (ССЗ) є причиною 67% усіх смертей [282]. Фактично кожен другий українець стикається із ССЗ. За даними Держслужби статистики лише у 2016 році від ССЗ померло 392 тисячі українців [282]. 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 [254]. 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 [234].

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 кодують 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 [176]. Останній складається із трансмембранного білка N-кадгерину та його цитоплазматичних партнерів: β -катеніну та α -катеніну [242].

Порушення організації ІД досить часто спостерігається при патологіях міокарду і розглядаються переважно як наслідок виникнення та прогресування хвороби [25]. 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 [126]. 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 *Cttnb1*, є основним транскрипційним ко-фактором такого важливого регулятора клітинного циклу, росту та поділу клітин як канонічний Wnt-сигналінг [225]. 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 [192]. Достеменно невідома участь цього сигнального каскаду та його основного ко-фактора β -катеніну в регулюванні пізнього кардіогенезу, формуванні та розвитку постнатального міокарду та ремодулюванні серця в дорослому організмі. Дослідженню цих проблем присвячено багато робіт, однак односпайної думки стосовно ролі β -катеніну в регулюванні зазначених процесів донині не існує [192].

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 [243]. Це надзвичайно важлива знахідка для розуміння біології серця, оскільки ці каскади регулюють ріст, проліферацію та розміри кардіоміоцитів, розмір серця та його метаболізм [273,45,209]. Однак, функція гена *Cttna1* 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 [195]. Розвиток дилатаційної кардіоміопатії, аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка, дефекти перегородки є наслідками мутацій гена *Cttna3*, продуктом якого є компонент АК – α -Т-катенін [35, 48, 40, 112]. 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 [143]. 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 -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 *Cttnn1* 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 *Cttnn1*.

4. Встановити роль канонічного Wnt сигналінгу 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 *Cttnn1* в ембріональних кардіоміоцитах.

7. Вивчити активність сигнальних каскадів залучених до розвитку патологій міокарду в серцях дорослих мишей із нокаутом гена *Cttnn1*.

8. Проаналізувати вплив нокауту гена *Cttnn11* в ембріональних кардіоміоцитах на метаболізм нейтральних ліпідів у серцях дорослих тварин.

Об'єкт дослідження: кардіогенез, постнатальний міокард, фетальні гени, канонічний Wnt сигналінг, Yap залежна транскрипція, метаболізм серця, АМПК, PPAR α , Pi3K/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 *Cttnn1*.

Методи дослідження: умовний генетичний нокаут під контролем специфічного серцевого промотора (α -MHC) для делеції досліджуваних генів, молекулярно-генетичні (виділення ДНК та РНК, полімерзана ланцюгова

реакція (ПЛР), зворотно транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР) в реальному часі, хроматинімунопреципітація з послідуною ЗТ-ПЛР (ChIP-ЗТ-ПЛР), молекулярно-біологічні (Вестерн-блот), імуногістохімічні, гістологічні (гематоксилін-еозинове (ГЕ) забарвлення, три хром-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, одно факторний дисперсійний аналіз із post hoc тестом Тукея та Холма-Сідака, тест Краскела-Уолліса із post hoc тестом Дана, лог-ранговий тест, метод Калан-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-сигналілгу 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 *Ctnnb1*, 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 -*MHC*). 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-myc*, 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 сигнальній 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 *Cttnnb1* 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 *Cttnn1*.

Запропоновано і обґрунтовано гіпотезу, згідно з якою пригнічення експресії генів *Cdh2*, *Cttnn1* 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*, *Cttnn1* та *Ctnnb1*, внаслідок мутації, можуть бути одним із молекулярно-генетичних механізмів розвитку патології серця. Імовірно, мутації генів *Cttnn1* та *Ctnnb1* у людей також можуть бути асоційованими з порушеннями розвитку та функціонування серця.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані свідчать про критичну функції 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*, *Cttnn1* та *Ctnnb1*) та порушеннями розвитку серця у ссавців на прикладі модельних тварин. Результати дослідження вказують на те, що мутації генів (*Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttnn1*) 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 *Cttnn1* 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-судиних 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 кріо-зрізів; 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 Досенко В.Є., д.м.н., професору Томасу Брауну, д.б.н., професору Павлу Добжину та д.б.н Сесилії Віната. 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 Regio

Інституту молекулярної та клітинної біології Польща д.б.н. Сесилії Вінаті за допомоги 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 допомоги 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 Досенко В.Є. за допомоги 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Серце – це перший орган, що формується у ембріогенезі і функціонує протягом усього життя. І формування міокарду, під час ембріонального розвитку і функціонування його пізніше, вимагає чіткої урегульованості міжклітинної адгезії та комунікації. У серці, міжклітинна адгезія забезпечується інтеркалярними дисками (ІД) – складними і жорстко врегульованими структурами, що сполучають між собою кардіоміоцити. Але функція та значення ІД для роботи серця набагато складніша, оскільки саме ІД забезпечують швидке розповсюдження електричного сигналу серцем, дозволяють кардіоміоцитами витримувати механічні навантаження пов'язані із скорочувальною функцією серця. Тож, саме завдяки ІД міокард функціонує як єдиний синцитій і електрично і механічно. Окрім того, ІД тісно пов'язані із актиновим цитоскелетом і через це, залучені, також, і до регулювання активності сигнальних каскадів клітини. Усе разом, це свідчить про виняткову важливість ІД для нормального функціонування міокарду.

1.1 Організація та структура інтеркалярних дисків

Згідно класичних уявлень ІД складаються із трьох основних комплексів: порові з'єднання (ПЗ), адгериновий комплекс (АК), та десмосоми. Порові з'єднання відповідальні за ефективну комунікацію між кардіоміоцитами, забезпечують генерацію та передачу електричного імпульсу у тканині міокарда. Адгериновий комплекс (або адгеринові з'єднання) забезпечують сильну

міжклітинну адгезію, і формуються білками кадгерин-катенінового комплексу. Десмосоми забезпечують структурну підтримку за допомогою взаємодії десмосомальних кадгеринів із системою філаменту.

АК разом із десмосомами також називають «областю композита», або «гібридні з'єднання» пізніше це визначення було розширене і окрім АК та десмосом сюди почали відноситись ПЗ разом із іонними каналами. Із застосуванням методів електронної мікроскопії АК та десмосоми були виявлені як одна структура електричної щільності. Пізніше було встановлено, що до складу області композита входять кадгерини, DSP, α - і β -катеніни, Vcl, p120 і ZO-1, і афадін, проте локалізація останнього є все ще дискусивною [241].

Окрім того, до структури ІД входять і деякі білки, що не приймають участі, безпосередньо у утворенні міжклітинних контактів, наприклад іонні канали [51] у той же час, деякі ділянки мембрани взагалі не містять білків [19].

Варто також зауважити, що дослідження із використанням бази даних «атлас білків людини» (<http://www.proteinatlas.org>), та бази даних про зв'язування білків ExPASy (<http://ca.expasy.org/sprot/>) а також аналіз опублікованих робіт свідчать про те, що близько 200 білків пов'язані із ІД [60], більш того порушення та/або зміна експресії близько 40% із ідентифікованих наразі білків спостерігається при різних захворюваннях серця у пацієнтів [60]. У своєму огляді ми зупинимося лише на структурі лише основних компонентів ІД, а також їхній адгезивній і сигнальній функціях та зв'язку із патологіями серця.

1.1.1 Адгериновий комплекс. Саме адгериновий комплекс забезпечує міцну міжклітинну адгезію. АК, можна назвати, головним молекулярним якорем для міофібрил, він поєднує актинові філаменти сусідніх клітин і таким чином дозволяє клітинам зберігати форму при механічному навантаженні [17]. Основний компонент АК, це трансмембранний і Ca^{2+} -залежний білок – кадгерин. Кадгерини були описані та охарактеризовані близько 40 років тому двома незалежними групами вчених, які досліджували механізми міжклітинної

адгезії при ранньому морфогенезі [60, 50, 121]. Нині, у людини відомо вже більше ніж 30 білків – членів цієї родини, проте, функція деяких з них й досі не з'ясована.

Як добре відомо, більшість видів клітин експресують декілька типів кадгеринів; так наприклад, скелетні м'язи експресують R-, M- та N-кадгерини. У кардіоміоцитах експресується лише один класичний кадгерин – N-кадгерин, що кодується геном *Cdh2*. Останній експресується на високому рівні як в серцях ембріональних, так і дорослих організмів, де він локалізується в ІД та в місцях тісного контакту сусідніх кардіоміоцитів [118]. Як відомо, для кадгеринів характерний гомофільний тип взаємодії, а саме: кадгерини своїм екстрацелюлярним доменом взаємодіють із іншими кадгеринами того ж типу, нагадуючи своєю взаємодією «блискавку». Внутрішньоклітинний домен класичних кадгеринів має сайти зв'язування з катенінами (рис. 1.1), які і забезпечують зв'язок кадгеринів та актинового цитоскелету клітини. Таким чином і забезпечується ефективна комунікація між кардіоміоцитами [68,75,114,116,117,118,127,168, 241] (рис 1.1).

Отже, N-кадгерин безпосередньо взаємодіє із β -катеніном, останній через зв'язок із α -катеніном та вінкуліном сполучає АК із актиновим цитоскелетом. Варто зауважити, що N-кадгерин у своєму цитоплазматичному домені має зв'язувальний сайт не лише для β -катеніну а й його гомолога – γ -катеніну (або плакоглобіну). Останній, є класичним компонентом десмосом, але через свою високу гомологію до β -катеніну здатен підтримувати утворення та структуру і АК [33]. Тож один і той самий АК може містити у своїй структурі як β -катенін так і γ -катенін. До того ж, обидва білки мають приймають участь у функціонування деяких сигнальних каскадів, що буде детально розглянуто нижче.

Окрім β -катеніну та γ -катеніну (продукти генів *CTNNB1* та *JUP* відповідно) до класичних компонентів АК належать і α -катеніни. Вперше білки цієї родини були ідентифіковані при проведенні аналізу структури класичного адгеринового комплексу методом імунопреципітації [183]. Наразі відомо, що

незважаючи на назву, цей білок до родини катенінів не належить, а має високу гомологію із вінкуліном [46,92]. Нині виявлено три ізоформи α -катеніну: α -Е-, α -N- та α -Т-катеніни, усі кодуються різними генами. Проте, у серці експресується лише два α -катеніни: α -Т- та α -Е-катеніни, що кодуються генами *CTNNA3* та *CTNNA1* відповідно, і характеризуються високим ступенем гомології [103]. Однак, було з'ясовано, що α -Т-катенін конститутивно взаємодіє із актином у мономерній формі, тоді як α -Е-катенін - у гомодимерній формі [251]. Тож, гетеродимер α -Т-катенін/ β -катенін забезпечує міцність АК у тканині серця зв'язуючи N- кадгерин/ β -катеніновий білковий комплекс із цитоскелетом клітини [251].

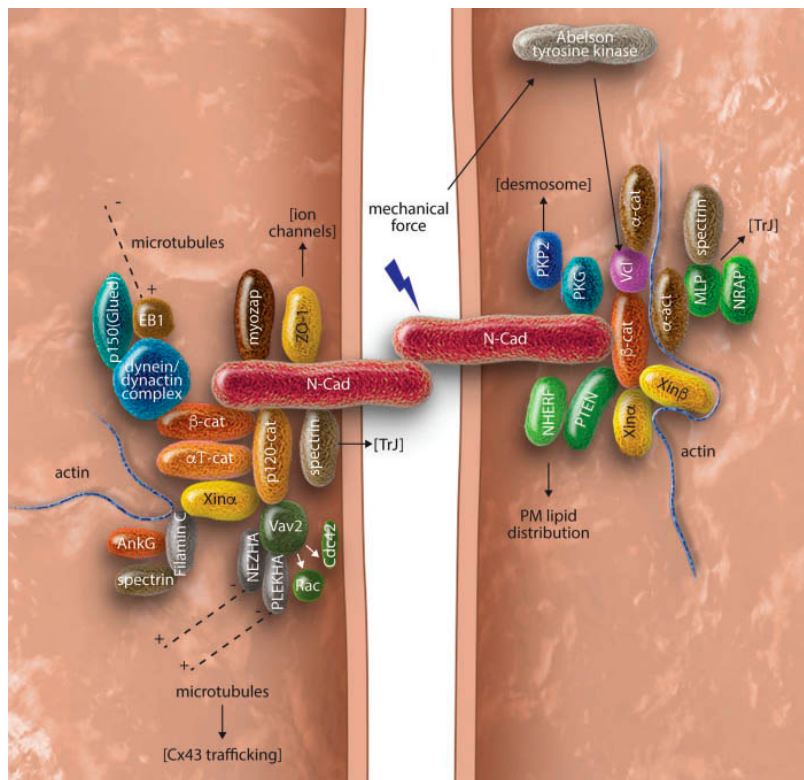


Рис.1.1. Загальна схема адгериновно комплексу, наведено основні та асоційовані білки. Зв'язок АК з іншими комплексами ІД показано пунктиром, сигнальні шляхи- стрілочками

Напротивагу α -Т-катеніну, α -Е-катенін, є механосентором і забезпечує стабільність та міцність міжклітинної адгезії при зростанні навантаження.

[135,137]. Окрім того, було з'ясовано, що α -Е-катенін приймає участь у сигнальній регуляції клітини, на відміну від його гомолога - α -Т-катеніну.

Інший член родини катенінів, білок p120 (або p120-катенін) також взаємодіє безпосередньо із цитоплазматичним доменом N-кадгерину із примембранною його ділянкою. У такий спосіб, p120 регулює адгезію і форму клітин шляхом зв'язування із гуанін-нуклеотидним фактором обміну Vav2, який, у свою чергу, активує сімейство Rho ГТФа з: Rac1 і Cdc42 [247]. Також p120 зв'язується з білками PLEKHA7 та Nezha, що забезпечують контакт із мінусовим кінцем мікротрубочок, тож у такий спосіб p120 поєднує АК із мікротрубочками.

Окрім класичних компонентів, структуру АК підтримують і деякі асоційовані білки, а саме: вінкулін, який ми вже згадували вище, PTEN, спектрин (spectrin), кортактин (cortactin), білки Xin: hXina та hXinb.

Вінкулін, у структурі ІД зв'язується із β -катеніном, та сполучає його із актином, але на відміну від β -катеніну, вінкулін рівномірно експресується по усій поверхні клітинної мембрани. У латеральній мембрані (ЛМ) вінкулін пов'язує костамер із актином через зв'язування із інтегрином [19,271]. Білок PTEN, також відіграє важливу роль у підтриманні структури АК та комунікації АК із клітинною мембраною. PTEN безпосередньо взаємодіє із β -катеніном та з NHERF (фактор регулюючий обмін протонів натрію). Таким чином PTEN сприяє поляризованому розподілу ліпідів на внутрішньому шарі плазматичної мембрани [74].

Білок спектрин, на відміну від попередніх асоційованих із АК компонентів, взаємодіє безпосередньо із N-кадгерином, утворюючи тетрамери для зв'язування із дистальними кінцями актинового філаменту. Кортактин, актин-зв'язувальний білок, також взаємодіє із N-кадгерином, вірніше, у кооперації із ним він регулює реорганізацію та міцність зчеплення актину. А саме утворюючи комплекси із Arp2 (актин пов'язаний білок 2) та Arp3 (актин пов'язаний білок 3) він регулює належну функцію актину, його полімерізацію та розгалуження [250].

Білки групи X_{in}, названі так на честь китайського слова – серце, hX_{ina} та hX_{inb} також асоційовані із АК. Мишачі онтологи цих білків досліджені значно краще білків людини, так показано, що білок mX_{ina} має у своїй структурі домен зв'язування із β -катеніном, тоді як mX_{inb} - із p120, через що вважається, що основна функція білків X_{in} – це утворення стабільного зв'язку між АК та актином. Окрім того, білки X_{in}, взаємодіють із філаміном, білком, що «зшиває» актин, рекрутуючи до цієї взаємодії і катеніни - p0071 та p120. Вважається, що така взаємодія може впливати на активність Vav2 та Ect2, які у свою чергу регулюють родину малих ГТФаз Rac1 та Rho і це може мати важливе значення у кардіогенезі [241]. Експериментальні роботи, також демонструють, що у серці мишей, mX_{ina} безпосередньо взаємодіє із ZO-1 та /або Sx43 [247,248], про що свідчать порушення ПЗ у серцях мишей із дефіцитом mX_{ina}. У серцях тварин, дефіцитних за mX_{inb}, спостерігали порушення формування ІД, тож ймовірно, mX_{inb} залучено до регулювання N-кадгерин опосередкованого сигналіngu [247].

Варто також нагадати, що АК не лише «склеює» кардіоміоцити разом, цей тип міжклітинної адгезії впливає і на жорсткість сусідніх клітин за рахунок механосенсорних кадгеринів. Механічне навантаження на кадгерини спричиняє зміни у організації саркомер, форми клітин та їхньої жорсткості. Навантаження передається α -актиніну, що спричиняє зміни його конформації після чого він рекрутує Vcl із області костамерів [267]. Також, показано, що механічне навантаження на кадгерини призводить до активації тирозинової кінази Abelson яка фосфорилує Vcl. Це узгоджується із результатами іншої роботи, де було показано, що фосфорилування Vcl у позиції Y822 призводить до підвищення концентрації Vcl у АК порівняно із костамерами. Більше того, механічне навантаження спричиняє підвищення експресії N-кадгерину [275].

1.1.2 Десмосоми. Десмосоми – це тип міжклітинних контактів, щільні та симетричні білкові пластинки, що сполучаючись між собою утворюють структури подібні до заклепок. Спершу, ці білкові комплекси і описувались як

«переривчасті, подібні до кнопки» структури епітеліальної тканини [160]. Десмосоми зустрічаються практично в усіх типах тканин: міокарді, клітинах дендритного ретикулуму в лімфатичних фолікулах, але найвищою їхня присутність є у фолікулярному/інтерфолікулярному епідермісі. Десмосоми забезпечують структурну підтримку кардіоміоцитів і клітин інших типів тканин, які отримують сильні механічні навантаження, наприклад епітелій. Незважаючи на те, що АК також передає навантаження до цитоскелету, десмосоми у цьому відношенні є більш надійними, оскільки зв'язуються із механічно стійким проміжним філаментом [81]. Крім цих стабілізуючих і адгезивних функцій, десмосоми мають важливу роль у морфогенезі тканин під час ембріонального розвитку та загоєння ран. Десмосомальні компоненти можуть транслокуватися в інші субклітинні компартменти, брати участь у сигнальних шляхах і тим самим впливати на регуляцію транскрипції генів, які беруть участь у проліферації та диференціації.

Десмосоми складаються із десмосомальних кадгеринів, що також, як і кадгерини АК є трансмембранними білками (рис.1.2) адаптовано згідно [241]. Наразі відомо 4 ізоформи десмоглеїну (DSG1-4) і 3 десмоколіну (DSC1-3), усі зазначені білки кодуються окремими генами [51]. Експресія десмосомальних кадгеринів тканино специфічна, у серці експресуються лише десмоглеїн-2 (DSG2) і десмоколін-2 (DSC2). На відміну від кадгеринів, у складі АК, десмосомальні кадгерини взаємодіють у гетерологічний спосіб. Плакоглобін (PKG), плакофілін-2 (PKP2), та десмоплакін (DSP), члени супер родини плакінів, поєднують десмін з десмосомою.

Аналогічно до структури АК, до структури десмосом також входять класичні члени, наведені вище та асоційовані: PKCa, α -T-catenin та p120. Протеїнова кіназа Ca (PKCa) здатна зв'язуватись із PKP2, тож залучена до регулювання адгезії десмосом, коли динаміка міжклітинної адгезії є необхідною [245]. Більш того, PKCa рекрутує та фосфорилує DSP під час генезису десмосом [51]. α -T-катенін, член сімейства α -катенінів, не лише взаємодіє із β -катеніном у структурі АК а й з десмосомальним PKP2, зв'язуючи

у такий спосіб десмосому і АК. Таким чином, α -Т-катенін відіграє важливу роль в «області композита» у ділянці ІД, де АК і десмосоми тісно пов'язані спільними структурними білками [241]. І, нарешті p120, можливо, також залучений до утворення десмосом, оскільки він здатен взаємодіяти із DSG1 та DSG3, і у такий спосіб, p120 також поєднує десмосоми із АК [247,113]. Проте, як відомо, ні DSG1 ні DSG3 не входять до складу десмосом у серці, і така взаємодія може відбуватися лише при високих концентраціях кальцію. Тому, здатність p120 зв'язуватись із серцевим варіантом DSG2, викликає сумніви.

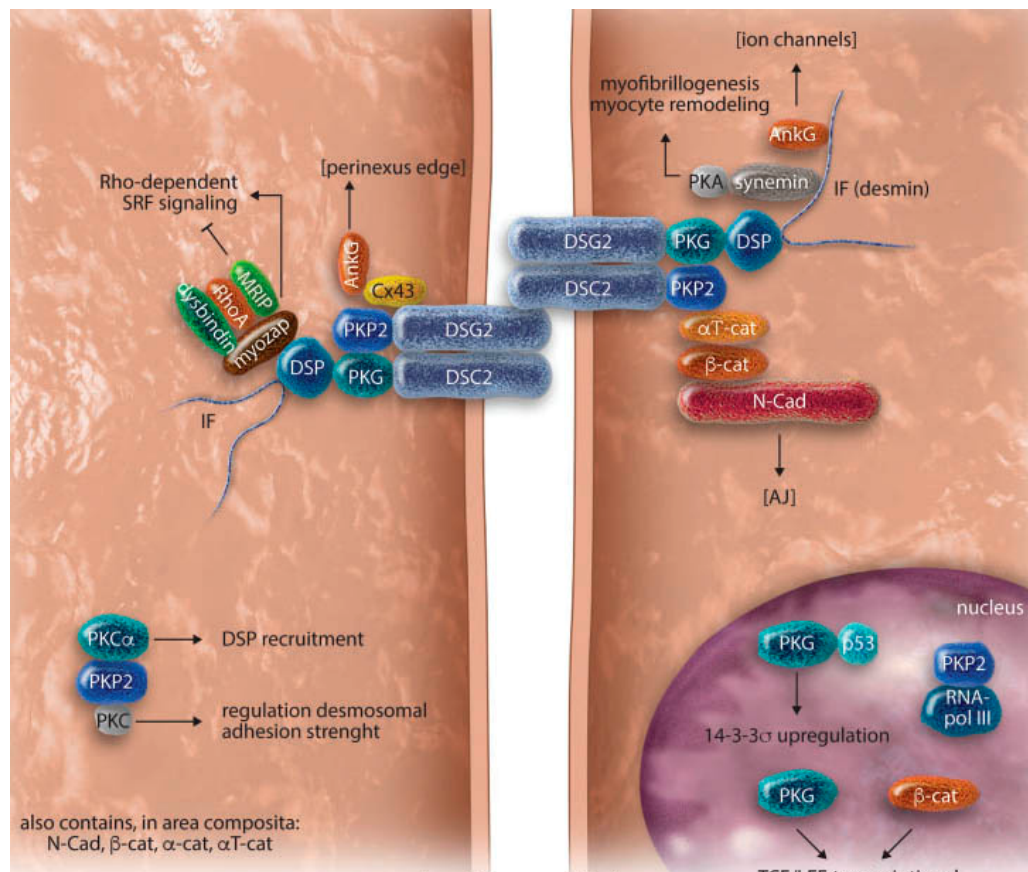


Рис.1.2. Основні та асоційовані білки десмосомального комплексу

1.1.3 Поріві з'єднання. Поріві з'єднання (ПЗ) представляють собою англомерацию декількох окремих каналів щілиних (порових) з'єднань разом із асоційованими із ними білками. ПЗ забезпечують електророболічний зв'язок між клітинами, що є необхідною умовою для поширення потенціалу дії та деяких розчинних речовин [176]. В цілому, ПЗ складаються з дванадцяти

молекул коннексину: шість молекул утворюють коннексон в мембрані клітини і поєднуються із коннексоном мембрани сусідньої клітини (рис.1.3) адаптовано з [241]. У міоцитах шлуночків найбільш поширеним є коннексин43 (Cx43). Розвиток, регулювання та деградація ПЗ є дуже чітко організованим процесом із швидким темпом відновлення: період напіврозпаду Cx43 становить 1–3 години [208].

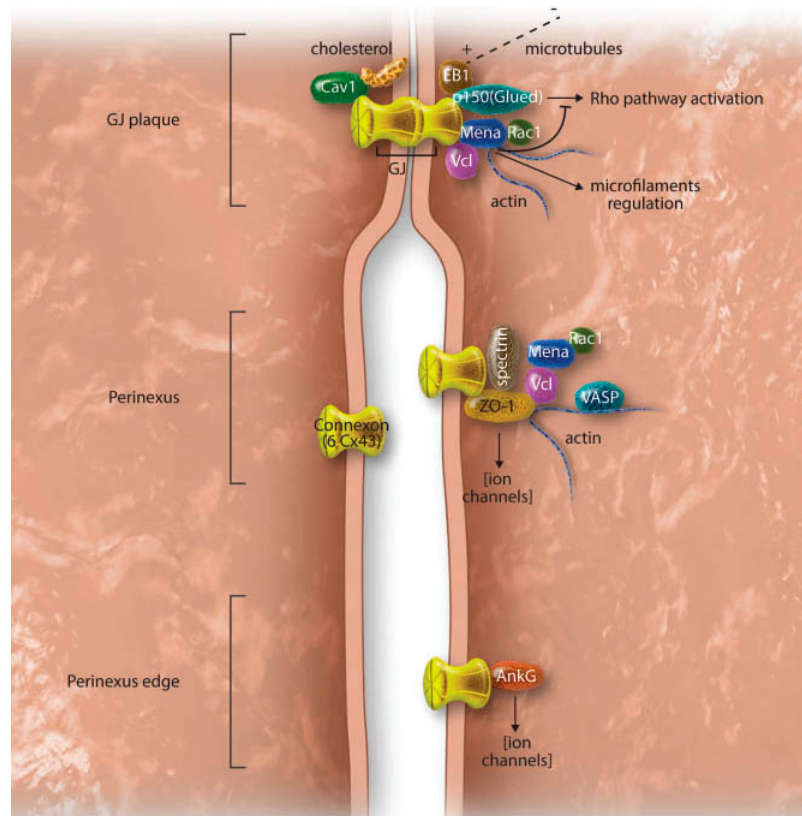


Рис.1.3. Основні та асоційовані білки поборових з'єднань

Окрім функції у утворенні коннексонів, білок Cx43 має і деякі не канонічні функції, що не залежать від коннексону та ПЗ. По-перше він є необхідним для функціонування натрієвого каналу, Cx43 підтримує комплекс, який генерує потенціал дії, а це означає, що Cx43 є необхідним не лише для передачі заряду а й збудження клітин [3]. Також було показано, що дефіцит Cx43, призводить до зниження експресії NaV1,5 і затримки провідності. Недостатність Cx43 негативно впливає на структуру ПЗ і генерацію заряду клітинами, що у решті решт спричиняє розвиток аритмій [241]. Роботи із

лабораторними тваринами також свідчать на користь важливості не канонічної функції Sx43, так тварини що експресували транковану форму білка Sx43, котра втрачала здатність зв'язуватись із ZO-1, гинули від аритмії шлуночків. Причому у таких тварин не спостерігали порушення ПЗ. Летальний фенотип пояснювався підвищенням щільності струму натрію і калію. З іншого боку ці дані вказують на те, що аритмія не залежить від функції ПЗ. По-друге, Sx43 також було ідентифіковано і в мітохондріях, більше того, було показано, що преішемічні стани міокарду характеризуються підвищенням локалізації Sx43 у мітохондріях [24]. Більш того, ПЗ фізично контактують із мітохондріями у клітині. Окрім того, експресія укороченої (транкованої) форми білка Sx43 може також позначитись і на функції мітохондріального Sx43 [145]. По-третє, нещодавно було показано, що ізоформа білка Sx43 – Sx43-20k здатна регулювати структуру та організацію АК а також міграцію клітин, оскільки безпосередньо залучена у регуляцію експресії гена N-кадгерину, важливо також, що ця активність є не залежною від функції ПЗ [128].

Так як і АЗ, ПЗ також є механочутливими, так циклічний механічний стрес, що виникає в наслідок скорочень кардіоміоцитів спричиняє збільшення і кількості ПЗ, і основного білку порових з'єднань - конексину 43. І цей ефект можна порівняти із дією α - або β -адренергічної стимуляції [275]. Більше того, було показано, що рівень фосфорилування Sx43 збільшується в результаті циклічного механічного стресу, і вочевидь, ці процеси обумовлені фактором росту ендотелію судин [213].

Mena (mammalian Enabled) білок асоційований із ПЗ взаємодіє із Sx43 та Vcl через його EVH1 домен (рис.1.3). Така взаємодія регулює актиновий цитоскелет та мікрофіламент як у структурі ДІ так і фокальній адгезії. Окрім того білок Mena характеризується важливою кардіопротекторною дією, а саме, зв'язуючись із Rac1, він інгібує активацію Rac1-асоційованого сигналінгу. Кавеолін-1 (Cav-1) також зв'язується із Sx43, загалом це інтегральний мембранний білок, що зв'язує холестерин. Разом з холестерином і сфінголіпідами він є важливими складовими кавеоли. Кавеоли – найкраще

охарактеризований тип ліпідних рафтів, окрім іншого кавеолі беруть участь у ендоцитозі, трансцитозі та зовнішніх сигналах. Взаємодія із Cx43 та Кавеолін-1 вказує на можливий зв'язок і ПЗ із кавеолами, однак, наразі це лише припущення [241].

Отже, АК, десмосоми, ПЗ не є індивідуально функціонуючими структурами, а утворюють одну функціональну одиницю – область композита; де у тісній кооперації ці комплекси забезпечують механічну та електричну комунікацію між клітинами, міжклітинну адгезію. Окремі комплекси ІД пов'язані один із одним у різні способи, наприклад через скефолдні білки ZO-1 та AnkG тощо. Деякі структурні компоненти гібридних з'єднань можуть також взаємодіяти з іншими білками ІД.

1.2 Мутації генів ІД та патології серця

З огляду на важливість правильної організації та збалансованості ІД, не викликає подиву те, що мутації деяких генів, членів ІД, є причиною спадкових патологій міокарду, таких як, серцева аритмогенна кардіоміопатія, дилатаційна кардіоміопатія, та інші.

Варто зауважити, що нині, найбільшу кількість генів, мутації котрих призводять до кардіального фенотипу у людей було ідентифіковано серед генів десмосомального комплексу (табл. 1.1). Цікаво, що мутації цих генів спричиняють не лише патології міокарду, мутації у десмосомальних генах, таких як *DSP* і *PKP1* (плакофілін 1, що експресується виключно у шкірі), асоційовані із різноманітними захворюваннями, наприклад: пухирчатка шкіри або пемфігус, пальмоплантарна кератодермія та гіпотрихоз. Мутації у генах десмосомальних білків можуть призводити до порушень міжклітинної адгезії, зв'язку із проміжним філаментом або обидва типи адгезії. Ці захворювання демонструють принципову важливість десмосом у нормальному

функціонуванні тканин, включно із тканиною міокарду. Однак, наразі не відомо, з якої причини мутації, наприклад *DSP*, можуть специфічно викликати хворобу шкіри, не спричиняючи при цьому патологій серця [51].

Мутації десмосомальних генів у серці, перш за все, пов'язані із аритмогенною кардіоміопатією, що характеризується непритомністю і раптовою смертю у юних спортсменів або тахікардією шлуночків. Окрім того, саме мутації гена *PKP2* є найбільш поширеними у пацієнтів з аритмогенною кардіоміопатією, однак мутації десмосомальних кадгеринів: *DSP* і *JUP*, також пов'язані з цією патологією [176,51]. Серцево-судинні захворювання, при яких діагностуються порушення роботи серця та деякі дефекти шкіри, також досить часто викликані мутаціями десмосомальних генів. Одним із яскравих прикладів є синдром Наксоса, тип аритмогенної кардіоміопатії, що розвивається в наслідок мутації гена *JUP* (табл. 1.1), та супроводжується розвитком кератодермії. Синдром Карвахала, симптоматично дуже подібний синдрому Наксоса, розвивається в наслідок мутацій гена *DSP*. Цікаво, що у пацієнтів хворих на аритмогенну кардіоміопатію, синдром Наксоса та Карвахала спостерігається і реконструкція ПЗ [176,51].

Говорячи, про мутації генів окремих структур ІД, таких як АК, ПЗ або десмосоми, важко відокремити та класифікувати їх виключно за належністю до певних комплексів, так наприклад ген *JUP*, що кодує плакоглобін, звісно відноситься до десмосомальних генів, проте його продукт приймає участь і у регулюванні структури АК. З іншого боку, α -Т-катенін – основний компонент АК взаємодіє і з десмосомальним комплексом, мутація цього гену спричиняє розвиток дилатаційної кардіоміопатії [104], аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка [88], дефектами формування міжпередсердної перегородки [230] диссекцією щитоподібної артерії [76] (табл.1.1). Для гомолога α -Т-катеніну, білка α -Е-катеніну, що кодується геном *CTNNA1*, мутацій у людей наразі не ідентифіковано, хоча було показано, суттєве зменшення експресії цього білка у області ураження тканини міокарду у пацієнтів після інфаркта [25]. Цікаво, що до тепер, не було ідентифіковано мутацій і у гені *CTNNB1*, що

кодує β -катенін, що мали би кардіальний фенотип, незважаючи на його важливу сигнальну функцію, хоча й показано, що порушення його локалізації або рівню експресії асоційовані із різними серцевими патологіями, включаючи і дилатаційну кардіоміопатію [192].

Мутація гена *CDH2*, що кодує основний трансмембранний кадгерин АК, була ідентифікована нещодавно, лише у 2017 році (табл.1.1), незважаючи на те, що фенотип спонтанної аритмогенної кардіоміопатії, що супроводжується значними порушеннями структури ІД та призводить до летальності було описано із застосуванням нокаутних мишей ще у 2005 році [126].

Таблиця 1.1

Мутації генів ІД та асоційований кардіальний фенотип

Ген	Продукт гена	Асоційований фенотип	Посилання
Адгеринові комплекси			
<i>JUP</i>	Плакоглобін	ARVC (аритмія, SCD, фіброз тканини міокарда, серцева недостатність), синдром Накоса (підвищене оволосіння, кератодермія)	[114,161]
<i>CDH2</i>	N-кадгерин	ARVC, серцева недостатність	[158]
<i>CTNNA3</i>	α -Т-катенін	Дилатаційна кардіоміопатія, ARVC	[49,58]
<i>VCL</i>	Вінкулін	Дилатаційната гіпертрофічна кардіоміопатія, прогресуюча серцева недостатність	[148,177]
Десмосоми			
<i>PKP2</i>	Плакофілін 2	ARVC	[51]
<i>DSG2</i>	Десмоглеїн-2	ARVC	[51]
<i>DSP</i>	Десмопакін	ARVC, лівостороння ARVC, захворювання шкіри, синдром Карвахала (кардіоміопатія лівого шлуночка, підвищене оволосіння, кератодермія)	[203,178,177,9]
Порові з'єднання			
<i>Cx40</i>	Конексин 40	Асистолія передсердь	[75]

Примітки: 1 - ARVC - аритмогенна кардіоміопатія правого шлуночка; 2 -SCD (Sudden cardiac death) - раптова кардіальна смерть.

Не зважаючи на те, що нині, у людини ідентифіковано 28 патологій, що розвиваються в наслідок мутацій генів конексинів – одного з основних компонентів ПЗ, кардіальний фенотип має лише мутація гена *Cx40* [226].

Синдроми Бругади та Карвахала і АК можуть розвиватися і в наслідок мутацій генів саркомерних білків, таких як десмін, тітін, ламіни А і С, трансмембранний білок (ТМЕМ) 43, стріатин [241,168]. Деякі з цих білків (десмін і тітін) певним чином взаємодіють і з білками ІД. Так, ламіни, наприклад, є класом білків проміжного філаменту у ядерній мембрані, стріатини мають кавеолін-зв'язувальний домен, що передбачає їхню певну взаємодію із білками ІД [241].

Тож, мутації генів ІД можуть спричиняти спадкові кардіальні фенотипи, такі як аритмогенна кардіоміопатія, прогресуюча серцева недостатність, дилатаційна кардіоміопатія, і варто зауважити, що незважаючи на велику кількість ідентифікованих наразі мутацій, виявлення та характеристика нових мутацій, та з'ясування функції окремих генів ІД мають нагальну потребу, як для розуміння біології і генетики розвитку і функціонування серця, так і для покращення діагностики та прогнозу для хворого.

1.3 Участь білків ІД у регулюванні сигнальних каскадів клітини

Розглядаючи організацію основних структурних компонентів ІД, ми згадували, що деякі білки ІД, не лише залученні до утворення та підтримки міжклітинної адгезії: АК чи десмосом а мають ширшу і складнішу функцію. Тож, білки міжклітинної адгезії здатні безпосередньо приймати участь у регулюванні сигнальних каскадів клітини, і у такий спосіб, впливають не лише на стабільність, жорсткість та реорганізацію актину а й експресію генів, і процеси, що з ними пов'язані. Низка експериментальних робіт присвячена

з'ясовуванню участі білків адгезії у регулюванні не лише міграції та проліферції клітин а й регуляції активності сигнальних систем клітини. Серед таких білків найкраще дослідженим є β -катенін, та його участь у канонічному Wnt сигналінгу, однак ряд робіт останніх років, свідчить про те, що сигнальна функція притаманна не лише β -катеніну. Так було показано, що його гомолог – γ -катенін (або плакоглобін), також здатен модулювати експресію генів. Сигнальна функція була показана і для деяких інших білків – компонентів ІД, а саме α -Е-катеніну, вінкуліну та Cx43.

1.3.1. Канонічний Wnt сигналінг та сигнальна функція β -катеніну.

Дослідження канонічного Wnt сигналінгу почалось із відкриття у мишей гена *Int1* та його онкогенного продукту у 1982 році [179]. Пізніше, у 1987 році, було описано аналогічний ген і у *Drosophila melanogaster*, що отримав назву – *Wingless (Wg)*, тож фактично нинішня номенклатура є результатом скорочення двох назв генів – *Int* та *Wg* [268]. Сімейство генів Wnt кодує еволюційно консервативний клас молекул, що секретуються і здатні ініціювати сигнальні каскади в клітинах-реципієнтах, які експресують відповідні рецептори. Білки Wnt - це досить велике сімейство секретованих сигнальних глікопротеїнів ~ 40 кДа, що мають досить не типову дводоменну структуру з аміно-кінцевими і карбокси-кінцевими доменами (NTD і CTD) та містять багато консервативних цистеїнів [255,268]. Деякі клітини із сигнальною функцією здатні секретувати білки родини Wnt у позаклітинний простір, де відповідні клітини розпізнають Wnt через гетеродимерний рецепторний комплекс, що складається з білків Frizzled (Fz) і LRP5 [268]. Після зв'язування Wnt білка та рецептору утворюються великі мультипротеїнові комплекси, які можуть навіть бути виявлені як окремі пунктатні структури в цитоплазмі. Ці білкові комплекси, ще називають сигналосомами (рис.1.4), і саме в них відбуваються каскади фосфорилування білків, що у кінцевому підсумку призводять або до

транскрипційної активації цільових генів – мішеней Wnt сигналіngu, або до перегрупування цитоскелету або міграції клітин.

Наразі ідентифіковано 19 Wnt білків ссавців, включаючи 10 Frizzled (Fz) рецепторів і два корецептори LRP5, що свідчить про величезну складність, необхідну для передачі Wnt-сигналізації [268,43].

Традиційно, білки Wnt поділяються на дві великі групи, залежно від їхньої здатності індукувати утворення вторинної осі в ембріонах жаб і трансформувати епітеліальні клітини молочної залози. Ті, що мають такі можливості: Wnt1, Wnt3 і Wnt8, називають канонічні Wnt білки; інші білки, такі як Wnt5a і Wnt11, діють через неканонічний шлях. Однак, із накопиченням експериментальних даних та розширенням наших знань про функціонування Wnt сигналізації, стало зрозуміло, що такий чіткий поділ не завжди є справедливим. Так відомо, що іноді одні і ті ж Wnt-молекули можуть активувати або канонічний, або неканонічний Wnt-сигнальний каскад в залежності від клітинного контексту [164,238].

Канонічні та неканонічні Wnt-сигналіngи відрізняються за їхніми кінцевими ефекторами. Сигналізація через канонічний Wnt каскад зазвичай відбувається за участі β -катеніну, основного ефектора цього сигналіngu, тому канонічний Wnt сигналіng, досить часто називають Wnt/ β -катеніновий сигнальний каскад. Неканонічний Wnt сигналіng включає у себе дві, так би мовити, гілки, а саме: Ca^{2+} /PKC – залежний; сигналіng, що забезпечує зниження рівня цГМФ-специфічних фосфодіестераз та Wnt сигналіng, що відповідає за планарну полярність клітин. Ці гілки Wnt сигнального каскаду залучені у регулювання процесів розвитку, формування полярності клітин у дрозофіл, гастрюляції та міграції клітин [268,43]. У цій частині свого огляду ми зупинимося лише на розгляді канонічного Wnt- сигнального каскаду.

Інтенсивність передачі сигналів Wnt/ β -катенінового каскаду визначається ядерною локалізацією β -катеніну та його загальною стабільністю. У відсутності лігандів Wnt, цитоплазматичний β -катенін підтримується на низькому рівні і секвеструється у складний білковий комплекс – деградувальний комплекс

[173]. Основними гравцями цього комплексу є білки Axin і APC (adenomatous polyposis coli), два скефолдних білки, що залучені до фосфорилування β -катеніна - CK1 α (казеїнова кіназа 1 α) і GSK3 β (кіназа глікогенсинтази 3 β). Коли β -катенін фосфорилується, він піддається убіквітинізації і протеасомній деградації. За цієї умови, канонічний Wnt сигналінг та β -катенін не активні (рис.1.4 а) [192], а фактор транскрипції LEF/TCF зв'язується із ко-репресором Groucho, що власне і спричиняє вимкнення експресії генів мішеней цього сигнального каскаду [192].

Зв'язування Wnt з рецептором Frizzled і його ко-рецептором Ryk призводить до утворення іншого білкового комплексу – сигнасоми, що перешкоджає фосфорилуванню та деградації β -катеніну. Завдяки чому, β -катенін стабілізується, накопичується в цитоплазмі, і транслокується у ядро. У ядрі β -катенін витісняє Groucho шляхом зв'язування з LEF/TCF. Окрім того, β -катенін взаємодіє з білком BCL9, ядерним білком Pygopus і CREB-зв'язувальним білком CBP, а також з тканино-специфічними активаторами транскрипції. Усе разом, це діє як перемикач транскрипційного репресора LEF/TCF у активатор, що власне і результується у експресії генів мішеней цього каскаду (рис. 1.4 б) [192]

Тож, як вже згадувалося вище, активність канонічного Wnt сигналінгу визначається рівнем цитозольного β -катеніну, а точніше, особливостями його фосфорилування. Фосфорилування β -катеніну кіназою *src* за Tyr654 і протеїнкіназою (PK) D1 за Thr112 або Thr120 промоутує його зв'язування із E-кадгерином у складі АК [54]. Аналогічно, фосфорилування E-кадгерину кіназами CK2 і GSK3 β за Ser834, Ser836 і Ser842 посилюють його взаємодію з β -катеніном. І навпаки, взаємодія E-кадгерину і β -катеніну пригнічується, коли останній фосфорилується CK1 за Tyr831 і Tyr860 [56]. Застосування моделей генетичного нокауту β -катеніну або експресії конститутивно активної форми цього білка показали, що активація канонічного Wnt сигналінгу та регулювання АК і міжклітинної адгезії залежать від одного і того ж пулу β -катеніну [62,86].

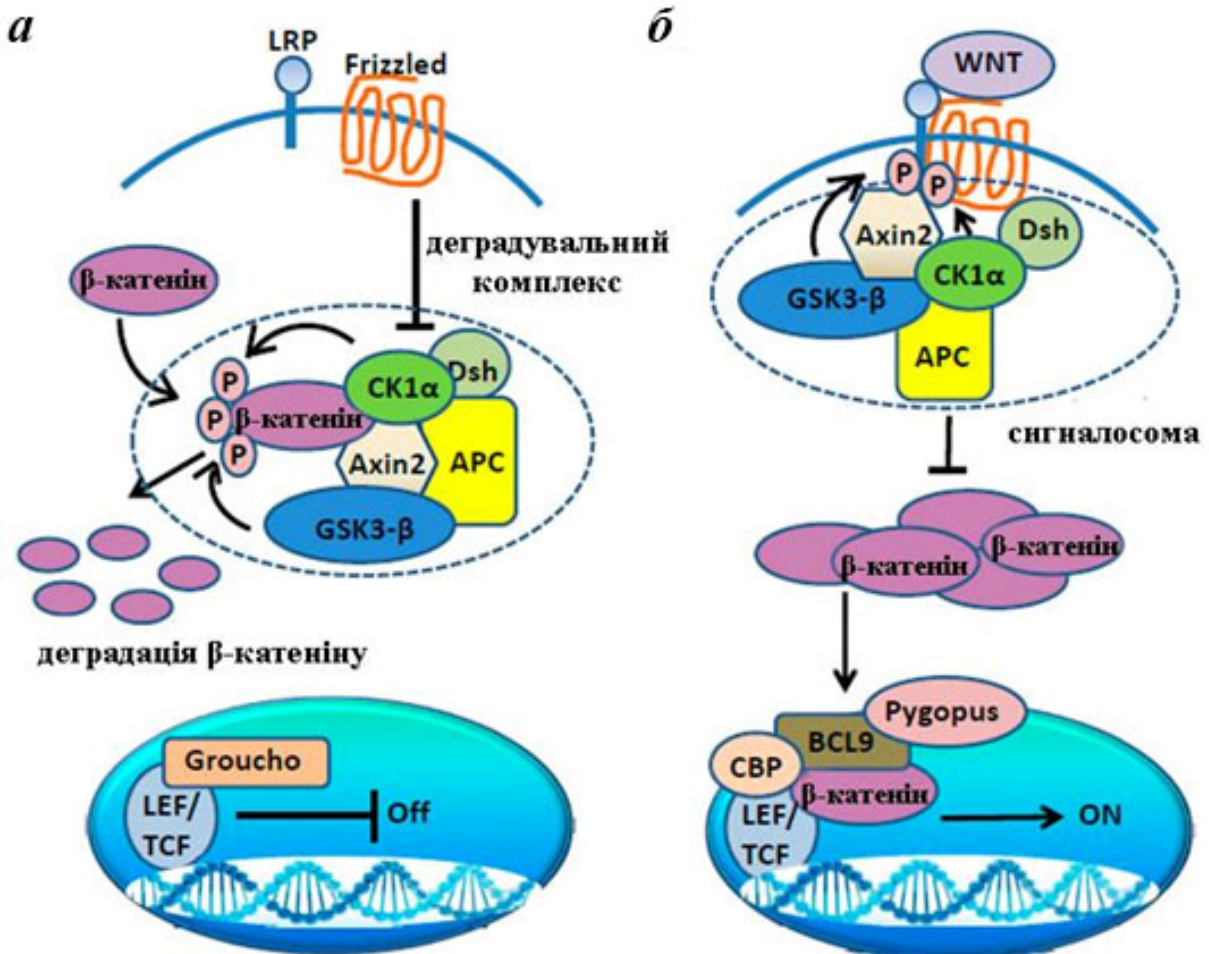


Рис.1.4. Класична схема канонічного Wnt-сигналіngu. Коли ліганди Wnt відсутні, β -катенін зв'язується у деградувальному комплексі та направляється на протеасомну деградацію. LEF / TCF асоціюється з Groucho і пригнічує експресію цільових генів (*a*). Після зв'язування ліганду Wnt з його Frizzled рецептором та його ко-рецептором утворюється сигналосома. Цей комплекс ініціює каскад подій фосфорилування, що перешкоджає деградації β -катеніну. В результаті β -катенін накопичується в цитоплазмі і переміщується в ядро, де він витісняє Groucho і утворює комплекс з BCL9, Pygopus, модифікатором гістонів CBP і перетворює LEF/TCF з репресора транскрипції в активатор (*б*)

Таким чином, клітини модулюють рівень активності Wnt і регулюють міжклітинну адгезію або проліферацію клітин шляхом конкуренції за цитоплазматичний пул β -катеніну. Канонічний Wnt-сигнальний каскад контролює експресію близько 80 генів, серед яких гени, що контролюють

клітинний цикл, проліферацію, диференціювання та багато інших процесів, наприклад гени *c-Myc* і *CyclinD1* [156,244].

Окрім цього, частина цитозольного пулу β -катеніну може бути транслокована у ядро, активуючи процеси, що вимагають активації Ras-сигналіngu [102,180].

1.3.2 Участь γ -катеніну у регулюванні активності канонічного Wnt сигналіngu. Інший компонент ІД, γ -катенін, основний компонент десмосом та гомолог β -катеніну [33] також має сигнальну функцію, а саме, він здатен регулювати активність канонічного Wnt сигналіngu. На користь чого свідчать наступні факти: аналогічно до β -катеніну, підвищення експресії γ -катеніну призводить до формування осі у *Xenopus laevis* [69]; γ -катенін коімунопреципітується з білками деградувального комплексу APC і Axin [123,210]; деякі медіатори канонічного Wnt сигналіngu, такі як ліганд Wnt1, APC і Axin, також регулюють стабільність γ -катеніну [124,187]; γ -катенін здатен активувати β -катенін/TCF-репортерні конструкції [149,221,256].

Нещодавно було показано, що γ -катенін здатен зв'язуватись з білками LEF/TCF, утворюючи потрійний комплекс із ДНК, але комплекс γ -катенін/LEF/TCF має дуже низьку афінність до ДНК [277,276]. Проте, утворення такого комплексу може перешкоджати β -катенін/LEF/TCF залежній експресії генів. Або ж, комплекси, що містять γ -катенін, завдяки специфічному розпізнаванню послідовностей ДНК можуть регулювати експресію генів - мішеней канонічного Wnt сигналіngu. Останнє узгоджується із експериментальними даними, де було показано, що γ -катенін здатен регулювати експресію генів незалежно від β -катеніну [229].

Більш того, у диференційованих кератиноцитах за допомогою методу ChIP-ChIP було виявлено більш ніж 5000 промоторів мішеней γ -катеніну [229,257]. Серед них було ідентифіковано, як гени мішені – канонічного Wnt сигналіngu, так і гени – учасники цього каскаду. Цікаво, що із застосуванням цього ж методу, для β -катеніну було виявлено лише 2000 промоторів-мішеней,

причому лише 38% із них перекривались із генами-мішенями γ -катеніну. Ці дані вказують на те, що ймовірно, β -катенін і γ -катенін мають різні молекулярні мішені, навіть модулюючи канонічний Wnt сигналінг. На користь такого припущення свідчать і результати отримані із застосуванням трансгенних мишей, де активація експресії *WNT-3* або *DVL-2* в шкірі призводила до розвитку фенотипу подібного до такого, у мишей із підвищеною експресією γ -катеніну [35]. Проте, фенотип таких тварин відрізнявся від фенотипу мишей що експресували підвищений рівень β -катеніну, хоча відомо, що у культурі клітин *Wnt-3* і *Dvl-287* ефективно підвищують експресію β -катеніну [134].

Сигнальну функцію γ -катеніну досліджували і із застосуванням ембріональних стовбурових клітин миші (mESCs), які були нокаутними за генами обох катенінів [150]. У MESCс дикого типу, що експресували стабілізований γ -катенін, виявили активацію канонічного Wnt сигналінгу, що пригнічувало диференціацію клітин у три кардіальні лінії. Така реакція клітин була подібною до відповіді клітин на підвищення експресії β -катеніну. Однак, експресія стабілізованого β -катеніну, ефективніше ніж γ -катеніну, підтримувала плюрипотентний стан стовбурових клітин, навіть за умови індукування диференціації.

У ракових клітинах, γ -катенін компенсував пригнічення експресії або, навіть, повну відсутність експресії β -катеніну у сенсі утворення міжклітинної адгезії, причому, це ніяк не позначалося на структурі і функції десмосом. Однак, не здатен був компенсувати відсутність β -катеніну для забезпечення функціонування канонічного Wnt сигналінгу [252]. На противагу цій роботі, із застосуванням клітин карциноми, було показано, що підвищений рівень експресії γ -катеніну спричиняв зниження проліферації, міграції та метастазування клітин [7]. Ймовірно, γ -катенін здатен пригнічувати туморогенез та метастазування шляхом регулювання експресії кластерів генів, які регулюють ці процеси. Більш того, γ -катенін може модулювати експресію генів разом із p53 і здатний, також, регулювати транскрипційну активність p53. Тож, ймовірно, саме це і пояснює часткову супресорну дію γ -катеніну [8].

Окрім того, результати досліджень вказують на те, що APC регулює онкогенні функції не тільки β -катеніну, але і γ -катеніну [124]. Відомо, що транскрипційна активність β -катеніну, так само як і γ -катеніну залежить від кофакторів транскрипції TCF/LEF, також показано, що обидва катеніни активують експресію гена *c-Мус*. Тож, γ -катенін залучено до регулювання канонічного Wnt сигналіngu, і він має деякі спільні гени – мішені із β -катеніном, але загалом ці білки мають різну функцію у регулюванні експресії генів і мають свої мішені (рис. 1.5) [192], а відтак і функція їхня у регулюванні поділу, проліферації, диференціюванні різна [124]. Так було показано, що активація Ras пригнічує сигнальну активність γ -катеніну і експресію деацетилази гістонів 4 (HDAC4), яка була ідентифікована як пряма мішень транскрипційного комплексу γ -катеніну/Lef1. Важливо також, що HDAC4, не є мішенню β -катеніну [266].

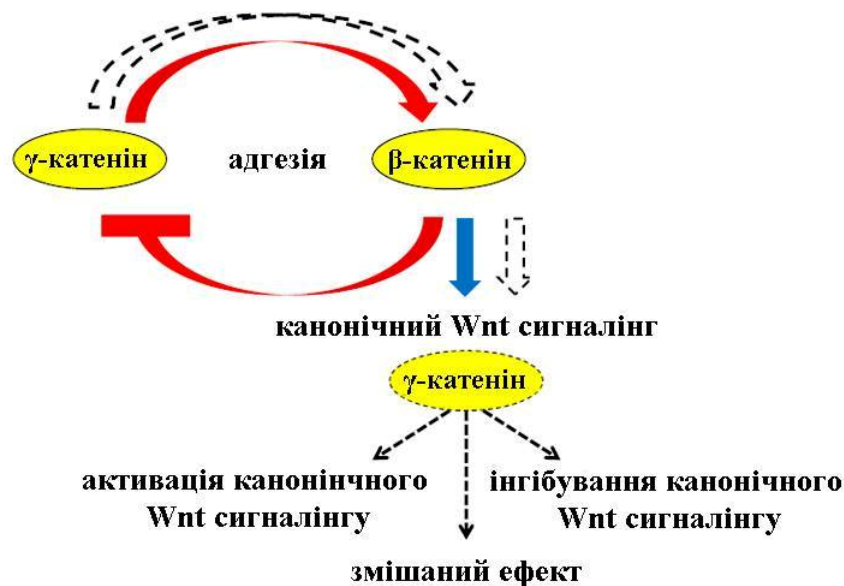


Рис. 1.5. Функціональна взаємодія між γ -катеніном та β -катеніном

1.3.3 Канонічний Wnt сигналінг та α -катенін. Сигнальна функція α -катеніну була встановлена відносно недавно, і досліджена вона дещо гірше, порівняно із сигналінгом опосередкованим β -катеніном. Проте, існуючі нині дані вказують на більш складний характер та спектр сигнальної активності α -катеніну, так наразі поодинокі дані свідчать про його участь у модуляції

активності канонічного Wnt, HIPPO, NF- κ B-, Hedgehog- та Rho-сигнальних каскадів. У даній частині огляду ми зосередимось, перш за все, на зв'язку α -катеніну та сигнальних систем, що є принциповими, як для розвитку так і функціонування серця дорослих організмів, а саме на канонічному Wnt- та HIPPO- сигнальних каскадах.

Залучення α -катеніну у регуляцію активності канонічного Wnt-сигналінгу було показано із застосуванням різноманітних моделей. Так із використанням *Xenopus laevis* було виявлено, що ектопічна надекспресія α -N-катеніну порушує дорзалізацію ембріонів жаб у наслідок пригнічення активності канонічного Wnt-каскаду [219]. У іншій роботі, за допомогою встановлених ліній клітин гліобластоми (U87/EGFR та U251/EGFR) було показано, що надлишкова експресія α -катеніну пригнічує локалізацію β -катеніну у ядрі клітин, що призводило до інгібування поділу та міграції клітин гліобластоми. У цій же роботі, боло показано, що нокдаун α -катеніну сприяв зростанню пулу β -катеніну у ядрі, навіть за умови відсутності стимуляції їх епідермальним фактором росту. [107]. Окрім того, при диференціюванні хондроцитів, також було показано, що α -катенін здатен модулювати транскрипційну активність β -катеніну та Wnt-каскаду. А саме, було показано, що у хондроцитах виснаження пулу α -катеніну, за рахунок його протеасомної деградації, стимулює сигнальну активність β -катеніну, як базальну, так і індуковану WNT7A [98].

При детальному аналізі можливих молекулярних механізмів сигнальної активності α -катеніну, виявилось, що останній здатен регулювати активність канонічного Wnt-сигналінгу і у ядрі на рівні ядерної локалізації основного медіатора каскаду - β -катеніну. Так, надмірна експресія α -катеніну у культурі клітин SW40, що характеризуються підвищеним рівнем активності канонічного Wnt-сигналінгу спричиняла секвестрування β -катеніну в цитоплазмі [223]. Проте, для α -катеніну, було показано не лише супресорну дію. Так, у іншій роботі було продемонстровано, що α -катенін здатен стимулювати транслокацію β -катеніну в ядро, шляхом взаємодії із білками ядерної мембрани – емеріном та неспріном-2 [172]. Однак варто зауважити, що більшість

експериментальних робіт, все ж таки, переконливо свідчать на користь супресорної активності α -катеніну у регулюванні канонічного Wnt сигналіngu, та регуляції транслокації β -катеніну у ядро.

Окрім того, було виявлено, що α -катенін також може перебувати у ядрі і транспорт його залежить від β -катеніну [72,163]. Із використанням у якості моделі лінії клітин HEK293T було показано, що після дії LiCl, прямого активатора транскрипційної активності β -катеніну, рівень ядерної локалізації останнього дійсно підвищувався, але разом із α -катеніном. При цьому спостерігали і пригнічення TOPFlash люцефіразної репортерної системи та експресії одного із генів-мішеней β -катеніну - гена *cyclinD1* [163]. Ймовірніше за все, α -катенін порушує або послаблює ефективність зв'язування комплексу β -катенін/TCF із ДНК і у такий спосіб пригнічує його транскрипційну активність [73]. Про складність молекулярної взаємодії β -катеніну та α -катеніну при реалізації Wnt залежної сигналізації свідчить і робота, де також було показано, що α -катенін інгібує транскрипційну активність β -катеніну не впливаючи на його ядерний імпорт [30]. Або робота, де було встановлено, що α -катенін здатен рекрутувати до транскрипційного комплексу β -катенін/TCF білок APC із комплексом CtBP-RCOR1-LSD1 (гістон деметилази) і у такий спосіб сприяти пригніченню експресії генів-мішеней каскаду [41]. Окрім того, α -катенін здатен не лише зв'язуватись із β -катеніном, а й рекрутувати до такого комплексу білки – компоненти інших сигнальних систем, що також спричиняє інгібування сигнальної активності останнього. Так наприклад, при активації Indian Hedgehog для диференціювання хондроцитів спостерігали утворення такого потрібного комплексу Gli3R- α -катенін- β -катенін опосередкованого саме зв'язувальною активністю α -катеніну [207].

Як вже зазначалось, модуляція активності канонічного Wnt за участі α -катеніну – є досить складною і багатофакторною, так останній здатен пригнічувати активність Wnt каскаду, не лише на рівні ядерної локалізації або транспорту у ядро β -катеніну, а й в цитоплазмі, сприяючи фосфорилуванню β -катеніну. Так було показано, що α -катенін здатен зв'язуватись із APC у складі

деградувального комплексу та рекрутувати до комплексу і β -катенін, стимулюючи у такий спосіб фосфорилування і подальшу протеасомну деградацію останнього [41]. Окрім того, α -катенін сприяє і стабілізації комплексу β -катенін/Е-кадерин через пригнічення фосфорилування β -катеніну Src тирозинкіназою. [100]. Тож, огляд наявних експериментальних робіт свідчить про те, що α -катенін регулює активність канонічного Wnt сигналіngu на різних рівнях реалізації його активності, що ймовірно залежить від клітинного контексту та особливостей активації самого каскаду.

1.3.4 HIPPO-сигнальний каскад та участь α -Катеніну у його регулюванні. Основні компоненти HIPPO сигнального каскаду були вперше ідентифіковані у *Drosophila melanogaster* при проведенні генетичного скринінгу регуляторів росту тканин [261,110,112,232]. Було показано, що мутації цих генів призводили до загального фенотипу надмірного росту тканини і збільшення розміру органів: очей, крил *Drosophila melanogaster*. Також, цей сигнальний каскад є високо консервативним, і у ссавців він, також, залучений до контролювання розмірів органів за рахунок контролю проліферації клітин [186]. Нині відомо, що HIPPO каскад контролює не лише розмір органів і проліферацію а також і апоптоз та диференціювання клітин. Окрім того, HIPPO сигнальний каскад забезпечує і контактне інгібування росту та поділу клітин [153].

Рівень активності HIPPO сигнального каскаду визначається рівнем фосфорилування його основного медіатора - Yap. У ссавців, це фосфорилування здійснюється за участі основних компонентів сигналіngu, білків - Sav1 та Mob1 та кіназ Mst1/2 та Lats1/2 [14]. Так, було показано, що висока щільність клітин та кількість контактів сприяє утворенню комплексу білками Mst1/2, Merlin, Willin та Kibra у результаті чого відбувається фосфорилування білка Mst1/2. У свою чергу це призводить до фосфорилування Lats1/2 кінази білком Mst1/2 за участі Sav. Активована таким чином Lats1/2 кіназа фосфорилує сериновий залишок Yap у позиції 127, при

чому утворюється сайт для зв'язування останнього із білком 14-3-3, що є необхідною умовою для секвестрування Yap в цитоплазмі (рис. 1.6 *a*). На додаток до цього, фосфорилування Yap за сериновим залишком у позиції 381 кіназою Lats1/2 призводить до наступного фосфорилування Yap кінзамаи СК1 δ та ϵ і рекрутування лігази SCF^{beta-TRCP} E3, що в решты решт спричиняє поліубіквітинування та деградацію Yap. І навпаки, якщо описаний каскад фосфорилувань не відбувається, а таке можливо при низькій щільності клітин та міжклітинних контактів, то не фосфорильований Yap транслокується у ядро, та активує транскрипцію генів, зв'язуючись із транскрипційним фактором TEAD (рис. 1.6 *b*) [67].

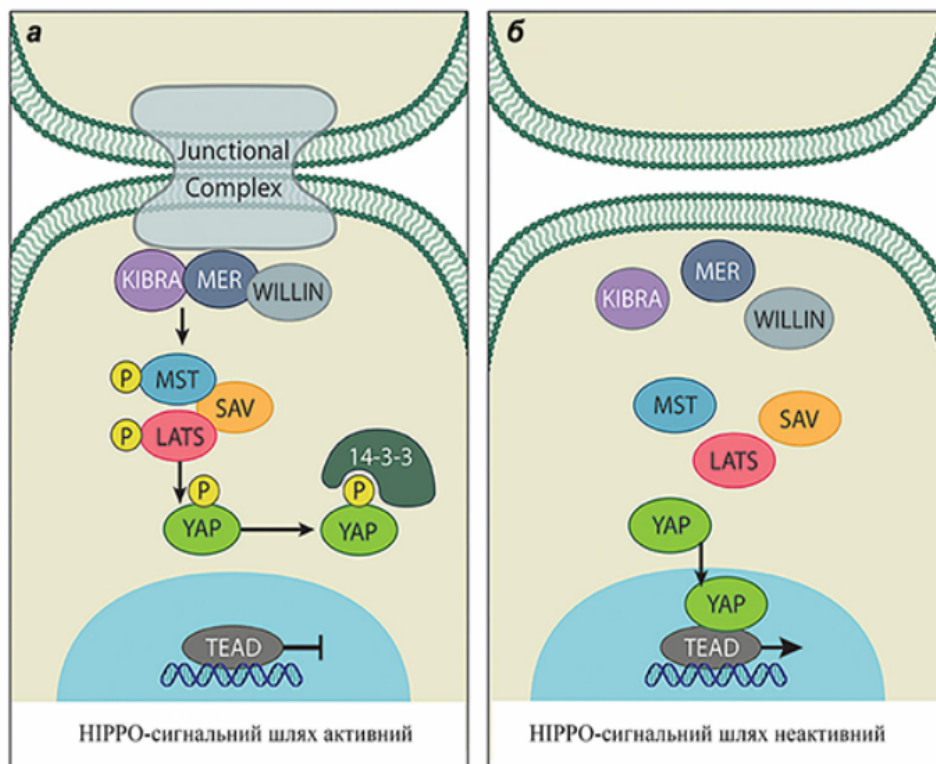


Рис. 1.6. Загальна схема реалізації HIPPO-сигналінгу за участі АК. За умови високої щільності міжклітинних контактів HIPPO-сигналінг активний, Yap секвеструється у цитоплазмі та не активує експресію генів-мішеней (*a*); при низькій кількості міжклітинних контактів каскад фосфорилування інгібується, що спричиняє транслокацію Yap у ядро із подальшою його транскрипційною активністю (*b*)

Як вже було зазначено, сигнальна активність HIPPO каскаду певним чином регулюється щільністю клітинних взаємодій, тож не дивно, що деякі білки міжклітинної адгезії безпосередньо залучені до регулювання його активності. Із застосуванням моделі генетичного нокауту, було з'ясовано, що нокаут гена *Cttnn1*, що кодує α -Е-катенін, призводить до підвищення Yap у ядрі незалежно від фосфорилування кіназами Lats1/2. У результаті, підвищення транскрипційної активності Yap у стовбурових клітинах волосяних фолікулів, спричиняло розвиток плоскоклітинної карциноми [222]. Детальніший аналіз молекулярних механізмів впливу α -катеніну на Yap1 залежну транскрипцію генів виявив, що при дисоціації АК зростає і ядерна локалізація Yap1, проте, α -катенін, котрий також вивільняється із АК, зв'язується із 14-3-3 та Yap1, що в решті решт призводить до секвестрування Yap1 у цитоплазмі [215]. У іншій роботі було показано, що α -катенін, пригнічує сигнальну активність Yap інгібуючи його фосфорилування Src-кіназою [139].

Із використанням у якості моделі *Drosophila*, було показано, що α -катенін приймає участь і у механочутливій регуляції HIPPO-сигнального каскаду. Так було, з'ясовано, що під час онтогенезу крил, механічне навантаження спричиняє зміни конформації білка α -катеніну, після чого він здатен зв'язуватись із Jub, білком, що залучає до комплексу і кіназу Wrts (гомолог кінази LATS1), ця низка подій спричиняє інгібування транскрипційної активності Yki (ортолог Yap) [204].

Тож, α -катенін не лише забезпечує утворення та підтримання міжклітинної адгезії а й баланс між адгезією та поділом клітин, модулюючи активність HIPPO-сигналіну.

1.3.5 Сигнальна активність інших білків ІД. Сигнальна функція була описана для вінкуліну (Vcl), білка асоційованого із АК та ЛМ. Було показано, що Vcl може зв'язуватись у мембрані із PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-біфосфат), який рекрутує регуляторні білки актину. Міцна взаємодія між Vcl і PIP2 сприяє фосфорилуванню останнього кіназою PI3Ks (фосфоінозитид 3-

кіназа класу I), в результаті чого генерується PIP3. Останній, як відомо, відіграє важливу функцію у фосфорлюванні Akt. І хоча, нині достеменно не зрозуміло, як саме Vcl впливає на PI3K, все ж таки Vcl залучено до регулювання сигнального каскаду PI3/ Akt, важливого для поділу, росту та апоптозу клітин.

Здатність регулювати експресію генів була нещодавно показана і для гена Sx43, а саме його ізоформи – Sx43-20k. Так з'ясувалось, що Sx43-20k безпосередньо залучена у регуляцію експресії гена N-кадгерину [128].

Отже, компоненти ІД, не лише здатні утворювати та підтримувати міжклітинні контакти, регулювати розмір та форму клітин, динаміку актину, а відтак і проліферацію і міграцію клітин, деякі білки, здатні регулювати експресію генів, модулюючи важливі сигнальні каскади клітин, що контролюють і диференціювання і проліферацію та міграцію, і розмір і апоптоз клітин. Усе це примушує нас переглянути функцію цих білків, та генів, що їх кодують, у процесах формування, розвитку та функціонування серця.

1.4 Сигнальна регуляція кардіогенезу та перебудов серця

1.4.1 Кардіогенез та його сигнальна регуляція. Розвиток серця – це складний і дуже динамічний процес. Як, вже неодноразово згадувалось, серце є першим органом, який утворюється в ембріоні, у мешей це відбувається приблизно на стадії розвитку E 6.5, під час гастрюляції, коли відбувається міграція та специфікація кардіальних клітин-попередників. Клітини мігрують з примітивної складки до передньо-латерального положення ембріону по обидві сторони від середньої лінії. Пізніше, на стадії E7.5, у мезодермальній складці, що лежить у основі голови можна вже виявити першу прокардіальну структуру, що утворюють ці клітини - “серцевий серп”. На стадії E8 попередники зливаються з утворенням першої примітивної серцевої

структури, серцевої трубки, яка потім утворює петлі і утворює S-подібну структуру. Нарешті, на стадії розвитку ембріону E14.5 можна розрізнити повністю сформоване серце із камерами та передсердями [192].

Наразі область формування серця поділяється на два поля і відповідно дві різні популяції клітин, а саме: перше серцеве поле (FHF) і друге серцеве поле (SHF) [65]. Деякі автори виділяють і третє серцеве поле (THF) [212], виділяючи додаткову популяцію мезодермальних клітин, які дають початок про-епікарду і синусовому вузлу. FHF це, власне серцевий серп, який і формує примітивну серцеву трубку, даючи початок лівому шлуночку (LV) і передсердям. Розширення примітивної серцевої трубки залежить від SHF, яке є своєрідним депо клітин для подальшого росту серця. Клітини SHF дають початок виносному тракту, передсердям та правому шлуночку (RV). Наразі ідентифіковані та прийняті певні генетичні маркери, що є типові для обох полів, а саме; Tbx5 є специфічним для FHF, в той час як Isl1, Fgf10, Tbx1 і Fgf8 визначають SHF [27,227].

Формування і розвиток серця хребетних - процес чітко врегульований збалансованою взаємодією між сигнальними каскадами Wnt/ β -катеніновим, Nodal/Activin, FGF і BMP сигналінгами [192].

У своєму огляді, ми, перш за все, зупинимось на розгляді функції канонічного Wnt сигналінгу у кардіогенезі оскільки його активність залежить від стабілізації одного з основних білків АК – β -катеніну, окрім того, здатність модулювати цей сигнальний каскад було показано і для α -Е-катеніну і γ -катеніну. Хоча відомо, що канонічний Wnt сигнальний каскад є важливим для кардіогенезу хребетних, наші знання щодо молекулярних механізмів його дії не повні а подекути є суперечливими. Дослідження ролі канонічного Wnt сигналінгу у кардіогенезі із застосуванням у якості моделей досліджень дрозофіл, ембріонів Xenopus, мишей та стовбурових клітин, дає змогу зробити висновок, що ефекти канонічного Wnt сигналінгу у згаданому процесі можуть бути різними і залежать від просторово-часового контексту.

Під час ембріогенезу індукція прекардіальної мезодерми і подальше формування FHF вимагає інгібування активності канонічного Wnt сигналіngu. Так, наприклад у мишей, у яких відсутній β -катенін, порушується респецифікація ендодерми в прекардіальну мезодерму, що призводить до утворення множинних серцевих примордій. Делеція β -катеніну, також спричиняє підвищення ектопічної експресії *Vmp2*, що спричиняє пригнічення активності канонічного Wnt сигналіngu [38]. Тож, інгібування канонічного Wnt і активація BMP каскадів є необхідною для правильної специфікації серцевої мезодерми. Взаємодія між канонічним Wnt сигналіngом та іншими регуляторними каскадами, що сприяють ініціації та розвитку FHF, була показана за допомогою лінії Notch-індукованих ембріональних стовбурових клітин миші (mESC). За умов використаної моделі, активація Notch сигналіngu у цих клітинах сприяла перепрограмуванню гемангіобласти в серцеву мезодерму шляхом пригнічення активності Wnt/ β -катенінового і підвищення активності BMP каскадів [38]. Аналогічно, формування серця потребує високої сигнальної активності BMP2 і низької активності Wnt/ β -катенінового каскаду у данію, *Xenopus* і ембріонів курей [38]. Нині відомо, що *Dkk1* і *Crescent* знижують активність канонічного Wnt, що є необхідною умовою для ініціювання експресії «серцевих» генів шляхом кооперації сигнальних каскадів BMP і FGF [217,92].

Серед найбільш критичних серцевих транскрипційних факторів (ТФ), що регулюються у такий спосіб – *Nkx2,5*, *Gata4* і *Gata6*. У *Xenopus* канонічний Wnt сигналінг функціонально кооперується із ТФ: *Gata4*, *Gata6* і *Nkx2.5*. Ця взаємодія відбувається на двох різних стадіях розвитку серця і необхідна для специфікації серця. А саме, на стадіях 8 і 18, Wnt/ β -катеніновий сигнальний каскад пригнічує експресію *Gata4* і *Gata6* в прекардіальній мезодермі. Ця подія передуює міграції кардіальних попередників до вентральної серединної лінії ембріона [1].

Правильна специфікація тканин вимагає білок-білкових взаємодій, та своєчасної сигнальної регуляції процесу. Наприклад, канонічний Wnt і β -

катенін мають двофазну сигнальну роль у розвитку серця: у FHF канонічний Wnt має інгібіторний ефект, однак індукує проліферацію у SHF. Інгібування транскрипційної активності β -катеніну у SHF призводить до зниження проліферації клітин і порушень розвитку, а також до інгібування розширення SHF [6]. Варто зауважити, що канонічний Wnt сигналінг підтримує клітинну популяцію SHF не лише в проліферативному стані, а також і у недиференційованому стані [122,130]. Умовний нокаут гена *CTNNB1*, що кодує β -катенін, в SHF-клітинах спричиняє зменшення кількості клітин в межах SHF, що спричиняє порушення формування виносного тракту і правого шлуночку [122]. Ці дані узгоджуються із результатами досліджень із застосуванням ембріональних стовбурових клітин, де було показано, що пригнічення активності канонічного Wnt сигналінгу необхідне для того, щоб прогеніторні клітини у області SHF вийшли із проліферативного стану і почали кардіальну диференціацію [201,162].

Крім того, у регулюванні диференціації клітин попередниць в SHF приймає участь і неканонічний Wnt сигналінг. Так, було показано, що відсутність *Wnt5a* і *Wnt11* сприяє підвищенню ядерної локалізації β -катеніну і впливає на диференціацію SHF [46]. Дійсно, високий рівень *Wnt5a* і *Wnt11* експресії у ембріональних клітинах індукує кардіогенез і запускає експресію кардіальних генів. Усе разом, це свідчить на користь думки по те, що утворення FHF і SHF, окрім іншого контролюється і неканонічним Wnt сигналінгом [46]. Загалом, Notch і неканонічний Wnt сигнальні каскади негативно регулюють активність канонічного Wnt сигналінгу і така взаємодія є критично необхідною для виходу із проліферації прогеніторів SHF.

Коли пул клітин SHF потрапляє до сформованої серцевої трубки, вони опиняються у області, де транскрипція генів опосередкована Wnt/ β -катеніновим каскадом повільно знижується, а активність BMP сигналінгу, навпаки, швидко зростає. Після цього, у клітинах SHF активується програма кардіальних генів і починається їхня специфікація і диференціація у кардіоміоцити [101,20,253]. Як вже згадувалось вище, клітини SHF дають

початок передсердя та венозному вузлу ембріонального серця. Для успішної специфікації клітин у передсердя необхідним є пригнічення активності канонічного Wnt сигналінгу, причому, переважно за рахунок дії неканонічних Wnt11 і Wnt5a [46]. В той же час, підвищення транскрипційної активності β -катеніну є необхідним для формування венозного тракту.

Вочевидь, канонічний Wnt сигналінг є одним із принципів регуляторів кардіогенезу, з огляду на це, білки, що здатні модулювати його активність, також залучені до контролю закладки та розвитку серця у ембріоні. Перш за все, це β -катенін – основний транскрипційний ко-фактор канонічного Wnt сигналінгу, та його гомолог γ -катенін. Проте, сигнальна функція останнього у контролюванні кардіогенезу не з'ясована, та і особливості γ -катенін залежної сигналізації потребують детальнішого дослідження. Ще один білок, що здатен регулювати активність канонічного Wnt сигналінгу – α -Е-катенін, і функція його у кардіогенезі не є достеменно з'ясованою. Окрім того, α -Е-катенін регулює і Hippo сигнальний каскад, який як відомо контролює розміри клітин та органів.

Контроль розмірів органів, мабуть, є однією з найдавніших таємниць біології. У мишей, трансгенна експресія YAP у печінці або нокаут гена Mst1/2 спричиняє збільшення органу майже до однієї чверті маси тіла миші. Цікаво, що розмір печінки зменшується до нормального рівня після приглушення експресії YAP. Тож, Hippo сигнальний каскад відіграє еволюційно консервативну роль у контролі за розмірами органів, включаючи і серце. І хоча розмір міокарду у ссавців строго контролюється протягом усього розвитку, наразі мало відомо про внутрішню регуляцію розміру серця і функцію Hippo каскаду у цьому процесі. Низка робіт із застосуванням нокаутних та трансгенних моделей свідчить на користь того, що Hippo каскад регулює розмір серця, запобігаючи входу кардіоміоцитів у мітоз, не впливаючи при цьому на швидкість проліферації [274].

1.4.2 Канонічний Wnt та HIPPO сигнальні каскади у міокарді.

Формування, функціонування та адаптації дорослого серця до гіпертрофічних стимулів, старіння, регенерації контролюється низкою сигнальних каскадів, серед яких: Wnt, HIPPO, Pi3K/Akt, MEK1-Erk1/2, cAMP/PKA, PPAR α , та AMPK сигнальні каскади [15,125]. Проте, у своєму огляді ми детальніше зупинимось на розгляді канонічного Wnt та HIPPO сигнальних каскадів, оскільки білки АК модулюють саме ці сигнальні системи клітини (підрозділ 1.3).

Як вже було детально охарактеризовано, канонічний Wnt сигналінг є одним із принципових регуляторів кардіогенезу (підрозділ 1.4.1). Однак, нині вважається, що у пізньому кардіогенезі та у постнатальному серці канонічний Wnt сигналінг пригнічується до базального рівня [211]. Проте, активація цього сигнального каскаду у ремоделюванні дорослого серця активно обговорюється і вивчається [259,181,65]. Про певний внесок Wnt сигналінгу у формування та функціонування дорослого серця свідчить і той факт, що у постнатальному серці було описано градієнтне поширення Wnt [265], що сприяє проліферації міоцитів серця.

Низка робіт, присвячених дослідженню ролі канонічного Wnt сигналінгу та β -катеніну у гіпертрофічному ремоделюванні серця, наразі не дає однозначної відповіді щодо його функції. Так, існують експериментальні дані, котрі свідчать, що пригнічення транскрипційної активності β -катеніну пригнічує розвиток гіпертрофії міокарду. Наприклад, активація GSK3 β , кінази що залучена до фосфорилування β -катеніну, пригнічує гіпертрофічну відповідь [80]. Встановлено, що деякі класичні гіпертрофічні стимули, такі як фенилефрин, ендотелін 1, хлорид літію активують опосередковану β -катеніном транскрипцію генів, інгібуючи активність GSK3 β [228].

Ці дані узгоджуються із іншими роботами, де із застосуванням трансгенних мишей (мають надмірну експресію гена *Dvl-1*), було продемонстровано, що активація Wnt/ β -катенінового каскаду призводить до летальності мишей та розвитку у них гіпертрофії [151]. Автори повідомляють

про підвищення сигнальної активності β -катеніну у таких тварин та експресії його генів – мішеней (*CyclinD1* та *c-Myc*). Варто зауважити, що у цій роботі, було також показано, активацію як канонічного так і неканонічного Wnt каскаду. Причому, активацію неканонічного Wnt спостерігали у серцях з уже розвиненою гіпертрофією десь через три місяці спостережень. Аналогічні результати були отримані і у моделі *in vitro* [151]. Окрім того, було показано, що активація канонічного Wnt за рахунок експресії конститутивно стабілізованого білка β -катеніну призводить до гіпертрофії кардіоміоцитів у культурі [78]. І навпаки, у модельних тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* спостерігали пригнічення гіпертрофічної відповіді за умов дії специфічних стимулів (ТАК) [199].

З іншого боку, існує думка, що для ефективної адаптації серця до дії гіпертрофічних стимулів канонічний Wnt сигналінг повинен бути пригніченим, так автори показали що нокаут гена *Ctnnb1*, у серцях дорослих тварин, спричиняє розвиток гіпертрофії. Тоді як у серцях тварин, що експресують конститутивно активну форму β -катеніну гіпертрофія не розвивалась навіть при дії специфічного стимулу (ангіотензин II) [16].

Тож, вочевидь канонічний Wnt-сигналінг має важливе значення не лише у кардіогенезі а й у постнатальному міокарді, проте його функція там дещо дискусивна і потребує детальнішого аналізу.

Важливу роль у формуванні постнатального міокарду, його росту, розміру, адаптації до дії гіпертрофічних стимулів відіграє і HIPPO – сигнальний каскад. Як вже згадувалось вище, це еволюційно консервативний сигналінг, що обмежує розмір органів пригнічуючи проліферацію клітин та сприяючи апоптозу [274]. Низка експериментальних робіт із застосуванням нокаутних та трансгенних тварин свідчить на користь того, що цей каскад відіграє ключову роль в регуляції проліферації кардіоміоцитів і розміру серця як за фізіологічних умов так і при гіпертрофічному ремоделюванні і при регенерації.

Із застосуванням *Mst1* трансгенних мишей [262] було показано, що пригнічення активності HIPPO-сигнального каскаду у серці призводить до

дилатаційної кардіоміопатії, яка однак, не супроводжувалась ре-активацією фетальних або ж гіпертрофічних генів [262]. Думка про те, що активація HIPPO каскаду пригнічує гіпертрофію серця узгоджується і з результатами іншої роботи де було показано, що при підвищенні артеріального тиску, у серці відбувається активація MST1 що корелює із рівнем апоптозу [205]. Експериментальні роботи із застосуванням делеції іншого компонента цього каскаду – *Lats2*, показали, що цей ген також пригнічує гіпертрофію. Так у мутантних серцях не спостерігали підвищення рівню апоптозу, розвитку дилатаційної кардіоміопатії та збільшення розмірів міоцитів і серця [157].

Цікаво, що у тварин із нокаутом гена *Yap* спостерігали фенотип подібний до такого що розвивався у мишей із підвищеним рівнем експресії *Mst1*. Нокаут цього гена у ранньому ембріогенезі спричиняв летальність ембріонів, тоді як делеція його, після закладки першого та другого серцевих полів (E10,5), спричиняла летальність тварин віком 20 тижнів. У таких мутантних мишей спостерігали розвиток дилатаційної кардіоміопатії та серцевої недостатності [206].

У кардіоміоцитах *in vitro*, було показано, що підвищення експресії YAP спричиняє збільшення розмірів клітин, тоді як нокдаун YAP – навпаки пригнічує їхню гіпертрофічну відповідь [206]. Цікаво також, що нещодавно було показано, що рівень експресії YAP посилюється, а фосфорилування YAP послаблюється у міокарді пацієнтів з гіпертрофічною кардіоміопатією [246], що свідчить про роль YAP в патогенезі гіпертрофічної хвороби серця людини.

Окрім іншого, HIPPO-сигнальний каскад здатен взаємодіяти і з іншими сигнальними шляхами, що приймають участь у контролі розвитку та ремоделюванні серця, а саме з PI3K-AKT-mTOR сигнальним шляхом. Останній є критичним регулятором розміру клітин [131]. HIPPO-сигнальний каскад може модулювати синтез mTOR і білка через YAP-залежну індукцію miR-29 і інгібування PTEN.

Таким чином, така взаємодія цих сигнальних каскадів може відігравати певну роль і у розвитку гіпертрофії серця. Як відомо, механічне навантаження є

поширеною причиною серцевої гіпертрофії [166]. І як уже згадувалося вище, HIPPO сигнальний каскад реагує на механічний стрес а відповідно і на можливі зміни чи порушення білків що забезпечують клітинні контакти, жорсткість та форму клітин та інше [55].

1.5 Дослідження функції генів АК у міокарді

З розвитком нокаутних та трансгенних технологій було створено експериментальні моделі мишей, які дозволяють вивчати функцію окремих генів у розвитку та гомеостазі тієї чи іншої структури. Саме з використанням таких тварин було показано, що делеція гена *Cdh2* у дорослому серці призводить до яскраво вираженої тахікардії шлуночка, внаслідок якої наступала смертність дослідних мишей протягом 2 місяців. У таких тварин спостерігали повну дисоціацію структурних компонентів ІД – АК, десмосом та ПЗ. Автори спостерігали фіброзис тканини серця мутантних тварин та підвищення кількості багатоядерних кардіоміоцитів [126]. Окрім того, делеція *Cdh2* та відсутність його продукту, білка N-кадгерину, в серці мишей супроводжувалась суттєвим зменшенням рівня експресії конексину 43, основного білка порових з'єднань міокарда, що і спричиняло порушення системи генерації та підтримання електричного імпульсу.

Зв'язок між N-кадгерином та конексином 43 було показано і у дослідженнях гетерозиготних за делецією гена *Cdh2* серцях дорослих мишей. Автори довели, що не лише повна відсутність кадгерину а й його дефіцит у тканині міокарда призводить до порушення генерації та передачі електричного імпульсу внаслідок зниження експресії конексину 43 [135]. У таких тварин спостерігали розвиток спонтанної серцевої аритмії. Загалом, на ґрунті своїх даних автори висловлюють припущення, що порушення організації АК у тканині серця дорослих мишей, внаслідок дефіциту або повної відсутності N-

кадгерину, може бути механізмом розвитку серцевої аритмії. Цікаво, що у людей, мутація цього гену була ідентифікована зовсім недавно, так лише у 2017 році було опубліковано роботу про зв'язок мутації гена *CDH2* та спадковою аритмогенною кардіоміопатією (підрозділ 1.2).

Із застосуванням нокаутних тварин було показано, що порушення міжклітинної адгезії шляхом спрямованої делеції гена *Vcl* призводить до раптової смертності нокаутних тварин внаслідок розвитку тахікардії шлуночків. У результаті цієї роботи було показано, що близько 49 % нокаутних тварин віком до трьох місяців гинули внаслідок тахікардії, інші тварини гинули у віці шести місяців внаслідок дилатаційної кардіоміопатії [272].

Порушення організації АК на рівні зв'язку кадгерину та актинового цитоскелету були досліджені кількома незалежними групами з використанням нокаутних як за β – так і за α – катеніном тварин.

У результаті таких досліджень було виявлено, що нокаут гена *Ctnna3* у міокарді спричиняє дилатаційну кардіоміопатію. Причому, це супроводжується порушеннями структури області композита без змін організації АЗ та десмосом [136]. Окрім того, у таких тварин спостерігали і зменшення рівня експресії *Sx43*, що асоціювалося із аритмією [136].

Нокаут гомолога гена *Ctnna3*, гена *Ctnna1* також призводив до розвитку дилатаційної кардіоміопатії. У тварин віком 8 місяців спостерігали зменшення експресії білків АК: N-кадгерину та *Vcl*, що вказує на порушення структури АК у таких тварин [220]. Проте, летальність у мутантних тварин, спостерігали лише після експериментального інфаркту [220]. Це узгоджується із результатами іншої групи авторів, де у тварин, що експресували мутантний білок α -Е-катеніну, летальність зростала після інфаркту [25].

Практично одночасно із нашою роботою було показано, що подвійний нокаут генів *Ctnna3* та *Ctnna1* у кардіоміоцитах спричиняв порушення темпу проліферації міоцитів серця через підвищення транскрипційної активності *Yap* [137]. Причому, порушення АК у мутантних серцях автори не спостерігали [137]. Окрім того, у таких тварин, завдяки активації *Yap* залежної транскрипції,

відбувалось покращення функції міокарду після інфаркту [137]. На думку авторів, α -катенін має потенціал у якості терапевтичної мішені при інфаркті міокарду, завдяки його участі у сигнальних каскадах клітини що регулюють поділ та ріст.

При нокауті гена *Ctnnb1* у кардіоміоцитах, не спостерігали порушень структури десмосом та АК, ймовірно за рахунок підвищення експресії γ -катеніну [39], проте спостерігали порушення активності канонічного Wnt сигналіngu при розвитку як фізіологічної так і патологічної гіпертрофії серця. Загалом, саме сигнальна функція продукту гена *Ctnnb1*, білку β -катеніну, у контексті ремоделювання міокарду, викликає найбільший інтерес.

Так, було встановлено, що експресія конститутивно стабільної форми β -катеніну викликає спонтанну гіпертрофію кардіоміоцитів *in vitro* [78]. Не менш цікавим є спостереження, що умовна кардіоспецифічна делеція тільки одного алелю гена *Ctnnb1* сприяла зниженню гіпертрофічної відповіді після звуження аорти порівняно з контрольною групою мишей, але супроводжувалась підвищенням фетальних генів [200]. Це вказує на те, що розвиток гіпертрофії відбувається за умови підвищення сигнальної активності β -катеніна.

На противагу цій низці робіт, було показано, що делеція гена *Ctnnb1* у дорослих кардіоміоцитах викликає розвиток гіпертрофії [16]. І у той же час автори спостерігали відсутність гіпертрофічного ремоделювання міокарду після ін'єкції ангіотензину II у мишей з конститутивно стабілізованим β -катеніном. Важливо зауважити, що у цій роботі, автори при оцінці та характеристиці гіпертрофії обмежувалися аналізом змін розмірів кардіоміоцитів і рівнем експресії ANP (одним із маркерів гіпертрофії). Тоді, як у інших роботах застосовувався більш комплексний підхід [192], аналізували і зміни індексу ваги серця до тіла, рівень експресії інших гіпертрофічних маркерних генів (*BNP*, *α -MHC*, *β -MHC*) та/або експресії генів - мішеней β -катеніну (*CyckinD1*, *c-Myc*, *c-Fos*).

Гетерозиготна делеція гена *Jup* у кардіоміоцитах, не призводила до летальності мутантних тварин і не спричиняла порушень структури ІД, однак

автори спостерігали витончення стінки правого шлуночку та розвиток спонтанної аритмії у таких тварин із віком (5-6 місяців) та при тривалих фізичних навантаженнях [121]. Однак, у іншій роботі умовний нокаут гена *Jup* у серцях дорослих тварин призводив до втрати кардіоміоцитів, фіброзу та запалення, усе разом це спричиняло серцеву дисфункцію подібну до тієї, що спостерігається у пацієнтів із аритмогенною кардіоміопатією [138].

Тож, такий короткий огляд наявних експериментальних робіт свідчить про те, що гени АК мають принципове значення як у кардіогенезі так і у функціонуванні та ремоделюванні дорослого серця за рахунок їхньої важливої адгезивної та сигнальної функції. Функція білків у утворенні та підтриманні цілісності міжклітинної адгезії і клітинних контактів є більш менш зрозумілою, тоді як сигнальна функція цих генів є не з'ясованою або дещо спірною, особливо у таких процесах як ремоделювання серця у дорослих тварин, його адаптації до гіпертрофічних стимулів, тощо.

Тож метою даної роботи було з'ясувати функцію генів АК (*Cttnn1*, *Cttnb1* та *Cdh2*) та їхніх продуктів, що приймають участь у підтриманні адгезії і регулюванні сигнальних каскадів у кардіогенезі та постнатальному серці. Дослідити особливості кардіогенезу та формування постнатального міокарду за умови нокауту досліджуваних генів у ембріональних кардіоміоцитах.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали та обладнання

2.1.1 Біологічні матеріали. При проведенні досліджень використовували низку біологічних матеріалів: маркери для визначення молекулярної ваги ДНК та білка для електрофорезу, ембріональну сироватку великої рогатої худоби (ВРХ), бичачий сироватковий альбумін, желатин.

При дослідженні змін вмісту білків використовували комерційні первинні антитіла проти: α -катеніну (1:1000, Sigma, c-2081), β -катеніну (1:1000, SantaCruz Biotechnology, sc-7963), активного β -катеніну (1:1000, Millipore, 05-665), GSK3 β (1:1000, Cell Signaling, 5676), pGSK3 β (1:1000, Cell Signaling, 8566), γ -катеніну (1:1000, BD Biosciences610253), Akt1 (1:1000, SantaCruz Biotechnology, sc-1618), pAkt Ser-473 (1:500, SantaCruz Biotechnology, sc-101629), pAkt Thr-308 (1:500, SantaCruz Biotechnology, sc-135650), ERK1/2 (1:1000, Cell Signaling, 9102), pERK1/2 Thr-202/Thr-204 (1:1000, Cell Signaling, 4377), AMPK α 1/2 (1:500, SantaCruz Biotechnology, sc-25792), pAMPK α Thr-172 (1:500, SantaCruz Biotechnology, sc-33524-R), PKA (1:1000, Cell Signaling, 4782), pPKA (1:1000, Cell Signaling, D45D3), HSL (1:1000, Cell Signaling, 4107), pHSL Ser-565 (1:1000, Cell Signaling, 4137), pHSL Ser-563 (1:1000, Cell Signaling, 4139), ACC (1:1000, Cell Signaling, 3662), pACC Ser-79 (1:1000, Cell Signaling, D7D11), Axin-1 (1:1000, Cell Signaling, 3323), PPR α (1:1000, SantaCruz Biotechnology, sc-9000) and Gapdh (1:1000, Cell Signaling, 5174); та вторинні кон'юговані із пероксидазою антитіла проти мишиних (1:10000, Cell Signaling, 7076) та кролячих антитіл (1:10000, Cell Signaling, 7074).

2.1.2 Реактиви. Для культивування ізолюваних клітин використовували мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM).

У низці експериментів з вивчення активності канонічного Wnt сигналіngu застосовували LiCl (вітчизняного виробництва) та AngII (Sigma, USA, A9525).

У решті молекулярно-генетичних, біологічних та гістологічних дослідженнях використовували низку наступних реагентів: додецилсульфат натрію (ДСН), тріс(гідроксиметил)амінометан (Tris), етилендіамінтетрааміноацетат натрію (EDTA₂Na), гематоксилін, еозин, фуксин кислий, пікринова кислота, масляний червоний О, 3-4,5-диметилтіазол-2,5-діфенілтетразоліум бромід (МТТ-реагент), хлороформ, ізопропанол, бісакриламід, тетраметилетилендіамін, фенілметилсульфонілфлуорид, ДМСО, набори для виділення РНК та синтезу кДНК, набори для ПЛР та ПЛР в реальному часі (ThermoFisher Scientific, США), Inusolve (AnalytikJena, Німеччина), парафін, середовище для заморожування тканини для криозрізів ОСТ (Leica, США), PBS, диметилсульфоксид, агароза, етидій бромід, β-меркаптоетанол, акриламід, PVDF-мембрана, люмінол, кумарикова кислота, (Merck, Німеччина), пеніцилін, стрептоміцин, HCl, NaOH, рідкий азот (вітчизняного виробництва), SureBeadsTM Prot G Magnetic Beads (Bio-Rad), хлорид натрію (NaCl), глікоген, формальдегід, коктейль інгібіторів протеаз (PIC Roche), SDS, авертин, уретан.

2.1.3 Застосовані праймери. Для генотипування мишей та ембріонів [240] використовували пари праймерів наведені у табл. 2.1. Аналіз змін рівнів експресії фетальних (або гіпертрофічних) генів, генів залучених до канонічного Wnt сигналіngu а також генів - мішеней Wnt та HIPPO-сигнальних каскадів [138,229,175] проводили із застосуванням праймерів наведених у табл. 2.2.

Підбір праймерів здійснювали стандартно за допомогою програми Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). При підборі праймерів намагалися відбирати послідовності довжиною 16 – 25 нуклеотидів, де

співвідношення Г/Ц становило орієнтовно 50-60%, а різниця у температурі поавління не перевищували би 6 градусів.

Таблиця 2.1

Праймери, що використовувалися для генотипування

Ген	Праймер	Послідовність	Розмір фрагменту, пн
<i>Cdh2</i>	Прямий	5'-TACAG TTTGGGTGACAAGC- 3'	250 (WT-алель) та 290 (Flox-алель)
	Зворотній	5' - CCAAAGCTGAGTGTGA CT-3'	
<i>Ctnnb1</i>	Прямий	5'-AGGTAGAGTGATGAAAGTTGTT-3'	221 (WT-алель) та 324 (Flox-алель)
	Зворотній	5'-CACCATGTCCTCTGTCTATTC-3'	
<i>Ctnna1</i>	Прямий	5'-CATTTCTGTCACCCCCAAAGACAC-3'	350 (Flox-алель) та 100 (WT-алель)
	Зворотній	5'-GCAAAATGATCCAGCGTCCTGGG-3'	
BatGal/ RosaR 26R	Прямий	5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'	374 (WT-алель) та 500 (Мутантна алель)
	Прямий	5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'	
	Зворотній	5'-AAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'	
$(\alpha$ - <i>MHC</i>)- <i>Cre</i>	Прямий	5'-CAGAACCTGAAGATGTTTCGC-3'	430
	Зворотній	5'-TACACCTCGGTGCTA ACCAG-3'	

Валідацію результатів ChIP проводили за допомогою праймерів наведених у таблиці 2.3. Підбір праймерів здійснювали стандартно, як описано вище.

Таблиця 2.2

Праймери, що використовувалися при дослідженні змін рівнів експресії генів

Назва гена	Праймер	Послідовність	Розмір фрагменту, пн
<i>ANP</i>	Прямий	5'-CATCACCTGGGCTTCTTCCT-3'	405
	Зворотній	5'-TGGGCTCCAATCCTGTCAATC-3'	

(продовж. табл 2.2.)

<i>BNP</i>	Прямий	5'-GCGGCATGGATCTCCTGAAGG-3'	418
	Зворотній	5'-CCCAGGCAGAGTCAGAAACTG-3'	
<i>β-МНС</i>	Прямий	5'-ATGTGCCGGACCTTGGAA-3'	170
	Зворотній	5'-CCTCGGGTTAGCTGAGAGATCA-3'	
<i>α-МНС</i>	Прямий	5'-GGCACAGAAACACCTGAAGA-3'	80
	Зворотній	5'-CATTGGCATGGACAGCATCATC-3'	
<i>c-Fos</i>	Прямий	5'-CCGACTCCTTCTCCAGCAT-3'	93
	Зворотній	5'-TCACCGTGGGGATAAAGTTG-3'	
<i>CyclinD1</i>	Прямий	5'-CCACAGATGTGAAGTTCATTTCCA-3'	161
	Зворотній	5'-GCAGTCCGGGTCACTTG-3'	
<i>c-Myc</i>	Прямий	5'-GCCCCTAGTGCTGCATGAG-3'	95
	Зворотній	5'-CCACAGACACCACATCAATTTCTT-3'	
<i>TCF-4</i>	Прямий	5'-AACGGAACAGACAGTATAATGG-3'	147
	Зворотній	5'-ACAGGAGTTGAAGGATTAGG-3'	
<i>Jup</i>	Прямий	5'-CCTGTGGACTCTGCGCAAT-3'	135
	Зворотній	5'-GACCAGGATCTTCAGCACACTCT-3'	
<i>Axin2</i>	Прямий	5'-GAGTAGCGCCGTGTTAGTGACT-3'	296
	Зворотній	5'-CCGAAAGTCCGGAAGAGGTATG-3'	
<i>Ctgf</i>	Прямий	5'-CAAGGACCGCACAGCAGTT-3'	124
	Зворотній	5'-AGAACAGGCGCTCCACTCTG-3'	
<i>Il1rl1</i>	Прямий	5'-TGGGCTTTGGCAATTCTGACAC-3'	122
	Зворотній	5'-TAAGTCGAGCGTCCTCTTTGGG-3'	
<i>Tnfrsf1b</i>	Прямий	5'-CGCCTGCACTAAACAGCAGAAC-3'	105
	Зворотній	5'-TTGCTCAGCCTCATGCACTGTC-3'	
<i>Aurka</i>	Прямий	5'-GGGTGGTCGGTGCATGCTCCA-3'	167
	Зворотній	5'-GCCTCGAAAGGAGGCATCCCCACTA-3'	
<i>Gapdh</i>	Прямий	5'-TGGCCTGCTGAGAACCTACA-3'	108
	Зворотній	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

Синтез праймерів проводили у відділі геноміки людини ІМБГ НАН України. Синтез праймерів наведених у табл. 2.3. проводили у Інституті молекулярної та клітинної біології, Варшава, Польща.

(продовж. табл. 2.3.)

<i>c-Мус-2</i>	Прямий	ССТАААТGACCCСТTGTCTC	140
	Зворотній	TGGTGAATTAAAGTCCCAAAGAC	
<i>c-Мус-3</i>	Прямий	AGACTCACCCСТCAGCTTCAAC	132
	Зворотній	CCCСТTTTGCTAATCCTTTG	
peg	Прямий	CCATTCCTATGACTGTAGAT	140
	Зворотній	CAATCAAGACGTTCTTTCCAG	

2.1.4 Обладнання. Джерело струму MP300-N (MS, США), центрицентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), мікроскоп PrimoStar (Carl Zeiss Microscopy, Німеччина), флуоресцентний мікроскоп Leica DM 1000 (Leica Microsystems, Німеччина), конфокальний мікроскоп Zeiss LSM510/uv Axiovert 200M, центрифуга Marathon Micro A (Fisher Scientific, США), камера для горизонтального електрофорезу (Cleaver, США), шейкер (BIOSAN, Литва), CO₂-інкубатор Jouan IGO 150 Cell Life (Thermo Fisher Scientific, США), фотометр для виміру оптичної густини ELx800 (BioTek, США), водяна баня (BIOSAN, Литва), термоциклер T-CY (Crea-Con, Нідерланди), ампліфікатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США), мікротом для нарізання парафінових зрізів (Leica, Німеччина), кріостат для нарізання заморожених секцій (Leica, Німеччина), прилад для аналізу кардіогемодинамічних параметрів Millar (Millar Instruments, USA), прилад для фрагментації хроматину Bioruptor® Pico (Diagenode), iCycler single-color real-time PCR detection system (IQ5, BioRad), міноісмотичні насоси виробництва ALZET модель 2002 (кат №10251-11, США), спектрофотометр NanoDrop (Bio-Rad, США), Bioruptor® Pico (Diagenode), автоматичні піпетки, штангенциркуль, термостат на 55°C, ваги, торсійні ваги, одноразові мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл та 0,2 мл, одноразові наконечники для автоматичних піпеток, пластикові планшети на 12 та 96 лунок.

2.2 Опис тварин, та схем схрещування, використаних при проведенні дослідження

Усі дослідження на тваринах проводили згідно європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також схвалені комісією з біоетики ІМБГ НАН України.

Для проведення дослідження у якості модельних об'єктів використовували колекцію лінійних, трансгенних та умовнонокаутних тварин. Усі тварини утримувались у віварії ІМБГ НАН України за стандартних умов: температура у віварії становила 22-24°C, тривалість дня контролювалась штучно та становила 16 годин. У різних експериментах використовували тварин різного віку (1, 3, 6, 10 та 11 місяців) також використовували ембріони мишей на різних термінах гестації (E10,5, E12,5 та E14,5) та новонароджених мишей (P1-3). Тварин забивали методом цервікальної дислокації, а новонароджених мишенят методом – декапітації.

2.2.1 Експериментальні моделі. CB57BL широко поширена лінія лабораторних мишей, що використовуються при самих різноманітних дослідженнях і не містить модифікацій геному.

α MHC-Cre трансгенні миші - експресують фагову Cre-рекомбіназу під контролем промотору важкого ланцюга α -міозину (α MHC або alpha-MHC; *Myh6*), Варто зауважити, що у цій моделі Cre-рекомбіназа активна лише під контролем тканино-специфічного промотору і виключно у кардіоміоцитах починаючи з 10,5 доби ембріонального розвитку. Тобто після утворення серцевої трубки. Cre-рекомбіназа здатна розпізнавати та вирізати любі ділянки ДНК, що фланковані LoxP сайтами. Промотор забезпечує ефективну

рекомбінацію, вище ніж 90% у кардіоміоцитах. У інших тканинах, як печінка, легені, м'язи, селезінка або інші типи клітин серця рекомбінація не виявлена.

α MHC-Cre тварини генеровані Dr. Michael Schneider (Baylor College of Medicine, United States) та люб'язно надані у наше розпорядження Dr. G. L. Radice (Jefferson Medical College, USA) [2].

BATGAL лінія репортерних мишей (синонім - β -catenin/TCF/LEF репортерні трансгенні миші). Цей трансген був створений шляхом злиття TCF/LEF сайту зв'язування та 0,13 кб фрагмента, що містить мінімальний промотор ТАТА-боксу гена *Siamois* [154]. Особливістю цієї лінії трансгенних мишей є те, що при активації канонічного Wnt сигналіngu та зв'язування β -катеніну із транскрипційним фактором TCF/LEF відбувається не лише активація транскрипції генів – мішеней β -катеніну а й гену бактеріальної β -галактозидази. Ці тварини використовуються для ідентифікації мутацій що впливають на Wnt-сигнальний шлях, та виявлення популяцій клітин де Wnt-сигналінг та β -катенін є активними під час ембріонального розвитку чи розвитку патологій дорослого організму.

Rosa26R репортерні миші (B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}/J) тварини експресують бактеріальну бета-галактозидазу (*lacZ*) після схрещування з Cre трансгенними лініями, експресія *lacZ* спостерігається у тканинах і клітинах де є наявною експресія Cre-рекомбінази. Використовуються як Cre-репортерні лінії; для оцінки експресії Cre у клітинах чи тканинах трансгенних тварин. Миші були створені та описані Philippe Soriano; депозит у Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) та люб'язно надані нам Dr. G. L. Radice (Jefferson Medical College, USA) [66].

N-cad^{flox/flox} миші – лінія мишей із умовним нокаутом гена *Cdh2*. Тварини містять у своєму геномі *loxP* сайти, що фланкують екзон 1, гена *Cdh2* (або *Ncad*). Стратегія створення генетичного нокауту наведена у Додатку Б. Лінія використовується при дослідженнях фізіології міокарду та аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка. Ця лінія мишей була створена Dr Igor

Kostestkii та Dr. Glenn Radice і люб'язно надана у наше розпорядження Dr. G. L. Radice (Jefferson Medical College, USA) [126].

α -E-catenin^{flox/flox} миші – умовнонокаутні миші, містять у своєму геномі *loxP* сайти що фланкують екзон 2 гена *Cttnn1* (α -Е-катенін). Стратегія створення генетичного нокауту наведена у Додатку В. Миші були отримані із Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) і люб'язно надані у наше розпорядження Dr. G. L. Radice (Jefferson Medical College, USA) [240].

β -catenin^{flox/flox} миші тварини містять у своєму геномі *loxP* сайти, що фланкують інтрони 1 та 6 гену *Cttnnb1* (β -катенін). Стратегія створення генетичного нокауту наведена у Додатку Г. Тварини були генеровані із використанням бластоцист мишей лінії C57BL/6J та мишей лінії C57BL/6J Миші були отримані із Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) і люб'язно надані у наше розпорядження Dr. G. L. Radice (Jefferson Medical College, USA) [28].

2.2.2 Схеми схрещувань трансгенних тварин. На першому етапі роботи, для отримання тварин із делецією гену-інтересу у ембріональних кардіоміоцитах, схрещували тварин, що експресують ген фагової Cre-рекомбінази під контролем промотора гена важкого ланцюга міозина α (α -MHC-Cre), з тваринами іншої репортерної лінії мишей, а саме Rosa26R. Варто зазначити, що α -MHC промотор, досить добре охарактеризований і експресується у ембріональному серці після закладки першого та другого серцевих полів виключно у кардіоміоцитах. Тож, і контрольований ним ген Cre-рекомбінази, експресується лише у кардіоміоцитах починаючи з тих же ж термінів ембріогенезу [2,147]. Застосування такої конструкції Cre-рекомбінази робить можливим вивчення функції гену-інтересу за умови його генетичного нокауту виключно у кардіоміоцитах починаючи із 10,5 доби ембріогенезу. Незважаючи на те, що цей промотор досить добре описано та валідовано, ми у своїй роботі, при дослідженні ролі гена *Cdh2* у кардіогенезі, застосовували і репортерну лінію Rosa26R. Остання є Cre-репортером і експресує бактеріальну

β -галактозидазу лише у клітинах де є активною і Cre-рекомбіназа. Такі тварини із 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* детальний опис тварин подано вище, стратегії генетичного нокауту подані у Додатках Б-Г.

Детальніше, гомозиготних мишей за умовним нокаутом гена-інтересу (Flox/Flox; α MHC-Cre⁻) схрещували із мишами із генотипом WT/WT; α MHC-Cre⁺; Rosa26R⁺. Потомство F1 зворотно схрещували із Flox/Flox; α MHC-Cre⁻ мишами (рис. 2.1).

Потомство F2 використовували в подальших дослідженнях: Flox/WT; α MHC-Cre⁺; Rosa26R⁺ – миші із гетерозиготною делецією досліджуваного гена (гетерозиготи), Flox/Flox; α MHC-Cre⁺; Rosa26R^{+/-} – миші із гомозиготною делецією гена -інтересу (гомозиготи), Flox/WT; α MHC-Cre⁻; Rosa26R^{+/-} та Flox/Flox; α MHC-Cre⁻; Rosa26R^{+/-} – тварини контрольної групи.

Варто зауважити, що при проведенні досліджень впливу нокауту генів на постнатальний розвиток серця, його ремоделювання, схема схрещування тварин була спрощеною, а саме для генерації дослідних тварин ми не залучали до схрещування репортерних мишей лінії Rosa26R. Тож, генотипи були наступними: Flox/WT; α MHC-Cre⁺ – миші із гетерозиготною делецією досліджуваного гена (гетерозиготи), Flox/Flox; α MHC-Cre⁺ – миші із гомозиготною делецією гена-інтересу (гомозиготи), Flox/WT; α MHC-Cre⁻ та Flox/Flox; α MHC-Cre⁻ – тварини контрольної групи.

Вміст білків – продуктів генів *Cttna1* та *Cttnb1* у серцях дорослих або новонароджених тварин перевіряли за допомогою Вестерн-блоту. На Рис. 2.2 наведено типові денситограми, на яких видно зниження кількості α -Е-катеніну у лізатах сердець мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну та повна відсутність білка – у гомозиготних за нокаутом гена α -Е-катеніну серцях тварин (рис. 2.2 *a*). Аналіз вмісту білка β -катеніну у лізатах отриманих із новонароджених сердець тварин (P1-2) із гетеро – та гомозиготним нокаутом гена

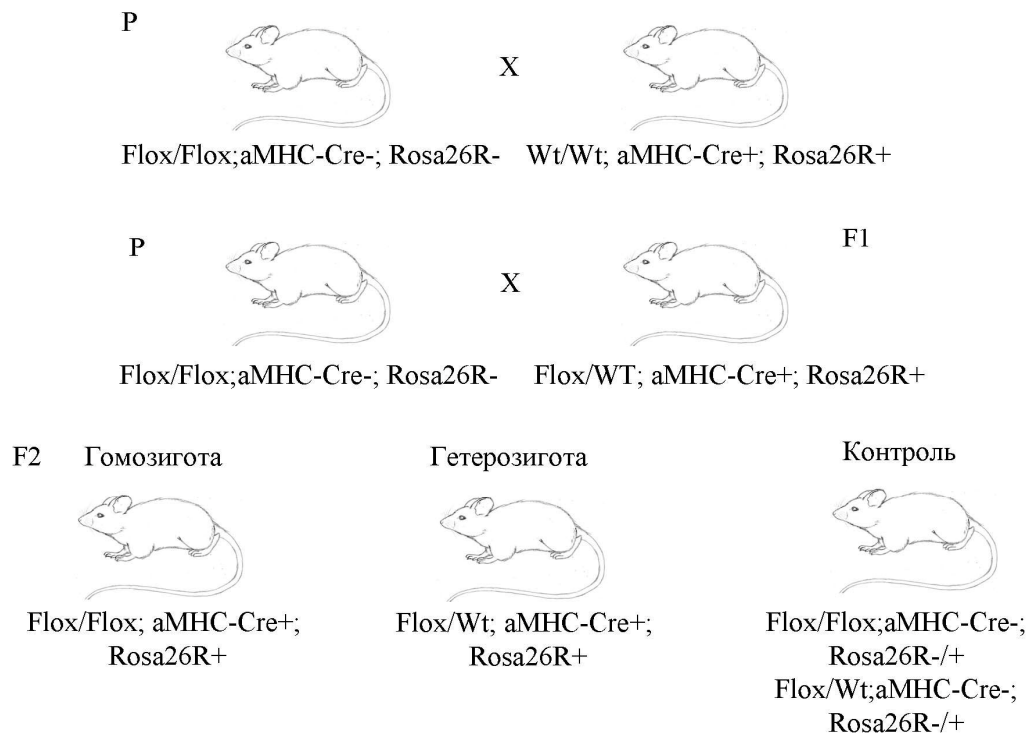


Рис.2.1. Схема схрещування мишей для отримання тварин. Flox/Flox; αMHC-Cre⁻; Rosa26R⁻ – миші не експресують Cre-рекомбінази, β-галактозидази і мають фланковану LoxP-сайтами ділянку гену (залежно від лінії); Flox/WT; αMHC-Cre⁻; Rosa26R⁻ – миші гетерозиготні за умовним нокаутом досліджуваного гена, що не містять генів Cre-рекомбінази і β-галактозидази; WT/WT; αMHC-Cre⁺; Rosa26R⁺ – миші що експресують гени Cre-рекомбінази та β-галактозидази; Flox/Flox; αMHC-Cre⁺; Rosa26R⁺ - миші із делецією двох алелів гена-інтересу (гомозиготи); Flox/WT; αMHC-Cre⁺; Rosa26R⁺ - миші із гетерозиготною делецією досліджуваного гена (гетерозиготи)

Ctnnb1 не виявив суттєвого зменшення вмісту білка у тварин із гетерозиготним нокаутом порівняно із контрольними тваринами того ж віку (рис. 2.2. б). Останнє може пояснюватись особливостями експресії цього гена зважаючи на його критичну сигнальну функцію.

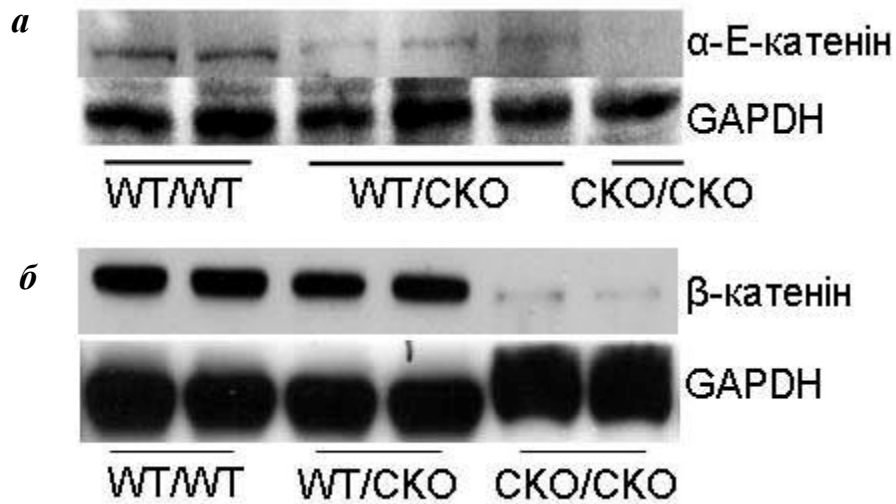


Рис. 2.2. Вестерн-блот аналіз лізатів сердець дослідних та контрольних тварин. Контроль (WT/WT), гетерозиги (WT/CKO) та гомозиготи (CKO/CKO) за делецією гена *Ctnna1* (а) та *Ctnnb1* (б)

2.2.3 Генотипування тварин. Для генотипування новонароджених тварин та ембріонів мишей ДНК виділяли згідно загальноприйнятому протоколу [152]. Ізольовані тканини, а саме кінчики хвостів, у випадку дорослих тварин та амніон, у випадку ембріонів переносили у 0,5 мл лізуючого буферу із розчином протеїнази К (10 мкг/мл) з послідуною інкубацією при температурі 55°C та постійному помішуванні (8-12 год). Такий лізат центрифугували при 10000 об/хв., 10 хв., при кімнатній температурі, після чого, до отриманого супернатанту додавали 0,5 мл ізопропанолу. Отриману ДНК переносили в 200 мкл ТЕ-буферу (10мМ Tris-HCl (pH 7,5); 1мМ EDTA) і інкубували при 55°C та постійній ротації+ до повного розчинення.

Суміш для проведення полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) готували згідно рекомендацій виробника з додаванням 0,3 рМ кожного праймеру (табл. 2.1) і 10 нг ДНК. Параметри ПЛР були підібрані імперично і становили: 94°C 5 хв. - 94°C 40 с, 60°C 40 с, 72°C 1 хв. (40 циклів) - 72°C 10 хв. З подальшим утримуванням при 4°C.

Результати ПЛР аналізували за допомогою методу горизонтального електрофорезу в 1,6% агарозному гелі із додаванням бромистого етидію в

буфері TAE (40мМ Tris, 20мМ оцтова кислота, 1мМ ЕДТА) при 70 мА протягом 40 хв. Результати генотипувань дослідних та контрольних тварин наведено у Додатку Д.

Візуалізацію отриманих фрагментів ПЛР проводили із застосуванням приладу ChemiDoc XRS (Bio-Rad, США).

2.3 Аналіз особливостей кардіогенезу за умови делеції досліджуваних генів

Для вивчення впливу делеції досліджуваних генів (*Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1*) на формування ембріонального серця, використовували ембріони терміном гестації 10,5; 12,5 та 14,5 діб (E10,5; E12,5 та E14,5 відповідно). Для цього формувались сім'ї з 2-4 самиць та одного самця відповідних генотипів (дивитись підрозділ 2.2), зважаючи на особливості фізіології мишей, кожного ранку перевіряли самиць на наявність вагінальних пробок (vaginal plug), наявність яких свідчила про запліднення. При візуалізації вагінальних пробок починали відрахування терміну вагітності від 0,5 діб (E0,5) згідно [117]. У 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.

2.4 Виділення та культивування неонатальних кардіоміоцитів

За допомогою методу холодної трипсинізації із сердець новонароджених мишей (P1) виділяли кардіоміоцити та вводили їх у культуру. Спершу,

ізолювані серця контрольних та дослідних тварин тричі промивали у середовищі DMEM із додаванням 10-кратних розчинів пеніциліну (1000 МО/мл) та стрептоміцину (1000 мкг/мл), з послідуною інкубацією протягом 20 хв. при +4°C. Після чого, проводили обробку тканини серця ферментами: 0,025% розчин трипсину та 0,01% ЕДТА в PBS протягом ночі при +4°C. Зразки дезінтегрували піпетуванням у середовищі DMEM з 10 % ФБС і висівали у культуральні 12-лункові планшети. Для отримання чистої культури кардіоміоцитів, застосовували додатковий крок – преплейтінг, а саме через 2 години після розсіву виділених клітин, суспензію переносили на нові лунки, даючи таким чином фібробластам та ендотеліоцитам прикріпитись до поверхні культурального пластику. Отримані таким чином неонатальні кардіоміоцити вирощувались протягом 3-5 діб при температурі 37 °C та при 5% CO₂ у газовій суміші.

2.5 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 у суміші фіксаторів (80% спирт/ 4% параформальдегід/ 5% оцтова кислота). Зафіксовані клітини забарвлювали гематоксиліном-еозином згідно:

- проточна вода – 5 хв.
- гематоксилін – 2 хв.
- проточна вода – 3 по 1 хв.
- 50% ізопропанол/50% етанол/0,05% оцтова кислота – 2 хв.
- 1% калій ацета – 2 хв.
- еозин – 2 хв.
- 90% етанол – 1 хв.

- 96% етанол – 1хв.
- 100% етанол – 1 хв.
- ксилол – 1 хв.

Фарбовані таким чином препарати заключали у середовище для покриття. Аналіз морфології клітин проводили за допомогою світлового мікроскопу при збільшенні 1000^x. А саме, визначали довжину та ширину клітин. У кожному варіанті аналізували більше, ніж 100 клітин із трьох сердець кожного генотипу.

Окрім зазначених параметрів, аналізували і частоту двоядерних клітин залежно від генотипу. Для цього культивовані протягом двох діб ізольовані клітини промивали PBS двічі, та фарбували розчином 20 мкг/мл акридинового оранжевого в PBS. Препарати інкубували з фарбником протягом 10 хв., при кімнатній температурі та промивали PBS тричі, після чого фіксували протягом 10 хв у 4% параформальдегіду. Аналіз проводили на флуоресцентному мікроскопі. Підраховували кількість двоядерних та одноподібних кардіоміоцитів. У кожному варіанті аналізували не менше 50 клітин із трьох сердець кожного генотипу.

2.6 Аналіз проліферативної активності неонатальних кардіоміоцитів

Для аналізу проліферативної активності ізольовані кардіоміоцити після 1 – 2 пасажу висівали у 96 лункові культуральні планшети по 10 тис/лунку. Через 2 доби культивування в кожен лунку додавали 15 мкл МТТ-реагенту (5 мг/мл) та інкубували протягом 4 год для утворення кристалів формазану. Після чого кристали формазану розчиняли у 100 мкл DMSO протягом 10 хв при 37 ° С і постійному помішуванні та вимірювали оптичне поглинання при 620 нм на приладі ELx800 (BioTek, США). Отримані показники обраховувались у програмі Excel, середні значення для кожного варіанту репрезентували у вигляді графіків. У роботі наведено найбільш типові дані для 4 повторностей.

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. Після чого додавали МТТ-реагент, так як описано вище. За таких умов експерименту контролем були клітини без обробки, що вирощувались у середовищі DMEM з 0,5 % ембріональної сироватки ВРХ.

Відомо, що LiCl безпосередньо і специфічно взаємодіє із GSK3, інгібуючи її активність, що призводить до руйнації деградувального комплексу та вивільнення із нього β -катеніну [52]. У результаті відбувається підвищення цитозольного вмісту β -катеніну із його послідуною транслокацією у ядро і, як наслідок, підвищенням транскрипційної активності β -катеніну.

2.7 Вивчення постнатального розвитку серця тварин за умови нокауту досліджуваного гена

Після генотипування формувались відповідні дослідні та контрольні групи, кількість тварин кожного генотипу реєструвалась щотижнево. Для оцінки різниці у виживаності використовувався метод Каплан-Мейр [23]. Для аналізу вікових особливостей формування міокарду чи моделюванні гіпертрофії, атлетичного серця використовували тварин відповідного віку/генотипу і методи подані нижче.

2.8 Мета-аналіз відтворюваних молекулярних маркерів гіпертрофії

Для проведення систематичного огляду та мета-аналізу відтворюваності гіпертрофічних маркерів та функції β -катеніну у розвитку гіпертрофії ми

виконали пошук та аналіз літератури в базах PubMed, Medline та Google Scholar. За ключовими словами «Wnt AND hypertrophy», «heart AND hypertrophy» були відібрані усі англomовні публікації. Загалом 215 джерел. Для подальшого статистичного аналізу були відібрані статті згідно наступним критеріям: 1) роботи де було наведено чисельні дані (маркери канонічного Wnt сигналіngu, маркери гіпертрофії та/або морфологічні параметри); 2) експериментальні роботи де проводилось вивчення участі/змін експресії β -катеніну у гіпертрофії; 3) експериментальні роботи, де при ремоделюванні різних типів тканини аналізувалась і експресія β -катеніну. Статті були виключені із аналізу якщо це були огляди літератури, роботи що не включали в себе чисельних даних або аналізу маркерів гіпертрофії (рис. 2.3).

У результаті, для проведення мета-аналізу, нами було відібрано 100 робіт, з яких 95 - це експериментальні роботи, 5 - дослідження клінічного матеріалу.

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

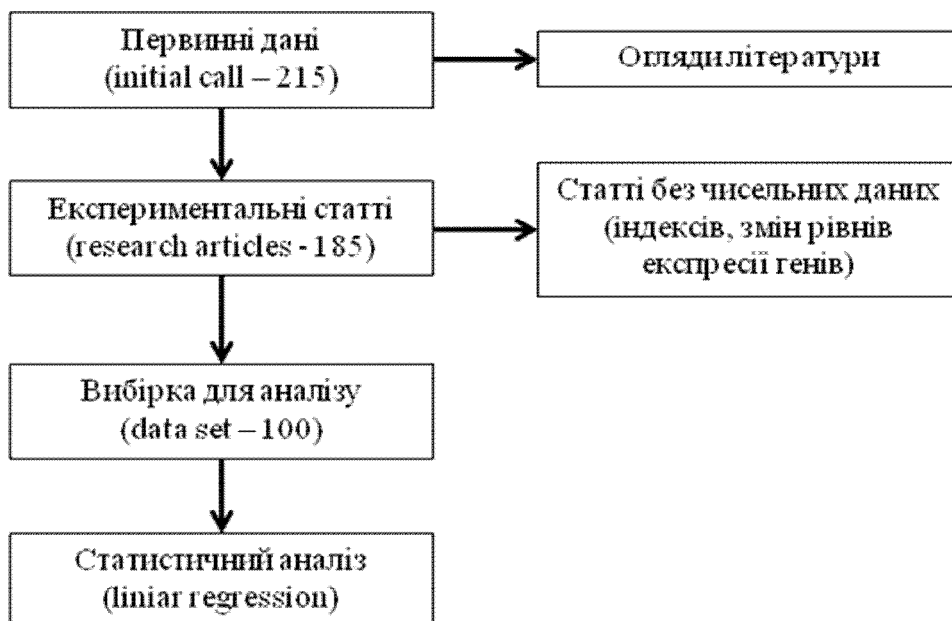


Рис. 2.3. Схема пошуку та відбору літературних джерел для мета-аналізу

2.9 Індукція гіпертрофії

Для індукції гіпертрофії самцям лінії BATGAL віком 3 місяці підшкірно вживлювали мініосмотичні насоси виробництва ALZET модель 2002 (кат №10251-11, США). Обрана нами модель насосів давала змогу проводити інфузію гіпертрофічних стимулів тваринам протягом 14 днів із швидкістю закачування 0,5 мкл/годину. Підготовку міні осмотичних насосів проводили згідно рекомендаціям виробника, тварин перед операцією анестезували авертином інтраперитоніально (0,2 мкг/г). У якості гіпертрофічних стимулів використовували хлорид літію та Ang (Sigma, USA, A9525) II у концентраціях 20мМ та 1мМ відповідно. Ангіотензин – це пептидний гормон що діє опосередковано через відповідні рецептори на клітинній мембрані і спричиняє звуження кровоносних судин та як наслідок – підвищення тиску [249]. Таким чином, ми модулювали хронічну гіпертензію у мишей, що є одним із факторів розвитку гіпертрофії. Контрольні тварини отримували фізіологічний розчин. Тварин виводили із досліду на 3, 7 та 14 добу спостережень. На кожному терміні спостережень проводили морфологічні, морфометричні, молекулярно-генетичні дослідження. Кількість тварин у кожній групі становила не менше 5 самців лінії BATGAL.

Ця низка експериментів виконувалась на базі Інституту дослідження легень та серця асоціації Макса Планка, Бад-Наухейм, Німеччина у рамках програми EMBO Post-Doctoral Short –Term Fellowships (ASTF 223.00-2011).

2.10 Моделювання атлетичного міокарду

Сигнальну функцію β -катеніну при формуванні атлетичного міокарду у

ранні терміни тренувань та при тривалих навантаженнях досліджували із 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 [61].

При дослідженні сигнальної функції канонічного Wnt каскаду рандомно формували дослідні та контрольні групи мишей, де контрольні тварин не отримували фізичного навантаження а утримувались за стандартних умов (рис.2.4). У дослідній групі тварини отримували навантаження починаючи із 5 хвилин плавання із поступовим збільшенням (на 1,5 хвилини щоденно), температура води при плаванні становила 37° С, після тренування тварин висушували під лампою накаливання. Частину тварин обох груп виводили із експерименту через 7 днів тренувань та через 4 тижні тренувань. Проводили морфометричні, морфологічні, молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні аналізи. Кількість тварин у кожній групі становила не менше 10 самців лінії CB57BL.

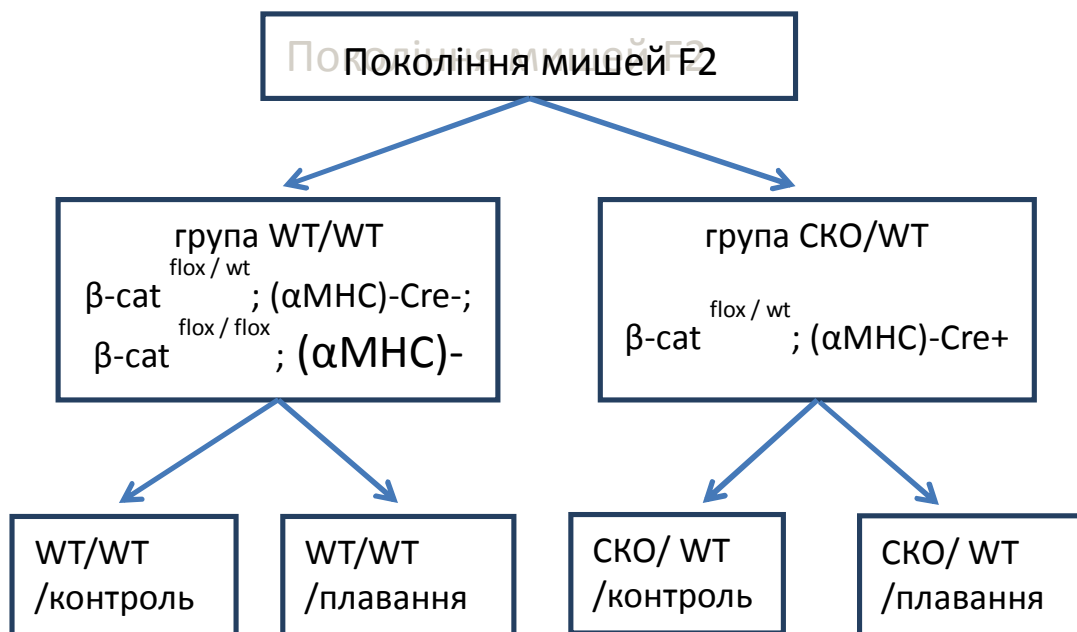


Рис.2.4. Схема формування дослідних і контрольних груп тварин для моделювання атлетичного міокарду

Розвиток атлетичного міокарду за умови гетерозиготного нокауту гена *Cttnb1* проводили за аналогічною схемою, лише з однією відмінністю, тварини у дослідній групі отримували фізичне навантаження протягом 6 тижнів. Тварин у кожній експериментальній групі було не менше 18 самців. Групи тварин формували згідно результатів генотипувань, а саме WT/WT - миші із генотипами β -cat^{flox / wt}; (α MHC)-Cre-; β -cat^{flox / flox}; (α MHC)-Cre-; група SKO/WT - тварини із генотипом β -cat^{flox / wt}; (α MHC)-Cre+. Після чого кожна група рандомно ділилась на дві частини, для контролю: WT/WT/контроль, SKO/WT/контроль та WT/WT/плавання, SKO/WT/плавання (рис.2.4). Миші у групах WT/WT/плавання та SKO/WT/плавання отримували фізичне навантаження протягом 6 тижнів, тварини у групах WT/WT/контроль і SKO/WT/контроль утримувались за стандартних умов і слугували відповідним контролем.

2.11 Дослідження кардіогемодинамічних показників

Для аналізу впливу нокауту досліджуваного гена на функціонування серця у дорослих тварин проводили аналіз кардіогемодинамічних показників. Для цього тварин віком 9 місяців відповідних генотипів анестезували інтраперитоніально уретаном (150 мг/г). Далі тваринам проводили диссекцію правої каротидної артерії, що давало змогу вводити у лівий шлуночок, ретроградно через праву каротидну артерію, ультратонкий катетор (d 1,4F). Таким чином, одночасно реєстрували тиск та об'єм лівого шлуночка та візуалізацію кривих об'єм-тиск серцевого циклу [115]. У роботі реєстрували наступні показники: частота серцевих скорочень, кінцевий систолічний та діастолічний тиски лівого шлуночка, кінцевий систолічний та діастолічний об'єми лівого шлуночка, ударний об'єм, серцевий викид, фракція викиду, dP/dt max, dP/dt min, dV/dt max, dV/dt min, and PdVdt max. Ефективну артеріальну жорсткість визначали за Sunagawa [115], 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.

2.12 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). Для чого проводили зважування тварини та ізольованого міокарду. Для розрахунку індексу МС/ДГ вимірювали довжину гомілки, попередньо препарувавши її та очистивши від м'яких тканин у 1М розчині NaOH протягом 4 год. при постійному переміщуванні. Наведені індекси відображають розвиток/ріст міокарду у тому числі і гіпертрофічний ріст серця.

2.13 Проведення гістологічних та імуногістохімічних досліджень

Для аналізу змін структури серця як у дорослих тварин так і ембріонів застосовували морфологічні та імуногістохімічні методи. Для чого готували парафінові препарати ізольованих сердець та ембріонів на досліджуваних термінах розвитку. Серця дослідних та контрольних груп дорослих тварин, а у випадку ембріонів – ембріони дослідних і контрольних груп) промивали у розчині холодного PBS з подальшою фіксацією у холодному розчині 4% параформальдегіду (ПФА). Дегідратацію зафіксованих зразків сердець проводили за наступною схемою:

- 70% етанол - 12 год.
- 80% етанол - 12 год.
- 90% етанол - 12 год.

- 96% етанол - 12 год.
- 100% етанол - 12 год.
- етанол:ксилол (1: 1) - 2 по 1год.
- ксилол - 2 по 1 год.
- ксилол:парафін (1:1) - 2 по 1год. при 55°C,

після чого тканину переносили у теплий парафін і інкубували там (2 по 1год., та 12 год. при 55°C), парафінові блоки готували згідно стандартної процедури. Отримані таким чином зразки, нарізали на мікротомі товщиною 9-10 мкм.

Депарафінізацію зрізів проводили за наступною схемою:

- ксилол – 2 по 5хв.
- 96% етанол – 2 по 1хв.
- 80% етанол – 1хв.
- 70% етанол – 30 с.

Депарафінізовані зрізи тканини серця, або ембріонів (через область серця), промивали водою і використовували для забарвлення гематоксилін-еозином, Масон-трихромного забарвлення [117], за методом ван Гізона [196] або X-gal забарвлення. Забарвлення секцій гематоксилін-еозином проводили за наступною схемою:

- гематоксилін – 1 хв.
- проточна вода – 3 по 2 хв.
- еозин – 15 с.
- 90% етанол – 1 хв.
- 96% етанол – 1хв.
- ксилол – 1 хв.

Фіброз тканини міокарда виявляли за допомогою Масон-трихромного забарвлення із використанням набору комерційних реагентів HT15 (Sigma-Aldrich) згідно рекомендацій виробника. Депарафінізовані препарати проводили через серію розчинів:

- розчин Буена -15 хв на водяній бані при 56 ° C

- дистильована вода - 25 хв
- гематоксилін - 2 хв
- дистильована вода
- фуксин - 5 хв
- дистильована вода - 1 хв
- фосфорновольфрамова кислота : фосфорномолібденова кислота : вода (1 : 1 : 2) - 6 хв
- анілін синій - 15 хв
- 1 % оцтова кислота - 4 хв
- дистильована вода - 1 хв
- Після фарбування проводили дегідратацію зрізів за наступною

схемою:

- 96 % спирт - 2 по 5хв
- 100 % спирт - 2 по 5хв
- ксилол 2 по 10хв

Окрім того у серії експериментів застосовували і забарвлення пікрофуксином за ван Гізоном [196] для виявлення фіброзу у серцях дорослих тварин:

- пікрофуксин (1:1 розчин насиченої пікринової кислоти та 0,1% основного фуксину) – 3хв.
- дистильована вода – 3 по 3 хв.
- гематоксилін – 3 хв.
- проточна вода – 3 по 2 хв.
- 96% спирт – 2 по 5хв.
- 100% спирт – 2 по 5хв.
- ксилол – 2 по 10хв.

Фарбовані зрізи тканини міокарду заключали у середовища для покриття під покривні скельця. Кількісний аналіз фіброзу проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ [216].

Для аналізу експресії бактеріальної β -галактозидази у химерних ембріонах та репортерних тваринах проводили X-gal забарвлення ізольованих ембріонів або сердець [127] за наступною схемою:

Зразки промивали у 100mM фосфаті натрію (pH 7,3)

Фіксували у розчині 0,2% глютарового альдегіду/2mM $MgCl_2$ /PBS (pH 7,3) протягом 15 – 30 хв при кімнатній температурі, після чого зразки промивали 3 рази по 15 хв у розчині: 0,02% NP-40, 0,1% деоксихолату, 2mM $MgCl_2$, 100mM фосфату натрію pH 7,3). Фарбування проводили у розчині 1 мг/мл X-gal, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5mM $K_4Fe(CN)_6$, 0,02% NP-40, 0,01% деоксихолату, 2 mM $MgCl_2$, 100mM фосфату натрію (pH7,3) при 37⁰C протягом 7 – 8 годин. Зафарбовані зразки тканини заключали у парафін, як описано вище та готували слайди для мікроскопічного аналізу

Для аналізу рівнів експресії та локалізації білків міжклітинної адгезії застосовували метод імуногістохімічного аналізу як описано [127]. Депарафінізовані зрізи тканини ембріонів через область серця спочатку інкубували у розчині 10 mM цитрату натрію (pH 6,0), протягом 5 хвилин для підвищення доступності антигенів. Далі:

PBS – 5 хв

PBS/0,2% гліцин – 2 по 5хв

5% знежирене молоко/ PBS – 30 хв

Первинні антитіла у розведенні 1 – 2 мкл/1000 у розчині 5% знежиреного молока/ PBS – 7 – 8 годин, у вологій камері при +4C

PBS/1% козячої сироватки - 3 по 5хв

Вторинні антитіла (Cy 3) у розведенні 1:100 у розчині 5% знежиреного молока/ PBS – 1 година, у вологій камері при кімнатній температурі

PBS – 4 по 5 хв

100%- ЕТОН

Безпосередньо перед покриттям препаратів додавали 1 – 2 краплини DAPI (4'-6-діамідіно-2-феніліндол) для контрастного забарвлення ядер. Зображення аналізували на конфокальному мікроскопі Zeiss LSM510/uv Axiovert 200M. Цей

етап роботи проводили на базі Університету Пенсильванії, (Філадельфія, США).

Для аналізу накопичення та вмісту триацилгліцеридів у тканині міокарду застосовували кріозрізи та Oil Red O забарвлення. Для цього, ізольовані серця поміщали в середовищ ОСТ і заморожували в рідкому азоті. Отримані кріозрізи (10 мікрон) фіксували в 4% розчині формальдегіду протягом 10 хв. Далі зразки фарбували згідно протоколу [143]:

- 50% ізопропанол – 10 хв.
- 0.0025% Oil Red O в ізопропанолі – 10 хв.
- дистильована вода – 5 хв.
- гематоксилін – 3 хв.
- проточна вода – 10 хв.
- заключення в гліцеринове желе.

Гістологічні препарати аналізували під світловим мікроскопом та обробляли за допомогою програми AxioVision на збільшенні 100^x, 400^x, 1000^x.

2.14 Аналіз змін експресії генів за допомогою ПЛР в реальному часі

У роботі аналізували зміни експресії фетальних генів, генів залучених до канонічного Wnt сигналіngu, та мішеней Wnt і HIPPO сигнальних каскадів (табл. 2.2), а також проводили валідацію методу ChIP (табл. 2.3) за допомогою методу ПЛР у реальному часі. Для цього із апікальної частини сердець дорослих тварин або із цілого серця ембріональну та новонароджених мишенят (P1-2) виділяли тотальну РНК. Зразки гомогенізували розтиранням після замороження у рідкому азоті і додавали реагент після чого піпетували до повного розчинення. Далі зразки лишали при кімнатній температурі протягом 5 хв.

На 400 мкл реагенту Inusolve додавали 80 мкл хлороформу, вортексували та інкубували при 4 ° С протягом 15 хв. Після чого, осаджували РНК на центрифугу Eppendorf при 12000 g, 4 ° С, протягом 15 хв. У результаті, відбирали верхню фазу і додавали рівний об'єм ізопропанолу. Центрифугували при 12 000 g, 4 ° С, протягом 10 хв.

Отриманий осад промивали холодним ізопропанолом або 75 % етанолом, висушували в термостаті при 37 ° С протягом 5-7 хв і розчиняли в 30-50 мкл чистої води, вільної від ДНКаз та РНКаз. Концентрацію виділеної РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop при довжині хвилі 260 нм. Отримані зразки РНК зберігали при – 80 ° С і використовували для синтезу кДНК. При роботі із культивованими клітинами, реагент для лізису додавали безпосередньо у лунки культуральних планшетів.

Синтез кДНК проводили з використанням комерційного набору реагентів Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit і праймерів олігодТ, що дає змогу отримати комплементарну ДНК до тотальної мРНК. Реакцію проводили згідно рекомендацій виробника. Синтезовану кДНК розводили до концентрації 10 нг/мкл і використовували для проведення стандартної ПЛР в реальному часі у якості матриці.

Стандартний метод ПЛР в реальному часі проводили за наступних режимів: 95°C 10 хв. - 95°C 40 с, 62°C 40 с, 72°C 40 с. (40 циклів) - 72°C 15 хв. З подальшим утримуванням при 4°C. Контролем слугував рівень експресії гена домашнього господарства гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (*Gapdh*). Обрахунки результатів кількісної ЗТ-ПЛР проводили за стандартним методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ та з використанням програми CFX96.

2.15 Аналіз вмісту білків за допомогою Вестерн-блоту

Для аналізу змін вмісту білків, тканину лівого шлуночка гомогенізували на льоду у RIPA-буфері (50 мМ Tris (рН 7.4), 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA (рН

8.0)) із додаванням інгібіторів протеаз (10 мкг/мкл лейпептину, 5 мкг/мкл пепстатину А, 2 мкг/мкл апротиніну, 1 мМ фенілметилсульфоніл флуорид) та фосфатаз (1 мМ натрій ортованадат та 10 мМ натрій флуорид). Лізат осаджували центрифугуванням при 10500g протягом 20 хв. Концентрацію білка визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop при довжині хвилі 280 нм.

Розділення білків проводили у 10% поліакриламідному гелі та переносили на PVDF мембрану напівсухим методом. На кожен доріжку наносили 50 мкг білка. Після переносу мембрану інкубували протягом 2 год у 5% розчині БСА при кімнатній температурі для блокування неспецифіки. Далі, мембрану інкубували з первинними та відповідними вторинними антитілами у концентраціях згідно рекомендацій виробника. Візуалізацію сигналу здійснювали за допомогою хемілюмінесцентного субстрату. Вміст фосфорильованих форм білків визначили як співвідношення інтенсивності сигналу для фосфорильованої форми до інтенсивності сигналу для відповідного сумарного білка. Вміст сумарних білків визначали як співвідношення інтенсивності сигналу для білка до інтенсивності сигналу для Gapdh. Рівень білка у контрольних тварин приймали за 1 умовну одиницю (у. о.).

2.16 Хроматинімунопреципітація (ChIP)

Заморожені серця новонароджених тварин подрібнювались механічно у 1000 мкл холодного розчину 1x PBS. Для більш ефективної гомогенізації тканиний лізат ресуспендували піпетуванням не менш ніж 10 разів, після чого лізат пропускали через шприць з голкою 19G та 25G не менш ніж по 20 разів. У лізат додавали 1,5 мл холодного розчину 1x PBS. Після чого проводили крос-лінк (зшивання ДНК із ДНК- зв'язувальними білками) за допомогою 1.6% розчину формальдегіду при кімнатній температурі протягом 10 хвилин у

кінцевому об'ємі 1х розчину PBS - 5 мл. Реакцію зупиняли додаванням 0,7 мл 1М розчину гліцину (до кінцевої концентрації 0.125 М) та інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Хроматин осаджували центрифугуванням протягом 5 хвилин при 1000g та промивали осад у 3 мл 2х розчину PBS, з додаванням 125 мкл коктейлю інгібіторів протеаз (РІК).

Отриманий хроматин або заморожували та зберігали при -80°C , або використовували для лізису та імунопреципітації. Лізис проводили у 0,3 мл лізуючого буферу у власній модифікації (табл 2.4) із додаванням 12 мкл 25х розчину РІС. Лізати гомогенізували ресуспендуванням шприцем з голкою 25G не менш ніж 10 разів. Після чого хроматин фрагментували.

Таблиця 2.4

Склад робочих розчинів, що використовувались для проведення ChIP

Лізуючий буфер	
Робочий розчин	Стокові розчини
0.5% SDS	20% SDS
1% Triton X-100	20% Triton X-100
0.15 M NaCl	5 M NaCl
1 mM EDTA	0.5 M EDTA
20 mM Tris pH 8	1 M Tris pH 8
Буфер для відмивання (RIPA)	
50 mM	1M HEPES-KOH, pH 7.6
500 mM	5M LiCl
1 mM	0.5M EDTA
1%	10% NP-40
0.7%	10% Na-Deoxycholate
Буфер для елюції	
1% SDS	10% SDS
0.1 M NaHCO ₃	NaHCO ₃
Буфер для інкубації	
1% Triton X-100	20% Triton X-100
0.15 M NaCl	5 M NaCl
1 mM EDTA	0.5 M EDTA
20 mM HEPES	1 M HEPES
0,35% SDS	10% SDS

Для отримання оптимальних фрагментів хроматину (у діапазоні 500 – 150 п.о.) проводил фрагментацію ДНК на приладі Bioruptor® Pico при режимі сонікації - 30s ON/ 30 s OFF протягом 3-х циклів. Після фрагментації хроматин осаджували при 14- 13000g, протягом 20 хв при 4° С. На цьому етапі для однієї реакції імунопреципітації (IP) відбирали по 100 мкл з кожного зразка, решту швидко заморожували та зберігали при -80° С з можливістю подальшого використання.

У своїй роботі для імунопреципітації ми застосовували SureBeads™ Prot G Magnetic Beads (Bio-Rad). Перед інкубацією із антитілами носії готували наступним чином: брали 40 мкл носіїв на одну реакцію IP і промивали у 100 мкл буферу для інкубації (табл. 2.4) тричі протягом 1 хвилини при ротації 700 g. Після чого носії ресуспендували у буфері для інкубації із додаванням BSA із розрахунку 1 мкг/мкл та інкубували протягом 2-х годин при постійній ротації і 4° С. Одночасно готували хроматин, а саме для однієї реакції IP відбирали 100 мкл хроматину та ресуспендували його із 300 мкл буферу для інкубації (табл. 2.4), після чого додавали антитіла та залишали при постійній ротації на 2 години при 4° С. Через 2 години, у суміш хроматину з антитілами вносили ресуспендовані носії і залишали інкубуватись при 4° С та постійній ротації ще протягом 8 - 9 годин.

Відмивання зразків проводили у 500 мкл відповідного буферу (табл 2.4) при постійній ротації та 4° С не менш ніж 8 разів. Окрім того, на цьому етапі разом із зразками після IP брали і разок хроматину (100 мкл) до інкубації із антитілами, у якості нативного контролю, для оцінювання проти нього рівня збагачення зрізків після IP. Після чого імунопреципітований хроматин та тотальний хроматин у нативному зразку елюювали у 200 мкл буферу для елюції протягом 20 хвилин при кімнатній температурі та постійній ротації. Через 20 хв до отриманого супернатанту додавали 0,4 мкл 5M NaCl, 0,4 мкл RNase A (10мг/мл) та 10,7мкл протеїнази К (18,6 мг/мл). Для де-крос-лінку хроматину супернатант інкубували протягом 2-х годин при 55-57°С та ще при 65°С протягом 8 годин. Для виділення ДНК відбирали по 50 мкл із кожного зразка.

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 [258].

Ця низка експериментів виконувалась на базі Інституті молекулярної та клітинної біології, Варшава, Польща у рамках програми EMBO Post-Doctoral Short –Term Fellowships (ASTF 518-2015).

2.17 Статистична обробка даних

Дані представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартне відхилення, якщо не вказане інше. Кількість тварин в групах та повторів незалежних експериментів вказана під рисунками.

Аналіз статистичної достовірності відмінності у виживаності між групами проводили із застосуванням лог-рагового 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, до рисунків зазначали який саме тест використаний при аналізі даних. Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми GraphPad Prism7.

РОЗДІЛ 3

КАДГЕРИН-КАТЕНІНОВИЙ КОМПЛЕКС У КАРДІОГЕНЕЗІ ТА НЕОНАТАЛЬНОМУ СЕРЦІ

Серце – це перший орган, що формується у ембріогенезі і працює протягом усього життя організму, адаптуючись до фізичних, гормональних та інших навантажень. Формування серця під час ембріонального розвитку є багатоетапним та складним процесом, що контролюється багатьма сигнальними системами клітини та клітинними взаємодіями і координується у просторі та часі. Вочевидь, міжклітинна адгезія та комунікація є надзвичайно важливими не лише для формування та розвитку ембріону а й ембріонального міокарду.

Роль генів, що кодують білок адгеринового комплексу (АК) у ембріогенезі досліджувалась із застосуванням технології генетичного нокауту. Так, було з'ясовано, що конститутивний нокаут гена *Cdh2*, що кодує білок N-кадгерину, у ранньому ембріогенезі спричиняє масивні порушення розвитку серця ембріону та амніону, і призводить до летальності [202]. Ця робота досить чітко акцентувала увагу науковців не лише на тому, що порушення адгезії є критичним для розвитку цілого ембріону, а й на тому, що досліджуваний ген, ймовірно, важливий саме для розвитку серця, на відміну від сомітів та інших тканин і органів. Вочевидь, відсутність N-кадгерину у клітинах цих тканин компенсувалась іншими білками – членами цієї родини (кадгеринами), здатними підтримувати міжклітинні контакти. Важливість N-кадгерину для функціонування міокарду була продемонстрована і із застосуванням умовного індукованого нокауту цього гена у серцях дорослих тварин [126]. Де автори показали, що нокаут гена *Cdh2* спричиняє летальність дорослих тварин в наслідок спонтанної аритмогенної кардіоміопатії і супроводжується

порушеннями структури інтеркалярних дисків (ІД). І, хоча ці роботи свідчать на користь гіпотези, що продукт гена *Cdh2* залучений у підтримання правильного розвитку і формування міокарду під час ембріогенезу, прямих експериментальних даних, що підтверджували би таке припущення, на початок проведення наших досліджень не було.

Так, не було з'ясовано і значення цитоплазматичних партнерів N-кадгерину, β - та α -катенінів у кардіогенезі. Проте, із застосуванням нокауту гена *Ctnnb1*, що кодує білок β -катеніну, було показано, що втрата цього гена на стадії зиготи спричиняла серйозні порушення гастрюляції і призводила до смертності ембріонів [77,97]. Нокаут гена *Ctnnb1*, виключно в ендодермі ембріонів, спричиняв формування багатокамерного серця, порушення розвитку структур голови та шкіри і призводив до летальності ембріонів терміном гестації E10,5 [140]. Летальною виявилась і індукована мутація гена *Cttna1*, продукт якого – білок α -Е-катенін є цитоплазматичним партнером β -катеніну [236]. Так, втрата сайту зв'язування цього білка з актином, викликала порушення розвитку трофобластного епітеліуму та спричиняла зупинку розвитку ембріона ще на стадії бластоцисти.

Цілком логічно було припустити, що цитоплазматичні партнери N-кадгерину, мають критичне значення не лише на стадії раннього ембріогенезу а і для формування та розвитку серця в цілому. Проте, значення їхньої адгезивної функції у цьому процесі не було з'ясоване, більше того, наявність і сигнальної функції цих білків додавала інтриги до розуміння ролі білків міжклітинної адгезії у кардіогенезі.

Тож, на першому етапі свого дослідження ми зосередились на аналізі ролі генів білків міжклітинної адгезії: *Cdh2*, *Cttna1* та *Ctnnb1* у кардіогенезі за умови специфічного умовного нокауту цих генів. Саме застосування такого підходу та Cre-LoxP системи під контролем важкого ланцюгу α -Міозину (α -MHC-Cre) дало нам змогу дослідити особливості формування та розвитку серця за умов делеції генів інтересу після формування першого та другого серцевого полів.

3.1 Дослідження функції генів адгеринового комплексу у кардіогенезі

3.1.1 Нокаут гена *Cdh2* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє порушення кардіогенезу та призводить до летальності ембріонів. Для дослідження ролі гена *Cdh2*, що кодує білок N-кадгерину, у ембріональному серці ми схрещували тварин із умовним нокаутом досліджуваного гена та тварин, що експресують α -МНС-Cre з репортерними мишами лінії R26R (дивитись розділ Матеріали і методи). Останнє давало нам змогу проаналізувати ефективність та специфічність роботи Cre-рекомбінази. Так репортерна LacZ алель експресувалась у таких мишей лише у тих клітинах де була активною Cre-рекомбіназа. Що було досить легко виявити за допомогою X-gal забарвлення парафінових зрізів тканини ембріону. Морфологічний аналіз ембріонів терміном гестації 10,5 діб демонструє, що активність Cre-рекомбінази обмежується виключно клітинами ембріонального серця (рис 3.1), тож Cre-рекомбіназа здатна розпізнавати та ефективно вирізати фрагменти геному, у тому числі і екзон гена *Cdh2*, що фланкований LoxP сайтами лише у кардіоміоцитах.

Аналіз розподілу генотипів ембріонів терміном гестації E10,5 виявив, що близько 25% усіх ембріонів мали генотип α МНС-Cre⁺, N-cad^{flox/flox}, R26R⁺, тобто були такими де обидві алелі гена *Cdh2* делетовані. Морфологічний аналіз таких ембріонів порівняно із контрольними зразками того ж віку виявив суттєві порушення розвитку мутантних ембріонів (рис. 3.2 *а, б*). А саме, ми спостерігали затримку їхнього розвитку, що супроводжувалась порушеннями розвитку голови та серця.

Як показано на рис 3.2, серця таких ембріонів були роздутими та мали кулькоподібну («balloon-like») морфологію. Морфогенез серця був не завершеним у таких ембріонів а екстраембріональна циркуляторна система була слабко розвиненою порівняно із контрольними ембріонами того ж віку.

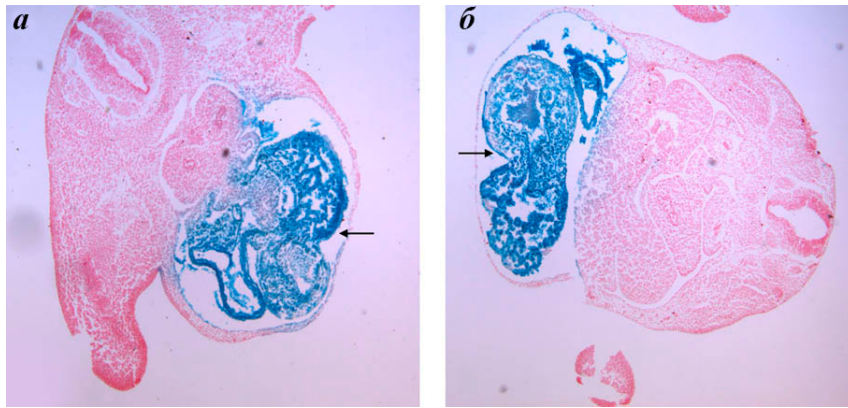


Рис. 3.1. Аналіз активності Cre-рекомбінази під контролем важкого ланцюга α -міозину за допомогою X-gal забарвлення парафінових поперечних секцій ембріонів терміном гестації E10,5: ембріон контрольної групи з генотипом α MHC-Cre+, N-cad^{wt/wt}, R26R+ (а); ембріон з нокаутом гена *Cdh2* генотипом α MHC-Cre+, N-cad^{flox/flox}, R26R+ (б). Стрілочками показано позитивне X-gal забарвлення, що обмежується виключно областю ембріонального серця

Варто зауважити, що при аналізі ембріонів на більш пізніх термінах гестації (E12,5) мутантні ембріони були на стадії ресорбування, що унеможливило проведення їхнього морфологічного аналізу. Морфологічний аналіз поперечних зрізів парафінових препаратів ембріонів на стадії розвитку E10,5 виявив, що за умови делеції гена *Cdh2* відбувалось витончення стінок ембріонального міокарду (рис 3.2 д, е). Ймовірно, це є наслідком порушення щільної міжклітинної адгезії у серцях за умови втрати досліджуваного нами гена.

Імуногістохімічний аналіз парафінових зрізів мутантних та контрольних зразків терміном гестації E10,5 виявив не лише відсутність експресії білка N-кадгерину (рис. 3.3 б) на поверхні ембріональних кардіоміоцитів а і його цитоплазматичного партнера - β -катеніну (рис 3.3 г). Це спостереження свідчить на користь припущення, що N-кадгерин має критичне значення у регулюванні рівню β -катеніну у ранньому кардіогенезі і, навіть більше, впливає на його розподіл під час формування ІД.

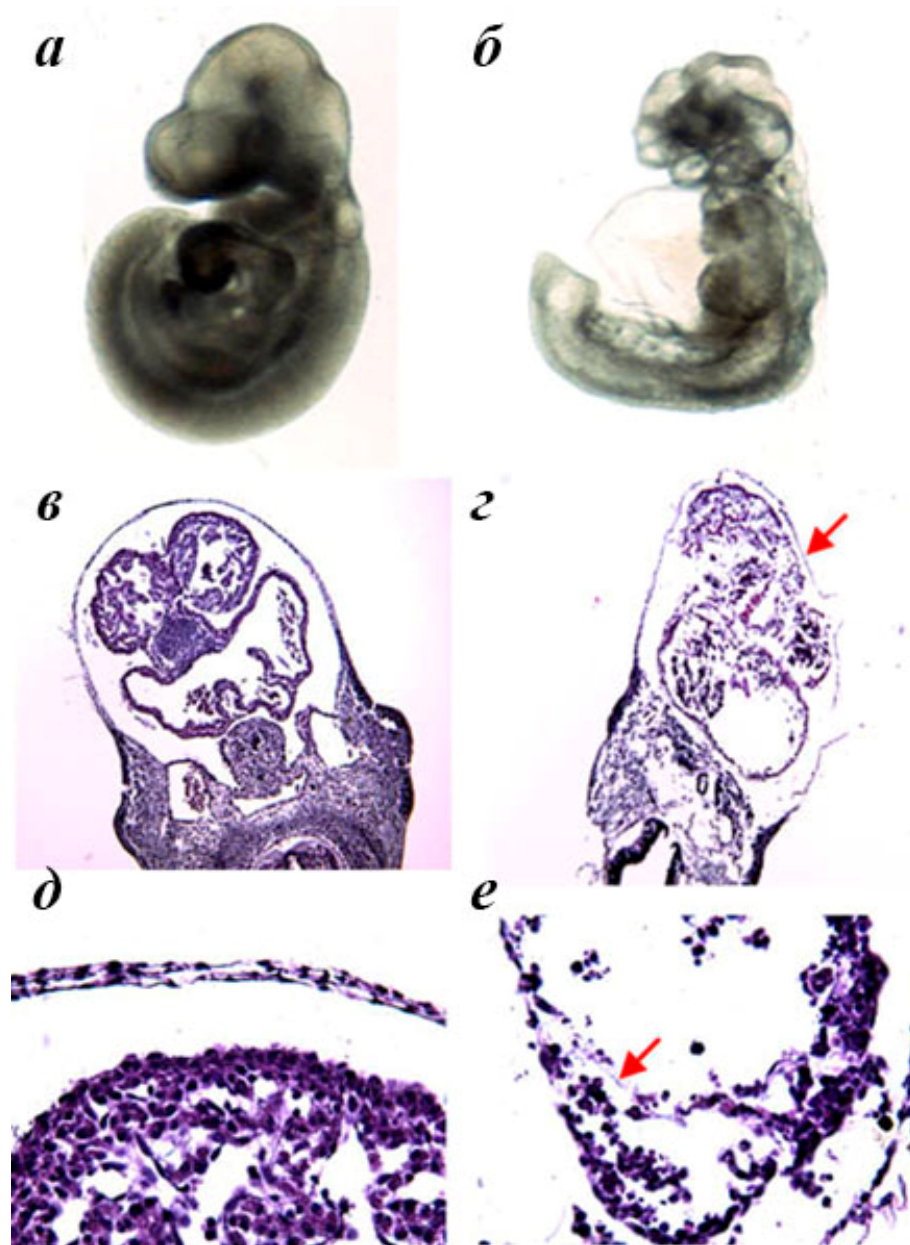


Рис. 3.2. Нокаут гена *Cdh2* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє порушення адгезії кардіоміоцитів і призводить до летальності ембріонів. Вигляд ембріону контрольної групи (*a*); вигляд ембріону з гомозиготним нокаутом гена *Cdh2* (*b*); гематоксилін-еозинове забарвлення зразків парафінових поперечних секцій ембріонів терміном гестації E10,5 (*b-e*); морфологічний аналіз поперечних зрізів тканини ембріону контрольної групи (*b, d*); морфологічний аналіз поперечних зрізів тканини ембріону з нокаутом гена *Cdh2* (*c, e*) Примітка: стрілочкою вказано витончення стінки міокарду у мутантного ембріону (*e*)

Загалом, наші дані підтверджують припущення, висунуте на початку проведення дослідження, що нокаут гена *Cdh2* виключно у кардіоміоцитах ембріону має критичні наслідки, як для кардіогенезу, так і для ембріогенезу в

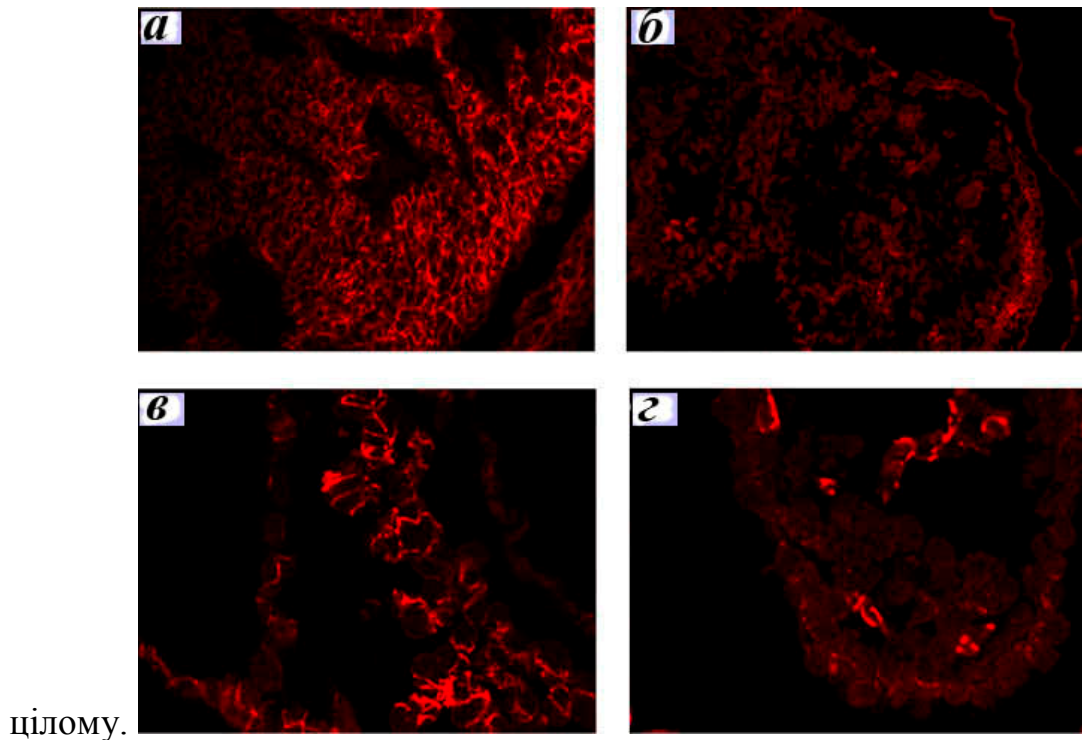


Рис. 3.3. Імуногістохімічний аналіз поперечних зрізів парафінових препаратів ембріональних сердець терміном гестації E10,5: зразки контрольної групи (**a**, **в**); зразки ембріональних сердець із делецією гена *Cdh2* (**б**, **з**); імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти N-кадгерину (**a**, **б**); імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти β -катеніну (**в**, **з**)

Варто також нагадати, що N-кадгерин (продукт досліджуваного гена) – це єдиний кадгерин, що експресується у кардіоміоцитах, тож його делеція спричиняє порушення структури адгеринових з'єднань та міжклітинної адгезії і призводить до ембріональної летальності в наслідок порушень розвитку серця.

3.1.2 Делеція гена *Cttna1* у клітинах серця ембріонів не призводить до порушень кардіогенезу та ембріогенезу. Для з'ясування значення α -Е-катеніну у розвитку міокарду під час ембріонального розвитку, ми також

застосували технологію умовного нокауту. Тварини з умовним нокаутом гена *Cttnn1*, що кодує білок α -Е-катеніну, схрещувались із трансгенними α МНС-Cre мишами. Генотипування та морфологічний аналіз ембріонів виявили, що кардіоспецифічний нокаут гена *Cttnn1* не спричиняв летальності ембріонів. Тож, ми мали змогу проаналізувати особливості ембріонального розвитку серця за умови делеції гена *Cttnn1* на термінах гестації E10,5 та 14,5 діб (рис. 3.4).

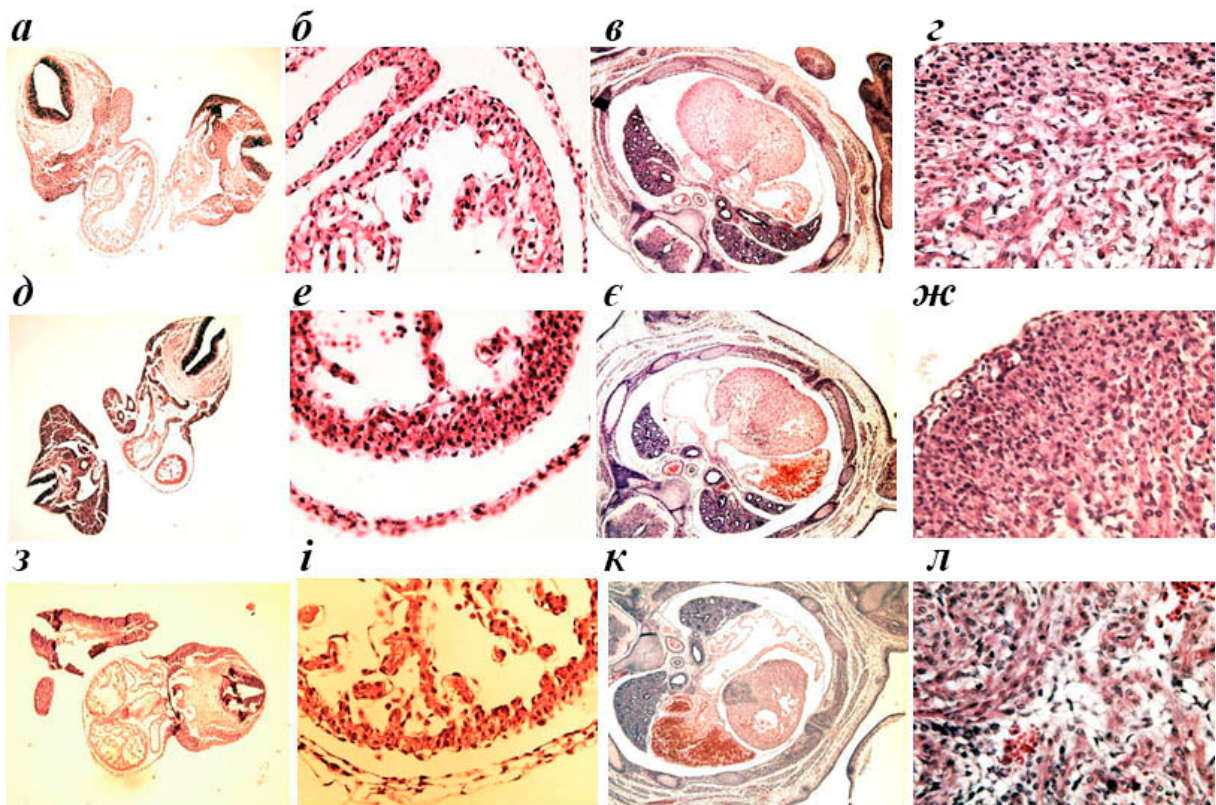


Рис. 3.4. Морфологічний аналіз парафінових зрізів мутантних та контрольних ембріонів через область серця за допомогою забарвлення гематоксиліном та еозином: контрольні ембріони (а-г); ембріони з кардіоспецифічним нокаутом гена *Cttnn1* (д-ж); ембріони з кардіоспецифічним нокаутом гена *Cttnb1* (з-л); ембріони терміном гестації E10,5 (а, б, д, е, з, і);– ембріони терміном гестації E14,5 (в, г, є, ж, к, л)

Загалом, мутантні ембріони не відрізнялись від таких у контролі, ми не спостерігали затримок розвитку, чи порушень формування міокарду, чи судинної системи на усіх досліджуваних термінах гестації

(рис.3.4 *д-ж*). Генотипування новонароджених тварин (віком P1-2) також не виявило аномалій розвитку чи летальності мутантних мишей (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

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

Нокаутований ген	Термін гестації	Контроль Виявлен о	Контроль Очікуван о	Мутанти виявлено	Мутанти очікувано	Всього зразків
<i>Cttna1</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 генотипувались на 1,5 – 2 добу після народження (P 1,5-2); 3 - мутантними зазначені тварини з делецією обох алелів досліджуваного гена; 4 - в дужках зазначена кількість аномальних/мертвих тварин; 5 - [#] мертва новонароджена тварина була гетерозиготою за нокаутом гена *Cttnb1*; 6 - * $p = 0.0578$, 7 - ** $p < 0.05$

Імуногістохімічний аналіз поперечних зрізів парафінових препаратів ембріонів терміном гестації E10,5 та E14,5 підтвердив ефективність нокауту гена *Cttna1* (рис. 3.5 *д* та *к*), так, ми не спостерігали позитивного сигналу після інкубації депарфінізованих секцій з антитілами проти α -Е-катеніну. Також, ми виявили, що делеція гена *Cttna1* не впливала на рівень експресії та розподіл білка N-кадгерину у серцях мутантних ембріонів (рис. 3.5 *г* та *і*), що свідчить про формування АК та ефективну міжклітинну адгезію між кардіоміоцитами.

Водночас, ми спостерігали підвищення рівня експресії α -Т-катеніну у мутантних серцях з делецією гена *Cttnn1* порівняно із контрольними серцями того ж терміну гестації (рис. 3.5 *є та л*).

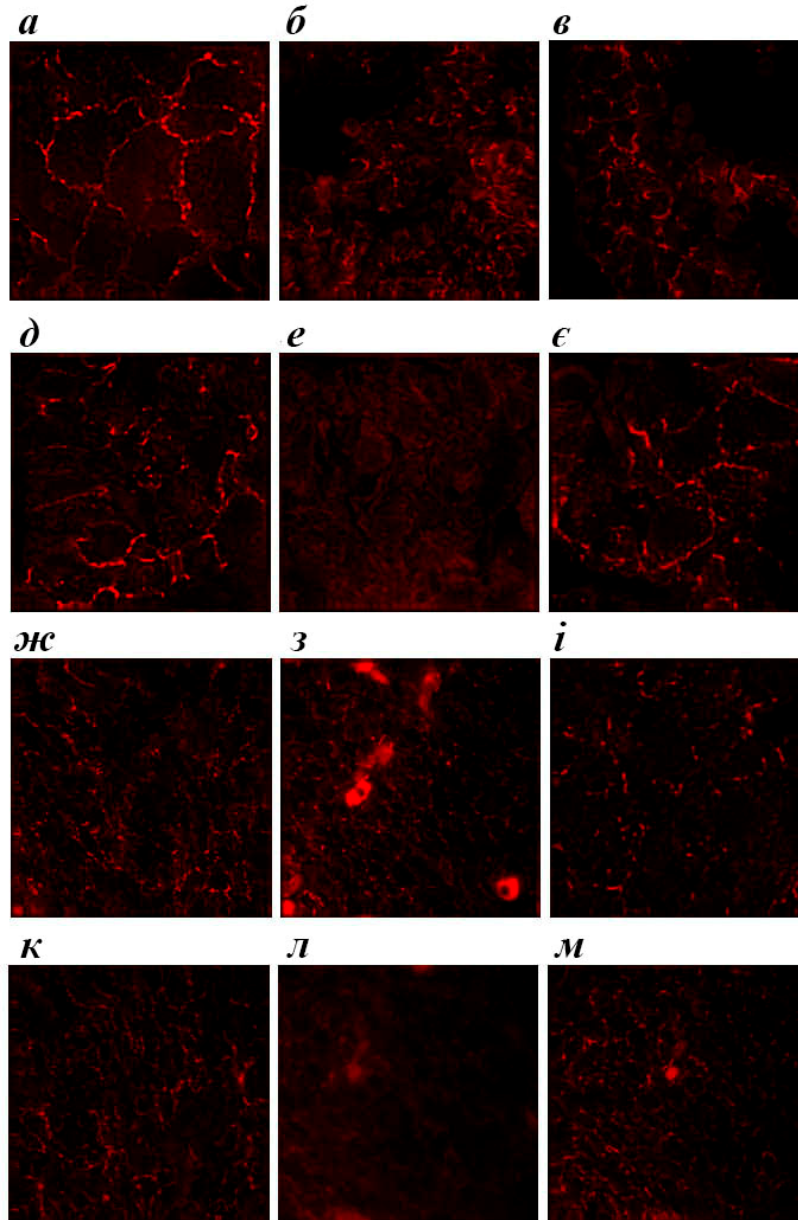


Рис. 3.5. Імуногістохімічний аналіз поперечних зрізів парафінових препаратів сердець ембріонів: зразки сердець терміном гестації E10,5 (*а – е*); зразки сердець терміном гестації E14,5 (*є-л*); зразки сердець контрольної групи (*а – в, є – з*); зразки сердець із гомозиготною делецією гена *Cttnn1* (*з – е, і – л*); імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти N-кадгерину (*а, з, є, і*); імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти α -Е-катеніну (*б, д, ж, к*); імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти α -Т-катеніну (*в, е, з, л*)

Як вже було зазначено у Огляді літератури, у серці експресується два α -катеніни: α -Т- та α -Е-катенін [103]. Незважаючи на високу гомологію між цими білками, вони мають деякі функціональні відмінності. Так, відомо, що α -Т-катенін забезпечує міцність адгеринових з'єднань, тоді як, α -Е-катенін є механосенсором [267]. Вочевидь, для формування ембріонального серця такі функціональні відмінності не є критичними. Проте не відомо, наскільки ефективним є таке функціональне заміщення для забезпечення розвитку та функціонування у міокарді дорослих організмів.

Отже, отримані нами дані демонструють, що делеція гена *Cttna1* у кардіоміоцитах ембріонів не впливає на розвиток ембріону та міокарду і не спричиняє порушень структури адгеринового комплексу, а отже і міжклітинної адгезії. Відсутність α -Е-катеніну функціонально компенсується іншим білком α -Т-катеніном, котрий досить ефективно здатен підтримувати адгезію кардіоміоцитів і формування серця під час ембріогенезу.

3.1.3 Нокаут гена *Cttnb1* у серці ембріонів не спричиняє виражених морфологічних вад але призводить до пізньої ембріональної летальності. Розвиток серця у ембріогенезі за умови специфічного нокауту гена *Cttnb1* вивчали із застосуванням аналогічної схеми схрещувань умовнонокаутних та трансгенних тварин, що застосовувалась і у попередніх роботах. Так само, як і при вивченні ролі гена *Cttnb1*, у цій серії досліджень, ми не виявили виражених морфологічних вад ембріонів та міокарду при делеції гена *Cttnb1*, та відсутності його продукту білка β -катеніну (рис 3.4 з-л). Загалом, ембріони із нокаутом досліджуваного нами гена та їхні серця терміном гестації 10,5 і 14,5 днів не відрізнялись від таких у контролі відповідного терміну гестації (рис 3.4 а-г).

Лише при аналізі розподілу генотипів, ми виявили, що гомозиготна делеція гена *Cttnb1* спричиняє летальність у пізньому ембріогенезі та серед новонароджених тварин (табл.3.1). Вочевидь, летальність таких ембріонів

починалась у пізньому ембріогенезі після E14,5 (табл. 3.1) оскільки їхня частота зменшувалась саме після цього терміну спостереження.

Імуногістохімічний аналіз парафінових препаратів ембріонального серця терміном гестації E10,5 та E14,5 по-перше, виявив відсутність експресії продукту гена *Cttnb1* у тканині мутантних сердець. По-друге, ми також не виявили змін рівню експресії чи розподілу, основного адгезивного білку, N-кадгерину у мутантних ембріонів порівняно із контрольними (рис. 3.6 *г* та *і*). Тож делеція гена *Cttnb1* не призводила до порушень структури адгеринового комплексу та формування адгезії між кардоіміоцитами у серцях мутантних ембріонів. Результати нашої роботи, дають змогу висунути припущення, що адгезивна функція продукту гена *Cttnb1*, білку β -катеніну, не є критичною для кардоігенезу після формування першого та другого серцевих полів.

Вочевидь, відсутність білка β -катеніну у структурі адгеринового комплексу компенсується його гомологом - плакоглобіном (γ -катеніном). Що також узгоджується із нашими результатами імуногістохімічного аналізу (рис. 3.6 *е*, *л*). Ми вже згадували, у Огляді літератури, що γ -катенін, за рахунок високої гомології до β -катеніну, здатен підтримувати структуру не лише десмосомальних комплексів а й АК. Окрім того, останніми роками обговорюється і можлива участь білка γ -катеніну у регулюванні сигнальних каскадів клітини, а саме канонічного Wnt-каскаду [192]. Припускається, що він, так само як і β -катенін, здатен проникати у ядро і утворювати потрійний комплекс γ -катенін/TCF/LEF/ДНК, модулюючи таким чином активність канонічного Wnt сигналінгу. Однак, мішені та ефект γ -катеніну, на відміну від β -катеніну, на разі не відомі. Також не відома його можлива сигнально-регуляторна функція у кардіогенезі чи міокарді новонароджених і дорослих тварин.

Тож, зважаючи на отримані дані, летальність новонароджених тварин та ембріонів із гомозиготним нокаутом гена *Cttnb1*, починаючи з терміну гестації E14,5, скоріш за все, є наслідком порушення активності канонічного Wnt-сигналінгу, а не утворення адгезивних комплексів у серцях ембріонів.

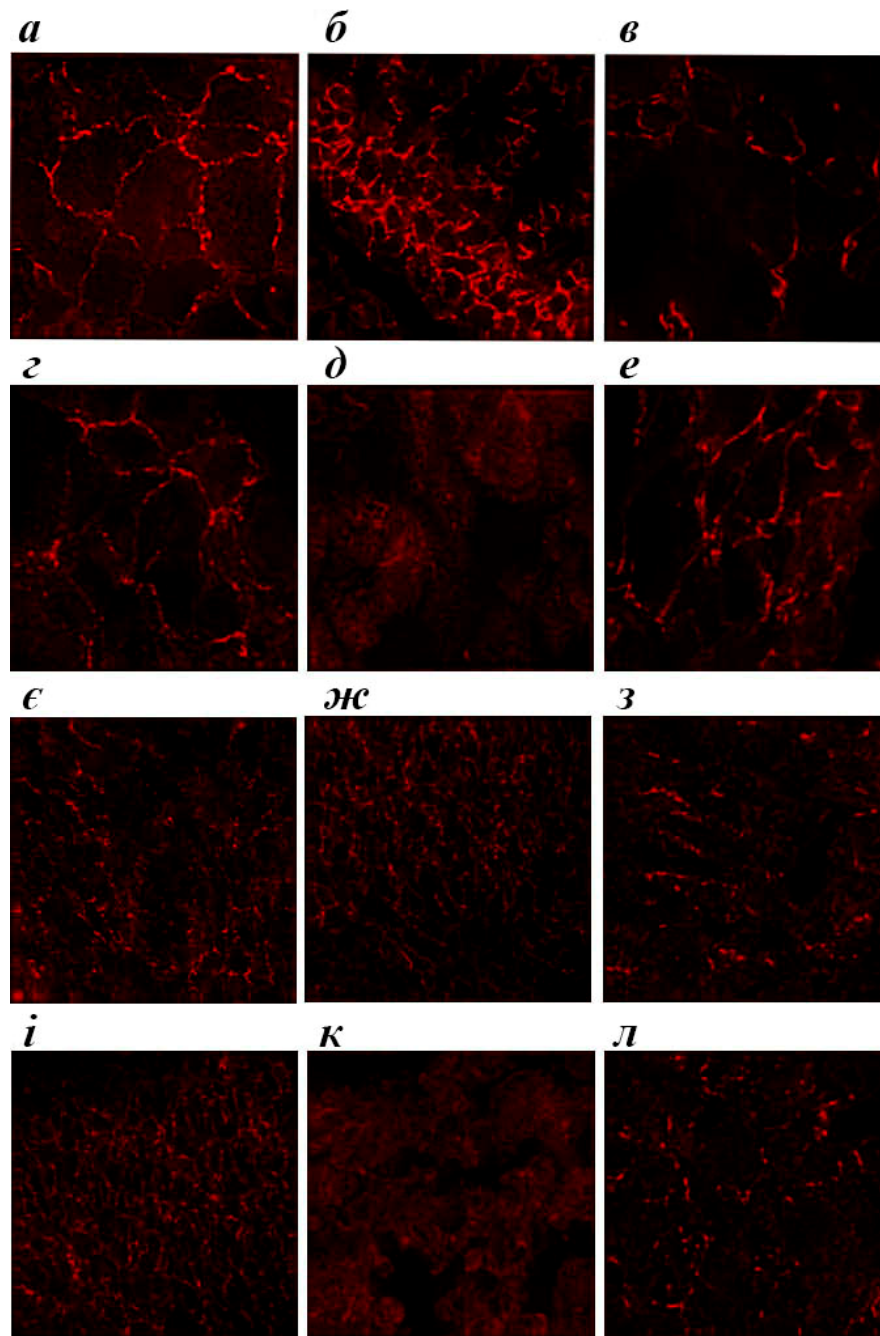


Рис. 3.6. Імуногістохімічний аналіз поперечних зрізів парафінових препаратів сердець ембріонів: серця терміном гестації E10,5 (*а-е*); серця терміном гестації E14,5 (*ж-л*); зразки сердець контрольної групи (*а-в, ж-з*); зразки сердець із гомозиготною делецією гена *Cttnb1* (*г-е, и-л*); імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти N-кадгерину (*а, г, ж, и*); імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти β-катеніну (*б, д, ж, к*); імуногістохімічне забарвлення з антитілами проти γ-катеніну (*в, е, з, л*)

3.2 Дослідження ролі цитоплазматичних партнерів N-кадгерину у неонатальному міокарді

Отже, нами було з'ясовано, що делеція гена *Cdh2* та відсутність експресії його продукту - N-кадгерину у серцях ембріонів є несумісною із життям, тож ми зосередились на аналізі функції його цитоплазматичних партнерів. І оскільки, ми не спостерігали виражених морфологічних вад ембріонів чи їхніх сердець після нокауту генів *Cttna1* та *Cttnb1*, ми вирішили проаналізувати, як саме делеція досліджуваних нами генів, у кардіоміоцитах, під час кардіогенезу, може вплинути на проліферативну активність неонатальних кардіоміоцитів (КМ).

Відомо, що між організацією цитоскелету та комплексами міжклітинної адгезії (АК, ІД) і проліферативною активністю КМ існує певний зв'язок [193,91]. Протягом ембріонального розвитку, та одразу після народження, КМ мають видовжену форму з рівномірним розподілом міофібрил. Термінальна диференціація або «визрівання» ембріональних клітин серця відбувається вже після народження, тоді, коли серце починає отримувати фізичні навантаження. Варто зауважити, що згадані морфологічні процеси супроводжуються і структуризацією адгезивних комплексів, а саме, N-кадгерин/катенінового комплексу. Спочатку, у КМ ембріонів, білки АК рівномірно розташовані вздовж клітинної мембрани, але при «визріванні» міокарду і термінальному диференціюванні КМ локалізація білків N-кадгерин/катенінового комплексу обмежується біполярними кінцями клітини. Це призводить до утворення спеціалізованих та чітко організованих структур – інтеркалярних дисків (ІД) [91].

Цікаво, що біполярна локалізація адгезивних білків та формування ІД корелює з різким зниженням проліферативної активності КМ у серцях новонароджених тварин. Це вказує на те, що міжклітинна адгезія як така, та білки що залученні до утворення та підтримання адгезивних комплексів

відіграють важливу роль у контролі проліферативної активності КМ та росту міокарду.

На користь такого припущення свідчать і дані про участь білків міжклітинної адгезії у регулюванні деяких сигнально-регуляторних каскадів клітини, а саме, β -катенін є транскрипційним ко-активатором канонічного Wnt-сигналіngu [109], α -E-катенін – здатен модулювати активність канонічного Wnt-та HIPPO-сигналінгів [278]. Однак, не відомо, як саме нокаут генів *Cttnn1* та *Cttnb1*, виключно у кардіоміоцитах сердець ембріонів, впливає на проліферативну активність КМ, їхню термінальну диференціацію та сигналінг, що залучені у її контролювання.

3.2.1 Аналіз контролю проліферації та розміру кардіоміоцитів сердець новонароджених тварин білками-компонентами комплексів міжклітинної адгезії. У своїй роботі, із застосуванням моделі умовного генетичного нокауту ми дослідили як делеція гена *Cttnn1* або *Cttnb1* у кардіоміоцитах під час кардіогенезу впливає на проліферативну активність неонатальних клітин серця. Перш за все, ми виявили, що гетерозиготна делеція гена *Cttnb1* у серці ембріонів спричиняє затримку росту міокарду новонароджених тварин (рис. 3.7 *a*). Варто зауважити, що при гомозиготній делеції цього гена, індекс співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ) також був статистично достовірно нижчим порівняно із контрольними тваринами та тваринам із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* (рис. 3.7 *a*). На противагу цим даним, як гетеро - так і гомозиготна делеція гена *Cttnn1* спричиняла підвищення маси серця новонароджених мишей віком P1 порівняно із контролем (рис. 3.7 *b*).

Аналіз проліферативної активності ізольованих кардіоміоцитів таких тварин, також виявив певну різницю між КМ з нокаутом генів *Cttnb1* та *Cttnn1* (рис 3.8). Хоча ми й не спостерігали статистично достовірної різниці між КМ контрольної групи та клітинами із гетерозиготною делецією, гомозиготний нокаут досліджуваного гена спричиняв статистично достовірне зниження

проліферативної активності КМ майже у 4 рази порівняно із клітинами двох інших груп (рис.3.8 *a*). Ймовірно, саме таке порушення проліферації КМ у серцях

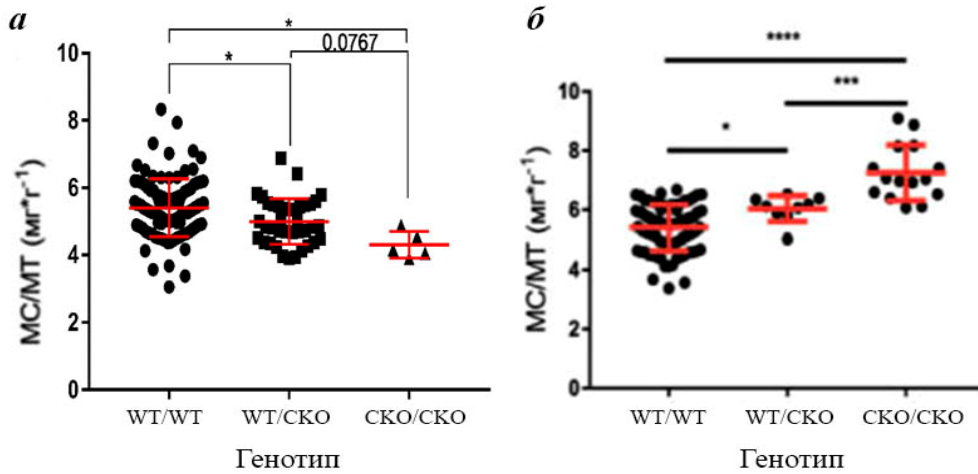


Рис 3.7. Аналіз співвідношення маси серця до маси тіла тварин віком P1 з кардіоспецифічною делецією гена *Cttnb1* (*a*) та гена *Cttna1* (*б*); WT/WT – контрольні тварини; WT/CKO- тварини з гетерозиготним нокаутом досліджуваного гена; CKO/CKO - тварини з гомозиготним нокаутом досліджуваного гена. Кількість тварин у кожній групі: *Cttnb1* WT/WT – 66, WT/CKO – 21; *Cttna1* 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

з гомозиготним нокаутом *Cttnb1* є причиною летальності мутантних тварин у пізньому ембріогенезі та одразу після народження (розділ 3.1.3). Цікаво, що і гетеро- і гомозиготна делеція гена *Cttna1* призводила до статистично достовірного підвищення проліферативної активності КМ порівняно із клітинами контрольної групи (рис.3.8 *б*). Можливо, це пояснює і підвищення значення індексу МС/МТ у новонароджених тварин з гетеро- та гомозиготною делецією гена *Cttna1* (рис. 3.7 *б*).

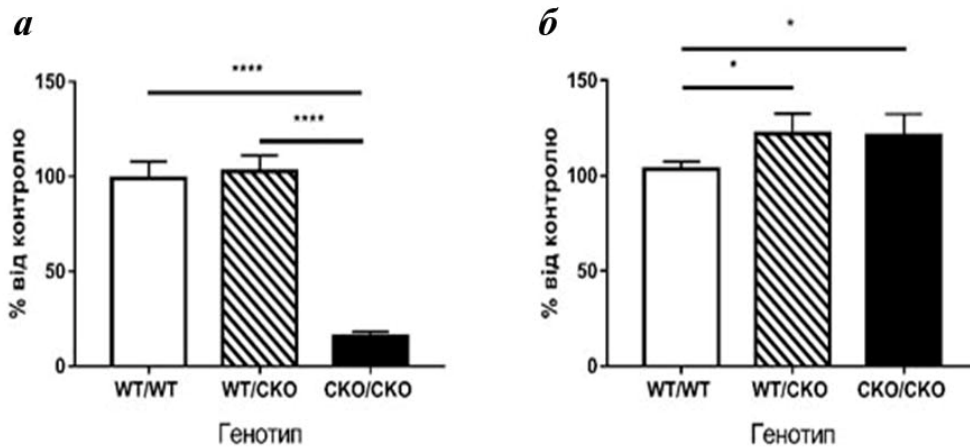


Рис 3.8. Аналіз проліферативної активності ізольованих КМ із кардіоспецифічною делецією гена *Ctnnb1* (а) та гена *Cttna1* (б); WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 3$ (за винятком кардіоміоцитів із гомозиготним нокаутом *Ctnnb1* (кардіоміоцити виділені із 2 сердець)). * – $p \leq 0,05$, **** – $p < 0,001$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Аналіз розмірів ізольованих КМ виявив що як гетеро- так і гомозиготна делеція гена *Ctnnb1* спричиняє збільшення довжини (рис 3.9 а) та ширини (рис 3.9 б) клітин серця мишенят. Однак, варто зауважити, що зміни параметру ширини ізольованих клітин були більш вираженими порівняно із параметром – довжини (рис 3.9). При делеції гена *Cttna1* обидва параметри зменшувались у клітин із гетеро - та гомозиготним нокаутом досліджуваного гена (рис 3.10). Причому, значення параметру ширини для клітин із гетерозиготною делецією гена *Cttna1* (рис 3.10 а) не займало проміжного значення між таким для клітин дикого типу та клітин із гомозиготним нокаутом гена, як при аналізі впливу делеції гена *Ctnnb1* (рис 3.9), а було статистично достовірно нижчим порівняно із іншими досліджуваними групами клітин.

Вочевидь, продукти досліджуваних нами генів, білки β -катенін та α -Е-катенін мають важливе значення у контролюванні проліферації та розмірів неонатальних кардіоміоцитів.

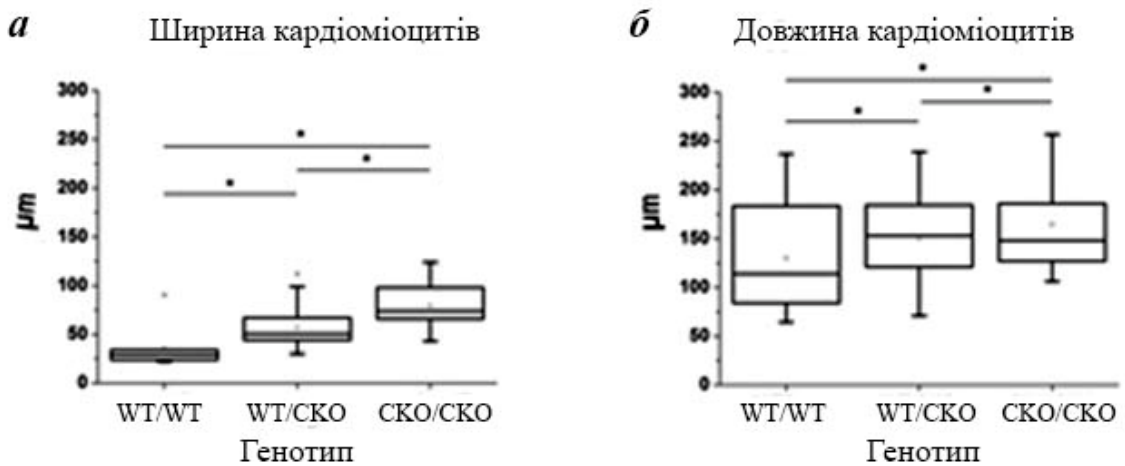


Рис 3.9. Аналіз впливу делеції гена *Ctnnb1* на розміри ізольованих кардіоміоцитів: ширина клітин (а); довжина клітин (б); WT/WT – контроль; WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Ctnnb1*; CKO/CKO – гомозиготи за нокаутом *Ctnnb1*. Аналізували не менше 50 кардіоміоцитів ізольованих із 3 сердець кожного генотипу, за винятком кардіоміоцитів із гомозиготним нокаутом *Ctnnb1* (кардіоміоцити виділені із 2 сердець). * – $p \leq 0.05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Ймовірно, делеція генів, що кодують ці білки спричиняє порушення як проліферації так і розмірів клітин неонатального міокарду. Так, наприклад, нокаут *Ctnnb1* спричиняє затримку проліферації клітин у серцях новонароджених тварин, що хоч і супроводжується збільшенням ширини та довжини таких клітин, все одно асоційовано із зменшенням розмірів серця у мишенят віком P 1-2, як у гетеро- так і гомозиготних за нокаутом досліджуваного гена. З іншого боку, втрата гена *Ctnna1* спричиняє збільшення маси серця у мишей, підвищення рівня проліферації у ізольованих неонатальних кардіоміоцитах та зменшення їхніх розмірів. Вочевидь, клітини із частковою та повною втратою гена *Ctnna1*, проліферують активніше, що спричиняє гіперплазію та збільшення розмірів серця.

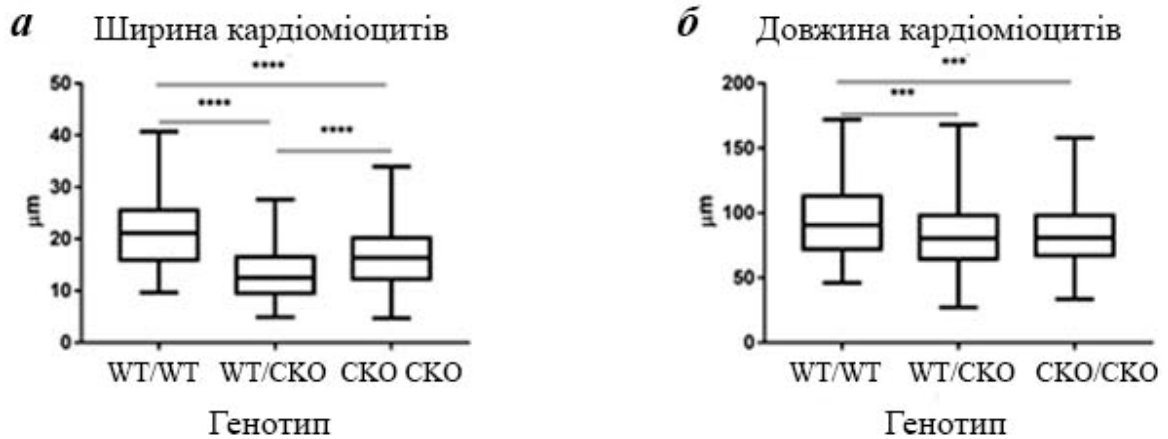


Рис 3.10. Аналіз впливу делеції гена *Cttna1* на розміри ізольованих кардіоміоцитів: ширина клітин (**а**); довжина клітин (**б**); WT/WT – контроль; WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Cttna1*; CKO/CKO – гомозиготи за нокаутом *Cttna1*. Аналізували не менше 50 кардіоміоцитів ізольованих із 3 сердець кожного генотипу, за винятком кардіоміоцитів із гомозиготним нокаутом *Cttna1* (кардіоміоцити виділені із 2 сердець). *** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.001$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Припускаємо, що порушення проліферативної активності у серцях новонароджених тварин, за умови делеції гена *Cttna1* або *Cttnb1*, є наслідком порушення сигнальної функції їхніх продуктів. Так добре відомо, що β -катенін, продукт гена *Cttnb1*, є основним медіатором канонічного Wnt сигналінгу [192]. Для α -Е-катеніну, продукту гена *Cttna1*, також нещодавно, була показана здатність модулювати кілька сигнальних каскадів клітини: канонічний Wnt та HIPPO [215,137,41,73].

Загалом, наші дані, не лише демонструють важливу роль білків та генів, що їх кодують, що залучені до підтримання міжклітинної адгезії, у контролюванні проліферації неонатальних кардіоміоцитів та розвитку серця, а й їхню сигнально-регуляторну функцію, що викликає інтерес та потребує більш детального аналізу.

3.2.2 Делеція цитоплазматичних партнерів N-кадгерину пригнічує визрівання постнатальних кардіоміоцитів. Порушення проліферації неонатальних КМ свідчить не лише про можливу сигнальну функцію β -катеніну та α -Е-катеніну і їхню участь у регуляції поділу і розмірів клітин серця у новонароджених тварин, а й про їхній вплив на визрівання КМ або їхню термінальну диференціацію. Як ми вже згадували вище, проліферація КМ та формування ІД безпосередньо пов'язані із термінальною диференціацією неонатальних КМ [193,91].

Тож, на початку цього етапу роботи, ми проаналізували зміни рівнів експресії фетальних генів у неонатальних кардіоміоцитах за умови гетеро- та гомозиготної делеції гена *Cttnn1* порівняно із контролем. У результаті, ми виявили статистично достовірне підвищення експресії гена *ANP* як у кардіоміоцитах із гетеро- так і з гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* (рис. 3.11).

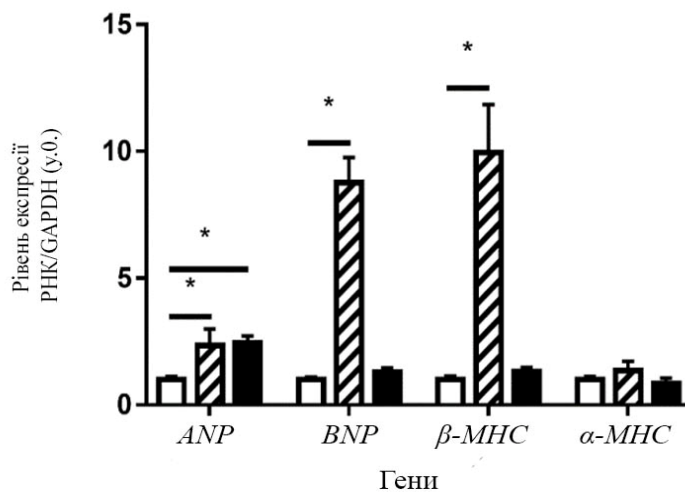


Рис. 3.11. Аналіз експресії фетальних генів у неонатальних кардіоміоцитах за умови нокауту гена *Cttnn1*. - WT/WT, - WT/CKO, - CKO/CKO; WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. * – $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Однак, експресія інших двох фетальних генів: *BNP* та β -*MHC* статистично достовірно зростала лише у клітинах із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1* (рис. 3.11). Ймовірно, делеція *Cttnn1* спричиняє порушення не лише проліферативної активності клітин серця а й впливає на післянатальний розвиток серця в цілому.

Зміни експресії фетальних генів *ANP* та *BNP* у неонатальних та ембріональних кардіоміоцитах ми спостерігали і за умови гетерозиготного нокауту *Cttnnb1* (рис 3.12). Однак, варто зауважити що, за умов експерименту, лише на деяких термінах ембріонального розвитку рівень експресії фетальних генів був статистично достовірно вищим у мутантних клітинах ніж у контролі. Так, рівень експресії *ANP* статистично достовірно зростав у ембріональних серцях на стадії розвитку E14,5, тоді як *BNP* - на E12,5. Проте, отримані нами дані свідчать про порушення експресії фетальних генів у кардіоміоцитах із нокаутом гена *Cttnnb1*. Ймовірно, втрата цього гена, також буде спричиняти порушення термінального диференціювання неонатальних кардіоміоцитів.

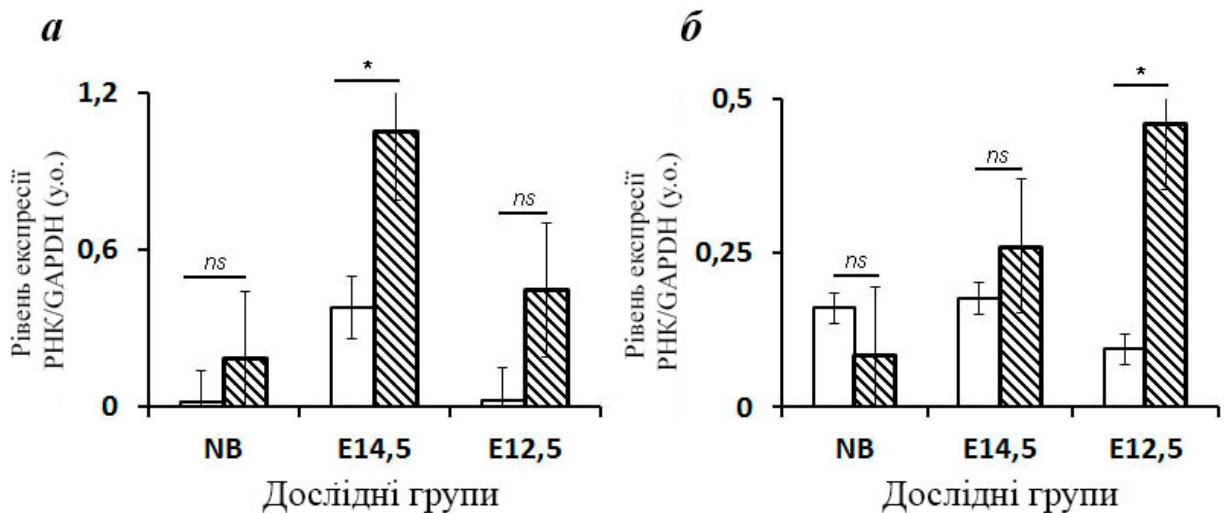


Рис. 3.12. Аналіз експресії фетальних генів *ANP* (а) та *BNP* (б) у серцях ембріонів та новонароджених тварин за умови нокауту гена *Cttnnb1*. - WT/WT, - WT/CKO ; WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи. ns – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Як було показано раніше, у мишей, протягом першої доби життя відбувається каріокінез клітин серця без послідуєчого цитокінезу [193], ця подія є ознакою термінальної диференціації неонатальних кардіоміоцитів та їхнього перемикання на дорослу генетичну програму. Ґрунтуючись на результатах аналізу проліферативної активності та розмірів неонатальних кардіоміоцитів а також особливостях експресії фетальних генів у мутантних клітинах ми припустили, що нокаут гена *Cttnb1* та *Cttnn1* спричиняє порушення термінальної диференціації КМ. Тож, ми проаналізували частоту одно- та двоядерних кардіоміоцитів виділених із мутантних та контрольних сердець. Виявилось, що і гетеро- і гомозиготна делеція *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє достовірне зниження кількості двоядерних КМ порівняно із контрольними клітинами (рис. 3.13 *a*). У випадку делеції іншого цитоплазматичного партнеру N-кадгерину – *Cttnb1*, відсоток двоядерних кардіоміоцитів також знижувався порівняно із контролем (рис. 3.13 *б*). Усе разом, це свідчить про затримку термінальної диференціації кардіоміоцитів як із делецією *Cttnn1* так і з нокаутом *Cttnb1*.

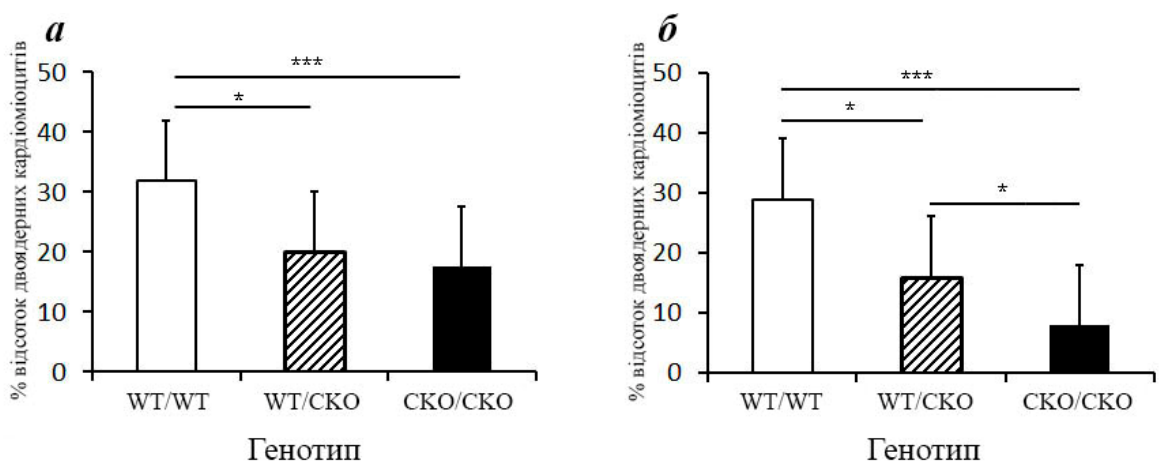


Рис. 3.13. Аналіз частоти двоядерних кардіоміоцитів у клітинах із нокаутом *Cttnn1* (*a*) та *Cttnb1* (*б*) супроводжується зниженням кількості двоядерних кардіоміоцитів. WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. * – $p \leq 0,05$, *** – $p < 0,005$, за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Загалом, отримані нами дані підтверджують висунуте нами припущення, що цитоплазматичні партнери N-кадгерину мають важливе значення у постнатальному формуванні міокарду і задіяні у регулюванні термінальної диференціації кардіоміоцитів.

3.2.3 Нокаут гена *Cttnn1* спричиняє порушення активності канонічного Wnt – та HIPPO сигнальних каскадів у неонатальних кардіоміоцитах. Практично одночасно з нашою роботою, із застосуванням умовнонокаутних тварин було показано, що делеція гена *Cttnn1* та *Cttnn3* у кардіоміоцитах асоційована із підвищенням транскрипційної активності Yap - основного модулятора HIPPO сигнального каскаду [137]. Останній, як відомо, є одним із важливих регуляторів розмірів кардіоміоцитів та серця [85]. Важливо, що у цій роботі автори спостерігали не лише підвищення транскрипційної активності Yap, а й підвищення проліферативної активності кардіоміоцитів. У своїй роботі, ми також спостерігали, що нокаут гена *Cttnn1* у ембріональному серці спричиняє підвищення проліферативної активності неонатальних клітин та зменшення їхніх розмірів (Розділ 3.2.1). Ми припустили, що такі порушення у мутантних кардіоміоцитах є наслідком порушення сигнальної функції α E-катеніну, продукту гена *Cttnn1*.

Відомо, що канонічний Wnt та HIPPO сигналінги є одними з основних регуляторів як розмірів клітин, так і їхньої проліферативної активності і диференціювання [15]. Також для α -E-катеніну була показана здатність модулювати активність цих каскадів у клітинних тест системах [137,41,215]. Тож, ми проаналізували активність канонічного Wnt та HIPPO сигналінгів у неонатальних кардіоміоцитах із гетеро- та гомозиготною делецією гена *Cttnn1*.

У результаті проведених досліджень ми виявили підвищення транскрипційної активності β -катеніну та Yap у клітинах новонароджених сердець як з гетеро- так і з гомозиготним нокаутом досліджуваного гена (рис 3.14 *a* та *б*). А саме, ми спостерігали підвищення рівнів експресії генів мішеней

β -катеніну: *c-Myc* і *Axin2* в обох дослідних групах (рис. 3.14 а). Однак рівень експресії іншого гена - *CyclinD1* підвищувався лише у клітинах із гомозиготною делецією *Cttnn1* (рис. 3.14 а).

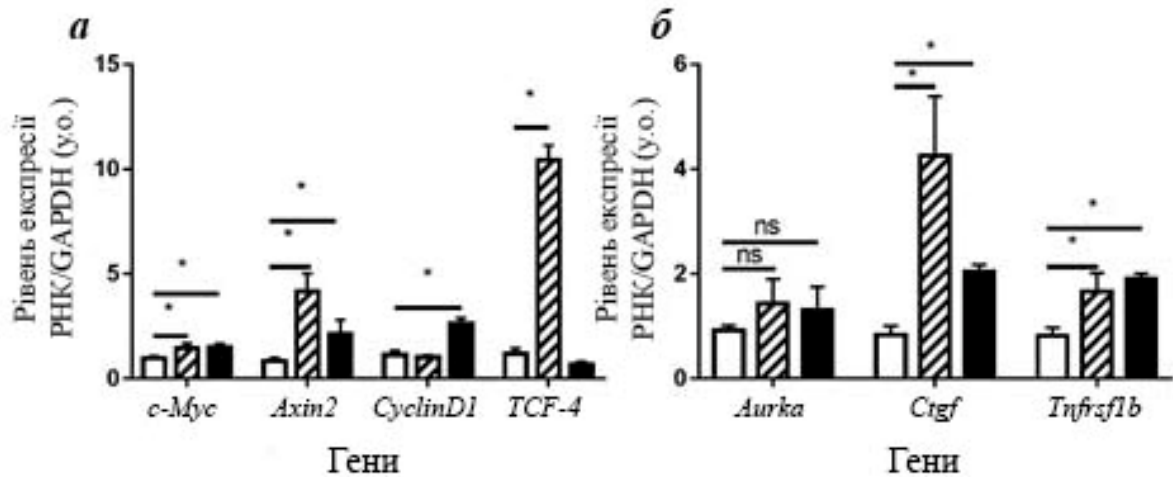


Рис. 3.14. Аналіз активності канонічного Wnt - та HIPPO сигнальних каскадів у неонатальних кардіоміоцитах за умови нокауту гена *Cttnn1*: а) аналіз змін експресії генів залучених до канонічного Wnt сигналінгу б) аналіз змін експресії генів мішеней Yар; - WT/WT, - WT/CKO, - CKO/CKO; WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. ns – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Цікаво, що рівень експресії *TCF4* був статистично достовірно вищим лише у клітинах гетерозиготних за нокаутом *Cttnn1* (рис. 3.14 а). Особливості експресії генів *CyclinD1* та *TCF4* за умови делеції гена *Cttnn1*, з одного боку, вказують на досить складний механізм сигнальної функції продукту цього гена - білка α -Е-катеніну, а з іншого - складність регуляції канонічного Wnt сигналінгу загалом. Незважаючи на це, зростання експресії генів *c-Myc* та *Axin2* свідчить про підвищення сигнальної активності канонічного Wnt та β -катеніну зокрема, у неонатальних кардіоміоцитах із гетеро – та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1*.

Аналіз рівнів експресії генів-мішеней Υ ар: *Ctgf*, *Tnfrsf1b* також виявив підвищення їхньої експресії у кардіоміоцитах із нокаутом гена *Cttnn1* (рис. 3.14 б) за умов експерименту. Отримані дані вказують на підвищення сигнальної активності Υ ар у цих клітинах, що також узгоджується з даними отриманими іншими авторами [137].

Таким чином, нам вдалось показати, що продукт досліджуваного нами гена, α -Е-катенін має сигнальну функцію, а саме він регулює активність канонічного Wnt та HIPPO – сигналінгів у кардіоміоцитах і є супресором транскрипційної активності основних медіаторів цих каскадів: β -катеніну та Υ ар відповідно. Тож, функція досліджуваного нами гена є критичною для формування постнатального міокарду за рахунок участі його продукту у регулюванні сигнальних каскадів (канонічного Wnt та HIPPO – сигналінгів).

3.2.4 Делеція гена *Cttnb1* у кардіоміоцитах призводить до порушень активності канонічного Wnt сигналінгу у серцях ембріонів та новонароджених тварин. Канонічний Wnt сигналінг є одним із регуляторів поділу, росту та диференціювання клітин. У свою чергу, β -катенін – основний транскрипційний ко-фактор цього сигнального каскаду, тож цей білок також є важливим регулятором багатьох процесів у клітині. Зважаючи на отримані нами дані, ми припустили, що нокаут гена, що кодує цей білок - *Cttnb1* призводить до порушення активності канонічного Wnt сигналінгу у пізньому кардіогенезі та новонародженому серці. Тож, ми проаналізували зміни рівнів експресії генів, що залучені до канонічного Wnt-сигналінгу (*TCF4* та *Axin2*) і генів що перебувають під його регуляцією (*c-Fos* і *CyclinD1*) у ембріональних та новонароджених серцях з гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1*. Також, для оцінки активності канонічного Wnt сигналінгу, проаналізували зміни вмісту фосфорильованого білка $GSK3\beta/\alpha$ у лізатах новонароджених сердець з гетерозиготним нокаутом *Cttnb1* порівняно із контролем.

Аналіз зразків сердець ембріонів виявив, що в серцях контрольної групи ембріонів відбувається підвищення рівнів експресії генів *TCF4* та *Axin2* на 14,5

добу ембріонального розвитку (рис. 3.15). Дані стосовно експресії генів-мішеней канонічного Wnt-сигналіngu *c-Fos* і *CyclinD1* узгоджуються із попередніми результатами та також свідчать про активацію канонічного Wnt-сигналіngu у пізньому ембріогенезі (E14, 5) за нормальних умов. Цікаво, що у серцях новонароджених тварин контрольної групи, рівень експресії генів *TCF-4* та *Axin2* зменшувався майже вдвічі порівняно із зразками на стадії розвитку E14,5. Це свідчить про пригнічення активності Wnt у постнатальному серці до базального рівня і узгоджується із літературними даними.

Однак, при аналізі зразків новонароджених сердець із гетерозиготною делецією гена *Ctnnb1*, нами було виявлено, що рівень експресії генів *TCF4*, *Axin2*, *c-Fos* і *CyclinD1* був суттєво, а іноді навіть вдвічі, вищий ніж такий у контрольних зразках (рис. 3.15).

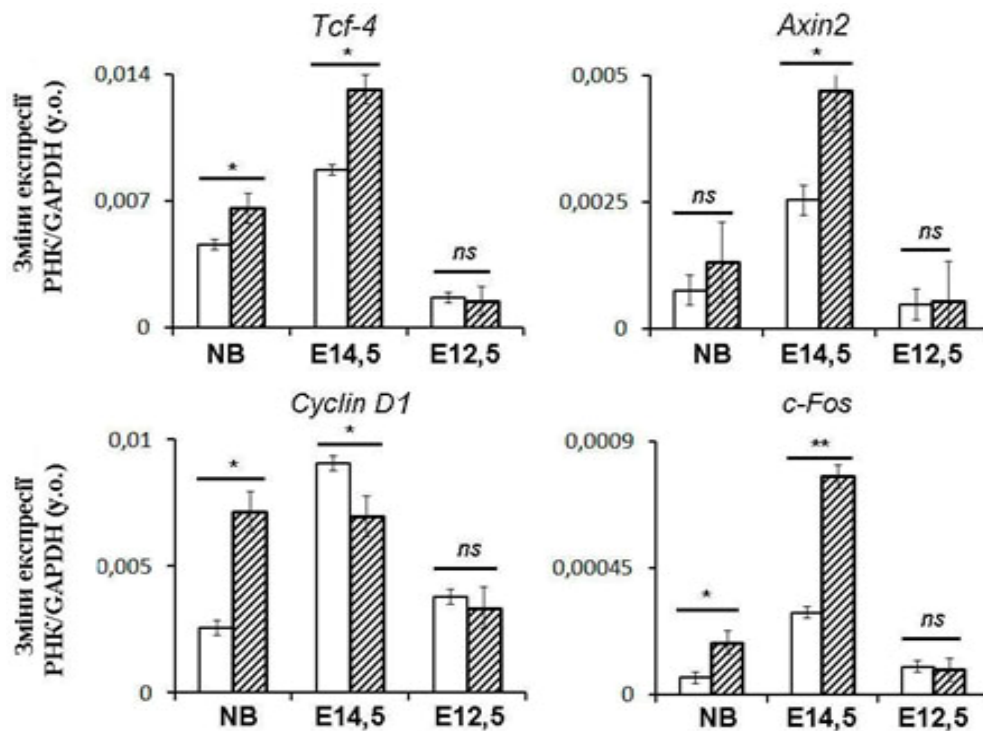


Рис.3.15. Кінетика активності Wnt/ β -катенінового сигнального шляху у ембріональних (E12,5 і E14,5) та новонароджених серцях (NB) за умови гетерозиготної делеції гена *Ctnnb1*: - WT/WT, - WT/CKO; WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи; кількість тварин в кожній групі – не менше 2; ns – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

При аналізі зразків сердець ембріонів обох груп, ми не спостерігали різниці між рівнями експресії досліджуваних генів на стадії ембріонального розвитку E12,5, проте на стадії розвитку E14,5 усі зазначені гени окрім *CyclinD1* експресувалися на вищому рівні у серцях із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* порівняно із контрольними зразками (рис. 3.15). Зниження експресії останнього може бути результатом впливу інших сигнальних каскадів, оскільки *CyclinD1* перебуває під контролем кількох сигналінгів [95].

Загалом, складається таке враження, що в ембріональних серцях з втратою одного алеля гена *Cttnb1* рівень активації канонічного Wnt суттєво вищий порівняно із контролем. І, незважаючи на те, що у серцях мутантних новонароджених тварин рівень активності канонічного Wnt також був вищим, серця з гетерозиготною делецією гена мали меншу масу порівняно із контрольними серцями на стадії розвитку P1-2 (рис.3.7). Цікаво, що при проведенні вестерн-блот аналізу вмісту фосфорильованої форми GSK3 α/β у серцях новонароджених мишей, ми також спостерігали підвищення її вмісту у зразках із сердець з гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* (рис.3.16).

Нагадаємо, що підвищення вмісту фосфорильованої GSK3 α/β свідчить про дисоціацію β -катенінового деградувального комплексу та підвищення транскрипційної активності β -катеніну, що в цілому узгоджується із даними ПЛР аналізу (рис.3.15). Однак, неочікуваним, у нашій роботі, виявилось не лише підвищення активності канонічного Wnt у серцях із гетерозиготним нокаутом досліджуваного гена, а й різниця між вмістом самих ізоформ GSK3 α та GSK3 β . Так у своїй роботі ми спостерігали, що вміст фосфорильованої GSK3 α у серцях і гетерозиготним нокаутом *Cttnb1* зростав у двічі порівняно із контролем та зразками із сердець із повним нокаутом гена *Cttnb1*. У той же час фосфорильована GSK3 β також статистично достовірно зростала, проте не так інтенсивно (рис. 3.16).

Відомо, що GSK3 α та GSK3 β є досить гомологічними білками, хоча й кодуються різними генами, детально їхню функцію дослідити досить важко через відсутність ефективних таргетних інгібіторів і їхню високу гомологію.

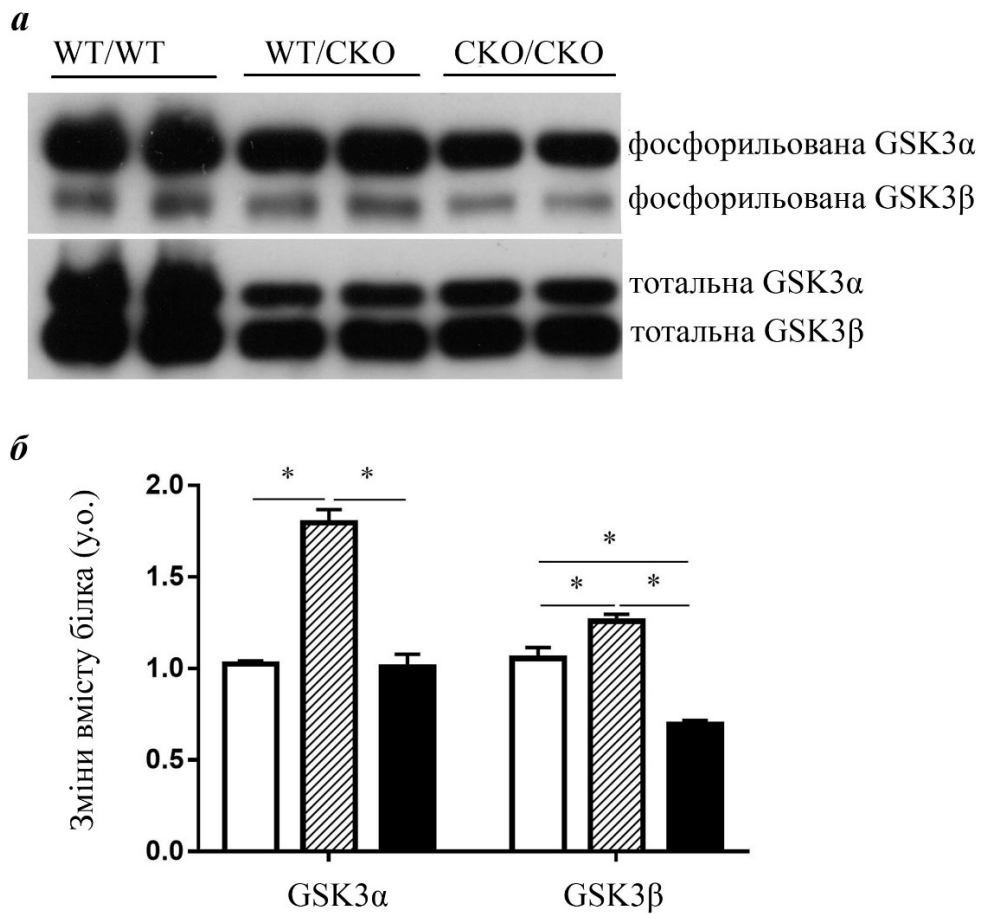


Рис. 3.16. Вестен-блот аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої GSK3α/β у лізатах сердець (P1-3) контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією *Cttnb1*: а – типовий Вестерн блот, б – денситометрія експресії фосфорильованої GSK3α/β нормалізована відносно тотальної GSK3α/β. Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із 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 із *post hoc* тестом Тукея

Однак, нещодавні роботи виявили, що функція цих двох ізоформ GSK3 у кардіоміоцитах є різною. Так із застосуванням рибок даніо було показано, що у кардіогенезі, GSK3α необхідна для виживання кардіоміоцитів, тоді як GSK3β

залучена до модуляції лівої/правої асиметрії тіла та позиціонування міокарду [133].

Так автори з'ясували, що кнокдаун GSK3 α спричиняє активацію апоптозу та зменшення кількості кардіоміоцитів у кардіогенезі. Цікаво, що у своїй роботі, ми спостерігали зниження проліферативної активності кардіоміоцитів із нокаутом гена *Cttnb1*, проте ми не можемо стверджувати, що це є наслідком зміни вмісту активної форми GSK3 α у мутантних клітинах. Із використанням технології генетичного нокауту у серцях дорослих мишей було показано, що зменшення експресії GSK3 α , навпаки сприяє проліферації кардіоміоцитів у дорослому серці після інфаркту міокарду та асоційоване зі зменшенням ремоделювання серця [4]. Тож, достеменно функція ізоформи GSK3 α у серці не з'ясована.

При аналізі вмісту фосфорильованих форм GSK3 α/β у лізатах сердець новонароджених тварин із гомозиготним нокаутом гена *Cttnb1* ми не виявили статистично достовірних змін вмісту фосфорильованої GSK3 α . Проте, вміст фосфорильованої GSK3 β статистично достовірно знижувався порівняно із контролем та зразками із гетерозиготним нокаутом *Cttnb1* (рис.3.16). З одного боку це свідчить про пригнічення активності канонічного Wnt сигналіngu у серцях новонароджених тварин із гомозиготним нокаутом *Cttnb1*, що було досить очікуваним результатом. Оскільки саме GSK3 β вважається основним регулятором активності канонічного Wnt сигналіngu. З іншого боку – зміни вмісту фосфорильованої GSK3 α , тобто зменшення вмісту активного білка у клітинах із нокаутом *Cttnb1* радше викликають нові питання щодо особливостей регулювання Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду.

Вище ми вже зазначали, що у клітинах серця експресується і інший білок, що здатен функціонально компенсувати втрату β -катеніну, та забезпечити організацію АК – γ -катенін (плакоглобін). Останнім часом накопичені дані і стосовно його можливої участі у регуляції активності канонічного Wnt-сигналіngu [276]. Тож ми припустили, що ймовірно у нашій моделі, за умови дефіциту та/або повної відсутності білка β -катеніну, до регуляції активності

канонічного Wnt залучається і γ -катенін також. Тож, ми проаналізували зміни рівню експресії гена, що кодує цей білок – *Jup*, у досліджуваних зразках.

Виявилось, що рівень експресії *Jup* був майже у двічі нижчим у серцях ембріонів (E14,5) з гетерозиготною делецією гена *Cttnb1* (рис 3.17 *a*). І навпаки, у серцях новонароджених тварин, цей рівень був удвічі вищим. Аналіз зміни вмісту білка γ -катеніну у лізатах сердець мишенят із гомо – та гетерозиготною делецією *Cttnb1* також виявив статистично достовірне підвищення вмісту білка як у серцях із гетеро- так і гомозиготним нокаутом гена *Cttnb1* (рис.3.17 *б* та *в*).

Причому, у серцях із гомозиготною делецією *Cttnb1* вміст білка γ -катеніну був статистично достовірно вищим ніж у серцях із гетерозиготним нокаутом досліджуваного гена (рис.3.17 *б* та *в*). Таке зростання експресії γ -катеніну узгоджується з нашим припущенням і є логічним, оскільки при нокауті гена *Cttnb1* відбувається функціонально компенсація останнього плакоглобіном. Імуногістохімічний аналіз сердець ембріонів (рис.3.7) свідчить на користь ефективності такої компенсації у сенсі утворення та підтримки міжклітинної адгезії протягом кардіогенезу, проте не відомо, чи здатен γ -катенін функціонально компенсувати структурну і сигнальну функцію β -катеніну у постнатальному міокарді.

Окрім того нами було показано статистично достовірне зменшення вмісту основного білка АК – N-кадгерину у лізатах сердець як із гетеро- так і з гомозиготним нокаутом гена *Cttnb1* (рис.3.17 *з*). Останнє вказує на порушення формування АК у мутантних неонатальних серцях. З одного боку за рахунок порушення сигнальної функції β -катеніну, може відбуватись порушення поляризації постнатальних кардіоміоцитів і утворення АК. А порушення проліферативної активності та термінальної диференціації клітин нами було показано при виконанні цього дослідження (Підрозділ 3.2.1 – 3.2.2.). З іншого боку, ця знахідка вказує на те, що функціональної компенсації γ -катеніну не достатньо для формування міжклітинної адгезії у новонародженому серці.

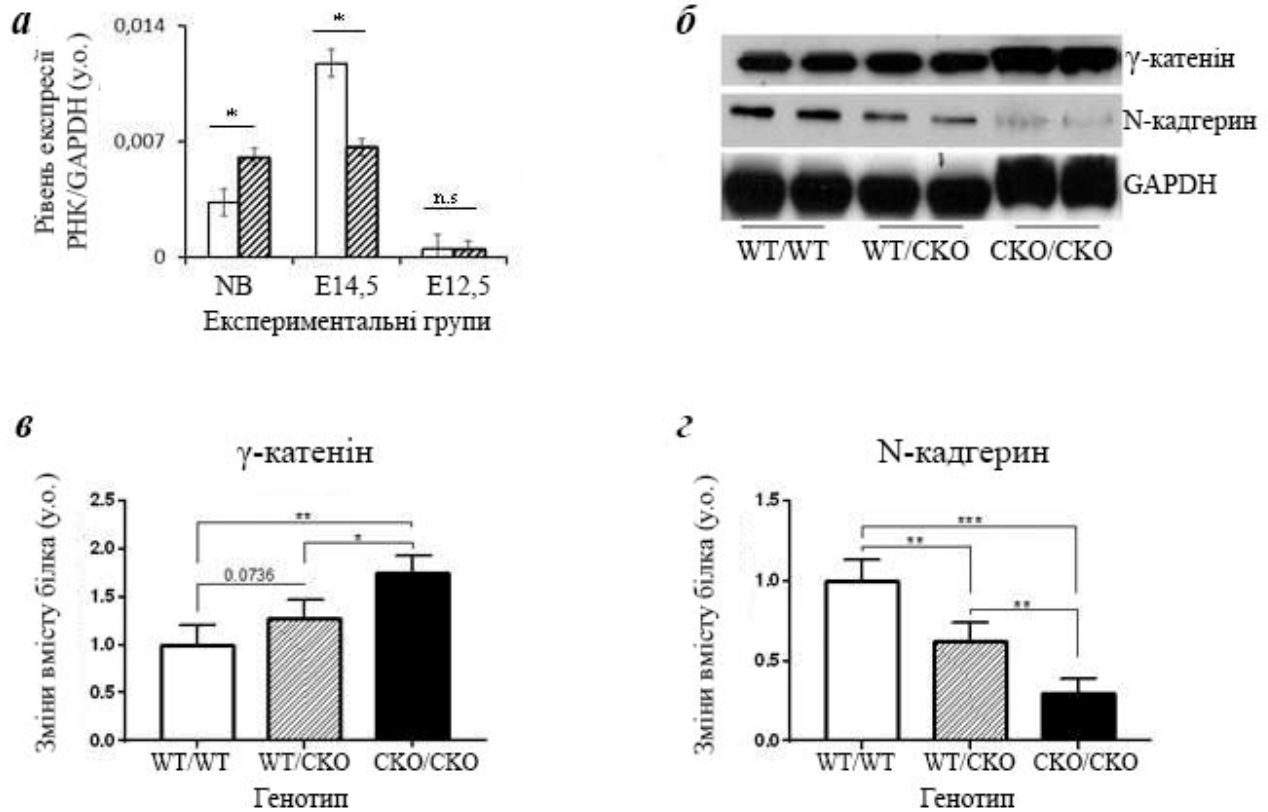


Рис. 3.17. Аналіз експресії білків адгеринового комплексу (АК) у лізатах сердець новонароджених мишей (P1-3); аналіз зміни експресії гена *JUP* за умови кардіоспецифічної делеції гена *Ctnnb1* у серцях ембріонів (E14,5 та E12,5) та новонароджених мишей (NB) (а); типовий вестерн блот; в – денситометрія експресії тотального γ -катеніну(б); денситометрія вмісту N-кадгерину (г). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. - WT/WT, - WT/CKO; WT/WT – контрольні зразки, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. n = 3 -5 у всіх групах. ns – $p > 0,05$; * - $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Отже, нами було показано, що у ембріональному серці канонічний Wnt-сигналінг, вочевидь, активується не лише для того щоб відбулась ініціація кардіальної мезодерми та експансія кардіальних клітин [192], а й для того, щоб на більш пізніх стадіях кардіогенезу (E14,5), вже сформоване серце ембріону росло. Пригнічення цього сигнального каскаду у тварин з контрольним

генотипом відбувається у постнатальному серці, ймовірно це є необхідною умовою для термінального диференціювання кардіоміоцитів.

Кардіоспецифічний нокаут гена *Ctnnb1* спричиняє порушення активності канонічного Wnt сигналіngu у пізньому ембріогенезі (E14,5) та у міокарді новонароджених тварин (P1-2). Окрім того, нам вдалось зареєструвати підвищення рівня експресії гена *Jup* у серцях новонароджених мишей з гетеротагомозиготним нокаутом досліджуваного гена. Ймовірно, γ -катенін, продукт гена *Jup*, приймає участь не лише у підтримці структури АК а й у регулюванні канонічного Wnt сигналіngu у якості транскрипційного ко-активатора, однак це припущення потребує більш детального аналізу. Окрім того, ефективність такої компенсації також викликає питання, оскільки у роботі ми спостерігали зменшення вмісту білка N-кадгерину у серцях із нокаутом гена *Ctnnb1*, що свідчить про порушення формування АК.

3.3 Вивчення особливостей регулювання активності канонічного Wnt сигналіngu у кардіоміоцитах за умови нокауту гена *Ctnnb1*

Ми вже зазначали вище, що γ -катенін - не лише основний десмосомальний катенін, він також здатен підтримувати організацію та структуру адгеринового комплексу. Проте, згідно останніх літературних даних, цей білок також залучений до регулювання сигнальних каскадів, а саме, γ -катенін, вочевидь, залучений до регулювання активності канонічного Wnt сигналіngu. Дійсно, γ -катенін може зв'язуватись із TCF4 і його локалізація була показана у ядрі клітин, однак попередні дані стосовно його сигнальної функції досить суперечливі. Одні експериментальні роботи свідчать на користь того, що γ -катенін здатен повністю підтримувати сигналізацію канонічного Wnt і компенсувати нокаутований β -катенін [150], інші – що γ -катенін пригнічує Wnt залежну транскрипцію генів [7], а інші – що γ -катенін має свої гени – мішені і це абсолютно змінює сенс канонічного Wnt сигналіngu у клітині [229]. Проте,

достеменно не відомо, чи здатен γ -катенін регулювати активність канонічного Wnt сигналіngu у кардіоміоцитах як під час кардіогенезу так і у постнатальному міокарді.

Тож, зважаючи на отримані нами дані, надалі ми зосередились на перевірці цієї гіпотези, а саме участі γ -катеніну у регулюванні активності канонічного Wnt сигналіngu у серцях новонароджених мишенят за умови нокауту гена *Ctnnb1*. Цей етап досліджень став можливим завдяки адаптації та застосуванню одного із сучасних методів молекулярної генетики, а саме, методу імунопреципітації хроматину (ChIP) із послідуочим ПЛР аналізом у реальному часі (ChIP-qPCR). Перш за все, при виконанні досліджень нами було адаптовано усі етапи методики для роботи із зразками тканини серця миші (P3). У якості підґрунття були використані опубліковані протоколи застосування методу для роботи із культурами клітин та деякими зразками тканин [142]. Адаптована нами методика детально викладена у розділі Матеріали та методи дослідження.

Варто нагадати, що метод ChIP фактично дозволяє досліджувати широкий спектр білок-ДНК асоціацій у межах цілого геному окремих клітинних популяцій чи тканин [70,142]. ChIP можна успішно застосовувати для визначення специфічних генів мішеней того чи іншого транскрипційного фактору. За допомогою специфічних антитіл та методиці ChIP ми можемо «виловити» усі ДНК мотиви які зв'язані із досліджуваним транскрипційним фактором у тій чи іншій тканині, чи на певній стадії ембріогенезу чи канцерогенезу чи інше. А послідуочий сиквенс ідентифікованих, у такий спосіб ділянок ДНК, дає змогу не лише виявити нові гени-мішені а й досить точно охарактеризувати специфічні зв'язувальні мотиви ДНК у структурі генів-мішеней досліджуваного транскрипційного фактору. Загалом, метод ChIP з послідуочим сиквенсом чи ПЛР аналізом у реальному часі є актуальним і досить точним методом при дослідженні особливостей регуляції експресії генів, встановленні генетичного профілю того чи іншого процесу [171].

У своїй роботі ми проаналізували зв'язування β -катеніну та γ -катеніну із ДНК у новонароджених (P2 -3) контрольних серцях та серцях із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*. Валідацію результатів імунопреципітації (IP) проводили із застосуванням методу ПЛР у реальному часі, праймери підбирали специфічно до консервативних фрагментів ДНК у структурі генів що містять Wnt responsible motive [258]. У результаті, нами було виявлено, що β -катенін зв'язувався з передбачуваними ділянками геному у контрольних серцях новонароджених тварин (P2-3). Як і очікувалось, ми спостерігали високий рівень зв'язування із генами *Axin*, *c-Myc* та *Lef1* (рис. 3.18). Ці дані свідчили на користь того, що метод працює коректно і умови реакції підібрані вдало.

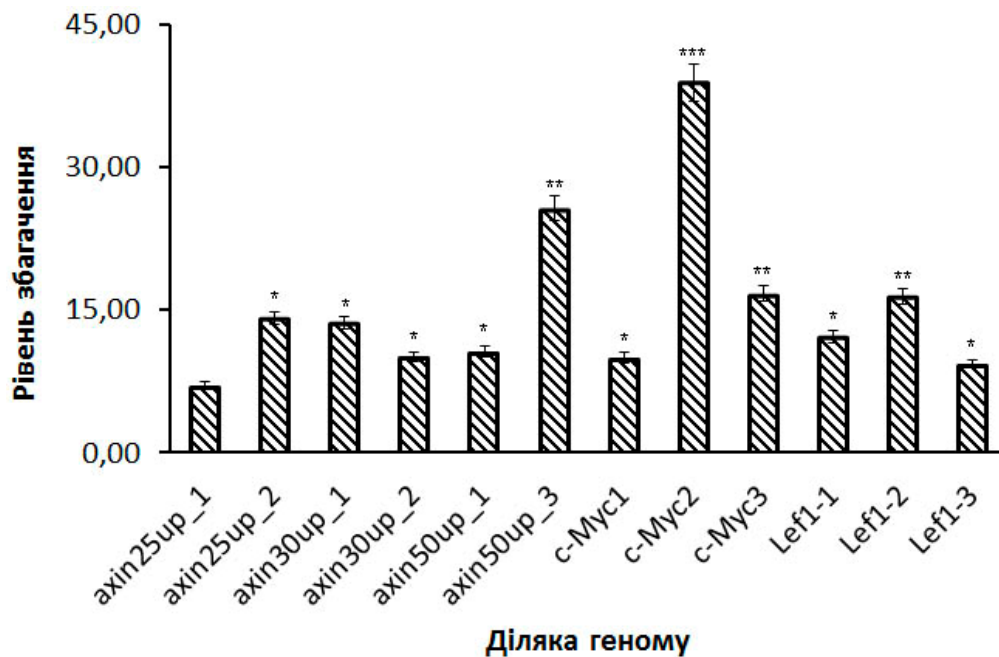


Рис. 3.18. Рівень зв'язування β -катеніну з передбачуваними ділянками геному у зразках преципітату хроматину отриманого із контрольних сердець новонароджених тварин (P2-3); кількість тварин в кожній групі – не менше 5; ns – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Однак, у зразках імунопреципітованого хроматину із антитілами проти γ -катеніну, отриманого із контрольних сердець, ми не спостерігали статистично

достовірного збагачення проаналізованих сайтів зв'язування у структурі генів *Axin*, *c-Myc* та *Lef1* (рис. 3.19 *a*). Проте, при аналізі імунопреципітату хроматину із зразків сердець із гетерозиготним нокаутом гена β -катеніну, ми виявили зв'язування γ -катеніну з ділянками геному у структурі генів *Axin* та *c-Myc* (рис. 3.18 *б*).

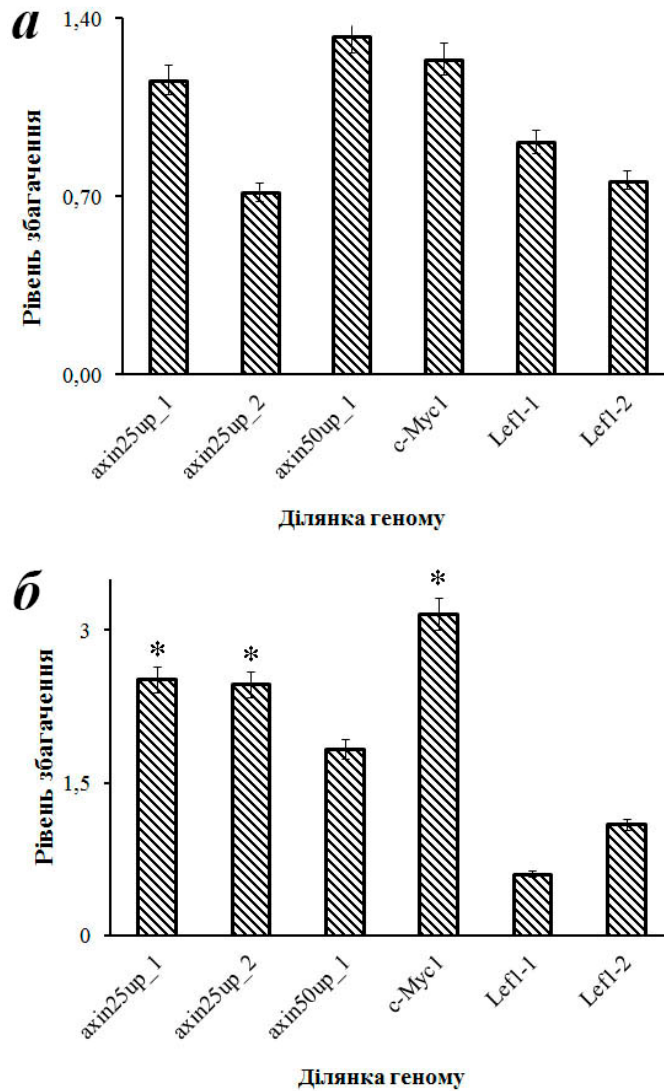


Рис. 3.19. Рівень зв'язування γ -катеніну з передбачуваними ділянками геному у зразках преципітату хроматину отриманого із контрольних сердець (*a*) та сердець із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* (*б*) новонароджених тварин (P3); кількість тварин в кожній групі – не менше 5; ns – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Отримані нами дані свідчать про здатність γ -катеніну компенсувати сигнальну функцію β -катеніну у серці новонароджених тварин та регулювати експресію генів мішеней канонічного Wnt сигналіngu. Тож, можемо припустити що і β -катенін і γ -катенін здатні зв'язуватись із одними й тими ж ділянками геному. Окрім того, отримані нами дані стосовно зв'язування γ -катеніну та ділянками геному у структурі гена *c-Myc* узгоджуються із результатами іншої групи авторів, де було показано, що γ -катенін здатен активувати експресію гена *c-Myc* [257]. Тож, нами показано, що за умови гетерозиготного нокауту гена *Cttnb1*, γ -катенін здатен компенсувати відсутній білок та утворювати потрійний білок/білок/ДНК комплекс регулюючи рівень експресії класичних мішеней β -катеніну. Ймовірно, за умови дефіциту та /або відсутності білка β -катеніну, зменшується конкуренція за зв'язування із транскрипційними ко-активаторами TCF/LEF для γ -катеніну, можливо існують і інші механізми взаємодії між цими двома білками. Проте, наразі невідомий характер дії γ -катеніну, а саме, чи є він репресором чи активатором генів – мішеней β -катеніну, чи має власні мішені які частково перекриваються із мішенями β -катеніну. Тож, необхідно за допомогою секвенування наступного покоління (NGS) провести ідентифікацію усіх генів мішеней для γ -катеніну. Останнє можливо реалізувати саме із застосуванням моделі умовного генетичного нокауту у поєднанні із ChIP-NGS, бо саме за умови повного нокауту *Cttnb1*, виявлення специфічних генів мішеней для γ -катеніну стає можливим.

Однак, зважаючи на наші дані, а саме летальність новонароджених тварин та ембріонів на пізніх стадіях розвитку із гомозиготним нокаутом гена *Cttnb1*, ми припускаємо, що сигнальна функція γ -катеніну не є ідентичною такій для β -катеніну. І γ -катенін не здатен забезпечити правильне розгортання генетичної програми у серцях новонароджених мишей, що й спричиняє летальність таких тварин. Ми схиляємося до думки, що ці білки, γ -катенін та β -катенін, здатні модулювати активність канонічного Wnt сигналіngu, проте мають різні гени-мішені, які можливо частково перекриваються, так наприклад ген *c-Myc* та *Axin2*.

Резюме

1) Із використанням умовного нокауту нами вперше показано, що N-кадгерин має критичне значення для формування ембріонального серця і гомозиготний нокаут його гена (*Cdh2*) у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє не лише порушення формування тканини міокарду, а й затримку розвитку ембріону і призводить до ембріональної летальності (E10,5 - E12,5).

2) Нокаут цитоплазматичного партнера N-кадгерину у кардіоміоцитах ембріонів, гена *Cttnn1*, не спричиняв порушення організації адгеринового комплексу та міжклітинної адгезії у ембріональному міокарді за рахунок функціональної компенсації його продукту α -Е-катеніну, гомологом - α T-катеніном, що є достатньою умовою для формування та росту ембріонального серця.

3) Нами показано, що інший компонент адгеринового комплексу - β -катенін, є необхідним для формування та розвитку міокарду після закладки першого та другого серцевих полів. Так, гомозиготний нокаут його гена *Cttnb1*, спричиняв летальність мутантних ембріонів на пізніх термінах гестації та новонароджених тварин (P1 – 3), що, однак не супроводжувалось вираженими морфологічними вадами ембріонів та їхніх сердець.

4) Сигнальна функція β -катеніну та правильне врегулювання канонічного Wnt сигналінгу є необхідною умовою проходження кардіогенезу. А саме, канонічний Wnt-сигналінг має бути активованим не лише у ранньому кардіогенезі, а й пізніше, після E12,5 для росту уже сформованого міокарду, далі у серці новонародженого організму (P1 – 3), його активність пригнічується до базального рівня, проте вона є необхідною для розгортання дорослої генетичної програми міокарду та термінального диференціювання кардіоміоцитів.

5) Нами було показано, що і гомо – і гетерозиготний нокаут гена *Cttnb1* призводить до порушення активності канонічного Wnt-сигналінгу (зростання рівня експресії генів *TCF4*, *Axin2*, *c-Fos* і *CyclinD1*) у

постнатальному міокарді, та як наслідок, спричиняє пригнічення проліферативної активності кардіоміоцитів, зменшення розмірів серця, гіпоплазії. Також такі порушення призводили до затримки термінального диференціювання неонатальних кардіоміоцитів, а саме спостерігали зменшення кількості двоядерних кардіоміоцитів та підвищення експресії фетального гена *ANP*.

6) За умови делеції гена *Cttnb1* у міокарді новонароджених мишей відбувається підвищення експресії його гомологу і основного компонента десмосом – γ -катеніну (*Jup*). Останній, здатний приймати участь у регулюванні активності канонічного Wnt сигнального каскаду у неонатальному міокарді і здатен регулювати експресію як мінімум двох генів мішеней β -катеніну - *Axin2* та *c-Myc*. Однак сигнальної функції γ -катеніну не достатньо для забезпечення формування міокарду.

7) З'ясовано, що нокаут гена *Cttnb1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє статистично достовірне зниження вмісту білка N-кадгерину, що свідчить про порушення утворення АК та міжклітинної адгезії у серцях новонароджених мишей.

8) Вперше було показано, що α -Е-катенін має не лише важливу функцію у підтриманні міжклітинної адгезії, а й приймає участь у регулюванні сигнальних систем кардіоміоцитів. А саме, α -Е-катенін є супресором транскрипційної активності β -катеніну та *Yap* у кардіоміоцитах новонароджених тварин. Делеція гена α -Е-катеніну спричиняє підвищення сигнальної активності β -катеніну та *Yap*, що призводить до підвищення проліферативної активності кардіоміоцитів, гіпоплазії та збільшення розмірів новонародженого міокарду, однак супроводжується затримкою термінального диференціювання клітин серця.

Основні положення даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:

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

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

3. **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

4. Пальчевська О.Л., Хазєва А.А., Мачушинець Н.В., Балацький В.В, Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., **Півень О.А.** Гетерозиготна делеція гену β -катеніну у ранньому кардіогенезі спричиняє затримку росту новонародженого серця і порушує кінетику канонічного WNT сигналіngu

5. Пальчевська О.Л., Хазєва А.А., Мачушинець Н.В., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., **Півень О.А.** Вплив делеції гена β -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії//Фактори експериментальної еволюції організмів, 2016. – Т.18. - С. 242-247.

6. V. V. Balatskyi, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, **O. O. Piven**. 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.

7. В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, Т. П. Рубан, **О. О. Півень** Білки-компоненти комплексів міжклітинної адгезії залучені до проліферації та розміру неонатальних кардіоміоцитів MUS MUSCULUS//Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2018. - том 16(1).– С.5-11

8. **О.О. Півень.** Оптимізація методу ChIP для дослідження регуляції генів-мішеней канонічного WNT сигналіngu у новонародженому серці// Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2018. – Т. 22. – С.169-175.

РОЗДІЛ 4

**ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ КАНОНІЧНОГО WNT СИГНАЛЬНОГО
КАСКАДУ В РОЗВИТКУ ТА РЕМОДЕЛЮВАННІ МІОКАРДУ**

Не лише формування серця у ембріогенезі є складним та чітко врегульованим процесом, до якого залучено цілу низку сигнальних каскадів і молекул. Адаптації серця новонародженого організму до гормональних та гемодинамічних навантажень при формуванні органу, а пізніше і при вікових та патологічних перебудовах серця – є складним процесом, що регулюється у просторі та часі і супроводжується молекулярно-генетичними та молекулярно-біологічними змінами, які у свою чергу призводять і до морфологічних та функціональних змін. Серед сигнальних каскадів, що залучені до регулювання розвитку постнатального серця та його перебудов відносяться перш за все G-білок пов'язаний рецептор, кальцінеурін/NFAT, MAPK, PI3K/AKT/mTOR сигнальні шляхи [125]. Однак, канонічний Wnt -сигналінг та β -катенін, як його головний медіатор, також залучені до вказаних процесів, а не лише до контролювання кардіогенезу. Варто зауважити, що нині ядерну локалізацію β -катеніну у диференційованих кардіоміоцитах не було показано ні при аналізі стандартних лінійних тварин ні при вивченні трансгенних мишей із стабілізованою формою останнього. Лише у ранніх ембріональних клітинах серця та у встановленій лінії клітин кардіоміоцитів HL-1 спостерігається ядерна локалізація β -катеніну, що свідчить про певний рівень активності канонічного Wnt каскаду [91]. Тож вважається, що сигнальна функція і β -катеніну і Wnt сигналінгу не має критичного значення у розвитку та перебудовах серця ссавців [90].

Проте, отримані нами дані, при аналізі неонатальних кардіоміоцитів та сердець новонароджених мишей, як з нокаутом гена *Ctnnb1*, так і гена *Cttna1*

(Розділ 3) переконливо свідчать про те, що порушення активності канонічного Wnt сигналіngu спричиняє і порушення термінальної диференціації кардіоміоцитів та формування новонародженого серця. Низка робіт інших авторів, також вказує на важливу роль Wnt/ β -катенінового сигналіngu не лише у розвитку міокарду а й при його адаптаціях до патологічних і фізіологічних чинників [169,224,156,214,21,32,49,247,259]. Проте, як було детально розглянуто у Огляді літератури, питання про функцію Wnt/ β -катенінового сигналіngu при гіпертрофічному ремоделюванні серця чи при регенерації після інфаркту є досить дискусивним. Тож, наступним нашим завданням було дослідити функцію канонічного Wnt сигналіngu у розвитку міокарду ссавців та його адаптацій до фізичних і гормональних факторів.

4.1 Дослідження ефекту гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1* у постнатальному міокарді

4.1.1 Аналіз формування постнатального міокарду за умови гетерозиготної делеції гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах. Отже, у наших попередніх дослідженнях, нами було з'ясовано, що гомозиготний нокаут гена *Ctnnb1* (Розділ 3) у ембріональних кардіоміоцитах призводить до гибелі новонароджених тварин, яка не супроводжується вираженими морфологічними вадами ембріону та серця. Проте, ми спостерігали порушення активності канонічного Wnt-сигналіngu у неонатальних кардіоміоцитах як із гетеро- так і гомозиготним нокаутом *Ctnnb1*. Сукупність наших власних та літературних даних свідчить про те, що сигнальна функція β -катеніну має важливе значення у розвитку постнатального серця. Тож, для перевірки нашого припущення ми згенерували дослідні групи тварин із гетерозиготним нокаутом досліджуваного гена, виключно у ембріональних кардіоміоцитах, віком 1, 3 та 6 місяців. Контролем слугували тварини відповідного віку із генотипами: аМНС-Cre-, β -cat^{flox/wt} та аМНС-Cre-, β -cat^{flox/flox}. Варто зауважити, що обрані терміни

спостереження відповідають підлітковому, статевозрілому та середньому віку людини [165].

На першому етапі роботи ми зосередились на морфологічному та морфометричному дослідженні сердець у тварин контрольної та дослідної груп. Аналіз зміни індексу співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ) у тварин усіх вікових груп, виявив, що у мишей віком 1 та 3 місяці, із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, цей показник був нижчим порівняно із контрольними тваринами відповідних вікових груп (рис. 4.1). Проте, лише у дослідних тварин віком 3 місяці ми спостерігали статистично достовірне зниження цього показника. При проведенні аналізу сердець тварин старшої вікової групи, з'ясувалось, що індекс МС/МТ зростав у мишей із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*.

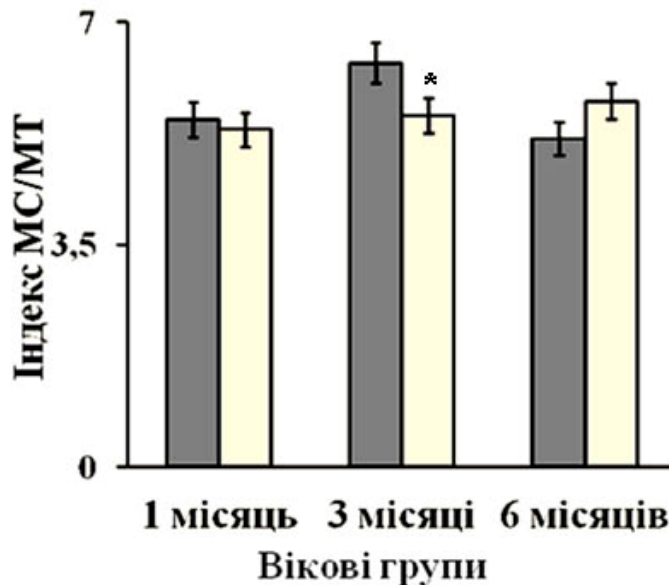


Рис. 4.1. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у контрольних тварин і тварин із гетерозиготною делецією гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах. - WT/WT, - WT/CKO. Примітка: кожна група контролів містила не менше 30 тварин, мутантів - не менше ≥ 15 тварин

Однак, морфологічний аналіз парафінових зрізів тканини міокарду, у мишей контрольної та дослідної груп віком 1, 3 та 6 місяців, не виявив

морфологічних змін чи порушень архітектури міокарду. Із застосуванням Масон-трихромного забарвлення ми не спостерігали фіброзів та/чи перебудов тканини серця у тварин із дефіцитом досліджуваного гена (рис. 4.2). Отримані дані узгоджуються із нашим попереднім спостереженням, де при гетеро- і гомозиготному нокауті гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах ми не спостерігали морфологічних порушень у тканині сердець ембріонів та новонароджених тварин. Повна втрата цього гена та відсутність його продукту у кардіоміоцитах сердець дорослих тварин, вочевидь, не є критичною для післянатального розвитку міокарду, що було показано і іншими групами вчених [138,229]. На думку авторів, при делеції гена *Ctnnb1* у міокарді відбувається підвищення експресії та вмісту γ -катеніну, останній, як відомо, здатен підтримувати не лише структуру десмосом а й АК. Варто зауважити, що у своїй роботі ми також спостерігали підвищення експресії гена *Jup*, у серцях новонароджених тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, що узгоджується із припущеннями авторів [138,229]. Однак, у своїй роботі ми спостерігали зниження вмісту N-кадгерину – основного кадгерину АК у серці, що вказує на можливі порушення формування АК та ІД за умови нокауту гена *Ctnnb1* (Підрозділ 3.2.4).

Летальність тварин із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, що ми спостерігали у своїй роботі (Розділ 3), на нашу думку, є наслідком порушення саме сигнальної функції β -катеніну, а не порушенням його адгезивної ролі. Як нами було показано (Розділ 3), неонатальні кардіоміоцити із гомо- та гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* зазнають порушень проліферативної активності, мають менші розміри. Також ми спостерігали пригнічення термінального диференціювання таких клітин. Вочевидь зменшення розмірів серця у проаналізованих нами дорослих тварин віком 1 та 3 місяці є наслідком порушень темпу проліферації та контролювання розмірів кардіоміоцитів неонатального серця.

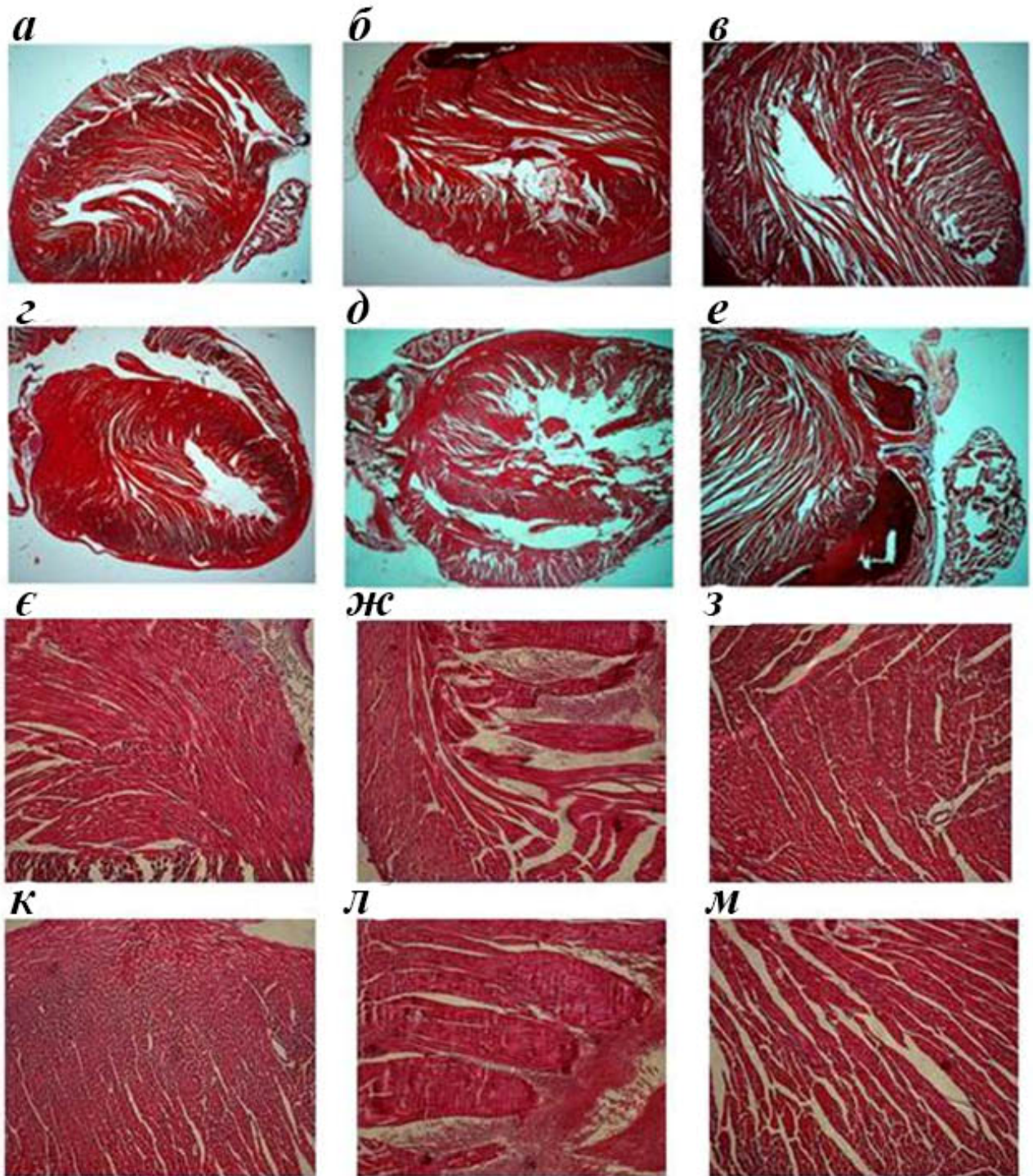


Рис. 4.2. Гістологічний аналіз тканини сердець контрольних тварин (*а, б, в*) та тварин із гетерозиготною делецією гена *Ctnnb1* (*з, д, е*) із застосуванням Масон-трихромного забарвлення. На рисунку наведено типові зрізи тканини серця тварин віком 1 (*а, з*), 3 (*б, д*) та 6 місяців (*в, е*). Збільшення $\times 2,5$ та 400

Однак, з віком у таких тварин відбувається збільшення досліджуваного нами показника МС/МТ, що може бути наслідком порушень адаптації сердець із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* до вікових змін та/чи гормональних навантажень пов'язаних із цим.

Окрім параметру МС/МС, важливим показником для оцінки розвитку міокарду та його перемикання на дорослу генетичну програму чи розвитку гіпертрофії є й певні генетичні маркери, а саме фетальні (або гіпертрофічні) гени: *ANP*, *BNP*, β -*MHC* та α -*MHC*. Відомо, що підвищення експресії фетальних генів: *ANP*, *BNP*, β -*MHC* і зниження експресії міозину дорослого серця (α -*MHC*) є типовим для гіпертрофії [199,185]. Тоді як, у нормі, в умовноздоровому міокарді гени: *ANP*, *BNP*, та міозин ембріонального серця (β -*MHC*) експресуються на базальному рівні. Тож ми перевірили рівні експресії фетальних генів та гена міозину дорослого серця у дослідних та контрольних тварин усіх вікових груп.

У результаті проведеного ЗТ-ПЛР аналізу в реальному часі, ми виявили зміни рівнів експресії фетальних генів і гена міозину дорослого серця у досліджених тварин віком 1, 3 та 6 місяців (рис. 4.3) порівняно з контрольними тваринами того ж віку.

З'ясувалось, що у дослідних тварин віком 1 та 3 місяці відбувалось підвищення експресії гена натрійуретичного пептиду В (*BNP*) та гена ембріонального міозину (β -*MHC*). У тих же груп тварин спостерігали і зниження рівня експресії гена міозину дорослого серця - α -*MHC* (рис. 4.3 *a*, *b* та *g*). З одного боку, такий молекулярно-генетичний профіль є типовим для гіпертрофічного міокарду, але у нашій роботі, при аналізі саме цих вікових груп, ми не спостерігали морфологічних та морфометричних ознак гіпертрофічного ремоделювання (фіброз та індекс співвідношення МС/МТ). Цікаво, що підвищення експресії фетальних генів у серцях дорослих тварин із гетерозиготним нокаутом *Ctnnb1*, що не супроводжувалось підвищенням гіпертрофічного індексу та фіброзом, спостерігали й інші автори [199]. Можна

було би припустити, що зазначені гени (*ANP*, *BNP*, β -*MHC* та α -*MHC*) не належать до справжніх і універсальних маркерів гіпертрофії, але проведений нами мета-аналіз свідчить про протилежне [185]. На нашу думку, підвищений рівень експресії *BNP*, β -*MHC* та пригнічення експресії α -*MHC* є наслідком порушення термінального диференціювання кардіоміоцитів у серцях новонароджених тварин, навіть, за умови гетерозиготного нокауту гена *Cttnb1* і, вочевидь, порушенням сигнальної функції продукту цього гена – білку β -катеніну.

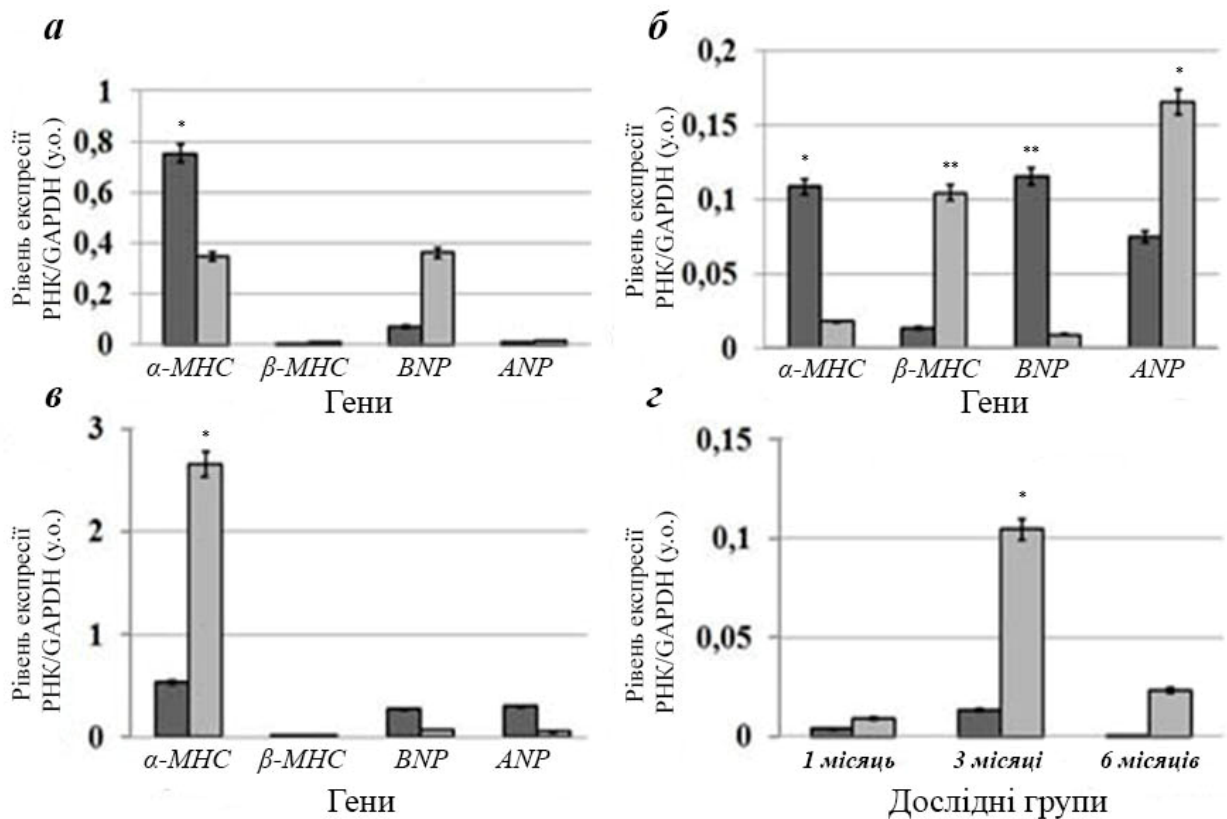


Рис. 4.3. Аналіз рівня експресії фетальних генів у міокарді тварин із гетерозиготною делецією гена *Cttnb1* (WT/CKO) та контрольних (WT/WT) тварин різних вікових груп: 1 місяць (**а**), 3 місяці (**б**), 6 місяців (**в**), відносний рівень експресії гена β -*MHC* (**з**). ■ - WT/WT, □ - WT/CKO. Примітка: кількість тварин в кожній групі – не менше 2

Цікаво, що при аналізі дослідних тварин віком 6 місяців, ми не виявили підвищення експресії генів натрійуретичних пептидів *ANP* та *BNP*, як у тварин

молодших вікових груп. Рівень експресії міозину ембріонального серця - β -*MHC* лишався високим порівняно із контрольними мишами того ж віку (рис. 4.3 *в* та *г*). Цікаво, що і міозин дорослого серця у цих тварин експресувався на вищому рівні порівняно із тваринами із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* віком 1 та 3 місяці та відповідним віковим контролем. Такий молекулярно-генетичний профіль дорослого серця не є типовим для гіпертрофічних змін і це викликає окремий інтерес та потребує більш детального аналізу.

Тож, отримані нами дані, узгоджуються із попередніми дослідженнями і свідчать про те, що гетерозиготний нокаут гена *Cttnb1* у ембріональних кардіоміоцитах хоч і не спричиняє летальності тварин, як гомозиготний нокаут цього гена, але спричиняє порушення розвитку постнатального серця. Ймовірно, продукт гена *Cttnb1* - β -катенін, через його сигнальну функцію є важливим регулятором проліферації та розмірів і термінального диференціювання кардіоміоцитів. Нокаут його гена спричиняє порушення активності канонічного Wnt сигналінгу, що супроводжується описаними нами молекулярно-генетичними порушеннями порушеннями.

4.1.2 Дослідження активності канонічного Wnt сигнального каскаду у міокарді дорослих тварин за умови гетерозиготної делеції гена *Cttnb1* у ембріональних кардіоміоцитах. Результати досліджень, викладені у попередньому підрозділі, вказують на те, що гетерозиготний нокаут гена *Cttnb1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє молекулярно генетичні патерни змін, що призводять до порушення розвитку постнатального серця. Ми припустили, що нокаут цього гена може спричиняти і порушення активності Wnt/ β -катенінового сигналінгу у серцях дорослих мишей. Останній, як відомо, не лише один із головних регуляторів проліферації та диференціювання стовбурових клітин, кардіогенезу, а, й за окремими літературними даними, адаптації міокарду до дії патологічних факторів [190,44]. Тож наступним завданням нашої роботи було проаналізувати активність канонічного Wnt

сигналіngu у серцях дослідної та контрольної груп мишей віком 1, 3 та 6 місяців.

Для з'ясування активності канонічного Wnt сигналіngu, та β -катеніну зокрема, ми проаналізували зміни рівнів експресії генів, продукти яких є безпосередніми компонентами машинерії, що здійснює активацію β -катенін-залежної транскрипції – ген *TCF4*; та залучений до контролю цитозольного рівню білка β -катеніну – ген *Axin2*. Варто зауважити, що останній є ще й мішенню канонічного Wnt сигналіngu. Також, ми проаналізували зміни рівнів експресії і інших генів, а саме, мішеней β -катеніну – *c-Myc*, *c-Fos* та *CyclinD1*.

Із застосуванням ЗТ-ПЛР аналізу у реальному часі ми виявили, що рівень експресії гена *TCF4* був суттєво нижчим (у 2 та більше разів) в зразках виділених із сердець тварин дослідних груп порівняно з контролем у віці 1, 3 та 6 місяців (рис. 4.4). Рівень експресії гена *Axin2* у серцях дослідних тварин був нижчим ніж у контрольних тварин в усіх проаналізованих вікових групах (рис. 4.4).

Як було зауважено вище, продукт гена *Axin2* залучений до контролювання цитозольного рівню білка β -катеніну у клітині, оскільки є скефолдним білком деградувального комплексу останнього [120,106] водночас цей білок є компонентом негативного «фідбеку» канонічного Wnt-каскаду, оскільки його ген перебуває під безпосереднім контролем білка β -катеніну [105]. Отримані нами дані вказують на те, що у серцях із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* у тварин усіх вікових груп активність канонічного Wnt сигналіngu порушена. Вочевидь, відбувається пригнічення активності цього каскаду у серцях тварин дослідних груп.

При аналізі змін експресії зазначених генів (*TCF4* та *Axin2*) у контрольних тварин усіх вікових груп ми виявили цікаві особливості динаміки активності канонічного Wnt-сигналіngu. А саме, згідно рівню експресії гена *TCF4*, у серцях контрольних тварин відбувалось пригнічення активності Wnt/ β -катенінового сигналіngu з віком (рис. 4.4).

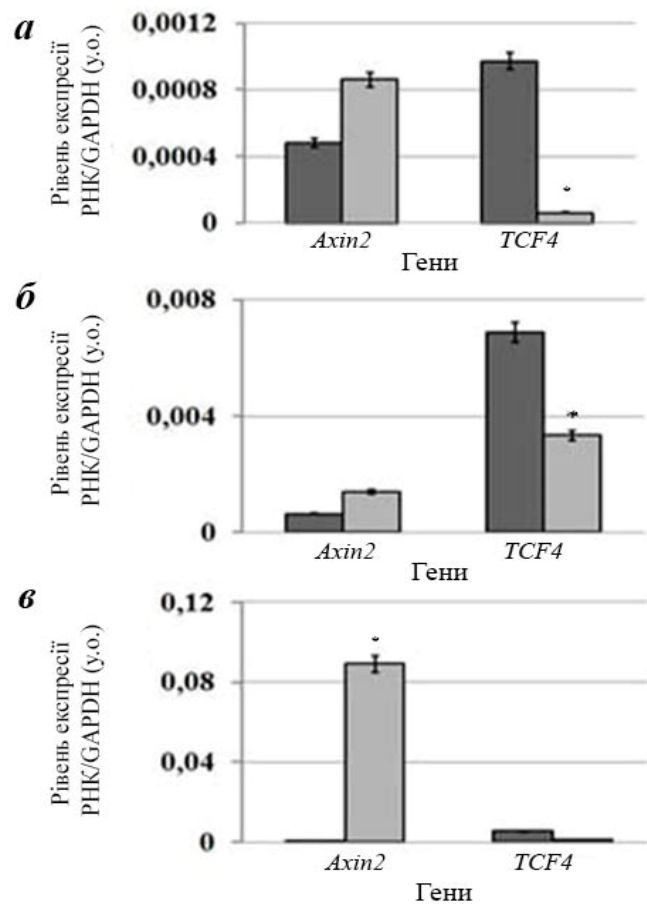


Рис. 4.4. Аналіз експресії генів - компонентів канонічного Wnt сигналіngu у серцях тварин дослідної і контрольної груп віком 1 (а), 3 (б) та 6 (в). - WT/WT, - WT/CKO. Примітка: кількість тварин в кожній групі – не менше 2

Окрім генів, білки яких залучені до контролю активності канонічного Wnt сигналіngu, ми проаналізували і зміни рівнів експресії кількох генів-мішеней цього сигналіngu: *c-Myc*, *c-Fos* та *CyclinD1*. Зазначені гени викликають інтерес ще й з тої причини, що вони залучені до контролювання проліферації, клітинного циклу та росту клітини у нормі та при онкогенезі, так гени *c-Myc* та *c-Fos* є протонкогенами і самі здатні контролювати транскрипцію цілої низки генів [48,12]. Інший ген, *CyclinD1*, також залучений у контролювання проліферації клітини і синтезу білка та ДНК. Але головне те, що зазначені гени, разом із іншими, відносяться і до маркерів гіпертрофії міокарду [185].

За допомогою ЗТ-ПЛР аналізу у реальному часі ми з'ясували, що у серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* віком 1 місяць відбувалось підвищення експресії гена *c-Myc* (рис. 4.5). Варто зауважити, що продукт гена *c-Myc* є не лише протоонкогеном і а критичним регулятором ембріогенезу та стовбуровості клітин [239]. Отримані дані, загалом, узгоджуються із нашими попередніми результатами (Підрозділ 4.1.1) та припущенням про порушення термінального диференціювання кардіоміоцитів у новонародженому серці за умови гетерозиготного нокауту гена *Cttnb1*. При аналізі експресії інших генів - мішеней: *c-Fos* та *CyclinD1* ми не виявили достовірної різниці між контрольною та дослідною групами мишей віком 1 місяць.

У серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гену *Cttnb1* віком 3 місяці усі досліджувані нами гени експресувались на нижчому рівні порівняно із контрольними мишами того ж віку (рис. 4.5). Що не лише свідчить про пригнічення сигнальної активності канонічного Wnt сигналінгу у цих серцях, а й узгоджується із нашими результатами, де ми спостерігали зменшення значенні індексу MC/MT саме у тварин цієї вікової групи. Оскільки усі проаналізовані нами гени (*c-Myc*, *c-Fos* та *CyclinD1*) є важливими регуляторами поділу клітин, у тому числі і кардіоміоцитів, синтезу ДНК і білка. І зменшення рівнів експресії цих генів вказує і на зниження синтезу білка і ДНК, а значить і на пригнічення темпу проліферації.

При аналізі тварин старшої вікової групи (6 місяців) за допомогою ЗТ-ПЛР аналізу у реальному часі нами було виявлено, що у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1*, на відміну від тварин молодших вікових груп, відбувалось підвищення експресії генів *c-Myc* та *CyclinD1* (рис. 4.5). Це досить цікаве та неочікуване спостереження може бути наслідком активності і інших сигнальних каскадів клітини, що також контролюють рівень експресії зазначених генів. Відомо, що і *c-Myc* та *CyclinD1* перебувають під контролем таких сигналінгів як Hedgehog, Notch та JAK/STAT - каскадів [40,237,116]. Ми припускаємо, що підвищений рівень експресії *c-Myc* та *CyclinD1* у серцях мишей із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* є наслідком активації інших

сигнальних каскадів що, у свою чергу, може бути наслідком пригнічення активності канонічного Wnt. З огляду на те, що сигнальні каскади клітини не існують і не функціонують окремо а взаємодіють один із іншим, регулюючи активність один одного, таке припущення цілком доречне.

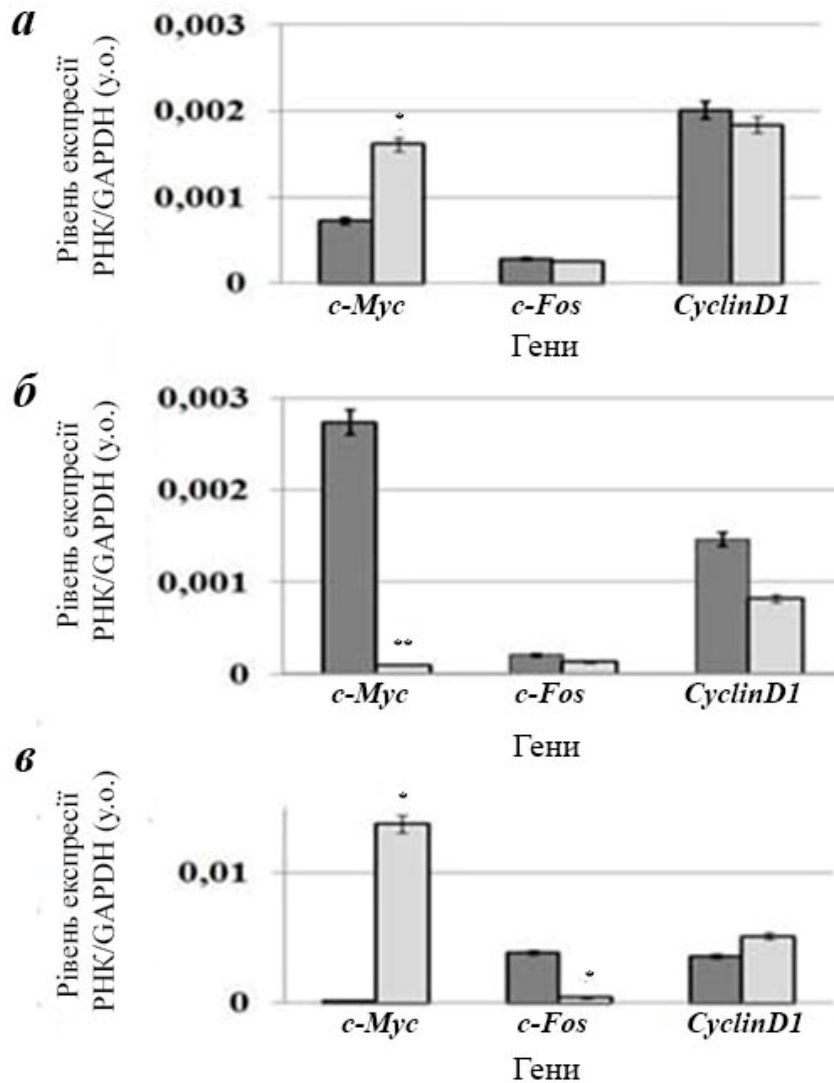


Рис. 4.5. Аналіз експресії генів мішеней канонічного Wnt сигналіну в міокарді тварин із гетерозиготною делецією гена *Cttnb1* (SKO/WT) та контрольних (WT/WT) тварин різних вікових груп: 1 місяць (а), 3 місяці (б), 6 місяців (в). ■ - WT/WT, □ - WT/SKO. Примітка: кількість тварин в кожній групі – не менше 2

Окрім того, підвищення експресії генів *c-Myc* та *CyclinD1* у серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* може бути і наслідком вікових змін у

комбінації із пригніченням активності канонічного Wnt сигналіngu та порушенням експресії фетальних генів. Також, хочеться звернути увагу на той факт, що саме у дослідних тварин цієї вікової групи ми спостерігали і зростання індексу МС/МТ (рис. 4.1), що може бути наслідком підвищення рівня експресії генів які регулюють синтез білка та ДНК і проліферацію клітин.

Узагальнюючи результати наведені у підрозділі, можемо зробити висновок, що сигнальна функція Wnt/ β -катенінового каскаду має важливе значення для постнатального формування та розвитку міокарду. Так, нами показано, що пригнічення активності цього каскаду, що було нами виявлено у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміocyтах спричиняє не лише порушення проліферації кардіоміocyтів у серці новонароджених тварин а й розвитку міокарду дорослих мишей. А саме, спричиняє затримку росту серця у тварин віком до 3 місяців, підвищення експресії фетальних генів, однак не супроводжується морфологічними порушеннями та фіброзами. У тварин старшої групи, вочевидь відбуваються порушення активності і інших сигнальних каскадів і спостерігається поступове збільшення маси серця, що потребує окремого вивчення.

4.2 Дослідження ролі Wnt/ β -катенінового сигналіngu у гіпертрофічному ремоделюванні серця

Одним із найпоширеніших захворювань серцевосудинної системи є гіпертрофія міокарду, і вона є одним із ключових факторів ризику розвитку серцевої недостатності. Патологічна гіпертрофія серця характеризується, перш за все, порушеннями архітектури тканини органу, розвитком фіброзу, елімінацією кардіоміocyтів та кардіальною дисфункцією [22]. Однак, типовими для гіпертрофії є і деякі зміни на молекулярно-генетичному рівні, а саме відбувається активація гіпертрофічних або фетальних генів (*ANP*, *BNP*, *b-*

МНС). Варто зауважити, що гіпертрофія - це адаптивна реакція серця, перш за все, на хронічне підвищення тиску, гормональні стреси та інше. Важливо розуміти, що процес адаптації міокарду починається із активації внутрішньоклітинних сигнально-регуляторних каскадів. До таких належать G-білок пов'язаний рецептор, кальцінеурін/NFAT, MAPK, PI3K/AKT/mTOR сигнальний шлях [125]. І якщо функція зазначених сигнальних шляхів у розвитку гіпертрофії більш менш зрозуміла, то участь канонічного Wnt-сигналіngu лишається досить дискусивною (див. Огляд літератури). На нашу думку, існуючі у літературі протиріччя обумовлені різними підходами до дизайну експериментів, а саме, різними термінами проведення спостережень та аналізів при дії гіпертрофічних стимулів, застосування різних методів при детекції змін експресії молекулярних маркерів гіпертрофії і таке інше. Так, наприклад, Vaugand з колегами, у своїй роботі, у якості гіпертрофічного індексу використовували лише розмір кардіоміоцитів, а молекулярних маркерів – ANP. У той час як інші автори (Огляд літератури) використовували для аналізу сигнальної функції канонічного Wnt-каскаду, при розвитку гіпертрофії, застосовували ширшу панель молекулярних маркерів (ANP, BNP, α МНС, β МНС), генів мішеней цього сигнального каскаду (*c-Fos*, *c-Myc*, *CyclinD1*) та індексів співвідношення маси серця до маси тіла або маси серця до довжини гомілки.

Ми вважаємо що, канонічний Wnt-сигналінг та β -катенін є важливими гравцями при адаптації міокарду, на користь цього свідчить кілька фактів, а саме: 1) цей сигнальний каскад залучено до контролю проліферації та росту диференційованих клітин; 2) канонічний Wnt-сигналінг регулює диференціювання клітин у тому числі і кардіоміоцитів; 3) серед генів-мішеней цього сигнального шляху є такі, які відіграють важливу роль у функціонуванні дорослого міокарду (гени гіпертрофічної відповіді, кадгерин, конексин 43, деякі протоонкогени та ін.) [50].

Тож метою наступного етапу нашої роботи було дослідити участь канонічного Wnt-сигналіngu у розвитку гіпертрофії дорослого міокарду.

4.2.1 Мета-аналіз молекулярних маркерів гіпертрофії і їхнього зв'язку зі змінами експресії β -катеніну

Як уже зазначалося вище, участь Wnt/ β -катенінового сигналіну у гіпертрофії - питання досить дискусивне. На нашу думку, для з'ясування функції канонічного Wnt та β -катеніну у розвитку гіпертрофії важливо обрати панель адекватних гіпертрофічних маркерів та маркерів для визначення активності канонічного Wnt сигналіну. Тож, у своїй роботі, перед проведенням експериментальних досліджень, ми спочатку провели глобальний аналіз наявних експериментальних даних стосовно досліджень молекулярних механізмів розвитку гіпертрофії із подальшим мета аналізом.

При проведенні цього етапу досліджень ми також звертали увагу і на панель маркерів, що застосовувалась різними дослідниками при діагностиці чи характеристиці гіпертрофічних змін тканини. Так, зазвичай, серед морфологічних параметрів дослідниками частіше використовуються гіпертрофічні індекси: співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ) співвідношення маси серця до довжини гомілки (МС/ДГ), співвідношення цитоплазми до ядра клітини, та власне розміри клітин, а також інтенсивність фіброзу. Окрім низки морфометричних та морфологічних параметрів використовуються і молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні: співвідношення вмісту ДНК/білок, рівень експресії генів *GSK3 β* , *CyclinD1*, *ANP*, *BNP*, β -МНС, α -МНС, *SERCA*, *Axin2*, різні типи актину (actin DIF), кадгерин, конексин-43 (*cx43*), *c-Myc*, *TCF/Lef*, *c-Fos*, *VEGFR* (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), *LRP*, *SFRP4*, *TGF β* (*Transforming Growth Factor- β*), *mTOR* (*mammalian target of rapamycine*). Варто зауважити, що наведені маркери аналізуються частіше на рівні білку, рідше на рівні експресії гена. Окрім того, не уся ця панель маркерів використовується при проведенні

досліджень, так різні групи авторів варіюють набором різних маркерів та методами їхнього аналізу при оцінці чи визначенні гіпертрофії.

Проаналізувавши експериментальні роботи із використанням у якості модельних об'єктів, як тварин, так і ізолюваних клітин за допомогою дисперсійного аналізу, ми з'ясували, що рівень експресії β -катеніну статистично достовірно впливав на усі гіпертрофічні індекси ($\eta^2=0,30$). Також було обраховано силу ефекту та розмір вибірки, що дозволяє уникнути несправжньо-позитивного результату ($g=0,64$, $N_{fs}>103$ when $N_0=71$). Окрім того ми не виявили ніякої видоспецифічності впливу β -катеніну на гіпертрофічні маркери (рис 4.6), що свідчить про універсальний характер залучення останнього у розвиток гіпертрофії тканин хребетних [83,108].

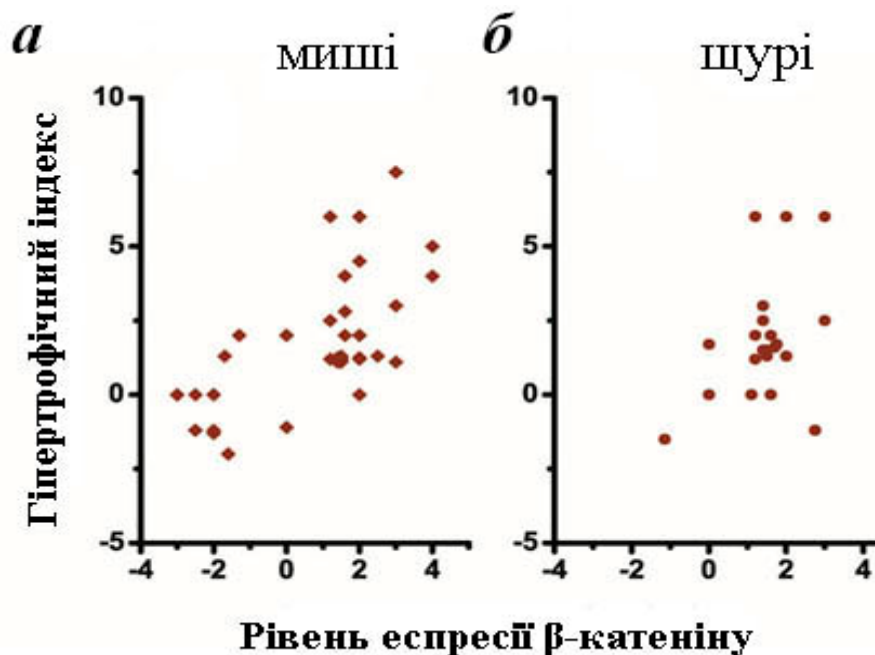


Рис. 4.6. Рівень експресії β -катеніну та гіпертрофічних індексів у мишей (а) та щурів (б). Сила ефекту та розмір вибірки, що дозволяє уникнути несправжньо-позитивного результату становили, відповідно 0,64 та $N_{fs}>103$ при $N_0=71$. Ступень кореляції розраховувалась за допомогою дисперсійного аналізу (two-way ANOVA)

Цікаво також, що за результатами нашого аналізу активація експресії β -катеніну завжди спричиняє гіпертрофічну відповідь, принаймні у серці. Окрім того, за допомогою дисперсійного аналізу, нами було виявлено статистично достовірний зв'язок рівню експресії β -катеніну та деяких маркерів гіпертрофії : *c-Мус* ($\eta^2=0,38$) та *ANP* ($\eta^2 = 0,095$) (рис. 4.7, **а** і **б** відповідно). Варто зауважити, що підвищення рівню експресії зазначених маркерів: *c-Мус* та *ANP* достовірно спричиняло розвиток гіпертрофії (рис 4.7).

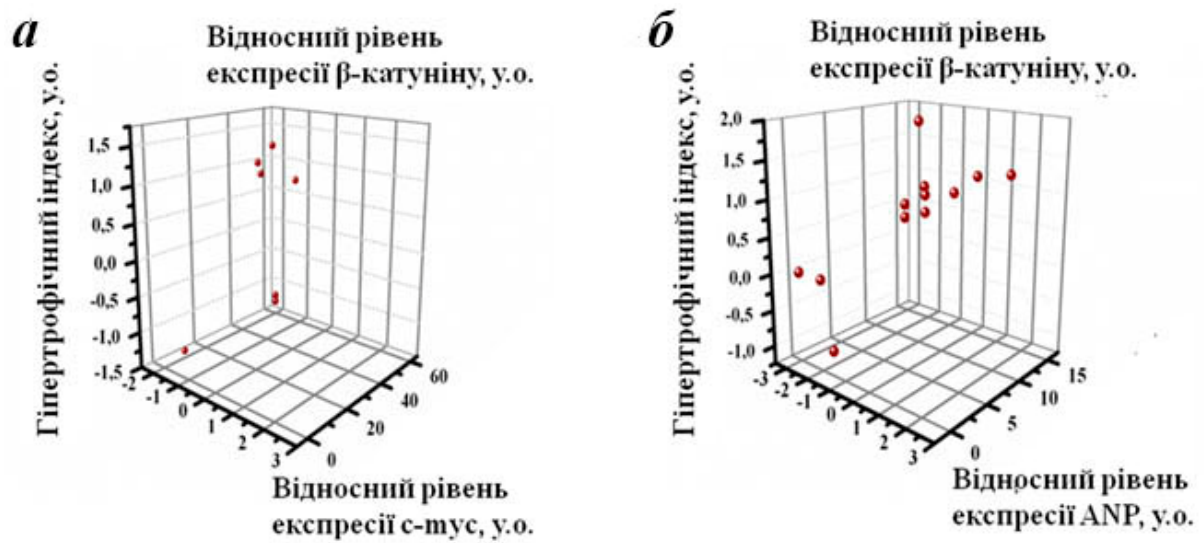


Рис. 4.7. Зв'язок відносного рівня експресії *c-мус* (**а**) та *ANP* (**б**) з гіпертрофічними індексами та відносним рівнем експресії β -катеніну

Отримані таким чином дані свідчать на користь припущення про універсальний характер участі β -катеніну у формуванні гіпертрофічної відповіді: по-перше, ген *c-Мус* перебуває під контролем канонічного Wnt сигналінгу [12,84] і підвищення його експресії статистично достовірно спричиняє гіпертрофію; по-друге, зміни рівня експресії основного медіатора канонічного Wnt-сигналінгу достовірно пов'язані із рівнем експресії гіпертрофічних маркерів.

Окрім того, нами було виявлено і кореляцію між гіпертрофічними індексами та рівнями експресії деяких гіпертрофічних генів. Так, за Пірсоном, було встановлено кореляцію між гіпертрофією та SERCA ($r=0,87$, $p \leq 0,05$) а

також між гіпертрофією та актином DIF ($r=0,71$, $p\leq 0,05$) (рис 4.8). Цікаво також, що в усіх проаналізованих нами роботах ми спостерігали достовірний зв'язок між β -катеніном та *Axin2* ($r=0,83$, $p\leq 0,05$) (рис. 4.9). Загалом, результати регресійного аналізу вказують на те що, рівень експресії гена *Axin2* має бути пригніченим для ефективної адаптації міокарду та розвитку гіпертрофії. Зауважимо, що такі результати є цілком логічними і свідчать на користь нашого припущення про залучення канонічного Wnt сигналіngu та β -катеніну у формування гіпертрофічної відповіді міокарду. Вже згадувалось у Огляді літератури, що білок *Axin2* має важливу роль у регуляції транскрипційної активності β -катеніну, і пригнічення експресії *Axin2* спричиняє і послаблення контролю рівня β -катеніну у цитозолі та призводить до підвищення його ядерної локалізації із послідуною транскрипційною активністю.

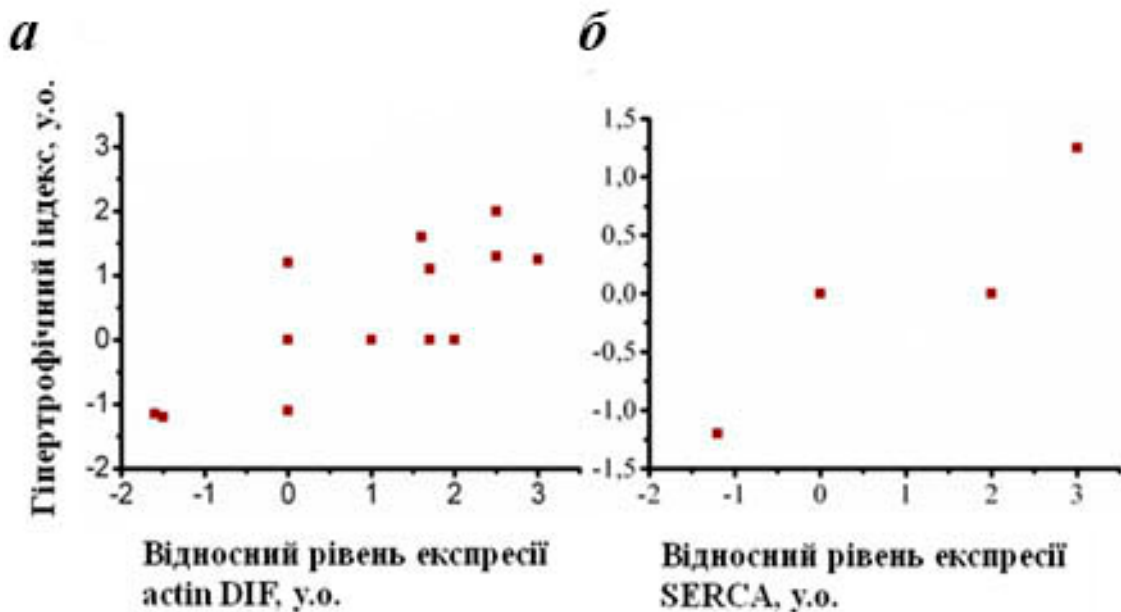


Рис. 4.8. Рівень експресії гіпертрофічних маркерів актину DIF (**а**) та SERCA (**б**) корелює з рівнем гіпертрофії. Кореляцію рівнів експресії генів та гіпертрофії було розраховано за допомогою методу регресії за Пірсоном

У результаті роботи, ми також виявили і інший маркер що статистично достовірно відтворювався як специфічний гіпертрофічний маркер, це індекс співвідношення білок/ДНК. Сильний зв'язок між цим індексом і гіпертрофією

($r=0,83$, $p\leq 0,05$) а також рівнем експресії β -катеніну ($r=0,83$, $p\leq 0,05$) було виявлено у результаті аналізу.

Також, при проведенні Мета-аналізу, ми виявили і інші цікаві закономірності, які хоч і не були статистично достовірними, проте мали тенденцію до статистичної достовірності, таким виявився зв'язок між експресією β -катеніну та BNP ($p = 0,074$) а також між гіпертрофічними індексами та рівнем експресії *CyclinD1* ($p = 0,078$) в усіх проаналізованих тканинах.

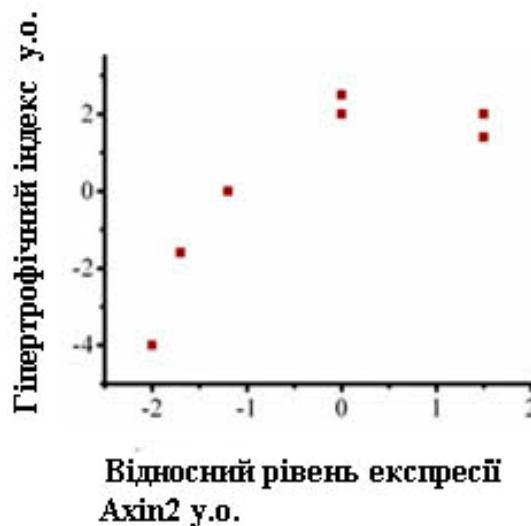


Рис. 4.9. Рівень експресії гена *Axin2* корелює із рівнем гіпертрофії. Кореляцію було розраховано за допомогою методу регресії за Пірсоном

Отримані нами дані демонструють спільні фундаментальні механізми гіпертрофії у різних експериментальних моделях. Так, наші результати свідчать на користь припущення про важливу роль β -катеніну у формуванні гіпертрофічної відповіді в усіх модельних об'єктах, що частіше за все використовуються при дослідженні цієї патології. Також, ми виявили, що зв'язок між рівнем експресії β -катеніну та гіпертрофією міокарду має тканинспецифічний характер. Індукція експресії β -катеніну чітко пов'язана із гіпертрофією серця і це спостереження узгоджується із низкою експериментальних робіт [283,151], що демонструють необхідність підвищення

сигнальної активності β -катеніну для формування гіпертрофії міокарду.

Окрім того, проведений нами аналіз, дав змогу виявити низку гіпертрофічних маркерів що є найбільш відтворюваними і адекватними для дослідження функції β -катеніну у формуванні гіпертрофічної відповіді, а саме: SERCA, актин DIF, Axin2, c-Myc, CyclinD1, BNP, ANP та індекс співвідношення білок/ДНК. Також, важливо зауважити, що деякі з цих генів уже використовуються у якості клінічних маркерів для діагностики гіпертрофії (натрійуретичні пептиди В та А) [279]. На нашу думку, використання зазначених маркерів допоможе з'ясувати роль β -катеніну у гіпертрофії і зокрема у гіпертрофії міокарду і із застосуванням клінічного матеріалу.

Узагальнюючи отримані дані, можемо зауважити, що β -катенін залучено до формування гіпертрофічної відповіді і характер цієї взаємодії універсальний і тканино специфічний. Детальне експериментальне дослідження функції β -катеніну у формуванні гіпертрофії і його можлива взаємодія із іншими сигнальними шляхами є надзвичайно важливим для розуміння механізмів адаптації серця до гіпертрофічних стимулів.

4.2.2 Аналіз сигнальної функції β -катеніну на початкових стадіях розвитку патологічної гіпертрофії серця. Для дослідження сигнальної функції β -катеніну у розвитку гіпертрофії міокарду ми використали репортерних мишей BATGAL які експресують бактеріальний ген β -галактозидази (див Матеріали та методи). Особливістю цієї лінії трансгенних мишей є те, що при активації канонічного Wnt-сигналіngu та зв'язування β -катеніну із транскрипційним фактором TCF/LEF відбувається, не лише, активація транскрипції генів – мішеней β -катеніну, а й гена бактеріальної β -галактозидази. Останнє дає змогу досить легко візуалізувати та ідентифікувати індивідуальні клітини у яких наразі активний канонічний Wnt-сигналінг.

Для індукції гіпертрофії самцям віком 3 місяці підшкірно вживлювали мініосмотичні насоси виробництва ALZET модель 2002. Обрана нами модель насосів давала змогу проводити інфузію гіпертрофічних стимулів тваринам

протягом 14 днів із швидкістю закачування речовини 0,5 мкл/годину. У якості гіпертрофічних стимулів як в дослідах *in vitro* так і *in vivo* використовували хлорид літію (LiCl) та Ang II (Sigma, USA, A9525) у концентраціях 20мМ та 1мМ відповідно.

Відомо, що ангіотензин – це пептидний гормон, що діє опосередковано через відповідні рецептори на клітинній мембрані і спричиняє звуження кровоносних судин та як наслідок - підвищення тиску [249]. На відміну від AngII, хлорид літію діє безпосередньо на β -катенін, а саме, хлорид літію спричиняє фосфорилування білку GSK3 β [233]. Останній, як відомо є головним компонентом деградувального комплексу для β -катеніну і його деактивація призводить до вивільнення та реалізації сигнальної активності β -катеніну [11].

Таким чином, у дослідних тварин, що отримували AngII ми індукували хронічне підвищення кров'яного тиску, що є одним із факторів розвитку патологічної гіпертрофії. А у групи тварин, що отримували LiCl - безпосередньо активували дисоціацію деградувального комплексу для β -катеніну, та активацію транскрипційної активності останнього. У якості контролю слугували тварини, що отримували фізіологічний розчин. Морфологічний, гістологічний та молекулярно-генетичний аналіз проводили на 3, 7 та 14 день спостережень.

У результаті експерименту, ми спостерігали підвищення індексу гіпертрофії вже на третю добу ін'єкції тваринам AngII та хлориду літію (рис. 4.10 *a*). Звісно показники не були вищими від контрольних значень удвічі чи утричі, оскільки ми досліджували саме ранні терміни дії стимулів, а навіть 2 тижні - це не достатній термін для розвитку патології та статистично достовірного збільшення індексу гіпертрофії. Варто зауважити, що більш виражене підвищення індексу гіпертрофії ми спостерігали у групі тварин які інфузивно отримували хлорид літію, що на нашу думку є наслідком прямої дії агенту, а саме активації сигнальної функції β -катеніну, на відміну від дії AngII.

При проведенні морфологічного аналізу парафінових зрізів тканини дослідних та контрольних сердець, ми не виявили виражених морфологічних

вад чи фіброзу, що також було очікуваним результатом з огляду на рані терміни спостережень (рис. 4.11)

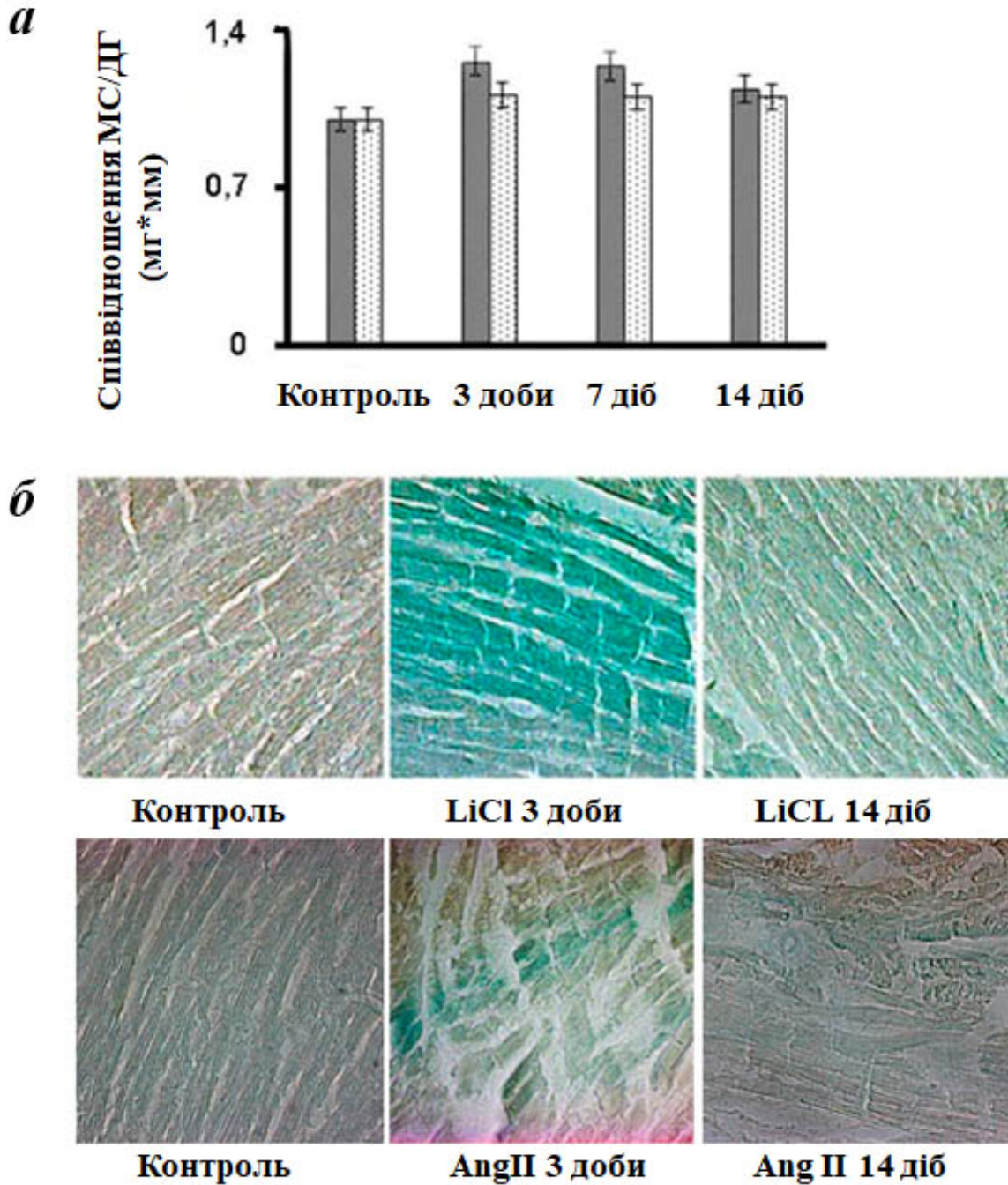


Рис. 4.10. Аналіз гіпертрофічної відповіді та активності канонічного Wnt-каскаду. аналіз гіпертрофічного індексу (МС/ДГ) після інфузії гіпертрофічних стимулів (*a*); X-gal забарвлення парафінових секцій тканин міокарду після інфузії AngII та LiCl, 400x (*б*); позитивне X-gal забарвлення свідчить про активацію сигнальної функції β -катеніну. - LiCl, - AngII. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$

Проте, із застосуванням X-gal забарвлення ми виявили позитивне забарвлення, що корелює із сигнальною активністю β -катеніну у цих клітинах, на третю добу експерименту. Варто зауважити, що у випадку дії хлориду літію забарвлення було інтенсивнішим аніж при інфузії тваринам ангіотензину (рис. 4.10 б). Цікаво, що у більш пізні терміни спостереження (7 діб) інтенсивність позитивного X-gal забарвлення зменшувалась та майже зникала на 14 добу досліду (рис. 4.10 б).

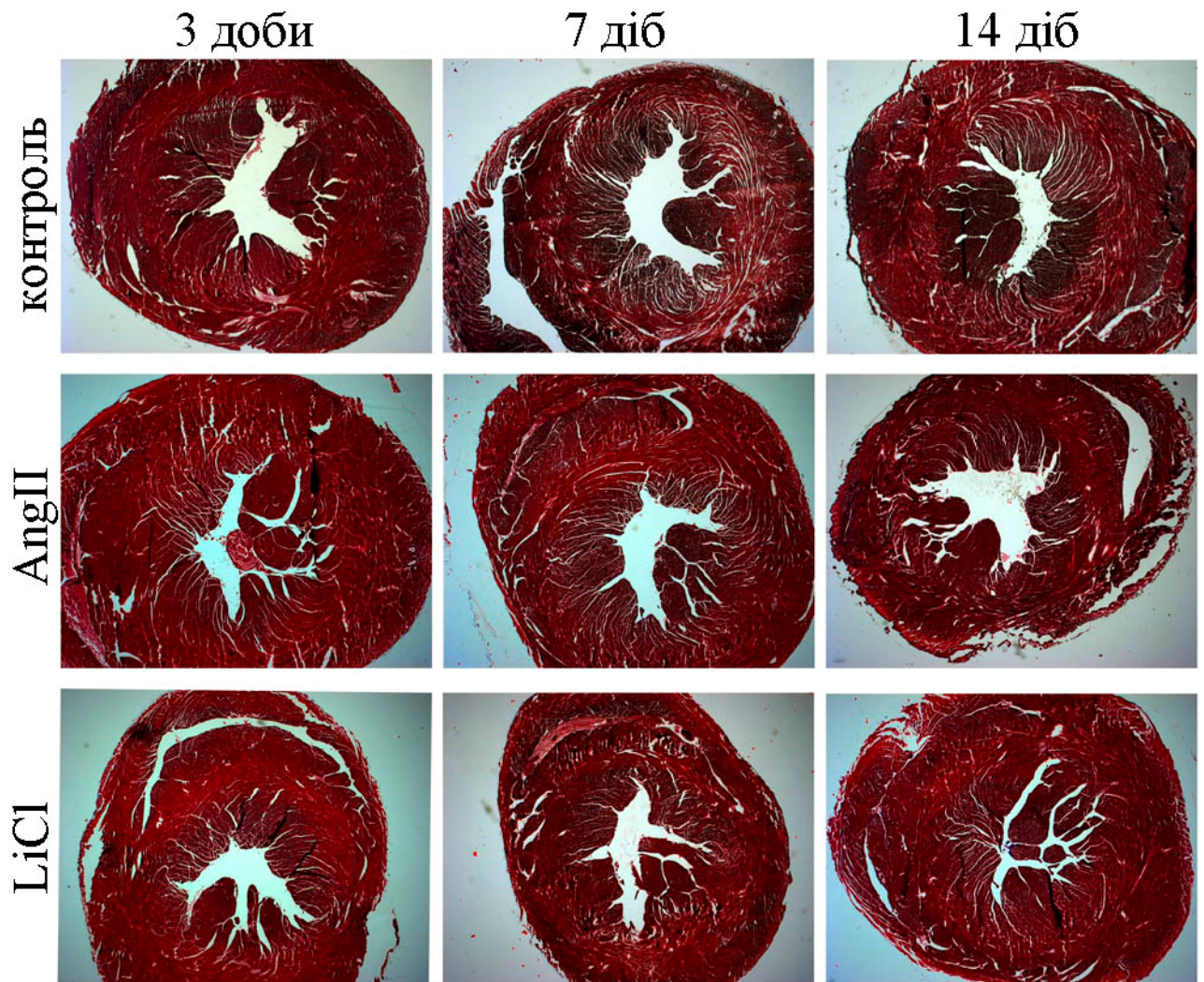


Рис.4.11. Морфологічний аналіз парафінових зрізів тканини сердець, Трихром-Масонове забарвлення, x 2,5

Аналіз змін рівнів експресії гіпертрофічних генів, також підтвердив розвиток гіпертрофії у тварин, що отримували хлорид літію та AngII порівняно

із контролем (рис. 4.12). А саме, рівень експресії гена *BNP*, був у двічі вищим аніж у контролі на 14 добу експерименту у випадку дії обох стимулів (рис.4.12. а). Рівень експресії міозину ембріонального серця (β -*MHC*) зростав в усі проаналізовані терміни спостережень при інфузії тваринам LiCl (рис. 4.12 б). При дії ангіотензину, підвищення рівню експресії цього маркера спостерігали на 7 та 14 добу експерименту (рис. 4.12 б). Лише на 14 добу дослідження підвищення експресії досліджуваних маркерів гіпертрофії було статистично достовірним. Проте варто зауважити, що підвищення експресії досліджуваних гіпертрофічних генів було вищим у випадку дії хлориду літію порівняно із ангіотензином, що узгоджується із попередніми даними (рис. 4.12).

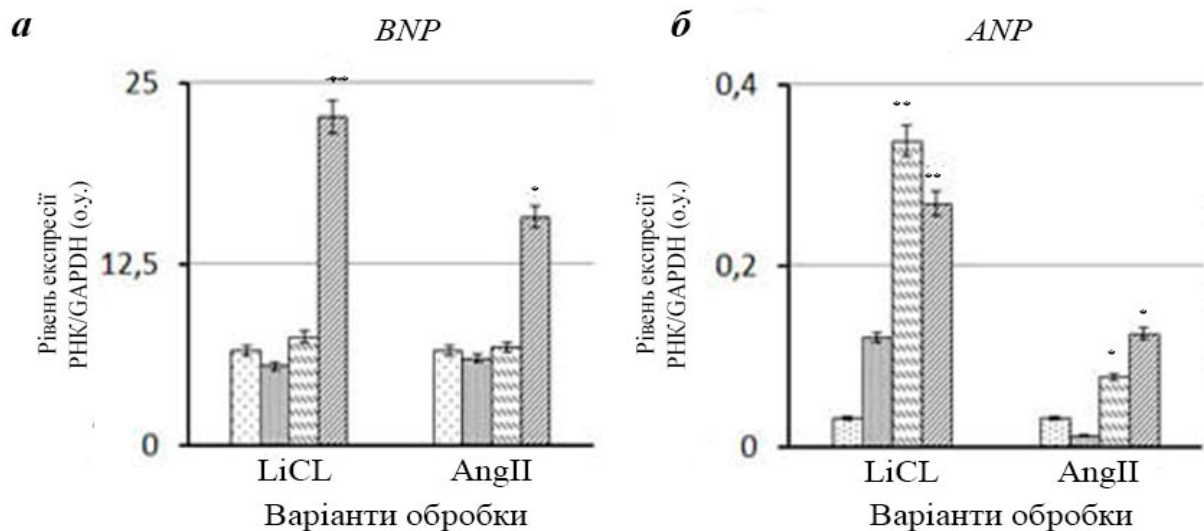


Рис. 4.12. Аналіз зміни рівня експресії гіпертрофічних генів *BNP* (а) та β -*MHC* (б) у серцях тварин після інфузії гіпертрофічних стимулів. * – $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея. - контроль, - з доби обробки, - 7 діб обробки, - 14 діб обробки. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$

Для аналізу активності канонічного Wnt-сигналіngu на ранніх термінах розвитку гіпертрофії, за умови дії гіпертрофічних стимулів, ми проаналізували зміни рівнів експресії генів мішеней β -катеніну (*c-Fos*, *c-Myc*, *CyclinD1*) та гена - компоненту канонічного Wnt-сигналіngu *TCF4*. Виявилось, що інфузія тваринам LiCl спричиняла статистично достовірне підвищення експресії усіх

проаналізованих генів вже на третю добу експерименту (рис.4.13). Що свідчить про активацію транскрипційної активності β -катеніну та узгоджується із даними X-gal забарвлення (рис.4.10 б). Варто зауважити, що усі досліджувані нами гени, є не лише мішенями сигнальної регуляції β -катеніну а й маркерами гіпертрофії. І підвищений рівень їхньої експресії свідчить також і про молекулярно-генетичні зміни типові для гіпертрофії.

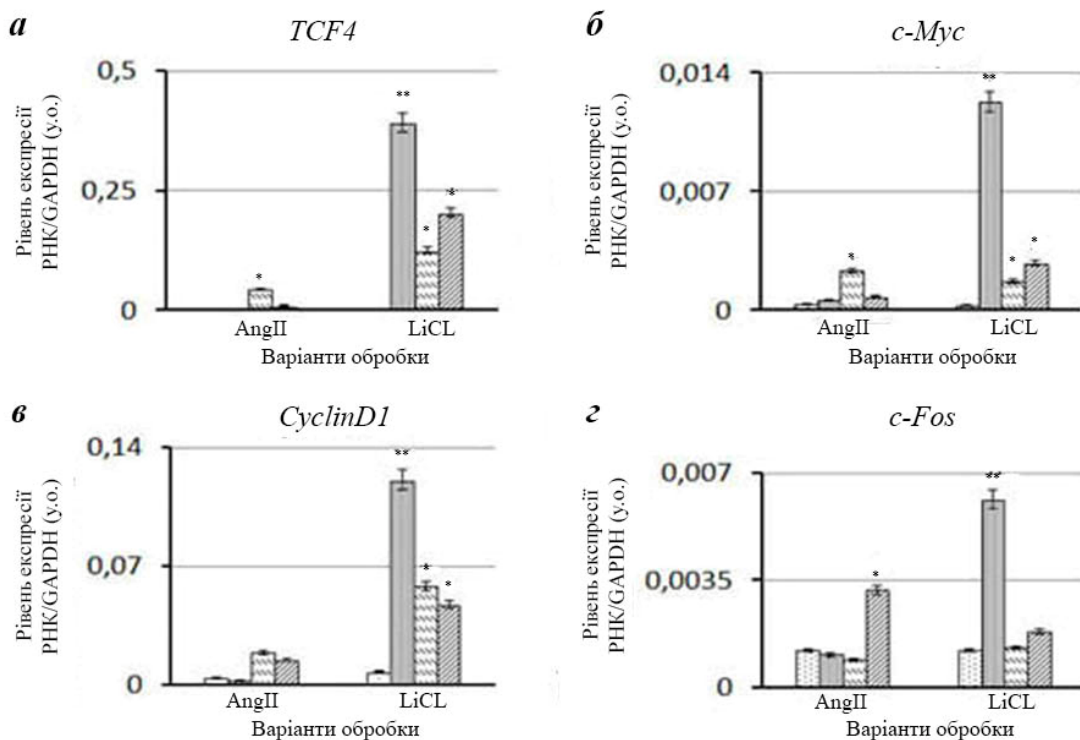


Рис. 4.13. Аналіз зміни рівня експресії генів-мішеней β -катеніну у серцях тварин після інфузії гіпертрофічних стимулів. Відносний рівень експресії гена *TCF4* (а); відносний рівень експресії гена *c-Myc* (б); відносний рівень експресії гена *CyclinD1* (в); відносний рівень експресії гена *c-Fos* (г). - контроль, - з доби обробки, - 7 діб обробки, - 14 діб обробки. * – $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$

Цікаво також, що усі ці гени, окрім гена *c-Fos* (рис.4.13 г) експресувались на вищому рівні порівняно із контролем в усі терміни спостережень після дії LiCl.

При інфузії тваринам AngII, гени мішені канонічного Wnt-сигналіngu (*c-Fos*, *c-Myc*, *CyclinD1*) та ген *TCF4* також експресувались на вищому рівні порівняно із контролем однак у більш пізні терміни спостережень: на 7 добу (*TCF4*, *c-Myc*, *CyclinD1*) та 14 добу (*c-Fos*) експерименту (рис.4.13). Важливо також зауважити, що для *CyclinD1* ми не спостерігали статистично достовірного підвищення експресії (рис.4.13 в). Також, цікаво, що у випадку дії AngII, підвищення експресії досліджуваних нами генів не було вищим ніж при дії LiCl (рис.4.13).

Отримані дані свідчать, перш за все, про розвиток гіпертрофії у тварин після інфузії AngII, що було очікуваним результатом, оскільки останній є специфічним стимулом. З іншого боку, наші результати свідчать про активацію канонічного Wnt-сигналіngu та β -катеніну зокрема, при формуванні гіпертрофії міокарду під дією класичного гіпертрофічного стимулу. Загалом, при аналізі даних складається враження, що при дії хлориду літію, та активацією безпосередньо сигнальної активності β -катеніну, підвищення експресії гіпертрофічних маркерів, в тому числі і тих, що перебувають під контролем канонічного Wnt каскаду відбувається раніше і має більш виражений характер порівняно із результатами отриманими при інфузії AngII.

Ми припустили, що функція канонічного Wnt – сигналіngu дійсно є критично важливою для розвитку гіпертрофічної відповіді, однак активація останнього є надзвичайно ранньою подією. Своє припущення ми перевірили із використанням ізолюваних кардіоміоцитів та вже знайомих стимулів гіпертрофії – AngII і LiCl. Вплив гіпертрофічних стимулів досліджувався у більш ранні терміни спостережень, а саме через 24 та 72 години експерименту, контролем слугували клітини, що перебували у стандартному культуральному середовищі DMEM/F12 із додаванням 10% ембріональної сироватки ВРГ. Клітини знімали механічно та виділяли білок для проведення Вестерн блот аналізу вмісту сумарного то активованого β -катеніну а також фосфорильованої GSK3 β .

У результаті проведеної роботи нами було показано, що вже через 24 години досліду відбувалось підвищення кількісного вмісту стабілізованого/активного β -катеніну та pGSK3 β у дослідних варіантах порівняно із контролем (рис. 4.14).

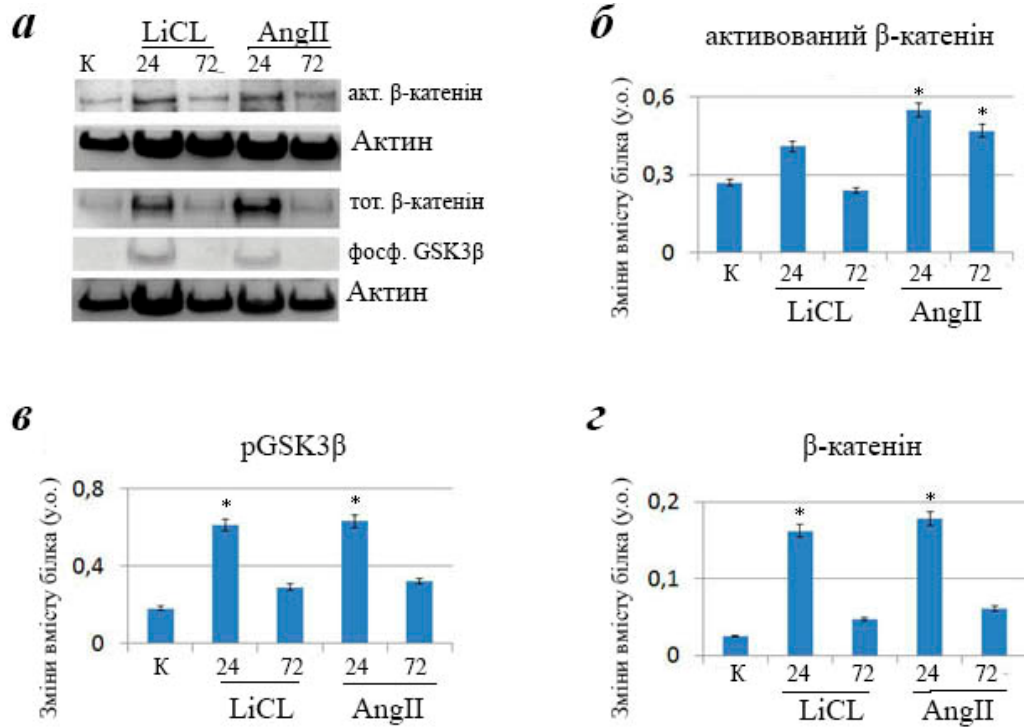


Рис. 4. 14. Вестерн блот аналіз вмісту сумарного, активованого β -катеніну та фосфорильованої GSK-3 β у лізатах ізольованих кардіоміоцитів після обробки гіпертрофічними стимулами (AngII і LiCl). типовий Вестерн блот (**а**), денситометрія експресії активного β -катеніну нормалізована відносно актину (**б**), денситометрія експресії фосфорильованої GSK-3 β нормалізована відносно актину (**в**), денситометрія експресії сумарного β -катеніну нормалізована відносно актину (**г**). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. * - $p \leq 0,05$, * - $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Це свідчить про руйнування деградувального комплексу β -катеніну та реалізацію сигнальної функції останнього саме у ранні терміни дії гіпертрофічних стимулів.

Ймовірно, при подальшому перебігу гіпертрофічного ремоделювання функція β -катеніну, репресується за участі негативного «фідбеку» чи інших

сигнально-регуляторних механізмів, які контролюють або взаємодіють із Wnt-сигналіном. Дійсно, одним із генів-мішеней β -катеніну є ген *Axin2*, котрий, як згадувалось вище є важливим компонентом деградувального комплексу останнього. Описані й інші молекули, що взаємодіють або безпосередньо із стабілізованим β -катеніном, або з комплексом β -катенін/TCF/LEF та у такий спосіб здійснюють негативний фізіологічний «фідбек» Wnt/ β -катенінового сигналіну [64]. Але, незважаючи на існування таких складних механізмів регуляції, активація канонічного Wnt сигналіну призводить до активації експресії генів що залучені до реалізації гіпертрофії міокарду. Отже, роль β -катеніну та Wnt/ β -катенінового сигналіну у розвитку гіпертрофії серця має набагато складніший характер та, можливо, залежить від стадії розвитку даної патології.

Зважаючи на літературні та власні данні, ми припускаємо, що сигнальна функція β -катеніну має важливе значення при розвитку патологічної гіпертрофії саме на ранній стадії перебудови міокарду. Активація канонічного Wnt сигналіну призводить і до активації експресії генів маркерів гіпертрофії – *BNP* та *β -MHC* а також генів залучених до регуляції росту клітин – *CyclinD1*, *c-Myc*, *c-Fos*. Усе разом це призводить до формування фенотипу, а саме збільшення гіпертрофічного індексу, фіброзу, та як наслідок погіршенню функції серця.

Отже нами показано, що при розвитку патологічної гіпертрофії в наслідок хронічного підвищення артеріального тиску відбувається активація Wnt/ β -катенінового сигналіну, і цей каскад поміж інших також залучено до адаптації ремоделювання серця. Однак активація канонічного Wnt-сигналіну і β -катеніну зокрема, подія рання і вочевидь необхідна для запуску генетичної програми, що сприяє ремоделюванню міокарду (або ембріоналізації міокарду). Тож, β -катенін має важливе не лише структурне а й сигнальне значення при перебудовах серця.

4.2.3 Вивчення активності канонічного Wnt сигналіngu при формуванні атлетичного міокарду. Адаптація серця до фізичних навантажень та хронічної гіпертензії відрізняються на молекулярному рівні. Відомо, що різні сигнально-регуляторні шляхи активуються при цих перебудовах [26]. Із застосуванням репортерних BATGAL мишей нами було показано, що при інфузії гіпертрофічних стимулів відбувається активація канонічного Wnt сигналіngu, але у ранні терміни експерименту – на третю добу дії гіпертрофічних стимулів (Підрозділ 4.2.2). Результати мета аналізу також свідчать на користь гіпотези про критичну та обов'язкову участь канонічного Wnt-каскаду у формуванні гіпертрофії та універсальність молекулярного механізму адаптації серця. Тож, надалі ми вирішили проаналізувати активність канонічного Wnt-сигналіngu при формуванні атлетичного міокарду, тобто при його адаптації до фізичних навантажень. Фізичні навантаження моделювались із застосуванням плавального тесту (Див Матеріали та методи).

Зважаючи на результати отримані нами у попередніх дослідженнях, а саме активацію канонічного Wnt-сигналіngu саме у ранні терміни адаптації міокарду до хронічної гіпертензії (Підрозділ 4.2.2) ми зосередились на аналізі тварин у ранні та пізні терміни адаптації міокарду до фізичного навантаження. А саме, аналізували тварин, що тренувались протягом 1 тижня та 1 місяця, і порівнювали їх із такими, що не тренувались.

У результаті проведених досліджень ми виявили зростання індексу співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ) у тварин як через 1 тиждень, так і через 1 місяць фізичних навантажень (рис. 4.15 *a*). Як і очікувалось, підвищення індексу МС/МТ було достовірним порівняно із контролем лише для групи тварин, що тренувалась протягом 1 місяця (рис. 4.15 *a*). Це свідчить про збільшення маси серця, та його адаптації до тренувань і формування так званого «атлетичного міокарду» саме у ці терміни спостережень - 1 місяць. З іншого боку наші дані узгоджуються із попередніми дослідженнями із застосуванням AngII та LiCL, де при коротких термінах спостережень не

виявили статистично достовірного підвищення значення гіпертрофічного індексу через 1 тиждень дії гіпертрофічних стимулів (Підрозділ 4.2.2).

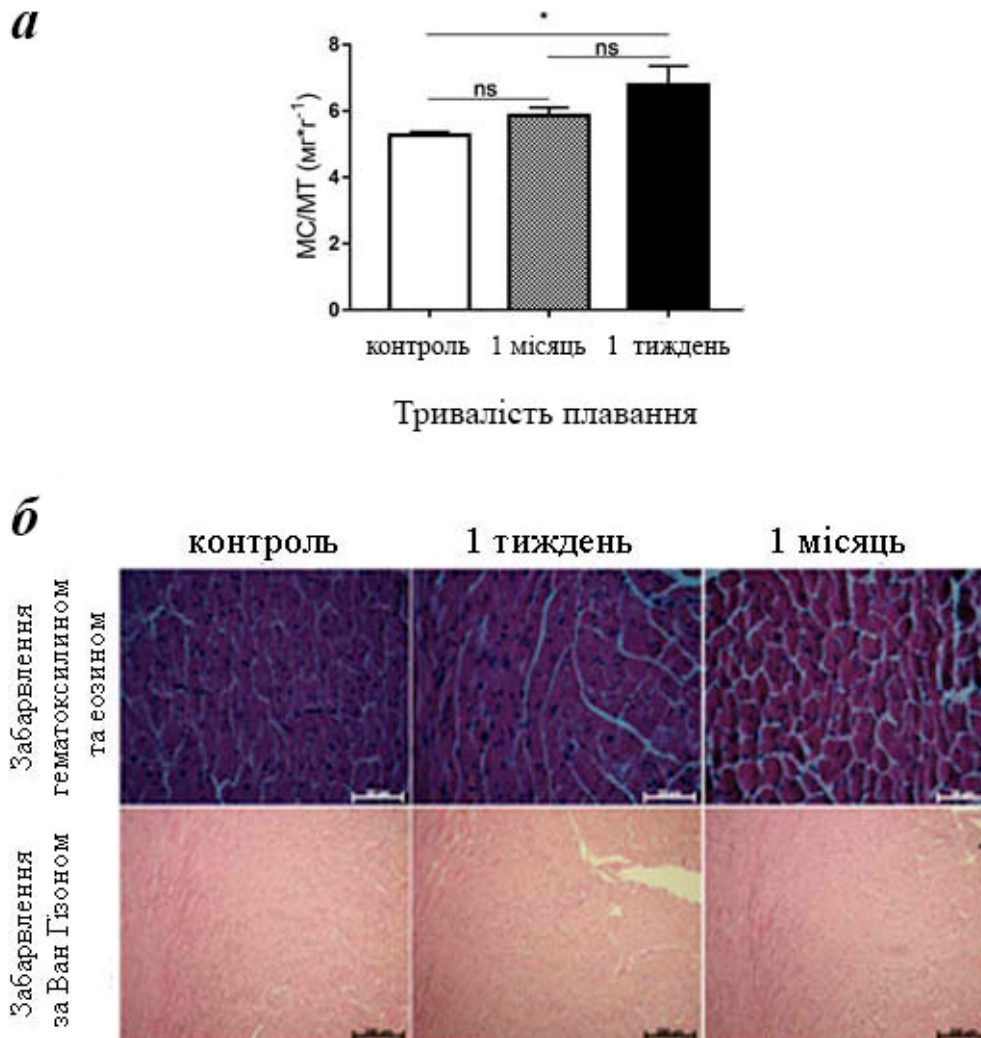


Рис. 4.15. Морфологічний та морфометричний аналіз тварин що отримували фізичне навантаження. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у контрольних тварин, що не тренувались, тварин, що тренувались протягом 1 тижня та тварини, що тренувались протягом 1 місяця (**a**). Кількість тварин у групах: контроль – 11, 1 тиждень – 4, 1 місяць – 12; * – $p < 0,05$; Морфологічний аналіз зрізів тканини міокарду тварин, що отримували фізичне навантаження протягом 1 тижня і 1 місяця порівняно із контрольними тваринами: забарвлення гематоксилін-еозином та пікрофуксином за ван Гізоном (**б**); Контроль – тварин, що не тренувались, 1 Тиждень – тварини, що тренувались протягом 1 тижня; 1 Місяць – тварини, що тренувались протягом 1 місяця.

Морфологічний аналіз зразків тканини міокарду тварин дослідних та контрольної груп, також не виявив патологічних змін (рис. 4.15 б). Так, при аналізі парафінових зрізів тканин сердець, забарвлених гематоксилін-еозином та пікрофуксином за ван Гізоном, ми не виявили фіброзу чи інших порушень структури міокарду у дослідних груп тварин. Це спостереження також свідчить про відсутність патологічних перебудов тканини серця при тривалому фізичному навантаженні як у ранні так і пізні терміни спостереження

Аналіз експресії гіпертрофічних генів виявив зниження їх експресії, а саме *Anp* та *Vnp*, вже через тиждень тренувань, однак лише зменшення експресії гена *Vnp* було статистично значимим порівняно із контролем (рис. 4.16). Проте, через місяць тренувань рівень експресії гіпертрофічних генів (*Anp* та *Vnp*) не відрізнявся від такого у контрольних тварин (рис. 4.16). Це також свідчить про відсутність патологічних змін у дорослих умовноздорових тварин після одного місяця тренувань.

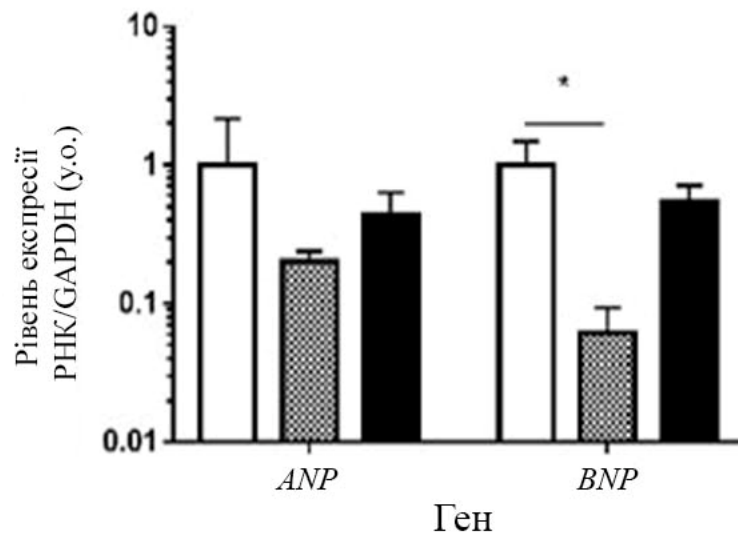


Рис. 4.16. Аналіз зміни рівня експресії гіпертрофічних генів (*Anp* та *Vnp*) у серцях контрольної групи тварин, тварин, що тренувались протягом 1 тижня та тварини, що тренувались протягом 1 місяця. Дані експресії мРНК представлені як відносна зміна рівня порівняно із контролем. □ - контроль, ▨ - 1 тиждень, ■ - 1 місяць тренувань. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; * – $p < 0,05$.

Далі ми проаналізували активність канонічного Wnt сигналіngu у дослідних та контрольних мишей. За допомогою ЗТ-ПЛР аналізу у реальному часі виявили підвищення рівня експресії гена *Axin2* у тварин дослідної групи, що тренувались протягом тижня. Це свідчить про активацію канонічного Wnt-сигналіngu у мишей на ранніх термінах розвитку атлетичного серця (рис. 4.17). Цікаво, що при тривалому фізичному навантаженні, за умов експерименту, ми не спостерігали активацію цього сигнального каскаду (рис. 4.17). Цікаво також, що, за умов експерименту, ми не реєстрували статистично достовірного підвищення експресії гена *c-Myc* (рис. 4.17) у тварин що тренувались як протягом тижня так і протягом місяця. Оскільки ген *c-Myc* є одним із універсальних маркерів гіпертрофії, то отримані нами дані також свідчать про відсутність патологічного ремоделювання міокарду, при фізичному навантаженні, і узгоджуються із результатами попередніх досліджень.

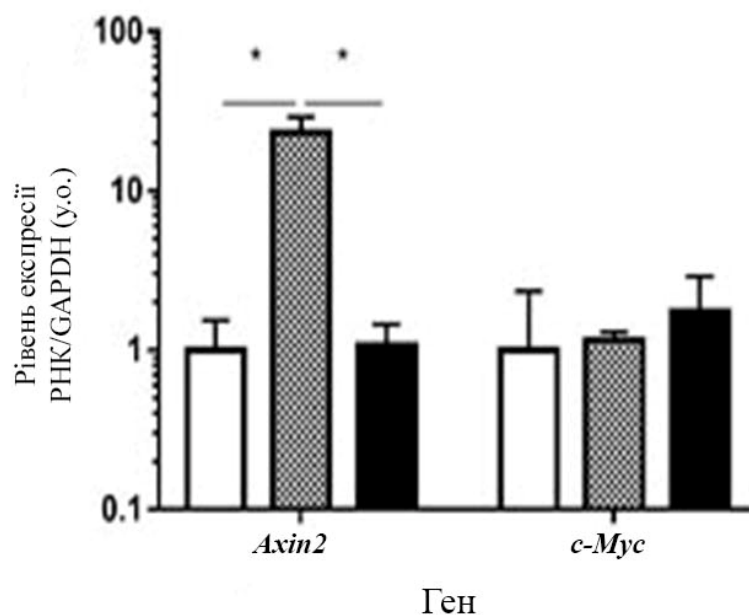


Рис. 4.17. Аналіз зміни рівня експресії генів-мішеней β -катеніну у серцях контрольної групи тварин, тварин що тренувались протягом 1 тижня та тварин, що тренувались протягом 1 місяця. Дані експресії мРНК представлені як відносна зміна рівня порівняно із контролем. - контроль, - 1 тиждень, - 1 місяць тренувань. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; * – $p < 0,05$.

Результати Вестерн блот аналізу узгоджуються із даними аналізу рівню експресії гена *Axin2*, так нами було показано підвищення вмісту фосфорильованої GSK3 β саме в лізатах сердець тварин, що тренувались протягом тижня (рис. 4.18). Нагадаємо, що GSK3 β є одним із компонентів деградувального комплексу β -катеніну і фосфорилування цієї кінази за серином 9 спричиняє вивільнення β -катеніну із деградувального комплексу із подальшою його ядерною транслокацією і транскрипційною активністю [192]. Тож наші дані свідчать про підвищення транскрипційної активності β -катеніну на початкових стадіях формування атлетичного міокарду, оскільки у лізатах сердець тварин, що тренувались протягом місяця, ми не спостерігали підвищення вмісту фосфорильованої форми GSK3 β (рис. 4.18).

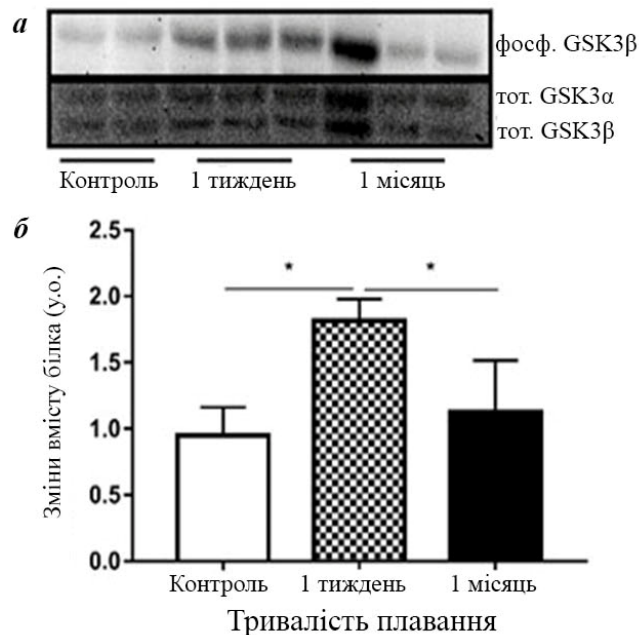


Рис. 4.18. Короткотривале плавання призводить до зростання вмісту фосфорильованої GSK3 β . Вестерн блот аналіз вмісту фосфорильованої та тотальної GSK3 β у лізатах сердець контрольних тварин, що не тренувались, тварин, що тренувались протягом 1 тижня та тварин, що тренувались протягом 1 місяця (а); денситограма вмісту фосфорильованої GSK3 β у лізатах сердець контрольних тварин, що не тренувались, тварин, що тренувались протягом 1 тижня та тварин, що тренувались протягом 1 місяця нормалізована відносно тотальної GSK3 β (б). Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; * – $p < 0,05$

Отримані нами дані узгоджуються із результатами попередніх досліджень, де при інфузії гіпертрофічних стимулів тваринам нами було показано, що активація канонічного Wnt-сигналіngu при адаптації міокарду до хронічної гіпертензії є необхідною умовою, але відбувається вона на ранніх стадіях адаптації (Підрозділ 4.2.2.).

Вочевидь, при подальшому моделюванні атлетичного міокарду сигнальна функція β -катеніну, можливо, репресується за участі негативного «фідбеку» чи інших сигнально-регуляторних механізмів, які контролюють або взаємодіють із Wnt-сигналіngом [64]. Загалом, наші дані свідчать про критичне значення канонічного Wnt-сигналіngu та β -катеніну зокрема як при патологічній, так і при фізіологічній гіпертрофії (атлетичний міокард), що також узгоджується із даними проведеного нами раніше мета-аналізу (Підрозділ 4.2.1.).

Отже, нами було показано, що розвиток гіпертрофії є досить консервативним механізмом і потребує активації і участі канонічного Wnt сигналіngu та β -катеніну. Останній є одним із потенційних гіпертрофічних маркерів і рівень експресії і білка β -катеніну і його гена корелює із рівнями експресії більшості гіпертрофічних маркерів. Із застосуванням репортерних та лінійних тварин вперше встановлено, що активація сигнальної функції β -катеніну є необхідною умовою адаптації серця до гемодинамічних та фізичних навантажень і відбувається на ранніх етапах ремоделювання міокарду.

4.3 Аналіз особливостей формування атлетичного міокарду за умови гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах

Отримані нами дані свідчать про принципово важливу роль канонічного Wnt сигналіngu у розвитку та формуванні постнатального серця, а також його адаптації до таких стресових факторів, як гемодинамічне та фізичне

навантаження. Нам вдалось показати, що пригнічення активності цього сигнального каскаду у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* спричиняє затримку росту серця, що супроводжується підвищенням експресії фетальних генів у дорослому міокарді. Також, нами було виявлено і специфічні вікові зміни так, у тварин із делецією однієї алелі гена *Ctnnb1* відбувалось збільшення маси серця із віком, проте не спостерігалось фіброзу тканини чи інших видимих морфологічних вад. З іншого боку, адаптація дорослого серця до фізичних чи гемодинамічних навантажень також потребує активації цього сигнального каскаду та β -катеніну, принаймні у рані терміни відповіді на стресовий чинник.

Зважаючи на отримані дані, виникало питання, як гетерозиготний нокаут досліджуваного нами гена *Ctnnb1* позначиться на адаптації міокарду до фізичних навантажень. Для відповіді на поставлене питання ми провели низку досліджень із застосуванням тварин віком 3 місяці контрольної групи (WT/WT) та тварин із нокаутом однієї алелі гена *Ctnnb1* (*CKO/WT*) у ембріональних кардіоміоцитах. Тварин отримували як було описано раніше (Матеріали та методи, Підрозділ 4.1). Миші обох генотипів були поділені на дві групи, перша група не отримувала фізичного навантаження і слугувала контролем до другої групи, що отримувала фізичні навантаження протягом 6 тижнів, як описано у Матеріалах та методах (Підрозділ 2.10).

4.3.1 Аналіз розвитку атлетичного міокарду у тварин із делецією гена *Ctnnb1* при тривалому фізичному навантаженні. На даному етапі досліджень ми, перш за все, зосередились на аналізі гіпертрофічної відповіді, тобто адаптації міокарду у дослідних тварин до тривалого фізичного навантаження. Для цього нами було проаналізовано індекс МС/МТ у мишей через 6 тижнів тренувань порівняно із тваринами, що не отримували навантажень. Варто зауважити, що вік мишей у експерименті становив 4,5 місяців в усіх експериментальних та контрольних групах. Ми виявили тенденцію до зростання значення індексу МС/МТ як у тварин контрольної групи так і тварин

із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* при тривалому фізичному навантаженні ($p = 0,07$) (рис. 4.19). Однак, у мишей, із гетерозиготним нокаутом досліджуваного гена, значення індексу МС/МТ було нижчим порівняно із тваринами, що не містили нокауту досліджуваного гену і отримували такі ж фізичні навантаження. Детальніший аналіз виявив, що у групі тварин що отримували фізичне навантаження, коефіцієнт варіації був в 5-10 разів вищим.

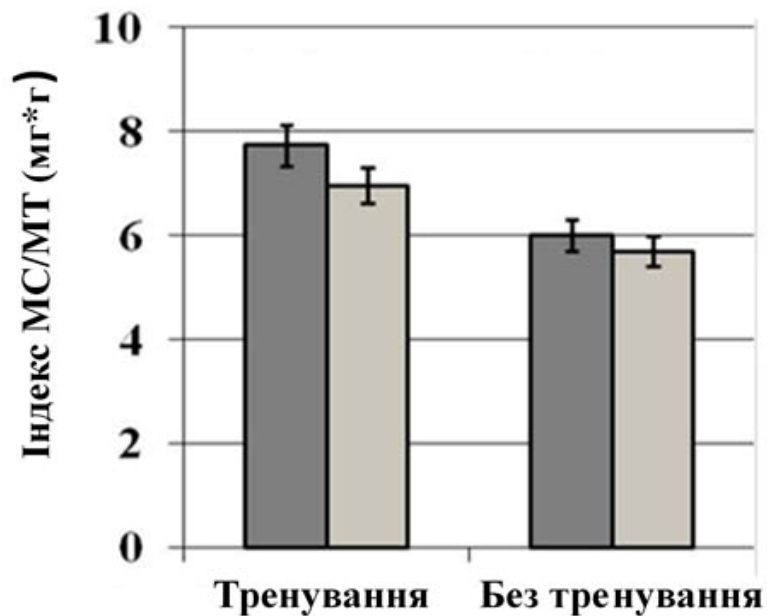


Рис. 4.19. Аналіз індексу співвідношення маси серця (МС, мг) до маси тіла (МТ, г) при адаптації тварин до фізичного навантаження: - WT/WT – тварини що не містять нокауту гена *Ctnnb1*, - WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Ctnnb1*, контроль – тварини що не отримували фізичного навантаження, плавання - тварини, що отримували фізичне навантаження, $n \geq 18$

Середнє значення показника індексу МС/ МТ у тварин дослідної групи без нокауту гена та із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* становив 0,18 та 0,31 відповідно, у тварин, контрольної групи - 0,03 та 0,06, відповідно (рис. 4.20).

При проведенні морфологічного аналізу парафінових зрізів сердець тварин, із застосуванням гематоксилін-еозинового забарвлення та забарвлення за ван Гізоном, ми не виявили фіброзів серця чи інших видимих порушень архітектури тканини міокарду, що могло б свідчити про розвиток патології у серцях мишей при адаптації їх до фізичного навантаження (рис.4.21). Варто зауважити, що у нашій попередній роботі, ми також не спостерігали розвитку фіброзу чи інших морфологічних вад серця у мишей як при тривалому так і короткостроковому навантаженні (Підрозділ 4.2.3).

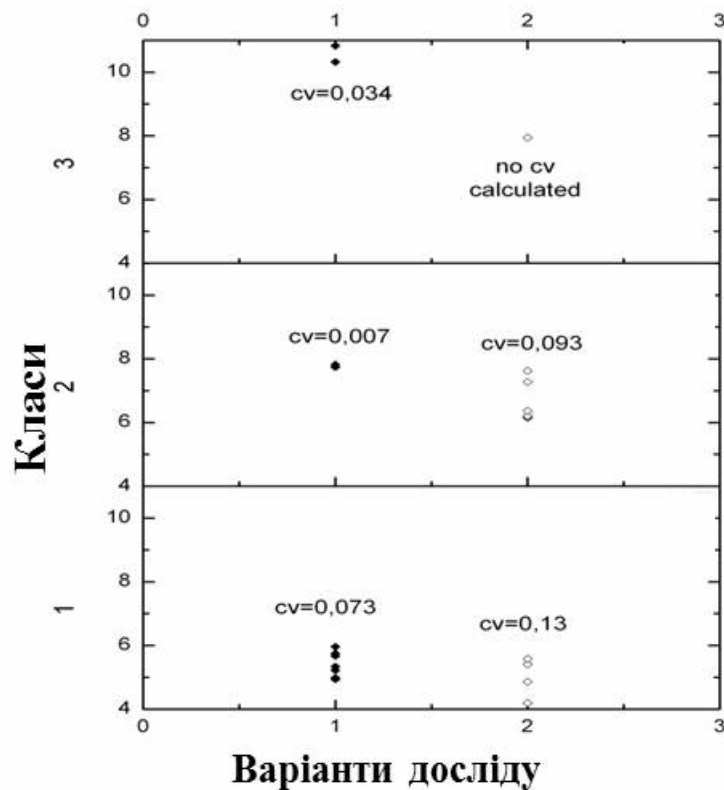


Рис. 4.20. Детальний аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин, що отримували тривале фізичне навантаження: WT/WT – тварини що не містять нокауту гена *Ctnnb1*, WT/СКО – гетерозиготи за нокаутом *Ctnnb1*, контроль – тварини що не отримували фізичного навантаження, плавання - тварини, що отримували фізичне навантаження, $n \geq 18$

З іншого боку, при дослідженні особливостей розвитку міокарду за умови гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1*, ми не спостерігали порушень

архітектури серця в усіх проаналізованих вікових групах мишей (Підрозділ 4.1.1). Це наводить на думку, що гетерозиготний нокаут гена *Ctnnb1* не призводить до критичних гістопатологічних змін серця дорослого організму, як за умови стресу, так і нормального утримування тварин.

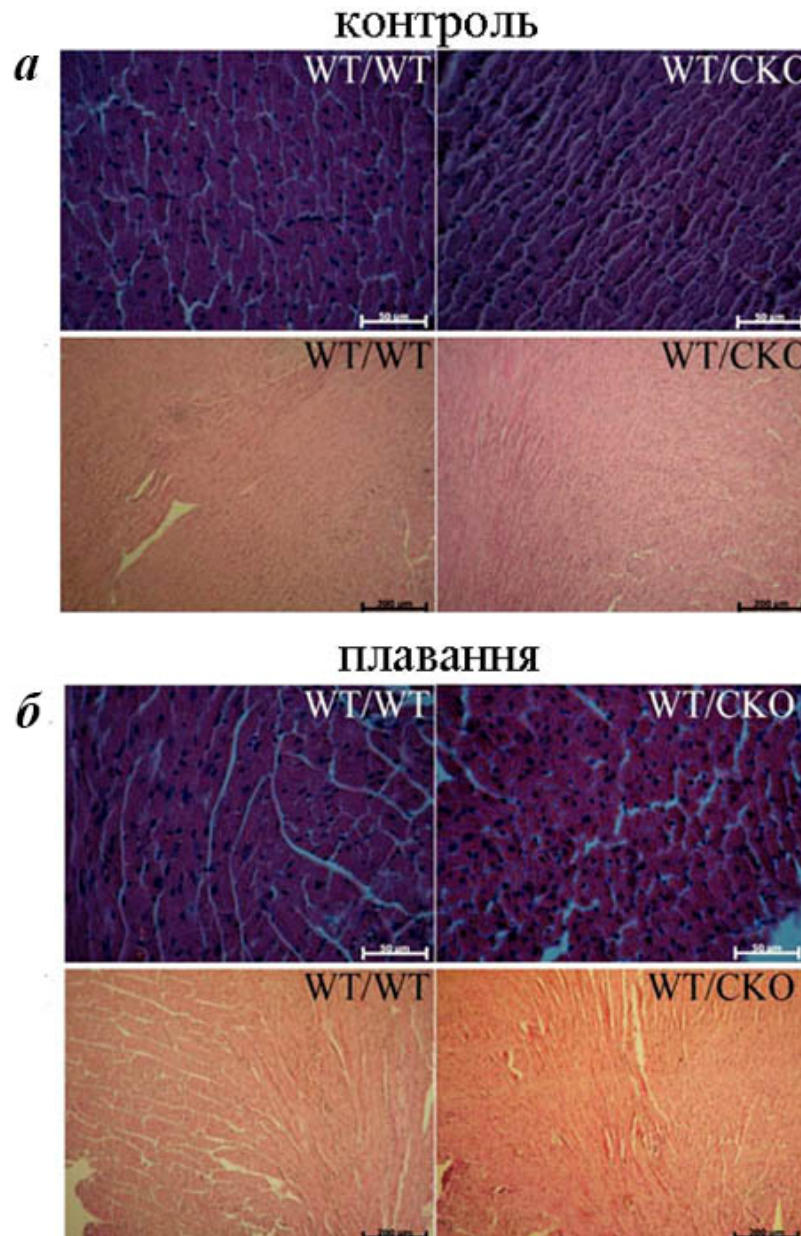


Рис.4.21. Морфологічний аналіз парафінових зрізів тканини серця тварин що отримували тривале фізичне навантаження: забарвлення гематоксилін-еозином (**а**) та пікрофуксином за ван Гізоном (**б**); WT/WT – тварини що не містять нокауту гена *Ctnnb1*, WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Ctnnb1*, контроль – тварини що не отримували фізичного навантаження, плавання - тварини, що отримували фізичне навантаження протягом 6 тижнів

Проте, аналіз розмірів кардіоміоцитів виявив, що у мишей контрольної групи із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* розмір клітин був статистично достовірно нижчим порівняно із мишами, що не містили нокауту досліджуваного гену (рис. 4.22). Однак, при тривалому фізичному навантаженні досліджуваний

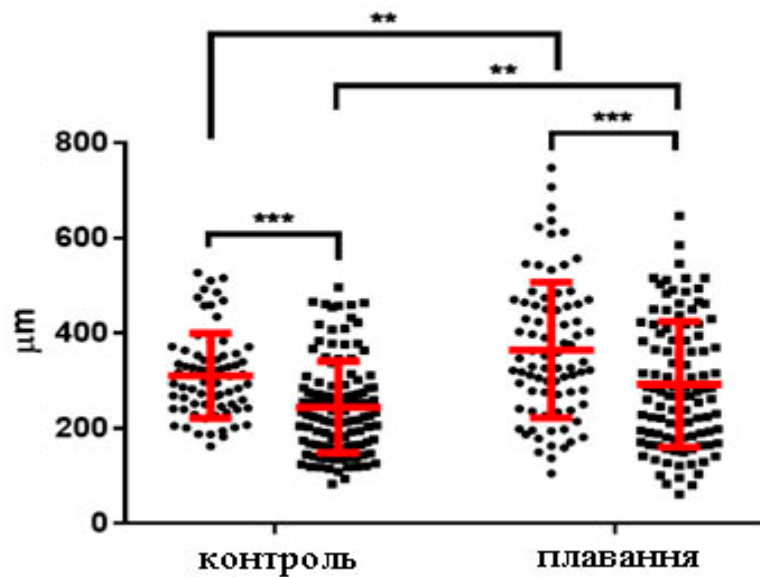


Рис. 4.22. Аналіз розмірів кардіоміоцитів при адаптації тварин до фізичного навантаження: ● - WT/WT – тварини, що не містять нокауту гена *Ctnnb1*, ■ - WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Ctnnb1*, контроль – тварини що не отримували фізичного навантаження, плавання - тварини, що отримували фізичне навантаження, $n \geq 18$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,005$ за допомогою тесту Краскела-Уолліса із *post hoc* тестом Данна.

нами параметр статистично достовірно зростав у тварин як з нокаутом так і без нокауту гена *Ctnnb1* (рис 4.19) що свідчить про гіпертрофічне ремоделювання серця за умови експерименту. Цікаво, що підвищення розмірів кардіоміоцитів у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* було статистично достовірно нижчим порівняно із тваринами, що також отримували фізичне навантаження але не містили нокауту досліджуваного гену (рис. 4.22). Це свідчить про

пригнічення гіпертрофії на рівні робочих клітин серця - кардіоміоцитів у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*.

Окрім того, у своїй роботі ми проаналізували і темп проліферації клітин як за умови гетеро- так і гомозиготного нокауту гена *Ctnnb1* під дією гіпертрофічного стимулу (LiCL). Із застосуванням ізольованих кардіоміоцитів із сердець новонароджених тварин, ми виявили, що гетерозиготна делеція гена *Ctnnb1* статистично достовірно не впливала на проліферативну активність ізольованих кардіоміоцитів як при обробці гіпертрофічним стимулом так і без неї (рис. 4.23). Однак, при аналізі кардіоміоцитів із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, виявили статистично достовірне зниження проліферативної активності клітин як у контрольному варіанті так і при обробці хлоридом літію (рис. 4.23).

Також варто звернути увагу на те, що при обробці клітин хлоридом літію спостерігали підвищення проліферативної активності кардіоміоцитів з гетерозиготною делецією *Ctnnb1* та дикого типу порівняно із контролем, де клітини перебували у стандартних умовах (рис. 4.23). Це вказує на порушення контролювання розміру клітин за умови гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1* у відповідь на дію гіпертрофічних стимулів. Данні отримані із клітинами як з гомо- так і гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* додатково свідчать на користь припущення про важливість канонічного Wnt-каскаду у розвитку гіпертрофічної відповіді. Так, як клітини із повним нокаутом гена *Ctnnb1* взагалі не реагували на дію гіпертрофічних стимулів.

Раніше, у своїй роботі, при аналізі впливу гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1* на формування постнатального міокарду ми виявили порушення експресії фетальних генів у мутантних тварин різних вікових груп (Підрозділ 4.1). Як відомо, фетальні гени активуються при адаптації серця дорослого організму до патологічних та фізіологічних навантажень і така активація є однією з молекулярно-генетичних подій, необхідних для ремоделювання серця. Тож, наступним етапом нашої роботи було проаналізувати рівень експресії

генів *ANP*, *BNP* та α -*MHC* у серцях тварин, що отримували фізичне навантаження порівняно із тваринами контрольної групи.

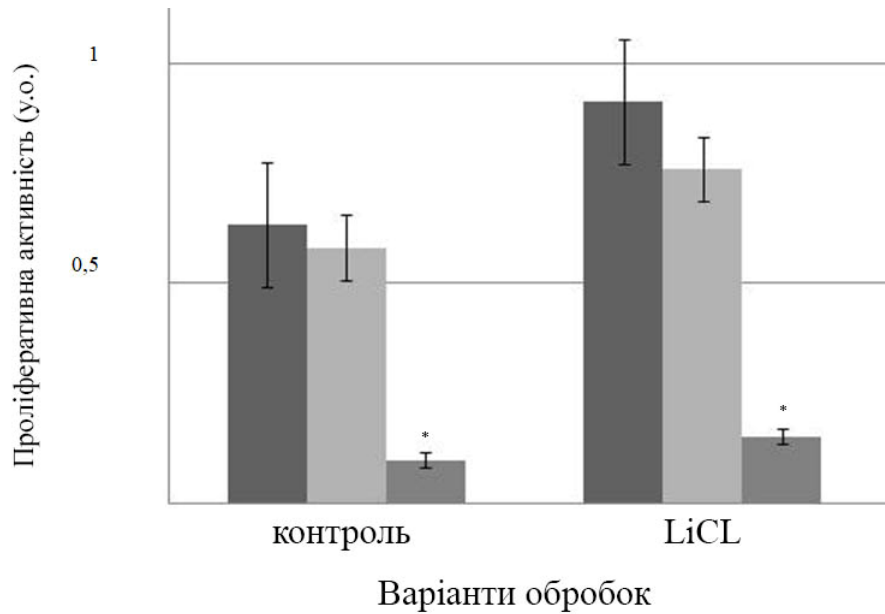


Рис. 4.23. Аналіз проліферації ізольованих кардіоміоцитів за умови впливу гіпертрофічного стимулу - LiCl. Контроль – клітини без обробки; LiCl – клітини, оброблені хлоридом літію. ■ - клітини дикого типу, □ - клітини із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, ▒ - клітини із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*

Перш за все, нами було показано, що у тварин контрольної групи з гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* віком 4,5 місяці рівень експресії фетальних генів *ANP*, *BNP* та міозину дорослого серця α -*MHC* був статистично достовірно вищим аніж у мишей того ж віку що не містили нокауту гена та не отримували фізичних навантажень (рис. 4.22). Це спостереження узгоджується із даними, що були отримані при аналізі тварин з делецією однієї алелі гена *Ctnnb1* віком три місяці (Підрозділ 4.1.1). Окрім того, це свідчить про певні зміни молекулярно генетичних патернів у серцях тварин гетерозиготних за нокаутом гена *Ctnnb1* навіть без модулювання додаткових навантажень чи стресу.

При формуванні атлетичного міокарду у тварин із нормальним генотипом відбувалось статистично достовірне підвищення гена *ANP* (рис.

4.24). Можемо припустити, що саме натрійуретичний пептид типу А приймає участь у адаптації серця до тривалих фізичних навантажень. У тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* при тривалому фізичному навантаженні спостерігали статистично достовірне підвищення експресії усіх проаналізованих фетальних генів порівняно із мишами, що перебували у контрольній групі і мали такий же генотип (рис. 4.24).

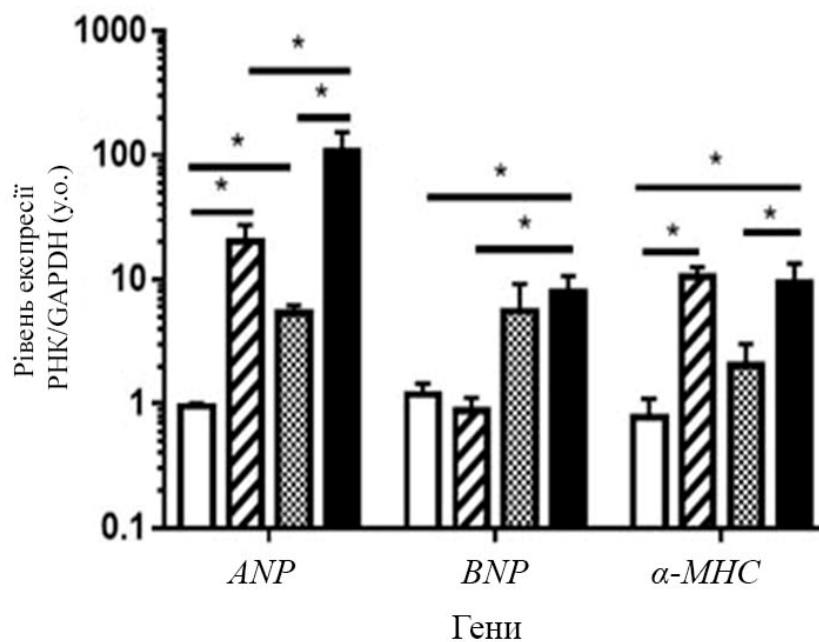


Рис. 4.24. Дослідження рівнів експресії фетальних генів у серцях тварин при тривалому фізичному навантаженні: -WT/WT контроль, – WT/CKO контроль, -WT/WT плавання, -WT/CKO. WT/WT-тварини що не містять нокауту гена *Cttnb1*, WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Cttnb1*, контроль – тварини що не отримували фізичного навантаження, плавання - тварини, що отримували фізичне навантаження протягом 6 тижнів; $n \geq 4$; * – $p < 0,05$

Підвищення експресії фетальних генів, або ембріоналізація міокарду - є одним із ключових молекулярно-генетичних мехнізмів серця при пристосуванні до впливу несприятливих факторів, як то, гемодинамічний чи гормональний стрес. Цікаво, що у серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* і за

умови нормального утримання, без моделювання стресу, фетальні гени експресуються на вищому рівні порівняно із тваринами того ж віку і з нормальним генотипом (рис. 4.24 та 4.3). Як ми вже висловлювали припущення, делеція однієї алелі гена *Ctnnb1* спричиняє порушення поділу та термінального диференціювання постнатальних клітин, та як наслідок розвитку серця, через порушення сигнальної активності продукту цього гена – білка β -катеніну. Ймовірно за таких умов серце не переходить на дорослу генетичну програму, лишається ембріоналізованим за нормальних умов функціонування а при навантаженнях, ступінь ембріоналізації такого міокарду зростає.

Отже, генетичний нокаут одного алелю гена *Ctnnb1* спричиняє затримку розвитку атлетичного міокарду при тривалих фізичних навантаженнях, що, однак, супроводжується підвищенням експресії фетальних генів у серцях таких тварин. Ймовірно, порушення адаптації міокарду, за умови застосованої генетичної моделі, є наслідком порушення активності сигнального Wnt-каскаду, оскільки важливість цього сигналінгу для формування атлетичного міокарду і гіпертрофії була показана нами у даному дисертаційному дослідженні (Підрозділ 4.2). Також нами було встановлено порушення активності цього сигналінгу у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* навіть за стандартних умов утримання (Підрозділ 4.1.2), тож наступною нашою задачею було проаналізувати кінетику активності канонічного Wnt каскаду за умов експерименту.

4.3.2 Дослідження активності канонічного Wnt сигналінгу у тварин при тривалому фізичному навантаженні за умови гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1*. Зважаючи на отримані нами результати, наступним логічним кроком роботи було проаналізувати кінетику активності канонічного Wnt сигналінгу та β -катеніну, зокрема, при адаптації до тривалого фізичного навантаження тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах. У цій серії дослідів ми проаналізували рівні експресії гена *TCF4* – продукт якого є транскрипційним ко-активатором канонічного Wnt

сигналіngu та гена *c-Myc* - гена - мішені цього каскаду. Знову ж таки, у тварин гетерозиготних за нокаутом гена *Ctnnb1*, що утримувались за стандартних умов і не отримували ніякого фізичного навантаження активність канонічного Wnt-сигналіngu була нижчою ніж у тварин, що також перебували у контрольній групі і мали нормальний генотип. Про що свідчить нижчий рівень експресії генів *TCF4* та *c-Myc* (рис. 4.25) і що узгоджується із нашими попередніми даними (Підрозділ 4.1.2).

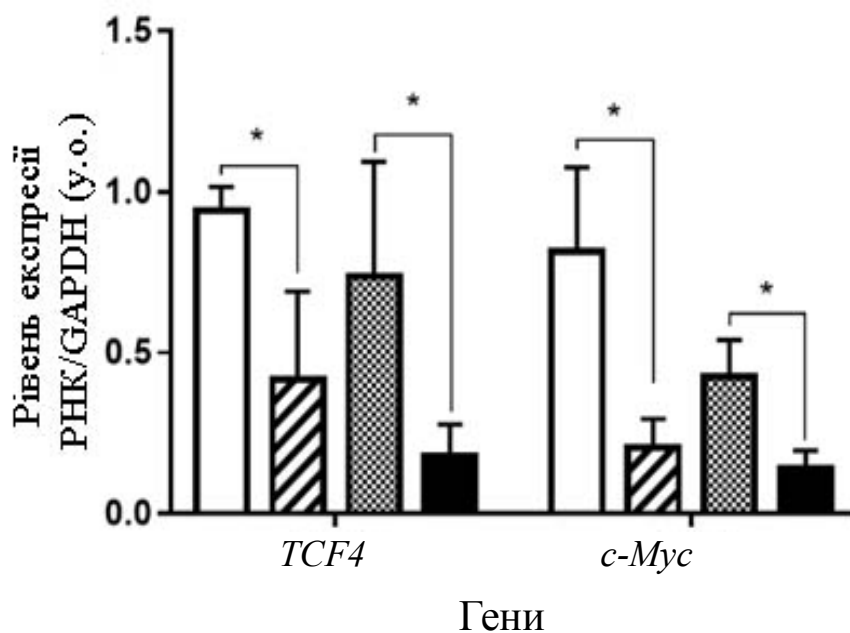


Рис. 4.25. Аналіз зміни рівнів експресії генів-мішеней β -катеніну у серцях контрольної групи тварин, тварин що тренувались протягом 6 тижнів. - WT/WT контроль, - WT/CKO контроль, - WT/WT плавання, - WT/CKO. WT/WT- тварини що не містять нокауту гена *Ctnnb1*, WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Ctnnb1*, контроль – тварини що не отримували фізичного навантаження, плавання - тварини, що отримували фізичне навантаження протягом 6 тижнів; $n \geq 4$; * – $p < 0,05$.

При тривалому фізичному навантаженні, ми спостерігали зниження експресії генів *TCF4* та *c-Myc* (рис. 4.25) як у серцях тварин з нормальним генотипом (WT/WT) так і у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*

(WT/СКО). Таке спостереження узгоджується із нашими попередніми даними. Де ми спостерігали пригнічення активності канонічного Wnt-сигналіngu на пізніх термінах формування атлетичного міокарду та гіпертрофії (Підрозділ 4.2).

Вестерн блот аналіз активності канонічного Wnt-сигналіngu у серцях тварин, що отримували тривале фізичне навантаження та тварин, що лишались у контролі, не виявив статистично вірогідних змін вмісту як сумарного так і активованого білка β -катеніну (рис. 4.26 б та в). Проте, вміст основних скефолдних білків деградувального комплексу β -катеніну – APC та Axin1 у мутантних серцях був статистично достовірно вищим порівняно із контрольними тваринами (рис. 4.26 е та є). Підвищення вмісту білків, що залучені до протеасомної деградації β -катеніну, переконливо свідчать про пригнічення його транскрипційної активності у серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1*, як при фізичних навантаженнях так і в контролі.

Однак, варто наголосити, що за умови тривалого фізичного навантаження, у серцях тварин гетерозиготних за нокаутом досліджуваного гена, підвищення вмісту білків APC та Axin1 було ще вищим порівняно із тваринами нормальних генотипів. Так вміст APC був майже в 3,5 а Axin1 – вдвічі вищим у лізатах сердець тварин із гетерозиготною делецією *Cttnb1* порівняно із мишами групи WT/WT, що отримували тривале навантаження (рис. 4.26 е та є).

Загалом, отримані дані свідчать про пригнічення сигнальної активності канонічного Wnt-каскаду у тварин із гетерозиготним нокаутом *Cttnb1*, як при тривалих фізичних навантаженнях, так і без них і узгоджуються із даними ЗТ-ПЛР аналізу (рис. 4.25).

Однак, при аналізі вмісту фосфорильованої форми GSK3 β , одного з критичних компонентів деградувального комплексу β -катеніну, ми виявили його статистично достовірне підвищення (рис. 4.26 з та д). Згідно сучасній уяві про функціонування канонічного Wnt сигналіngu, зростання вмісту

фосфорильованої GSK3 β свідчить про дисоціацію деградувального комплексу β -катеніну та підвищення сигнальної активності. Важливо також зауважити, що рівень фосфорильованої GSK3 β був статистично вірогідно вищим у тварин з гетерозиготною делецією однієї алелі *Ctnnb1*, що не отримували фізичного навантаження та у групі тварин що отримували його протягом шести тижнів.

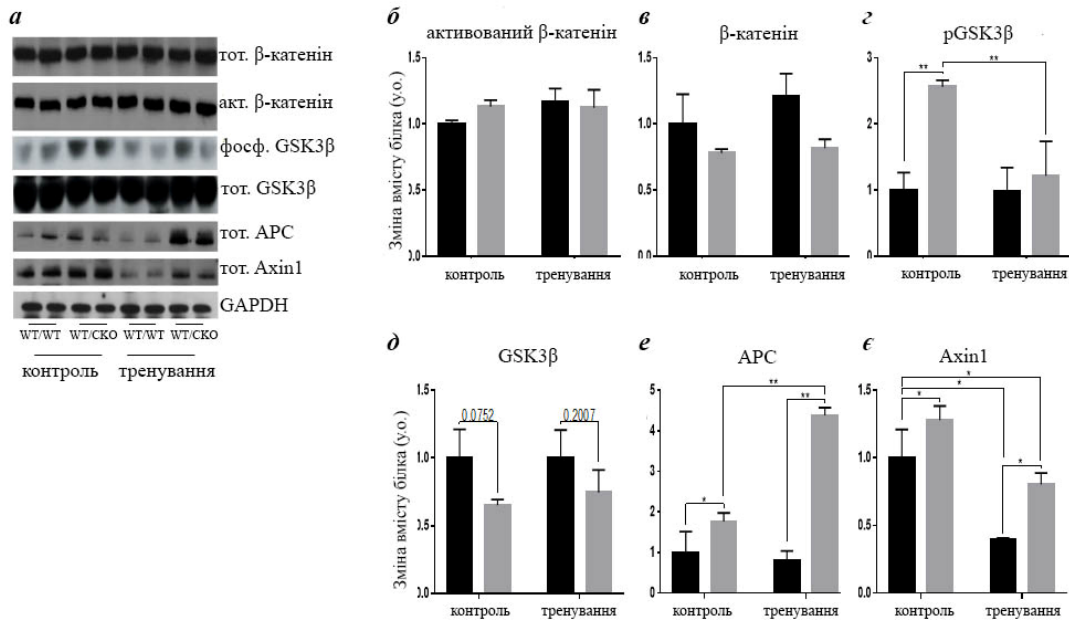


Рис 4.26. Вестерн блот аналіз кінетики канонічного Wnt-сигналіну у тварин з нормальним генотипом (WT/WT) та тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* (SKO/WT) при тривалому фізичному навантаженні (плавання) та без нього (контроль): Вестерн блот аналіз змін вмісту досліджуваних білків (**а**); вміст активованого білка β -катеніну (**б**); вміст тотального β -катеніну (**в**); вміст фосфорильованої GSK3 β (**г**); вміст тотальної GSK3 β (**д**); вміст APC (**е**); вміст Axin1 (**є**); ■ - WT/WT, ▒ - SKO/WT. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$, $n = 5$ у кожній групі; за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Проте, дані отримані при аналізі вмісту сумарної та деактивованої GSK3 β суперечать даним наведеним вище. А саме, аналізу рівнів експресії генів *TCF4* та *c-Myc* (рис. 4.25) та вмісту активованого білків APC та Axin1 (рис. 4.26 **е** та **є**) у мутантних тварин.

Варто зауважити, що GSK3 β є важливим компонентом не лише канонічного Wnt сигналіngu а й PI3/АКТ-кіназного сигналіngu. Тож, ми припускаємо, що за умови пригнічення сигнальної функції β -катеніну у серцях тварин відбувається порушення активності і інших сигнальних каскадів клітини, що залучені у регулювання адаптації серця до різних стресових чинників та мають спільні регуляторні компоненти.

4.3.3 Аналіз активності сигнальних каскадів залучених до розвитку гіпертрофії у серцях тварин із гетерозиготною делецією гена *Ctnnb1*. Як уже зазначалося, адаптація дорослого міокарда до стресу, в тому числі фізичних навантажень регулюється низкою сигнально-регуляторних каскадів, серед яких G-білок пов'язаний рецептор, кальцінеурін/NFAT, MAPK, PI3K/АКТ/mTOR сигнальні шляхи [125].

Зважаючи на результати отримані нами при аналізі активності канонічного Wnt сигналіngu у тварин з гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, логічним було проаналізувати і рівень фосфорилування ERK та АКТ, котрі є компонентами MAPK та PI3-кіназного-mTOR-залежного шляхів у дослідних та контрольних груп тварин. На цьому етапі роботи, ми також вирішили проаналізувати і активність PKA сигнального каскаду, останній, як відомо, не лише приймає участь у формуванні гіпертрофічного міокарду а й приймає участь у координації скорочувальної функції серця [129].

У результаті дослідження нам вдалося виявити статистично вірогідне підвищення вмісту фосфорильованих форм АКТ за треоніном 308 та серином 473 у мутантних тварин як без фізичного навантаження так і при тривалих тренуваннях (рис. 4.27 б та в). Таке фосфорилування свідчить про активацію цього сигнального каскаду у тварин із гетерозиготною делецією гена *Ctnnb1* як за умов контролю так і моделювання атлетичного міокарду. Це надзвичайно важлива знахідка, оскільки проливає світло на молекулярні патерни змін у серцях тварин гетерозиготних за нокаутом досліджуваного нами гена. А саме, це свідчить про певну дисрегуляцію сигнальних каскадів у серцях таких тварин, навіть за умов відсутності стресу. І, що особливо важливо, ці дані пояснюють

підвищений рівень фосфорильованого GSK3 β у серцях мутантних тварин, що було нами виявлено при аналізі кінетики активності канонічного Wnt у тварин за умов експерименту (рис. 4.26 з і д). Так відомо, що GSK3 β не лише приймає участь у фосфорилуванні β -катеніну а й є мішенню для активованого АКТ [31].

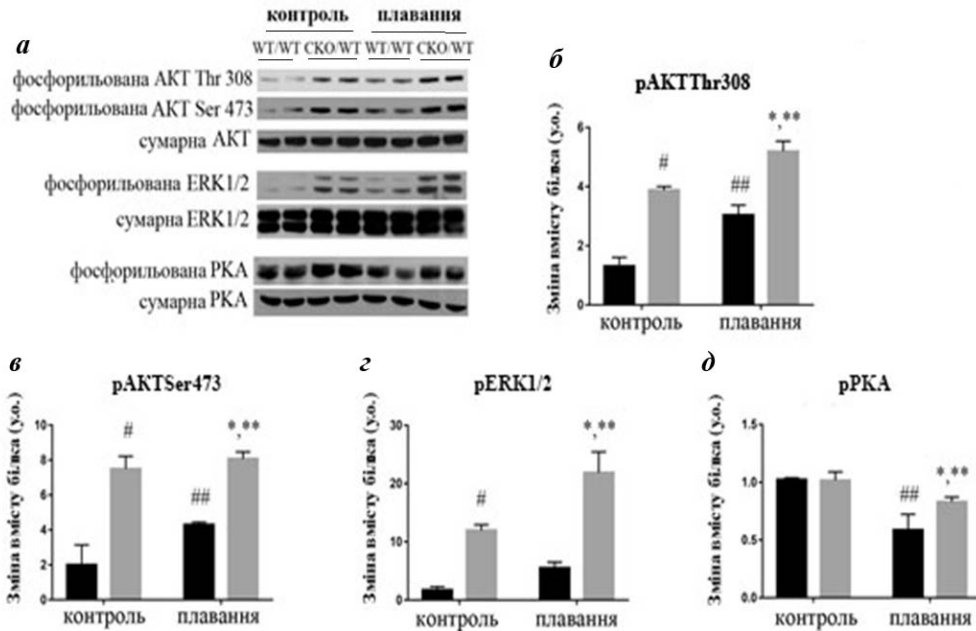


Рис 4.27. Вестерн блот аналіз кінетики гіпертрофічних сигнальних каскадів у тварин дикої типу (WT/WT) та з делецією однієї алелі гена *Stnnb1* (SKO/SKO) при тривалому фізичному навантаженні (плавання) та без нього (контроль): Вестерн блот аналіз змін вмісту досліджуваних білків (а); вміст фосфорильованої АКТ Thr308 (б); вміст фосфорильованої АКТ (в); вміст фосфорильованої ERK1/2 (г); вміст фосфорильованої PKA (д). ■ - WT/WT, ■ - SKO/SKO. n = 5 у кожній групі; # - різниця між мутантними та дикотипними тваринами у контрольній групі; ## - різниця між дикотипними тваринами у контролі та досліді (при тривалому фізичному навантаженні); * - різниця між мутантними та дикотипними тваринами при фізичному навантаженні; ** - різниця між мутантними тваринами у контролі та досліді (при тривалому фізичному навантаженні) $P < 0.05$

Варто також зауважити що у серцях тварин без нокауту гена *Stnnb1*, при тривалому фізичному навантаженні, ми також спостерігали статистично достовірне підвищення вмісту фосфорильованих форм АКТ за треоніном 308 та

серином 473 (рис. 4.27 б і в). Такий результат був цілком очікуваним, оскільки відомо, що, активація АКТ є одним з механізмів адаптації серця до дії несприятливих чинників [31]. Проте, нагадаємо, що активація цього сигнального каскаду у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* перевищувала таку у тварин із нормальним генотипом як при фізичному навантаженні так і у контрольній групі (рис. 4.26 б і в). Загалом, це узгоджується із висунутим нами припущеннями, про порушення активності сигнальних каскадів у серцях досліджуваних тварин за умови пригнічення активності канонічного Wnt сигналіngu.

Аналіз активності MAPK сигналіngu, також виявив підвищення вмісту фосфорильованих ERK1/2 у мутантних тварин у обох групах експерименту, більш ніж у два рази (рис. 4.27 з). За літературними даними відомо, що як пригнічення так і активація цього сигнального каскаду має негативний вплив на функціонування серця, та асоційована із гіпертрофічним ремоделюванням серця, розвитком ішемії та серцевої недостатності [209,197]. Також, було показано, що активація ERK1/2 у серці, має антиапоптичну дію [197].

Варто зауважити, що статистично вірогідне підвищення вмісту активованих форм Акт та ERK1/2, яке ми спостерігали у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* при тривалому фізичному навантаженні, що водночас не супроводжувалось підвищенням індексу МС/МТ, як у тварин із нормальним генотипом, свідчить на користь припущення про принципову роль транскрипційної активності β -катеніну у адаптації дорослого серця до фізичних навантажень.

Вочевидь, значення має і той факт, що у таких «мутантних» тварин окремі компоненти зазначених сигнальних каскадів фосфорилуються навіть більшою мірою, ніж у тварин що не містять гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1*. Можливо, за умови пригнічення активності Wnt сигналіngu, навіть нижче базального рівня, тобто порівняно із дикотипними тваринами, відбувається компенсація сигнальної функції останнього іншими каскадами при розвитку гіпертрофії. Загалом, отримані нами результати свідчать про те, що

навіть активація інших «гіпертрофічних» сигналінгів (Акт та ERK1/2) за умови пригнічення сигнальної функції β -катеніну не є достатньою умовою для ефективної адаптації дорослого міокарда до тривалих фізичних навантажень.

Окрім того, нами встановлено, що гетерозиготна делеція гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах, навіть за умов відсутності моделювання фізичних навантажень, спричиняє активацію сигнальних каскадів (Акт та ERK1/2), що є не лише типовим для гіпертрофії а й для ембріонального серця, котре не переключилось на дорослу генетичну програму. Незважаючи на те, що за умов експерименту ми не спостерігали статистичних змін вмісту активованого білка β -катеніну, ми припускаємо що гетерозиготний нокаут його гена впливає на кількість білка у канонічних та не канонічних білкових комплексах β -катеніну [31,85] і це, у свою чергу і є причиною порушення активності інших каскадів клітини, а саме MAPK та PI3K/AKT/mTOR-залежного сигналінгів. Усе разом, це може призводити до затримки розвитку постнатального серця та його адаптації до фізичного навантаження, що й було показано у даному дисертаційному дослідженні.

Відомо, що РКА залучена до регулювання скорочувальної функції міокарду, а саме, ця кіназа фосфорилує саркомерні білки включно з тітіном. Тож зниження рівня фосфорилування РКА у серці є певним молекулярним маркером погіршення і скорочувальної функції міокарду [129]. У своїй роботі, при проведенні Вестерн блот аналізу вмісту фосфорильованої форми РКА ми не спостерігали статистично вірогідної різниці у тварин обох генотипів контрольної групи (рис. 4.27 д). Однак при тривалому фізичному навантаженні у тварин обох генотипів відбувалось зниження вмісту фосфорильованої РКА. Варто зауважити, що зменшення активності РКА у тварин, що не містили гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1* було статистично вірогідно більшим порівняно з тваринами гетерозиготними за делецією досліджуваного гена. З одного боку це свідчить про погіршення скорочувальної функції у серцях тварин при тривалому фізичному навантаженні. З іншого – погіршення функції міокарду у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, за умов

експерименту, було менш вираженим порівняно із тваринами нормальних генотипів (WT/WT).

Загалом, нами вперше було показано, що делеція однієї алелі гена *Cttnb1* у кардіоміоцитах ембріонів (E10,5) не лише спричиняє пригнічення активності канонічного Wnt-сигналінгу а й асоційована із підвищенням сигнальної активності MAPK, PI3K/АКТ/mTOR сигнальних каскадів, як при тривалому фізичному навантаженні, так і без нього. Проте, навіть за таких умов: пригнічення канонічного Wnt-каскаду та надмірної активації MAPK, PI3K/АКТ/mTOR-сигналінгів тварини, гетерозиготні за нокаутом гена *Cttnb1*, мають слабшу гіпертрофічну відповідь. Вочевидь, транскрипційна активність продукту досліджуваного нами гена, білка β -катеніну є необхідною умовою не лише для формування постнатального серця а й врегулювання активності інших сигнальних каскадів клітини.

Резюме

1) Із застосуванням моделі генетичного нокауту, було детально охарактеризовано особливості формування постнатального серця та його адаптації до тривалого фізичного навантаження. Детально досліджено роль канонічного Wnt-сигналінгу у ремоделюванні дорослого серця та розвитку гіпертрофії.

2) З'ясовано, що гетерозиготний нокаут гена *Cttnb1* у ембріональних кардіоміоцитах (E10,5) призводить до затримки росту та підвищення експресії фетальних генів (*BNP*, β -*MHC*) у постнатальному серці (1 та 3 місяці), але не супроводжується фіброзами чи іншими вираженими морфологічними порушенням структури серця.

3) При дослідженні тварин із нокаутом однієї алелі гена *Cttnb1* старшої вікової групи (6 місяців) виявлено тенденцію до гіпертрофічного росту серця та підвищення експресії міозинів дорослого і ембріонального серця (β -*MHC* та α -*MHC*).

4) Загалом нами показано, що функція канонічного Wnt-сигналіngu та β -катеніну має важливе значення для постнатального формування та розвитку міокарду. Так, нами встановлено, що у серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* відбувається пригнічення активності цього каскаду порівняно із серцями контрольними тваринами того ж віку.

5) За допомогою проведеного мета-аналізу, нами було показано, що β -катенін залучено до формування гіпертрофічної відповіді і характер цієї взаємодії універсальний. Окрім того, за допомогою мета-аналізу нами 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-мус, CD1, BNP, ANP та індекс співвідношення білок/ДНК

6) Із застосуванням репортерних та лінійних тварин вперше встановлено, що активація сигнальної функції β -катеніну є необхідною умовою адаптації серця до гемодинамічних та фізичних навантажень і відбувається на ранніх етапах формування гіпертрофічної відповіді.

7) Генетичний нокаут однієї алелі гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах (E10,5) спричиняє пригнічення активності канонічного Wnt-сигналіngu і асоційований із патернами молекулярно білогічних змін, а саме підвищенням сигнальної активності MAPK та PI3K/AKT/mTOR-сигнальних каскадів у серцях дорослих тварин навіть за умови відсутності дії гіпертрофічних стимулів.

8) Показано, що, генетичний нокаут однієї алелі гена *Ctnnb1* спричиняє затримку розвитку атлетичного міокарду при тривалих фізичних навантаженнях, що, однак, супроводжується підвищенням експресії фетальних генів *ANP*, *BNP* та міозину дорослого серця α -MHC у серцях таких тварин.

9) Нами було показано, 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, РІЗ-кіназного сигналінгів у тварини гетерозиготних за нокаутом *Ctnnb1* не сприяла формуванню атлетичного міокарду.

Основні положення даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:

- 1) Пальчевська О.Л., Балацький В.В., Андреева А.О., Мацевич Л.Л., **Півень О.О.**, Лукаш Л.Л. Дослідження активності канонічного Wnt-сигналінгу у тварин різного віку за умов ембріональної кардіоспецифічної делеції β -катеніну //Цитологія та генетика,- 2015. – 49(№ 1). - С. 10-17.
- 2) 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
- 3) Palchevska O.L., Macewicz L.L., **Piven O.P.** A link between β -catenin and hypertrophy: Evaluation and meta-analysis// Biopolymers and Cell.- 2016. - 32(2). – P.150-157.
- 4) **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.
- 5) Пальчевська О.Л., Хазєва 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. 242-247.
- 6) 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. - том 15(2). – С.181 – 186.
- 7) 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, ECPB. - 2018. - 3(83). – С. 33–39.

РОЗДІЛ 5

**ВИВЧЕННЯ ФУНКЦІЇ α -Е-КАТЕНІНУ В РОЗВИТКУ ТА
ФУНКЦІОНУВАННІ МІОКАРДУ ЗА УМОВИ НОКАУТУ ГЕНА *Cttnn1***

До тепер, функція білка α -Е-катеніну, у контексті біології серця, розглядалась і обмежувалась переважно його участю у формуванні, регулюванні та підтримці міжклітинної адгезії. Однак, поодинокі роботи свідчать на користь участі цього білка у регулюванні сигнальних каскадів клітин, що робить його досить важливим гравцем у контролюванні цілої низки біологічних процесів [141,172,189,194,219]. І хоча, переважна більшість цих робіт виконана з застосуванням інших клітинних об'єктів, кілька робіт свідчать на користь сигнальної функції α -Е-катеніну і у серці [137]. У попередніх розділах дисертаційного дослідження, нами також було показано сигнальну функцію α -Е-катеніну у постнатальному серці (P1-2). Так, нокаут гена *Cttnn1* у ембріональному серці, хоч і не призводив до виражених морфологічних вад ембріону чи серця, а також летальності, все ж таки впливав на проліферативну активність постнатальних кардіоміоцитів, розмір серця та клітин (Розділ 3). Окрім того, у постнатальних кардіоміоцитах, із нокаутом гена *Cttnn1* ми виявили підвищення транскрипційної активності β -катеніна та *Yap*. Також, хочемо нагадати, що на відміну від свого гомолога α -Т-катеніну, для α -Е-катеніну, тобто гена *Cttnn1*, наразі не описано мутацій які би спричиняли розвиток серцевих патологій (Огляд літератури).

Усе разом, це примушує більш детально проаналізувати функцію цього гена та його продукту у формуванні та функціонуванні серця дорослого організму. Тож, у наступному розділі нашої роботи, ми зосередились на

детальному аналізу функції α -Е-катеніну у постнатальному серці із застосуванням моделі генетичного нокауту гена *Cttnn1*.

5.1 Аналіз впливу гомо- і гетерозиготного нокауту гена *Cttnn1* на постнатальний розвиток серця та тривалість життя тварин

5.1.1 Дослідження тривалості життя тварин із гетеро - та гомозиготною делецією гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах. З огляду на власні та літературні дані ми припустили, що нокаут гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах, хоч і не спричиняє летальності, все ж таки, через його участь у модулюванні сигнальних каскадів впливатиме на формування постнатального міокарду. Таке припущення ґрунтується на наших попередніх даних, де ми виявили порушення темпу проліферації та термінальної диференціації неонатальних кардіоміоцитів за умови і гомо- і гетерозиготного нокауту гена *Cttnn1*. Окрім того, ми спостерігали і підвищення транскрипційної активності β -катеніну та *Yap* у мутантних кардіоміоцитах. Сигнальна функція α -Е-катеніну, продукту гена *Cttnn1*, була показана і іншими дослідниками [137].

Для виконання цього етапу досліджень, ми використовували тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах, стратегія схрещувань таких мишей детально викладена у Матеріалах та методах (Розділ 2.2). Для початку ми проаналізували, як нокаут досліджуваного нами гена впливає на тривалість життя дорослих тварин. У результаті, нами було з'ясовано, що і гетерозиготний і гомозиготній нокаут гена *Cttnn1* статистично достовірно спричиняв скорочення тривалості життя мишей порівняно із контрольною групою тварин. А саме, у випадку тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1* летальність тварин реєстрували вже на 28 тижні життя. Гомозиготні, за нокаутом досліджуваного гена, тварини гинули, починаючи з 19 тижня (рис. 5.1). Згідно наших спостережень, середня тривалість життя для гетерозигот становила - 38 тижнів, гомозигот – 36 тижнів. Варто зауважити, що тварини як дослідних так і контрольної груп

утримувались за однакових і стандартних умов віварію. Однак, через 48 тижнів спостережень усі гетерозиготні та гомозиготні самці мишей загинули. Серед контрольної групи тварин, нами також було зареєстровано летальність, а саме, протягом терміну спостереження загинуло 2 із 15 тварин (рис. 5.1). Проте, зареєстрована нами летальність є в межах норми [269]. Спостереження за контрольними тваринами припинили на 52 тижні їхнього життя.

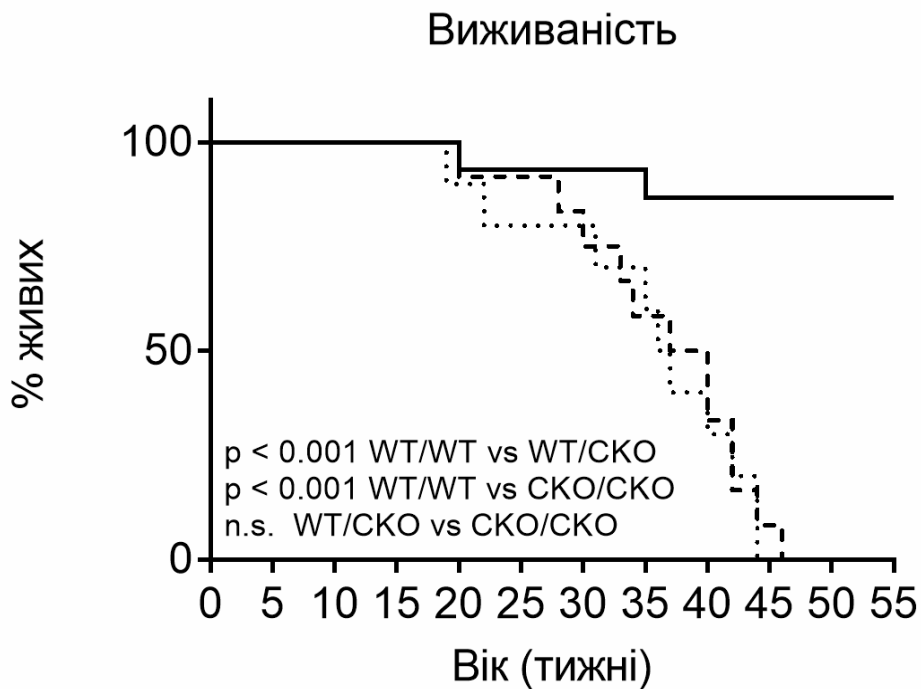


Рис. 5.1. Криві виживаності Каплан-Мейер для тварин контрольної групи та мишей із нокаутом гена *Cttna1*. WT/WT – контрольні миші ($n = 15$), WT/CKO – гетерозиготи ($n = 12$), CKO/CKO – гомозиготи ($n = 10$).

— - WT/WT; - - - - WT/CKO; - CKO/CKO. $p < 0.001$ за допомогою лог-рангового тесту

Таким чином, нами було показано, що як повний так і частковий нокаут гена *Cttna1* у ембріональних кардіоміоцитах призводить до скорочення тривалості життя тварин та передчасної летальності. З огляду на отримані дані, а саме передчасну летальність досліджуваних мишей, при проведенні

подальших морфологічних, морфометричних, молекулярно-генетичних та біологічних досліджень ми використовували тварин віком 10 місяців.

5.1.2 Вивчення ремоделювання серця дорослих тварин за умови гетеро- та гомозиготного нокауту гена *Cttnn1*. При проведенні морфологічного та морфометричного аналізів, ми виявили суттєві порушення тканини серця у тварин віком 10 місяців як із гетеро- так і гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1*. По-перше ми спостерігали підвищення значення індексу співвідношення МС/МТ у дослідних тварин обох генотипів порівняно із контрольними мишами (рис. 5.2). Статистично достовірне зростання цього показника, з одного боку свідчить про гіпертрофічний ріст міокарду у тварин з нокаутом гена *Cttnn1*, а з іншого – узгоджується із нашими попередніми даними. Де нами було показано зростання індексу МС/МТ у новонароджених тварин із гетеро – та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* (Підрозділ 3.2).

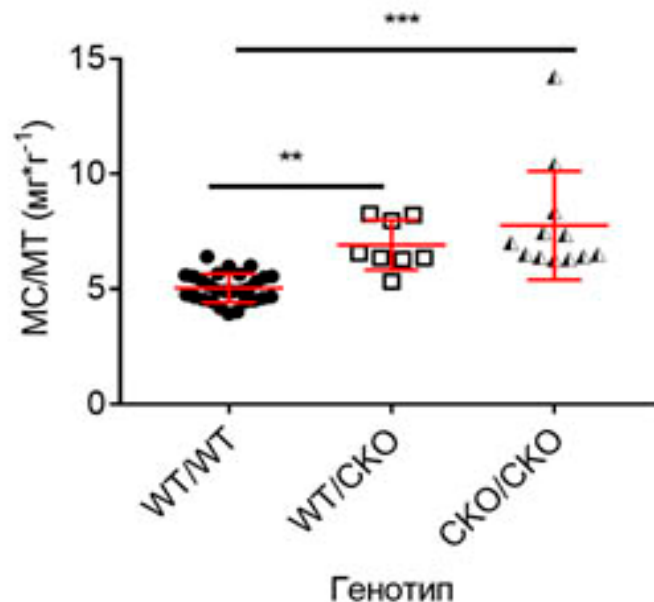


Рис. 5.2. Гетерозиготна та гомозиготна делеція гена *Cttnn1* спричиняє зростання індексу співвідношення маси серця (МС, мг) до маси тіла (МТ г). WT/WT – контрольні миші, WT/SKO – гетерозиготи, SKO/SKO – гомозиготи. WT/WT n = 26, SKO/WT n = 10, SKO/SKO n = 14. ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,005$ за допомогою тесту Краскела-Уолліса із *post hoc* тестом Данна

Проведення детального морфологічного аналізу парафінових секцій сердець тварин контрольної групи та тварин із гетеро- і гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* показало суттєві порушення структури серця у мутантних тварин обох генотипів віком 10 місяців. А саме, із застосуванням забарвлення гематоксиліном та еозином ми виявили, в обох мутантних групах тварин, критичні гістопатологічні порушення. Серед яких ідентифікували: “хвилясті” кардіоміоцити (рис. 5.3. *a, б, в*), та кардіоміоцити із гіпереозинофільною цитоплазмою (рис. 5.3. *г, д, е*), наявність таких клітин вказує на ішемічне ураження міокарду за умов експерименту [13,82]. Цікаво, що при проведенні аналізу спостерігали також і пошкодження коронарних судин, останнє, як відомо є причиною ішемічного ушкодження серця (рис. 5.3. *п, р, с*) [82]. Тож, ушкодження коронарних судин, що ми спостерігали, вочевидь пояснює наявність “хвилястих” кардіоміоцитів (рис. 5.3. *a, б, в*) та кардіоміоцитів із гіпереозинофільною цитоплазмою (рис. 5.3. *г, д, е*). Окрім того, спостерігали кардіоміоцити із вакуолізованими ядрами (рис. 5.3. *ж, з, к*), що є ознакою загибелі клітин [111] та дифузну інфільтрацію міокарда лімфоцитами (рис. 5.3. *л, м, н*), останнє є ознакою запалення [182].

Окрім зазначених порушень структури серця, ми також спостерігали і масивні фіброзні заміщення як у тварин із гетеро- так і з гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1*. Так, за допомогою забарвлення за ван Гізоном ми виявили периваскулярний фіброз (рис 5.4. *a*), що, як відомо спричиняє порушення коронарного кровообігу [47], це узгоджується із тими гістологічними порушеннями, що є типовими для ішемічного ураження міокарду, та були описані нами вище (рис. 5.3.). Окрім того спостерігали і значний замісний фіброз, що є ознакою загибелі кардіоміоцитів та їхнього заміщення сполучною тканиною [71]. Це також узгоджується із попередніми даними, де ми виявили кардіоміоцити із вакуолізованими ядрами у серцях мишей із делецією гена *Cttnn1* (рис. 5.3). При проведенні аналізу інтенсивності

фіброзу, ми виявили деякі відмінності між серцями тварин із гомозиготною та гетерозиготною делецією досліджуваного гена.

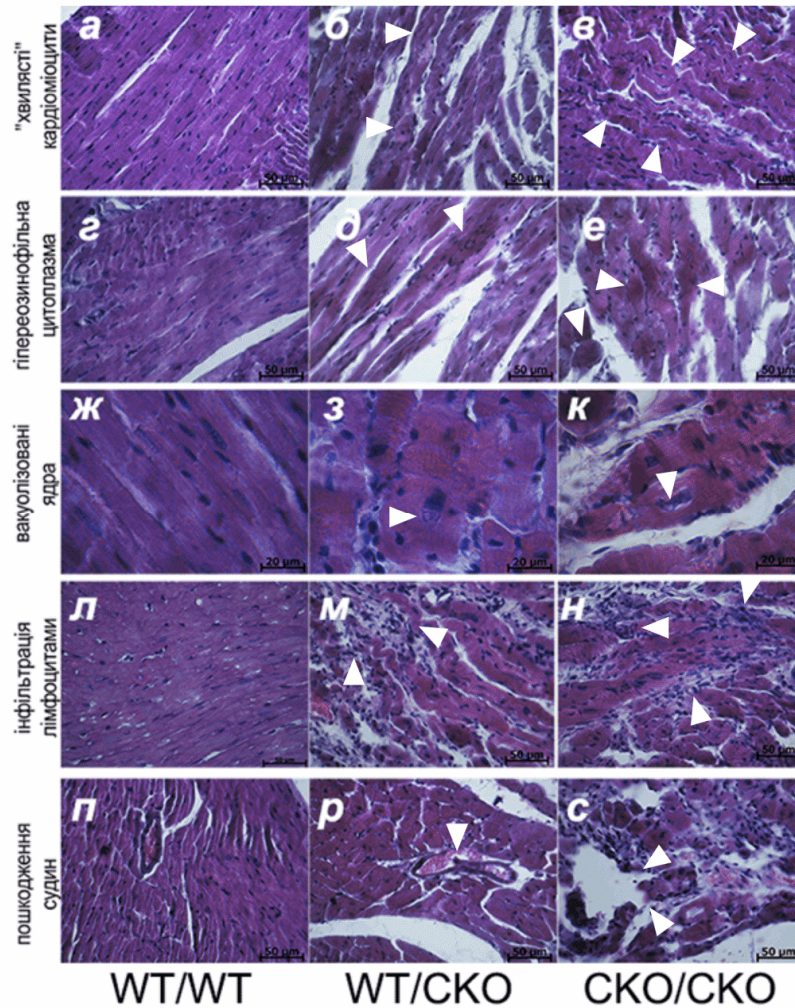


Рис. 5.3. Морфологічний аналіз парафінових зрізів тканини міокарду контрольних тварин, та мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією *Stnna1* за допомогою гематоксилін/еозинового забарвлення. На рисунку наведені типові гістопатологічні зміни. *а, б, в* – “хвилясті” кардіоміоцити, збільшення $40\times$, лінійка 50 мкм, *г, д, е* – кардіоміоцити із гіперезинофільною цитоплазмою, збільшення $400\times$, лінійка 50 мкм, *ж, з, к* – кардіоміоцити із вакуолізованими ядрами, збільшення $1000\times$, лінійка 20 мкм *л, м, н* – дифузна інфільтрація міокарда лімфоцитами, збільшення $400\times$, лінійка 50 мкм, *п, р, с* – пошкодження судин в серці, збільшення $400\times$, лінійка 50 мкм. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. Усі вказані гістопатологічні зміни позначені стрілочками

Як вже було зазначено раніше, однією із ознак гіпертрофії є підвищення експресії фетальних генів. Тож, наступним кроком нашої роботи було проаналізувати зміни рівнів експресії фетальних генів, а саме *ANP*, *BNP* та β -*MHC*, а також міозина дорослого серця – α -*MHC* (рис. 5.5). Варто нагадати, що порушення експресії фетальних генів, а саме *ANP*, *BNP* та β -*MHC* ми спостерігали і у серцях новонароджених тварин P1-2 за умови нокауту досліджуваного нами гена (Підрозділ 3.2.2). Цікаво, що і при аналізі змін експресії цих генів у дорослих серцях ми спостерігали статистично достовірне зростання експресії генів *ANP*, та β -*MHC*, як у тварин із гетеро- так із гомозиготним нокаутом *Cttna1* (рис 5.5). Хочемо наголосити, що підвищення експресії цих генів є маркерами і деяких патологій серця, а саме гіпертрофії та серцевої недостатності [174], що узгоджується із даними морфологічного та морфометричного дослідження.

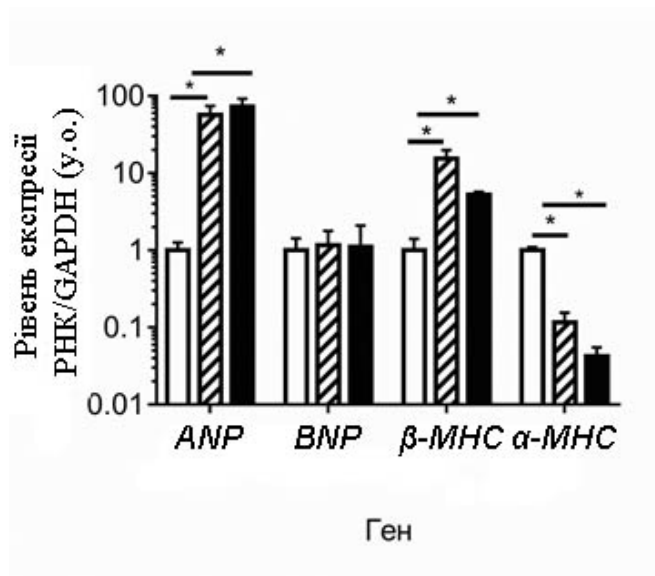


Рис. 5.5. Аналіз рівнів експресії фетальних генів у мишей контрольної групи та тварин із гетерозиготним і гомозиготним нокаутом гена *Cttna1*. Дані експресії представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, - WT/CKO – гетерозиготи, - CKO/CKO – гомозиготи. n = 5 у всіх групах. * – p ≤ 0,05 за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Про розвиток патології серця у дорослих тварин за умови нокауту гена *Cttna1* свідчить і статистично достовірне зниження експресії гена міозина

дорослого серця – α -МНС (рис. 5.5). Зниження експресії останнього було більшим у серцях тварин із гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* порівняно із таким для гетерозигот. Це також є типовим при гіпертрофії та серцевій недостатності [170]. Варто зауважити, що ми не спостерігали статистично достовірних змін експресії гена *BNP* у серцях обох мутантних групи мишей порівняно із контролем (рис. 5.5).

Загалом нами було показано, що і повна і часткова втрата гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє зростання гіпертрофічного індексу, масивні гістопатологічні перебудови та зміни експресії фетальних генів *ANP*, β -*MHC* та α -*MHC* у серцях дорослих мишей віком 10 місяців. Усе разом це свідчить про розвиток гіпертрофії та серцевої недостатності у таких тварин.

5.2 Дослідження гемодинамічної функції серця за умови делеції гена *Cttnn1*

Тож нами було показано, що гомозиготний та гетерозиготний нокаут гена *Cttnn1* спричиняє низку морфологічних та молекулярно-генетичних порушень серця дорослих мишей віком 10 місяців, типових для гіпертрофії та серцевої недостатності. Оскільки патологічні стани серця зазвичай супроводжуються і порушенням його функції, тож наступним етапом роботи було проаналізувати вплив делеції досліджуваного гена на основні кардіогемодинамічні параметри. При проведенні аналізу тварин віком 9 місяців нами було виявлено погіршення насосної та діастолічної функцій серця у тварин із гетерозиготною та гомозиготною делецією гена *Cttnn1* (табл. 5.1). Аналіз петель тиск-об'єм переконливо вказує на дилатацію лівого шлуночка у тварин із повним та частковим нокаутом досліджуваного гена (рис. 5.6).

До того ж, при детальному аналізі низки гемодинамічних параметрів, ми виявили зменшення частоти серцевих скорочень, як у гетерозигот, так і у

гомозигот за нокаутом гена *Cttnn1* (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. 5.1). Усе разом, це свідчить про погіршення насосної функції серця у тварин із делецією гена *Cttnn1*, а також про розвиток серцевої недостатності у мутантних мишей віком 9 місяців.

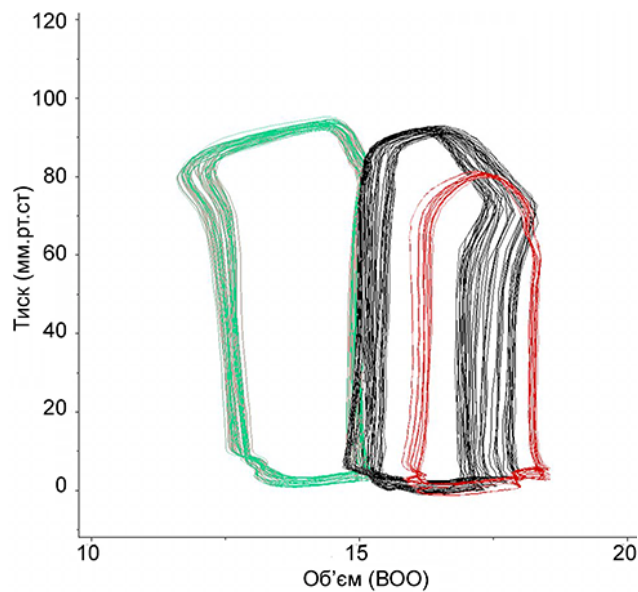


Рис. 5.6. Аналіз типових кривих тиск-об'єм у тварин із гетерозиготним та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* порівняно із контрольними мишами.

— - WT/WT, — - WT/SKO, — - SKO/SKO. WT/WT – контрольні миші, WT/SKO – гетерозиготи, SKO/SKO – гомозиготи

Варто зауважити, що у тварин із делецією гена *Cttnn1*, окрім решти показників, погіршувалась і скоротлива функція серця, про що свідчить зниження таких показників, як кінцевий систолічний тиск та $dPdt_{\text{максимальне}}$. Так, зниження кінцевого систолічного тиску у гомозигот за нокаутом досліджуваного

Кардіогемодинамічні показники мишей із гетерозиготною і гомозиготною делецією гена *Cttna1* порівняно із контрольними тваринами

Параметр	WT/WT	WT/СКО	СКО/СКО
Частота серцевих скорочень (уд*хв. ⁻¹)	626.8 ± 92	492.1 ± 106.1 *	486.6 ± 137.0 *
Максимальний об'єм (мкл)	23.1 ± 6.1	25.5 ± 8.0*	24.8 ± 10.0
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*	20.3 ± 9.9*
Кінцевий діастолічний об'єм (мкл)	21.2 ± 6.1	24.5 ± 8.1*	24.3 ± 10.1*
Кінцевий систолічний тиск (мм.рт.ст)	87.2 ± 10.2	79.5 ± 20.9 *	84.3 ± 15.3
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	45.0 ± 26.3*	31.3 ± 17.3 * [#]
Серцевий вкид (мкл*хв. ⁻¹)	6288.9 ± 2156.4	4663.7 ± 2224.1 *	3697.9 ± 1912.5 *
Ударна робота (мм.рт.ст*мкл ⁻¹)	744.5 ± 346.1	626 ± 395.1 *	408.0 ± 296.6 * [#]
Артеріальна жорсткість (мм.рт.ст*мкл ⁻¹)	9.9 ± 3.9	9.2 ± 1.9	19.0 ± 17.0 * [#]
dPdt _{максимальне} (мм.рт.ст*сек. ⁻¹)	13712.8 ± 3079.3	8683.8 ± 5141.6 *	7767.8 ± 2257 *
dPdt _{мінімальне} (мм.рт.ст*сек. ⁻¹)	-10814.2 ± 1865.0	-6466.5 ± 3834.7 *	-5824.3 ± 1375.8 *
Тau_w (мсек.)	4.5 ± 1.2	11.0 ± 6.9 *	15.6 ± 35.3 *

(продовж. табл. 5.1.)

Тau_g (мсек.)	9.6 ± 9.6	12.1 ± 6.3	42.5 ± 149.0 * [#]
Максимальна потужність (мВат)	6.1 ± 1.2	5.4 ± 3.4	3.0 ± 1.9 * [#]
E _{максимальна}	12.7 ± 0.7	11.2 ± 4.0	13.9 ± 7.5

Примітки: 1-WT/WT – контрольні миші, 2 - WT/СКО – гетерозиготи, 3 - СКО/СКО – гомозиготи, 4 - n = 5 у кожній групі, 5 - * - $p \leq 0.05$ відносно контрольних мишей, 6 - # - $p \leq 0,05$ відносно мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

гена становило - 8,7%, у гетерозигот - 3,3%. (табл. 5.1). Показник $dPdt_{\text{максимальне}}$ знижувався у гомозигот на 36,6%, а у гетерозигот - на 43,3%. Описані нами порушення насосної та систолічної функцій можуть бути результатом значного зростання артеріальної жорсткості, що є важливим фактором після навантаження.

Дійсно, у тварин із гомозиготним нокаутом гена, артеріальна жорсткість зростала на 91,1% порівняно із контрольними мишами (табл. 5.1). Цікаво, що у тварин, гетерозиготних за нокаутом гена *Ctnn1*, цей показник не відрізнявся від такого у контрольних тварин (табл. 5.1) і, незважаючи на це, у мишей із гетерозиготним нокаутом *Ctnn1* спостерігали погіршення серцевої функції. Це може вказувати на участь продукту гена *Ctnn1* - α -Е-катеніну у регулюванні чи підтриманні нормальної гемодинамічної функції, так як нокаут цього гена спричиняє її порушення. З іншого боку наші дані вказують на той факт, що насосна та діастолічна функції можуть бути порушені, не залежно, від артеріальної жорсткості у дослідних тварин за умов експерименту.

Також нами було показано, що у мутантних тварин відбувається зростання таких показників як: кінцевий діастолічний тиск, кінцевий діастолічний об'єм і Тау (табл. 5.1). Підвищення значень цих показників означає, що міокард гірше розслаблюється після скорочення.

Варто зауважити, що скорочувальна функція міокарду залежить від рівню фосфорилування саркомерних білків, серед яких і титин. Ми припустили, що нокаут досліджуваного нами гена може спричиняти порушення роботи сигнальних каскадів клітини, залучених до фосфорилування саркомерних білків. Одним із таких ферментів є протеїнкіназа А (РКА) [68,129]. Тож, для перевірки нашого припущення, ми проаналізували вміст фосфорильованої РКА у лізатах сердець тварин із гомо- та гетерозиготним нокаутом гена *Cttna1*. У результаті, ми виявили статистично достовірне зменшення вмісту фосфорильованої РКА у обох групах мутантних тварин порівняно із контролем, що свідчить про пригнічення її активності (рис. 5.7).

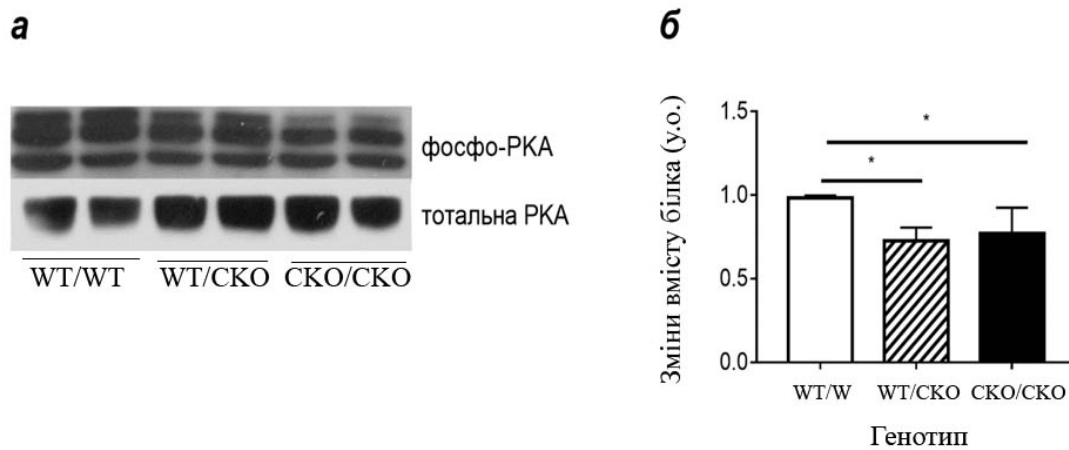


Рис. 5.7. Аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої РКА у лізатах сердець тварин із гетерозиготним та гомозиготним нокаутом гена *Cttna1* порівняно із контрольними мишами. типовий Вестерн блот (а), денситометрія експресії фосфорильованої РКА нормалізована відносно тотальної РКА (б). Дані експресії білка подано, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. n = 5 у всіх групах. * - $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Отримані дані узгоджуються із результатами досліджень основних кардіогемодинамічних параметрів (табл. 5.1) і також свідчать про погіршення скорочувальної функції міокарду у мутантних тварин. З іншого боку наші дані можуть свідчити і про більш глобальні порушення активності молекулярних

каскадів клітини, що залученні до регулювання фізіології та метаболізму дорослого серця, так відомо, що РКА, окрім іншого, регулює каталітичну активність гормончутливої ліпази (HSL) [61].

Загалом, нами показано, що гетерозиготний та гомозиготний нокаут гена *Ctnna1* у ембріональних кардіоміоцитах (E10,5) спричиняє масивні порушення основних гемодинамічних показників міокарду та, як наслідок, розвиток серцевої недостатності.

5.3 Дослідження сигнальної функції α -Е-катеніну за умови нокауту його гена

При дослідженні неонатальних кардіоміоцитів із нокаутом гена *Ctnna1* нами було виявлено, що його продукт - α -Е-катенін залучено до регулювання активності канонічного Wnt- та NIPPO-сигнального каскаду (Підрозділ 3.2.3). Так, α -Е-катенін є супресором транскрипційної активності медіаторів цих сигнальних систем - β -катеніну та γ у неонатальних кардіоміоцитах (P1-2). Варто зауважити, що сигнальна функція - α -Е-катеніну досліджувалась одночасно із його адгезивною функцією із застосуванням різноманітних модельних систем. Низка експериментальних робіт також свідчить на користь участі цього білка у регулюванні активності канонічного Wnt-сигнального каскаду, але отримані дані є дещо суперечливими, а саме показано як позитивну [172], так і негативну [41,207,73] регуляцію активності каскаду α -Е-катеніном. Була продемонстрована здатність α -Е-катеніну регулювати і активність іншого сигнального каскаду - NIPPO [222,215]. Як уже зазначалось вище, практично одночасно із нашою роботою, із застосуванням подвійного нокауту генів *Ctnna1* та *Ctnna3* (продукти α -Е- та α -Т-катенін відповідно) у міокарді було показано підвищення транскрипційної активності γ що супроводжувалось прискоренням темпу проліферації кардіоміоцитів [137,215].

Ми вже наголошували, у своїй роботі, на важливості таких сигнальних каскадів як канонічний Wnt- і HIPPO-сигналінг, як для правильної закладки, так формування серця у ембріогенезі, так і для адаптацій серця до дії патологічних факторів [37,273,21]. Оскільки, нами було показано підвищення активності вказаних сигнальних систем у серцях новонароджених мишей (P1-2), за умови делеції гена *Cttnn1*; до того ж, результати морфометричних, морфологічних та кардіогемодинамічних досліджень свідчать на користь розвитку серцевої недостатності у мутантних мишей, ми припустили, що нокаут гена *Cttnn1* спричиняє активацію Wnt- і HIPPO-сигналінгів і у серцях дорослих тварин і це, може бути причиною розвитку патології.

Тож, наступним логічним кроком нашої роботи, було дослідити активність канонічного Wnt- та HIPPO-сигнальних каскадів у серцях тварин із гомозиготним та гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1*.

5.3.1 Дослідження активності канонічного Wnt-сигналінгу у серцях тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1*. У результаті роботи ми виявили підвищення сигнальної активності канонічного Wnt-каскаду у серцях дорослих тварин віком 10 місяців із гомо– та гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1* (рис.5.8). Незважаючи на те, що статистично достовірно зростав вміст тотального білка β -катеніну лише у лізатах сердець тварин із гомозиготною делецією *Cttnn1* (рис. 5.8 *a* та *b*), вміст активного білка підвищувався у лізатах сердець обох мутантних груп порівняно із контролем (рис. 5.8 *a* та *b*). Дійсно вміст нефосфорильованого за серином 33/37 та треоніном 41 β -катеніну зростав, як у зразках із сердець з гетерозиготним, так і гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* порівняно із зразками контрольної групи (рис. 5.8 *a* та *b*). Окрім того, ми виявили, що рівень активного β -катеніну у гомозигот був статистично достовірно вищим порівняно із мишами гетерозиготними за нокаутом досліджуваного гена (рис. 5.8 *a* та *b*). А це вказує на те, що у тварин гомозиготних за нокаутом гена *Cttnn1*, у ембріональних

кардіоміоцитах, рівень активності Wnt-сигналіngu вищий ніж у мишей із гетерозиготною делецією цього гена.

Окрім вмісту β -катеніну, ми проаналізували і інший важливий компонент регулювання активності канонічного Wnt-каскаду, а саме учасника деградувального комплексу β -катеніну - GSK-3 β . Відомо, що фосфорилування цієї кінази за серином 9 інгібує її активність, а саме здатність фосфорилувати β -катенін, та відправляти його на деградацію. Очікувано, аналіз вмісту фосфорильованої GSK-3 β , узгоджується із попередніми даними (рис. 5.8) і також свідчить про активацію канонічного Wnt-каскаду у серцях мутантних мишей.

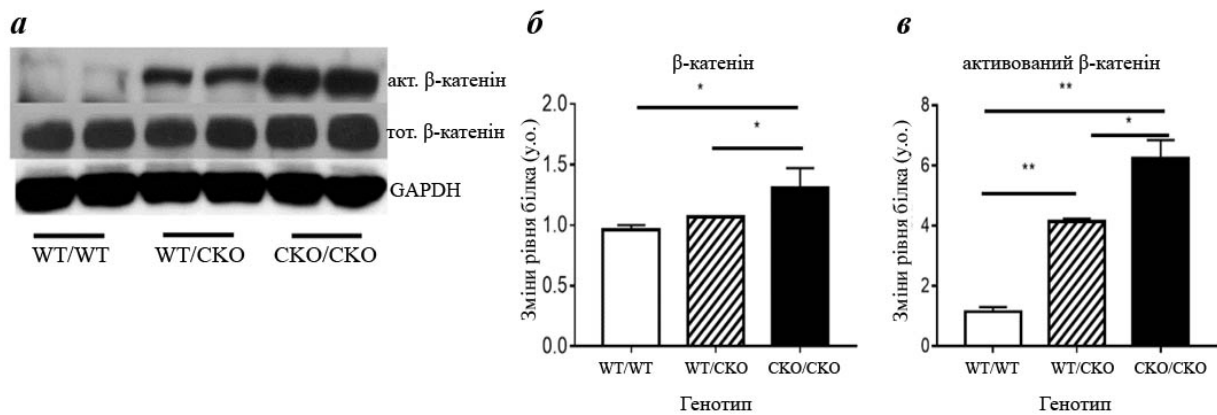


Рис. 5.8. Аналіз вмісту тотального та активного β -катеніну у лізатах сердець дослідних та контрольних мишей. типовий Вестерн блот (**а**), денситометрія експресії тотального білка β -катеніну нормалізована відносно *Gardh* (**б**), денситометрія експресії активного β -катеніну нормалізована відносно тотального β -катеніну (**в**). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом гена *Cttnn1*, CKO/CKO – гомозиготи за нокаутом гена *Cttnn1*. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Так нами було показано, що вміст фосфорильованої GSK-3 β підвищувався у мишей гетерозиготних та гомозиготних за нокаутом гена *Cttna1* у 2 та 2,5 рази порівняно із контролем (рис. 5.9 *a* та *б*). При аналізі вмісту фосфорильованої GSK-3 β знову ж таки спостерігали статистично достовірно вищий рівень активації канонічного Wnt-сигналіngu мишей із гомозиготним нокаутом гена *Cttna1* порівняно із гетерозиготними за нокаутом гена тваринами (рис. 5.9 *a* та *б*).

Вестерн блот аналіз вмісту іншого ключового компоненту деградувального комплексу β -катеніну – Axin1 показав статистично достовірне зменшення його вмісту в обох дослідних групах тварин (рис. 5.9 *a* та *в*). Останнє узгоджується із результатами попередніх досліджень і також свідчить на користь зменшення рівню фосфорилування β -катеніну у серцях мутантних тварин, та підвищення його сигнальної активності.

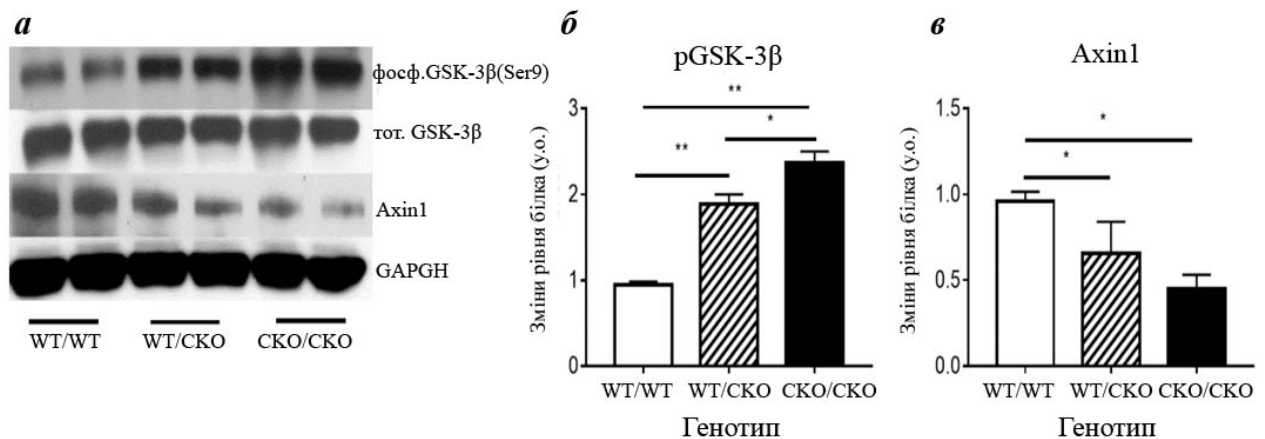


Рис. 5.9. Вестерн блот аналіз вмісту компонентів деградувального комплексу β -катеніну GSK-3 β та Axin1 у лізатах сердець контрольних та дослідних мишей. типовий Вестерн блот (*a*), денситометрія експресії фосфорильованої GSK-3 β нормалізована відносно тотальної GSK-3 β (*б*), денситометрія експресії Axin1 нормалізована відносно Gapdh (*в*). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом гена *Cttna1*, CKO/CKO – гомозиготи за нокаутом гена *Cttna1*. n = 5 у всіх групах. * - p \leq 0,05, * - p \leq 0,01 за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Для більш детальної характеристики активності канонічного Wnt-каскаду у серцях дослідних та контрольних тварин ми проаналізували і зміни експресії генів-мішеней цього каскаду, а саме *c-Myc*, *c-Fos*, *CyclinD1* та власне, самого *Cttnn1*, продукт якого, білок β -катенін, є основним транскрипційним медіатором канонічного Wnt-сигналіngu. У результаті ЗТ-ПЛР аналізу нами було показано підвищення рівнів експресії генів *c-Myc* та *Cttnn1* (рис. 5.10). Підвищення експресії гена *Cttnn1*, було цілком очікуваним і узгоджується із даними Вестерн блот аналізу, де ми також спостерігали підвищення вмісту його білку β -катеніну. Підвищення експресії гена *c-Myc*, з одного боку свідчить про активність канонічного Wnt сигналіngu, а з іншого – про розвиток патологічних перебудов у дорослих серцях за умови делеції досліджуваного гена, оскільки ген *c-Myc* є одним із відтворюваних маркерів гіпертрофії (Підрозділ 4.2.1).

Важливо, також наголосити, що рівень експресії генів *c-Myc* і *Cttnn1* був вищим у тварин із гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* порівняно із гетерозиготами, що свідчить про вищий рівень сигнальної активності канонічного Wnt-каскаду у таких тварин (рис. 5.10). Тож, дані ЗТ-ПЛР аналізу узгоджуються із результатами досліджень вмісту білків.

Окрім того, хочемо зауважити, що ці дані узгоджуються із попередніми результатами аналізу активності канонічного Wnt-сигнального каскаду у новонароджених серцях P1-2. Де ми, також, реєстрували статистично достовірне зростання рівню експресії гена *c-Myc* (Підрозділ 3.2.3). Проте, на відміну від новонароджених сердець, у дорослих, ми не спостерігали статистично достовірного зростання експресії гена *CyclinD1* навіть у тварин із гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* (рис.5.10). Не змінювалась у мутантних тварин і експресія гена *c-Fos*, порівняно із контролем (рис. 5.10). Ймовірно, це пояснюється тим, що обидва гени (*CyclinD1*, *c-Fos*) перебувають під сигнальною регуляцією не лише канонічного Wnt-сигнального каскаду.

Узагальнюючи, можемо зробити висновок, що делеція гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах призводить до активації канонічного Wnt-

сигнального каскаду у серцях дорослих тварин, що свідчить про залучення білка α -Е-катеніну у регуляцію активності цього сигнального каскаду та про супресорну функцію білка α -Е-катеніну.

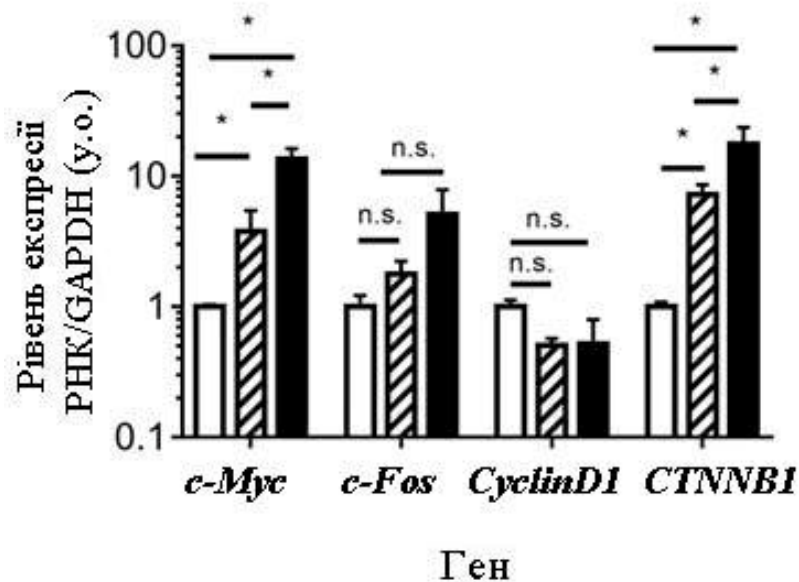


Рис. 5.10. Аналіз в реальному часі експресії генів-мішеней WNT/ β -катенінового сигнального шляху у серцях контрольних та дослідних тварин. Дані експресії мРНК представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. - WT/WT – контрольні миші, - WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом гена *Sttnal*, - CKO/CKO – гомозиготи за нокаутом гена *Sttnal*. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$, n.s. – $p > 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

5.3.2. Аналіз активності HIPPO-сигналінгу у серцях тварин із нокаутом гена *Sttnal*. Як уже було зазначено вище, у своїй роботі ми спостерігали підвищення транскрипційної активності *Yap* у неонатальних кардіоміоцитах (P1-2) із нокаутом гена *Sttnal*. У той час, іншими авторами було показано, що подвійний нокаут генів *Sttnal* та *Sttna3*, також спричиняв підвищення сигнальної активності *Yap* у кардіоміоцитах [137]. Тож ґрунтуючись на власних та літературних даних, ми припустили, що продукт гена *Sttnal* має важливу сигнальну функцію і залучений не лише до регулювання активності канонічного Wnt каскаду а й HIPPO-сигнального

каскаду у кардіоміоцитах неонатального та дорослого серця. Для перевірки свого припущення ми проаналізували зміни рівнів експресії генів-мішеней *Yap*: *Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b* у серцях дорослих тварин з нокаутом *Cttnn1*. Результати ЗТ-ПЛР аналізу свідчать про підвищення транскрипційної активності *Yap* у серцях обох груп дослідних тварин порівняно із контрольними тваринами (рис. 5.11).

Хоча усі проаналізовані нами гени-мішені *Yap* експресувалися на високому рівні у тварин із нокаутом гена *Cttnn1* ми не виявили статистично достовірної різниці рівня їхньої експресії між групами мутантних тварин окрім гена *Il1rl1*. Нагадаємо, що на відміну від цих даних, активація канонічного Wnt-сигналіngu була вищою у тварин із гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* порівняно із мишами із гетерозиготною делецією цього гена (Підрозділ 5.3.1). Ми вже згадували, що при аналізі відмінностей між тваринами з гетерозиготним та гомозиготним нокаутом *Cttnn1*, ми спостерігали статистично достовірне підвищення рівня експресії *Il1rl1* у гомозиготних мишей порівняно із гетерозиготами (рис. 5.11). Варто зауважити, що підвищення рівня *Il1rl1* в плазмі крові хворих із серцевою недостатністю є маркером показника для прогнозу виживаності пацієнтів як «1-year mortality» [167]. Це узгоджується із ранньою летальністю, що була нами зареєстрована при аналізі тривалості життя тварин з гетерозиготним та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1*. Саме тварини із гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* та підвищеним рівнем експресії гена *Il1rl1* гинули раніше ніж миші із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1*.

Отже, нами було продемонстровано підвищення транскрипційної активності *Yap* у серцях дорослих тварин із гомо- та гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах. Нагадаємо, що цей сигнальний каскад залучений до контролювання розміру серця та кардіоміоцитів, а також до гіпертрофічного ремоделювання і розвитку серцевої недостатності [37].

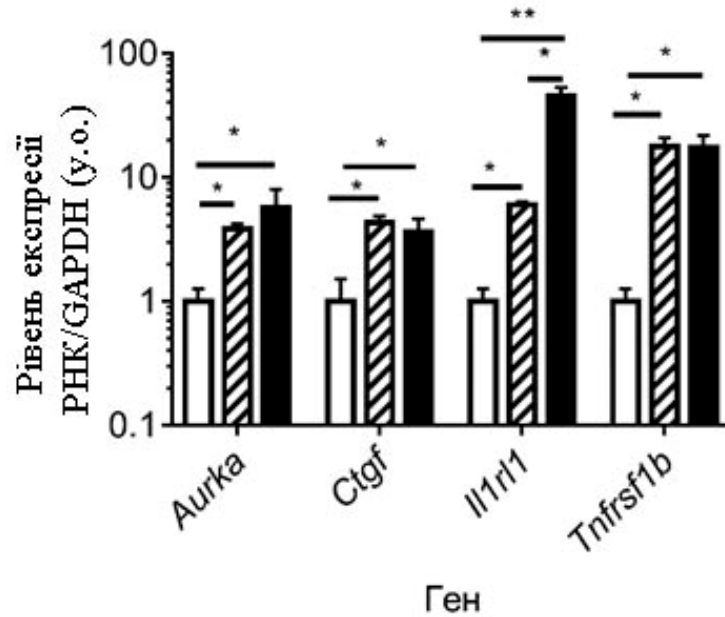


Рис. 5.11. Аналіз експресії генів-мішеней Yap (*Aurka*, *Ctgf*, *Il1r1*, *Tnfrsf1b*) у серцях контрольних та дослідних мишей: Дані експресії мРНК представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. - WT/WT – контрольні миші, - WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом гена *Cttna1*, - CKO/CKO – гомозиготи за нокаутом гена *Cttna1*. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Загалом нами було встановлено, продукт гена *Cttna1*, білок α -Е-катеніну має важливу супресорну функцію у регуляції транскрипційної активності Yap і HIPPO-сигнального каскаду у кардіоміоцитах, що вочевидь призводить і до збільшення маси серця і до розвитку серцевої недостатності.

5.4 Вивчення впливу гетеро- та гомозиготного нокауту гена *Cttna1* на активність гіпертрофічних сигнальних каскадів у серцях мишей

У своїй роботі ми показали розвиток серцевої недостатності у тварин із нокаутом гена *Cttna1* у ембріональних кардіоміоцитах. Цікаво, що описаний

нами фенотип супроводжувався і порушенням активності таких важливих сигналінгів, для функціонування та розвитку серця, як Wnt/ β -катеніновий та Hippo-каскади. Окрім того, раніше нами було показано пригнічення cAMP/РКА-сигнального шляху (Підрозділ 5.2), у мутантних серцях, що також є типовим для серцевої недостатності з одного боку, а з іншого - вказує на більш масивні зміни на молекулярно-біологічному та генетичному рівнях. Але, до формування серцевої недостатності залучені не лише зазначені сигнальні каскади, бо, як відомо, серцева недостатність – складна і комплексна патологія [34,132,184]. Тож ми вирішили проаналізувати активність кількох сигнальних каскадів, участь яких у розвитку патології міокарду є добре відомою, а саме PI3K/Akt- та Mek1/Erk1/2- сигнальних шляхів.

При аналізі активності основних медіаторів PI3K/Akt- та Mek1/Erk1/2- сигналінгів ми виявили підвищення вмісту тотальної АКТ у лізатах сердець мутантних тварин обох груп у двічі (рис. 5.12 *a* та *b*). Окрім того, змінювався і вміст фосфорильованих форм АКТ а саме, у лізатах сердець із гомо – та гетерозиготним нокаутом вміст АКТ фосфорильованої за серином 473 також суттєво підвищувався (рис. 5.12 *a* та *b*). Тоді, як вміст АКТ фосфорильованою за треоніном 308 був нижчим у лізатах сердець обох дослідних груп тварин (рис. 5.12 *a* та *c*).

Загалом, результати Вестерн блот аналізу свідчать про підвищення сигнальної активності PI3K/Akt-сигналіngu у серцях тварин із нокаутом гена *Cttna1* [263]. Грунтуючись на наших та літературних даних, можемо зазначити, що активація АКТ, у мутантних серцях відбувається, ймовірно, через mTORC2-комплекс. Як уже зазначалося вище, патології міокарду, у тому числі і серцева недостатність, досить складні і розвиток їхній координується кількома сигнальними шляхами, і один із таких – це Mek1/Erk1/2 сигнальний каскад. Одразу ж зазначимо, що Mek1/Erk1/2 сигнальний каскад реагує на вплив цілої низки патологічних факторів [15]. Проте, як показано авторами, негативний вплив на функціонування серця має і активація і пригнічення його. До розвитку серцевої недостатності та гіпертрофії призводить і збільшення і зменшення

вмісту фосфорильованих Erk1/2, головного медіатора Mek1/Erk1/2 каскаду [87,29]. При проведенні Вестрен блот аналізу ми спостерігали і зменшення вмісту фосфорильованих Erk1/2 у лізатах сердець тварин гетерозиготних за нокаутом гена *Cttna1*; і навпаки у тварин - гомозигот за нокаутом *Cttna1*, спостерігали статистично достовірне підвищення вмісту фосфорильованих Erk1/2 (рис 5.13).

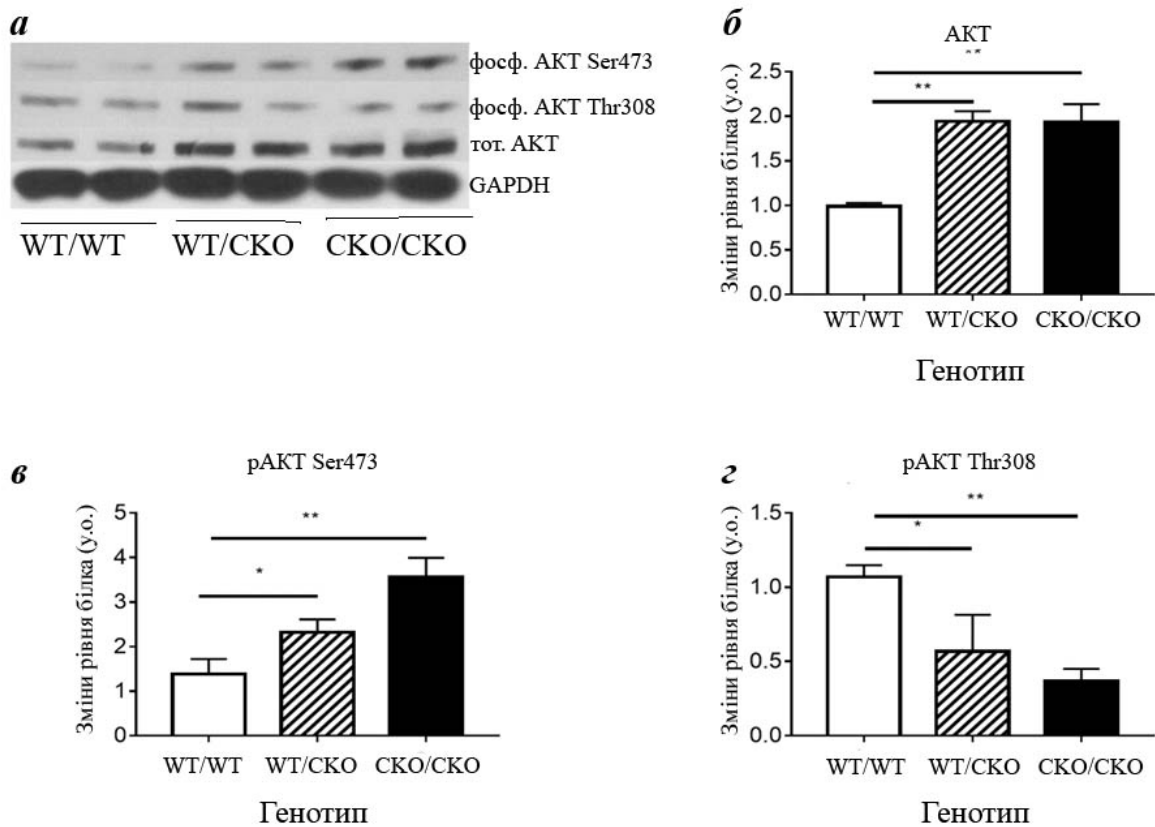


Рис. 5.12. Вестерн-блот аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої Akt у лізатах сердець контрольних та дослідних мишей: типовий Вестерн блот (**а**), денситометрія експресії тотальної АКТ нормалізована відносно Gardh (**б**), денситометрія вмісту АКТ фосфорильованої за Сер 473 нормалізована відносно тотальної АКТ (**в**), денситометрія вмісту АКТ фосфорильованої за Тре 308 нормалізована відносно тотальної АКТ (**г**). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні тварини, WT/CKO – гетерозиготи за нокаутом *Cttna1*, CKO/CKO – гомозиготи за нокаутом *Cttna1*. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Загалом, проведені нами дослідження активності сигнальних каскадів, що беруть участь у формуванні та розвитку серцевої недостатності (PI3K/Akt та Mek1/Erk1/2) свідчать про те, що делеція гена *Cttna1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє розвиток серцевої недостатності у дорослих тварин віком 10 місяців. Окрім того, можемо зробити висновок що нокаут досліджуваного нами гена спричиняє низку молекулярно-біологічних та генетичних патернів змін у серцях мутантних тварин.

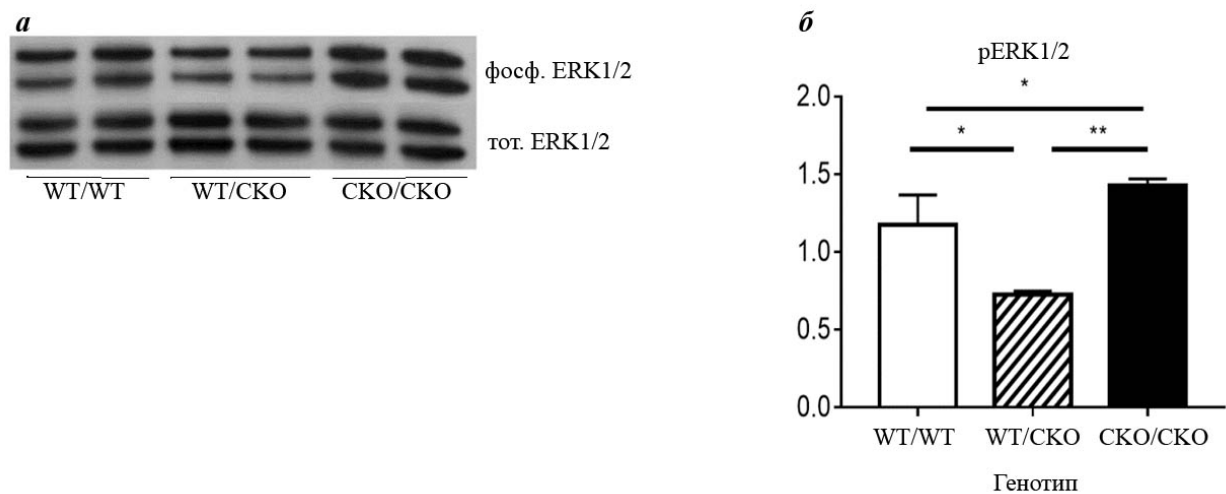


Рис. 5.13. Вестерн-блот аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої Erk1/2 у лізатах сердець контрольних та дослідних мишей. типовий Вестерн блот (а), денситометрія експресії фосфорильованих Erk1/2 нормалізовані відносно тотальних Erk1/2 (б). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. n = 5 у всіх групах. * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

5.5 Дослідження метаболізму ліпідів у серцях тварин із делецією гена *Cttna1*

Отже, при проведенні молекулярно-біологічних досліджень нами було виявлено типові для серцевої недостатності порушення активності кількох

сигнальних каскадів. Варто зауважити, що наші результати, не лише підтверджують розвиток серцевої недостатності у тварин із нокаутом гена нокаутом *Cttna1* у ембріональних кардіоміоцитах, а й вказують на масивніші порушення на молекулярно-біологічному та генетичному рівнях у серцях таких тварин. Бо, порушення активності PI3K/Akt-, канонічного Wnt, Mek1/Erk1/2- та cAMP/PKA сигнальних систем, можуть спричиняти порушення метаболізму ліпідів у серцях мутантних тварин. Відомо, що основний транскрипційний фактор, що регулює експресію генів катаболізму нейтральних жирів - PPAR α , сам перебуває під сигнальною регуляцією PI3K/Akt-каскаду [28,39]. Окрім того, активність PPAR α регулюється і канонічним Wnt-сигналінгом, а саме підвищення активності останнього спричиняє пригнічення PPAR α через один із генів мішеней β -катеніну – ген *c-Myc* [5], підвищення експресії якого ми спостерігали у своїй роботі. Окрім того, у серцях мутантних мишей нами було показано і порушення активності PKA, яка не лише залучена до фосфорилування саркомерних білків а й регулює каталітичну активність HSL [61]. Тож, нам вдалось логічним, проаналізувати активність основних сигнальних каскадів залучених до метаболізму нейтральних ліпідів у лізатах сердець тварин дослідних та контрольної груп.

5.5.1 Аналіз окислення ліпідів у серцях дорослих мишей за умови нокауту гена *Cttna1*. Відомо, що накопичення ліпідів у клітинах серця є однією із супутніх ознак порушення метаболізму ліпідів у серці. З огляду на порушення активності сигнальних каскадів, що можуть впливати і на метаболізм ліпідів у серці, ми вирішили дослідити чи відбувається накопичення ліпідів у серцях тварин із делецією гена *Cttna1*. Для цього провели специфічне забарвлення криозрізів тканини міокарду дослідних та контрольних жиривим червоним O. У результаті нами було зареєстровано накопичення нейтральних жирів у кардіоміоцитах мишей як із гомо- так і із гетерозиготним нокаутом гена *Cttna1* про що свідчить позитивне забарвлення (рис. 5.14).

Для розуміння молекулярних механізмів порушення метаболізму ліпідів, за умови делеції гена *Cttnal*, ми провели дослідження активності основних регуляторів окислення жирів, а саме PPAR α і HSL.

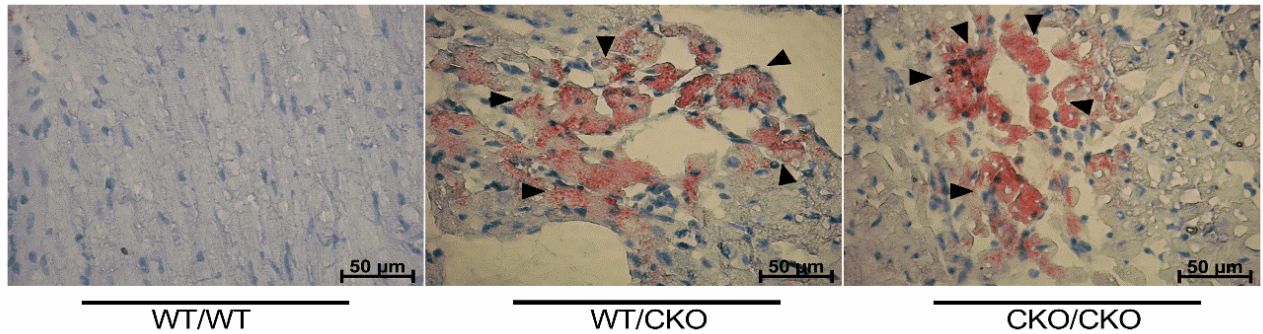


Рис. 5.14. Аналіз накопичення нейтральних ліпідів у серцях контрольних та дослідних тварин за допомогою забарвлення кризрізів тканини міокарду жировим червоним О. Збільшення 400х, лінійка 50 мкм. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи

У результаті проведеного Вестрен блот аналізу нам вдалося виявити зниження вмісту PPAR α у лізатах сердець обох дослідних груп тварин вдвічі порівняно із контрольними зразками (рис. 5.15). Останнє, підтверджує порушення метаболізму нейтральних ліпідів у серцях мутантних тварин, а саме вказує на пригнічення катаболізму ліпідів та узгоджується із результатами гістологічного аналізу (рис. 5.14).

Як згадували вище, у своїй роботі ми спостерігали пригнічення активності PKA у лізатах сердець тварин із гомозиготним та гетерозиготним нокаутом гена *Cttnal*. Зазначена кіназа, поміж іншого, регулює і каталітичну активність гормон чутливої ліпази (HSL). Цей фермент, як відомо, гідролізує триацилгліцериди і діацилгліцериди [170], а також лімітує швидкість гідролізу нейтральних ліпідів. Тож ми припустили, що у серцях тварин із нокаутом досліджуваного нами гена каталітична активність HSL, також може бути порушеною. Дійсно, при проведенні Вестрен блот аналізу, ми виявили статистично достовірне інгібування активності HSL. І хоча вміст тотального

білка HSL статистично достовірно зменшувався лише у лізатах сердець тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnal* (рис. 5.16 *a* та *б*), вміст фосфорильованої HSL за Сер 563 та Сер 565 був статистично достовірно нижчим у тварин як із гомозиготним так і з гетерозиготним нокаутом гена *Cttnal* (рис. 5.16 *a*, *в* і *г*). Тож, отримані нами дані свідчать про пригнічення активності HSL, та пригнічення гідролізу триацилгліцеридів і діацилгліцеридів [170].

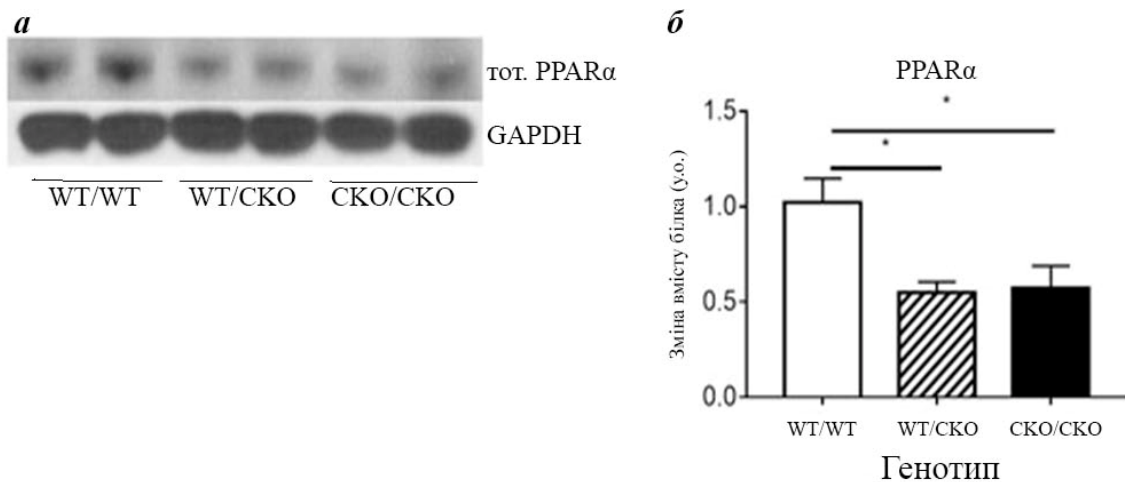


Рис. 5.15. Вестерн-блот аналіз вмісту PPAR α у лізатах сердець дослідних та контрольних тварин. типовий Вестерн блот (*a*), денситометрія вмісту фосфорильованої PPAR α нормалізована відносно Gapdh (*б*). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Наші дані демонструють не лише розвиток серцевої недостатності у серцях тварин із делецією гена *Cttnal* а й порушення метаболізму ліпідів. Однак, накопичення нейтральних ліпідів та порушення гідролізу ліпідів, що ми виявили при проведенні дослідження, не є поширеним, або ж типовим, у пацієнтів із серцевою недостатністю. Така симптоматика є більш типовою для пацієнтів із метаболічним синдромом або діабетом [218,155], що обтяжені серцевою недостатністю. Ймовірно, у нашій моделі генетичного нокауту, саме

делеція гена *Ctnn1* специфічно спричиняє порушення активності ферментів залучених до катаболізму ліпідів, завдяки порушенню супресорної функції продукту цього гена.

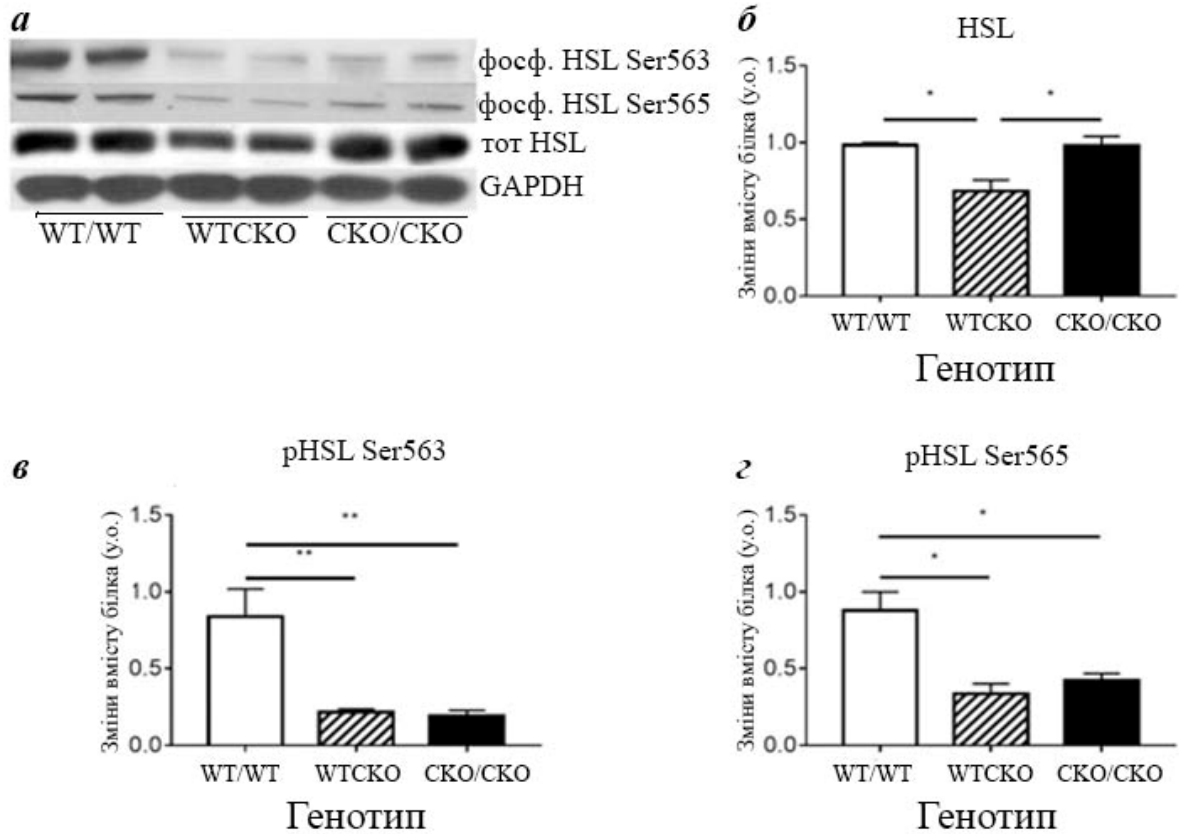


Рис. 5.16. Вестерн блот аналіз активності гормончутливої ліпази (HSL) у лізатах сердець контрольних та дослідних тварин. типовий Вестерн блот (**а**), денситометрія вмісту тотальної HSL нормалізована відносно *Gapdh* (**б**), денситометрія вмісту фосфорильованої за Сер 563 HSL нормалізована відносно тотальної HSL (**в**), денситометрія вмісту фосфорильованої за Сер 565 HSL нормалізована відносно тотальної HSL (**г**). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

5.5.2 Дослідження активності основних регуляторів метаболізму нейтральних ліпідів у серцях тварин за умови нокауту гена *Ctnn1*. Як уже було зазначено вище, при проведенні дослідження нами були показані не типові

для серцевої недостатності ознаки - накопичення ліпідів та пригнічення їхнього метаболізму. Тож, виникало питання, чи змінюється активність основних регуляторів метаболізму ліпідів у серцях дослідних тварин. Отже, далі ми вирішили проаналізувати активність кінрази, що активується цАМФ (АМРК) та ацетил-СоА-карбоксилази (АСС) у серцях мишей із гетерозиготним та гомозиготним нокаутом гена *Cttna1* порівняно із контролем.

У результаті, за допомогою Вестерн блоту, ми спостерігали підвищення вмісту тотального білка АМРК у лізатах сердець тварин обох дослідних груп (рис. 5.17 *a* і *б*).

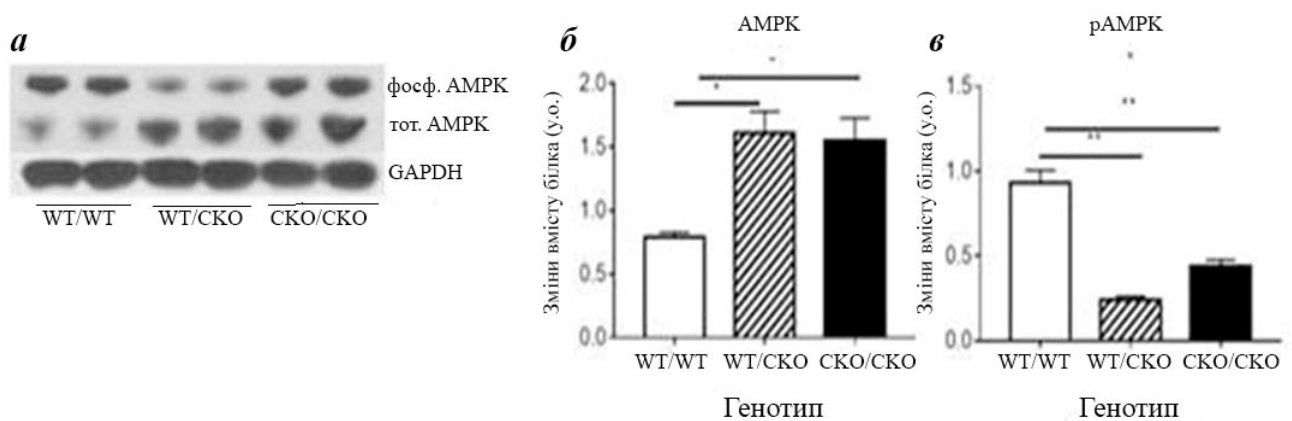


Рис. 5.17. Вестерн блот аналіз змін вмісту тотальної та фосфорильованої АМРК у лізатах сердець контрольних та дослідних тварин. типовий Вестерн блот (*a*), денситометрія вмісту тотальної АМРК нормалізована відносно *Gapdh* (*б*), денситометрія вмісту фосфорильованої АМРК нормалізована відносно тотальної АМРК (*в*). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Проте, вміст фосфорильованої форми АМРК, навпаки, статистично достовірно знижувався у тварин з нокаутом гена *Cttna1*, у обох дослідних груп тварин (рис. 5.17 *a* та *в*). Що свідчить про пригнічення активності АМРК у лізатах сердець мутантних тварин. Цікаво також, що це пригнічення було статистично достовірно вищим у лізатах сердець тварин із гетерозиготним

нокаутом гена *Cttnal* порівняно із гомозиготами, згідно даних Вестерн блот аналізу (рис. 5.17 **a** та **в**).

Пригнічення активності АМРК у серцях дослідних мишей узгоджується і з результатами аналізу вмісту її субстрату АСС [188]. Дійсно, вміст фосфорильованої АСС був статистично достовірно нижчим у тварин як з гомозиготним так і з гетерозиготним нокаутом гена *Cttnal* порівняно із контрольними мишами (рис. 5.18).

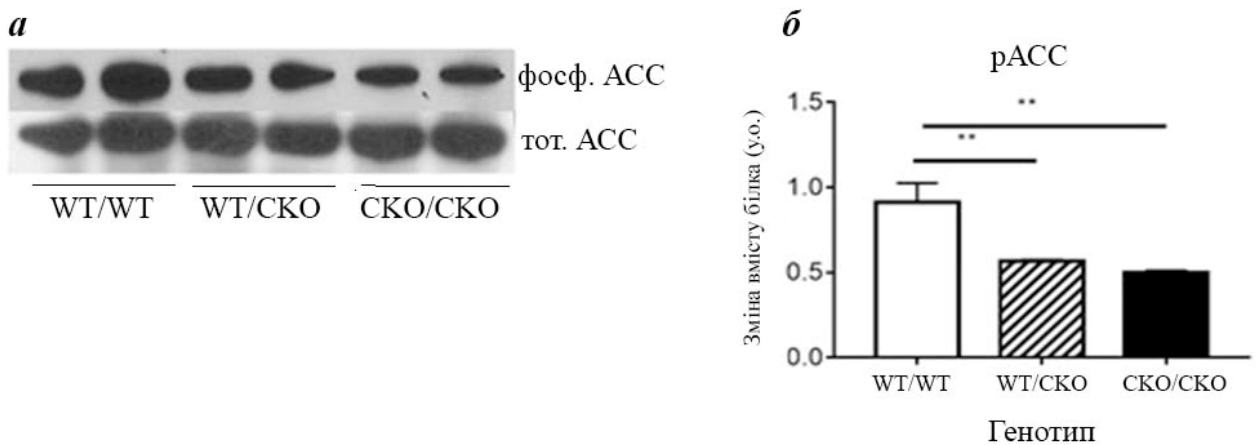


Рис. 5.18. Вестерн блот аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої АСС у лізатах сердець тварин контрольної та дослідних груп. типовий Вестерн блот (**a**), денситометрія експресії фосфорильованої АСС нормалізована відносно тотальної АСС (**б**). Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ за допомогою ANOVA із post hoc тестом Тукея

Узагальнюючи дані викладені у розділі, можемо сказати, що і гомозиготна і гетерозиготна делеція гена *Cttnal* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє критичні порушення метаболізму ліпідів, а саме інгібування β -окислення жирних кислот, та як наслідок – накопичення ліпідів у кардіоміоцитах дорослого серця.

Резюме

1) Вперше виявлено, що гомозиготний та гетерозиготний нокаут гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах (E10,5) спричиняє скорочення життя дослідних тварин удвічі у наслідок розвитку серцевої недостатності.

2) З'ясовано, що делеція гена *Cttnn1* призводить до погіршення кардіогемодинамічних показників, що свідчить про серцеву недостатність та нездатність таких клітин до розслаблення після навантаження.

3) Вперше показано, що продукт гена *Cttnn1*, α -Е-катенін пригнічує транскрипційну активність канонічного Wnt-сигналіngu у серці. І гомозиготний і гетерозиготний нокаут гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах (E10,5) спричиняє підвищення активності Wnt/ β -катенінового сигналіngu, про що свідчить підвищення експресії деяких генів-мішеней (*Cttnnb1* та *c-Myc*), підвищення вмісту активованого β -катеніну та вмісту інгібованої GSK-3 β , і зменшення вмісту Axin-1.

4) Показано, що α -Е-катенін залучено до контролювання активності HIPPO-сигнального каскаду, а саме α -Е-катенін пригнічує активність його основного медіатора - YAP у серці, про що свідчить зростання рівнів експресії генів *Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1* та *Tnfrsf1b*.

5) Вперше показано, що нокаут гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах призводить до порушення активності сигнальних систем (PI3K/Akt-, MEK1-Erk1/2-сигналінгів та PKA) що є типовим для серцевої недостатності.

6) Вперше продемонстровано, що і повна і часткова делеція гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах призводить до накопичення ліпідів у кардіоміоцитах у наслідок специфічних порушень метаболізму (зниження вмісту PPAR α , інгібування AMPK та HSL та активацію ACC).

7) Загалом нами показано, що α -Е-катенін є супресором сигнальної функції ключових медіаторів канонічного Wnt та Hippo-сигнальних каскадів - β -катеніну та YAP. І повний і частковий нокаут гена *Cttnn1* викликають

специфічні патерни молекулярно-генетичних та молекулярно-біологічних порушень, що призводять до серцевої недостатності і летальності.

Основні положення даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:

- 1) В. В. Балацький, І. Акименко, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень**, Л. Л. Лукаш. Альфа-Е-катенін у гістологічних перебудовах міокарда при старінні// Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 18. – С. 219-222
- 2) В. В. Балацький, О. Л. Пальчевська, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень**. 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.
- 3) В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень**. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє зменшення експресії основного компонента десмосом γ -катеніну//Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – Т. 21. – С. 293-296.
- 4) В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень**. 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.
- 5) В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень**. Активність гіпертрофічних сигнальних шляхів у серці регулюється α -Е-катеніном// Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки – 2017. – Т. 20. (№ 2). – С. 42-48.
- 6) В. Балацький, Л. Мацевич, **О. Півень** 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.
- 7) V V Balatskyi, LL Macewicz, AM Gan, SV Goncharov, P Pawelec, GV Portnichenko, TYu Lapikova-Bryginska, VO Navrulin, VE Dosenko, A Olichwier, P

Dobrzyn, **OO Piven**. 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

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У результаті проведення досліджень нами було показано, що гени адгеринового комплексу: *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Ctnna1* є критичними у кардіогенезі, формуванні постнатального серця та його функціонуванні. Їхні продукти, N-кадгерин, β -катенін та α -Е-катенін приймають участь не лише у утворенні та підтриманні міжклітинної адгезії у серці ембріонів і дорослих тварин, а й залучені до регулювання важливих сигнальних каскадів, що контролюють ріст, розмір, поділ клітин та навіть метаболізм. Тож, порушення або ж зміна експресії цих генів спричиняють молекулярно-генетичні та біологічні патерни змін, що можуть призводити до порушень зазначених процесів та летальності.

Так, нами вперше було показано, що гомозиготний нокаут гена *Cdh2* у ембріональних кардіоміоцитах (E10,5) спричиняє порушення формування тканини міокарду, затримку розвитку ембріону і, як наслідок, ембріональну летальність (E10,5 - E12,5). Варто нагадати, що ген *Cdh2* кодує трансмембранний білок - N-кадгерин, і у кардіоміоцитах АК формується лише за умови його експресії. Тож, отримані нами дані, свідчать про те, що правильне формування структури та врегульованість АК є принципово важливою умовою для розвитку ембріонального серця у ссавців. Інші структурні компоненти інтеркалярних дисків, такі як ПЗ та десмосоми не в змозі забезпечити морфогенез серця при нокауті гена *Cdh2* та відсутності білка N-кадгерину у складі області композита. Наші дані узгоджуються із кількома експериментальними роботами де функція гена *Cdh2* досліджувалась у ранньому ембріогенезі та дорослому серці із застосуванням відповідних моделей конститутивного та умовного нокаутів гена. Так було показано, що повна втрата функції гена *Cdh2* в усіх тканинах ембріону спричиняє чисельні вади розвитку ембріонів: сомітів, структур голови та серцево-судинної системи, кардіоміоцити у мутантних ембріонів були дезінтегровані [202]. Такі ембріони

гинули до 10 доби ембріонального розвитку. Тож, ці дослідження продемонстрували критичне значення АК і його основного компоненту - N-кадгерину та міжклітинної адгезії у ембріональному розвитку. Проте, наша робота, дає більш точну відповідь на питання – а яка ж функція гена *Cdh2* у кардіогенезі? А саме, демонструє, що у кардіогенезі, адгезивна функція гена *Cdh2* є домінуючою.

Оскільки порушення експресії гена *Cdh2* у ранньому ембріогенезі і кардіогенезі є летальним, то функцію цього гена у дорослому серці вивчали із застосуванням іншого методологічного підходу - його умовного нокауту, моделі що дозволяла «вирізати» перший екзон цього гена вже у серці дорослих тварин. У результаті, було показано, що гомозиготний нокаут гена *Cdh2* у серці дорослих мишей спричиняв дезінтеграцію ІД, зменшення експресії основних десмосомальних білків (плакоглобіну та десмоплакіну), порушення структури ПЗ, а саме зменшення експресії *Cx43*, що призводило до порушення генерації та передачі імпульсу [126]. Такі тварини гинули через два місяці після нокауту досліджуваного гена у результаті яскраво вираженої тахікардії шлуночка. Більш того, навіть гетерозиготний нокаут гена *Cdh2* у серці дорослих тварин спричиняв зниження експресії *Cx43*, що призводило до порушення генерації та передачі електричного імпульсу, і як наслідок – спонтанної аритмії [135].

Ці спостереження дали змогу запропонувати авторам один із потенційних генетичних механізмів розвитку аритмії у наслідок порушення експресії гена *Cdh2*. З іншого ж боку, результати досліджень вказують на більш комплексну функцію гена *Cdh2* у серці дорослих тварин. Де, на відміну від ембріонального міокарду, функція *Cdh2* не обмежується підтриманням міжклітинної адгезії. Дійсно, ектопічна експресія іншого класичного кадгерину у химерних мишей, а саме, E-кадгерину, забезпечувала розвиток ембріону і серця, що вказує на функціональну компенсацію між білками N- та E-кадгерину. Проте, у дорослих мишей, що експресували у кардіоміоцитах епітеліальний E-кадгерин, спостерігали розвиток дилатаційної кардіомопатії [146,63]. Тож, ектопічна експресія E-кадгерину у ІД не здатна забезпечити нормальне функціонування

міокарду. Це вказує на виняткову роль N-кадгерину, ймовірно, не лише за рахунок утворення міжклітинних контактів а й за рахунок взаємодії з іншими цитоплазматичними партнерами, що мають і адгезивну і сигнально-регуляторну функцію. Вочевидь, гемодинамічні та механічні навантаження, що отримує серце одразу після народження, потребує чіткої організації зони композита, ефективної взаємодії між усіма структурними комплексами ІД та балансу між сигнальною і адгезивною функціями білків ІД.

Варто також зауважити, що дані отримані із модельними тваринами, і запропонований молекулярно-генетичний механізм розвитку аритмії в наслідок порушення експресії гена *Cdh2*, нещодавно були підтверджені у дослідженнях пацієнтів із сімейною аритмогенною кардіоміопатією правого шлуночку (ARVC), де було ідентифіковано нову мутацію гена *CDH2* (с.686A>C, р.Gln229Pro) [158]. З одного боку це демонструє доцільність застосування нокаутних та трансгенних тварин при вивченні функції окремих генів, а з іншого боку дає нам змогу рекомендувати ген *CDH2* клініцистам у якості додаткового маркера при проведенні діагностики та з'ясування причин хвороби серця.

Однак, повертаючись до нашої роботи, хочемо нагадати, що у серцях ембріонів із нокаутом гена *Cdh2* ми спостерігали і зменшення експресії і мембранної локалізації його цитоплазматичного партнера – β -катеніну. Оскільки, цей білок є не лише одним із компонентів АК а й головним транскрипційним ко-фактором канонічного Wnt-сигналінгу, можливо нокаут гена *Cdh2* міг би позначитись і на його сигнальній функції. Проте через летальність ембріонів це перевірити було б важко. Хочемо нагадати, що канонічний Wnt-сигналінг є одним із критичних регуляторів росту та поділу клітин, диференціювання стовбурових клітин і залучений до ембріогенезу, регенерації та канцерогенезу [192,190]. І згідно останніх літературних даних, модулювати активність канонічного Wnt сигналінгу можуть і інші білки АК, а саме α -E-катенін та γ -катенін (Огляд літератури, підрозділ 1.3). Тож, логічно було припустити, що і нокаут генів *Ctnnb1* та *Cttnn1*, які кодують білки-

цитоплазматичні партнери N-кадгерину (β -катенін та α -Е-катенін відповідно) також може призводити до порушень розвитку серця ембріонів чи навіть летальності.

Проте, застосувавши аналогічний підхід до вивчення функції цих генів (*Ctnnb1* та *Cttnn1*), у кардіогенезі, а саме модель генетичного нокауту у ембріональних кардіомиоцитах, після закладки першого та другого серцевих полів (після E10,5), ми не спостерігали виражених морфологічних вад як ембріону так і серця. Більше того, делеція генів *Ctnnb1* та *Cttnn1* супроводжувалась підвищенням експресії та локалізації у АК їхніх гомологів: білків γ -катеніну та α -Т-катеніну відповідно. Також у своїй роботі, на досліджуваних термінах ембріогенезу, ми не спостерігали і порушень експресії основного серцевого кадгерину - N-кадгерину, у мутантних серцях. Що вказує на формування, у таких мутантних ембріонів, АК, та підтримки належним чином міжклітинної комунікації.

Проте, при аналізі ембріонів з нокаутом гена *Ctnnb1* на пізніх термінах гестації та новонароджених мишей (P1-3) ми виявили, що кількість мутантних ембріонів (E14,5) була меншою ніж очікувана, згідно розподілу алелів за Менделем. Відповідно, і кількість новонароджених тварин була нижчою від очікуваної, більш того, такі тварини, якщо і народжувались, то гинули між P1 – P3. Той факт, що летальність ембріонів і новонароджених мишей із нокаутом гена *Ctnnb1* не супроводжувалась морфологічними вадами розвитку і ембріонів і серця, свідчить на користь того, що причиною летальності, ймовірніше за все є порушення активності канонічного Wnt-сигналіngu.

Дійсно, у своїй роботі ми спостерігали порушення активності цього каскаду у мутантних ембріональних (E12,5 та E14,5) та новонароджених (P1-2) і дорослих серцях. Про що свідчать дослідження зміни експресії генів (*TCF4*, *Axin2*, *c-Fos* і *CyclinD1*) та Вестерн блот аналіз вмісту фосфорильованої форми GSK3 α/β , і низки скефолдних білків (APC та *Axin1*) у серцях дорослих тварин.

Як детально було розглянуто у Огляді літератури, канонічний Wnt - сигналінг та β -катенін, зокрема, залучені до формування ембріонального серця

(рис. 6.1). Транскрипційна активність цього каскаду має принципове значення для диференціювання попередників мезодерми, а також для проліферації кардіальних попередників у області серцевого серпа для формування серцевої трубки (стадії розвитку E7,5 – E8,5). І навпаки, активність, канонічного Wnt каскаду має бути пригнічена для успішної специфікації кардіальної мезодерми (E6, 5 – E7,5) і пізніше для розширення першого та другого серцевих полів (рис. 6.1). Більш того, згідно існуючій уяві, активність канонічного Wnt пригнічується у ембріональному серці на стадіях розвитку E8,5 – E14,5 і у серці новонароджених та дорослих тварин і перебуває на базальному рівні [211].

У своїй роботі, при аналізі активності канонічного Wnt-сигналіngu у контрольних тварин, ми дійсно спостерігали пригнічення активності цього каскаду у новонароджених серцях порівняно із ембріональним серцем, що узгоджується із літературними даними. Проте, нами було показано, що у контрольних тварин, відбувається активація канонічного Wnt-сигналіngu та, відповідно, підвищення експресії його генів мішеней (*TCF4*, *Axin2*, *c-Fos*) на пізніх термінах кардіогенезу, а саме на 14,5 добу розвитку. Тож, наші дані демонструють, що у кардіогенезі канонічний Wnt-сигналінг, вочевидь, активується не лише для того щоб відбулась ініціація кардіальної мезодерми та експансія кардіальних клітин [192], а й для того, щоб на більш пізніх стадіях кардіогенезу (E14,5), вже сформоване серце ембріону росло, тобто відбувалась проліферація вже диференційованих кардіоміоцитів. Більш того, важливість цієї активації і канонічного Wnt-сигнального каскаду як такого у пізньому ембріогенезі серця, підтверджують наші дані із дослідження ембріонів із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* продуктом якого є β -катенін. Нагадаємо, що у своїй роботі ми спостерігали летальність мутантних ембріонів на пізніх термінах гестації та новонароджених тварин (P1 – 3), що, однак не супроводжувалось вираженими морфологічними вадами ембріонів та їхніх сердець. Окрім того, у таких серцях ми спостерігали зниження вмісту фосфорильованої GSK3 β / α порівняно із контролем, що свідчить про

пригнічення транскрипційної активності канонічного Wnt каскаду у цей період кардіогенезу.

Цікаво, що навіть гетерозиготний нокаут гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняв порушення канонічного Wnt-каскаду, а саме підвищення його активності як у серцях ембріонів (E14,5) так і у новонароджених тварин (P1- 2) про що свідчить підвищення експресії генів-мішеней цього каскаду. Аналіз вмісту фосфорильованої форми GSK3 β / α у новонароджених серцях із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* також свідчить про підвищення сигнальної активності канонічного Wnt-каскаду порівняно із контрольними серцями та серцями із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*. На нашу думку, підвищення активності Wnt-сигнального каскаду у серцях із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* є наслідком модуляції цього каскаду за участі гомолога β -катеніну - білка γ -катеніну. Можлива участь останнього, у регулюванні сигнальної активності Wnt, детально висвітлена у Огляді літератури, проте нагадаємо, що наявні літературні дані свідчать про здатність γ -катеніну зв'язуватись із білками деградувального комплексу (APC і Axin) [123,210]; γ -катенін здатен активувати β -катенін / TCF-репортерні конструкції [149,221,256]; γ -катенін здатен зв'язуватись з білками LEF/TCF, утворюючи потрібний комплекс із ДНК [277,276]; γ -катенін здатен регулювати експресію генів незалежно від β -катеніну [229]. Проте особливості γ -катенін-залежної експресії генів-мішеней канонічного Wnt-сигналіну у кардіогенезі, як власне і сигнальна функція γ -катеніну у процесі формування серця - не відомі.

Наші дані, а саме підвищення експресії γ -катеніну у мутантних новонароджених тварин, як із гомо – так і гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* свідчать на користь нашого припущення. Вочевидь, γ -катенін компенсує відсутність β -катеніну у структурі ІД, оскільки ми не виявили морфологічних порушень розвитку ембріону та тканини серця. Однак, нами було показано, що у новонародженому серці γ -катенін здатен утворювати комплекс з LEF/TCF та ДНК і регулювати експресію генів *c-Myc* та *Axin*. Більше того, за умови гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1* та дифіциту білка β -катеніну сигнальна

функція γ -катеніну зростала. І хоча нам і вдалося показати участь γ -катеніну у регулюванні активності канонічного Wnt-сигналіngu, та те, що функція ця ґрунтується на конкуренції білка із β -катеніном за зв'язування із LEF/TCF та ДНК, всеодно, наші результати лише відкривають ще одні цікавий і важливий напрямок досліджень, а саме вивчення «не-канонічного» транскрипційного кофактору канонічного Wnt-сигналіngu - γ -катеніну, ідентифікація його мішеней та біологічного контексту у кардіогенезі.

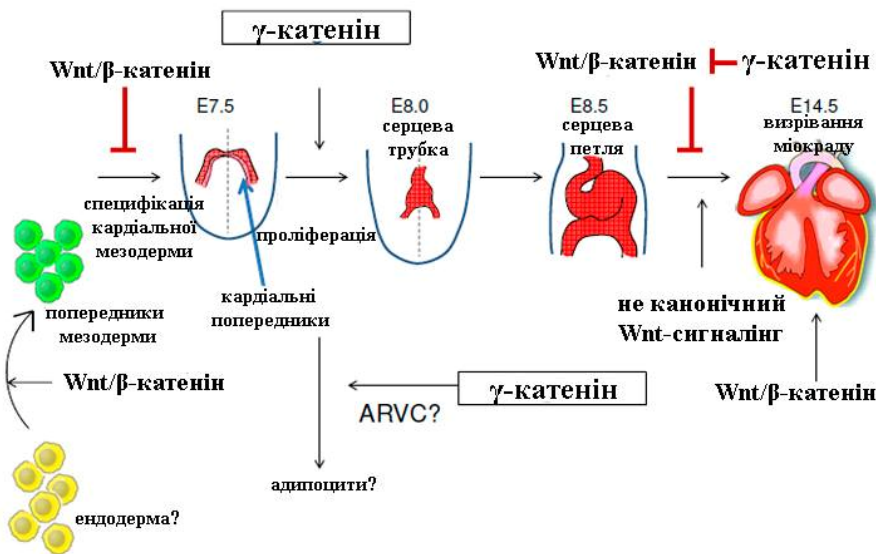


Рис. 6.1. Функція канонічного Wnt сигналіngu у регулюванні кардіогенезу ссавців. Wnt/ β -катеніновий сигнальний каскад перебуває у активованому стані під час відтворення популяції стовбурових клітин та специфікації мезендодерми. Пізніше, пригнічення активності канонічного Wnt каскаду є необхідною умовою для специфікації попередників кардіальної мезодерми; має інгібіторний ефект у FHF (перше серцеве поле) але індукує проліферацію популяції клітин SHF (друге серцеве поле). Проліферація ранніх міоцитів шлуночків відбувається за умови активованого стану Wnt/ β -катенінового сигналіngu. Вочевидь, γ -катенін також здатен регулювати ці процеси за рахунок функціональної компенсації та /або конкуренції із β -катеніном за мішені зв'язування

Оскільки, наші дані наразі свідчать про те, що сигнальної функції γ -катеніну не достатньо для виживаності тварин із нокаутом гена *Ctnnb1* у

ембріональних кардіоміоцитах. Ми припускаємо, що за умови делеції гена *Ctnnb1*, γ -катенін приймає участь у регулюванні канонічного Wnt-сигналіngu у кардіогенезі, а саме підтримує проліферацію диференційованих кардіоміоцитів та розширення першого та другого серцевих полів (рис. 6.1) [192], оскільки серце проходило ці етапи формування та розвивалось до морфологічно нормального органу у ембріонів більш пізнього терміну гестації та у новонароджених тварин. Проте тварини із гомозиготним нокаутом *Ctnnb1* всеодно гинули: E14,5 – P1-2.

Однак, це питання потребує окремого дослідження із застосуванням сучасних методів: ChIP-qPCR та ChIP-NGS. Про неефективність функціонального заміщення β -катеніну його гомологом γ -катеніном свідчить і зниження вмісту основного білка АК – N-кадгерину у серцях новонароджених тварин P1-2, як з гетеро – так і гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*. Останнє означає зменшення утворення міжклітинних контактів АК у області композита, що може позначитись і на функціонуванні серця у дорослих тварин.

Окрім того, варто враховувати і той факт, що γ -катенін може мати свої гени-мішені і зовсім інший біологічний контекст ніж β -катенін у регулюванні кардіогенезу. І наразі, ці мішені, як загалом, так і у серці – не ідентифіковані. На користь такого припущення свідчить робота, де було показано, що ядерна локалізація γ -катеніну у стовбурових клітинах спричиняла їхнє адипогенне диференціювання опосередковано через канонічний Wnt-каскад [144], тоді як відомо, що β -катенін залежна транскрипція генів пригнічує адипогенез [119]. До того ж, підвищення ядерної локалізації γ -катеніну, не лише промодувало адипогенез у дорослому серці, а й розвиток ARVC, що також вказує на додаткові сигнальні функції цього гена у міокарді і його патогенезі (рис.6.1).

Загалом, нами вперше було показано активацію канонічного Wnt-сигнального каскаду у пізньому кардіогенезі (E14,5) в нормі, та сигнальну функцію γ -катеніну у серцях новонароджених мишей за умови гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1*, а також, летальність новонароджених тварин із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, що свідчить про критичну функцію β -

катенін-залежної транскрипції генів у пізньому ембріогенезі та постнатальному серці. Окрім того, нам вдалось з'ясувати, що гени *Ctnnb1* та *Cttnn1*, на відміну від їхнього цитоплазматичного партнера - N-кадгерину, за раунок їхньої сигнально-регуляторної функції, залучені до формування міокарду на більш пізніх термінах кардіогенезу (після E14,5) та у серці новонароджених тварин (P1-2).

Так, нами вперше було показано, що і нокаут гена *Ctnnb1* і гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє порушення проліферативної активності, термінальної диференціації кардіоміоцитів та розмірів постнатального міокарду (P1-2). У постнатальному серці проліферативна активність кардіоміоцитів, як відомо, пригнічується протягом першої декади життя (у мишей), що супроводжується формуванням та врегулюванням білків області композита, тобто структур АК, ПЗ та десмосом. Окрім того, у мишей протягом цього терміну постнатального розвитку відбувається і утворення двоядерних кардіоміоцитів, тобто каріокінез без послідуєчого цитокінезу. Ці події призводять до, так званого, «визрівання» міокарду (heart maturation) і корелюють із обмеженням регенеративного потенціалу серця у ссавців [193,91].

Нами було показано, що незважаючи на різний фенотип, отриманий при нокауті гена *Ctnnb1* і гена *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах, порушення їхньої експресії призводили до зменшення кількості одноядерних кардіоміоцитів. Що свідчить про порушення визрівання новонародженого серця у мутантних мишей.

Цікаво, що і гетерозиготний і гомозиготний нокаут гена *Ctnnb1* спричиняв збільшення розмірів кардіоміоцитів новонародженого серця і зменшення розмірів серця. Ця низка експериментальних даних узгоджується із висунутим нами припущеннями про критичне значення активності канонічного Wnt-сигнального каскаду у постнатальному міокарді і про інший біологічний контекст γ -катенін-залежної активації цього сигнального каскаду. Незважаючи на те, що нами було показано підвищення експресії γ -катеніну у серцях із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* і навіть експериментально показано

підвищення зв'язування γ -катеніну із LEF/TCF та ДНК, кардіоміоцити у культурі не утворювали міжклітинних контактів, зберігали округлу морфологію, не ділились і гинули, навіть після впливу специфічного активатора канонічного Wnt-сигналіну [280]. У своїй роботі, підвищення експресії γ -катеніну спостерігали і у серцях тварин гетерозиготних за нокаутом досліджуваного гена, що супроводжувалось підвищенням активності канонічного Wnt-сигналіну. Проліферативна активність цих клітин не відрізнялась від такої у контролі, вочевидь, за умови гетерозиготної делеції гена *Cttnb1* у клітинах, з певною ймовірністю, канонічний Wnt-каскад регулюється як за участі γ -катеніну так β -катеніну.

Принципова важливість транскрипційної активності саме β -катеніну на базальному рівні, у новонародженому серці підтверджується і результатами аналізу нокауту гена *Cttna1*. Так у гетеро- і гомозиготних за нокаутом цього гена новонароджених тварин спостерігали підвищення проліферативної активності і зменшення розмірів кардіоміоцитів та збільшення маси серця (P1-2) що свідчить про гіпоплазію серця. Однак, визрівання таких сердець також було порушеним, бо відсоток двоядерних кардіоміоцитів знижувався у обох досліджених групах мишей, також спостерігали порушення експресії фетальних генів (*ANP*, *BNP*, β -*MHC*). Варто зауважити, що у своїй роботі нам вдалось вперше продемонструвати, що нокаут гена *Cttna1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє підвищення транскрипційної активності β -катеніну як у серцях новонароджених так і дорослих мишей. Дійсно, нами було показано підвищення експресії генів-мішеней канонічного Wnt-сигналіну у серцях новонароджених (*c-Myc*, *Axin2*, *Cyclin D1*, *TCF4*) та дорослих (*c-Myc* та *c-Fos*) мишей із нокаутом гена *Cttna1*. Окрім того, у серцях дорослих тварин із нокаутом гена *Cttna1* ми спостерігали і підвищення вмісту активного β -катеніну, фосфорильованої за серином 9 GSK-3 β (не активної) та зменшення вмісту скефолдного білка Axin1. Усе разом це вказує на дисоціацію деградувального комплексу β -катеніну, та як наслідок підвищення його транскрипційної активності.

Як вже згадувалось у Огляді літератури, існуючі поодинокі роботи свідчать на користь участі α -Е-катеніну у модуляції активності Wnt-сигналіngu. Грунтуючись на літературних і власних даних припускаємо, що, α -Е-катенін є супресором канонічного Wnt-сигналіngu у кардіоміоцитах. На нашу думку, така дія може реалізовуватись безпосередньо через фізичну взаємодію білка α -Е-катеніну із β -катеніном у складі деградувального комплексу (рис.6.2. *a*), що є додатковим фактором для ефективної протеасомної деградації β -катеніну; або із ядерним пулом β -катеніну (рис.6.2 *б*), де така взаємодія перешкоджатиме утворенню комплексу β -катенін/LEF-TCF/ДНК [73,41,260] і відповідно - реалізації транскрипційної активності β -катеніну. Тож, нокаут гена *Cttnn1* та відсутність або зниження вмісту його продукту - α -Е-катеніну може спричинити послаблення внутрішньоклітинного контролю рівню цитозольного β -катеніну (рис.6.2 *в*). Окрім того, за умови нокауту гена *Cttnn1*, сигнальна активність β -катеніну може підвищуватись і опосередковано, через HIPPO-сигнальний каскад (рис.6.2 *г*), модулятором якого є α -Е-катенін (Огляд літератури, підрозділ 1.3).

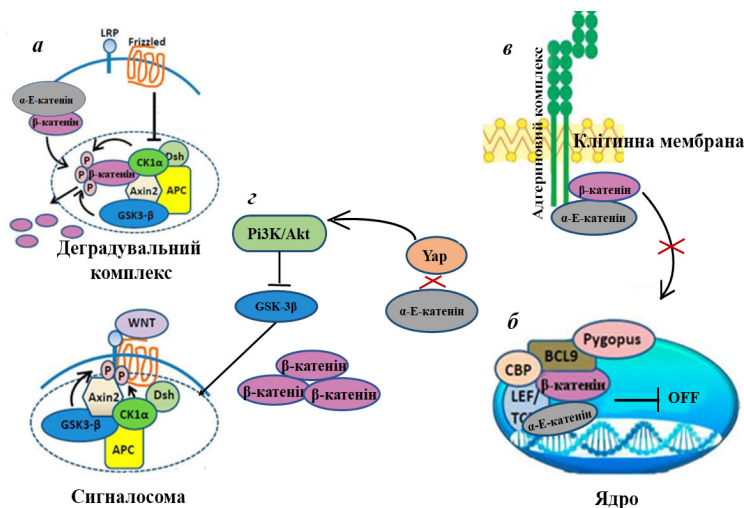


Рис.6.2. Молекулярно-біологічні механізми модуляції транскрипційної активності β -катеніну α -Е-катеніном

Тож, пригнічення Wnt/ β -катенінового сигналіngu та залучення γ -катенін-залежної транскрипції генів спричиняє порушення термінальної диференціації неонатальних кардіоміоцитів, повне пригнічення їхньої проліферації,

зменшення маси серця та летальність новонароджених тварин, що ми і спостерігали у тварин із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*; за умови гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1* відбувалась активація канонічного Wnt-сигналіngu, вочевидь із залученням обох катенінів β - і γ -, що також супроводжувалось пригніченням темпу проліферації, та пригніченням термінальної диференціації міоцитів серця (рис.6.3). Активація Wnt/ β -катенінового сигналіngu у неонатальному серці із нокаутом гена *Ctnna1* спричиняла підвищення проліферації кардіоміоцитів та, також, пригнічення їхнього термінального диференціювання. Наша робота, не лише демонструє важливу роль базального рівня активності канонічного Wnt-сигналіngu у врегулюванні проліферації неонатальних кардіоміоцитів а й важливість балансу між сигнальною та адгезивною функцією білків АК: β - і γ -катенінів та α -Е-катеніну (рис.6.3).

Окрім того, у серцях із гомо- і гетерозиготним нокаутом гена *Ctnna1* ми спостерігали і підвищення транскрипційної активності Yap – основного медіатора Hippo-сигнального каскаду. Як відомо, цей сигналінг є важливим регулятором розміру міокарду, поділу та програмованої гибелі міоцитів серця [274]. Як детально було розглянуто у Огляді літератури (підрозділ 1.3), α -Е-катенін зв'язується із Yap, що спричиняє секвестрування останнього та пригнічення його сигнальної активності [222,137]. У своїй роботі ми спостерігали підвищення експресії генів-мішеней Yap у новонароджених серцях (*Ctgf*, *Tnfrsf1b*), та у міокарді дорослих тварин (*Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1* і *Tnfrsf1b*). Наші результати узгоджується із даними інших авторів. Так, у серцях із подвійним нокаутом генів *Ctnna1* та *Ctnna3*, що кодують білки α -Е-катеніну та α -Т-катеніну відповідно, автори спостерігали підвищення сигнальної активності Yap, гіперпроліферацію, зменшення розміру неонатальних міоцитів серця та гіпоплазію сердець [137].

Аналіз літературних [85,138], та власних даних демонструє, що α -Е-катенін інгібує транскрипційну активність Yap, утворюючи потрійний білковий комплекс Yap/14-3-3/ α -Е-катенін, а за умови делеції гена *Ctnna1* білковий

комплекс дезінтегрує або ж не утворюється і це спричиняє підвищення експресії генів-мішеней *Yap*.

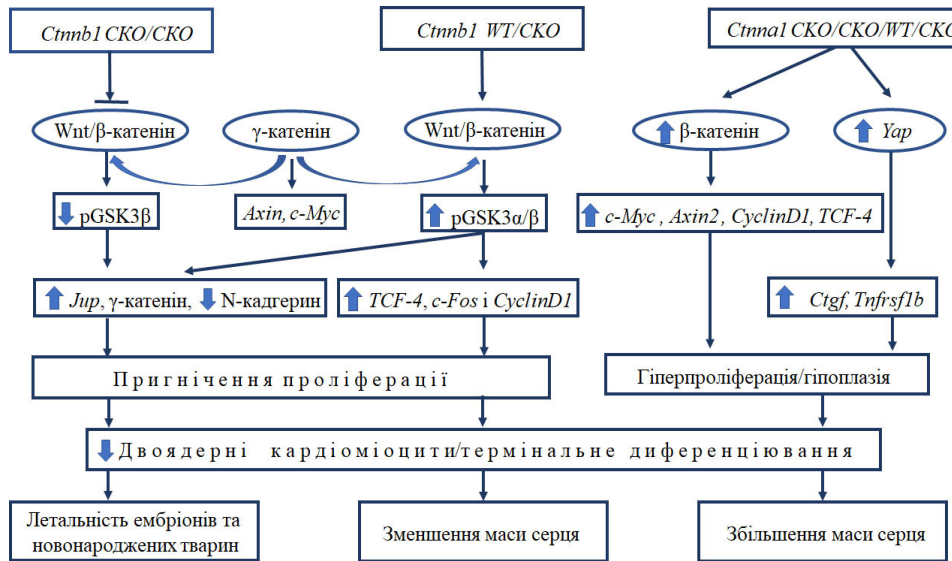


Рис.6.3. Нокаут генів *Ctnnb1* та *Ctnn1* у кардіоміоцитах ембріонів (E10,5) спричиняє порушення розвитку неонатального серця, в наслідок змін активності канонічного Wnt- та HIPPO-сигнальних каскадів

Однак, ефект нокауту гена *Ctnn1* не обмежується лише активацією *Yap*-залежної транскрипції, відомо, що вивільнений *Yap* здатен безпосередньо зв'язуватись із β -катеніном, що спричиняє гіперпроліферацію кардіоміоцитів та гіпертрофію міокарду [54] (рис.6.4). Причому, відбувається активація «не канонічної» сигнальної функції останнього, так наразі було ідентифіковано гени-мішені (*Sox2* і *Snai2*) для *Yap* і β -катеніну активація яких відбувається не залежно від ДНК зв'язувального комплексу LEF/TCF (рис 6.4) [54]. Підвищення ядерної локалізації *Yap* спричиняє не лише активацію генів – мішеней HIPPO-каскаду та генів-мішеней *Yap*/ β -катеніну, але і активацію такого важливого для росту клітин сигнального каскаду як *Pi3K*/*Akt*-сигналінг. Було показано, що *Yap* здатен активувати останній опосередковано через свої мішені: *miR-29* і *IGF1R* [172] (рис.6.4). Важливо також наголосити, що активація *Pi3K*/*Akt*-сигнального каскаду стимулює стабілізацію β -катеніну і підвищення його транскрипційної активності через фосфорилування *GSK-3β*. Тож, як бачимо, α -Е-катенін модулює не лише активність HIPPO-сигнального

каскаду, а й канонічного Wnt- сигналінгу, причому активність останнього регулюється як безпосередньо так і опосередковано.

Тож, нами було показано, що α -Е-катенін є супресором транскрипційної активності β -катеніну та Υ ар у неонатальному та дорослому серці. Порушення експресії гена *Cttnn1* спричиняє і порушення сигнальної активності його продукту, а саме активацію експресії генів мішеней канонічного Wnt та HIPPO сигналнів – що призводить до порушення термінальної диференціації та проліферативної активності міоцитів серця та збільшення розмірів новонародженого органу (рис.6.4).

Вочевидь, порушення експресії генів *Cttnb1* та *Cttnn1* у ембріональному серці після формування першого та другого серцевих полів спричиняє порушення активності таких важливих регуляторів росту та поділу міоцитів серця та розвитку гіпертрофії як канонічний Wnt- та HIPPO-сигнальні каскади, що спричиняє порушення термінального диференціювання кардіоміоцитів та серця і може негативно впливати на розвиток та функціонування міокарду дорослого організму.

Дійсно, у своїй роботі ми спостерігали порушення розвитку постнатального серця у тварин із нокаутом гена *Cttnb1* та *Cttnn1* у ембріональних кардіоміоцитах (рис.6.3). Цікаво, що нокауті досліджуваних генів спричиняли дещо протилежні фенотипи як у серцях новонароджених так і у дорослих мишей. Так, нокаут гена *Cttnb1* спричиняв затримку росту серця, що не супроводжувалось морфологічними вадами, та підвищенням експресії фетальних генів у тварин віком 1 та 3 місяці. І навпаки, при нокауті гена *Cttnn1*

Нокаут *Cttnn1* спричиняє підвищення вмісту та транскрипційної активності Υ ар та β -катеніну. Активація Υ ар спричиняє підвищення експресії генів залучених до проліферації кардіоміоцитів та [274]. Вивільнений Υ ар зв'язується із β -катеніном, викликаючи гіперпроліферацію міоцитів серця та гіпертрофію [85]. Окрім того, Υ ар опосередковано, через свої мішені мікроРНК 29 та ILGFR1 активує Pi3K/Akt-сигналінг [274]. Канонічний Wnt активує свої гени мішені, що призводить до гіпертрофії [96,26], або опосередковано через

MAPK [132], а також спричиняє порушення метаболізму жирних кислот пригнічуючи PPAR α через c-Myc [5].

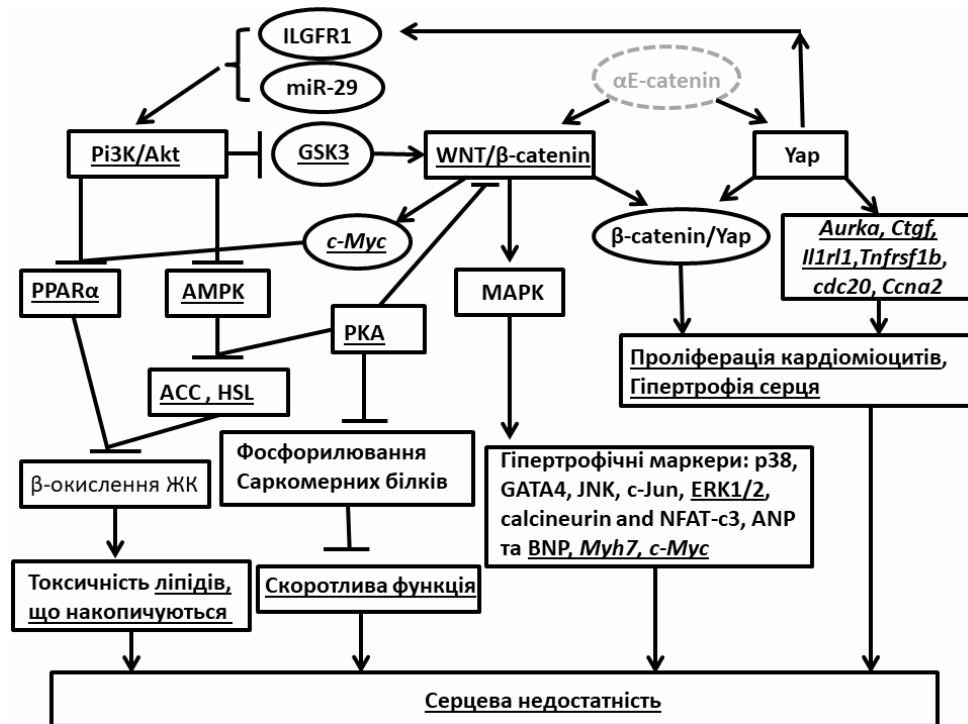


Рис. 6.4. Запропонована схема функції гена *Cttna1* у міокарді.

Активация PI3K/Akt-сигнального каскаду спричиняє фосфорилування GSK-3 β та підвищення транскрипційної активності β -катеніну [18]. Окрім того, Akt пригнічує активність PPAR α та AMPK [34,94]. Зниження активності AMPK призводить до інгібування HSL, PPAR α та як наслідок пригнічує β -окислення жирних кислот [198]. Інгібування PKA призводить до зниження фосфорилування саркомерних білків (включаючи тітин), що призводить до порушення скоротливої функції серця [129,13].

ми спостерігали збільшення індексу МС/МТ, масивні гістопатологічні зміни та фіброз, які однак, також супроводжувались підвищенням експресії фетальних генів. Окрім того, ми спостерігали і низку порушень функціонування сигнальних систем клітини (канонічний Wnt-, HIPPO-, PI3K/Akt-, MAPK- та PKA сигнальних каскадів) у мутантних серцях. Більш того у серцях із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Cttna1* ми виявили і порушення регулювання метаболізму нейтральних ліпідів (зниження вмісту PPAR α , інгібування AMPK та HSL та активацію ACC).

Загалом, наші результати демонструють, що нокаут генів *Ctnnb1* та *Cttnn1* у ембріональному серці, за рахунок порушення сигнальної функції їхніх продуктів, білків α -Е-катеніну та β -катеніну відповідно, спричиняє молекулярні патерни змін, що прогресують з віком та можуть бути причиною порушення функціонування дорослого серця.

Аналіз сердець дорослих тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, перш за все, виявив порушення активності канонічного Wnt-сигналіngu, як і очікувалось на початку проведення роботи, активність β -катенін-залежної транскрипції генів була нижчою у мутантних серцях порівняно із контролем відповідного віку (1, 3, 4,5 та 6 місяців), тобто нижче базального рівня. Про що свідчить зниження рівня експресії генів мішеней β -катеніну (*cFos* та *c-Myc*), та його транскрипційного ко-фактора (*TCF4*) у серцях дорослих тварин. Варто зауважити, що у серцях дорослих мишей із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* ми не спостерігали статистично достовірних змін вмісту тотального та активованого білка β -катеніну. Однак, у цій низці експериментів ми виявили і підвищення вмісту скефолдних білків деградувального комплексу - APC та Axin1, що свідчить про пригнічення транскрипційної активності β -катеніну. Окрім того, ми спостерігали і підвищення вмісту фосфорильованих GSK3 α/β , що суперечать результатам ЗТ-ПЛР аналізу та змін вмісту білків APC та Axin1. Однак, такі неузгодження пояснюються підвищенням активності іншого сигнального каскаду у серцях мутантних мишей - PI3K/AKT/mTOR сигналіngu, про що свідчить підвищення вмісту фосфорильованих форм AKT за треоніном 308 та серином 473.

Відомо, що GSK3 α/β , окрім участі у регулюванні рівню β -катеніну, є й важливим компонентом PI3/AKT-кіназного сигналіngu, і активація останнього спричиняє підвищення фосфорильовання GSK3 α/β . Цікаво, що у серцях дорослих мишей ми спостерігали порушення активності не лише PI3K/AKT/mTOR- та Wnt/ β -катенінового сигналіngів, а й активності MAPK сигналіngu, про що свідчило підвищення вмісту фосфорильованих форм ERK1/2 у мутантних тварин.

Активация MAPK та PI3K/AKT/mTOR- у серцях мишей із нокаутом однієї алелі гена *Ctnnb1*, з одного боку, може свідчити про певну патологію таких сердець, наприклад про гіпертрофічне ремоделювання, розвитку ішемії та серцевої недостатності [31,209,197]. Проте, у своїй роботі ми не спостерігали фіброзу, чи інших гістопатологічних змін тканини мутантних сердець в усіх проаналізованих групах тварин різного віку, що були б типовими для зазначених патологій. Гіпертрофічний індекс, або індекс співвідношення МС/МТ підвищувався лише у тварин найстаршої проаналізованої нами вікової групи (6 місяців), і таке зростання мало характер тенденції. З іншого боку, відомо, що MAPK та PI3K/AKT/mTOR- сигнальні каскади, так само як і канонічний Wnt, залучені до кардіогенезу на ранніх його стадіях [79].

Тут варто наголосити, що при адаптації міокарду до гіпертрофічних стимулів відбувається його ембріоналізація, тобто дедиференціація і повернення до молекулярних, генетичних та біохімічних патернів типових для ембріонального серця [53]. Це своєрідний захист кардіоміоцитів від гибелі при дії несприятливих чинників.

Отримані нами дані при аналізі сердець новонароджених (P1-2) та дорослих тварин, вказують на те, що гетерозиготна делеція гена *Ctnnb1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє затримку термінальної диференціації кардіоміоцитів, порушення їхньої проліферативної активності та активності основних сигнальних каскадів залучених до розвитку серця у ембріогенезі та його функціонування після народження. Тобто, гетерозиготний нокаут гена *Ctnnb1* спричиняє розвиток фенотипу так званого «ембріоналізованого серця». Підвищений рівень експресії фетальних генів (*BNP* та β -*MHC*) та дорослого міозину серця (α -*MHC*) також свідчить на користь висунутого нами припущення.

Також, ми хочемо звернути увагу і на характер змін експресії генів-мішеней канонічного Wnt-сигналіngu у тварин різних вікових груп із нокаутом однієї алелі гена *Ctnnb1*. Так гени *c-Fos* та *CyclinD1* експресувались у серцях тварин гетерозиготних за нокаутом гена *Ctnnb1* на нижчому рівні порівняно із

контрольними мишами в усіх вікових групах. Однак, статистично достовірним зниження експресії було лише для гена *c-Fos* у тварин віком 6 місяців. Ген *c-Myc*, статистично достовірно експресувався на нижчому рівні у серцях мутантних мишей у групах тварин віком 3 місяці, тоді як у мишей віком 1 та 6 місяців експресія цього гену статистично достовірно зростала. Такий неоднозначний характер експресії генів-мішеней канонічного Wnt-сигналіну (*c-Myc*, *c-Fos* та *CyclinD1*) у серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* вказує на участь інших сигнальних каскадів у регулюванні їхньої експресії, а саме PI3K/АКТ, Hedgehog, Notch [40,237,116,10]. Нагадаємо, що у своїй роботі ми спостерігали підвищення активності PI3K/АКТ- сигнального каскаду у серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1*, і хоча активність інших зазначених сигнальних систем у даній роботі не досліджувалась, припускаємо, що порушення активності канонічного Wnt-сигнального каскаду може бути асоційовано із більш масивними порушеннями активності сигнальних систем клітини у серці. Окрім того, не варто забувати, що за умови гетерозиготної делеції гена *Cttnb1* до регулювання канонічного Wnt-сигнального каскаду може залучатись і γ -катенін. Більш того, останній здатен регулювати експресію генів *c-Myc* та *Axin2*.

Узагальнюючи наведений масив даних, можемо зробити висновок, що сигнальна функція канонічного Wnt-каскаду та β -катеніну на базальному рівні має важливе значення для постнатального формування та розвитку міокарду. Так, гетерозиготний нокаут гена *Cttnb1* у ембріональних кардіоміоцитах спричиняє порушення активності не лише цього сигнального каскаду а й інших систем залучених до кардіогенезу та розвитку і функціонування дорослого серця (MAPK та PI3K/АКТ/mTOR- сигнальні каскади) спричиняє молекулярні та генетичні патерни змін які можна описати як «ембріоналізований міокард». Усе разом, це може позначитись на функціонуванні серця дорослих тварин та його адаптації до дії стресових чинників.

Аналіз дорослих тварин із гомо- та гетерозиготним нокаутом гена *Cttna1* у ембріональних кардіоміоцитах узгоджується із висунутим нами

припущенням. Так, у таких тварин ми навпаки спостерігали гіпертрофічний ріст міокарду, масивні гістопатологічні зміни, порушення функції серця та підвищення транскрипційної активності β -катеніну та *Yap*. Також, нокаут гена *Cttnn1* спричиняв масивні порушення функціонування сигнальних систем залучених до розвитку гіпертрофії і серцевої недостатності (PI3K/Akt-, MAPK- та PKA сигнальних каскадів) та метаболізму жирних кислот (зниження вмісту PPAR α , інгібування AMPK та HSL та активацію ACC), усе разом це спричиняло розвиток серцевої недостатності та летальність мишей (рис.6.4). Звісно, на ґрунті наших експериментів, ми не можемо стверджувати що фенотип який розвивався у тварин із нокаутом гена *Cttnn1* був зумовлений лише підвищенням транскрипційної активності β -катеніну у серцях постнатальних тварин. Сигнально-регуляторний механізм розвитку серцевої недостатності у мишей із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* у кардіоміоцитах має набагато складнішу молекулярно-біологічну природу і є результатом порушень активності одразу двох сигнальних каскадів: канонічного Wnt та HIPPO.

Варто нагадати, що роль гена *Cttnn1* із застосуванням моделі умовного нокауту досліджувалась у серці і раніше, але у цій роботі Cre рекомбіназа контролювалась іншим промотором - MLC2v [220]. Одразу ж звернемо увагу на той факт, що описана авторами модель умовного нокауту не забезпечує ефективної делеції фланкованих loxP сайтами ділянок ДНК [36] на відміну від моделі (α MHC-Cre) застосованої у наших дослідженнях [2,191]. Тож, у серцях тварин, навіть із гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1*, його продукт, α -Е-катенін, експресувався, хоч і на нижчому рівні порівняно із контрольними тваринами [220]. І не зважаючи на це, було показано, що за умов такої генетичної моделі, у мутантних тварин розвивалась дилатаційна кардіоміопатія, яка, в межах спостережень, не прогресувала до серцевої недостатності та не спричиняла летальності тварин. До того ж, автори роботи, у своїх дослідженнях не приділяли уваги потенційній сигнальній функції білка α -Е-катеніну і тим більше, порушенням активності сигнальних систем клітини у наслідок порушення α -Е-катенін-опосередкованого сигналіngu. Таким чином, наша

робота, це фактично перша спроба проаналізувати повну делецію гена α -Е-катеніна та її вплив на формування та функціонування міокарду на рівні організму.

Нагадаємо, що при аналізі новонароджених кардіоміоцитів із нокаутом гена *Cttnn1*, ми спостерігали зменшення розмірів клітин та підвищення їхньої проліферативної активності, що спричиняло збільшення маси новонародженого серця та його гіпоплазію. У серцях дорослих тварин, ми спостерігали не тільки підвищення індексу МС/МТ у мутантних тварин обох груп, а й підвищення експресії гіпертрофічних генів, значний замісний та периваскулярний фіброз, гістопатологічні зміни що свідчать про ішемічне ураження серця та запалення. На додаток, ми спостерігали порушення кардіогемодинамічних показників у серцях тварин із гомо- та гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1*, що узгоджується із пригніченням активності РКА, яка як відомо фосфорилує саркомерні білки, включно з тітином [68,129] і у такий спосіб підтримує скоротливу функцію міокарду [12]. Усе разом, це свідчить про розвиток серцевої недостатності у тварин з делецією гена *Cttnn1*, та як наслідок – летальність.

Серцева недостатність – складна патологія, що супроводжується фіброзом, запальним процесом, порушенням насосної функції та електрофізіології [30]. Однак, основними рушійними силами усіх описаних змін є порушення активності чисельних сигнальної каскадів клітини, що залучені як до контролювання кардіогенезу так і функціонування дорослого міокарду, а саме: HIPPO-, Wnt/ β -катеніновий-, Pi3K/Akt- та MAPK-сигнальні шляхи [15,125].

Дійсно, у своїй роботі, ми спостерігали активацію Pi3K/Akt - сигналіngu у серцях тварин із нокаутом гена *Cttnn1*, про що свідчить підвищення вмісту фосфорильованої Akt за серином 473. Однак характер активації, а саме фосфорилування останнього відрізнявся від такого у мишей із нокаутом гена *Cttnn1*. Вочевидь, за умови нокауту *Cttnn1* у серцях тварин відбувається активація Pi3K/Akt-каскаду через mTORC2 залежний механізм, оскільки ми

спостерігали зниження фосфорилування Akt за треоніном 308 [263,31]. Окрім того, наші дані свідчать і про певні порушення контролювання окислення ліпідів, так відомо, що Pi3K/Akt-каскад регулює метаболізм жирних кислот через одну з мішеней - PPAR α , пригнічуючи активність останнього [34]. Нагадаємо, що PPAR α - це один із головних активаторів експресії генів що регулюють катаболізм ліпідів. Проте, у серцях із нокаутом гена *Cttnn1*, в наслідок порушення супресорної функції його продукту, ми спостерігали і активацію канонічного Wnt-сигнального каскаду. Останній як відомо, також може регулювати активність PPAR α опосередковано через одну із своїх мішеней *c-Myc* [5] (рис 6.4). Тож, пригнічення вмісту PPAR α , та зниження рівню фосфорилування AMPK і його мішеней: ACC та HSL є наслідком порушення сигнальної функції α -Е-катеніну.

Загалом, детальний аналіз активності низки сигнальних молекул, що регулюють метаболізм ліпідів (AMPK, PPAR α , гормон-чутливої ліпази (HSL), ацетил-СоА карбоксилази (ACC)) демонструє зниження їхньої активності, та свідчить про пригнічення β -окислення жирних кислот [170,7] а також транспорту жирних кислот до мітохондрій [93,58] у серцях тварин із гомозиготним та гетерозиготним нокаутом гена *Cttnn1*. Ці дані, також узгоджуються із накопиченням нейтральних ліпідів яке ми спостерігали у експерименті. Також варто нагадати, усі ці зазначені молекули, що регулюють метаболізм жирів у клітині залучені і до розвитку патології серця, так наприклад відомо, що AMPK активується при ішемії міокарда [198] і запобігає розвитку гіпертрофії серця [59]. Проте, на відміну від порушень активності Pi3K/Akt, MAPK-, PKA- сигнальних каскадів, пригнічення активності регуляторів катаболізму нейтральних ліпідів та їхнє накопичення у кардіоміоцитах не є типовим для серцевої недостатності. Однак, спостерігається при серцевій недостатності у хворих на діабет та /або метаболічний синдром [218,155]. Оскільки, у даному дослідженні ми не використовували тварин із зазначеними патологіями, то порушення метаболізму нейтральних ліпідів у серцях тварин із нокаутом гена *Cttnn1* є

специфічними саме для порушення α -Е-катенін залежного сигналіngu (рис.6.4).

Як уже зазначалось вище, у мишей із нокаутом гена *Cttnn1*, окрім активації РІЗК/АКТ-сигнального каскаду ми спостерігали і порушення активності MAPK-сигналіngu. Нагадаємо, що активація цього сигнального каскаду відбувалась і у серцях тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1*. Ми вже зазначали вище, що MAPK-сигналінг залучено до контролювання раннього кардіогенезу, а також, він активується або пригнічується у серці при дії цілої низки несприятливих факторів [87]. На відміну від попередньої моделі, де ми вивчали вплив нокауту *Cttnb1*, порушення активності MAPK-сигналіngu залежало від типу нокауту гена, тобто у серцях тварин гетерозиготних за делецією гена *Cttnn1* вміст фосфорильованих Erk1/2 зменшувався порівняно із контролем, тоді як у серцях тварин із повною втратою гена *Cttnn1* – статистично достовірно підвищувався. Однак, нагадаємо, що порушення активності цього каскаду, як підвищення так і зниження її у дорослому міокарді спричиняє розвитку патологічного стану [209]. Зв'язок між α -Е-катеніном та функціонуванням MAPK-сигналіngu було встановлено і в іншій роботі із застосуванням культивованих кератиноцитів, де після нокауту гена *Cttnn1* автори спостерігали, не лише підвищення активності MAPK, а й підвищення проліферативної активності таких клітин, що не супроводжувалось порушеннями міжклітинних контактів та адгезії [240]. Це узгоджується із нашими результатами, та свідчить на користь висунутої нами теорії, що сигнальна функція α -Е-катеніну принципово важлива для контролювання клітинного циклу та поділу клітин і не лише у кардіоміоцитах.

Однак, механізми модулювання активності Erk1/2 через α -Е-катенін залежний сигналінг потребують окремого дослідження, наразі, на ґрунті літературних даних, ми можемо лише запропонувати два можливих механізми. По-перше, α -Е-катенін може модулювати активність MAPK-каскаду через пряму фізичну взаємодію. По-друге, така модуляція активності MAPK-каскаду може бути опосередкована через канонічний Wnt-сигнальний шлях. Зв'язок між

МАРК- та Wnt-сигналінами було виявлено у експериментальних дослідженнях [132], у нашій роботі, у серцях із нокаутом гена *Cttnn1* ми спостерігали активацію канонічного Wnt-сигналіну, що робить наше припущення ймовірним. Окрім того, було показано, що у клітинах, де активність канонічного Wnt-сигналіну підвищена, активація Erk1/2 відбувається Raf-1 опосередковано [184,270]. Відомо, що активність Raf-1 залежить від взаємодії із білком 14-3-3, причому, білок 14-3-3 здатен як пригнічувати так і активувати Raf-1, залежно від залученого сайту зв'язування [235,141,42]. Тож припускаємо, що α -Е-катенін здатен опосередковано регулювати характер зв'язування білків Raf-1 та 14-3-3, і кількісний вміст α -Е-катеніну має визначальне значення у такій взаємодії.

Загалом, нами вперше детально показано сигнально-регуляторну функцію α -Е-катеніну у кардіоміоцитах, а саме, здатність білка не лише підтримувати міжклітинну адгезію, та структуру АК у складі ІД а й пригнічувати Yap та β -катенін залежну транскрипцію. Нами було показано, що нокаут гена *Cttnn1*, за рахунок порушення та відсутності супресорної функції його білка, спричиняє активацію канонічного Wnt-каскаду та Yap, що у свою чергу призводить до низки молекулярно-генетичних та молекулярно-біологічних патернів змін (порушення активності Pi3K/Akt, MEK1-Erk1/2, cAMP/PKA, PPAR α та AMPK), усе це викликає гіперпроліферацію міоцитів серця новонароджених тварин, описані нами гіпертрофічні зміни з віком, запалення, ішемію, фіброз і порушення гемодинамічної функції. Незважаючи на те, що мутації гена *Cttnn1* у людей до тепер описано не було, наші дані свідчать, що порушення експресії цього гена може призводити до розвитку патології міокарду у людей. Тож, на нашу думку, варто із застосуванням сучасних методів досліджень проаналізувати наявність або відсутність мутації гена *Cttnn1* у пацієнтів із спадковою серцевою недостатністю, що супроводжується низкою описаних нами симптомів.

Отже, нами показано, що порушення експресії гена *Cttnn1* та *Cttnnb1* у ембріональному серці, впливає на розвиток та формування постнатального

серця, порушуючи активність основних сигнальних каскадів серця та спричиняючи розвиток кардіальних фенотипів; серцевої недостатності та летальності у випадку гена *Cttnal*, та затримки формування дорослого серця і пролонгованого «ембріоналізованого» стану за умови гетерозиготного нокауту *Cttnb1*. Загалом наші дані дають змогу деталізувати та уточнити сигнальну функцію досліджуваних генів у кардіогенезі та постнатальному розвитку серця.

Як вже згадувалось, Wnt/ β -катеніновий сигналінг, не лише принциповий регулятор кардіогенезу, а й важливий координатор адаптацій міокарду до дії несприятлих факторів: фізичні навантаження, гемодинамічний та гормональний стрес та інші. Однак, як наголошувалось у Огляді літератури (Підрозділ 1.4), функція цього сигнального каскаду при гіпертрофічному ремоделюванні серця є дещо дискусивною. Згідно одних експериментальних робіт, стабілізація β -катеніну спричиняла розвиток гіпертрофії що супроводжувалось підвищенням експресії маркерів гіпертрофії (p38, GATA4, c-Jun, ERK1/2, кальцинейрин, NFAT-C3, ANP та BNP) [132]. Також, було показано, що активація канонічного Wnt-сигналінгу, у серці, призводить до розвитку дилатаційної кардіоміопатії та смертності. З іншого боку, було встановлено, що ефективна адаптація серця до гіпертрофічних стимулів відбувається лише за умови пригнічення транскрипційної активності β -катеніну [16].

У своїй роботі, ми показали, що активація канонічного Wnt-сигналінгу є необхідною для ефективної адаптації міокарду до впливу гіпертрофічних чинників. Так, за допомогою регресійного та дисперсійного аналізів нами було показано, що гіпертрофія завжди пов'язана із зростанням вмісту β -катеніну. Мета-аналіз наявних експериментальних робіт свідчить, що механізм розвитку гіпертрофії є універсальним і консервативним, підвищення експресії β -катеніну, як на рівні білка, так і мРНК є критичним для гіпертрофічного росту тканини в усіх досліджуваних модельних тест-системах та організмах. Також нами було ідентифіковано низку специфічних та відтворюваних маркерів для аналізу гіпертрофії: SERCA, actin DIF, Axin2, c-Myc, CyclinD1, BNP, ANP а

також індекс співвідношення тотального білка/ДНК. Окрім того нами було встановлено зв'язок між експресією β -катеніну та зазначеними маркерами. Використання запропонованої нами низки маркерів допоможе оптимізувати дослідження гіпертрофії міокарду та участі різних сигнальних молекул, у тому числі, β -катеніну у згаданому процесі.

Дані мета-аналізу підтверджуються і експериментальними дослідженнями, так нами було показано, що як при дії гіпертрофічних стимулів (AngII) і при активації канонічного Wnt-каскаду безпосередньо (LiCl) і при фізичному навантаженні активація Wnt/ β -катенін залежної транскрипції генів є необхідною умовою адаптації серця дорослих тварин, але на початкових стадіях адаптації міокарду. Так, при дії гіпертрофічних стимулів, ми спостерігали активацію β -катенін-залежної транскрипції на 3 добу інфузії стимулів, про що свідчило позитивне X-gal забарвлення. Про активацію канонічного Wnt-сигналіngu свідчить і підвищення експресії генів мішеней β -катеніну після дії AngII на 7 добу експерименту (*TCF4*, *c-Myc*, *CyclinD1*) та після дії LiCl на 3 добу експерименту (*c-Myc*, *CyclinD1* та *TCF4*). Про розвиток гіпертрофії, за умов експерименту, свідчить підвищення значень індексу МС/ДГ, та підвищена експресія фетальних або гіпертрофічних генів (*BNP*, *β -MHC*). Результати отримані із ізольованими кардоіміоцитами, також демонстрували важливість активації канонічного Wnt-сигналіngu на початку адаптації клітин до дії стимулів. Так, підвищення вмісту стабілізованого β -катеніну та pGSK3 β у клітинах оброблених AngII та LiCl відбувалось через 24 години досліду, тоді як через 72 години, активації β -катенін залежного сигналіngu вже не спостерігали.

При моделюванні атлетичного міокарду, ми також спостерігали активацію канонічного Wnt-сигналіngu у мишей, що отримували фізичне навантаження протягом одного тижня, про що свідчить підвищення експресії *Axin2* та вмісту pGSK3 β . У тварин, що отримували фізичне навантаження протягом місяця (4 тижні) активацію канонічного Wnt-каскаду не спостерігали.

Тож, нами показано, що незалежно від типу гіпертрофічного чиника, сигнальна функція β -катеніну необхідна для розвитку гіпертрофії міокарду, проте транскрипційна активність β -катеніну є необхідною на ранніх етапах ремоделювання. Пізніше, коли гіпертрофічна або фетальна генетична програма активована, транскрипційна активність β -катеніну пригнічується шляхом внутрішньо клітинного негативного «зворотнього зв'язку» [64], або із залученням інших сигнальних систем, що здатні модулювати активність Wnt-каскаду. Дійсно, при моделюванні атлетичного міокарду, ми спостерігали і підвищення експресії гена *Axin2*, котрий є одним із компонентів деградувального комплексу і мішенню β -катеніну.

Отриманий сет даних узгоджується і з результатами досліджень впливу гетерозиготного нокауту гена *Cttnb1* на адаптацію серця до тривалих фізичних навантажень. Нагадаємо, що за умови гетерозиготної делеції цього гена ми спостерігали підвищення активності MAPK, PI3-кіназного-сигнальних каскадів, але у цих серцях, ми не спостерігали гістопатологічних змін чи інших генетичних чи молекулярних ознак гіпертрофії, серцевої недостатності та іншого, так як у тварин із нокаутом гена *Cttna1*. Не спостерігали у дорослих тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* порушень активності PKA сигнального каскаду, що могло би свідчити про погіршення насосної функції таких сердець.

При адаптації таких тварин до тривалого фізичного навантаження ми не спостерігали морфологічних чи інших гістопатологічних змін тканини міокарду типових для гіпертрофії. Статистично достовірне зростання значення гіпертрофічного індексу у тварин гетерозиготних за нокаутом гена *Cttnb1* ми спостерігали лише за умови розподілу таких тварин за класами, проте аналіз розмірів кардіоміоцитів виявив статистично достовірне зростання розмірів клітин у тварин, що отримували фізичне навантаження. Важливо, що зростання це було нижчим у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1*, порівняно із контрольною групою мишей, що свідчить про затримку розвитку гіпертрофічної відповіді та узгоджується із даними аналізу індексу МС/МТ.

Загалом, результати цього експерименту вказують на те, що для гіпертрофічної відповіді активація канонічного Wnt-сигнального каскаду є необхідною умовою, так у цих тварин ми спостерігали пригнічення активності останнього про що свідчить зниження експресії генів *TCF4* та *c-Myc* як за умови фізичного навантаження так і без нього. Підвищення вмісту фосфорильованої GSK3 α/β та скефолдних білків Axin2 та APC також свідчить на користь підвищення транскрипційної активності β -катеніну у лізатах сердець мутантних тварин як при тренуванні так і без нього. Нагадаємо, що у тварин із нокаутом гена *Ctnnb1*, за умов відсутності стресу, ми спостерігали підвищення активності сигнальних каскадів PI3K/Akt та MAPK. Результати аналізу вмісту фосфорильованих GSK3 α/β , та AKT за треоніном 308 та серином 473 а також ERK1/2 свідчать про ще більше підвищення активності цих каскадів у серцях мутантних мишей при тривалому фізичному навантаженні, що однак не призводило до збільшення маси серця та формування гіпертрофічної відповіді.

Складається враження, що за умови пригнічення канонічного Wnt-сигналіngu при адаптації до фізичних навантажень відбувається компенсаторна активація інших сигнальних систем клітини - PI3K/Akt та MAPK, підвищується експресія фетальних генів, тобто ступінь ембріоналізації міокарду підвищується однак гіпертрофія серця не розвивається.

Окрім того, при фізичному навантаженні, у дослідних тварин, ми спостерігали і зниження активності РКА, яка як відомо приймає участь у фосфорилуванні саркомерних білків і тому є важливим регулятором гемодинамічної функції серця на молекулярному рівні. Наші дані вказують на те, що за умови тривалого фізичного навантаження, відбувалось погіршення насосної функції міокарду у дорослих тварин. Однак, у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*, рівень активності РКА був статистично вищим порівняно зі тваринами, що тренувались та не мали нокауту досліджуваного гена. Тож, насосна функція серця у таких мишей, із пригніченим канонічним Wnt-каскадом, також погіршувалась але меншою мірою ніж у тварин нормальних генотипів. Аналізуючи дані отримані при

дослідженні тварин як з нокаутом гена *Cttnb1* так і гена *Cttnn1*, ми припускаємо, що можливо канонічний Wnt-сигналінг залучено до контролювання активності РКА, проте наразі немає достатнього масиву даних, щоб запропонувати хоча б гіпотетичний механізм такого впливу. Однак у тварин із підвищенням активності Wnt-сигналінгу та нокаутом гена *Cttnn1* ми спостерігали пригнічення активності РКА навіть без додаткових стресових чинників.

Загалом, наші робота, це фактично перша комплексна спроба детального аналізу функції генів *Cdh2*, *Cttnb1* та *Cttnn1* у кардіогенезі, формуванні і функціонуванні постнатального серця. Наші власні та літературні дані вказують на те, що продукти генів АК за рахунок їхньої адгезивної та сигнальної функції мають важливе значення на різних етапах кардіогенезу а також у формуванні дорослого серця. Порушення експресії генів *Cdh2*, *Cttnb1* та *Cttnn1* спричиняє каскади молекулярно-генетичних та молекулярно-біологічних змін, що призводять до розвитку певних серцевих фенотипів та летальності. Це дозволяє нам розглядати порушення експресії цих генів як потенційні молекулярно-генетичні механізми розвитку серцевих патологій. І якщо, наразі мутації гена *Cdh2* і їхній зв'язок із серцевою аритмією вже показано, пошук зв'язку мутацій генів *Cttnb1* та *Cttnn1* у популяції людей є перспективним та важливим завданням.

ВИСНОВКИ

Пригнічення або повна відсутність експресії генів *Cdh2*, *Cttnna1* та *Cttnnb1* 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*, *Cttnna1* та *Cttnnb1* 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 *Cttnnb1* спричиняє летальність мутантних ембріонів на пізніх термінах гестації та новонароджених тварин (P1 – 3).

3. Уперше продемонстровано, що нокаут генів *Cttnna1* та *Cttnnb1* 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 Hippo-сигнальних каскадів β -катеніну та Yap у серцях дорослих (10 місяців) та новонароджених тварин (P1-3).

5. Доповнено дані про роль канонічного Wnt сигналіngu в кардіогенезі, а саме показано його активацію в пізньому кардіогенезі (E14,5). Встановлено, що нокаут гена *Cttnnb1* спричиняє порушення активності канонічного Wnt сигналіngu 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Afouda BA, Martin J, Liu F, Ciau-Uitz A, Patient R, Hoppler S.* GATA transcription factors integrate Wnt signalling during heart development. *Development* [Internet]. 2008.Vol. 135. №19. P. 3185–90.
2. *Agah R, Frenkel PA, French BA, Michael LH, Overbeek PA, Schneider MD.* Gene Recombination in Postmitotic Cells Targeted Expression of Cre Recombinase Provokes Cardiac-restricted, Site-specific Rearrangement in Adult Ventricular Muscle In Vivo. *J Chem Phys* [Internet]. 1997.Vol. 100. №1. P. 169–79.
3. *Agullo-Pascual E, Cerrone M, Delmar M.* Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: Diseases of the connexome. *FEBS Lett* [Internet]. 2014.Vol. 588. №8. P. 1322–30.
4. *Ahmad F, Lal H, Zhou J, Vagnozzi RJ, Yu JE, Shang X, et al.* Cardiomyocyte-Specific Deletion of Gsk3 α Mitigates Post-Myocardial Infarction Remodeling, Contractile Dysfunction, and Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2014.Vol. 64. №7. P. 696–706.
5. *Ahuja P, Zhao P, Angelis E, Ruan H, Korge P, Olson A, et al.* Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice. *J Clin Invest.* 2010.Vol. 120. №5. P. 1494–505.
6. *Ai D, Fu X, Wang J, Lu M-F, Chen L, Baldini A, et al.* Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007.Vol. 104. №22. P. 9319–24.
7. *Aktary Z, Pasdar M.* Plakoglobin Represses SATB1 Expression and Decreases In Vitro Proliferation, Migration and Invasion. *Gottardi C, editor. PLoS One* [Internet]. 2013.Vol. 8. №11. P. e78388.
8. *Aktary Z, Kulak S, Mackey J, Jahroudi N, Pasdar M.* Plakoglobin interacts with the transcription factor p53 and regulates the expression of 14-3-3. *J Cell Sci* [Internet]. 2013.Vol. 126. №14. P. 3031–42.
9. *Alcalai R, Metzger S, Rosenheck S, Meiner V, Chajek-Shaul T.* A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder, and woolly hair. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2003.Vol. 42. №2. P. 319–27.
10. *Alvarez-Medina R, Le Dreau G, Ros M, Martí E.* Hedgehog activation is required upstream of Wnt signalling to control neural progenitor proliferation.

- Development. 2009. Vol. 136. №19. P. 3301–9.
11. *Archbold HC, Yang YX, Chen L, Cadigan KM.* How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway. *Acta Physiol (Oxf)* [Internet]. 2012. Vol. 204. №1. P. 74–109.
 12. *Armstrong DD, Esser K a.* Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2005. Vol. 289. №4. P. C853-9.
 13. *Armstrong S, Ganote CE.* Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of glycolytic blockade, phorbol esters, and ischaemia. *Cardiovasc Res* [Internet]. 1994. Vol. 28. №11. P. 1700–6.
 14. *Barry ER, Camargo FD.* The Hippo superhighway: signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2013. Vol. 25. №2. P. 247–53.
 15. *Barry SP, Davidson SM, Townsend PA.* Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2008. Vol. 40. №10. P. 2023–39.
 16. *Baurand A, Zelarayan L, Betney R, Gehrke C, Dunger S, Noack C, et al.* β -catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling. *Circ Res* [Internet]. 2007. Vol. 100. №9. P. 1353–62.
 17. *Bays JL, Peng X, Tolbert CE, Guilluy C, Angell AE, Pan Y, et al.* Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell–cell and cell–matrix adhesions. *J Cell Biol* [Internet]. 2014. Vol. 205. №2. P. 251–63.
 18. *Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh TC, Millhorn DE.* Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells. *Cell Signal* [Internet]. 2001. Vol. 13. №1. P. 23–7.
 19. *Bennett PM, Maggs AM, Baines AJ, Pinder JC.* The transitional junction: a new functional subcellular domain at the intercalated disc. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2006. Vol. 17. №4. P. 2091–100.
 20. *van den Berg G, Abu-Issa R, de Boer BA, Hutson MR, de Boer PAJ, Soufan AT, et al.* A Caudal Proliferating Growth Center Contributes to Both Poles of the Forming Heart Tube. *Circ Res* [Internet]. 2009. Vol. 104. №2. P. 179–88.
 21. *Bergmann MW.* WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development. *Circ Res* [Internet]. 2010. Vol. 107. №10. P. 1198–208.
 22. *Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR.* Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2010. Vol. 128. №1. P. 191–227.

23. *Bland JM, Altman DG.* Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *BMJ* [Internet]. 1998.Vol. 317. №7172.
24. *BOENGLER K, DODONI G, RODRIGUEZSINOVAS A, CABESTRERO A, RUIZMEANA M, GRES P, et al.* Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2005.Vol. 67. №2. P. 234–44.
25. *van den Borne SWM, Narula J, Voncken JW, Lijnen PM, Vervoort-Peters HTM, Dahlmans VEH, et al.* Defective Intercellular Adhesion Complex in Myocardium Predisposes to Infarct Rupture in Humans. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2008.Vol. 51. №22. P. 2184–92.
26. *Brade T, Männer J, Kühl M.* The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. *Cardiovasc Res.* 2006.Vol. 72. №2. P. 198–209.
27. *Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz K-L.* Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013.Vol. 3. №10. P. a013847–a013847.
28. *Braut V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon a P, et al.* Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* [Internet]. 2001.Vol. 128. №8. P. 1253–64.
29. *Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai Y, Parsons S, et al.* Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest.* 2003.Vol. 111. №10. P. 1475–86.
30. *Breckenridge R.* Heart failure and mouse models. *Dis Model Mech* [Internet]. 2010.Vol. 3. №3–4. P. 138–43.
31. *Breuleux M, Klopfenstein M, Stephan C, Doughty CA, Barys L, Maira S-M, et al.* Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2009.Vol. 8. №4. P. 742–53.
32. *Buchert M, Athineos D, Abud HE, Burke ZD, Faux MC, Samuel MS, et al.* Genetic dissection of differential signaling threshold requirements for the Wnt/ β -catenin pathway in vivo. *PLoS Genet.* 2010.Vol. 6. №1.
33. *Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R.* Plakoglobin and beta-catenin: distinct but closely related. *Science* [Internet]. 1992.Vol. 257. №5073. P. 1142–4.
34. *Chaanine AH, Hajjar RJ.* AKT signalling in the failing heart. *Eur J Heart Fail* [Internet]. 2011.Vol. 13. №8. P. 825–9.
35. *Charpentier E, Lavker RM, Acquista E, Cowin P.* Plakoglobin suppresses

- epithelial proliferation and hair growth in vivo. *J Cell Biol* [Internet]. 2000.Vol. 149. №2. P. 503–20.
36. *Chen J, Kubalak SW, Chien KR*. Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development* [Internet]. 1998.Vol. 10. №125. P. 1943–9.
 37. *Chen SN, Gurha P, Lombardi R, Ruggiero A, Willerson JT, Marian AJ*. The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2014.Vol. 114. №3.
 38. *Chen VC, Stull R, Joo D, Cheng X, Keller G*. Notch signaling respecifies the hemangioblast to a cardiac fate. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2008.Vol. 26. №10. P. 1169–78.
 39. *Chen X, Shevtsov SP, Hsich E, Cui L, Haq S, Aronovitz M, et al*. The beta-catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2006.Vol. 26. №12. P. 4462–73.
 40. *Chiang M, Wang Q, Gormley A, Stein S, Xu L, Shestova O, et al*. High selective pressure for Notch1 mutations that induce Myc in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2016. P. Epub ahead of print.
 41. *Choi SH, Estarás C, Moresco JJ, Yates JR, Jones KA, Jones KA*. α -Catenin interacts with APC to regulate β -catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes. *Genes Dev* [Internet]. 2013.Vol. 27. №22. P. 2473–88.
 42. *Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, et al*. 14-3-3 ζ negatively regulates Raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem*. 1997.Vol. 272. №34. P. 20990–3.
 43. *Clevers H*. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* [Internet]. 2006.Vol. 127. №3. P. 469–80.
 44. *Clevers H*. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006.Vol. 127. №3. P. 469–80.
 45. *Cohen ED, Tian Y, Morrisey EE*. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development* [Internet]. 2008.Vol. 135. №5. P. 789–98.
 46. *Cohen ED, Miller MF, Wang Z, Moon RT, Morrisey EE*. Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. *Development* [Internet]. 2012.Vol. 139. №11. P. 1931–40.
 47. *Dai Z, Aoki T, Fukumoto Y, Shimokawa H*. Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. *J Cardiol* [Internet]. 2012.Vol. 60. №5. P. 416–21.

48. *Dang C V., Resar LM, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, et al.* Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res.* 1999.Vol. 253. №1. P. 63–77.
49. *Dawson K, Aflaki M, Nattel S.* Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential. *J Physiol [Internet].* 2013.Vol. 591. №Pt 6. P. 1409–32.
50. *Deb A.* Cell-cell interaction in the heart via Wnt/ β -catenin pathway after cardiac injury. *Cardiovasc Res [Internet].* 2014.Vol. 102. №2. P. 214–23.
51. *Delmar M, McKenna WJ.* The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res [Internet].* 2010.Vol. 107. №6. P. 700–14.
52. *Deng H, Dokshin GA, Lei J, Goldsmith AM, Bitar KN, Fingar DC, et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β is sufficient for airway smooth muscle hypertrophy. *J Biol Chem.* 2008.Vol. 283. №15. P. 10198–207.
53. *Dirkx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ.* Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet].* 2013.Vol. 1832. №12. P. 2414–24.
54. *Du C, Jaggi M, Zhang C, Balaji KC.* Protein Kinase D1-Mediated Phosphorylation and Subcellular Localization of β -Catenin. *Cancer Res [Internet].* 2009.Vol. 69. №3. P. 1117–24.
55. *Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature [Internet].* 2011.Vol. 474. №7350. P. 179–83.
56. *Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber EC, Bialucha CU, Adams J, et al.* Casein Kinase 1 Is a Novel Negative Regulator of E-Cadherin-Based Cell-Cell Contacts. *Mol Cell Biol [Internet].* 2007.Vol. 27. №10. P. 3804–16.
57. *Duval C, Fruchart JC, Staels B.* PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation. *Arch Mal Coeur Vaiss [Internet].* 2004.Vol. 97. №6. P. 665–72.
58. *Dyck JRB, Kudo N, Barr AJ, Davies SP, Hardie DG, Lopaschuk GD.* Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *Eur J Biochem [Internet].* 1999.Vol. 262. №1. P. 184–90.
59. *Dyck JRB, Lopaschuk GD.* AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol [Internet].* 2006.Vol. 574. №1. P. 95–112.
60. *Estigoy CB, Pontén F, Odeberg J, Herbert B, Guilhaus M, Charleston M, et al.* Intercalated discs: multiple proteins perform multiple functions in non-failing and failing human hearts. *Biophys Rev [Internet].* 2009.Vol. 1. №1. P. 43–9.

61. *Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE.* Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* [Internet]. 2003.Vol. 36. №12. P. 1751–9.
62. *Fagotto F, Funayama N, Gluck U, Gumbiner BM.* Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* [Internet]. 1996.Vol. 132. №6. P. 1105–14.
63. *Ferreira-Cornwell MC, Luo Y, Narula N, Lenox JM, Lieberman M, Radice GL.* Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart. *J Cell Sci* [Internet]. 2002.Vol. 115. №Pt 8. P. 1623–34.
64. *Filipovich A, Gehrke I, Poll-Wolbeck SJ, Kreuzer K-A.* Physiological inhibitors of Wnt signaling. *Eur J Haematol* [Internet]. 2011.Vol. 86. №6. P. 453–65.
65. *Freire AG, Resende TP, Pinto-do-Ó P.* Building and Repairing the Heart: What Can We Learn from Embryonic Development? *Biomed Res Int.* 2014.Vol. 2014 P.1–8.
66. *Friedrich G, Soriano P.* Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. 1991.Vol. 5. №9.
67. *Fu V, Plouffe SW, Guan K-L.* The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2017.Vol. 49 P. 99–107.
68. *Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL.* Phosphorylation of Titin Modulates Passive Stiffness of Cardiac Muscle in a Titin Isoform-dependent Manner. *J Gen Physiol* [Internet]. 2005.Vol. 125. №3. P. 257–71.
69. *Funayama N, Fagotto F, McCrea P, Gumbiner BM.* Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling. *J Cell Biol* [Internet]. 1995.Vol. 128. №5. P. 959–68.
70. *Furey TS.* ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2012.Vol. 13. №12. P. 840–52.
71. *Gandhi MS, Kamalov G, Shahbaz AU, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Sun Y, et al.* Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis. *Heart Fail Rev* [Internet]. 2011.Vol. 16. №1. P. 23–34.
72. *Giannini AL, Vivanco M d. M, Kypta RM.* Analysis of β -Catenin Aggregation and Localization Using GFP Fusion Proteins: Nuclear Import of α -Catenin by the β -Catenin/Tcf Complex. *Exp Cell Res* [Internet]. 2000.Vol. 255. №2. P. 207–20.
73. *Giannini AL, Vivanco M d. M, Kypta RM.* α -Catenin Inhibits β -Catenin Signaling by Preventing Formation of a β -Catenin•T-cell Factor•DNA

- Complex. *J Biol Chem* [Internet]. 2000. Vol. 275. №29. P. 21883–8.
74. *Giepmans BNG, van IJzendoorn SCD*. Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009. Vol. 1788. №4. P. 820–31.
 75. *Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, van Langen IM, Sandkuijl L, et al*. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res* [Internet]. 2003. Vol. 92. №1. P. 14–22.
 76. *Grond-Ginsbach C, Chen B, Pjontek R, Wiest T, Jiang Y, Burwinkel B, et al*. Copy number variation in patients with cervical artery dissection. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2012. Vol. 20. №12. P. 1295–9.
 77. *Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K, Kemler R*. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* [Internet]. 1995. Vol. 121. №11. P. 3529–37.
 78. *Hahn J-Y, Cho H-J, Bae J-W, Yuk H-S, Kim K-I, Park K-W, et al*. Beta-catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* [Internet]. 2006. Vol. 281. №41. P. 30979–89.
 79. *Hallam D, Hilgen G, Dorgau B, Zhu L, Yu M, Bojic S, et al*. Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generate Light Responsive Retinal Organoids with Variable and Nutrient-Dependent Efficiency. *Stem Cells* [Internet]. 2018. Vol. 36. №10. P. 1535–51.
 80. *Hardt, S. E., Sadoshima J*. Glycogen Synthase Kinase-3 β : A Novel Regulator of Cardiac Hypertrophy and Development. *Circ Res*. 2002. Vol. 90. №10. P. 1055–63.
 81. *Harmon RM, Green KJ*. Structural and Functional Diversity of Desmosomes. *Cell Commun Adhes* [Internet]. 2013. Vol. 20. №6. P. 171–87.
 82. *Hasham MG, Baxan N, Stuckey DJ, Branca J, Perkins B, Dent O, et al*. Systemic autoimmunity induced by the TLR7/8 agonist Resiquimod causes myocarditis and dilated cardiomyopathy in a new mouse model of autoimmune heart disease. *Dis Model Mech* [Internet]. 2017. Vol. 10. №3. P. 259–70.
 83. *Haybar H, Khodadi E, Shahrabi S*. Wnt/ β -catenin in ischemic myocardium: interactions and signaling pathways as a therapeutic target. *Heart Fail Rev* [Internet].
 84. *He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al*. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* [Internet]. 1998. Vol. 281. №5382. P. 1509–12.
 85. *Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, et al*.

- Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size. *Science* (80-) [Internet]. 2012. Vol. 332. №6028. P. 458–61.
86. *Heasman J, Crawford A, Goldstone K, Garner-Hamrick P, Gumbiner B, McCrea P, et al.* Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* [Internet]. 1994. Vol. 79. №5. P. 791–803.
 87. *Heineke J, Molkentin JD.* Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2006. Vol. 7. №8. P. 589–600.
 88. *van Hengel J, Calore M, Bauce B, Dazzo E, Mazzotti E, De Bortoli M, et al.* Mutations in the area composita protein α T-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* [Internet]. 2013. Vol. 34. №3. P. 201–10.
 89. *Herrenknecht K, Ozawa M, Eckerskorn C, Lottspeich F, Lenter M, Kemler R.* The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1991. Vol. 88. №20. P. 9156–60.
 90. *Hirschy A, Croquelois A, Perriard E, Schoenauer R, Agarkova I, Hoerstrup SP, et al.* Stabilised beta-catenin in postnatal ventricular myocardium leads to dilated cardiomyopathy and premature death. *Basic Res Cardiol* [Internet]. 2010. Vol. 105. №5. P. 597–608.
 91. *Hirschy A, Schatzmann F, Ehler E, Perriard J-C.* Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev Biol.* 2006. Vol. 289. №2. P. 430–41.
 92. *van den Hoff MJ, Kruithof BP, Moorman AF.* Making more heart muscle. *BioEssays* [Internet]. 2004. Vol. 26. №3. P. 248–61.
 93. *Hoppel CL.* Carnitine and carnitine palmitoyltransferase in fatty acid oxidation and ketosis. *Fed Proc* [Internet]. 1982. Vol. 41. №12. P. 2853–7.
 94. *Horman S, Vertommen D, Heath R, Neumann D, Mouton V, Woods A, et al.* Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem* [Internet]. 2006. Vol. 281. №9. P. 5335–40.
 95. *Hotchkiss A, Robinson J, MacLean J, Feridooni T, Wafa K, Pasumarthi KBS.* Role of D-type cyclins in heart development and disease. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2012. Vol. 90. №9. P. 1197–207.
 96. *Hou N, Ye B, Li X, Margulies KB, Xu H, Wang X, et al.* Transcription Factor 7-like 2 Mediates Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling and c-Myc Upregulation in Heart Failure. *Circ Hear Fail* [Internet]. 2016. Vol. 9. №6.
 97. *Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W.*

- Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* [Internet]. 2000.Vol. 148. №3. P. 567–78.
98. *Hwang S-G, Yu S-S, Ryu J-H, Jeon H-B, Yoo Y-J, Eom S-H, et al.* Regulation of β -Catenin Signaling and Maintenance of Chondrocyte Differentiation by Ubiquitin-independent Proteasomal Degradation of α -Catenin. *J Biol Chem* [Internet]. 2005.Vol. 280. №13. P. 12758–65.
 99. *Hyafil F, Morello D, Babinet C, Jacob F.* A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* [Internet]. 1980.Vol. 21. №3. P. 927–34.
 100. *Inge LJ, Rajasekaran S a, Wolle D, Barwe SP, Ryazantsev S, Ewing CM, et al.* alpha-Catenin overrides Src-dependent activation of beta-catenin oncogenic signaling. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2008.Vol. 7. №6. P. 1386–97.
 101. *Jain R, Li D, Gupta M, Manderfield LJ, Ifkovits JL, Wang Q, et al.* Integration of Bmp and Wnt signaling by Hopx specifies commitment of cardiomyoblasts. *Science* (80-) [Internet]. 2015.Vol. 348. №6242. P. aaa6071–aaa6071.
 102. *Janssen K, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P, et al.* APC and Oncogenic KRAS Are Synergistic in Enhancing Wnt Signaling in Intestinal Tumor Formation and Progression. *Gastroenterology* [Internet]. 2006.Vol. 131. №4. P. 1096–109.
 103. *Janssens B, Goossens S, Staes K, Gilbert B, van Hengel J, Colpaert C, et al.* alphaT-catenin: a novel tissue-specific beta-catenin-binding protein mediating strong cell-cell adhesion. *J Cell Sci* [Internet]. 2001.Vol. 114. №Pt 17. P. 3177–88.
 104. *Janssens B, Mohapatra B, Vatta M, Goossens S, Vanpoucke G, Kools P, et al.* Assessment of the CTNNA3 gene encoding human alpha T-catenin regarding its involvement in dilated cardiomyopathy. *Hum Genet* [Internet]. 2003.Vol. 112. №3. P. 227–36.
 105. *Jho E, Zhang T, Domon C, Joo C, Freund J, Costantini F.* Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol Cell Biol*. 2002.Vol. 22. №4. P. 1172–84.
 106. *Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, F. C.* Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2002.Vol. 22. №4. P. 1172–83.
 107. *Ji H, Wang J, Fang B, Fang X, Lu Z.* α -Catenin inhibits glioma cell migration, invasion, and proliferation by suppression of β -catenin transactivation. *J Neurooncol* [Internet]. 2011.Vol. 103. №3. P. 445–51.
 108. *Jia H, King IN, Chopra SS, Wan H, Ni TT, Jiang C, et al.* Vertebrate heart growth is regulated by functional antagonism between Gridlock and Gata5.

- Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2007.Vol. 104. №35. P. 14008–13.
109. *Jin T, George Fantus I, Sun J.* Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal* [Internet]. 2008.Vol. 20. №10. P. 1697–704.
 110. *Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ.* The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev* [Internet]. 1995.Vol. 9. №5. P. 534–46.
 111. *Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S.* Morphological and Molecular Characterization of Adult Cardiomyocyte Apoptosis During Hypoxia and Reoxygenation. *Circ Res* [Internet]. 2000.Vol. 87. №2.
 112. *Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Verstreken P, Hiesinger PR, Bellen HJ, et al.* Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development* [Internet]. 2002.Vol. 129. №24. P. 5719–30.
 113. *KANNO M, AOYAMA Y, ISA Y, YAMAMOTO Y, KITAJIMA Y.* p120 catenin is associated with desmogleins when desmosomes are assembled in high-Ca²⁺ medium but not when disassembled in low-Ca²⁺ medium in DJM-1 cells. *J Dermatol* [Internet]. 2008.Vol. 35. №6. P. 317–24.
 114. *Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Spiliopoulou C, Anastasakis A, et al.* Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Hear Rhythm* [Internet]. 2004.Vol. 1. №1. P. 3–11.
 115. *Kass DA, Maughan WL, Guo ZM, Kono A, Sunagawa K, Sagawa K.* Comparative influence of load versus inotropic states on indexes of ventricular contractility: experimental and theoretical analysis based on pressure-volume relationships. *Circulation* [Internet]. 1987.Vol. 76. №6. P. 1422–36.
 116. *Katoh Y, Katoh M.* Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med.* 2009.Vol. 9. №7. P. 873–86.
 117. *Kaufman MH.* The Atlas of Mouse Development. Academic Press; 1992. 512 p.
 118. *Kemler R, Babinet C, Eisen H, Jacob F.* Surface antigen in early differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977.Vol. 74. №10. P. 4449–52.
 119. *Kennell JA, MacDougald OA.* Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* [Internet]. 2005.Vol. 280. №25. P. 24004–10.
 120. *Kikuchi A.* Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal.* 1999.Vol. 11. №11. P. 777–88.

121. *Kirchhof P, Fabritz L, Zwiener M, Witt H, Schäfers M, Zellerhoff S, et al.* Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation* [Internet]. 2006.Vol. 114. №17. P. 1799–806.
122. *Klaus A, Saga Y, Taketo MM, Tzahor E, Birchmeier W.* Distinct roles of Wnt/ β -catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007.Vol. 104. №47. P. 18531–6.
123. *Kodama S, Ikeda S, Asahara T, Kishida M, Kikuchi A.* Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability. *J Biol Chem* [Internet]. 1999.Vol. 274. №39. P. 27682–8.
124. *Kolligs FT, Kolligs B, Hajra KM, Hu G, Tani M, Cho KR, et al.* gamma-Catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev* [Internet]. 2000.Vol. 14. №11. P. 1319–31.
125. *Kontaridis MI, Geladari E V., Geladari C V.* Pathways to myocardial hypertrophy in *Introduction to Translational Cardiovascular Research*. 1st ed. D. V. Cokkinos, editor. *Introduction to Translational Cardiovascular Research*. Cham: Springer International Publishing; 2015. 167–186 p.
126. *Kostetskii I, Li J, Xiong Y, Zhou R, Ferrari V a, Patel V V, et al.* Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ Res* [Internet]. 2005.Vol. 96. №3. P. 346–54.
127. *Kostetskii I, Moore R, Kemler R, Radice GL.* Differential Adhesion Leads to Segregation and Exclusion of N-Cadherin-Deficient Cells in Chimeric Embryos. *Dev Biol* [Internet]. 2001.Vol. 234. №1. P. 72–9.
128. *Kotini M, Barriga EH, Leslie J, Gentzel M, Rauschenberger V, Schambony A, et al.* Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo. *Nat Commun* [Internet]. 2018.Vol. 9. №1. P. 3846.
129. *Krüger M, Linke WA.* Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006.Vol. 27. №5–7. P. 435–44.
130. *Kwon C, Qian L, Cheng P, Nigam V, Arnold J, Srivastava D.* A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Is11 determines cardiac progenitor cell fate. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009.Vol. 11. №8. P. 951–7.
131. *Lee C-H, Inoki K, Guan K-L.* mTOR Pathway as a Target in Tissue Hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2007.Vol. 47. №1. P. 443–67.
132. *Lee C-Y, Kuo WW, Baskaran R, Day CH, Pai PY, Lai CH, et al.* Increased β -Catenin Accumulation and Nuclear Translocation are Associated with

Concentric Hypertrophy in Cardiomyocytes. *Cardiovasc Pathol*. 2017.

133. *Lee H-C, Tsai J-N, Liao P-Y, Tsai W-Y, Lin K-Y, Chuang C-C, et al.* Glycogen synthase kinase 3 α and 3 β have distinct functions during cardiogenesis of zebrafish embryo. *BMC Dev Biol* [Internet]. 2007.Vol. 7. №1. P. 93.
134. *Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S.* Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* [Internet]. 1999.Vol. 274. №30. P. 21464–70.
135. *Li J, Levin MD, Xiong Y, Petrenko N, Patel V V., Radice GL.* N-cadherin haploinsufficiency affects cardiac gap junctions and arrhythmic susceptibility. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2008.Vol. 44. №3. P. 597–606.
136. *Li J, Goossens S, van Hengel J, Gao E, Cheng L, Tyberghein K, et al.* Loss of α T-catenin alters the hybrid adhering junctions in the heart and leads to dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmia following acute ischemia. *J Cell Sci* [Internet]. 2012.Vol. 125. №Pt 4. P. 1058–67.
137. *Li J, Gao E, Vite A, Yi R, Gomez L, Goossens S, et al.* Alpha-catenins control cardiomyocyte proliferation by regulating yap activity. *Circ Res*. 2015.Vol. 116. №1. P. 70–9.
138. *Li J, Swope D, Raess N, Cheng L, Muller EJ, Radice GL.* Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of β -catenin signaling. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2011.Vol. 31. №6. P. 1134–44.
139. *Li P, Silvis MR, Honaker Y, Lien W-HH, Arron ST, Vasioukhin V.* α E-catenin inhibits a Src-YAP1 oncogenic module that couples tyrosine kinases and the effector of Hippo signaling pathway. *Genes Dev* [Internet]. 2016.Vol. 30. №7. P. 798–811.
140. *Lickert H, Kutsch S, Kanzler B, Tamai Y, Taketo MM, Kemler R.* Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev Cell* [Internet]. 2002.Vol. 3. №2. P. 171–81.
141. *Light Y, Paterson H, Marais R.* 14-3-3 Antagonizes Ras-Mediated Raf-1 Recruitment to the Plasma Membrane To Maintain Signaling Fidelity. 2002.Vol. 22. №14. P. 4984–96.
142. *Liu ET, Pott S, Huss M.* Q&A: ChIP-seq technologies and the study of gene regulation. *BMC Biol* [Internet]. 2010.Vol. 8. №1. P. 56.
143. *Ljungberg O, Tibblin S.* Peroperative fat staining of frozen sections in primary hyperparathyroidism. *Am J Pathol* [Internet]. 1979.Vol. 95. №3. P. 633–41.
144. *Lombardi R, Cabreira-hansen MG, Bell A.* Nuclear Plakoglobin Is Essential for Differentiation of Cardiac Progenitor Cells to Adipocytes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2011.Vol. 109. №12. P. 1342–53.

145. *Lübckemeier I, Requardt RP, Lin X, Sasse P, Andrié R, Schrickel JW, et al.* Deletion of the last five C-terminal amino acid residues of connexin43 leads to lethal ventricular arrhythmias in mice without affecting coupling via gap junction channels. *Basic Res Cardiol* [Internet]. 2013.Vol. 108. №3. P. 348.
146. *Luo Y, Ferreira-Cornwell M, Baldwin H, Kostetskii I, Lenox J, Lieberman M, et al.* Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin. *Development* [Internet]. 2001.Vol. 128. №4. P. 459–69.
147. *Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M.* Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol* [Internet]. 1990.Vol. 111. №6 Pt 1. P. 2427–36.
148. *Maeda M, Holder E, Lowes B, Valent S, Bies RD.* Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculin. *Circulation* [Internet]. 1997.Vol. 95. №1. P. 17–20.
149. *Maeda O, Usami N, Kondo M, Takahashi M, Goto H, Shimokata K, et al.* Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene* [Internet]. 2004.Vol. 23. №4. P. 964–72.
150. *Mahendram S, Kelly KF, Paez-Parent S, Mahmood S, Polena E, Cooney AJ, et al.* Ectopic γ -catenin Expression Partially Mimics the Effects of Stabilized β -catenin on Embryonic Stem Cell Differentiation. *Gottardi C, editor. PLoS One* [Internet]. 2013.Vol. 8. №5. P. e65320.
151. *Malekar P, Hagenmueller M, Anyanwu A, Buss S, Streit MR, Weiss CS, et al.* Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. *Hypertension* [Internet]. 2010.Vol. 55. №4. P. 939–45.
152. *Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.* *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.
153. *Mao X, Li P, Wang Y, Liang Z, Liu J, Li J, et al.* CRB3 regulates contact inhibition by activating the Hippo pathway in mammary epithelial cells. *Cell Death Dis* [Internet]. 2017.Vol. 8. №1. P. e2546–e2546.
154. *Maretto S, Cordenonsi M, Dupont S, Braghetta P, Broccoli V, Hassan a B, et al.* Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003.Vol. 100. №6. P. 3299–304.
155. *Marfella R, Di Filippo C, Portoghese M, Barbieri M, Ferraraccio F, Siniscalchi M, et al.* Myocardial lipid accumulation in patients with pressure-overloaded heart and metabolic syndrome. *J Lipid Res* [Internet]. 2009.Vol. 50. №11. P. 2314–23.
156. *Marinou K, Christodoulides C, Antoniadis C, Koutsilieris M.* Wnt signaling in

- cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol Metab.* 2012. Vol. 23. №12. P. 628–36.
157. *Matsui Y, Nakano N, Shao D, Gao S, Luo W, Hong C, et al.* Lats2 Is a Negative Regulator of Myocyte Size in the Heart. *Circ Res* [Internet]. 2008. Vol. 103. №11. P. 1309–18.
 158. *Mayosi BM, Fish M, Shaboodien G, Mastantuono E, Kraus S, Wieland T, et al.* Identification of Cadherin 2 (CDH2) Mutations in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2017. Vol. 10. №2.
 159. *MBInfo contributors.* Hpo Pathway Schematic. 2014.
 160. *McGrath JA.* Inherited disorders of desmosomes. *Australas J Dermatol* [Internet]. 2005. Vol. 46. №4. P. 221–9.
 161. *McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, et al.* Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* [Internet]. 2000. Vol. 355. №9221. P. 2119–24.
 162. *Meilhac SM, Esner M, Kelly RG, Nicolas J-F, Buckingham ME.* The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell* [Internet]. 2004. Vol. 6. №5. P. 685–98.
 163. *Merdek KD, Nguyen NT, Toksoz D.* Distinct activities of the alpha-catenin family, alpha-catenin and alpha-catenin, on beta-catenin-mediated signaling. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2004. Vol. 24. №6. P. 2410–22.
 164. *Mikels AJ, Nusse R.* Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *Arias AM, editor. PLoS Biol* [Internet]. 2006. Vol. 4. №4. P. e115.
 165. *Mollova M, Bersell K, Walsh S, Savla J, Das LT, Park S-Y, et al.* Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. Vol. 110. №4. P. 1446–51.
 166. *Mondry A, Swynghedauw B.* Biological adaptation of the myocardium to chronic mechanical overload. Molecular determinants of the autonomic nervous system. *Eur Heart J* [Internet]. 1995. Vol. 16 Suppl I P. 64–73.
 167. *Mueller T, Dieplinger B, Gegenhuber A, Poelz W, Pacher R, Haltmayer M.* Increased plasma concentrations of soluble ST2 are predictive for 1-year mortality in patients with acute destabilized heart failure. *Clin Chem* [Internet]. 2008. Vol. 54. №4. P. 752–6.
 168. *Murray B, Hoorntje ET, te Riele ASJM, Tichnell C, van der Heijden JF, Tandri H, et al.* Identification of sarcomeric variants in probands with a clinical diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC). *J Cardiovasc Electrophysiol* [Internet]. 2018. Vol. 29. №7. P. 1004–9.

169. *Naito AT, Shiojima I, Komuro I.* Wnt Signaling and Aging-Related Heart Disorders. *Circ Res.* 2010.Vol. 107. №11. P. 1295–303.
170. *Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA.* Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest* [Internet]. 1997.Vol. 100. №9. P. 2362–70.
171. *Nakato R, Shirahige K.* Recent advances in ChIP-seq analysis: from quality management to whole-genome annotation. *Brief Bioinform* [Internet]. 2016.Vol. 18. №2. P. bbw023.
172. *Neumann S, Schneider M, Daugherty RL, Gottardi CJ, Eming S a, Beijer A, et al.* Nesprin-2 interacts with α -catenin and regulates Wnt signaling at the nuclear envelope. *J Biol Chem* [Internet]. 2010.Vol. 285. №45. P. 34932–8.
173. *Niehrs C.* The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012.Vol. 13. №12. P. 767–79.
174. *Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K.* Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* [Internet]. 2011.Vol. 57. №2. P. 131–40.
175. *Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, et al.* The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* [Internet]. 2009.Vol. 16. №3. P. 398–410.
176. *Noorman M, van der Heyden MAG, van Veen TAB, Cox MG PJ, Hauer RNW, de Bakker JMT, et al.* Cardiac cell–cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2009.Vol. 47. №1. P. 23–31.
177. *Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, et al.* Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2000.Vol. 9. №18. P. 2761–6.
178. *Norman M, Simpson M, Mogensen J, Shaw A, Hughes S, Syrris P, et al.* Novel mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy. *Circulation* [Internet]. 2005.Vol. 112. №5. P. 636–42.
179. *Nusse R, Varmus HE.* Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* [Internet]. 1982.Vol. 31. №1. P. 99–109.
180. *Obrador-Hevia A, Chin S-F, González S, Rees J, Vilardell F, Greenson JK, et al.* Oncogenic KRAS is not necessary for Wnt signalling activation in APC-associated FAP adenomas. *J Pathol* [Internet]. 2010.Vol. 221. №1. P. 57–67.
181. *Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Hidi L, Lux Á, Ruppert M, et al.* Physiological

- and pathological left ventricular hypertrophy of comparable degree is associated with characteristic differences of in vivo hemodynamics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015. P. ajpheart.00588.2015.
182. *Olinde, M.D KD, O'Connell, M.D JB*. INFLAMMATORY HEART DISEASE: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment of Myocarditis. *Annu Rev Med [Internet]*. 1994.Vol. 45. №1. P. 481–90.
 183. *Ozawa M, Baribault H, Kemler R*. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J [Internet]*. 1989.Vol. 8. №6. P. 1711–7.
 184. *Padala RR, Karnawat R, Viswanathan SB, Thakkar AV, Das AB, Hanna S, et al*. Cancerous perturbations within the ERK, PI3K/Akt, and Wnt/ β -catenin signaling network constitutively activate inter-pathway positive feedback loops. *Mol BioSyst [Internet]*. 2017.Vol. 13. №5. P. 830–40.
 185. *Palchevska OL, Macewicz LL, Piven OO*. A link between β -catenin and hypertrophy: evaluation and meta-analysis. *Biopolym Cell*. 2016.Vol. 32 P. 150–7.
 186. *Pan D*. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell [Internet]*. 2010.Vol. 19. №4. P. 491–505.
 187. *Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P*. Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol [Internet]*. 1996.Vol. 16. №5. P. 2128–34.
 188. *Park SH, Gammon SR, Knippers JD, Paulsen SR, Rubink DS, Winder WW*. Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol [Internet]*. 2002.Vol. 92. №6. P. 2475–82.
 189. *Peng X, Maiers JL, Choudhury D, Craig SW, DeMali K a*. α -Catenin uses a novel mechanism to activate vinculin. *J Biol Chem [Internet]*. 2012.Vol. 287. №10. P. 7728–37.
 190. *Piven OO, Palchevska OL, Lukash LL*. Role of Wnt/ β -catenin signaling in embryonic cardiogenesis, postnatal formation and reconstruction of myocardium. *Cytol Genet [Internet]*. 2014.Vol. 48. №5. P. 333–43.
 191. *Piven OO, Kostetskii IE, Macewicz LL, Kolomiets YM, Radice GL, Lukash LL*. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development. *Exp Biol Med (Maywood) [Internet]*. 2011.Vol. 236. №7. P. 816–22.
 192. *Piven OO, Winata CL*. The canonical way to make a heart: β -catenin and plakoglobin in heart development and remodeling. *Exp Biol Med*. 2017. P. 153537021773273.
 193. *Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al*. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science [Internet]*.

- 2011.Vol. 331. №6020. P. 1078–80.
194. *Pradhan D, Lombardo CR, Roe S, Rimm DL, Morrow JS.* α -Catenin Binds Directly to Spectrin and Facilitates Spectrin-Membrane Assembly *in Vivo*. *J Biol Chem* [Internet]. 2001.Vol. 276. №6. P. 4175–81.
 195. *Protonotarios N, Tsatsopoulou A.* Naxos disease and Carvajal syndrome: Cardiocutaneous disorders that highlight the pathogenesis and broaden the spectrum of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2004.Vol. 13. №4. P. 185–94.
 196. *Puchtler H, Sweat F.* Histochemical specificity of staining methods for connective tissue fibers: Resorcin-fuchsin and van Gieson's picro-fuchsin. *Histochemie* [Internet]. 1964.Vol. 4. №1. P. 24–34.
 197. *Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, et al.* Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007.Vol. 104. №35. P. 14074–9.
 198. *Qi D, Young LH.* AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2015.Vol. 26. №8. P. 422–9.
 199. *Qu J, Zhou J, Yi XP, Dong B, Zheng H, ML, et al.* Cardiac specific haploinsufficiency of β -catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction. *Mol Cell*. 2008.Vol. 43. №3. P. 319–26.
 200. *Qu J, Zhou J, Yi XP, Dong B, Zheng H, Miller LM, et al.* Cardiac-specific haploinsufficiency of beta-catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2007.Vol. 43. №3. P. 319–26.
 201. *Qyang Y, Martin-Puig S, Chiravuri M, Chen S, Xu H, Bu L, et al.* The Renewal and Differentiation of Isl1+ Cardiovascular Progenitors Are Controlled by a Wnt/ β -Catenin Pathway. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2007.Vol. 1. №2. P. 165–79.
 202. *Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO.* Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* [Internet]. 1997.Vol. 181. №1. P. 64–78.
 203. *Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, et al.* Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2002.Vol. 71. №5. P. 1200–6.
 204. *Rauskolb C, Sun S, Sun G, Pan Y, Irvine KD.* Cytoskeletal Tension Inhibits Hippo Signaling through an Ajuba-Warts Complex. *Cell* [Internet]. 2014.Vol.

158. №1. P. 143–56.
205. *Del Re DP, Matsuda T, Zhai P, Gao S, Clark GJ, Van Der Weyden L, et al.* Proapoptotic Rassf1A/Mst1 signaling in cardiac fibroblasts is protective against pressure overload in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2010. Vol. 120. №10. P. 3555–67.
206. *Del Re DP, Yang Y, Nakano N, Cho J, Zhai P, Yamamoto T, et al.* Yes-associated Protein Isoform 1 (Yap1) Promotes Cardiomyocyte Survival and Growth to Protect against Myocardial Ischemic Injury. *J Biol Chem* [Internet]. 2013. Vol. 288. №6. P. 3977–88.
207. *Rhee J, Ryu J-H, Kim J-H, Chun C-H, Chun J-S.* α -Catenin inhibits β -catenin-T-cell factor/lymphoid enhancing factor transcriptional activity and collagen type II expression in articular chondrocytes through formation of Gli3R. α -catenin. β -catenin ternary complex. *J Biol Chem* [Internet]. 2012. Vol. 287. №15. P. 11751–60.
208. *Rhett JM, Jourdan J, Gourdie RG.* Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2011. Vol. 22. №9. P. 1516–28.
209. *Rose BA, Force T, Wang Y.* Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev* [Internet]. 2010. Vol. 90. №4. P. 1507–46.
210. *Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P.* The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem* [Internet]. 1995. Vol. 270. №10. P. 5549–55.
211. *Rudloff S, Kemler R.* Differential requirements for β -catenin during mouse development. *Dev Stem Cells*. 2012. Vol. 139. №20. P. 3711–21.
212. *Ruiz-Villalba A, Hoppler S, van den Hoff MJB.* Wnt signaling in the heart fields: Variations on a common theme. *Dev Dyn* [Internet]. 2016. Vol. 245. №3. P. 294–306.
213. *Salameh A, Karl S, Djilali H, Dhein S, Janousek J, Daehnert I.* Opposing and synergistic effects of cyclic mechanical stretch and α - or β -adrenergic stimulation on the cardiac gap junction protein Cx43. *Pharmacol Res* [Internet]. 2010. Vol. 62. №6. P. 506–13.
214. *van de Schans V a M, van den Borne SWM, Strzelecka AE, Janssen BJ a, van der Velden JLJ, Langen RCJ, et al.* Interruption of Wnt signaling attenuates the onset of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* [Internet]. 2007. Vol. 49. №3. P. 473–80.
215. *Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszek J, Rodriguez JRR, Zhou D, et*

- al.* Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* [Internet]. 2011.Vol. 144. №5. P. 782–95.
216. *Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.* NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* [Internet]. 2012.Vol. 9. №7. P. 671–5.
217. *Schneider V a, Mercola M.* Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* [Internet]. 2001.Vol. 15. №3. P. 304–15.
218. *Schulze PC.* Myocardial lipid accumulation and lipotoxicity in heart failure. *J Lipid Res* [Internet]. 2009.Vol. 50. №11. P. 2137–8.
219. *Sehgal RN, Gumbiner BM, Reichardt LF.* Antagonism of cell adhesion by an alpha-catenin mutant, and of the Wnt-signaling pathway by alpha-catenin in *Xenopus* embryos. *J Cell Biol* [Internet]. 1997.Vol. 139. №4. P. 1033–46.
220. *Sheikh F, Chen Y, Liang X, Hirschy A, Stenbit AE, Gu Y, et al.* α -E-catenin inactivation disrupts the cardiomyocyte adherens junction, resulting in cardiomyopathy and susceptibility to wall rupture. *Circulation*. 2006.Vol. 114. №10. P. 1046–55.
221. *Shimizu M, Fukunaga Y, Ikenouchi J, Nagafuchi A.* Defining the roles of beta-catenin and plakoglobin in LEF/T-cell factor-dependent transcription using beta-catenin/plakoglobin-null F9 cells. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2008.Vol. 28. №2. P. 825–35.
222. *Silvis MR, Kreger BT, Lien W-HW-H, Klezovitch O, Rudakova GM, Camargo FD, et al.* α -Catenin Is a Tumor Suppressor That Controls Cell Accumulation by Regulating the Localization and Activity of the Transcriptional Coactivator Yap1. *Sci Signal* [Internet]. 2011.Vol. 4. №174. P. ra33–ra33.
223. *Simcha I, Shtutman M, Salomon D, Zhurinsky J, Sadot E, Geiger B, et al.* Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol* [Internet]. 1998.Vol. 141. №6. P. 1433–48.
224. *Sklepkiewicz P, Shiomi T, Kaur R, Sun J, Kwon S, Mercer B, et al.* Loss of secreted frizzled-related protein-1 leads to deterioration of cardiac function in mice and plays a role in human cardiomyopathy. *Circ Hear Fail*. 2015.Vol. 8. №2. P. 362–72.
225. *Smith FD, Scott JD.* Scaffolding proteins: not such innocent bystanders. *Curr Biol* [Internet]. 2013.Vol. 23. №12. P. R515-7.
226. *Srinivas M, Verselis VK, White TW.* Human diseases associated with connexin mutations. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2018.Vol. 1860. №1. P. 192–201.
227. *Srivastava D.* Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Cell* [Internet]. 2006.Vol. 126. №6. P. 1037–48.

228. *Sugden PH, Fuller SJ, Weiss SC, Clerk A.* Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Br J Pharmacol.* 2009.Vol. 153. №S1. P. S137–53.
229. *Swope D, Cheng L, Gao E, Li J, Radice GL.* Loss of cadherin-binding proteins β -catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis. *Mol Cell Biol [Internet].* 2012.Vol. 32. №6. P. 1056–67.
230. *Syrmou A, Tzetis M, Fryssira H, Kosma K, Oikonomakis V, Giannikou K, et al.* Array comparative genomic hybridization as a clinical diagnostic tool in syndromic and nonsyndromic congenital heart disease. *Pediatr Res [Internet].* 2013.Vol. 73. №6. P. 772–6.
231. *Takeichi M.* Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol [Internet].* 1977.Vol. 75. №2 Pt 1. P. 464–74.
232. *Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DCR, Schiripo TA, Haber DA, et al.* salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell [Internet].* 2002.Vol. 110. №4. P. 467–78.
233. *Tateishi A, Matsushita M, Asai T, Masuda Z, Kuriyama M, Kanki K, et al.* Effect of inhibition of glycogen synthase kinase-3 on cardiac hypertrophy during acute pressure overload. *Gen Thorac Cardiovasc Surg [Internet].* 2010.Vol. 58. №6. P. 265–70.
234. *Thakur J, Prinja S, Garg CC, Mendis S, Menabde N.* Social and Economic Implications of Noncommunicable diseases in India. *Indian J Community Med [Internet].* 2011.Vol. 36. №Suppl 1. P. S13-22.
235. *Thorson JA, Yu LW, Hsu AL, Shih NY, Graves PR, Tanner JW, et al.* 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol [Internet].* 1998.Vol. 18. №9. P. 5229–38.
236. *Torres M, Stoykova A, Huber O, Chowdhury K, Bonaldo P, Mansouri A, et al.* An alpha-E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 1997.Vol. 94. №3. P. 901–6.
237. *Tsai JS, Chao CH, Lin LY.* Cadmium activates multiple signaling pathways that coordinately stimulate Akt activity to enhance c-Myc mRNA stability. *PLoS One.* 2016.Vol. 11. №1. P. 1–22.
238. *Tu X, Joeng KS, Nakayama KI, Nakayama K, Rajagopal J, Carroll TJ, et al.* Noncanonical Wnt Signaling through G Protein-Linked PKC δ Activation Promotes Bone Formation. *Dev Cell [Internet].* 2007.Vol. 12. №1. P. 113–27.
239. *Varlakhanova N, Cotterman R, de Vries W, Morgan J, Donahue L, Murray S, et al.* Myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal.

- Differentiation. 2010.Vol. 80. №1. P. 9–19.
240. *Vasioukhin V, Bauer C, Degenstein L, Wise B, Fuchs E.* Hyperproliferation and Defects in Epithelial Polarity upon Conditional Ablation of α -Catenin in Skin. *Cell* [Internet]. 2001.Vol. 104. №4. P. 605–17.
 241. *Vermij SH, Abriel H, van Veen TAB.* Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2017.Vol. 113. №3. P. cvw259.
 242. *Vite A, Radice GL.* N-cadherin/catenin complex as a master regulator of intercalated disc function. *Cell Commun Adhes.* 2014.Vol. 21. №3.
 243. *Vite A, Li J, Radice GL.* New functions for alpha-catenins in health and disease: from cancer to heart regeneration. Vol. 360, *Cell and Tissue Research.* 2015. p. 773–83.
 244. *Vlad A, Röhrs S, Klein-Hitpass L, Müller O.* The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal* [Internet]. 2008.Vol. 20. №5. P. 795–802.
 245. *Wallis S, Lloyd S, Wise I, Ireland G, Fleming TP, Garrod D.* The α Isoform of Protein Kinase C Is Involved in Signaling the Response of Desmosomes to Wounding in Cultured Epithelial Cells. Nelson WJ, editor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2000.Vol. 11. №3. P. 1077–92.
 246. *Wang P, Mao B, Luo W, Wei B, Jiang W, Liu D, et al.* The alteration of Hippo/YAP signaling in the development of hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* [Internet]. 2014.Vol. 109. №5. P. 435.
 247. *Wang Q, Lin JL-C, Wu K-H, Wang D-Z, Reiter RS, Sinn HW, et al.* Xin proteins and intercalated disc maturation, signaling and diseases. Vol. 17, *Frontiers in bioscience (Landmark edition).* 2012. 2566–93 p.
 248. *Wang Q, Lin JL-C, Erives AJ, Lin C-I, Lin JJ-C.* New Insights into the Roles of Xin Repeat-Containing Proteins in Cardiac Development, Function, and Disease. In: *International review of cell and molecular biology* [Internet]. 2014. p. 89–128.
 249. *Watkins SJ, Borthwick GM, Oakenfull R, Robson A, Arthur HM.* Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro is TAK1-dependent and Smad2/3-independent. *Hypertens Res* [Internet]. 2012.Vol. 35. №4. P. 393–8.
 250. *Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ.* The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol* [Internet]. 1997.Vol. 138. №2. P. 375–84.
 251. *Wickline ED, Dale IW, Merkel CD, Heier JA, Stolz DB, Kwiatkowski A V.* α T-Catenin Is a Constitutive Actin-binding α -Catenin That Directly Couples the Cadherin·Catenin Complex to Actin Filaments. *J Biol Chem* [Internet].

- 2016.Vol. 291. №30. P. 15687–99.
252. *Wickline ED, Du Y, Stolz DB, Kahn M, Monga SPS.* γ -Catenin at adherens junctions: mechanism and biologic implications in hepatocellular cancer after β -catenin knockdown. *Neoplasia* [Internet]. 2013.Vol. 15. №4. P. 421–34.
253. *van Wijk B, van den Hoff M.* Epicardium and Myocardium Originate From a Common Cardiogenic Precursor Pool. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2010.Vol. 20. №1. P. 1–7.
254. *Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, et al.* European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. Eur Hear Network, Brussels [Internet]. 2017. P. 192.
255. *Willert K, Nusse R.* Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2012.Vol. 4. №9. P. a007864.
256. *Williams BO, Barish GD, Klymkowsky MW, Varmus HE.* A comparative evaluation of β -catenin and plakoglobin signaling activity. *Oncogene* [Internet]. 2000.Vol. 19. №50. P. 5720–8.
257. *Williamson L, Raess NA, Caldelari R, Zakher A, de Bruin A, Posthaus H, et al.* Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J* [Internet]. 2006.Vol. 25. №14. P. 3298–309.
258. *Wisniewska MB, Misztal K, Michowski W, Szczot M, Purta E, Lesniak W, et al.* LEF1/ -Catenin Complex Regulates Transcription of the Cav3.1 Calcium Channel Gene (*Cacna1g*) in Thalamic Neurons of the Adult Brain. *J Neurosci* [Internet]. 2010.Vol. 30. №14. P. 4957–69.
259. *Xi X-H, Wang Y, Li J, Wang F-W, Tian G-H, Yin M-S, et al.* Activation of Wnt/ β -catenin/GSK3 β signaling during the development of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol*. 2015.Vol. 24. №3. P. 179–86.
260. *Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Schwartz RJ, et al.* Regulation of Insulin-Like Growth Factor Signaling by Yap Governs Cardiomyocyte Proliferation and Embryonic Heart Size. *Sci Signal* [Internet]. 2011.Vol. 4. №196. P. ra70–ra70.
261. *Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W.* Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* [Internet]. 1995.Vol. 121. №4. P. 1053–63.
262. *Yamamoto S, Yang G, Zablocki D, Liu J, Hong C, Kim S-J, et al.* Activation of Mst1 causes dilated cardiomyopathy by stimulating apoptosis without compensatory ventricular myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* [Internet]. 2003.Vol. 111. №10. P. 1463–74.
263. *Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE.* A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep* [Internet].

- 2015.Vol. 12. №6. P. 937–43.
264. *Yao M, Qiu W, Liu R, Efremov AK, Cong P, Seddiki R, et al.* Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding. Vol. 5, Nature communications. 2014.
265. *Ye B, Hou N, Xiao L, Xu Y, Boyer J, Xu H, et al.* APC controls asymmetric Wnt/ β -catenin signaling and cardiomyocyte proliferation gradient in the heart. J Mol Cell Cardiol. 2015.Vol. 89 P. 287–96.
266. *Yim J-H, Baek J-H, Lee C-W, Kim M-J, Yun HS, Hong E-H, et al.* Identification of HDAC4 as a target of γ -catenin that regulates the oncogenic K-Ras-mediated malignant phenotype of Rat2 cells. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2013.Vol. 436. №3. P. 436–42.
267. *Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, Nagafuchi A, Shibata M.* α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. Nat Cell Biol [Internet]. 2010.Vol. 12. №6. P. 533–42.
268. *Yu J, Virshup DM.* Updating the Wnt pathways. Biosci Rep. 2014.Vol. 34. №5.
269. *Yuan R, Tsaih S-W, Petkova SB, De Evsikova CM, Xing S, Marion MA, et al.* Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. Aging Cell [Internet]. 2009.Vol. 8. №3. P. 277–87.
270. *Yun M, Kim S, Jeon SH, Lee J, Choi K.* Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. J Cell Sci [Internet]. 2005.Vol. 118. №Pt 2. P. 313–22.
271. *Zemljic-Harpf AE, Godoy JC, Platoshyn O, Asfaw EK, Busija AR, Domenighetti AA, et al.* Vinculin directly binds zonula occludens-1 and is essential for stabilizing connexin-43-containing gap junctions in cardiac myocytes. J Cell Sci [Internet]. 2014.Vol. 127. №5. P. 1104–16.
272. *Zemljic-Harpf AE, Miller JC, Henderson SA, Wright AT, Manso AM, Elsherif L, et al.* Cardiac-myocyte-specific excision of the vinculin gene disrupts cellular junctions, causing sudden death or dilated cardiomyopathy. Mol Cell Biol [Internet]. 2007.Vol. 27. №21. P. 7522–37.
273. *Zhang Y, Del Re DP.* A growing role for the Hippo signaling pathway in the heart. Vol. 95, Journal of Molecular Medicine. Springer Berlin Heidelberg; 2017. p. 465–72.
274. *Zhou Q, Li L, Zhao B, Guan K-L.* The Hippo Pathway in Heart Development, Regeneration, and Diseases. Circ Res [Internet]. 2015.Vol. 116. №8. P. 1431–47.
275. *Zhuang J, Yamada KA, Saffitz JE, Kléber AG.* Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes. Circ Res [Internet]. 2000.Vol. 87.

- №4. P. 316–22.
276. *Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev a.* Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000.Vol. 20. №12. P. 4238–52.
277. *Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Kowalczyk AP, Müller EJ, Jones JC, et al.* Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci* [Internet]. 2000.Vol. 113 (Pt 1. №18. P. 3127–39.
278. *Балацький ВВ, Пальчевська ОЛ, Мацевич ЛЛ, Півень ОО.* α -Е-катенін потенційний регулятор канонічного Wnt та HIPPO- сигналінгів у міокарді. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів [Internet]. 2016.Vol. 14. №2. P. 168–73.
279. *Бесага ЄМ.* Визначення вмісту натрійуретичних пептидів у плазмі крові як діагностичний та прогностичний маркер при серцевій недостатності. Актуальні діагностичні підходи. 2000. P. 12–7.
280. *Пальчевська ОЛ, Хазєєва АА, Мачушинець НВ, Рубан ТП, Мацевич ЛЛ, Півень ОО.* Вплив делеції гена β -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії. Фактори експериментальної еволюції організмів [Internet]. 2016.Vol. 18 P. 242–7.
281. WHO | WHO Mortality Database. WHO. World Health Organization; 2014.
282. Захворюваність населення — Головне управління статистики у Харківській області.
283. The Wnt Homepage.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1) **Півень О.О.** Костецький І.Є., Мацевич Л.Л., Коломієць Ю.М., Редіс Г., Лукаш Л.Л. Делеція гена N- кадєрину 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 функціонуванні міокарда//Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів – 2010– том 8, № 2 – с.320 – 333. (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 OO**, 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 експреиментальних груп тварин, обрахунки даних ПЛР)

7) **OO Piven**, OL Palchevska, LL Lukash. 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., Андрєєва 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 експеримента 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 експеримента та аналіз та обрахунки даних ПЛР аналізу,

узагальнення отриманих даних, написання статті, також дисертант приймав участь у експериментах із фізичного навантаження).

10) Palchevska O.L., Macewicz L.L., **Piven O.P.** 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 обробка 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., Хазєва А.А., Мачушинець Н.В., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., **Півень О.А.** Вплив делеції гена β -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії//Фактори експериментальної еволюції організмів, 2016. – Т.18. - С. 242-247. (Дисертантом особисто проведено планування роботи, виділення і культивування клітин, генотипування, аналіз і обробка первинних даних, написання статті).

13) Пальчевська О.Л., Хазєва А.А., Мачушинець Н.В., Балацький В.В., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., **Півень О.А.** Гетерозиготна делеція гену β -катеніну у ранньому кардіогенезі спричиняє затримку росту новонародженого серця і порушує кінетику канонічного WNT сигналіngu.// Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. - Т20. – С84 - 89 (Дисертантом особисто проведено планування роботи, виділення білка та аналіз змін вмісту білків, аналіз і обробка 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. - том 15(2). – С.181 – 186. (Дисертантом особисто проведено планування роботи, виділення білка та аналіз змін вмісту білків, аналіз і обробка 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, обробка даних, написання статті).

16) V. V. Balatskyi, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, **O. O. Piven.** 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) В. В. Балацький, І. Акименко, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень**, Л. Л. Лукаш. 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) В. В. Балацький, О. Л. Пальчевська, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень.** 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) **O.O Piven**, CL Winata. 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) В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень.** 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) В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень**. 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) В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, **О. О. Півень**. 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) В. Балацький, Л. Мацевич, **О. Півень** 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, поведено аналіз експресії генів та морфологічний аналіз, узагальнення отриманих даних, написання статті)

24) В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, Т. П. Рубан, **О. О. Півень** Білки-компоненти комплексів міжклітинної адгезії залучені до проліферації та розміру неонатальних кардіоіоцитів MUS MUSCULUS//Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2018. - том 16(1).– С.5-11. (Дисертантом особисто заплановано експериментальну роботу, проведено аналіз морфології та ПЛР, проведено узагальнення результатів та написання статті).

25) V V Balatskyi, LL Macewicz, AM Gan, SV Goncharov, P Pawelec, GV Portnichenko, TYu Lapikova-Bryginska, VO Navrulin, VE Dosenko, A Olichwier, P Dobrzyn, **OO Piven**. [Cardiospecific deletion of \$\alpha\$ 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, вестрен блоти, приготування парафінових та кріо блоків і зрізів тканини).

26) **О.О. Півень.** 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) O.Piven, L. Mazewich, L. Lukash, I. Kostetskii, G Radice N-cadherin-mediated adhesion in early heart development// European Journal of clinical Investigation. – 2008 – Vol.38 (1). – P.40.

28) O.Piven Requirement for N-cadherin-Catenin Complex in Cardiogenesis// EMBL Conference Stem Cells, Tissue Homeostasis and Cancer, 12-15 May 2010, EMBL Heidelberg, Germany.

29) O.Piven , 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) O.Piven , Kostetskii I , Macewicz L , 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., Балацкий В.В., Мацевич Л.Л., Півень О.О., Лукаш Л.Л. Структурна функція β-катеніну у післянатальному розвитку міокарду. Матеріали X 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 - P243

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., L. Macewicz, Piven O.O., L. Lukash Embrionically 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) V. Balatskyi, O. Palchevska, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven, L. Lukash V. 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.

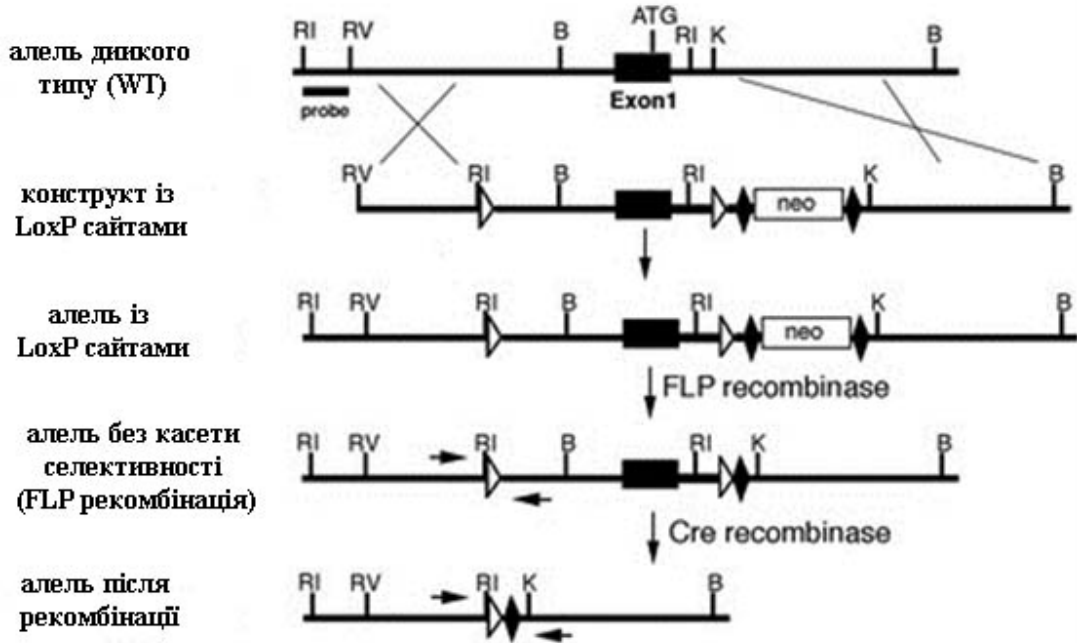
39) V. V. Balatskyi, O. L. Palchevska, L. L. Macewicz, O. O. Piven, L. L. Lukash. Loss of alpha-e-catenin in embrionic heart leads to dramatic malformation of adult heart // X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. Kyiv. – 2016.

40) V. Balatskyi, O. Palchevska, L. Macewicz, A. M. Gan, S. Goncharov, P. Pawelec, G. Portnichenko, T. Lapikova-Bryginska, V. Navrulin, V. Dosenko, P.

Dobrzyn, O. Piven 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.

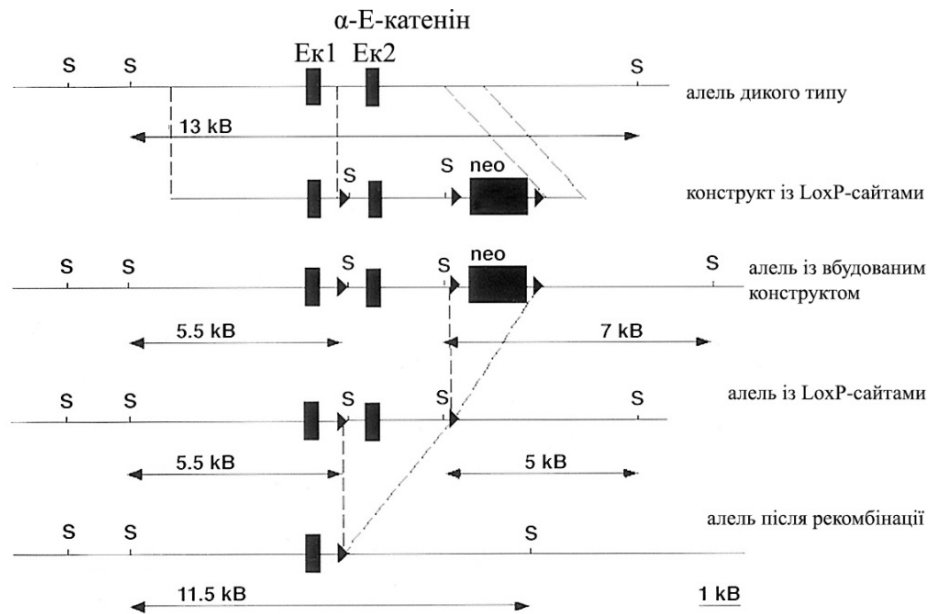
41) V. Vaskyvskyy, V. Balatskyi, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven Alpha-E-catenin in neonatal cardiomyocytes size regulation / / Joint Meeting of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology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

ДОДАТОК Б

Схема створення умовного нокаута гена *Cdh2* [126]

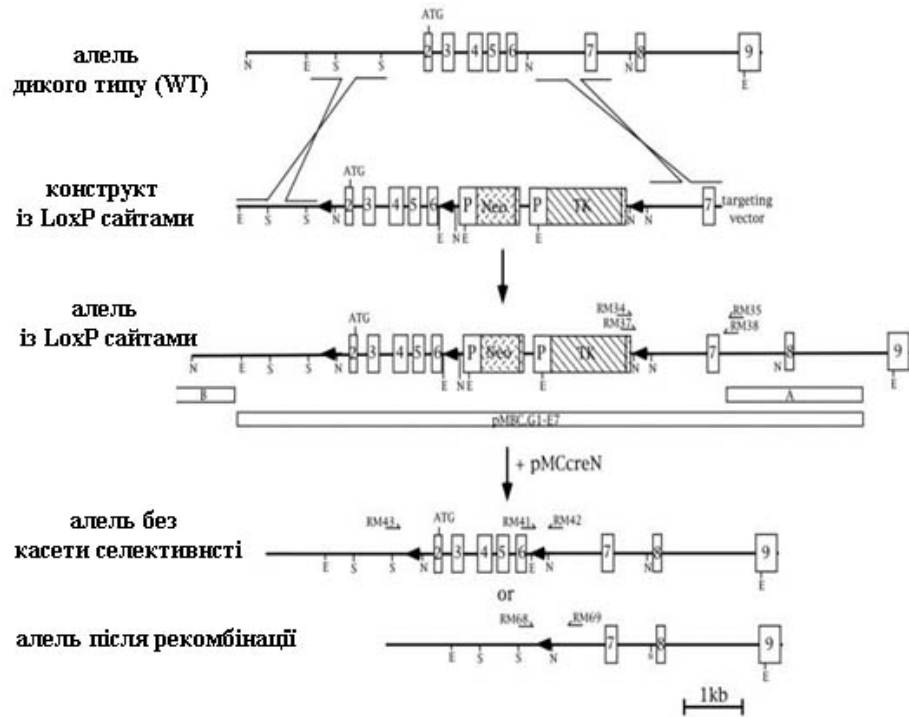
► – LoxP сайти, ■ – екзон, neo – касета із геном селективності.

ДОДАТОК В

Схема створення умовного нокаута гена *Cttna1* [240].

► – LoxP сайти, █ – екзон, █ – касета із геном селективності.

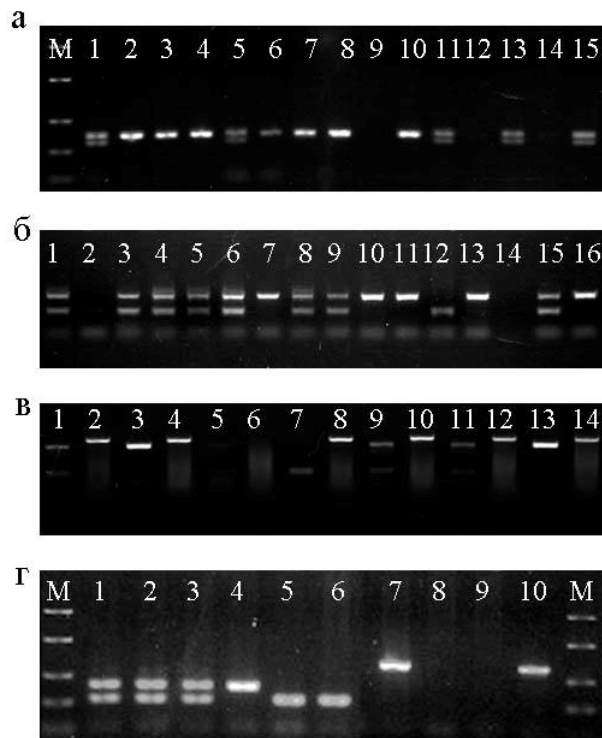
ДОДАТОК Г

Схема створення умовного нокаута гена *Cttnb1* [28]

► – LoxP сайти, – екзон, neo – касета із геном селективності.

ДОДАТОК Д

Електрофореграма розділення продуктів ПЛР результатів генотипування умовнонокаутних та трансгенних тварин, наведено результати ПЛР від окремих мишей



М- маркер молекулярної ваги (1500, 850, 400, 200, 50 п.о.); а - на наявність фланкованих алелів гена *Cdh2*. 1, 5, 11, 13, 15 - миші гетерозиготні за LoxP-сайтами у гені *Cdh2*, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 - миші гомозиготні за LoxP-сайтами у гені *Cdh2*, 9 – негативний контроль, 12, 14 – продукт ПЛР відсутній; б – на наявність трансгенів *Bat-Gal* (1 – 7) та *Rosa25R* (8-16). 2 і 14 – негативний контроль, 1, 3, 4, 5, 6 - гетерозиготні репортерні тварини *Bat-Gal*, 7, 10, 11, 13, 16 – тварини дикого типу, 8, 9, 15 – гетрозиготні репорні тварини *Rosa25R*, 12 – гомозиготна репортерна тварина *Rosa25R*; в- на наявність фланкованих алелів гена *Cttna1* та Cre-рекомбінази. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – результати ПЛР на наявність LoxP-сайтів у гені *Cttna1*. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 – результати ПЛР на наявність α -MHC-Cre-рекомбінази у геномі. 7 – миші гомозиготні за геном

Cttna1 дикого типу; 1, 9, 11 – миші гетерозиготні за геном *Cttna1*, 3, 5, 13 – миші гомозиготні за LoxP-сайтами у гені *Cttna1*. 2, 4, 8, 10, 12, 13 – миші із α -MHC-Cre-рекомбіназою в геномі; 6 – миша, яка не експресує α -MHC-Cre-рекомбінази в геномі; в- наявність фланкованих алелів гена *Cttnb1* та Cre-рекомбінази. 1 – 6 - результати ПЛР на наявність LoxP-сайтів у гені, 7-10 – результати ПЛР на наявність α -MHC-Cre-рекомбінази у геномі. 1-3 - миші гетерозиготні за геном *Cttnb1*, 4 - миша гомозиготна за LoxP-сайтами у гені *Cttnb1*, 5, 6 – миші гетерозиготні за LoxP-сайтами у гені *Cttnb1*, 7, 10 – тварини що містять у геномі ген α -MHC-Cre-рекомбінази, 8 – негативний контроль, 9 – тварина, що не експресує трансген α -MHC-Cre-рекомбінази