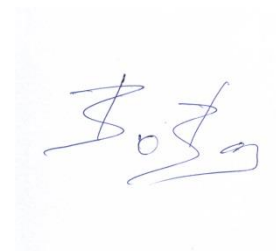


**ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**



БАЛАЦЬКИЙ Володимир Вікторович

УДК 575+576.52+577+616.1

Роль α -Е-катеніну у постнатальному розвитку серця

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий керівник: кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Півень Оксана Олександрівна.

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

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

Захист відбудеться “27” листопада 2018 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

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

Автореферат розіслано “__” _____ 2018 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., с.н.с.

 **І.В.Крупська**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Серцево-судинні захворювання (ССЗ) займають перше місце серед причин смерті та інвалідизації у всьому світі. За даними ВООЗ у 2015 році від серцево-судинних хвороб загинуло 17,7 млн людей, що становить 31% від усіх смертей (Wilkins et al., 2017). В Україні, це також нагальна проблема і, наприклад, лише в 2014 році від серцево-судинних загинуло 425607 людей, що складає 67,3% від усіх зареєстрованих смертей (Wilkins et al., 2017). Окрім того ССЗ, є причиною інвалідизації населення, у тому числі і працездатного, що з одного боку є вагомим фактором погіршення рівня та якості життя і обмеженням індивідуальних можливостей пацієнтів. З іншого боку поширеність ССЗ та інвалідизація і летальність спричинена цією групою патологій мають і вагоме соціально-економічне значення. Лише економіці країн ЄС ця проблема щорічно вартує більше, ніж 210 мільярдів €, і більшість цих коштів витрачається на заходи в системі охорони здоров'я (Wilkins et al., 2017). Для України ця проблема є ще більш актуальною, оскільки за оцінками експертів, неінфекційні захворювання, у тому числі й ССЗ, у країнах із низьким та середнім рівнями доходів можуть знизити валовий внутрішній продукт на 5-10%, що пов'язано з численними випадками передчасної смерті (Thakur, Prinja, Garg, Mendis, & Menabde, 2011).

Зважаючи на таку невтішну статистику поширення серцево-судинних захворювань дослідження механізмів та ключових регуляторів їх патогенезу є нагальним. Актуальним у цьому сенсі є дослідження участі окремих генів у розвитку та функціонуванні міокарда, ревізія функцій уже відомих генів та встановлення генів мутації котрих можуть спричинити розвиток ССЗ. Нині описано низку генів, мутації у яких спричиняють розвиток дилатаційної, гіпертрофічної кардіоміопатій та аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка. Серед них переважно гени, що кодуєть білки інтеркалярних дисків (ІД), і залучені до підтримки структурної цілісності міокарду та його функціонування. Проте, актуальним є пошук і серед генів, що не лише приймають участь у підтримці міжклітинної адгезії, а й залучені до функціонування сигнальних каскадів. Останні є регуляторами як кардіогенезу, постнатального розвитку серця так і розвитку патологій міокарду, тож порушення функціонування сигнальних каскадів кардіоміоцитів може спричинити і порушення зазначених процесів. Одним із генів, що приймає участь не лише у підтримці структурної цілісності серця, а й у регулюванні сигнальних каскадів є α -Е-катенін.

α -Е-катенін – компонент міжклітинної адгезії, який забезпечує поєднання кадєрин-катенінового комплексу із актиновим цитоскелетом (A Vite & Radice, 2014), але нещодавні дослідження встановили залучення α -Е-катенін до модуляції активності сигнальних шляхів, серед яких зокрема Wnt/ β -катеніновий-, HIPPO-, MAPK-сигнальні каскади (Alexia Vite, Li, & Radice, 2015). Варто зауважити, що зазначені сигнальні каскади залучені до контролю росту та проліферації кардіоміоцитів, контролюють розміри серця та кардіоміоцитів а також метаболізм міокарду (Cohen, Tian, & Morrisey, 2008; Rose, Force, & Wang, 2010; Zhang & Del Re, 2017). Тож, порушення активності цих каскадів може спричинити і порушення функції серця та бути причиною розвитку патології міокарду.

Структурна та сигнальна функції α -Е-катеніну досліджувались із використанням культур клітин та мишиних моделей. Так було показано, що делеція α -Е-катеніну в ранньому ембріогенезі призводить до порушення формування трофобласту та блокує ембріональний розвиток на стадії бластоцисти (Torres et al., 1997). На противагу згаданій роботі, делеція α -Е-катеніну у винятково в ембріональному серці не спричиняла летальності тварин. Раніше у нашому відділі було показано, що ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну не призводить до вад кардіогенезу, за рахунок функціональної компенсації α -Т-катеніном (Piven et al., 2011). Іншими вченими було показано, що кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до розвитку дилатаційної кардіоміопатії у дорослих мишей (Sheikh et al., 2006). Цікаво, що у людей спостерігається зниження експресії α -Е-катеніну у ділянках міокарда поблизу зони розриву стінки серця після інфаркту, але механізм такого зниження наразі не відомий (van den Borne et al., 2008). Проте у цих роботах функція α -Е-катеніну розглядалась перш за все як структурна, а наслідки пов'язані із його втратою пояснювались за рахунок порушення міжклітинної адгезії.

Сигнальна функція α -Е-катеніну була встановлена відносно недавно. Із застосуванням мишей із делецією досліджуваного гену в шкірі, було показано, що нокаут α -Е-катеніну призводить до гіперпроліферації кератиноцитів в наслідок активації MAPK-сигнального каскаду та не супроводжувалась порушеннями на рівні адгезії (Vasioukhin, Bauer, Degenstein, Wise, & Fuchs, 2001). Участь α -Е-катеніну у регуляції активності сигнального каскаду HIPPO була показана і у кардіоміоцитах. Подвійний кардіоспецифічний нокаут α -Е- та α -Т-катеніну призводив транслокації Yар в ядро та активації проліферації кардіоміоцитів (Li et al., 2015). Варто зауважити, що транскрипційний фактор Yар є основним медіатором HIPPO-сигнального шляху, і α -Е-катенін має супресорну функцію та пригнічує активність останнього. Окрім того, із використанням встановлених клітинних ліній було показано, що α -Е-катенін залучається до модуляції активності Wnt/ β -катенінового сигнального шляху, стабілізуючи деградувальний комплекс β -катеніну та інгібуючи його взаємодію із Tcf-ДНК (Giannini, Vivanco, & Kuyta, 2000). Таким чином, α -Е-катенін здатен пригнічувати транскрипційну активність β -катеніну.

Тож, останні експериментальні дані демонструють, що функція α -Е-катеніну не обмежується лише підтримкою міжклітинної адгезії. Нині показано, що α -Е-катенін здатен приймати участь у регуляції кількох сигнально-регуляторних каскадів клітини: MAPK, HIPPO та WNT/ β -катенінового сигнальних шляхів. Проте дослідження функції α -Е-катеніну у міокарді обмежувалось до нині переважно вивченням його структурної ролі, можлива участь α -Е-катеніну у регулюванні важливих сигнальних каскадів у серці лишається мало дослідженою.

Таким чином наша робота присвячена вивченню і уточненню функції α -Е-катеніну у функціонування дорослого серця. Результати наших досліджень мають важливе значення не лише для розвитку фундаментальних знань у галузі біології серця, а й можуть в подальшому слугувати необхідним підґрунтям для покращення діагностики деяких серцевих патологій.

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: «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 рр.) та «Дослідження регуляторної функції β - та α -катеніну у вікових та патологічних перебудовах/реконструкціях дорослого міокарда 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 рр.), проектів в 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 патологічної гіпертрофії лівого шлуночку» та 2018 – 2020 рр: «Сигнальна функція β -катеніну та α -Е-катеніну у регуляції метаболізму серця та патогенезі гіпертрофії лівого шлуночка».

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити сигнальну функцію α -Е-катеніну у дорослому міокарді за умови кардіоспецифічної гетерозиготної та гомозиготної делеції його гена.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. З'ясувати вплив гетеро- та гомозиготної ембріональної кардіоспецифічної делеції α -Е-катеніну на виживаність мишей та функціонування серця.
2. Проаналізувати активність канонічного Wnt- та NRPPO-сигнальних шляхів у серці мишей із кардіоспецифічним нокаутом α -Е-катеніну.
3. Проаналізувати активність гіпертрофічних сигнальних каскадів (Pi3K- та MAPK-сигнальних каскадів) у міокарді мишей із кардіоспецифічним нокаутом α -Е-катеніну.
4. Дослідити вплив α -Е-катеніну на активність регуляторів метаболізму ліпідів у серці мишей із делецією α -Е-катеніну.
5. Встановити вплив кардіоспецифічної делеції α -Е-катеніну на проліферацію неонатальних кардіоміоцитів.

Об'єкт дослідження: розвиток постнатального міокарду, зміни рівня експресії фетальних генів, динаміка канонічного Wnt сигналіну, Yap залежна транскрипція, метаболізм серця, активність AMPK, PPAR α , Pi3K/Akt, PKA та MEK1/Erk1/2 сигнальних каскадів, гіпертрофічна відповідь, серцева недостатність.

Предмет дослідження: особливості функціонування дорослого серця за умови ембріональної кардіоспецифічної гетерозиготної та гомозиготної делеції гена α -Е-катеніну.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні (виділення ДНК та РНК, ПЛР, ЗТ-ПЛР в реальному часі), молекулярно-біологічні (Вестерн-блот), гістологічні (гематоксилін-еозинове забарвлення, забарвлення акридиновим оранжевим, забарвлення пікрофуксином за ван Гіzenом та забарвлення жиривим червоним О), методи клітинної біології (виділення первинних неонатальних кардіоміоцитів, МТТ-тест), фізіологічні методи (аналіз гемодинамічних показників міокарду) 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 Каплан-Мейер).

Наукова новизна одержаних результатів. Показано, що функція α -Е-катеніну не обмежується лише адгезивною, цей білок має важливе сигнально-регуляторне значення у постнатальному розвитку серця та патогенезі серцевої недостатності. Отримані дані свідчать, що α -Е-катенін виконує супресорну роль у контролюванні активності канонічного WNT-сигнального шляху та Υ ар як у неонатальних, так і дорослих кардіоміоцитах. Порушення цієї функції спричиняє патерни молекулярно-генетичних та молекулярно-біологічних змін, що призводять до розвитку серцевої недостатності. Виявлено, що як гетеро-, так і гомозиготна ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє порушення функціонування РіЗК/Akt- та MEK1-Erk1/2-сигнальних каскадів у дорослих тварин. Вперше показано, що делеція α -Е-катеніну у ембріональному серці призводить до скорочення тривалості життя та передчасної загибелі тварин внаслідок серцевої недостатності. Вперше виявлено порушення метаболізму ліпідів та їхнє накопичення у дорослих кардіоміоцитах в наслідок нокауту гену α -Е-катеніну.

Теоретичне значення одержаних результатів. В результаті виконаних досліджень було отримано низку фундаментальних даних, які значно доповнюють та розширюють попередні знання про роль α -Е-катеніну у функціонуванні післянатального міокарду та патогенезі серцевої недостатності. А саме, показано що α -Е-катенін є супресором сигнальної активності канонічного WNT- та Υ ар, і порушення цієї функції спричиняє розвиток серцевої недостатності та передчасну летальність. Запропоновано молекулярно-генетичний механізм що може призводити до формування та прогресування серцевої недостатності внаслідок мутації/пригнічення експресії α -Е-катеніну.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані про сигнальну функцію α -Е-катеніну у розвитку післянатального серця та патогенезі дорослого міокарду вказують на те, що мутація цього гену у людей може бути причиною серцевої недостатності та ранньої летальності. Дана робота, незважаючи на свою фундаментальність, може бути використана для покращення діагностики серцево-судинних патологій.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені автором у дисертації, отримано ним особисто або за його безпосередньої участі. Автором безпосередньо було виконано основну частину експериментальних досліджень, адаптовано та використано методи досліджень (виділення РНК, синтез кДНК, кількісний ПЛР в реальному часі, виготовлення парафінових зрізів тканини міокарду, виділення білка та Вестерн-блот, гематоксилін-еозинове забарвлення, забарвлення акридиновим оранжевим, забарвлення пікрофуксином за ван Гізеном та забарвлення жиривим червоним О). Автором разом із науковим керівником проаналізовано та концептуалізовано дані літературних джерел, заплановано експериментальні дослідження, проаналізовано та узагальнено отримані результати. Частину експериментів (МТТ-тест) проведено спільно зі співробітниками відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, які є співавторами опублікованих робіт.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на українських та міжнародних конференціях: 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 11 наукових праць, з них 6 статей у фахових журналах та 5 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу та 4 розділів (огляд літератури, матеріали і методи, результати досліджень, узагальнення та аналіз результатів), висновків та списку літератури, який налічує 175 посилань. Робота викладена на 149 сторінках машинописного тексту (з них 104 сторінок складає основна частина роботи) і містить 3 таблиці, 32 рисунки та 3 додатки.

Також автор висловлює щире 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. Окрім того, автор висловлює подяку співробітникам відділу загальної та молекулярної патофізіології Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та особисто завідувачу відділу проф. Досенко В.Є. за допомогу у проведенні фізіологічних досліджень. Автор висловлює подяку за допомогу у планування та виконанні роботи своєму науковому керівнику — к.б.н., ст.н.с. О.О. Півень, завідуючій відділом генетики людини, д.б.н., професору Л.Л. Лукаш, а також співробітникам відділу генетики людини к.б.н. Л.Л. Мацевич, Т.П. Рубан, та іншим.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень.

Опис тваринної моделі. Для проведення експериментальної роботи схрещували тварин, що містять у своєму геномі ген фагової Cre-рекомбінази під контролем промотора гена важкого ланцюга міозина α (α -MHC-Cre), та тварин, що містять у своєму геномі loxP-сайти, що фланкують 2-ий екзон гену α -Е-катеніну. α -MHC промотор і контрольований ним ген Cre-рекомбінази починає експресуватися у ембріональному серці після закладки першого та другого серцевих полів виключно у кардіоміоцитах. Використання такої системи делеції досліджуваного гена дає змогу вивчати його функцію виключно у кардіоміоцитах, починаючи із 10,5 доби ембріонального розвитку. Генотипування здійснювали за ПЛР, як матрицю використовували ДНК виділену із кінчиків хвостів. У дослідженні використовували мишей таких генотипів: α -катенін^{Flox/Flox}; α MHC-Cre⁻ – миші у яких 2-ий екзон α -Е-катеніну франкований LoxP-сайтами та не мають в геномі Cre-рекомбінази (контролі); α -катенін^{Flox/WT}; α MHC-Cre⁻ – миші гетерозиготні за умовним нокаутом гена α -Е-катеніну та у яких в геномі не має Cre-рекомбінази (контролі); α -катенін^{Flox/Flox} ; α MHC-Cre⁺ - миші із делецією двох алелів гена α -Е-катеніну (гомозиготи); α -катенін^{Flox/WT}; α MHC-Cre⁺ - миші із гетерозиготною делецією гена α -Е-катеніну (гетерозиготи).

Дослідження виживаності мишей. Миші утримувались в клітках за стандартних умов, кількість тварин кожного генотипу реєструвалась щотижнево. Для оцінки різниці у виживаності використовувався метод Каплан-Мейр.

Аналіз базових кардіогемодинамічних параметрів. Для анестезії мишей використовували уретан (150мг/г), який вводили інтраперитоніально після чого проводили диссекцію правої каротидної артерії. Ультратонкий катетер діаметром 1,4F ретроградно вводили через праву каротидну артерію у лівий шлуночок для одночасної реєстрації тиску та об'єму лівого шлуночка та візуалізації кривих об'єм-тиск серцевого циклу. Ми реєстрували наступні кардіогемодинамічні параметри: 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.

Морфометричний аналіз. Для оцінки маси у тварин контрольної та дослідних груп проводили аналіз співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ, мг*г⁻¹) та індексу маси серця до довжини гомілки (МС/ДГ, мг*мм⁻¹).

Гістологічний аналіз тканини міокарда. Для аналізу змін структури міокарда на морфологічному рівні ізольовані серця фіксували в 4% параформальдегіді та заключали в парафін і використовували для забарвлення гематоксилін/еозином та пікрофуксином за ван Гізоном. Серця також заливали в середовище для криозрізів для забарвлення жиривим червоним О.

Дослідження відносного рівня експресії генів. Виділену із апексів серця РНК використовували для синтезу кДНК. Синтезовану кДНК використовували для ПЛР в реальному часі. Досліджували рівень експресії таких генів: *Nppa*, *Nppb*, *Myh7*, *Myh6*, *c-Fos*, *Ccnd1*, *c-Myc*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b* та *Aurka*, для нормалізації рівня експресії використовували *Gapdh*. Обчислення результатів ПЛР в реальному часі проводили за стандартним методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Дослідження рівня білків. Білок виділяли із лівого шлуночка, розділяли в 10% поліакриламідному гелю та переносили на PVDF-мембрану. Після чого інкубували із відповідними первинними та вторинними антитілами. Досліджували рівень таких білків: β -катеніну, активного β -катеніну, GSK3 β , pGSK3 β , γ -катеніну, Akt1, pAkt Ser-473, pAkt Thr-308, ERK1/2, pERK1/2 Thr-202/Thr-204, AMPK α 1/2, pAMPK α Thr-172, PKA, pPKA, HSL, pHSL Ser-565, pHSL Ser-563, ACC, pACC Ser-79, Axin-1, PPR α для нормалізації використовували GAPDH.

Виділення первинної культури неонатальних кардіоміоцитів. Первинну культуру неонатальних кардіоміоцитів отримували методом холодної трипсинізації з серця новонароджених мишей. Для збагачення суспензії кардіоміоцитами використовували попереднє прикліплення фібробластів та ендотеліоцитів до культивального посуду протягом 2 год. Отримані неонатальні кардіоміоцити культивували протягом 3-5 діб при температурі 37 °C та при 5% CO₂ у газовій суміші.

Морфологічний та фізіологічний аналіз кардіоміоцитів in vitro. Неонатальні кардіоміоцити використовували для дослідження рівня проліферації (МТТ-тест), встановлення частоти двоядерних (забарвлення акридиновим оранжевим) та встановлення розмірів: довжини та ширини (забарвлення гематоксиліном/еозином).

Статистичний аналіз 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. Для аналізу статистичної достовірності відмінності у виживаності між групами використовували лог-раговий тест. 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 Т'юкі або post hoc тестом Холма-Сідака, якщо ні – тест Краскела-Уолліса із post hoc тестом Данна. Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми GraphPad Prism7.

Результати досліджень та їх обговорення

Спочатку ми проаналізували тривалість життя мишей із гетеро- та гомозиготною делецією α -Е-катеніну і встановили значне її скорочення порівняно із контрольними тваринами (рис. 1 *a*). Зважаючи на передчасну загибель мутантних тварин подальші дослідження проводились із використанням мишей віком 10 місяців.

Візуальний аналіз сердець встановив збільшення розмірів серця, із значною гіпертрофією передсердь та шлуночків (рис. 1 *b*), що підтверджується зростання індексів МС/МТ та МС/ДГ у мутантних мишей обох генотипів порівняно із таким у контрольних (рис. 2 *a* та *b*).

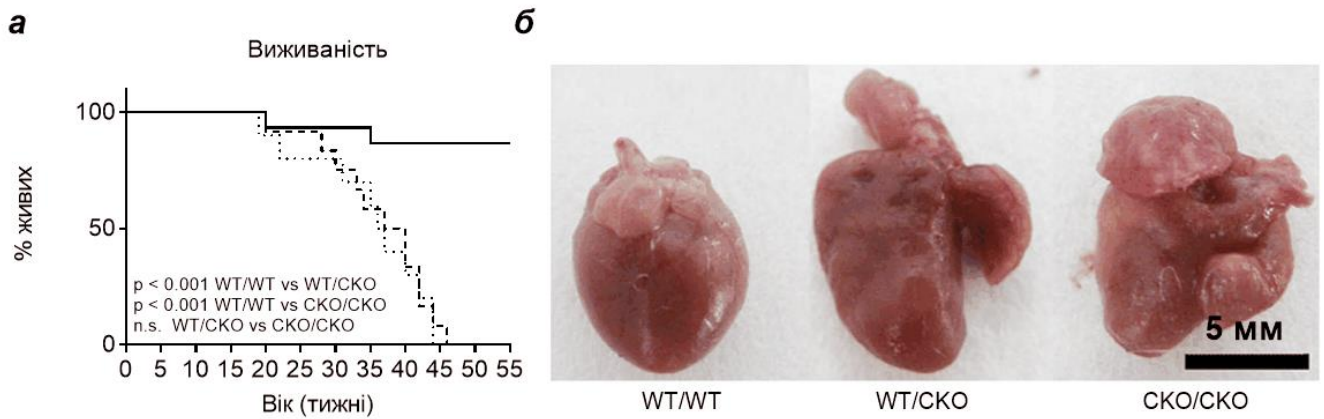


Рис. 1. Гетеро- та гомозиготна делеція α -Е-катеніну призводить до передчасної загибелі мишей та значних гістопатологічних змін серця: **а** – криві Каплан-Мейер, статистичний аналіз виживаності здійснювали за допомогою лог-рангового тесту; — WT/WT, - - WT/CKO, CKO/CKO; **б** – фотографії серцець, лінійка 5 мм. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну

За допомогою гематоксилін/еозинового забарвлення парафінових зрізів зразків тканини серця ми виявили в обох мутантних групах тварин критичні гістопатологічні порушення. А саме: 1) “хвилясті” кардіоміоцити (рис. 3), та 2) кардіоміоцити із гіпереозинофільною цитоплазмою (рис. 3), що є свідченням ішемічного ушкодження серця, 3) кардіоміоцити із вакуолізованими ядрами (рис. 3), що свідчить про загибель кардіоміоцитів, 4) дифузну інфільтрацію міокарда лімфоцитами (рис. 3), що свідчить про розвиток запальних процесів.

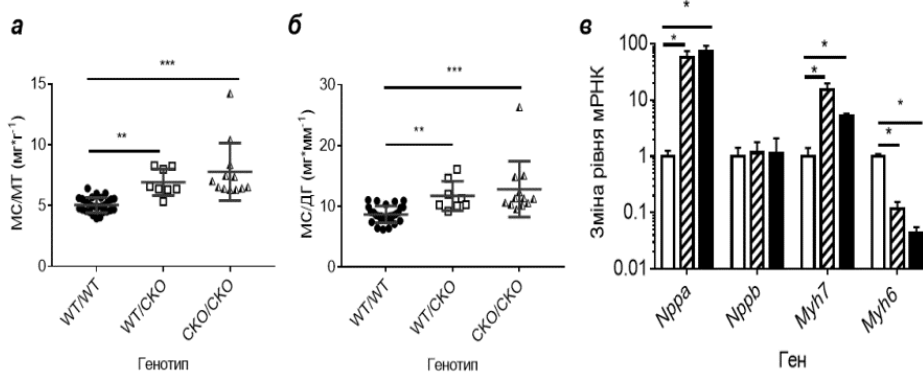


Рис. 2. Делеція α -Е-катеніну призводить до гіпертрофії серця: **а** – індекс співвідношення МС/МТ; **б** – індекс співвідношення МС/ДГ, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,005$ за допомогою тесту Краскела-Уолліса із

post hoc тестом Данна; **в** – рівень експресії гіпертрофічних (фетальних) генів, * – $p < 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея. □ – WT/WT, ▨ – WT/CKO, ■ – CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну

За допомогою забарвлення зрізів серця за ван Гізоном ми проаналізували і наявність фіброзу в міокарді та його інтенсивність. Нами було виявлено значні фіброзні uszkodження серця в обох дослідних групах мишей, зокрема периваскулярний фіброз (рис. 4 *a*), що призводить до порушень коронарного кровообігу, та значний замісний фіброз, що є свідченням загибелі кардіоміоцитів та їхнього заміщення сполучною тканиною (рис. 4 *a*). Аналіз інтенсивності фіброзу виявив певні відмінності між серцями тварин із повною та частковою втратою досліджуваного гену. Так, рівень фіброзу у контрольних тварин був $0,2\% \pm 0,2\%$, у гетерозигот за нокаутом α -Е-катеніну інтенсивність фіброзу становила $1,8\% \pm 0,14\%$, тоді як у тварин із гомозиготним нокаутом α -Е-катеніну – $2,4\% \pm 0,8\%$, при чому рівень фіброзу у тварин із гомозиготною делецією α -Е-катеніну був достовірно вищим порівняно із тваринами із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 4 *b*).

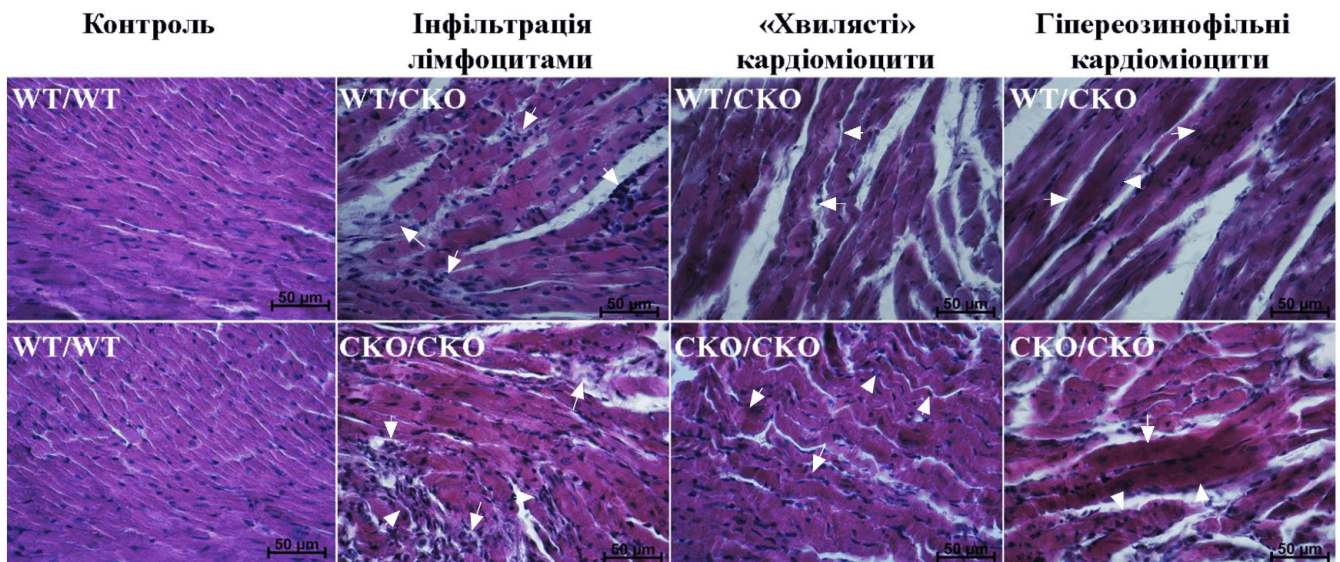


Рис. 3. Гетеро- та гомозиготна делеція α -Е-катеніну спричиняє значні гістопатологічні зміни серця. Забарвлення гематоксилін/еозином, що виявило інфільтрацію лімфоцитами міокарда, хвилясті та гіперезинофільні кардіоміоцити, лінійка 50 мкм, збільшення $400\times$. Усі гістопатологічні зміни вказані білими стрілками. WT/WT – контрольні миші, WT/СКО – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, СКО/СКО – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну

За допомогою ПЛР в реальному часі ми проаналізували рівень експресії гіпертрофічних (фетальних) генів, і встановили зростання *Npra* та *Myl7* (кодують ANP та β -МНС відповідно) у серцях мутантних тварин порівняно із контрольними (рис. 2 *в*), та зниження експресії гену *Myl6* (кодує α -МНС) у мишей із гетеро- та гомозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 2 *в*).

Для з'ясування впливу кардіоспецифічної делеції α -Е-катеніну на фізіологічний стан серця ми провели дослідження кардіогемодинамічних параметрів. Так нами було виявлено зниження частоти серцевих скорочень, як у гетерозигот, так і у гомозигот за нокаутом досліджуваного гену (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. 1).

Також у мишей із нокаутом α -Е-катеніну серце гірше розслаблюється після скорочення, про що свідчить зростання як у гетерозигот, так і гомозигот наступних показників: кінцевий діастолічний тиск (зростає на 10,2% та 11% відповідно), кінцевий діастолічний об'єм (зростає у обох групах) та Тау (зростає у 2,5 та 3,5 рази відповідно) (табл. 1).

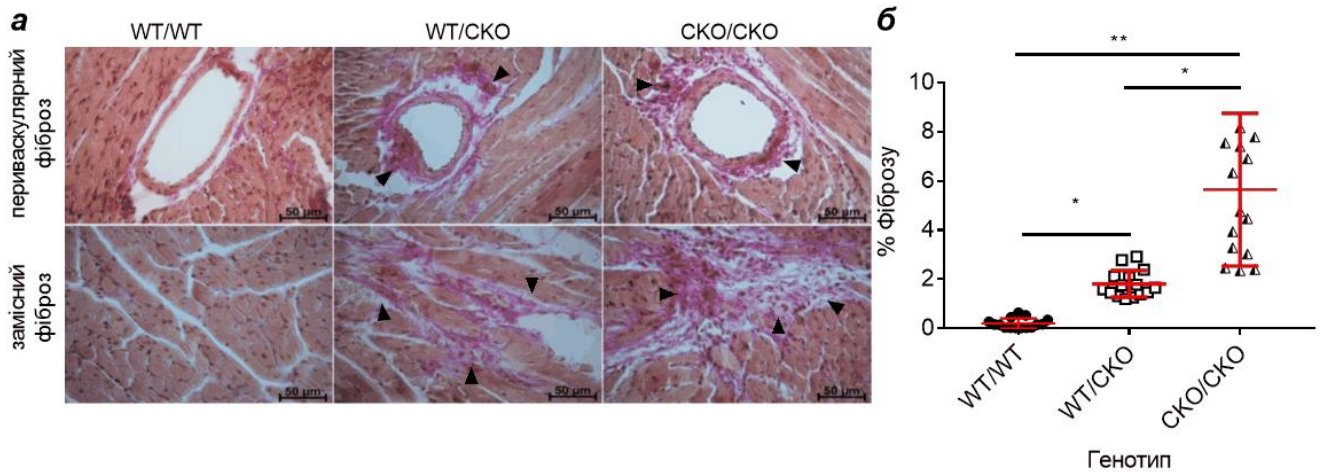


Рис. 4. Кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну призводить до розвитку периваскулярного та замісного фіброзу: **а** – Забарвлення парафінових зрізів міокарда за ван Гізоном, що вказує на периваскулярний та замісний фіброз, лінійка 50 мкм, збільшення 400^x; **б** – результати вимірювання рівня фіброзу. Усі гістопатологічні зміни вказані чорними стрілками. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, за допомогою тесту Краскела-Уолліса із post hoc тестом Данна

Таблиця 1

Кардіогемодинамічні показники контрольних мишей, мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну та мишей із гомозиготною делецією α -Е-катеніну

Параметр	WT/WT	WT/CKO	CKO/CKO
Частота серцевих скорочень (уд*хв. ⁻¹)	626.78 ± 91.93	492.11 ± 106.07 *	486.56 ± 136.96 *
Максимальний об'єм (мкл)	23.08 ± 6.1	25.51 ± 7.95*	24.82 ± 9.9
Мінімальний об'єм (мкл)	12.69 ± 8.5	16.43 ± 10.91*	17.72 ± 8.66*
Кінцевий систолічний об'єм (мкл)	14.59 ± 9.59	17.85 ± 11.15*	20.35 ± 9.91*

Кінцевий систолічний тиск (мм.рт.ст)	87.2 ± 10.24	79.55 ± 20.91 *	84.27 ± 15.32
Кінцевий діастолічний об'єм (мкл)	21.19 ± 6.08	24.49 ± 8.15*	24.33 ± 10.09*
Кінцевий діастолічний тиск (мм.рт.ст.)	0.16 ± 2.54	9.1 ± 6.74 *	5.47 ± 8.12 **
Ударний об'єм (мкл)	10.38 ± 4.2	9.07 ± 3.27 *	7.1 ± 3.28 **
Фракція викиду (%)	51.62 ± 25.15	44.96 ± 26.27*	31.28 ± 17.33 **
Серцевий викид (мкл*хв. ⁻¹)	6288.97 ± 2156.42	4663.75 ± 2224.1 *	3697.87 ± 1912.46 *

Примітка. WT/WT – контрольні миші, WT/СКО – гетерозиготи, СКО/СКО – гомозиготи. n = 5 у кожній групі, * – p < 0,05 відносно контрольних мишей, # – p < 0,05 відносно мишей із гетерозиготною делецією α-Е-катеніну за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Таким чином, усі зміни перелічені вище свідчать, що делеція α-Е-катеніну призводить до розвитку серцевої недостатності, що найбільш ймовірно і призводить до передчасної загибелі мутантних мишей.

Як зазначалось раніше α-Е-катенін може моделювати активність WNT/β-катенінового сигнального шляху тому ми вирішили проаналізувати активність останнього в міокарді мишей із гетеро- та гомозиготною делецією α-Е-катеніну. За допомогою Вестерн-блоту ми виявили зростання тотального β-катеніну лише у гомозигот (рис. 5 *a* та *б*), але значне зростання активного β-катеніну спостерігали в міокарді мишей обох мутантних груп (рис. 5 *a* та *в*). Рівень фосфорильованої за Сер 9 GSK-3β, що свідчить про її інгібування (рис. 5 *a* та *г*). Варто зауважити, що рівень активного β-катеніну та інгібованої GSK-3β був достовірно вищим у гомозигот порівняно із гетерозиготами (рис. 5 *a*, *в* та *г*). Також ми виявили значне зниження кількості Аксину1 – основного компонента деградувального комплексу β-катеніну (рис. 5 *a* та *д*). За допомогою ПЛР в реальному часі ми проаналізували рівень експресії β-катеніну та його генів-мішеней. Нами було виявлено зростання експресії β-катеніну в обох мутантних групах тварин порівняно із контрольними (рис. 5 *e*), також ми виявили зростання експресії і гену *c-Мус* у гетеро- і гомозигот. Рівень експресії і β-катеніну, і *c-Мус* був достовірно вищим у гомозигот порівняно із гетерозиготами (рис. 5 *e*), що узгоджується із даними Вестерн-блоту (рис. 5 *a*, *в* та *г*). Отримані дані переконливо свідчать про активації WNT/β-катенінового сигналіну у міокарді мишей із делецією α-Е-катеніну, рівень активності канонічного WNT-сигнального шляху у гомозигот вищий порівняно із гетерозиготами.

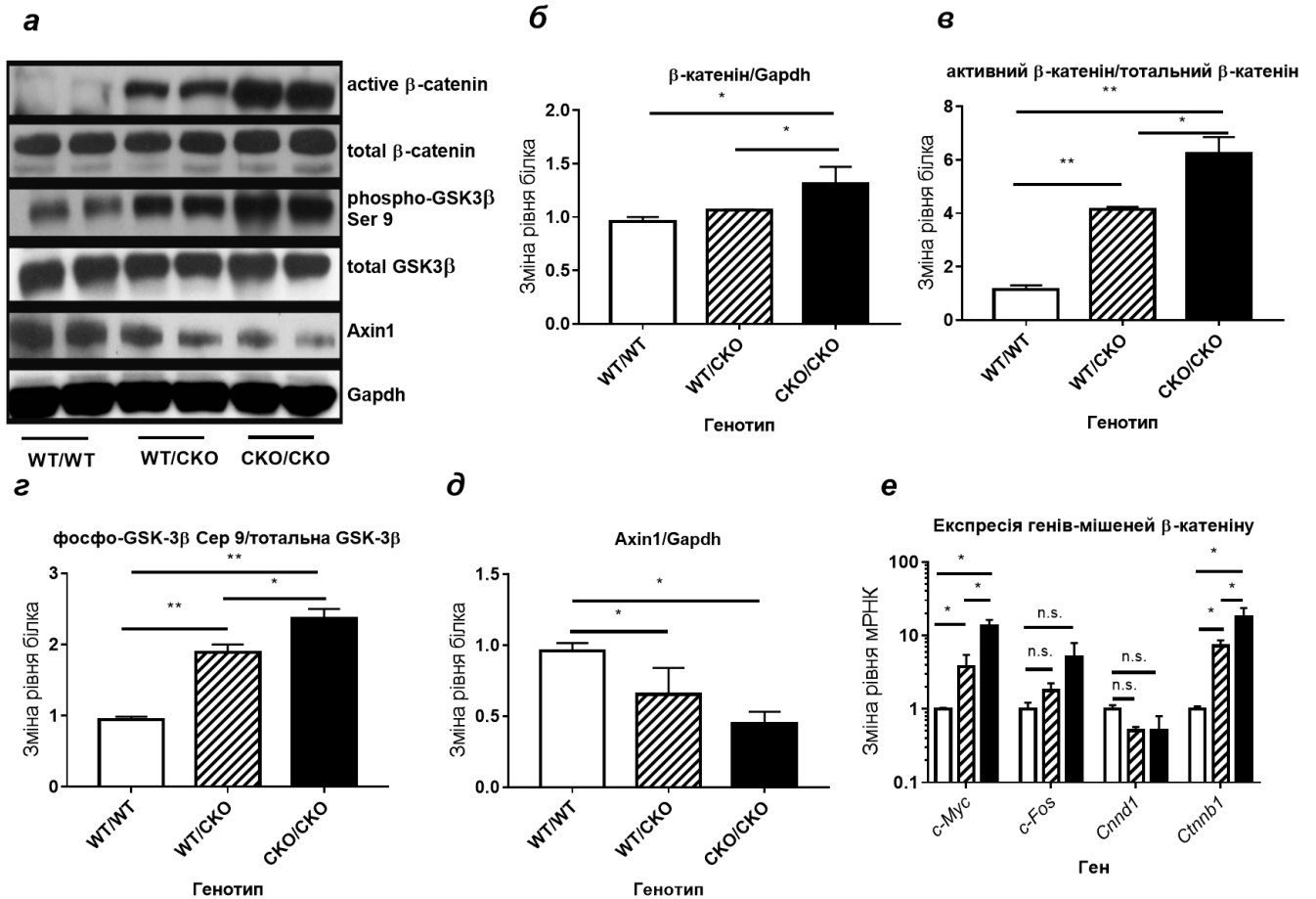


Рис. 5. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до активації канонічного WNT-сигнального шляху: **а** – Типовий Вестерн-блот на вміст тотального та активного β -катеніну, фосфорильованої за Сер 9 GSK-3 β аксину; **б** – денситограма β -катеніну нормалізована відносно Gapdh; **в** – денситограма активного β -катеніну нормалізована відносно тотального β -катеніну; **г** – денситограма фосфорильованої за Сер 9 GSK-3 β нормалізована відносно тотальної GSK-3 β ; **д** – денситограма Аксину1 нормалізована відносно Gapdh; **е** – рівень експресії генів-мішеней β -катеніну. $n = 5$ у кожній групі. \square – WT/WT, штрихуваний – WT/CKO, \blacksquare – CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Також ми проаналізували рівень експресії генів-мішеней *Yap* (*Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b*) у міокарді мутантних тварин та виявили зростання їх експресії в обох дослідних групах (рис. 6), що свідчить про активацію транскрипційної активності *Yap* у міокарді мишей із нокаутом α -Е-катеніну. У нашій роботі ми не спостерігали статистично достовірної різниці рівня експресії генів *Aurka*, *Ctgf* та *Tnfrsf1b* між групами мутантних тварин на відміну від попередніх даних, де у гомозиготних за нокаутом α -Е-катеніну мишей активація канонічного WNT-сигналіngu була вищою ніж у гетерозигот (рис. 5). Однак, нами було виявлено статистично достовірне вищий

рівень експресії гену *Il1rl1* у тварин з гомозиготним нокаутом α -Е-катеніну порівняно із таким у гетерозиготних мишей (рис. 6).

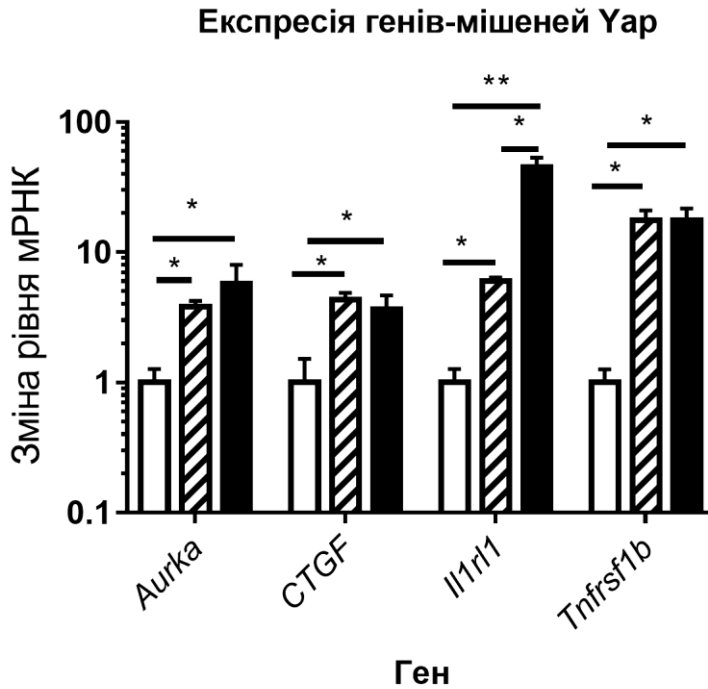


Рис. 6. Нокаут α -Е-катеніну спричиняє активацію експресії генів-мішеней γ ар (*Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b*) у міокарді. □ – WT/WT, ▨ – WT/CKO, ■ – CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. n = 5 у всіх групах. * - p < 0.05, ** – p < 0.01 за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Отже, наведені дані свідчать про вивільнення із цитоплазматичних “пасток” β -катеніну та γ ар, та активації їх транскрипційної функції в міокарді мишей із гетеро- та гомозиготним кардіоспецифічним нокаутом α -Е-катеніну.

Відомо, що серцева недостатність – це складна і комплексна патологія, і її розвиток регулюється численними сигнальними каскадами, які взаємодіють між собою та із канонічним WNT/ β -катеніновим та HIPPO-сигнальним шляхом (Chaanine & Hajjar, 2011; Lee et al., 2017; Padala et al., 2017) в подальшому ми зосередились на дослідженні активності ключових медіаторів РіЗК/Akt-, Mek1/Erk1/2- та cAMP/РКА-сигнальних шляхів.

Так за допомогою Вестерн-блоту ми встановили двократне зростання рівня тотальної Akt у серцях мутантних мишей обох генотипів (рис. 7 а та з), рівень фосфорильованої Akt за Сер 473 також зростав у гетеро- та гомозигот (рис. 7 а та д), але рівень фосфорильованої Akt за Тре 308 знижувався у обох дослідних групах (рис. 7 а та е). Отримані дані можуть свідчити про активацію Akt mTORC2 комплексом (Yang, Murashige, Humphrey, & James, 2015). Кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну також призводить до зміни рівня фосфорилування ключового медіатора MAPK-

каскаду – Erk1/2. Зокрема, гетерозиготна делеція α -Е-катеніну призводить до зниження фосфорильованих Erk1/2 (рис. 7 *а* та *в*), а гомозиготна – навпаки призводить до зростання рівня фосфорильованих Erk1/2 (рис. 7 *а* та *в*). Гетерозиготна та гомозиготна делеція α -Е-катеніну призводить також до зниження рівня фосфорильовання РКА (рис. 7 *а* та *б*), що свідчить про інгібування її кіназної активності.

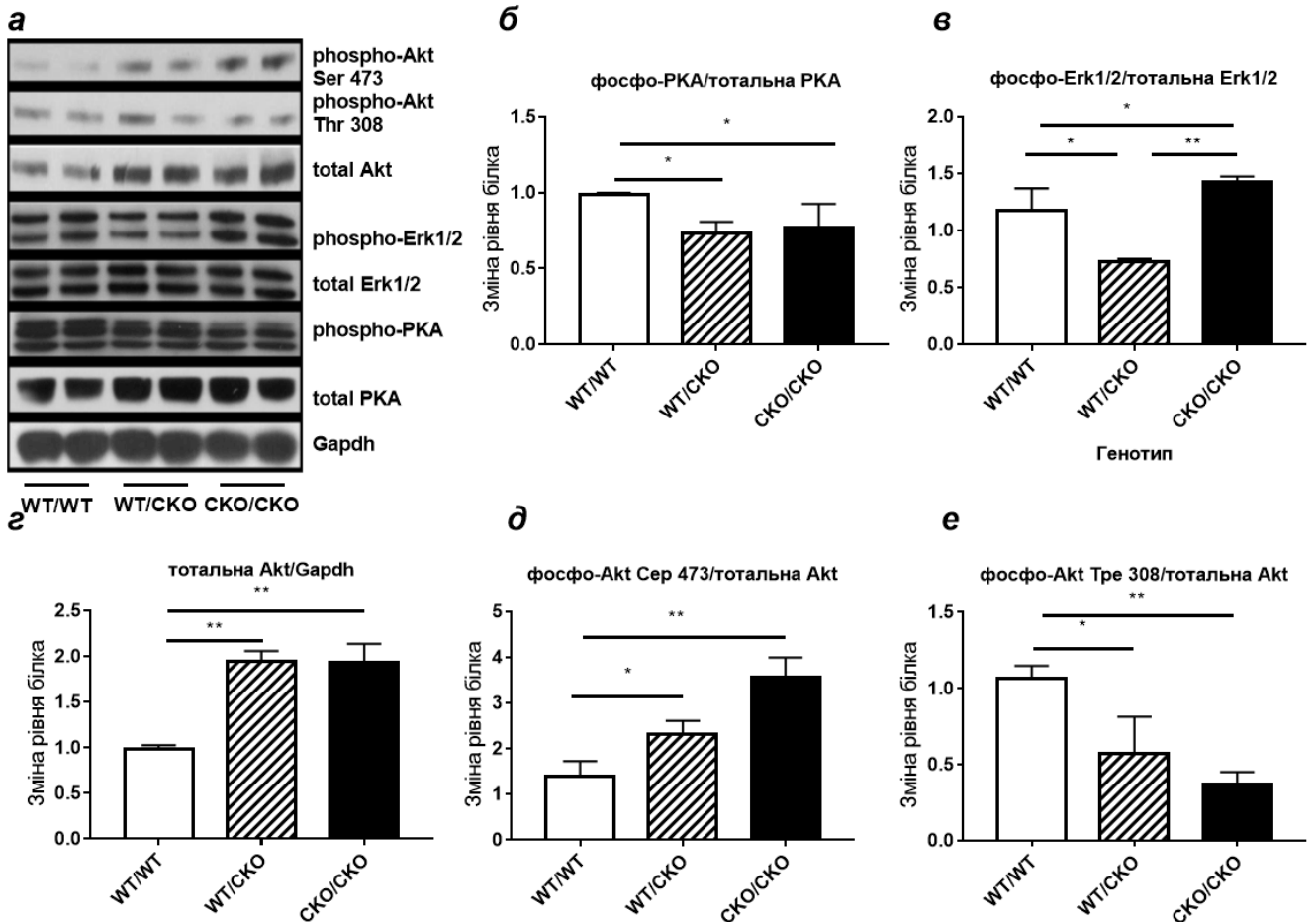


Рис. 7. Гетеро- та гомозиготна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до зміни активності гіпертрофічних сигнальних каскадів. *а* – Типовий Вестерн-блот на вміст тотальних та фосфорильованих РКА, Erk1/2 та Akt. *б* – денситограма фосфорильованої РКА нормалізована відносно тотальної РКА, *в* – денситограма фосфорильованих Erk1/2 нормалізована відносно тотальних Erk1/2, *г* – денситограма тотальної Akt нормалізована відносно Gapdh, *д* – денситограма фосфорильованої за Тре Akt нормалізована відносно тотальної Akt, *е* – денситограма фосфорильованої за Сер 473 Akt нормалізована відносно тотальної Akt. $n = 5$ у кожній групі. \square – WT/WT, штрихуваний – WT/CKO, \blacksquare – CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Отже, ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катенін асоційована із порушеннями активності сигнальних каскадів залучених до розвитку серцевої недостатності дорослого міокарду

Зважаючи на те, що розвиток серцевої недостатності супроводжується змінами метаболізму ліпідів ми також вирішили проаналізувати рівень експресії та фосфорилування ключових його регуляторів.

Ми виявили зростання рівня тотальної кінази, що регулюється АМФ (АМПК) (рис. 8 *а* та *в*), але не зважаючи на це рівень фосфорилування, що свідчить про її

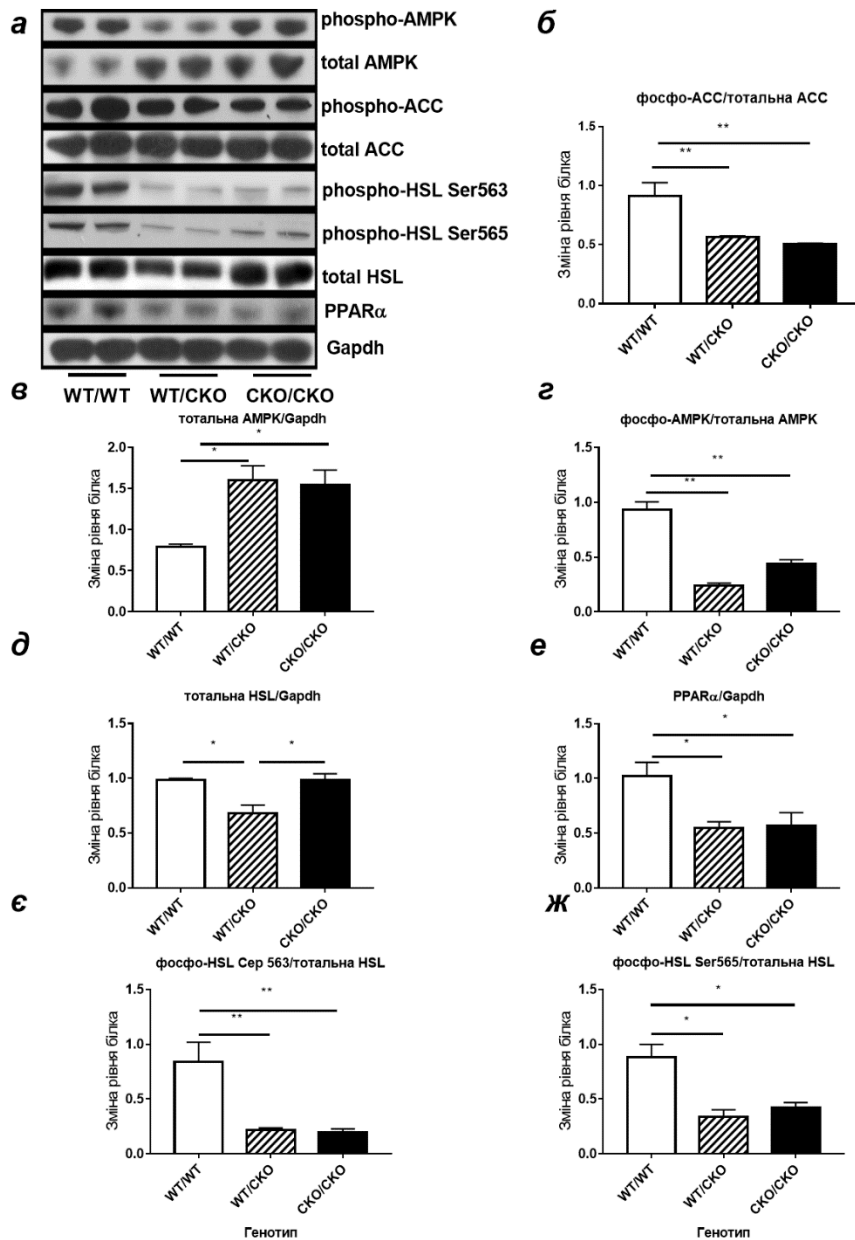


Рис. 8. Гетеро- та гомозиготна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до зміни активності регуляторів метаболізму ліпідів: *а* – Типовий Вестерн-блот на вміст тотального та активного АМПК, фосфорильованої АСС, тотальної та фосфорильованої НСЛ; *б* – денситограма фосфорильованої АСС нормалізована відносно тотальної АСС; *в* – денситограма тотальної АМПК нормалізована відносно Gapdh; *г* – денситограма фосфорильованої АМПК нормалізована відносно тотальної АМПК; *д* – денситограма тотальної НСЛ нормалізована відносно Gapdh; *е* – денситограма PPAR α нормалізована відносно Gapdh; *ж* – денситограма фосфорильованої за Сер

563 НСЛ нормалізована відносно тотальної НСЛ; *ж* – денситограми фосфорильованої за Сер 565 НСЛ нормалізована відносно тотальної НСЛ. $n = 5$ у кожній групі. \square – WT/WT, ▨ – WT/CKO, \blacksquare – CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ за допомогою ANOVA із post hoc тестом Тьюкея

активацію знижувався (рис. 8 *a* та *z*). Також ми виявили зниження рівня фосфорилування інгібітора транспорту жирних кислот до мітохондрій – ацетил-СоА карбоксилази (ACC) (рис. 8 *a* та *b*), що свідчить про її активацію.

Рівень ліпази, що чутлива до гормонів (HSL) також знижувався у міокарді мишей обох мутантних генотипів (рис. 8 *a*, *e* та *ж*), що свідчить про її інгібування та узгоджується із зниженим рівнем активної АМПК. Відомо, що HSL є ферментом що лімітує швидкість гідролізу триацигліцеридів, тож зниження її активної форми свідчить про інгібування ліполізу, що узгоджується і накопиченням триацигліцеридів у міокарді (рис. 9). Також ми виявили зниження експресії ключового транскрипційного фактора, який активує експресію генів, що залучені до катаболізму ліпідів – PPAR α у серцях як гетеро-, так і гомозигот (рис. 8 *a* та *e*).

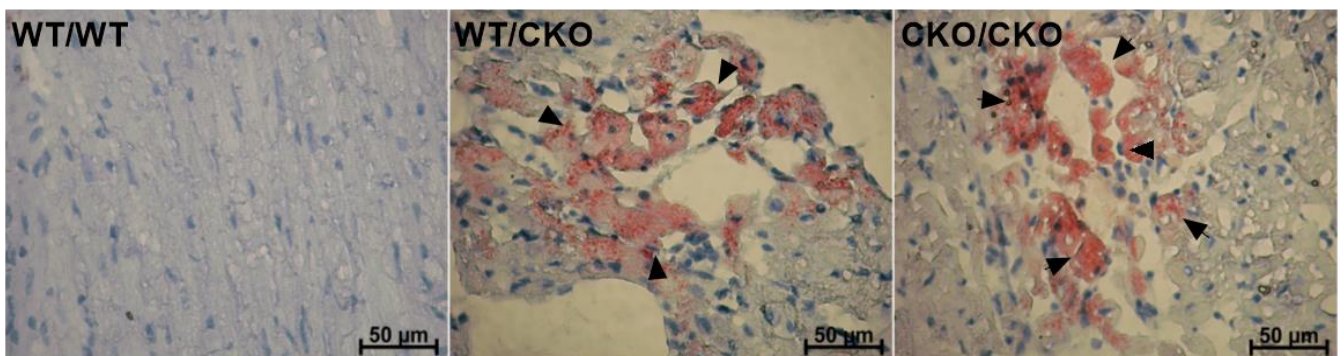


Рис. 9. Кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну призводить до накопичення нейтральних ліпідів у міокарді. Забарвлення криозрізів тканини серця жирним червоним О. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. Стрілки вказують на включення триацигліцеридів у кардіоміоцитах сердець мутантних мишей. Лінійка 50 мкм. Збільшення 400^x

Таким чином ембріональний кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну асоційований із накопиченням нейтральних ліпідів у кардіоміоцитах та інгібуванням β -окислення жирних кислот у дорослому міокарді мутантних тварин. Варто зауважити, що накопичення нейтральних жирів та порушення їхнього окислення не є типовим для серцевої недостатності, такі порушення є більш типовими для пацієнтів із серцевою недостатністю, що розвивається на фоні метаболічного синдрому та/або діабету. Тож, вочевидь, у нашій моделі накопичення ліпідів та пригнічення активності ферментів, що здійснюють їхній катаболізм є наслідком саме кардіоспецифічної делеції α -Е-катеніну та порушення його сигнальної функції у післянатальному серці.

Для з'ясування часу початку змін у серці мишей із гетеро- і гомозиготною делецією α -Е-катеніну ми проаналізували новонароджених мишенят віком 1 доба. Ми виявили зростання маси серця гетеро- та гомозиготних мишенят (рис. 10 *a*). Цікаво, що у гомозиготних мишенят маса серця була достовірно вища порівняно із гетерозиготними (рис. 10 *a*). За допомогою МТТ-тесту ми встановили, що рівень

проліферації ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів виділених із сердець гетеро- та гомозиготних мишенят був вищим порівняно із таким у контролі (рис. 10 б). Нами було також досліджено розміри неонатальних кардіоміоцитів і ми виявили достовірне зниження ширини і довжини мутантних кардіоміоцитів обох генотипів порівняно із контрольними (рис 10 в, г та д).

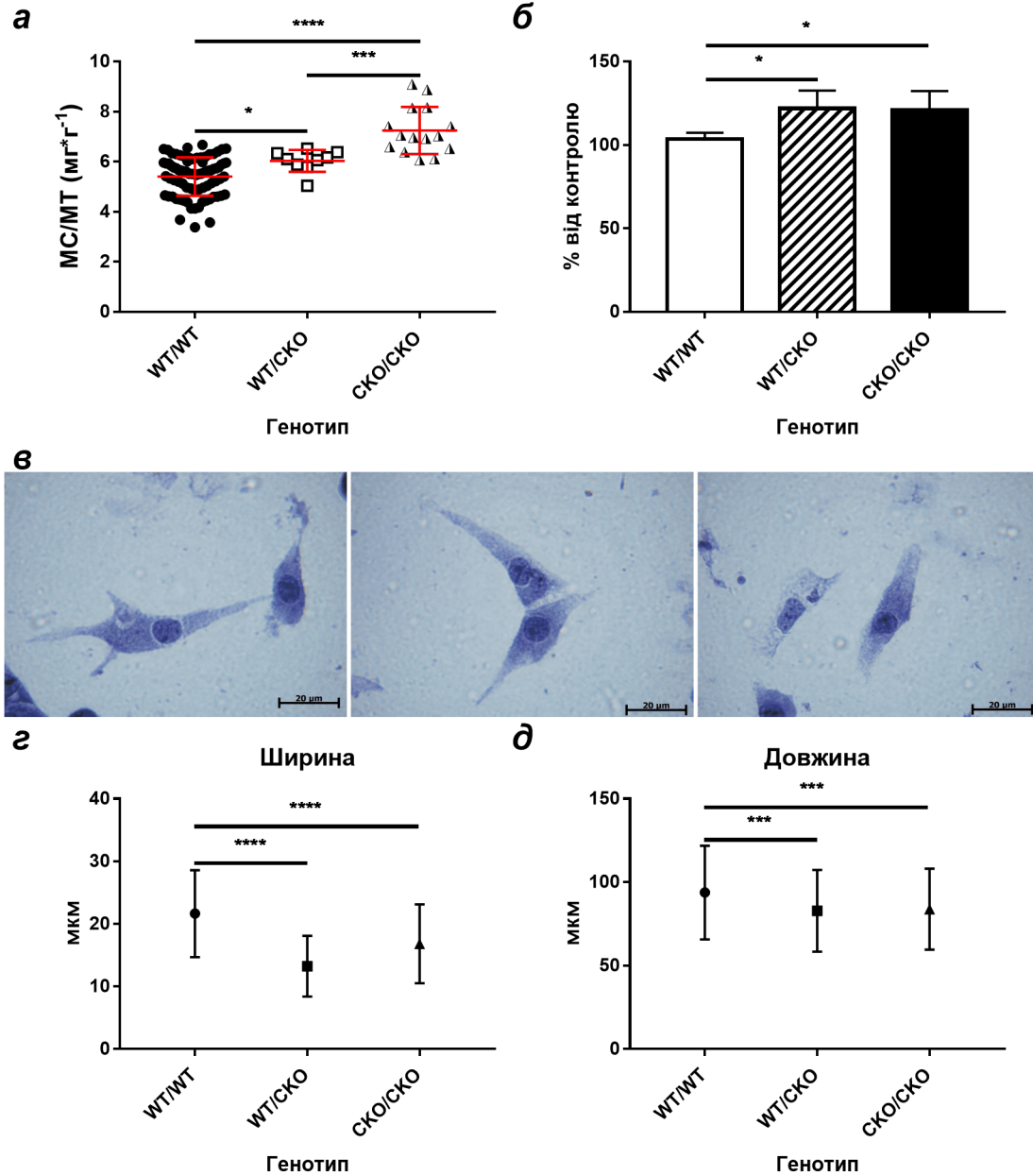


Рис. 10. Гетеро- та гомозиготна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до порушення термінального диференціювання неонатальних кардіоміоцитів: **а** – індекс співвідношення МС/МТ; **б** – дані МТТ-тесту, що свідчить про проліферацію кардіоміоцитів; **в** – гематоксилін/еозинове забарвлення ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів; **г** – довжина ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів; **д** – ширина ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів. □ – WT/WT, ▨ – WT/CKO, ■ – CKO/CKO. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,005$, **** – $p < 0,001$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Ми проаналізували також частоту двоядерних кардіоміоцитів і виявили зниження кількості двоядерних мутантних гетеро- та гомозиготних кардіоміоцитів (рис. 11), що свідчить про порушення їх термінальної диференціації.

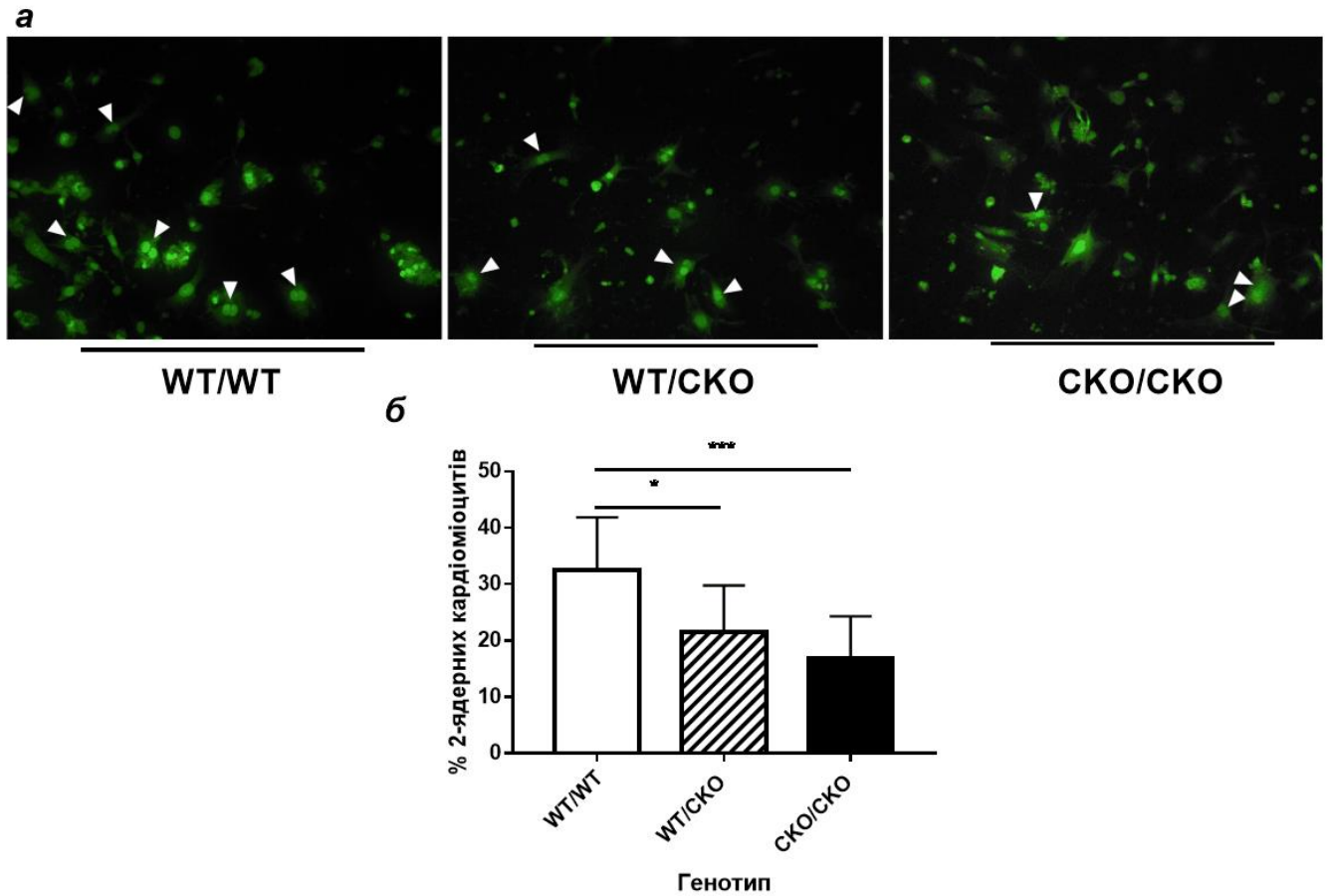


Рис. 11. Нокаут α -Е-катеніну супроводжується зниженням кількості двоядерних кардіоміоцитів: **а** – мікрофотографії кардіоміоцитів забарвлені акридиновим оранжевим, стрілками вказано двоядерні кардіоміоцити; **б** – частота двоядерних неонатальних кардіоміоцитів. \square – WT/WT, hatched – WT/CKO, \blacksquare – CKO/CKO. WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,005$, за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Для більш детального з'ясування впливу ембріонального кардіоспецифічного гетеро- та гомозиготного нокауту α -Е-катеніну ми також проаналізували рівень експресії гіпертрофічних (фетальних) генів та генів-мішеней β -катеніну та *Yap* (рис. 12). Ми виявили зростання у 2 рази рівня експресії *Nppa* у обох мутантних груп (рис. 12 **а**). Рівень експресії *Nppb* та *Muh7* зростав лише у кардіоміоцитах із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 12 **а**). Рівень експресії міозину дорослого серця – *Muh6* не відрізнявся у мутантних кардіоміоцитах порівняно із контрольними. нами було виявлено зростання рівня експресії *c-Myc*, *Axin2* в обох дослідних групах (рис. 12 **б**), рівень експресії *Cyclin D1* зростав лише у кардіоміоцитах із гомозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 8 **б**), а рівень експресії *Tcf-4* – лише у кардіоміоцитах із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 8 **б**). Аналіз рівня експресії генів-

мішеней Υ ap: *Ctgf*, *Tnfrsf1b* також показав зростання експресії цих генів у мутантних кардіоміоцитах обох дослідних груп (рис. 8 в) порівняно із контролем.

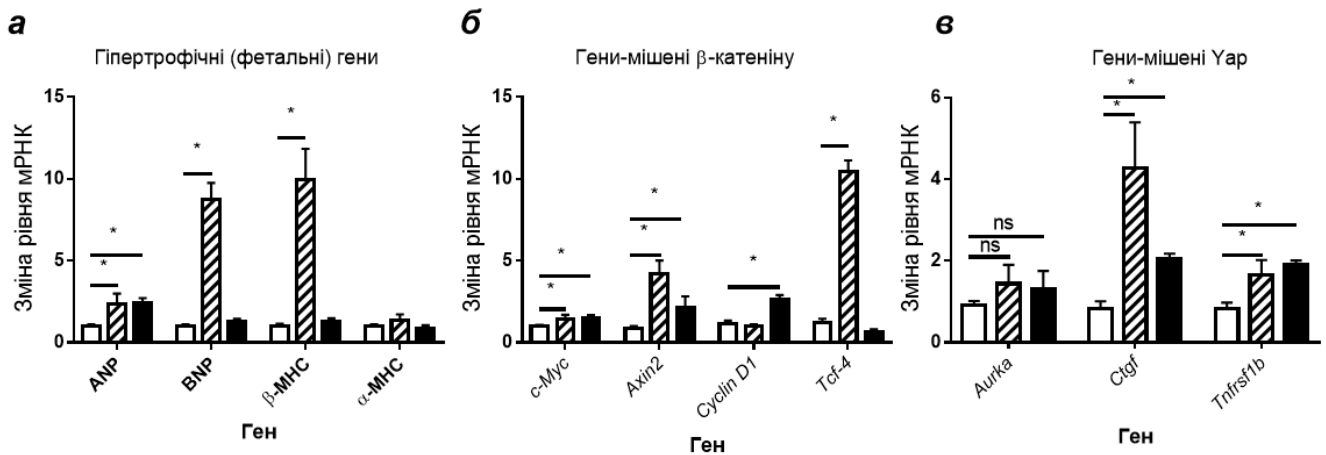


Рис. 12. Рівень експресії гіпертрофічних (фетальних) генів (**а**), генів мішеней β -катеніну (**б**) та Υ ap (**в**) в ізолюваних неонатальних кардіоміоцитах. \square – WT/WT, hatched – WT/CKO, \blacksquare – CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns $p > 0.05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Отримані дані свідчать про порушення термінального диференціювання неонатальних кардіоміоцитів із гетеро- та гомозиготною делецією α -Е-катеніну, що супроводжується активацією експресії генів-мішеней WNT/ β -катенінового сигнального шляху та Υ ap.

ВИСНОВКИ

α -Е-катенін є супресором сигнальної активності Υ ap та β -катеніну, які є ключовими транскрипційними медіаторами канонічного WNT- та Hippo-сигнальних каскадів. Гетеро- і гомозиготна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняють патерни молекулярно-генетичних та молекулярно-біологічних змін, що призводять до розвитку серцевої недостатності.

1. Вперше показано, що ембріональна кардіоспецифічна гетеро- та гомозиготна делеція α -Е-катеніну спричиняє скорочення тривалості життя та передчасну загибель мутантних тварин в наслідок серцевої недостатності.

2. Виявлено, що α -Е-катенін є супресором транскрипційної активності канонічного WNT-сигнального шляху та Υ ap. Як гетеро-, так і гомозиготна делеція α -Е-катеніну призводить до активації канонічного WNT-сигнального шляху (зростає рівень активного β -катеніну та рівень інгібованої GSK-3 β , та знижується рівень Axin-1, а також зростає рівень експресії *Cttnb1* та *c-Myc*) та транскрипційної активності

Уар у неонатальних і дорослих кардіоміоцитах (зростає рівень експресії генів-мішеней: *Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1* та *Tnfrsf1b*).

3. Встановлено, що як гетеро-, так і гомозиготна ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє порушення функціонування РІЗК/Akt-сигнального шляху (зростає рівень тотальної Akt та фосфорильованої форми за Сер-473, але знижується фосфорильованої Akt за Тре-308) та MEK1-Erk1/2-сигнального каскаду в дорослих тварин (у гетерозигот знижується рівень фосфорильованих Erk1/2, а у гомозигот – зростає).

4. Вперше показано, що гетеро- та гомозиготний нокаут α -Е-катеніну викликає специфічні порушення метаболізму ліпідів (зниження вмісту PPAR α , інгібування AMPK та HSL та активацію ACC) та їхнє накопичення у кардіоміоцитах дорослого серця.

5. Виявлено, що ембріональна кардіоспецифічна гетеро- та гомозиготна делеція α -Е-катеніну спричиняє підвищення проліферативної активності неонатальних кардіоміоцитів та затримку їхньої термінальної диференціації.

СПИСОК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Балацький В. В. Альфа-Е-катенін у гістологічних перебудовах міокарда при старінні / В. В. Балацький, І. Акименко, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень, Л. Л. Лукаш // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 18. – С. 219-222. (Особисто дисертантом проведено аналіз виживаності тварин, морфометричний та гістологічний аналіз).
2. Балацький В. В. α -Е-катенін потенційний регулятор канонічного Wnt та HIPPO-сигналінгів у міокарді / В. В. Балацький, О. Л. Пальчевська, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14. – № 2. – С. 168-173. (Особисто дисертантом проведено дослідження вмісту фосфорильованих білків та рівня експресії генів).
3. Балацький В. В. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє зменшення експресії основного компонента десмосом γ -катеніну / В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – Т. 21. – С. 293-296. (Особисто дисертантом проведено дослідження рівня білка γ -катеніну та рівня експресії його гена).
4. Балацький В. В. Кардіоспецифічна делеція гена α -Е-катеніну призводить до порушення метаболізму ліпідів дорослого серця / В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій – 2017. – Т. 22. – № 2. – С. 65-68. (Особисто дисертантом проведено гістологічний аналіз та дослідження рівня білків).
5. Балацький В. В. Активність гіпертрофічних сигнальних шляхів у серці регулюється α -Е-катеніном / В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки – 2017. – Т.

20. – № 2. – С. 42-48. (Особисто дисертантом проведено дослідження рівня білків).
6. Balatskyi V. V. Cardiospecific knockout of α E-catenin leads to violation of the neonatal cardiomyocytes maturation via β -catenin and Yap signalling / V. V. Balatskyi, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, O. O. Piven // Biopolym. Cell – 2017. – Vol. 33. – № 6. – P. 434-441. (Особисто дисертантом проведено визначення розмірів клітин та кількості ядер, дослідження експресії генів)
 7. V. V. Balatskyi 1st Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv. – 2015.
 8. V. V. Balatskyi Loss of alpha-e-catenin in embrionic heart leads to dramatic malformation of adult heart / V. V. Balatskyi, O. L. Palchevska, L. L. Macewicz, O. O. Piven, L. L. Lukash // X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. Kyiv. – 2016.
 9. В. В. Балацький Ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до активації експресії генів-мішеней Ніпро-сигналінгу/ Балацький В.В., Пальчевська О.Л., Мацевич Л.Л., Півень О.О. // Міжнародна науково-практична конференція ‘Актуальні питання розвитку біології та екології’ Вінниця – 2016
 10. V. V. Balatskyi Alpha-E-catenin gene ablation leads to heart failure / 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// X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. Kyiv. – 2017.
 11. V. V. Balatskyi Alpha-E-catenin in neonatal cardiomyocytes size regulation / V. Vaskyvskyy, V. Balatskyi, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven // 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.

АНОТАЦІЯ

Балацький В. В. Роль α -Е-катеніну у постнатальному розвитку серця. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.22 «Молекулярна генетика». – Інститут молекулярної біології і генетики національної академії наук України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена з'ясуванню ролі α -Е-катеніну у функціонуванні міокарда, вивченню можливої участі α -Е-катеніну у модуляції активності сигнально-регуляторних каскадів у міокарді (WNT/ β -катенінового-, Ніпро-, РіЗК/Акт-, MAPK-, РКА-сигнальних шляхів), а також участі у регуляції метаболізму ліпідів у серці.

Вперше показано, що ембріональний кардіоспецифічний нокаут гену α -Е-катеніну призводить до розвитку серцевої недостатності, і як наслідок передчасної загибелі мишей, що супроводжується значними гістопатологічними зміни міокарда

(“хвилясті” кардіоміоцити, кардіоміоцити із гіпереозинофільною цитоплазмою, замісний та периваскулярний фіброз). Також, показано що як гетерозиготна, так і гомозиготна делеція α -Е-катеніну порушують термінальне диференціювання неонатальних кардіоміоцитів.

Встановлено, що і гетерозиготний, і гомозиготний кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну призводить до активації канонічного WNT/ β -катенінового сигнального шляху (зростає рівень активного β -катеніну та інгібованої GSK-3 β , знижується рівень інгібітора β -катеніну – Аксину-1, активується експресія генів-мішей). Також встановлено активацію транскрипційної активності основного медіатора Hippo-сигнального шляху – Yap (зростає експресія генів-мішеней: Aurka, Ctgf, Il1r11, Tnfrsf1b).

Показано, що делеція α -Е-катеніну призводить до активації Pi3K/Akt-сигналіну (зростає рівень фосфорильованої за Ser 473 Akt), до зміни активності MAPK-каскаду (гетерозиготна делеція α -Е-катеніну призводить до інгібування Erk1/2, а гомозиготна – до активації Erk1/2) та інгібування цАМФ/РКА-сигнального шляху (зниження рівня фосфорильованої РКА).

Встановлено, що як гетерозиготний, так і гомозиготний ембріональний кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну призводить до порушення метаболізму ліпідів у серці. У міокарді мутантних тварин відбувається накопичення нейтральних ліпідів внаслідок інгібування β -окислення жирних кислот (зниження вмісту активної АМРК, зниження рівня фосфорилування HSL та зростання рівня активної АСС, зниження рівня PPAR α).

В результаті виконаних досліджень було отримано низку фундаментальних даних, які значно доповнюють та розширюють попередні знання про роль α -Е-катеніну у функціонуванні післянатального міокарду та патогенезі серцевої недостатності. Запропоновано молекулярно-генетичний механізм, що може призводити до розвитку та прогресування серцевої недостатності внаслідок мутації/пригнічення експресії α -Е-катеніну. Дана робота, незважаючи на свою фундаментальність, може бути використана для покращення діагностики серцево-судинних патологій.

Ключові слова: α -Е-катенін, серцева недостатність, Wnt/ β -катеніновий сигнальний шлях, Hippo-сигнальний шлях, метаболізм.

АННОТАЦІЯ

Балацкый В. В. Роль α -Е-катенина в постнатальном развитии сердца. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2018 год.

Диссертация посвящена выяснению роли α -Е-катенина в функционировании миокарда, изучению возможного участия α -Е-катенина в модуляции активности сигнально-регуляторных каскадов в миокарде (WNT/ β -катенинового-, Hippo-,

Pi3K/Akt-, MAPK-, PKA-сигнальных путей), а также участия в регуляции метаболизма липидов в сердце.

Впервые установлено, что эмбриональный кардиоспецифический нокаут гена α -Е-катенина приводит к развитию сердечной недостаточности, и как следствие преждевременной гибели мышцей, сопровождается значительными гистопатологическими изменениями миокарда ("волнистые" кардиомиоциты, кардиомиоциты с гипереозинфильной цитоплазмой, заместительный и периваскулярный фиброз). Также, показано, что как гетерозиготная, так и гомозиготная делеция α -Е-катенина нарушают терминальную дифференциацию неонатальных кардиомиоцитов.

Установлено, что и гетерозиготный, и гомозиготный кардиоспецифический нокаут α -Е-катенина приводит к активации канонического WNT/ β -катенинового сигнального пути (растет уровень активного β -катенина и ингибированной GSK-3 β , снижается уровень ингибитора β -катенина – Аксина-1, активируется экспрессия генов-мышей). Также установлено активацию транскрипционной активности основного медиатора Hippo-сигнального пути – Yap (растет экспрессия генов-мишеней: *Aurka*, *Ctgf*, *Ilrl1*, *Tnfrsf1b*).

Показано, что делеция α -Е-катенина приводит к активации Pi3K/Akt-сигналинга (растет уровень фосфорилированной за Ser 473 Akt), к изменению активности MAPK-каскада (гетерозиготная делеция α -Е-катенина приводит к ингибированию Erk1/2, а гомозиготная – активации Erk1/2) и ингибирование цАМФ/PKA-сигнального пути (снижение уровня фосфорилированной PKA).

Установлено, что как гетерозиготный, так и гомозиготный эмбриональный кардиоспецифический нокаут α -Е-катенина приводит к нарушению метаболизма липидов в сердце. В миокарде мутантных животных происходит накопление нейтральных липидов в результате ингибирования β -окисления жирных кислот (снижение содержания активной АМПК, снижение уровня фосфорилирования HSL и рост уровня активной АСС, снижение уровня PPAR α).

В результате выполненных исследований был получен ряд фундаментальных данных, которые значительно дополняют и расширяют предыдущие знания о роли α -Е-катенина в функционировании постнатального миокарда и патогенезе сердечной недостаточности. Предложено молекулярно-генетический механизм, который может приводить к развитию и прогрессированию сердечной недостаточности вследствие мутации/подавления экспрессии α -Е-катенина. Данная работа, несмотря на свою фундаментальность, может быть использована для улучшения диагностики сердечно-сосудистых патологий.

Ключевые слова: α -Е-катенин, сердечная недостаточность, Wnt/ β -катениновый сигнальный путь, Hippo-сигнальный путь, метаболизм.

SUMMARY

Balatskyi V.V. α -E-catenin in postnatal heart development. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.22 – Molecular Genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The heart is the first organ to form during mammalian development. Proper signaling regulation and cell-cell interactions are extremely important for cardiogenesis and the maturation and functioning of the heart. Intercalated discs: adherens junctions, desmosomes, and gap junctions that consist of three major junctional complexes maintain heart tissue formation. Many proteins that are members of cell junctional complexes are also involved in regulating signaling cascades and play important roles in mechanical cell coupling and the determination of cell fate. Among these is *Ctnn1*, which encodes α E-catenin, a protein component of cell-cell adhesion that links the cadherin-catenin complex to the actin cytoskeleton. Two isoforms of α -catenin are expressed in the heart: α E-catenin and α T-catenin. α T-catenin permanently interacts with the cadherin-catenin complex and actin cytoskeleton to provide strong intercellular adhesion. α E-catenin acts as a mechanosensor in the cadherin-catenin complex.

The structure and function of α -catenin have been studied using experimental mouse models and isolated cells. The early embryonic loss of this gene was shown to disrupt the trophoblast epithelium and block embryonic development in the blastocyst stage. Previously was reported that heart-specific knockout of α E-catenin did not affect cardiogenesis or overall embryonic development. This appeared to be related to functional redundancy between proteins of the adhesion complex, particularly between α E- and α T-catenin. Other studies showed that the ablation of α E-catenin in the adult heart leads to cardiomyopathy and intercalated disc abnormalities. Moreover, in humans, α E-catenin downregulation was observed in areas of myocardial infarction with heart wall rupture, but the precise mechanisms of this downregulation are still unknown.

Recent studies suggest that α E-catenin is involved in regulating HIPPO signaling by binding with Yap (i.e., the main mediator of HIPPO signaling). α E-catenin deletion in the skin leads to keratinocyte hyperproliferation through HIPPO signaling inhibition. Furthermore, α E-catenin interacts with 14-3-3 protein and Yap and sequesters it in the cytoplasm, thereby preventing Yap translocation to the nucleus. The cardiospecific double knockout of α E- and α T-catenin in mice led to the activation of Yap-dependent transcription and cardiomyocytes proliferation. Furthermore, α -catenin modulates canonical WNT signaling. It prevents the interaction between the β -catenin/T-cell factor complex and DNA and stimulates β -catenin degradation.

These data clearly show that α E-catenin has dual functions in the heart—structural and signaling functions – but the latter is poorly understood. Thus, we employed a conditional knockout approach to explore the role of α E-catenin in the functioning of the adult heart and signaling networks that orchestrate myocardium metabolism. We found that α E-catenin plays an important role in the suppression of canonical Wnt- and Yap-dependent transcription in cardiomyocytes. Cardiospecific knockout of α E-catenin caused enlargement of the heart and atria, heart fibrosis, the upregulation of hypertrophic genes, and the dysregulation of fatty acid metabolism via Yap and β -catenin transcriptional activity. The

robust activation of canonical Wnt and Yap negatively affected cardiomyocytes signaling machinery, specifically by downregulating the activity of main regulators of energy metabolism (adenosine monophosphate-activated protein kinase [AMPK] and peroxisome proliferator-activated receptor α [PPAR α]) and dysregulating hypertrophic pathway activity (i.e., phosphatidylinositide 3-kinase [Pi3K]/Akt, cyclic adenosine monophosphate [cAMP]/protein kinase A [PKA], and MEK1/extracellular signal regulated kinase 1/2 [Erk1/2]). Moreover, α E-catenin downregulation negatively affected cardio-hemodynamic function and led to the inability of cardiomyocytes to adapt to physical loads via the PKA pathway. We found that the embryonic heart-specific ablation of α E-catenin led to the development of heart failure with age and premature death in mice. Thus, full or even partial α E-catenin gene dysfunction caused heart failure through canonical Wnt and Yap activation.

In addition, we found that α -E-catenin knock out impairs maturation and terminal differentiation of neonatal cardiomyocytes via activation canonical Wnt- and Hippo-signaling pathways. The embryonic cardiospecific ablation of α E-catenin stimulates the proliferation of neonatal cardiomyocytes and attenuates their maturation (smaller cardiomyocytes and a lower level of binucleated cardiomyocytes) via the β -catenin-and Yap-dependent transcription activity. The signaling function of α E-catenin is crucially important for the postnatal heart maturation and function.

Our data expand knowledge of the role of α E-catenin in regulating heart function. α E-catenin is involved in maintaining cell adhesion and modulating two critical signaling pathways (i.e., HIPPO and canonical Wnt). Thus, α E-catenin plays an important role in suppressing β -catenin- and Yap-dependent transcription in cardiomyocytes. The results suggest a molecular genetic mechanism of heart failure development due to the mutation in α -E-catenin our downregulation of its expression. Results obtained in this study, despite its fundamentality, may improve diagnostics of cardiovascular pathologies.

Key words: α -E-catenin, heart failure, WNT/ β -catenin signaling, Hippo signaling, metabolism.