

ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БАЛАЦЬКИЙ Володимир Вікторович

УДК 575+576.52+577+616.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ α -Е-КАТЕНІНУ У ПОСТНАТАЛЬНОМУ РОЗВИТКУ
СЕРЦЯ**

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

В. В. Балацький

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

Київ – 2018

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 спеціальність 03.00.22 «Молекулярна генетика».
– *Інститут молекулярної біології і генетики національної академії наук України, Київ, 2018.*

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. В Україні, це також нагальна проблема і, наприклад, лише в 2014 році від ССЗ загинуло 425607 людей, що складає 67,3% від усіх зареєстрованих смертей за цей рік. 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 обмеження індивідуальних можливостей пацієнтів. З іншого боку поширеність ССЗ та інвалідизація і летальність спричинена цією групою патологій мають 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. 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.

Зважаючи на таку невтішну статистику поширення ССЗ 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 принциповими регуляторами як кардіогенезу, постнатального розвитку серця, так і розвитку патологій міокарду, тож порушення сигнальних каскадів кардіоміоцитів може спричинити порушення зазначених процесів. Одним із генів, що приймає участь не лише у підтриманні структурної цілісності серця, а й у регулюванні сигнальних каскадів є α -Е-катенін.

α -Е-катенін – компонент міжклітинної адгезії, який забезпечує поєднання кадєрин-катєнінового комплексу із актиновим цитоскелетом, але нещодавні дослідження встановили залучення α -Е-катєнін до модуляції активності сигнальних шляхів, серед яких зокрема Wnt/ β -катєніновий-, NIPPO-, MAPK-сигнальні каскади. Варто зауважити, що зазначені сигнальні каскади залучені до контролю росту та проліферації кардіоміоцитів, контролюють розміри серця та кардіоміоцитів, а також метаболізм міокарду. Тож, порушення активності цих каскадів може спричинити і порушення функції серця та бути причиною розвитку патології міокарду.

Структурна та сигнальна функції α -Е-катєніну досліджувались із використанням культур клітин та мишиних моделей. Так було показано, що делеція α -Е-катєніну в ранньому ембріогенезі призводить до порушення формування трофобласту та блокує ембріональний розвиток на стадії бластоцисти. На противагу згаданій роботі, делеція α -Е-катєніну винятково в ембріональному серці не спричиняла летальності тварин. Раніше у нашому відділі було показано, що ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катєніну не призводить до вад кардіогенезу, за рахунок функціональної компенсації α -Т-катєніном. Іншими вченими було показано, що

кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до розвитку дилатаційної кардіоміопатії у дорослих мишей. 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. 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. 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 до активації проліферації кардіоміоцитів та транслокації Yар в ядро. 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. 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.

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/Akt-, 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 змінами 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 Ніпро-сигнального шляху – Уар (зростає експресія генів-мішеней: *Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b*).

Показано, що делеція α -Е-катеніну призводить до активації РіЗК/Akt-сигналіну (зростає рівень фосфорильованої за Сер 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 АМПК, 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, Нірро-сигнальний шлях, метаболізм.

Список робіт, що опубліковані за темою дисертації

1. 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.
2. 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 дисетантом проведено аналіз виживаності тварин, морфометричний та гістологічних аналіз).
3. Балацький В. В. α -Е-катенін потенційний регулятор канонічного Wnt та НІРРО- 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).

4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. V. V. Balatskyi Alpha-E-catenin signaling function in cardiomyocytes proliferation/ **V. Balatskyi**, O. Palchevska, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven, L. Lukash 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-сигналіngu/ **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. Vaskyvskyu, 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.

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. Heart tissue formation is maintained by intercalated discs that consist of three major junctional complexes: adherens junctions, desmosomes, and gap junctions. 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 *Cttna1*, 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 cardiomyocyte 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 cardiomyocyte 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.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

1. 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.

2. Balatskyi V. V. Alpha-E-Catenin in histological reconstruction of myocardium with aging / **Balatskyi V. V.**, Akimenko I., Macewicz L. L., Piven O.O., Lukash L. L. // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2016. – V. 18. – P. 219-222.
3. Balatskyi V. V. α -E-catenin is a potential regulator of canonical wnt and hippo-signallings in myocardium / **V. V. Balatskyi**, O. L. Palchevska, L. L. Macewicz, O. O. Piven // The Bulletin of Vavilov Society of Geneticist and Breeders of Ukraine. – 2016. – V. 14. – № 2. – P. 168-173.
4. Balatskyi V. V. Cardiac deletion of α -E-catenin leads to reduced expression of the main component of desmosomes – γ -catenin / **V. V. Balatskyi**, L. L. Macewicz, O. O. Piven // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2017. – V. 21. – P. 293-296.
5. V. V. Balatskyi. Embryonic cardiospecific knockout of α -E-catenin gene leads to alteration of energy metabolism in adult heart / **V. V. Balatskyi**, L. L. Macewicz, O. O. Piven // Bulletin of the Taras Shevchenko National University of Kyiv. Problems of regulation of physiological functions – 2017. – V. 22. – № 2. – C. 65-68.
6. V. V. Balatskyi. α -E-catenin regulates hypertrophic signalings in heart / **V. V. Balatskyi**, L. L. Macewicz, O. O. Piven // Bulletin of the Zaporizhzhya National University. Biological sciences – 2017. – T. 20. – № 2. – C. 42-48.
7. V. V. Balatskyi Alpha-E-catenin signaling function in cardiomyocytes prolaliferation/ **V. Balatskyi**, O. Palchevska, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven, L. Lukash 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. V. V. Balatskyi Embryonic cardiospecific alpha-E-catenin deletion induce upregulation of hippo-signaling target genes / **Balatskiy V.V.**, Palchevska O.L., Macewicz L.L., Piven O O // International Scientific and Practical Conference ‘Current problems of biology and ecology’. Vinnitsa – 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1	28
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. Ізоформи та будова α -катеніну	29
1.2. Участь α -катеніну в міжклітинній адгезії	31
1.3. α -Катенін у регуляції цитоскелету	35
1.4. Участь α -катеніну в сигнальних каскадах клітини	36
1.4.1. α -Катенін у модуляції WNT/ β -катенінового сигнального шляху.	37
1.4.2. α -Катенін у регуляції HIPPO-сигнального каскаду.	40
1.4.3. α -Е-катенін у регуляції інших сигнальних каскадів.	42
1.5. Функція α -катенінів у серці	44
РОЗДІЛ 2	48
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	48
2.1. Опис біологічних, хімічних агентів та обладнання що використовувались у роботі	48
2.1.1. Біологічні матеріали.	48
2.1.2. Хімічні агенти.	49
2.1.3. Праймери.	49
2.1.4. Обладнання.	52
2.2. Опис тваринної моделі та схеми схрещування	52
2.2.1. Генотипування.	55

	15
2.3. Дослідження виживаності мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну	56
2.4. Дослідження кардіогемодинамічних параметрів	56
2.5. Морфометричний аналіз дослідних тварин	57
2.6. Гістологічний аналіз тканини міокарда	57
2.7. Виділення РНК, синтез кДНК та ПЛР в реальному часі	60
2.8. Виділення тотального білка, електрофорез у ПААГ в денатуруючих умовах та Вестерн-блот	61
2.9. Виділення первинної культури неонатальних кардіоміоцитів	62
2.10. Морфологічний аналіз кардіоміоцитів <i>in vitro</i>	63
2.11. Дослідження рівня проліферації неонатальних кардіоміоцитів	64
2.12. Статистична обробка даних	64
РОЗДІЛ 3	66
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	66
3.1. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до розвитку серцевої недостатності, гістопатологічних змін міокарда та передчасної загибелі мишей	66
3.1.1. Гетерозиготна та гомозиготна делеція α -Е-катеніну у серці спричиняє передчасну загибель мутантних тварин.	66
3.1.2. Втрата α -Е-катеніну спричиняє розвиток гіпертрофії серця. Морфологічний та морфометричний аналіз сердець тварин з гетеро- та гомозиготною делецією гену	68
3.1.3. Делеція α -Е-катеніну призводить до значних гістопатологічних змін міокарда.	71
3.1.4. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до зниження рівня основного цитоплазматичного компонента демосом – γ -катеніна.	74

	16
3.1.5. Нокаут α -Е-катеніну призводить до порушення гемодинамічної функції серця.	75
3.2. Нокаут α -Е-катеніну призводить до активації WNT/ β -катенінового сигнального шляху та Υ ар-залежної транскрипції	82
3.2.1. Гетрозиготна та гомозиготна делеції α -Е-катеніну призводить до активації канонічного WNT/ β -катенінового сигнального шляху.	82
3.2.2. Гетрозиготна та гомозиготна делеції α -Е-катеніну призводить до активації Υ ар-залежної транскрипції.	86
3.3. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до зміни активності гіпертрофічних сигнальних каскадів	90
3.4. Кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну спричиняє порушення метаболізму ліпідів у серці	95
3.4.1. Делеція α -Е-катеніну призводить до інгібування окислення та накопичення ліпідів у серці.	95
3.4.2. Нокаут α -Е-катеніну спричиняє інгібування основних регуляторів метаболізму нейтральних жирів.	99
3.5. Делеція α -Е-катеніну призводить до порушень неонатального серця	102
3.5.1. Нокаут α -Е-катеніну призводить до порушення термінального диференціювання неонатальних кардіоміоцитів.	102
3.5.2. Делеція α -Е-катеніну спричиняє підвищення транскрипційної активності β -катеніну та Υ ар у серцях новонароджених тварин.	107
РОЗДІЛ 4	111
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	111
ВИСНОВКИ	122
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	124

ДОДАТОК А	17
ДОДАТОК Б	145
ДОДАТОК В	148
ДОДАТОК В	149

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

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

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

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

BW – body weight (маса тіла)

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

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

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

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

GSK – glycogen-synthase-kinase (кіназа глікогенсинтази)

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

Na₂EDTA – disodium ethylenediaminetetraacetate (динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти)

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

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

РІЗК – 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)

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

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

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

АЗ – адгеринові з'єднання

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ІД – інтеркалярні диски

ЗТ-ПЛР – зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція

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

РНК – рибонуклеїнова кислота

ФБС – фетальна бича сироватка

ССЗ – серцево-судинні захворювання

Сер – серин

Тре – треонін

ВСТУП

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 [65]. В Україні, це також нагальна проблема і, наприклад, лише в 2014 році від ССЗ загинуло 425607 людей, що складає 67,3% від усіх зареєстрованих смертей за цей рік [164]. 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 обмеження індивідуальних можливостей пацієнтів. З іншого боку поширеність ССЗ та інвалідизація і летальність спричинена цією групою патологій мають 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 [164]. 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 [152].

Зважаючи на таку невтішну статистику поширення ССЗ 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 спричиняти розвиток ССЗ. Нині описано низку генів, мутації у яких спричиняють розвиток дилатаційної, гіпертрофічної кардіоміопатій та аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка. Серед них переважно гени, що кодують 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 принциповими регуляторами як кардіогенезу, постнатального розвитку серця, так і розвитку патологій міокарду, тож порушення сигнальних каскадів кардіоміоцитів може спричинити порушення зазначених процесів. Одним із генів, що приймає участь не лише у підтриманні 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 [159], але нещодавні дослідження встановили залучення α -Е-катеніну до модуляції активності сигнальних шляхів, серед яких зокрема Wnt/ β -катеніновий-, HIPPO-, MAPK-сигнальні каскади [160]. Варто зауважити, що зазначені сигнальні каскади залучені до контролю росту та проліферації кардіоміоцитів, контролюють розміри серця та кардіоміоцитів, а також метаболізм міокарду [174,35,138]. 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 [154]. На противагу згаданій роботі, делеція α -Е-катеніну 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 [126]. Іншими вченими було показано, що кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до розвитку дилатаційної кардіоміопатії у дорослих мишей [144]. 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 [19]. 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 [140,157]. 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 до активації проліферації кардіоміоцитів та транслокації Yар в ядро [88]. 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 [32,48]. 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) 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), 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 Hippo-сигнальних шляхів у серці мишей із кардіоспецифічним нокаутом α -Е-катеніну.
3. Проаналізувати активність гіпертрофічних сигнальних каскадів (Pі3K- 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 сигналіngu, Yар залежна транскрипція, метаболізм серця, активність AMPK, PPAR α , Pі3K/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 Гізеном та забарвлення жиром 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 Калан-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 Yap 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 PI3K/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 Yap , 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 Гіzenом та забарвлення жиром 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 та методи, результати досліджень, узагальнення та аналіз результатів), висновків та списку літератури, який налічує 175 посилань. Робота викладена на 149 сторінках машинописного тексту (з них 103 сторінок складає основна частина роботи) і містить 3 таблиці, 32 рисунки та 3 додатки.

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. 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. 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Міжклітинна адгезія та міжклітинна комунікація – ключові процеси, що забезпечують існування багатоклітинних організмів. Комунікація між клітинами забезпечує диференціювання клітин у різні типи, а також їхнє об'єднання у тканини та органи, і як наслідок – функціонування організму, як єдиного цілого. Міжклітинна адгезія підтримується наступними типами контактів: щільними та адгериновими з'єднання, десмосомами, щілинними контактами [36]. Варто зауважити, що для існування організму необхідно не лише об'єднання клітин, а й комунікація між ними, яка забезпечується численними сигнальними каскадами, серед яких зокрема: WNT-, Hippo-, PI3K-, MAPK-, цАМФ/РКА-сигнальні шляхи та багато інших [34,139,174,28,138]. Злагоджене функціонування процесів міжклітинної адгезії та сигналізації забезпечують нормальний розвиток та існування організму, а порушення – призводять до розвитку хвороб, у тому числі і ССЗ, та як наслідок летальності.

Розуміння функції окремих молекул, що приймають участь як у підтримці міжклітинної адгезії, так і в сигнальній регуляції диференціювання, росту, проліферації та метаболізму клітин мають вагомe значення і для розуміння процесів патогенезу різних захворювання, зокрема і ССЗ. Особливий інтерес, у цьому сенсі, викликають молекули із подвійними функціями: сигнальною та структурною. Серед таких, наприклад, β -катенін

який є компонентом адгеринових з'єднань та медіатором канонічного WNT-сигнального шляху; iASPP є регулятором десмосом та NF-κB-сигналіngu; Yarp взаємодіє із AMOT та є ключовим медіатором Hippo-сигнального шляху [97]. Порушення функції цих білків та/або експресії цих генів мають зазвичай комплексні патологічні прояви за рахунок порушення як сигнальної, так і структурної функцій. Протягом останніх років участь у модуляції активності сигнально-регуляторних шляхів була встановлена й для α-катеніну, який забезпечує поєднання адгеринових з'єднань із актиновим цитоскелетом. Зокрема було встановлено, що α-катенін залучається до WNT/β-катенінового- [135,32], Hippo- [140], NF-κB- [81] та Hedgehog-сигнальних шляхів [93]. Але роль α-Е-катеніну у регуляції сигнальних каскадів, особливо у серці залишається не з'ясованою.

1.1. Ізоформи та будова α-катеніну

Вперше α-катенін було виявлено при аналізі структури класичного адгеринового комплексу методом імуноприципітації антитілами проти E-кадерину у комплексі із іншими кадерин-зв'язувальними білками: β- та γ-катенінами [116]. Нині відомо, що α-катенін – білок із масою 102 кДа, який не зважаючи на назву, не належить до родини катенінів. Цей білок належить до іншої родини і характеризується значною гомологією із вінкуліном [116,58]. Нині ідентифіковано три ізоформи α-катеніну: α-Е-, α-N- та α-T-катеніни, що кодуються різними генами. Дослідження виявили, що α-Е-катенін експресується майже у всіх органах та тканинах багатоклітинних організмів: епітелій, серце, мозок, нирки, тимус, щитовидна залоза та інші.

Також було показано, що у людини α -Е-катенін має два сплайсові варіанти: $\alpha 1$ -Е- та $\alpha 2$ -Е-катеніни які відрізняються між собою вставкою з 24 амінокислот в СООН-кінці молекули [108,136]. На противагу α -Е-катеніну, α -N-катенін експресується виключно у нейронах різних відділів нервової системи. Для α -N-катеніну ідентифіковано три ізоформи: α -NI-, α -NII- та α -NIII-катеніни, які є результатом альтернативного сплайсингу. Цікаво, що для цього білка була показана і певна видоспецифічність, а саме α -NI- та α -NII-катеніни ідентифіковані у всіх ссавців та відрізняються між собою вставкою з 48 амінокислот у СООН-кінці молекули, тоді як форма α -NIII-катенін – специфічна лише для приматів та характеризується делецією NH₂-кінцевих екзонів [59,156,105]. Експресія α -Т-катеніну, також обмежується певними типами клітин, а саме, він експресується на високому рівні в клітинах сім'яників та в кардіоміоцитах. Однак, низький рівень експресії α -Т-катеніну виявлений також і в клітинах скелетних м'язів, нирок та печінки, нейронах головного мозку. Для цього катеніну також ідентифіковано три транскрипти його гену: стандартний транскрипт, альтернативний транскрипт В та альтернативний транскрипт Х, які синтезуються із альтернативних промоторів. Із них перші два кодують ідентичні білки, а альтернативний транскрипт Х – форму білка, у якої відсутній NH₂-кінцевий β -катенін зв'язувальний домен [72,50].

У структурі α -катеніну виділяють низку функціональних доменів (рис. 1.1): 1) β -катенін/плакоглобін зв'язувальний домен, який розміщується на NH₂-кінці молекули, необхідний для взаємодії α -катеніну із кадеринами через β -катенін або плакоглобін; 2) гомодимеризаційний домен, який частково перекривається із β -катенін-зв'язувальним доменом; 3) вінкулін-зв'язувальний домен, який знаходиться між амінокислотними залишками 327-402 і відповідає за взаємодію із вінкуліном та α -актиніном; 4) домен, що модулює адгезію через утворення димерів із низькою афінністю і необхідний для стабілізації латеральних димерів кадєринів на плазматичній мембрані; 5)

ZO1-зв'язуючий домен знаходиться на COOH-кінці та необхідний для взаємодії із ZO1, ZO2 та актином [114,127,68,168].

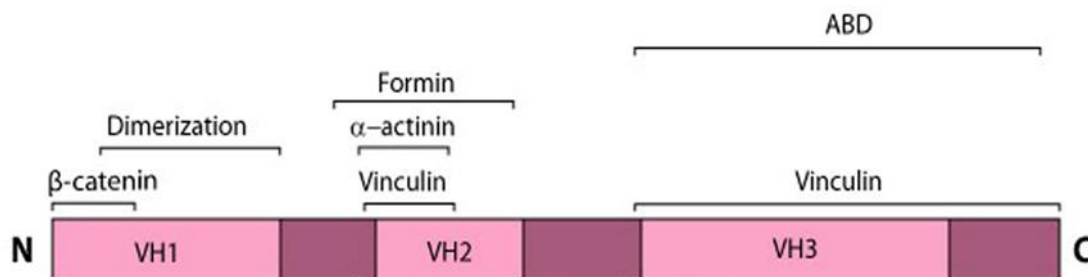


Рис. 1.1. Схематичне зображення функціональних доменів α -катеніну [102]. VH – ділянки гомологічні вінкуліну, ABD – актинзв'язуючий сайт. Вказано сайти взаємодії із білками-партнерами

1.2. Участь α -катеніну в міжклітинній адгезії

Адгеринові з'єднання відіграють надзвичайно важливу роль під час ембріогенезу та в підтриманні гомеостазу дорослого організму, а порушення їхньої структури призводить до розвитку багатьох патологій [66]. Адгеринові з'єднання утворюються трансмембранними білками – класичними кадеринами (E-, N-, P-, R-, M-кадеринами), які забезпечують гомофільну Ca^{2+} -залежну взаємодію між суміжними клітинами [66]. Із цитоплазматичним хвостом кадєринів взаємодіють катеніни: α -, β/γ - та p120-катеніни (рис. 1.2.). β/γ -Катенін та p120-катенін взаємодіють безпосередньо із кадеринами, а α -катенін, взаємодіючи із β -катеніном та актинзв'язуючими білками, поєднує кадєрин-катеніновий комплекс із актиновим цитоскелетом [116,114,127,68,168,117,118,75]. p120-Катенін взаємодіє із примембранною

ділянкою кадєринів та інгібує їхній ендцитоз, окрім того, для стабілізації цієї взаємодії критично необхідним є α -катєнін [155].

α -Катєнін *in vitro* взаємодіє із актином та призводить до утворення актинових пучків (actin bundles). Актинзв'язувальна активність α -катєніну реалізується лише в димерній формі [137]. Не зважаючи на здатність α -катєніну взаємодіяти як із актином, так і з β -катєніном, нині не було продемонстровано утворення гетеротетрамерного комплексу типу кадєрин/ β -катєнін/ α -катєнін/актин [166]. Тому вважається, що для приєднання кадєринового комплексу необхідні й інші актинзв'язувальні білки. Так було показано взаємодію α -катєніну із актинзв'язувальним білком вінкуліном і встановлено, що ця взаємодія необхідна для утворення функціональних адгєринових з'єднань [161,162]. З'ясувалось також, що α -катєнін при взаємодії із вінкуліном активує його, що надає йому здатності взаємодіяти із актиновим цитоскелетом [123]. У свою чергу, в результаті взаємодії із вінкуліном α -катєнін зазнає конформаційних змін, переходячи у відкриту конформацію. Варто зауважити, що взаємодія вінкуліну із α -катєніном стабілізується актином [133,70,31]. α -Актинін є безпосереднім партнером α -катєніну в складі кадєрин-катєнінового комплексу, та можливо, забезпечує взаємодію останнього із актиновим цитоскелетом [80,111]. Іншими партнером α -катєніну, який залучається до поєднання адгєринових з'єднань із цитоскелетом є EPLIN. Ця взаємодія є надзвичайно важливою для поєднання кадєрин-катєнінового комплексу із актиновим цитоскелетом, оскільки нокдаун EPLIN призводив до порушення їхньої структури. Також авторам вдалось *in vitro* "зібрати" комплекс кадєрин/ β -катєнін/ α -катєнін/EPLIN/F-актин [3]. ZO-1 безпосередньо взаємодіє із α -катєніном у складі кадєрин-катєнінового комплексу, а також із F-актином, забезпечуючи таким чином поєднання адгєринових з'єднань із цитоскелетом [71]. Поєднання кадєрин-катєнінового комплексу із актиновим цитоскелетом, також, забезпечується LIM білком Ajuba, який взаємодіє із α -катєніном [102]. Окрім усього вище згаданого, утворення адгєринових з'єднань стимулюється

і лінійними актиновими канатами (actin cables), для їхньої полімеризації залучається білок формін-1, який безпосередньо взаємодіє із α -катеніном [82]. Адгеринові з'єднання крім актинового цитоскелету поєднуються також, із примембранним спектриновим цитоскелетом, і для цієї взаємодії необхідна пряма взаємодія із α II β II спектрином [130]. Крім актинзв'язувальних білків із α -катеніном взаємодіє білок 1-афадін, внаслідок цієї взаємодії поєднуються два адгезивних комплекси: кадєрин-катєніновий та спектриновий [150,128].



Рис. 1.2. Схема будови адгєринових з'єднань за [107]

α -Катєнін окрім стабілізації взаємодії кадєрин-катєнінового комплексу із цитоскелетом клітини залучається до утворення та перебудови перших. Так було показано, що α -катєнін виконує дві важливі функції на ранніх етапах утворення адгєринових з'єднань: 1) взаємодіючи із кадєрин/ β -катєніновим комплексом α -катєнін підсилює початкові гомофільні взаємодії між окремими молекулами кадєринів на суміжних клітинах; 2) забезпечуючи міцність першого кадєрин/кадєринового комплексу α -катєнін також сприяє утворення численних взаємодій між клітинами без залучення актинового цитоскелету [9].

Кадерин-катеніновий комплекс, під час утворення міжклітинної адгезії, зазнає механічного впливу актоміозинового комплексу при цьому, основним передавачем навантаження є α -катенін [18]. α -Катенін є механочутливим елементом адгеринових з'єднань, який внаслідок прикладення сили, яка виникає в результаті скорочення актино-міозинового комплексу зазнає конформаційних змін (розгортання молекули). Ці зміни призводять до вивільнення сайту взаємодії із вінкуліном, що забезпечує залучення, ще більшої кількості актинових мікрофіламентів до кадерин-катенінового комплексу, збільшуючи міцність адгеринових з'єднань [171]. Як зазначалось вище α -катенін взаємодіє із EPLIN, і цікаво, що ця взаємодія також є механочутливою, але на відміну від вінкуліну EPLIN взаємодіє із α -катеніном лише у нерозгорнутій конформації. Таким чином взаємодія між α -катеніном та EPLIN відбувається у статичних адгеринових контактах, які не зазнають механічного навантаження [151].

Варто зауважити, що адгеринові з'єднання зазнають постійних змін під час розвитку, формування та функціонування організмів. Так, наприклад, при дослідженні ембріонів дрозофіли було показано, що α -катенін забезпечує динамічність кадеринових гомодимерів на плазматичній мембрані. Він по чергово взаємодіє із актиною сіткою та β -катеніном, що і забезпечує їхню мобільність [26]. До того ж, α -катенін регулює кадеринові з'єднання на різних рівнях, так було показано, що нокдаун α -катеніну помірно знижував афінність кадеринів [10].

Узагальнюючі вище наведені дані, стає очевидно, що α -катенін у складі кадерин-катенінового комплексу є принциповим гравцем при утворенні сайтів взаємодії із численними актинзв'язувальними білками, і може бути однією із ключових ланок у регуляції кадерин опосередкованої міжклітинної адгезії.

1.3. α -Катенін у регуляції цитоскелету

Баланс між адгезією та міграцією клітин надзвичайно важливий для підтримання гомеостазу організму. Як вже детально розглядалось вище, одним із регуляторів адгезії та динаміки цитоскелету є α -катенін, що ходить до складу адгеринових з'єднань та регулює цитоскелет у різних формах. Так було показано, що у розчині α -катенін утворює гомодимери, а коли у розчині є β -катенін α -катенін зв'язує його із високою афінністю ($K_d = 100$ нМ) [84]. У клітині цитоплазматична фракція α -катеніну, також, існує у мономерній, гомодимерній та гетеродимерній формі із β -катеніном [15]. α -Катенін в гомодимерній формі регулює локальну динаміку актинового цитоскелету супресуючи розгалуджуючу активність Atp2/3 комплексу, та сприяє таким чином утворенню актинових пучків поблизу кадєрин-катенінового комплексу [38]. Крім того було показано, що цитоплазматична фракція α -катеніну регулює динаміку актинового цитоскелету незалежно від кадєринового комплексу. Цікаво, що секвестрування цитоплазматичної фракції α -катеніну до мітохондрій призводило до зростання динаміки плазмалеми та міграції клітини, а її секвестрування до плазмалеми – навпаки зменшувало динаміку ламелоподій [15]. Супресія активності Atp2/3 α -катеніном полягає в тому, що α -катенін взаємодіє із актиновим протомером, захищаючи від взаємодії із Atp2/3, що запобігає розгалуженню актинових філаментів [52]. Стабілізація актинового цитоскелету α -катеніном поблизу плазматичної мембрани має надзвичайно важливе значення у процесах нейрогенезу. Так було показано, що делеція α -N-катеніну у нейронах гіпокампу призводить до зменшення дендритних шипиків, внаслідок зростання динаміки мембран, а його над експресія, навпаки, призводить до зростання кількості таких шипиків [4].

Також було встановлено, що α -катенін окрім актинового цитоскелету регулює і структуру мікротрубочок у клітинах в яких відсутні центросоми. Так було показано, що надекспресія α -катеніну призводила до зростання кількості та довжини мікротрубочок в таких клітинах [145]. Окрім того, α -катенін є одним з факторів що регулює внутрішньоклітинний рух, так було показано, що він взаємодіє із субодиницею динактинового комплексу (динамінтином) та інгібує рух органел по мікротрубокам [94].

Тож, структура функція α -Катеніну досить багатогранна, він не лише підтримує стабільність та міцність міжклітинних адгезивних комплексів, а й незалежно від адгеринових з'єднань стабілізує цитоскелет та регулює внутрішньоклітинний транспорт.

1.4. Участь α -катеніну в сигнальних каскадах клітини

α -Катенін відіграє надзвичайно важливу функцію у розвитку та гомеостазі організму за рахунок регуляції міжклітинної адгезії та перебудов цитоскелету. Проте роботи останніх років свідчать і про сигнальну функцію цього білка, яка наразі гірше досліджена. Одним із перших свідчень залучення α -катеніну до сигнальних шляхів була робота Vasioukhin et. al [157] у якій було показано, що делеція α -катеніну в шкірі призводить до гіперпроліферації кератиноцитів, яка не пов'язана із порушенням міжклітинної адгезії. При цьому у таких кератиноцитів спостерігалась активація Ras- та MAPK-сигнальних каскадів [157]. Це примушує нас переглянути функцію α -катеніну у розвитку, формування та функціонування організму і окремих його систем.

1.4.1. α -Катенін у модуляції WNT/ β -катенінового сигнального шляху. WNT/ β -катеніновий сигнальний шлях один із найважливіших регуляторів проліферації та диференціювання клітин, як в ембріогенезі, так і в дорослому організмі [25,78]. Патологічна активація цього сигнального каскаду призводить до багатьох захворювань серед яких зокрема рак, а також і серцево-судинні захворювання [16,34]. Основним медіатором канонічного WNT-сигналіngu є β -катенін, який за відсутності WNT-лігандів в деградувальному комплексі фосфорилується кazeїн кіназою I та кіназою глікогенсинтази 3 β (GSK3- β) після чого зазнає убіквітилювання убіквітинлігазою β -Trcp та направляється для подальшого протеасомного протеолізу (рис. 1.3 *a*) [54]. Зв'язування WNT-лігандів із рецепторами Frizzled та LRP5/6 стимулює їхнє фосфорилування, утворення сигналосоми та рекрутування деградувального комплексу до плазматичної мембрани. Усе це призводить до вивільнення β -катеніну та його транслокації в ядро де він взаємодіючи із транскрипційними факторами родини LEF/TCF активує експресію генів-мішеней (рис. 1.3 *б*) [54].

Участь α -катеніну у модуляції активності канонічного WNT-сигнального шляху було встановлено із використанням різних модельних систем. Зокрема було показано, що ектопічна надекспресія α -N-катеніну у ембріонах *Xenopus laevis* інгібує активність канонічного WNT-сигналіngu, що призводить до порушення дорзалізації ембріону [143]. Із використанням встановлених клітин ліній U87/EGFR та U251/EGFR (клітинигліобластоми, які надекспресуюють рецептор до епідермального фактора росту) було показано, що надекспресія α -катеніну призводить до пригнічення ядерної локалізації β -катеніну після стимуляції епідермальним фактором росту. І навпаки, його нокдаун – спричиняє зростання ядерної локалізації β -катеніну навіть у нестимульованих клітинах. Також α -катенін інгібував як проліферацію, так і міграцію ракових клітин [74]. Залучення α -катеніну до модуляції активності β -катеніновий сигналіngu виявлено і при дедиференціації хондроцитів. Так, убіквітин-незалежна протеасомна

деградація α -катеніну в хондроцитах стимулює, як базальну, так і WNT7A-стимульовану транскрипційну активність β -катеніну [67]. Подальші роботи встановили і механізми за якими α -катенін модулює транскрипційну активність β -катеніну.

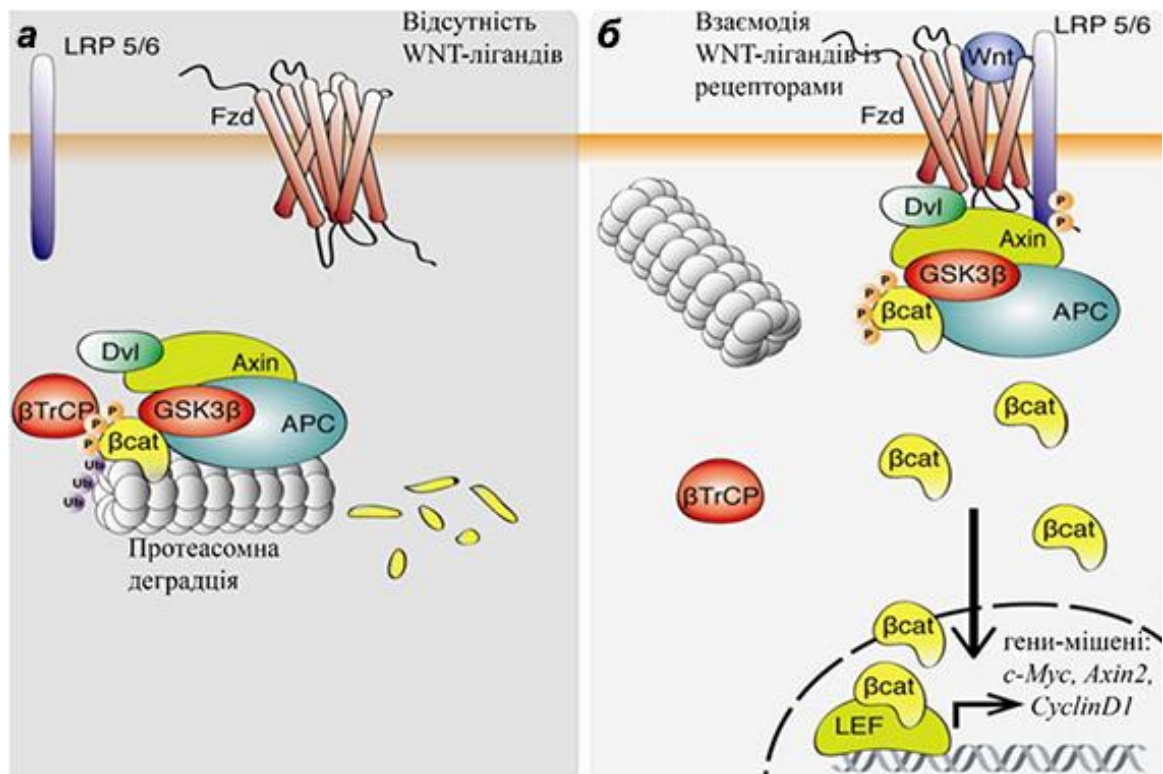


Рис 1.3. Схема канонічного WNT/ β -катенінового сигнального шляху за [24] зі змінами. **a** – WNT-сигнальний шлях неактивний: β -катенін зазнає постійного фосфорилювання GSK-3 β , убіквітилювання убіквітинлігазою β -Тгср та постійної протеасомної деградації. **б** – WNT-сигнальний шлях активний: зв'язування WNT-ліганду із рецепторами (Fzd та LRP5/6) призводить до їх фосфорилювання та рекрутування деградувального комплексу до мембрани, стабілізації β -катеніну та його транслокації в ядро де він разом із транскрипційними факторами LEF/TCF активує експресію генів-мішеней

З'ясувалось, що α -катенін регулює WNT/ β -катеніновий сигналінг також і на рівні ядерної локалізації β -катеніну. Так було показано, що надекспресія

α -катеніну в SW40 клітинах (походять із раку товстої кишки та характеризуються активацією WNT/ β -катенінового сигналіngu) призводить до секвестрування β -катеніну в цитоплазмі [147]. Окрім негативного впливу α -катеніну на ядерну локалізацію β -катеніну була встановлена й протилежна можливість. Так S. Neumann et. al. продемонстрували, що α -катенін взаємодіє із білком ядерної мембрани – неспріном-2 та емеріном й стимулює транслокацію β -катеніну в ядро [110]. Проте, це наразі єдина робота де продемонстровано підсилення транскрипційної активності β -катеніну α -катеніном. Більшість експериментальних робіт із використанням клітин різних встановлених ліній свідчать про супресорну функцію α -катеніну в регуляції ядерної локалізації β -катеніну.

Цікаво також, що ядерна локалізація α -катеніну залежить від β -катеніну із яким він й імпортується в ядро [49,104], а експортується білком CRM-1, який взаємодіє із сигналом ядерного експорту [47]. Так було показано, що при стимуляції HEK293T клітин LiCl спостерігається котранслокація α -катеніну та β -катеніну у ядро. При цьому відбувається пригнічення TOPFlash люцефазної репортерної системи та транскрипції гену *cyclin D1* [104]. Механізм дії α -катеніну на β -катенін/Tcf-залежну транскрипцію полягає в тому, що він призводить до порушення взаємодії комплексу β -катенін/Tcf із ДНК і у такий спосіб пригнічують транскрипційну активність β -катеніну [48]. В іншій роботі також було показано, що α -катенін не впливає на ядерний імпорт β -катенін, проте інгібує його транскрипційну активність [30]. У ядрі α -катенін рекрутує до комплексу β -катенін/TCF, який знаходиться на WRE (WNT response elements) генів-мішеней, APC (adenomas polyposis coli), який в свою чергу взаємодіє із комплексом гістон деметилази CtBP-RCOR1-LSD1, що призводить до інгібування транскрипції генів-мішеней [32]. При диференціації хондроцитів, стимульованої Indian Hedgehog, також відбувається інгібування транскрипційної активності β -катеніну у ядрі внаслідок утворення потрібного комплексу Gli3R- α -катенін- β -катенін, де, до речі, α -катенін поєднує Gli3R із β -катеніном [135].

Однак, α -катенін інгібує сигнальну активність β -катеніну й в цитоплазмі. Так відомо, що Src тирозинкіназа фосфорилує β -катенін у РС-3 клітинах, що призводить до транслокації β -катеніну в ядро. У цій же модельній системі було показано, що відновлення експресії α -катеніну значно інгібувало транслокацію Src-фосфорильованого β -катеніну в ядро, стабілізуючи взаємодію β -катеніну із E-кадерином [69]. Окрім того, Seung H. Choi et. al. продемонстрували, що α -катенін входить до деградувального комплексу β -катеніну, взаємодіючи із APC та рекрутує β -катенін до комплексу, і у такий спосіб стимулює фосфорилування та подальшу деградацію β -катеніну [32].

Таким чином α -катенін здатен регулювати WNT/ β -катеніновий сигнальний каскад на різних рівнях:

1. Стабілізує його взаємодію із кадеринами;
2. Секвеструє β -катенін в цитоплазмі;
3. Сприяє його фосфорилуванню в деградувальному комплексі;
4. Приймає участь у транслокації β -катеніну в ядро;
5. Утворює комплекси в ядрі із інгібіторами транскрипції.

1.4.2. α -Катенін у регуляції Hippo-сигнального каскаду. Hippo-сигнальний каскад – ключовий сигнальний каскад, який регулює розміри органів, за рахунок контролю проліферації клітин [121]. Також він забезпечує контактне інгібування проліферації клітин [100]. У ссавців компонентами сигнального шляху є Mst1/2 та Lats1/2 кінази, а також білки Sav1 та Mob1, які фосфорилують транскрипційний ко-активатор Yap [11]. Відомо, що при високій кількості міжклітинних контактів Mst1/2 утворює комплекс із білками Merlin, Willin та Kibra та фосфорилується. Mst1/2, в свою чергу, за допомогою білка Sav фосфорилує Lats1/2 кіназу, яка в свою чергу, фосфорилує транскрипційний ко-активатор Yap. Важливо, що

фосфорилування Yap створює сайт зв'язування із білком 14-3-3 та забезпечує його секвестрування в цитоплазмі (рис. 1.4 *a*) [43]. З іншого боку, низький рівень контактів запобігає утворенню комплексу кіназ, внаслідок цього не відбувається фосфорилування Yap. У свою чергу, не фосфорильований Yap транслокується в ядро, де він взаємодіє із транскрипційним фактором TEAD та активує експресію генів-мішеней (рис. 1.4 *b*) [43].

Із використанням нокаутних мишей було встановлено, що α -катенін залучається до регуляції активності HIPPO-сигнального каскаду. Так, було показано, що делеція α -E-катеніну у стовбурових клітинах волосяних фолікулів призводить до розвитку плоскоклітинної карциноми. В клітинах із делецією α -E-катеніну спостерігалось зростання ядерної локалізації Yap1, яке не залежить від його фосфорилування LATS кіназами [146]. Подальші дослідження встановили, що α -катенін регулює локалізацію Yap1 в кератиноцитах залежно від стану адгеринових з'єднань, так було показано, що при дисоціації адгеринових з'єднань зростає ядерна локалізація Yap1, а α -катенін, який вивільняється із адгеринових з'єднань та взаємодіє із скафолдним білком 14-3-3, та утворює комплекс із Yap1, секвеструючи його таким чином в цитоплазмі [140]. Окрім того α -катенін інгібує β -інтегрин залежене фосфорилування Yap Src-кіназою, що також призводить до пригнічення транскрипційної активності Yap [92].

Окрім того, α -катенін також забезпечує механочутливе регулювання HIPPO-сигналіну. Cordelia Rauskolb et. al. встановили, що під час розвитку крил *Drosophila* механічне навантаження призводить до конформаційних змін молекули α -катеніну, завдяки чому з нею взаємодіє білок Jub, який рекрутує кіназу Wrts (гомологічний LATS1 кіназі у ссавці), що врешті респондує та призводить до інгібування Yki (ортолог Yap у ссавців) та відповідно, пригнічення його транскрипційної активності [134].

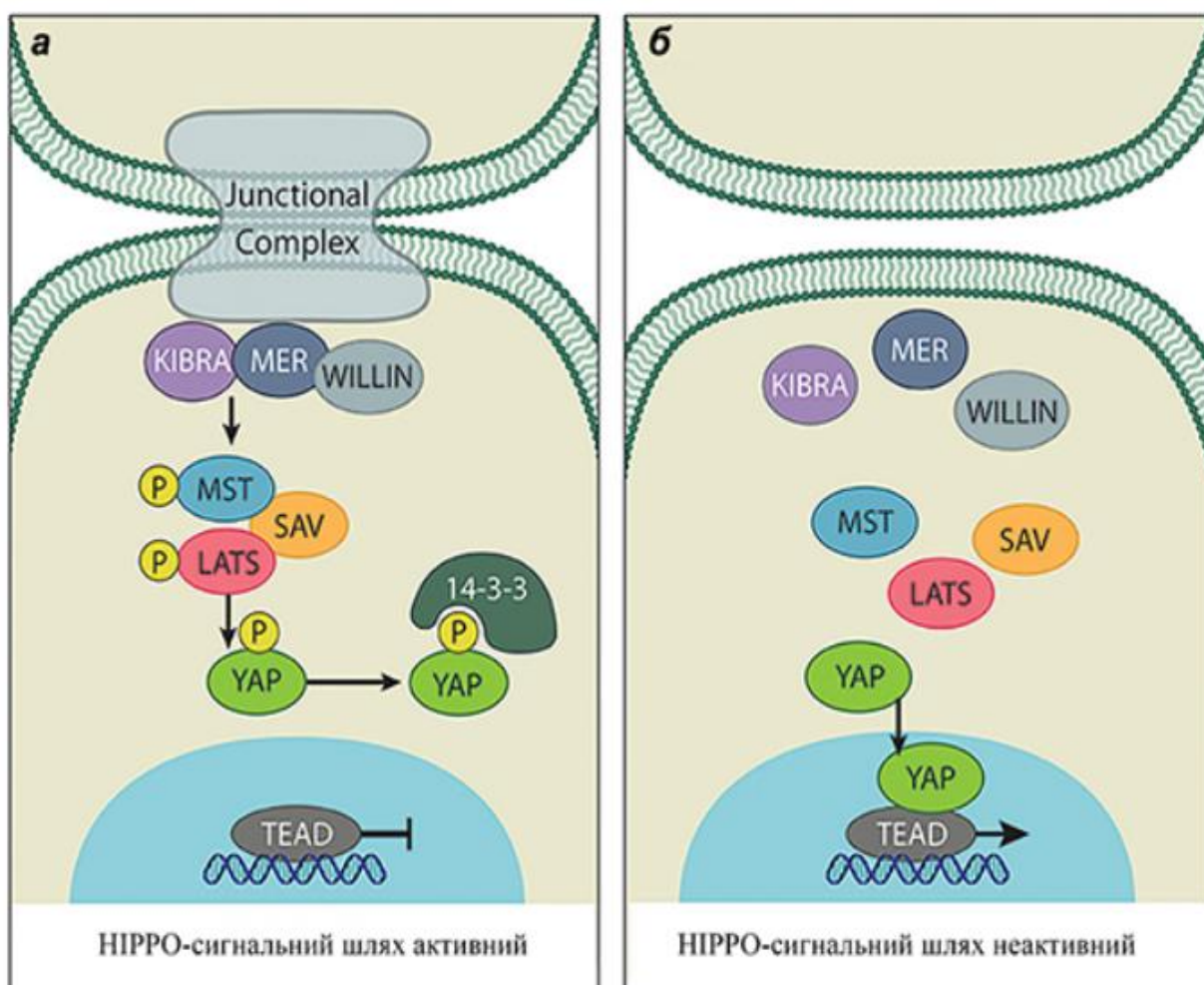


Рис. 1.4. Схема HIPPO-сигнального шляху за [103] зі змінами. **a** – HIPPO-сигнальний шлях неактивний: при умові низького рівня міжклітинних контактів Yap секвеструється у цитоплазмі та не активує експресію генів-мішеней, **б** – При низькій кількості міжклітинних контактів каскад фосфорилювання інгібується, Yap нефосфорилюється та траслюкується у ядро де активує експресію генів-мішеней

Таким чином α -катенін забезпечує взаємозв'язок і необхідний баланс між міжклітинною адгезією та проліферацією клітин, регулюючи HIPPO-сигнальний каскад.

1.4.3. α -Е-катенін у регуляції інших сигнальних каскадів. Окрім здатності регулювати канонічний Wnt- та HIPPO-сигнальні каскади, α -Е-

катеніну приймає участь і у модуляції інших важливих сигнальних систем клітини. Поодинокі експериментальні роботи свідчать про залучення α -Е-катеніну до регулювання активності NF- κ B-, Hedgehog- та Rho-сигнальних шляхів.

Так було з'ясовано, що у клітинах раку молочної залози α -катенін взаємодіє та стабілізує I κ B α , і таким чином пригнічує ядерну локалізацію NF- κ B та репресує експресію генів-мішеней сигнального каскаду [124].

Делеція α -Е-катеніну у нейрональних прогеніторних клітинах (α E-catenin^{fl/fl}/Nestin-Cre) призводить до гіперплазії клітин головного мозку та активації експресії генів-мішеней Hedgehog-сигнального каскаду: Fgf15 та Gli1. Таким чином, α -катенін є ендogenousним інгібітором Hedgehog-сигналіну, але механізм за яким він діє наразі не відомий і потребує подальшого з'ясування [61].

Окрім того, α -катенін, який входить до складу адгеринових з'єднань взаємодіє із MgcRacGAP, субодиницею комплексу централспіндіну, що в свою чергу призводить до рекрутування ECT2 GEF Rho-ГТФази. Таким чином α -катенін забезпечує активацію примембраної Rho та стан актинового цитоскелету, який взаємодіє із кадериновим комплексом [92]. У *Drosophila* Rho безпосередньо взаємодіє із p120ctn та α -катеніном, що забезпечує локалізацію Rho поблизу адгеринових з'єднань [66]. Таким чином α -катенін, який входить до складу адгеринових з'єднань забезпечує регуляцію специфічного пулу Rho ГТФази, що в свою чергу впливає на стан кадеринокатенінового комплексу.

Тож підсумовуючи цю частин огляду, можемо зазначити що α -Е-катенін – не лише принципово важливий компонент та регулятор міжклітинної адгезії, стабілізатор цитоскелету та модулятор внутрішньоклітинного руху. Цей білок має важливу регуляторну (переважно супресорну) функцію для низки принципово важливих сигнальних каскадів

клітини. Однак, на відміну від структурної функції, сигнальна роль цього білка є менш дослідженою і вимагає детального аналізу.

1.5. Функція α -катенінів у серці

У серці, на відміну від інших органів, міжклітинна адгезія забезпечується особливим типом структур – інтеркалярними дисками [89]. До складу інтеркалярних дисків входить чотири типи контактів: адгеринові з'єднання, десмосоми, гібридні з'єднання та щілинні контакти [158], які забезпечують спряження електричної активності кардіоміоцитів та їхнє скорочення [27].

Ключову роль в утворенні та функціонування інтеркалярних дисків відіграють адгеринові з'єднання [159] структуру, яких було розглянуто раніше (Розділ 1.2). Тому тут ми зосередимося на особливостях адгеринових з'єднань у міокарді. Як відомо, кардіоміоцити експресують лише один тип кадєринів, а саме N-кадєрини [85], які й забезпечують поєднання суміжних кардіоміоцитів. Цитоплазматичні домени N-кадєринів взаємодіють із β/γ -катеніном та через α -катенін поєднуються із актиновим цитоскелетом [158].

На відміну від інших клітин кардіоміоцити експресують два α -катеніни: α -Т- та α -Е-катеніни [72]. Обидва α -катеніни є високогомологічними, але їхні функції не є надлишковими. Зокрема було показано, що α -Т-катенін конститутивно взаємодіє із актином у мономерній формі, на відміну від α -Е-катеніну, який утворює комплекс із актином у гомодимерній формі [163]. У результаті, гетеродимер α -Т-катенін/ β -катенін

взаємодіє із актиновим цитоскелетом із значно більшою афінністю ніж гетерокомплекс α -Е-катенін/ β -катенін [163]. Таким чином α -Т-катенін забезпечує міцність адгеринових з'єднань у міокарді поєднуючи N-кадерин/ β -катеніновий комплекс із актиновим цитоскелетом. Та як було показано, α -Е-катенін у складі адгеринових з'єднань є механосенсором [171], що забезпечує приєднання вінкуліну та додаткового актинового цитоскелету до адгеринових з'єднань та передачу на нього навантаження [169]. Таким чином α -Е-катенін, на відміну від свого гомолога, забезпечує стабільність та міцність міжклітинної адгезії при зростанні навантаження.

Значення α -катенінів у функціонуванні серця досліджувалась із використанням мишей із кардіоспецифічним нокаутом відповідних генів. Так було встановлено, що делеція α -Т-катеніну в серці призводить до розвитку дилатаційної кардіоміопатії [90]. Автори при цьому спостерігали порушення структури гібридних з'єднань, але організація адгеринових з'єднань та десмосом залишалась незмінною [90]. Також було виявлено зниження експресії конексину 43, що призводило до розвитку аритмії при ішемії-реперфузії дорослого серця [90]. Цікаво також, що α -Т-катенін в кардіоміоцитах легеневих вен регулює запалення та залучається до розвитку atopічної астми [42].

У нашому відділі раніше було показано, що ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну не призводить до порушень кардіогенезу та летальності новонароджених мишей [125]. Sheikh та ін. встановили, що кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводила до розвитку дилатаційної кардіоміопатії у мишей віком 8 місяців. Вони спостерігали помірне зниження експресії N-кадерину, а також вінкуліну, що свідчить про порушення структури адгеринових з'єднань [144]. Миші із нокаутом α -Е-катеніну гинули лише після експериментального інфаркту [144], що також було підтверджено групою інших вчених, які спостерігали

зростання летальності мишей після інфаркту із мутантним α -Е-катеніном (делеція С-кінцевого домену) [19].

Подвійний кардіоспецифічний нокаут α -Т- та α -Е-катеніну призводив до зростання проліферації кардіоміоцитів внаслідок активації Υ ар [88]. Цікаво, що автори не спостерігали порушення структури адгеринових з'єднань (експресія N-кадерину та β -катеніну не змінювалась) [88]. Також у таких мишей покращувалась функція серця після інфаркту за рахунок підвищеної активності Υ ар залежної транскрипції [88]. Тож автори висувають припущення що, α -катенін є потенційною терапевтичною мішенню при терапії інфаркту міокарду саме через його сигнальну функцію.

Значення α -катеніну при розвитку серцевих патологій вивчалось і у пацієнтів з дилатаційної кардіоміопатією. В результаті таких досліджень було показано, що у людей мутації у гені *CTNNA3* (кодує α -Т-катенін) асоційовані із розвитком дилатаційної кардіоміопатії [73] та аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка [57], а також із дефектами міжпередсердної перегородки [149] та диссекцією щитоподібної артерії [51]. У гені *CTNNA1* (кодує α -Е-катенін) на даний час не виявлено мутацій, які б спричиняли розвиток серцево-судинних захворювань. Але встановлено значне зниження експресії α -Е-катенін у зоні розриву міокарда після інфаркта [19], і причини, які призводять до такого зниження не відомі. Також відомо, що у нормі, старіння міокарду супроводжується зростанням експресії α -Е-катеніну [79], тож такі зміни рівня експресії цього білка у зоні інфаркту викликають додаткові питання стосовно його функції у реконструкції дорослого серця.

Таким чином огляд експериментальних робіт свідчить про те, що α -Е-катенін має подвійну функцію: структурну та сигнальну. Структурна функція цього білку є винятково важливою для забезпечення стабільності та міцності міжклітинної адгезії при зростанні навантаження, для стабілізації цитоскелету та контролю внутрішньоклітинного транспорту в клітинах включаючи і кардіоміоцити. Сигнальна функція α -Е-катеніну, у свою чергу,

не обмежується контролем якогось одного сигнального каскаду, це переважно супресорний контроль активності цілої низки сигнальних систем які є принципово важливими для розвитку і функціонування серця. Перш за все це канонічний WNT-, Hippo- та MAPK-сигналінги, що регулюють як проліферацію і ріст кардіоміоцитів, так і метаболізм серця в нормі та при патології. Проте, саме сигнальна функція α -Е-катеніну у клітинах і в тому числі у міокарді є найменш дослідженою.

Тож метою цієї дисертаційної роботи є вивчення та аналіз сигнальної функції α -Е-катеніну у дорослому серці за умови його гетеро- та гомозиготної кардіоспецифічної делеції.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Опис біологічних, хімічних агентів та обладнання що використовувались у роботі

2.1.1. Біологічні матеріали. В роботі використовували, маркери для визначення молекулярної ваги ДНК та білка для електрофорезу, ембріональну сироватку ВРХ, бичачий сироватковий альбумін, желатин, первинні антитіла проти: α -катеніну (1:1000, Sigma, с-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. Хімічні агенти. Мінімальне середовище Ігла в модифікації Дельбрюкко (DMEM), 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, МТТ-реагент, акридиновий аранжевий (Sigma-Aldrich, США), 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 броміду, β -меркаптоетанол, акриламід, PVDF-мембрана, люмінол, кумарикова кислота, (Merck, Німеччина), H₂O₂ пеніцилін, стрептоміцин, HCl, NaOH, рідкий азот (вітчизняного виробництва).

2.1.3. Праймери. Для генотипування мишей [157] та визначення рівня експресії гіпертрофічних генів, генів-мішеней WNT/ β -катенінового та NIPPO-сигнальних шляхів [91,148,113] використовували праймери наведені в табл. 2.1. та 2.2 відповідно.

Таблиця 2.1.

Праймери, що використовувалися для генотипування

Назва гена	Праймери	Послідовність	Розмір фрагменту, пн
<i>α-E-catenin</i>	Прямий	5'-CATTTCTGTACCCCCAAAGACAC-3'	350 (Флох-алель) та 100 (WT-алель)
	Зворотній	5'-GCAAAATGATCCAGCGTCCTGGG-3'	
<i>(α-MHC)-Cre-рекомбіназа</i>	Прямий	5'-CAGAACCTGAAGATGTTCGC-3'	430
	Зворотній	5'-TACACCTCGGTGCTA ACCAG-3'	

Таблиця 2.2.

Праймери, що використовувалися дослідження рівнів експресії генів

Назва гена	Праймери	Послідовність	Розмір фрагменту, пн
<i>Npra</i>	Прямий	5'-CATCACCCCTGGGCTTCTTCCT-3'	405
	Зворотній	5'-TGGGCTCCAATCCTGTCAATC-3'	
<i>Nprb</i>	Прямий	5'-GCGGCATGGATCTCCTGAAGG-3'	418
	Зворотній	5'-CCCAGGCAGAGTCAGAAACTG-3'	
<i>Muh7</i>	Прямий	5'-ATGTGCCGGACCTTGGAA-3'	170
	Зворотній	5'-CCTCGGGTTAGCTGAGAGATCA-3'	

<i>Myh6</i>	Прямий	5'-GGCACAGAAACACCTGAAGA-3'	80
	Зворотній	5'-CATTGGCATGGACAGCATCATC-3'	
<i>c-Fos</i>	Прямий	5'-CCGACTCCTTCTCCAGCAT-3'	93
	Зворотній	5'-TCACCGTGGGGATAAAGTTG-3'	
<i>Ccnd1</i>	Прямий	5'-CCACAGATGTGAAGTTCATTTCCA-3'	161
	Зворотній	5'-GCAGTCCGGGTCACACTTG-3'	
<i>c-Myc</i>	Прямий	5'-GCCCCTAGTGCTGCATGAG-3'	95
	Зворотній	5'-CCACAGACACCACATCAATTTCTT-3'	
<i>Ctgf</i>	Прямий	5'-CAAGGACCGCACAGCAGTT-3'	124
	Зворотній	5'-AGAACAGGCGCTCCACTCTG-3'	
<i>Il1rl1</i>	Прямий	5'-TGGGCTTTGGCAATTCTGACAC-3'	122
	Зворотній	5'-ТААGTCGAGCGTCCTCTTTGGG-3'	
<i>Tnfrsf1b</i>	Прямий	5'-CGCCTGCACTAAACAGCAGAAC-3'	105
	Зворотній	5'-TTGCTCAGCCTCATGCACTGTC-3'	
<i>Aurka</i>	Прямий	5'-GGGTGGTTCGGTGCATGCTCCA-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.

2.1.4. Обладнання. Джерело струму MP300-N (MS, США), центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), мікроскоп PrimoStar (Carl Zeiss Microscopy, Німеччина), флуоресцентний мікроскоп Leica DM 1000 (Leica Microsystems, Німеччина), 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), 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 тваринної моделі та схеми схрещування

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 (рис. 2.1) [157].

α -МНС промотор і контрольований ним ген Cre-рекомбінази починає експресуватися у ембріональному серці після закладки першого та другого серцевих полів виключно у кардіоміоцитах [5,98]. Використання такої системи делеції досліджуваного гена дає змогу вивчати його функцію виключно у кардіоміоцитах, починаючи із 10,5 доби ембріонального розвитку.

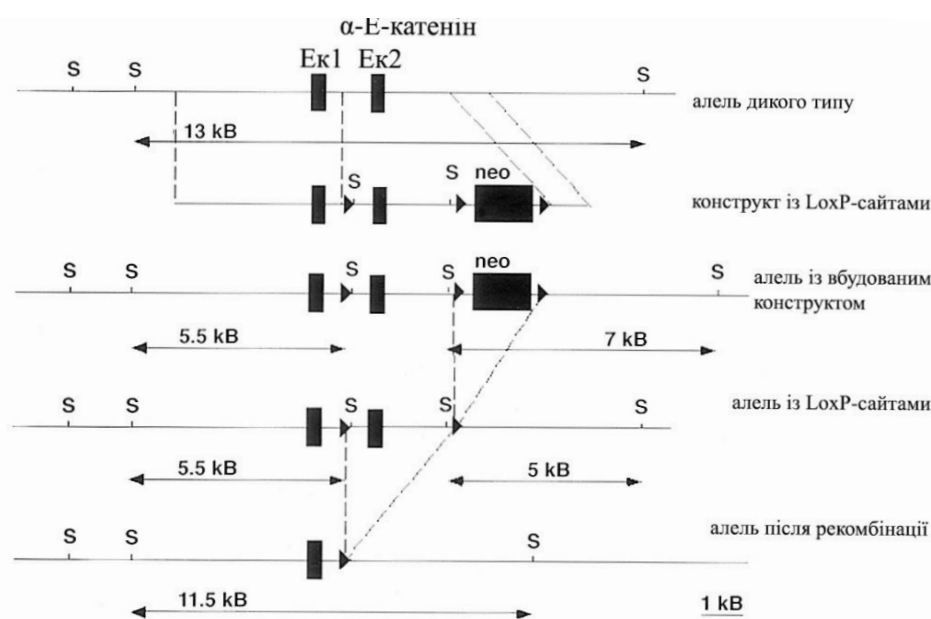


Рис. 2.1. Схема створення умовного нокаута гена α -Е-катеніна [157]. ►
– LoxP сайти, ■ – екзон, ■ – касета із геном селективності

Гомозиготних мишей за умовним нокаутом гена α -Е-катеніну (Flox/Flox; α МНС-Cre⁻) схрещували із мишами, які експресують Cre-рекомбіназу під контролем промотора гена важкого ланцюга міозина α (WT/WT; α МНС-Cre⁺). Потомство F1 зворотньо схрещували із Flox/Flox; α МНС-Cre⁻ мишами (рис. 2.2).

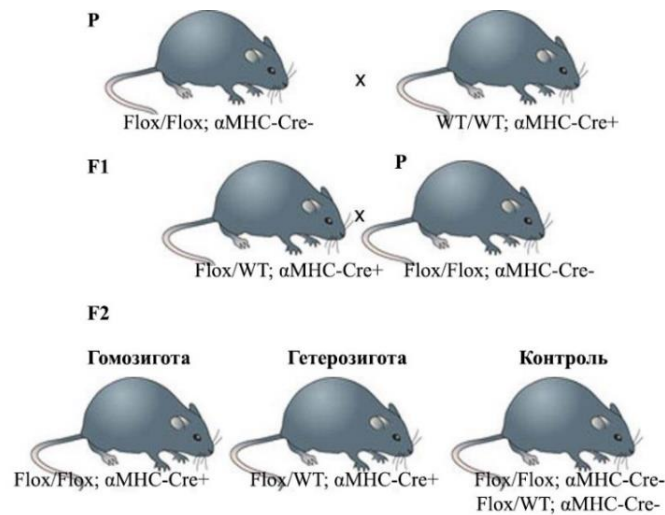


Рис. 2.2. Схема схрещування мишей для отримання тварин із гомозиготною та гетерозиготною делецією α -*E*-катеніну. Flox/Flox; α MHC-Cre⁻ – миші у яких 2-ий екзон α -*E*-катеніну франкований LoxP-сайтами та не мають в геномі Cre-рекомбінази; Flox/WT; α MHC-Cre⁻ – миші гетерозиготні за умовним нокаутом гена α -*E*-катеніну та у яких в геномі не має Cre-рекомбінази; WT/WT; α MHC-Cre⁺ – миші яких в геномі є Cre-рекомбіназа; Flox/Flox; α MHC-Cre⁺ - миші із делецією двох алелів гена α -*E*-катеніну (гомозиготи); Flox/WT; α MHC-Cre⁺ - миші із гетерозиготною делецією гена α -*E*-катеніну (гетерозиготи)

Потомство F2 використовували в подальших дослідженнях: Flox/WT; α MHC-Cre⁺ – миші із гетерозиготною делецією α -*E*-катеніну (гетерозиготи), Flox/Flox; α MHC-Cre⁺ – миші із гомозиготною делецією α -*E*-катеніну (гомозиготи), Flox/WT; α MHC-Cre⁻ та Flox/Flox; α MHC-Cre⁻ – слугували як якості контрольної групи тварин.

Наявність білка α -*E*-катеніну у серцях мишей різних генотипів перевіряли за допомогою Вестерн-блоту, результати якого наведено у додатку Б (додаток Б, Рис. Б1), де видно зниження кількості α -*E*-катеніну у лізатах сердець мишей із гетерозиготною делецією α -*E*-катеніну та повна

відсутність білка – у гомозиготних за нокаутом гену α -Е-катеніну серцях тварин.

Тварини утримувались у віварії ІМБГ НАН України за стандартних умов: температура у віварії становила 22-24°C, тривалість дня контролювалась штучно та становила 10 годин. Тварини віком 10 місяців забивались методом цервікальної дислокації, а новонароджені мишенята методом – декапітації.

2.2.1. Генотипування. Виділення ДНК для генотипування проводили згідно стандартного протоколу [99]. Зразки тканини дослідних тварин (кінчики хвостів) дезінтегрували в 0,5 мл лізуючому буфері із розчином протеїнази К (10 мкг/мл) при температурі 55°C і постійному помішуванні протягом 8-12 год. Отриманий лізат центрифугували 10000 об/хв., 10 хв., при кімнатній температурі, після чого відбирали супернатант та додавали 0,5 мл ізопропанолу. Осаджену ДНК переносили в 200 мкл ТЕ-буферу (10мМ Tris-HCl (рН 7,5); 1мМ EDTA) і витримували при 55°C при постійному помішуванні до повного розчинення.

Реакційну суміш готували згідно рекомендацій виробника з додаванням 0,3 рМ кожного праймеру і 10 нг ДНК. Праймери для генотипування наведені в табл. 2.1. в розд. 2.1.3.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за наступних умов: 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.

Аналіз результатів ПЛР проводили методом горизонтального електрофорезу в 1,6% агарозному гелі в присутності бромистого етидію в буфері ТАЕ (40мМ Tris, 20мМ оцтова кислота, 1мМ EDTA) при 70 mA протягом 40 хв (додаток В, Рис. В1).

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

2.3. Дослідження виживаності мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну

Миші утримувались в клітках за стандартних умов, кількість тварин кожного генотипу реєструвалась щотижнево. Для оцінки різниці у виживаності використовувався метод Каплан-Мейр [17].

2.4. Дослідження кардіогемодинамічних параметрів

Для анестезії мишей використовували уретан (150мг/г), який вводили інтраперитоніально після чого проводили диссекцію правої каротидної артерії. Ультратонкий катетор 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 [77]. 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. Ефективну артеріальну жорсткість визначали за Sunagawa [77], 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.

2.5. Морфометричний аналіз дослідних тварин

Для оцінки маси серця у тварин контрольної та дослідних груп проводили аналіз індексів співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ, мг/г) та індексу маси серця до довжини гомілки (мг/мм). Ці індекси відображають розвиток/ріст міокарда у тому числі і гіпертрофічний ріст серця. Для виділення гомілкової кістки гомілку поміщали на 4 год. у 1М розчин NaOH при постійному переміщуванні для гідролізу м'яких тканин.

2.6. Гістологічний аналіз тканини міокарда

Для аналізу змін структури міокарда на морфологічному рівні ізольовані серця дослідних та контрольних тварин промивали у розчині холодного PBS та фіксували у розчині 4% параформальдегіду (ПФА). Після фіксації проводили дегідратацію дослідного матеріалу проводячи зразки через серію спиртів:

- 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 1 год.)
- ксилол (2 по 1 год.)
- ксилол:парафін (1:1) (2 по 1 год. при 55°C),

після чого витримували тканину в парафіні (2 по 1 год., та 12 год. при 55°C) та готували парафінові блоки згідно стандартної процедури. Отримані зразки, залиті в парафін, нарізали на мікротомі товщиною 9-10 мкм.

Зрізи депарафінізували за наступною схемою:

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

Після промивки зрізів водою проводили забарвлення гематоксилін-еозином або за методом ван Гізона [131]. Гематоксилін-еозинове забарвлення 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.

Для виявлення фіброзу тканини міокарда здійснювали забарвлення пікрофуксином за ван Гізоном [131]:

- 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.

Депарафінізовані зрізи заключали у середовища для покриття та покривали покривними скельцями. Кількісний аналіз фіброзу проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ [141].

Для виявлення триацилгіцеридів ізольовані серця поміщали в середовищення ОСТ і заморожували в рідкому азоті. Кріозрізи товщиною 10 мікрон фіксували в 4% розчині формальдегіду протягом 10 хв. Після чого здійснювали забарвлення за наступною схемою [96]:

- 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 за допомогою світлового мікроскопа та обробляли за допомогою програми AxioVision на збільшенні 100^x, 400^x, 1000^x.

2.7. Виділення РНК, синтез кДНК та ПЛР в реальному часі

Виділення тотальної РНК проводили із апікальної частини серця розтертої в рідкому азоті за допомогою фенол-хлороформеного методу згідно рекомендацій виробника. Зразки тканини серця гомогенізували розтиранням після замороження у рідкому азоті, потім додавали реагент і піпетували до повного розчинення, після чого їх витримували ще 5 хв. при кімнатній температурі. У випадку виділення РНК з культивованих клітин реагент для лізису додавали безпосередньо у лунки. На 1 мл реагенту Inusolve додавали 200 мкл хлороформу, вортексували 20 с. з подальшим інкубацією при 4°C протягом 15 хв. Після осаджування на центрифугі при 12000 g, 4°C, протягом 15 хв. верхню фазу відбирали і додавали рівний об'єм ізопропанолу. Знову осаджували центрифугуванням при 12 000 g, 4°C, протягом 10 хв. Отриманий осад промивали холодним 75% етанолом, висушували в термостаті при 37°C протягом 5-7 хв. і розчиняли в 20 мкл 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°C і використовували для синтезу кДНК.

Синтез кДНК проводили за допомогою комерційного набору реагентів Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit і праймерів олігодТ, які дають змогу отримати комплементарну ДНК до тотальної мРНК. Всі маніпуляції проводили згідно рекомендацій виробника. Отриману кДНК

розводили до концентрації 10 нг/мкл і використовували як матрицю для стандартної ПЛР в реальному часі.

В роботі використовували стандартний метод ПЛР в реальному часі за наступних умов: 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. Праймери, які використовували для ПЛР в реальному часі наведені в табл. 2.2. у розд. 2.1.3. Контролем слугував рівень експресії гена домашнього господарства гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (*Gapdh*). Обчислення результатів кількісної РТ-ПЛР проводили за стандартним методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ та з використанням програмного забезпечення CFX96.

2.8. Виділення тотального білка, електрофорез у ПААГ в денатуруючих умовах та Вестерн-блот

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 додавання 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). Після чого центрифугували при 10500g протягом 20 хв. Концентрацію білка визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop при 280 нм.

Білки (50 мкг на доріжку) розділяли в 10% поліакриламідному гелі та переносили на PVDF мембрану напівсухим методом. Мембрану блокували 2 год у 5% розчині БСА при кімнатній температурі. Мембрану інкубували з первинними та відповідними вторинними антитілами зазначеними в розд.

2.1.1. Візуалізацію сигналу здійснювали за допомогою хемілюмінесцентного субстрату. Рівень фосфорильованих форм визначили як співвідношення інтенсивності сигналу для фосфорильованої форми до інтенсивності сигналу для відповідного тотального білка. Рівень тотальних білків визначали як співвідношення інтенсивність сигналу для білка до інтенсивності сигналу для Gapdh. Рівень білка у контрольних тварин приймали за 1 умовну одиницю (у. о.).

2.9. Виділення первинної культури неонатальних кардіоміоцитів

Первинну культуру неонатальних кардіоміоцитів отримували методом холодної трипсинізації з серця новонароджених мишей (P1). Для цього ізольовані серця дослідних тварин промивали 3 рази в середовищі DMEM з 10-кратними розчинами антибіотиків (пеніцилін (1000 МО/мл) та стрептоміцин (1000 мкг/мл)), та інкубували з вказаним розчином 20 хв. при +4°C. Після обробки зразків антибіотиками проводили ферментативну обробку тканини в 0,025% розчині трипсину та 0,01% ЕДТА в PBS протягом ночі при +4°C. Трипсинізовані зразки тканини дезінтегрували піпетуванням у середовищі DMEM з 10 % ФБС і розсівали на пластикові 12-лункових планшети. Для позбавлення від фібробластів та ендотеліоцитів суспензію кардіоміоцитів через 2 год переносили на нові лунки. Отримані неонатальні кардіоміоцити культивували протягом 3-5 діб при температурі 37 °C та при 5% CO₂ у газовій суміші.

2.10. Морфологічний аналіз кардіоміоцитів *in vitro*

Кардіоміоцити висівались на покривні скельця та культивувались протягом 2 діб. Через 2 доби, клітини фіксували в фіксаторі (80% спирт/4% параформальдегіду/5% оцтова кислота) протягом 30 хв за кімнатної температури. Фіксовані клітини забарвлювали гематоксиліном-еозином за наступною схемою:

- проточна вода – 5 хв.
- гематоксилін – 2 хв
- проточна вода – 3 по 1 хв.
- 50% ізопропаноло/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.

Після цього препарати заключали у середовище для покриття. Морфологічний аналіз проводили за допомогою світлового мікроскопу при збільшенні 1000^x. При проведенні аналізу визначали довжину та ширину кардіоміоцитів. У кожному варіанті аналізували більше, ніж 100 клітин із трьох сердець кожного генотипу.

Для визначення частоти двоядерних кардіоміоцитів культивовані кардіоміоцити культивувались, як описано вище. Середовище відбиралось, клітини двічі промивались PBS, після цього фарбувались розчином 20 мкг/мл акридинового оранжевого в PBS та витримувались 10 хв., після цього тричі промивались PBS та фіксувались протягом 10 хв в 4% параформальдегіду та

аналізувались на флуоресцентному мікроскопі. Досліджували кількість двоядерних та одноядерних кардіоміоцитів, У кожному варіанті аналізували більше, не менше 50 клітин із трьох сердець кожного генотипу.

2.11. Дослідження рівня проліферації неонатальних кардіоміоцитів

Для МТТ тесту ізольовані кардіоміоцити висівали по 10 тис/лунку 96 лункового планшету. Через 2 добу в кожному 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 та вимірювали оптичну густину при 570 нм.

2.12. 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.

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. Який тест використаний у кожному випадку зазначено у підписі до рисунку. Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми GraphPad Prism7.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до розвитку серцевої недостатності, гістопатологічних змін міокарда та передчасної загибелі мишей

3.1.1. Гетерозиготна та гомозиготна делеція α -Е-катеніну у серці спричиняє передчасну загибель мутантних тварин. Як було зазначено у Розділі 1 і гетеро-, і гомозиготна делеція гену α -Е-катеніну у ембріональному серці не спричиняла летальності ембріонів та новонароджених мишей, і не супроводжувалась порушеннями морфологічної будови серця і ембріону. Тож виникло питання як часткова і повна втрата досліджуваного нами гену позначиться на функціонуванні дорослого міокарду та загалом на життєздатності тварин.

Для дослідження функції α -Е-катеніну у міокарді ми використовували мишей, як із гетерозиготною так, гомозиготною делецією гена, тварин генерували як описано у Матеріалах та методах (Розділ 2.2). Перш за все ми зосередились на аналізі виживаності мутантних тварин. У результаті проведених досліджень нами було встановлено, що у обох дослідних групах тварин статистично достовірно скорочувалась тривалість життя порівняно із контрольними мишами. Так, гетерозиготи за нокаутом гену α -Е-катеніну

починали вмирати на 28 тижні життя, а гомозиготи – на 19 тижні (рис. 3.1). Загалом, середня тривалість життя у гетерозигот складала 38 тижнів, а у гомозигот – 36 тижнів. Протягом 48 тижнів загинули 12 із 12 гетерозиготних тварин, та 10 із 10 гомозиготних тварин. Варто зауважити, що серед групи контрольних мишей 2 із 15 тварин загинули протягом 48 тижнів спостережень (рис. 3.1). Однак така летальність серед контрольних тварин є в межах норми [172]. Спостереження за контрольними тваринами припинили на 52 тижні їхнього життя.

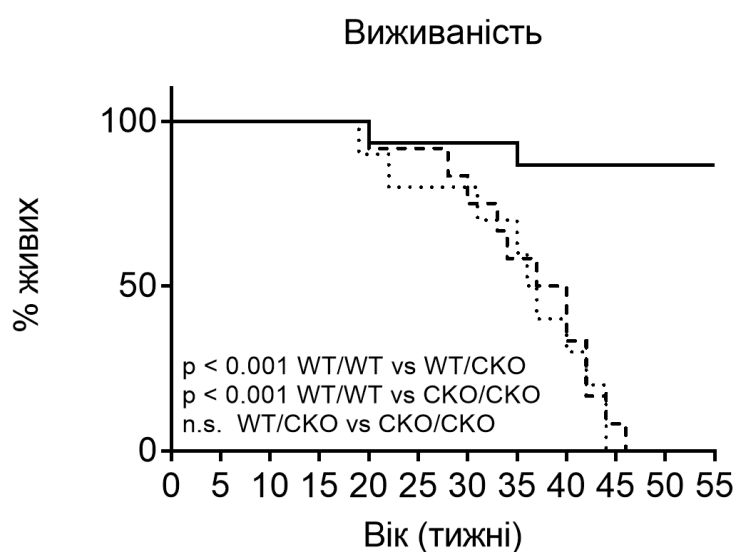


Рис. 3.1. Криві виживаності Каплан-Мейер для гетерозиготних, гомозиготних за нокаутом гену α -Е-катеніну тварин та контрольних мишей. — WT/WT, WT/CKO, ---- CKO/CKO. WT/WT – контрольні миші ($n = 15$), WT/CKO – гетерозиготи ($n = 12$), CKO/CKO – гомозиготи ($n = 10$). $p < 0.001$ за допомогою лог-рангового тесту

Тож, результати наших спостережень свідчать, що ембріональна кардіоспецифічна гетеро- та гомозиготна делеція гену α -Е-катеніну спричиняють скорочення тривалості життя мутантних тварин та їхню передчасну летальність. Зважаючи на ранню смертність мутантних тварин в усіх подальших дослідженнях використовували мишей віком 10 місяців.

3.1.2. Втрата α -Е-катеніну спричиняє розвиток гіпертрофії серця.

Морфологічний та морфометричний аналіз сердець тварин з гетеро- та гомозиготною делецією гену α -Е-катеніну віком 10 місяців виявив суттєві порушення. Серця тварин обох дослідних груп були видовжені, із збільшеними передсердями порівняно із серцями контрольних мишей (рис. 3.2. *а*). Дані візуального аналізу сердець узгоджуються із значеннями гіпертрофічних індексів (співвідношення МС/МТ та МС/ДГ). Ці показники статистично достовірно зростали у обох групах мутантних тварин порівняно із контрольними (рис. 3.2. *б* та рис. 3.2. *в*). Проте, значення співвідношень МС/МТ та МС/ДГ не відрізнялись між собою у мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.2. *б* та рис. 3.2 *в*).

Отже, дані морфометричного аналізу свідчать про зростання маси серця у тварин із частковою та повною втратою гену α -Е-катеніну віком 10 місяців. Таке зростання, ймовірно може бути наслідком розвитку серцевої патології і може супроводжуватись порушеннями рівнів експресії фетальних або гіпертрофічних генів. Тож, наступним кроком нашої роботи було проаналізувати рівень експресії гіпертрофічних (фетальних) генів, а саме *Nppa*, *Nppb* та *Myl7*, а також рівень експресії міозина дорослого серця – *Mylb* (рис 3.3). У результаті, ми виявили зростання експресії генів *Nppa* та *Myl7*, що кодують натрійуретичний пептид А та β -ланцюг важкого ланцюга міозину відповідно, і є маркерами розвитку патології серця, а саме гіпертрофії та серцевої недостатності [112] (рис 3.3).

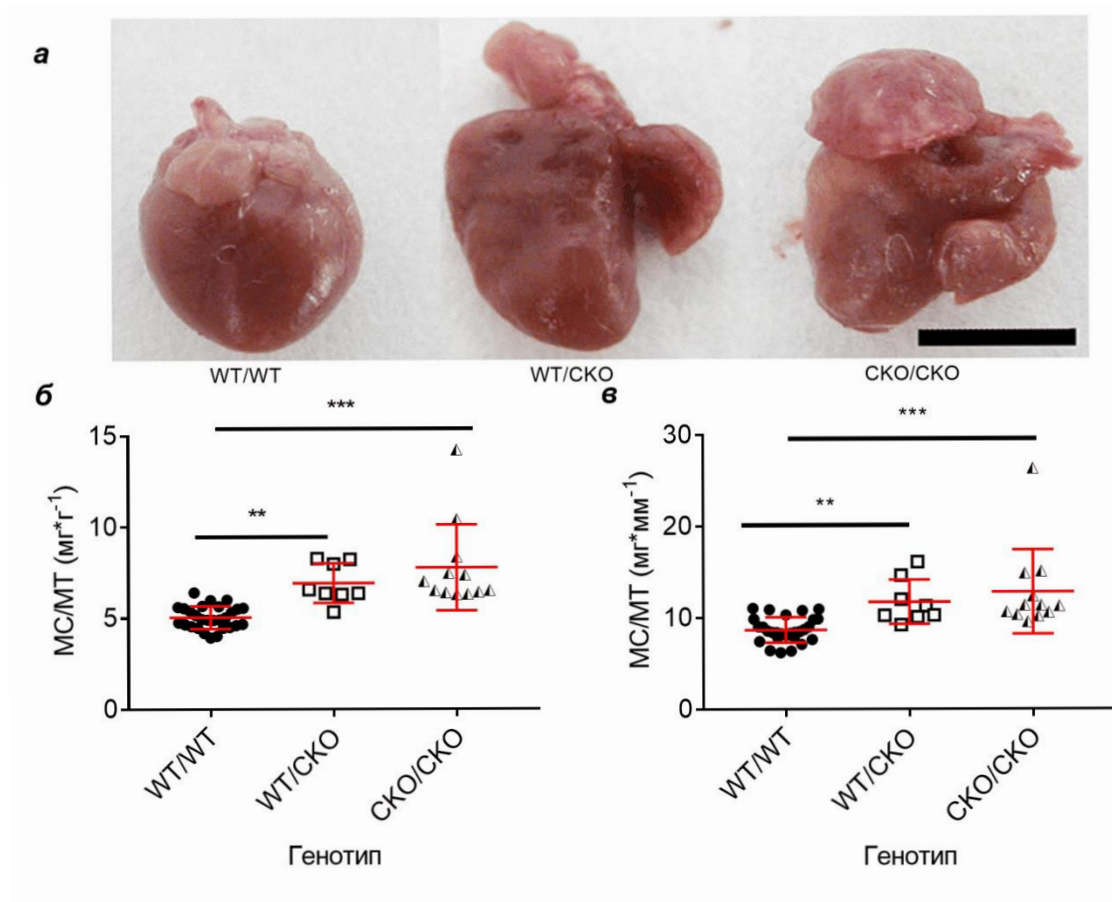


Рис. 3.2. Гетерозиготна та гомозиготна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до збільшення маси серця. **a** – фотографії сердець контрольних мишей, мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну та мишей із гомозиготною делецією α -Е-катеніну, розмір лінійки 5 мм. **б** – Співвідношення маси серця (МС, мг) до маси тіла (МТ, г). **в** – Співвідношення маси серця (МС, мг) до довжини голілки (ДГ, мм). WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. WT/WT $n = 26$, CKO/WT $n = 10$, CKO/CKO $n = 14$. ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,005$ за допомогою тесту Краскела-Уолліса із *post hoc* тестом Данна

Цікаво, що експресія гену *Nppb*, що кодує натрійуретичний пептид В не змінювалась у мутантних тварин порівняно із контрольними. Рівень експресії гену *Mylb*, що кодує α -ланцюг важкого ланцюга міозину, і є міозином дорослого серця, статистично достовірно знижувався в обох дослідних

групах тварин (рис 3.3). Зниження рівня експресії гену *Myh6* також є типовим при гіпертрофії та серцевій недостатності [109].

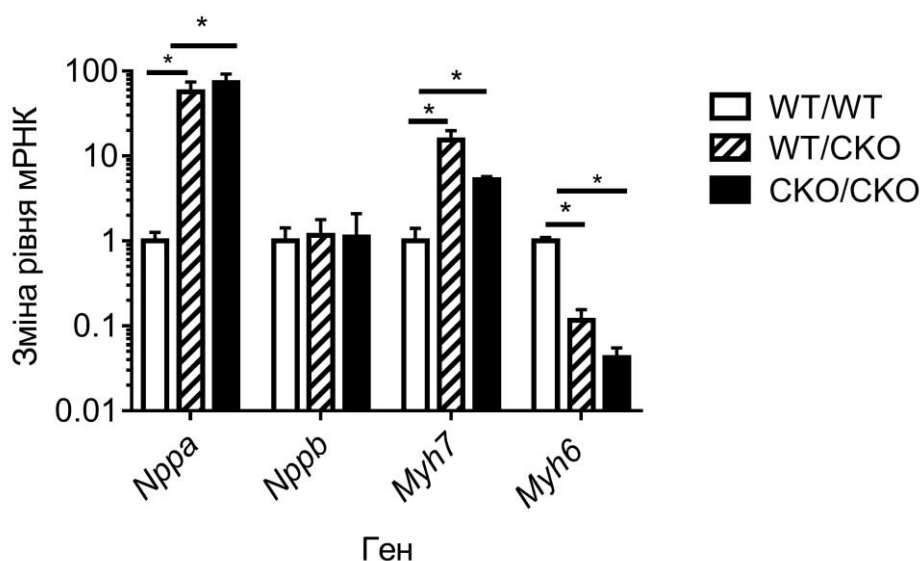


Рис. 3.3. Експресія гіпертрофічних (фетальних) генів у контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. Дані експресії представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * – $p < 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Отже, як повна так і часткова втрата гену α -Е-катеніну у ембріональному серці спричиняє збільшення маси серця, зростання гіпертрофічного індексу та супроводжується змінами експресії генів *Nrpa*, *Nppb* та *Myh6* у дорослих тварин віком 10 місяців. Такі зміни є типовими для розвитку гіпертрофії та серцевої недостатності.

3.1.3. Делеція α -Е-катеніну призводить до значних гістопатологічних змін міокарда. Втрата гену α -Е-катеніну спричиняє розвиток гіпертрофії дорослого серця. Однак, відомо, що гіпертрофія супроводжується і значними гістопатологічними перебудовами тканини міокарду. Тож, для подальшої і більш повної характеристики фенотипу мишей із гетерозиготною та гомозиготною кардіоспецифічною α -Е-катеніну ми провели детальний гістологічний аналіз сердець мутантних та контрольних тварин.

За допомогою гематоксилін/еозинового забарвлення парафінових зрізів зразків тканини серця ми виявили в обох мутантних групах тварин критичні гістопатологічні порушення. А саме, спостерігали: 1) “хвилясті” кардіоміоцити (рис. 3.4. *a, б, в*), та 2) кардіоміоцити із гіпереозинофільною цитоплазмою (рис. 3.4. *г, д, е*), що є свідченням ішемічного ушкодження серця [8,53], 3) кардіоміоцити із вакуолізованими ядрами (рис. 3.4. *ж, з, к*), що свідчить про загибель кардіоміоцитів [76], 4) дифузну інфільтрацію міокарда лімфоцитами (рис. 3.4. *л, м, н*), що свідчить про розвиток запальних процесів [115], а також 5) пошкодження коронарних судин, що призводить до ішемічного ушкодження серця (рис. 3.4. *п, р, с*) [53]. Варто зауважити, що наявність ушкоджених коронарних судин узгоджується і водночас пояснює наявність “хвилястих” кардіоміоцитів (рис. 3.4. *a, б, в*) та кардіоміоцитів із гіпереозинофільною цитоплазмою (рис. 3.4. *г, д, е*).

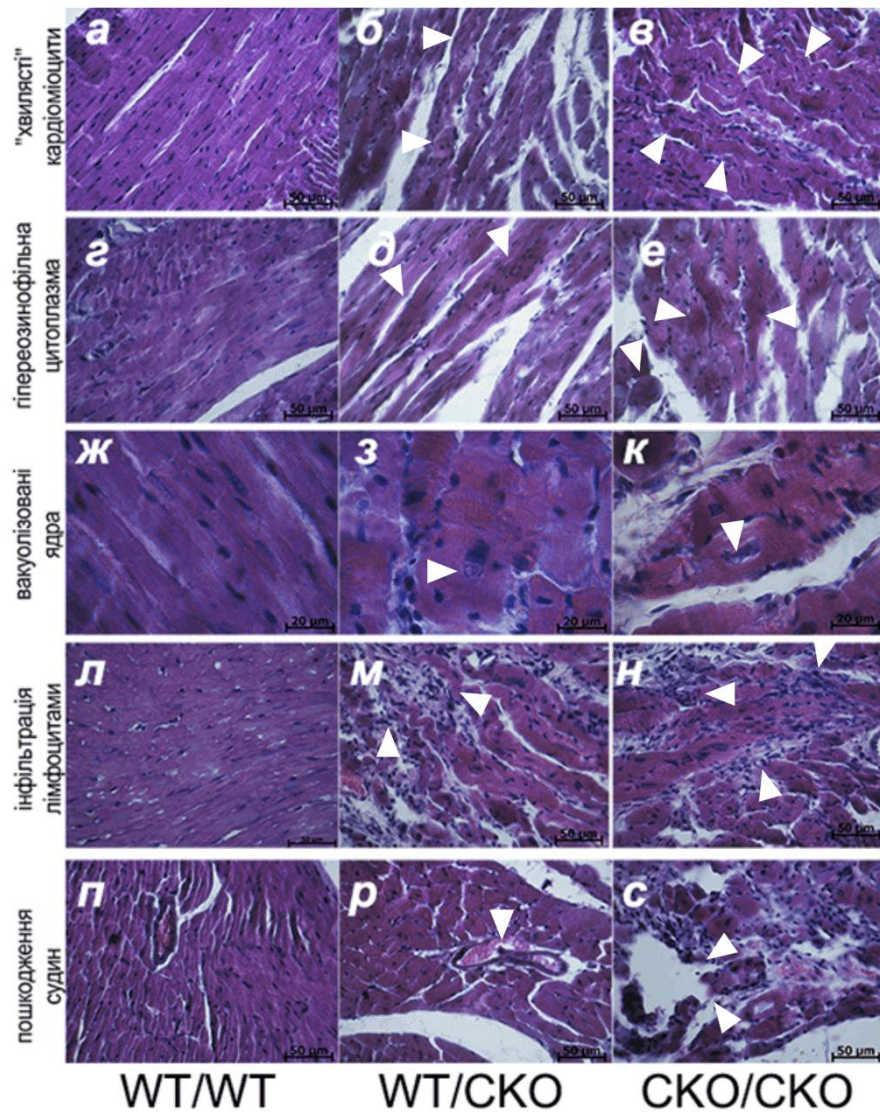


Рис. 3.4. Гематоксилін/еозинове забарвлення парафінових зрізів серця контрольних мишей, та тварин із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. На зображенні наведені типові гістопатологічні зміни. *a, б, в* – “хвилясті” кардіоміоцити, збільшення $40\times$, лінійка 50 мкм, *г, д, е* – кардіоміоцити із гіпереозинοφільною 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/SKO – гетерозиготи, SKO/SKO – гомозиготи. Усі вказані гістопатологічні зміни позначені стрілочками

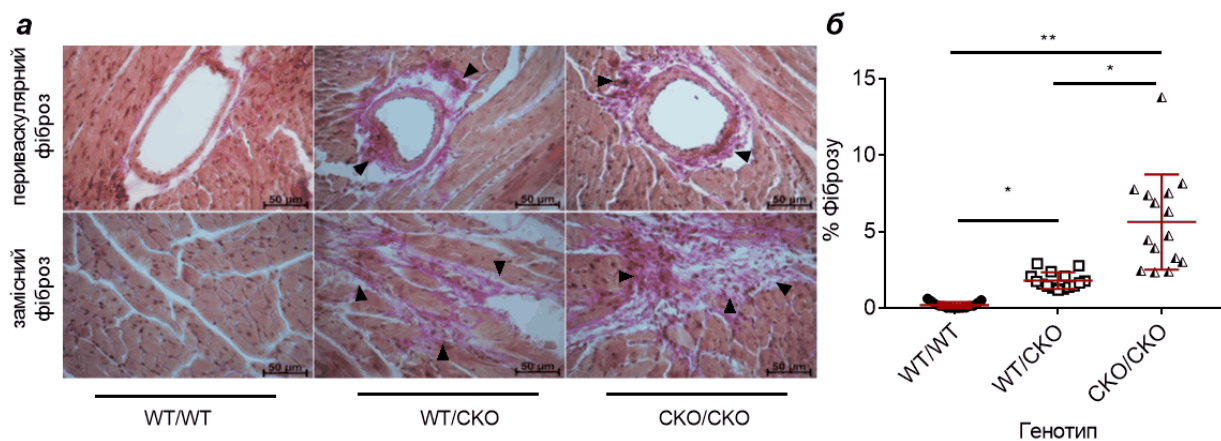


Рис. 3.5. Забарвлення парафінових зрізів серця за ван Гізоном контрольних мишей, мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну та мишей із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. **а** – Периваскулярний (верхній рядок) та замісний (нижній рядок) фіброз. **б** – Результати обрахунку площі, що займає фіброз. Збільшення 400х, лінійка 50 мкм. WT/WT – контрольні миші, WT/SKO – гетерозиготи, SKO/SKO – гомозиготи. $n = 5$ у кожній групі. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, за допомогою тесту Краскела-Уолліса із post hoc тестом Данна. Усі вказані гістопатологічні зміни вказані стрілочками

За допомогою забарвлення зрізів серця за ван Гізоном ми проаналізували і наявність фіброзу в міокарді та його інтенсивність. Нами було виявлено значні фіброзні ушкодження серця в обох дослідних групах мишей, зокрема периваскулярний фіброз (рис 3.5. **а**), що призводить до порушень коронарного кровообігу [37], та значний замісний фіброз, що є свідченням загибелі кардіоміоцитів та їхнього заміщення сполучною тканиною [45]. 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. 3.5. б).

Отже, результати гістопатологічних досліджень свідчать на користь того що і гетеро- і гомозиготний нокаут α -Е-катеніну у ембріональному серці спричиняє розвиток масивних гістопатологічних перебудов у дорослому міокарді які у свою чергу вказують на розвиток ішемії, запальних процесів та гибелі кардіоміоцитів у мутантних серцях.

3.1.4. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до зниження рівня основного цитоплазматичного компонента демосом – γ -катеніна. Раніше, із застосуванням іншої трансгенної моделі мишей було показано, що делеція α -Е-катеніну спричиняє розвиток фенотипу подібного до дилатаційної кардіоміопатії у людей [144]. У цій же роботі, автори спостерігали порушення структури інтеркалярних дисків у серцях мутантних тварин, проте не спостерігали статистично достовірних змін рівня експресії білків – основних компонентів ІД: α -Т-катеніну, плакоглобіну або γ -катеніну, десмоплакіну та коннексину 43. Однак відомо, що дилатаційна кардіоміопатія асоціюється із порушеннями структури демосом і відповідно порушеннями рівня експресії основних білків демосом: γ -катеніну та десмоплакіну. γ -Катенін – один із ключових компонентів контактів між кардіоміоцитами. Він забезпечує не лише утворення демосом, а й може входити до складу кадєрин-катенінового комплексу адгеринових з'єднань [7]. Тож ми вирішили проаналізувати рівень його експресії у мишей із гетеро- та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. У результаті, ми виявили статистично достовірне зниження кількості білку γ -катеніну лише у

гомозигот за нокаутом α -Е-катеніну (рис. 3.6 *a* та *б*), що також підтверджується даними ПЛР у реальному часі (рис. 3.6 *в*).

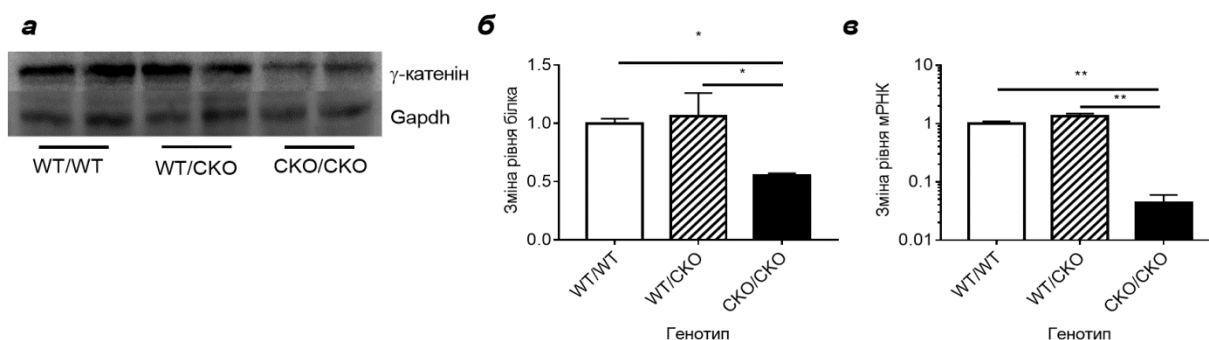


Рис. 3.6. Аналіз зміни рівня експресії γ -катеніну у контрольних мишей, та тварин із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. *a* – типовий Вестерн блот експресії білку γ -катеніна, *б* – денситометрія експресії білку γ -катеніна нормалізованої відносно Gapdh, *в* – результати ПЛР у реальному часі експресії мРНК γ -катеніна нормалізованої відносно Gapdh. Дані експресії білку та мРНК представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/СКО – гетерозиготи, СКО/СКО – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Отримані дані вказують на те, що у тварин з повною втратою α -Е-катеніну відбувається зниження експресії білка γ -катеніну – основного компоненту десмосом та адгеринових з'єднань, що може свідчити і про порушення структури демосом і потребує детального вивчення.

3.1.5. Нокаут α -Е-катеніну призводить до порушення гемодинамічної функції серця. Патології міокарду зазвичай

характеризуються не лише гістопатологічними перебудовами, збільшенням маси серця та зміною рівнів експресії маркерних генів, а й погіршенням гемодинамічної функції органа. Тож наступним нашим кроком було проаналізувати вплив делеції α -Е-катеніну на функціонування серця та основні кардіогемодинамічні параметри. У результаті, нами було з'ясовано, що насосна та діастолічна функції серця у мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну погіршувались, про що свідчать дані кардіогемодинамічних досліджень (табл. 3.1). Аналіз петель тиск-об'єм свідчить про дилатацію лівого шлуночка у мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.7).

Окрім того, спостерігали і 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. 3). Усі ці зміни свідчать, що делеція α -Е-катеніну призводить до погіршення насосної функції серця, що є ознакою розвитку серцевої недостатності.

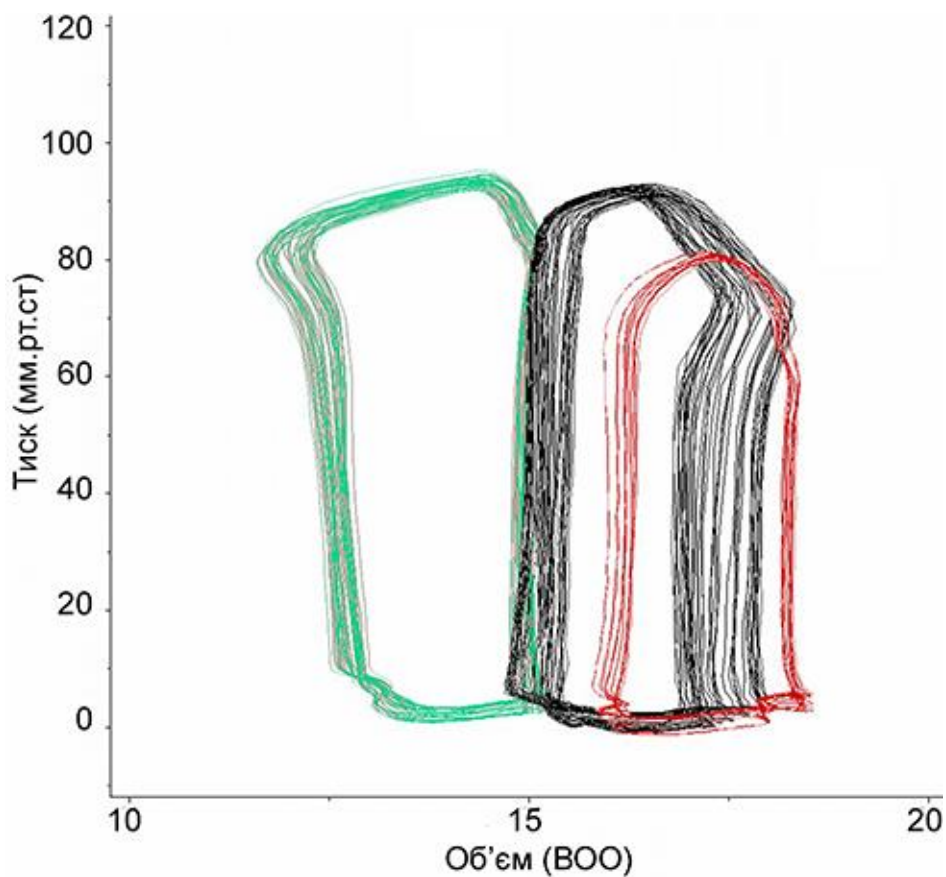


Рис. 3.7. Типові криві тиск-об'єм контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. — WT/WT, — WT/СКО, — СКО/СКО. WT/WT – контрольні миші, WT/СКО – гетерозиготи, СКО/СКО – гомозиготи

Цікаво, що у мишей із нокаутом α -Е-катеніну погіршувалась також і скоротлива функція серця, про що свідчить зниження у гетерозигот та гомозигот таких показників, як кінцевий систолічний тиск (на 8,7% та 3,3% відповідно), $dPdt_{\text{максимальне}}$ (на 36,6% та 433% відповідно) (табл. 3).

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

Параметр	WT/WT	WT/СКО	СКО/СКО
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 діастолічний об'єм (мкл)	21.19 ± 6.08	24.49 ± 8.15*	24.33 ± 10.09*
Кінцевий систолічний тиск (мм.рт.ст)	87.2 ± 10.24	79.55 ± 20.91 *	84.27 ± 15.32
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 вкид (мкл*хв. ⁻¹)	6288.97 ± 2156.42	4663.75 ± 2224.1 *	3697.87 ± 1912.46 *

Ударна робота (мм.рт.ст*мкл ⁻¹)	744.46 ± 346.05	626 ± 395.14 *	408.01 ± 296.59 *#
Артеріальна жорсткість (мм.рт.ст*мкл ⁻¹)	9.93 ± 3.86	9.19 ± 1.87	18.98 ± 17.02 **
dPdt _{максимальне} (мм.рт.ст*сек. ⁻¹)	13712.83 ± 3079.3	8683.78 ± 5141.59 *	7767.78 ± 2257 *
dPdt _{мінімальне} (мм.рт.ст*сек. ⁻¹)	-10814.16 ± 1864.97	-6466.48 ± 3834.69 *	-5824.27 ± 1375.76 *
Tau_w (мсек.)	4.46 ± 1.18	10.97 ± 6.85 *	15.6 ± 35.26 *
Tau_g (мсек.)	9.6 ± 9.6	12.1 ± 6.35	42.55 ± 148.98 *#
Максимальна потужність (мВат)	6.11 ± 1.17	5.37 ± 3.43	3.0 ± 1.86 **
E _{максимальна}	12.74 ± 0.65	11.17 ± 3.97	13.87 ± 7.5

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

Такі порушення насосної та систолічної функцій у мишей із гомозиготною делецією α-Е-катеніну можуть бути наслідком значного зростання артеріальної жорсткості (зростає на 91,1% порівняно із контрольними тваринами), що є важливим фактором післянавантаження (табл. 3). Проте, у мишей із гетерозиготною делецією α-Е-катеніну у яких артеріальна жорсткість не відрізнялась від такої у контрольних мишей (табл. 3.1) також відбувалось погіршення серцевої функції. Ці дані свідчать про

роль α -Е-катеніну у порушенні гемодинамічної функції і про те, що насосна та діастолічна функції можуть бути порушені не залежно від артеріальної жорсткості у тварин з делецією гену α -Е-катеніну.

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. 3).

Тож, отримані нами дані казують на те, що делеція α -Е-катеніну у ембріональному серці призводить до критичного порушення основних гемодинамічних показників міокарду та до розвитку серцевої недостатності.

Висновок до підрозділу.

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.

Результати викладені у підрозділі опубліковано у працях:

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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.

3.2. Нокаут α -Е-катеніну призводить до активації WNT/ β -катенінового сигнального шляху та Υ ар-залежної транскрипції

Як було показано, із застосуванням різних модельних об'єктів, α -катенін не лише важливий компонент міжклітинної адгезії, а й залучається до модуляції активності канонічного WNT-сигнального каскаду, при цьому він може здійснювати як позитивний [110], так і негативний [32,135,48] вплив на його активність. Також було показано й можливу участь α -катеніну у контролюванні активності HIPPO-сигнального шляху [146,140], а подвійний нокаут α -Е- та α -Т-катеніну у міокарді призводив до вивільнення транскрипційного фактора Υ ар із комплексу із білком 14-3-3 та його подальшої активації [88,140]. Відомо також, що і канонічний WNT- і HIPPO-сигнальний каскади мають важливе значення у розвитку міокарду та його перебудовах при адаптаціях до дії патологічних чинників: хронічне підвищення артеріального тиску, інфаркт, гормональні навантаження, старіння та інше [30,174,16]. Тож у своєму дослідженні ми вирішили проаналізувати активність канонічного WNT-сигналіngu та рівень експресії генів-мішеней Υ ар у серцях тварин із повною та частковою делецією гену α -Е-катеніну.

3.2.1. Гетрозиготна та гомозиготна делеції α -Е-катеніну призводить до активації канонічного WNT/ β -катенінового сигнального шляху. За допомогою Вестерн-блот аналізу ми виявили зростання рівня тотального β -катеніну у серцях тварин із гомозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.8 *a* та *b*), однак, у гетерозигот рівень тотального β -катеніну не змінювався (рис. 3.8 *a* та *b*). Проте, вміст активного β -катеніну (нефосфорильованого за Сер-

33/37 та Тре-41) у проаналізованих білкових лізатах зростав як в гетерозигот, так і у гомозигот порівняно із тваринами контрольної групи (рис. 3.8 **a** та **в**). Цікаво, що рівень активного β -катеніну у гомозигот був статистично достовірно вищим порівняно із гетерозиготами (рис. 3.8 **a** та **в**). Що свідчить про вищий рівень активності канонічного WNT-сигналіngu у тварин гомозиготних за делецією α -Е-катеніну порівняно із гетерозиготними мутантними тваринами.

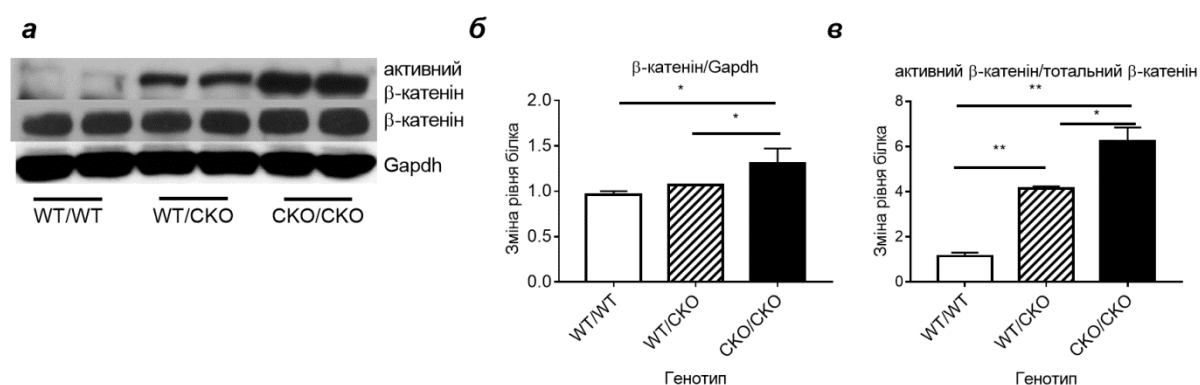


Рис. 3.8. Вестерн блот експресії тотального та активного β -катеніну у серцях контрольних мишей, мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну та мишей із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. **a** – типовий Вестерн блот, **б** – денситометрія експресії тотального білка β -катеніну нормалізована відносно Gapdh, **в** – денситометрія експресії активного β -катеніну нормалізована відносно тотального β -катеніну. 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. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Аналіз вмісту фосфорильованої за Сер-9 GSK-3 β , також свідчить про активацію канонічного WNT-сигналіngu у мутантних тварин. GSK-3 β – один з основних компонентів деградувального комплексу β -катеніну, і її фосфорилування кінази за Сер-9 здатності до фосфорилування β -катеніну.

Вміст фосфорильованої GSK-3 β у гетерозигот та гомозигот був у 2 та 2,5 рази вищим порівняно із контрольними тваринами відповідно (рис. 3.9 *a* та *б*). Цікаво також, що вміст фосфорильованої GSK-3 β у гомозигот також статистично достовірно був вищим порівняно із гетерозиготами (рис. 3.9 *a* та *б*), що узгоджується із даними аналізу вмісту фосфорильованого β -катеніну (рис. 3.8).

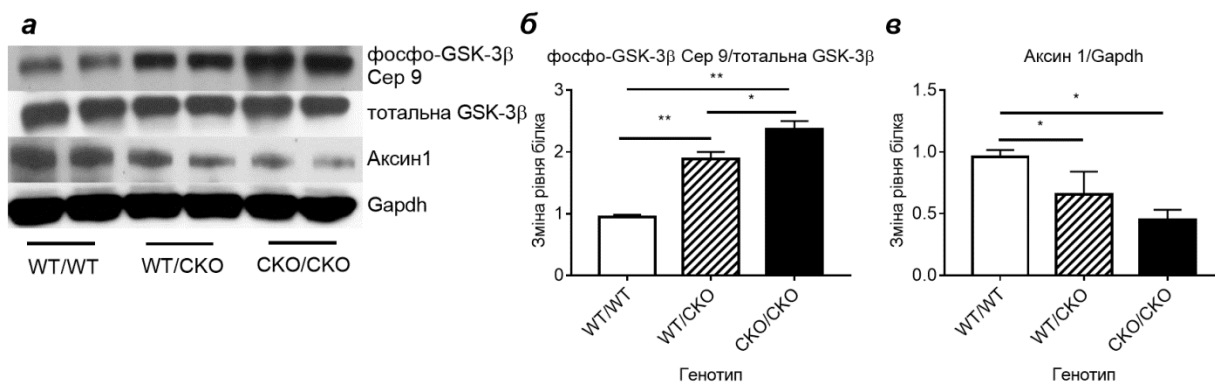


Рис. 3.9. Вестерн блот аналіз вмісту фосфорильованої, тотальної GSK-3 β та Аксину-1 у лізатах сердець контрольних мишей, мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну та мишей із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. *a* – типовий Вестерн блот, *б* – денситометрія експресії фосфорильованої GSK-3 β нормалізована відносно тотальної GSK-3 β , *в* – денситометрія експресії Аксину-1 нормалізована відносно Gapdh. 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. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Окрім того нами було проаналізовано і вміст іншого ключового компонента деградувального комплексу β -катеніну – Axin-1. У результаті, ми виявили достовірне зниження вмісту білка Axin-1 в обох дослідних групах,

тварин (рис. 3.9 *a* та *в*), що також свідчить про пригнічення фосфорилування β -катеніну, та як наслідок, підвищення його транскрипційної активності.

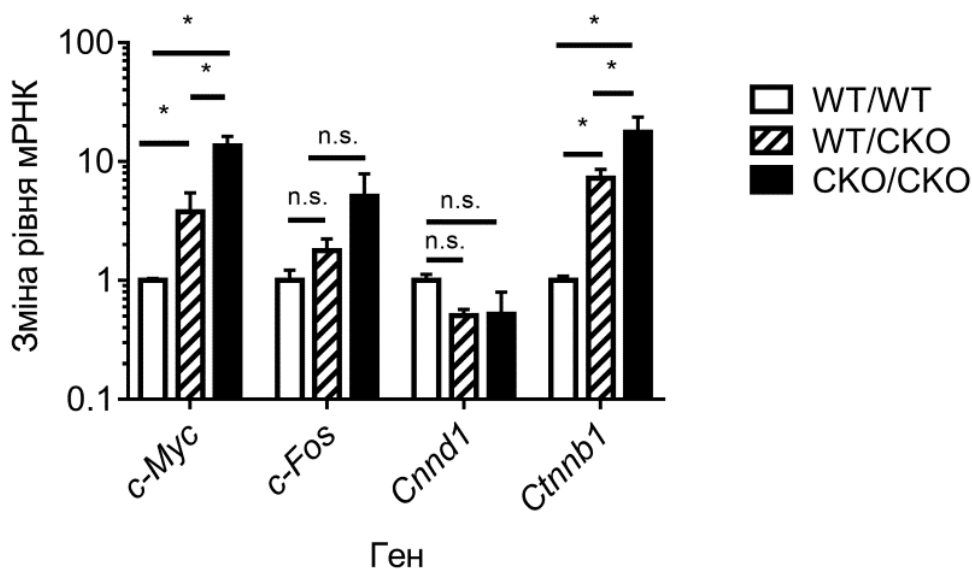


Рис. 3.10. Аналіз експресії генів-мішеней WNT/ β -катенінового сигнального шляху у серцях контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну за допомогою ПЛР в реальному часі. *Cnnd1* – циклін D1, *Ctnnb1* – β -катенін. Дані експресії мРНК представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p < 0,05$, n.s. – $p > 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Аналіз рівня експресії генів-мішеней WNT/ β -катенінового сигнального шляху та *Ctnnb1* (β -катеніну) також узгоджується із даними Вестен-блоту та свідчить про підвищення транскрипційної активності β -катеніну. Так, нами було виявлено зростання експресії генів *c-Myc* та *Ctnnb1* (рис. 3.10), однак, експресія генів *c-Fos* та *Cnnd1* (циклін D1) не змінювалась у мутантних тварин порівняно із контрольними мишами (рис. 3.10). Варто зауважити, що експресія генів *c-Myc* і *Ctnnb1* була вищою у гомозиготних за нокаутом α -Е-

катеніну серцях порівняно із гетерозиготами (рис. 3.10). І це узгоджується із нашими попередніми спостереженнями про вищий рівень сигнальної активності α -Е-катенін у тварин із гомозиготним нокаутом α -Е-катеніну порівняно із гетерозиготами. Варто зауважити, що канонічний WNT-сигналінг та β -катенін зокрема мають критичне значення у кардіогенезі та перебудові дорослого міокарду. Так і у нашому відділу, і іншими авторами було показано, що пригнічення його активності асоційоване із зменшенням маси серця та порушенням термінальної диференціації неонатальних кардіоміоцитів, тоді як активація у дорослому міокарді призводить до розвитку гіпертрофії [120].

Отже нами показано, що ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє активацію канонічного WNT-сигналінгу у дорослих мутантних серцях, що свідчить про супресорну функцію α -Е-катеніну у регулюванні активності WNT-сигналінгу.

3.2.2. Гетерозиготна та гомозиготна делеції α -Е-катеніну призводить до активації γ ар-залежної транскрипції. Підвищення ядерної локалізації γ ар, та активації експресії його генів мішеней було показано у кардіоміоцитах з подвійним нокаутом генів α -Е-катеніну та α -Т-катеніну [88]. Окрім того, автори спостерігали і гіперпроліферацію таких нокаутних клітин. Тож, на ґрунті літературних даних, ми припустили що делеція лише одого гену α -Е-катеніну також буде впливати на активність HIPPO-сигнального каскаду у кардіоміоцитах дорослих мутантних сердець. Аналіз зміни рівня експресії генів-мішеней γ ар: *Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b*, дійсно свідчив про активацію транскрипційної активності γ ар як у гетерозиготних, так і гомозиготних за нокаутом α -Е-катеніну дорослих серцях (рис. 3.11). 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 (див підрозділ 3.2.1.). 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. 3.11).

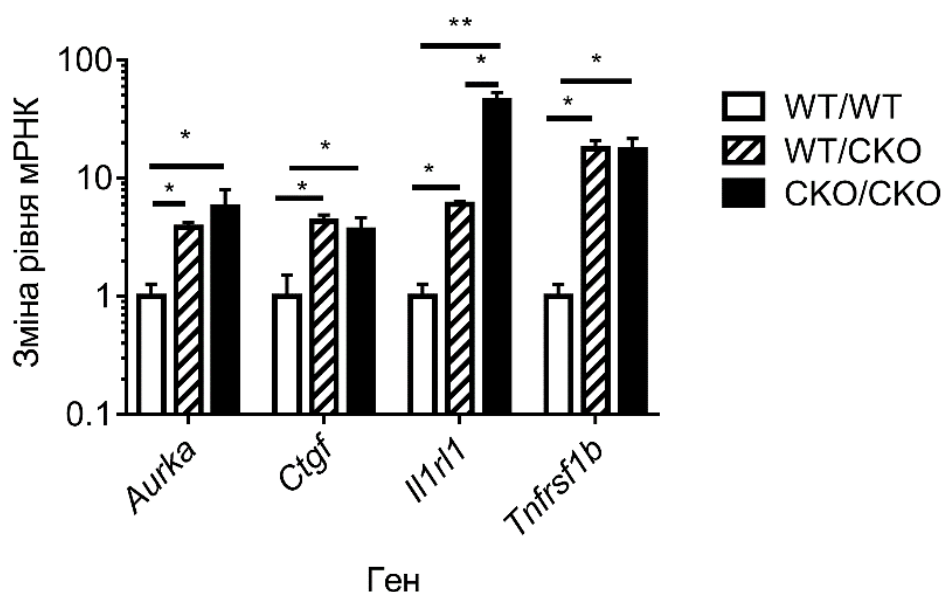


Рис. 3.11. Аналіз експресії генів-мішеней γ ар (*Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1*, *Tnfrsf1b*) у серцях контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну за допомогою ПЛР в реальному часі: Дані експресії мРНК представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Цікаво, що у пацієнтів із серцевою недостатністю зростання рівня *Il1rl1* в плазмі крові є маркером такого важливого показника для прогнозу

виживаності хворих як «1-year mortality» [106]. Це узгоджується із ранньою летальністю, що ми спостерігали при аналізі тривалості життя мишей з делецією α -Е-катеніну і тривалістю життя гетеро- та гомозиготних тварин.

Загалом, активація Υ ар у дорослому серці не лише може призводити до збільшення розмірів клітин серця, розмірів міокарду а й до розвитку гіпертрофії і серцевої недостатності [30].

Отже, наші результати свідчать про те, що делеція α -Е-катеніну у ембріональному серці мишей спричиняє підвищення транскрипційної активності Υ ар і пригнічення HIPPO-сигнального каскаду. Вочевидь, α -Е-катенін має важливу супресорну функцію у регулюванні активності Υ ар та його генів мішеней у клітинах міокарду.

Висновок до підрозділу.

Виявлено, що α -Е-катенін є супресором транскрипційної активності канонічного WNT-сигнального шляху та Υ ар. Як гетеро-, так і гомозиготна делеція α -Е-катеніну призводить до активації канонічного WNT-сигнального шляху та транскрипційної активності Υ ар.

Результати викладені у підрозділі опубліковано у працях:

1. 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.
2. 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

3. 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.

3.3. Кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до зміни активності гіпертрофічних сигнальних каскадів

Дані морфологічних, гістологічних та гемодинамічних досліджень свідчать, що делеція α -Е-катеніну у ембріональному серці спричиняє розвиток серцевої недостатності та летальність дорослих тварин. 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 [28,87,119].

Оскільки, у своїй роботі ми продемонстрували розвиток серцевої недостатності у мишей із делецією α -Е-катеніну та показали активацію канонічного WNT-сигнального шляху та Yap було цікаво проаналізувати і стан інших сигнальних систем залучених до розвитку серцевої недостатності. Тому в подальшій роботі ми зосередились на дослідженні активності ключових медіаторів PI3K/Akt-, Mek1/Erk1/2- та cAMP/PKA-сигнальних шляхів.

Ми виявили двократне зростання експресії тотальної Akt у серцях дорослих мишей, як із гетерозиготною так і з гомозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.12 *a* та *б*). Рівень фосфорилювання Akt за Сер 473 також значно зростав в обох дослідних групах тварин (рис. 3.12 *a* та *в*), а рівень фосфорилювання Akt за Тре 308 знижувався як в гетерозигот, так і у гомозигот (рис. 3.12 *a* та *г*). Отримані результати свідчать про підвищення сигнальної активності PI3K/Akt каскаду та можливість активації Akt через mTORC2-комплекс у серцях тварин із нокаутом α -Е-катеніну [167].

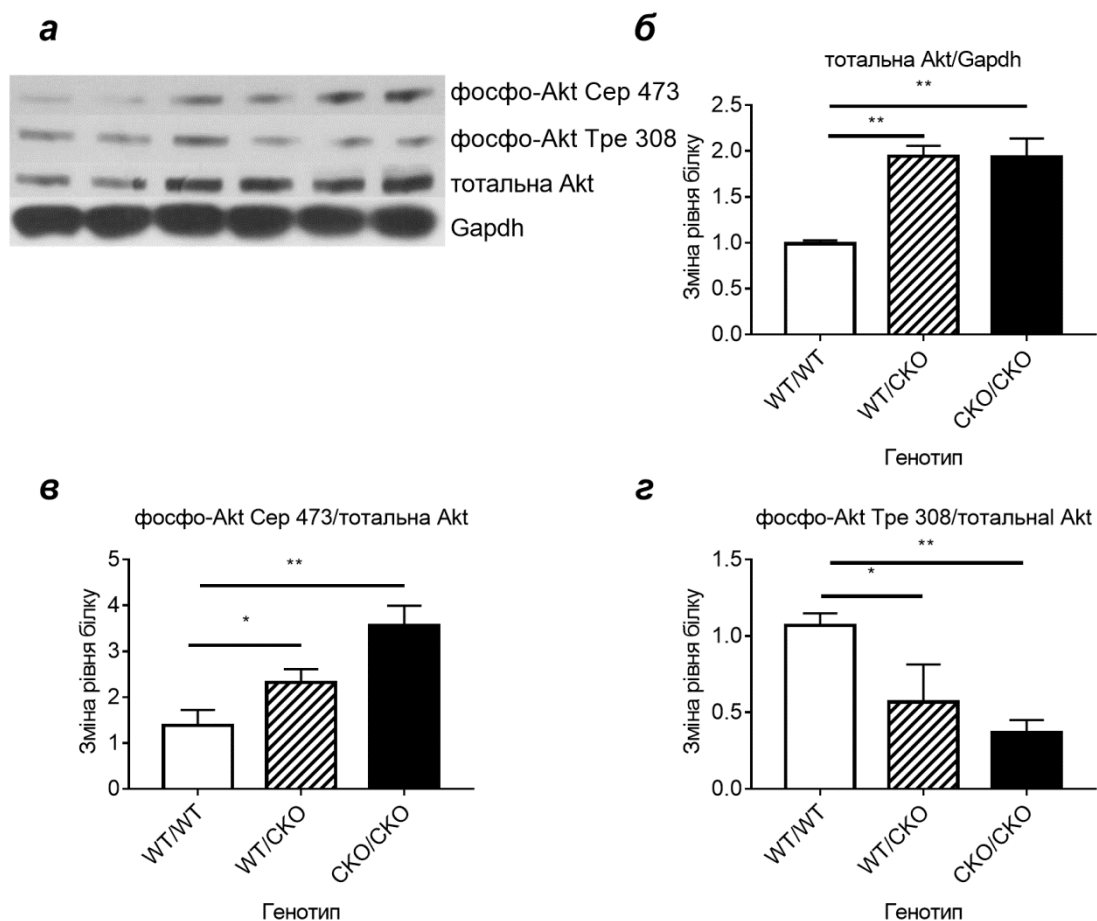


Рис. 3.12. Вестерн-блот аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої Akt у лізатах сердець контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. **а** – типовий Вестерн блот, **б** – денситометрія експресії тотальної Akt нормалізована відносно Gapdh, **в** – денситометрія експресії фосфорильованої за Сер 473 Akt нормалізована відносно тотальної Akt, **г** – денситометрія експресії фосфорильованої за Тре 308 Akt нормалізована відносно тотальної Akt. 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. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Іншим важливим сигнальним каскадом залученим до розвитку серцевої недостатності є Mek1/Erk1/2 каскад. Цікаво, що цей сигналінг реагує на вплив цілої низки патологічних факторів [12]. Однак, і підвищення, і зниження рівня фосфорилювання його основного медіатора – Erk1/2 має негативний вплив на функціонування міокарду і призводить до розвитку патології [56,21]. У своїй роботі ми виявили зниження вмісту фосфорильованих форм білків у гетерозигот (рис 3.13), але у гомозигот вміст фосфорильованих Erk1/2 статистично достовірно зростає порівняно із контрольними мишами та мишами із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.13).

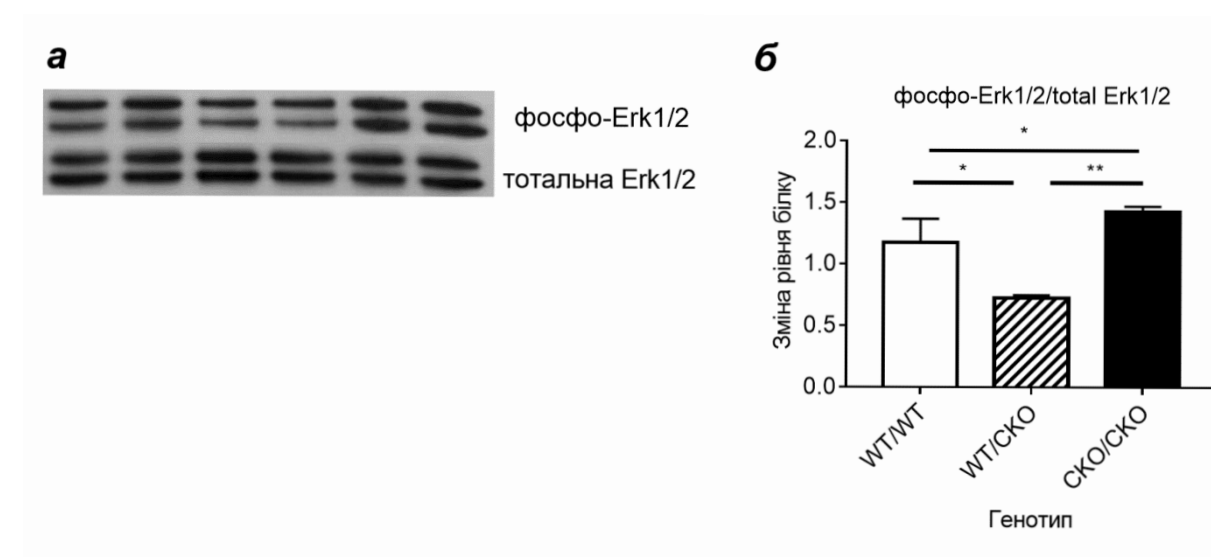


Рис. 3.13. Вестерн-блот аналізу експресії тотальної та фосфорильованої Erk1/2 у серцях контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. **а** – типовий Вестерн блот, **б** – денситометрія експресії фосфорильованих Erk1/2 нормалізовані відносно тотальних Erk1/2. Дані 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. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Аналіз вмісту фосфорильованої протеїнкінази А (РКА) виявив статистично достовірно зниження місту фосфорильованої РКА в обох дослідних групах тварин (рис. 3.14) порівняно із контролем, що свідчить про інгібування її активності. Пригнічення активності РКА у дорослому серці не лише свідчить про серцеву недостатність а й вказує на погіршення скорочувальної функції міокарду, оскільки РКА є принциповим регулятором фосфорильовання саркомерних білків, включаючи тітин.

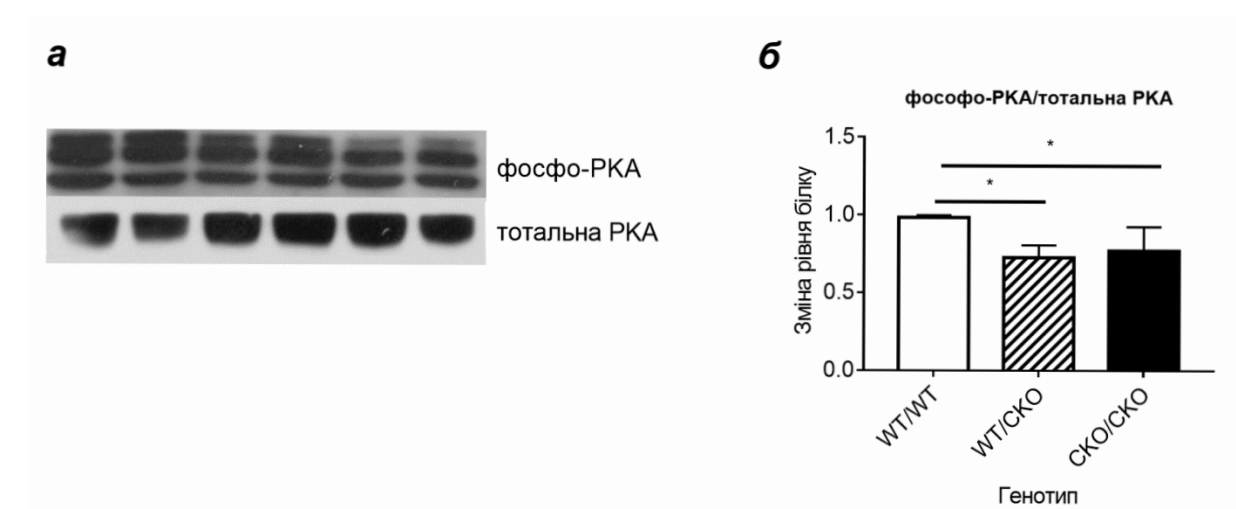


Рис. 3.14. Вестерн-блот експресії тотальної та фосфорильованої РКА у серцях контрольних мишей, мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну та мишей із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. **а** – типовий Вестерн блот, **б** – денситометрія експресії фосфорильованої РКА нормалізована відносно тотальної РКА. 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. * - $p < 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Тож результати дослідження активності сигнальних каскадів що залучені до розвитку серцевої недостатності, а саме: PI3K/Akt-, Mek1/Erk1/2-

та cAMP/PKA-сигнальних шляхів вказують на молекулярно-біологічні і біохімічні зміни у серцях із делецією α -Е-катеніну що є типовими для серцевої недостатності.

Висновок до підрозділу.

Результати досліджень викладені у підрозділі вказують на те, що ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катенін асоційована із порушеннями активності PI3K/Akt-, cAMP/PKA- та MAPK-сигнальних каскадів, що залучені до розвитку серцевої недостатності дорослого міокарду.

Результати викладені у підрозділі опубліковано у працях:

1. 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.
2. 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.

3.4. Кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну спричиняє порушення метаболізму ліпідів у серці

Зміни у активності сигнальних каскадів (PI3K/Akt-, WNT/ β -катеніновий, Mek1/Erk1/2- та cAMP/PKA) що нами були показані можуть бути причиною і порушення обміну ліпідів у серцях тварин із делецією α -Е-катеніну. Так, згідно літературних даних, активація PI3K/Akt-сигнального шляху призводить до інгібування експресії PPAR α [28], який є основними транскрипційним фактором, що активує експресію генів залучених до катаболізму нейтральних жирів [39]. Також, відомо, що активація WNT/ β -катенінового сигнального каскаду знижує експресію PPAR α через один з його генів-мішеней – *c-Myc* [6]. Тому, в подальшій своїй роботі ми проаналізували вміст тотальних та фосфорильованих білків, що залучені до метаболізму нейтральних ліпідів у лізатах сердець тварин дослідних та контрольної груп.

3.4.1. Делеція α -Е-катеніну призводить до інгібування окислення та накопичення ліпідів у серці. Однією з типових ознак порушення метаболізму жирних кислот у міокарді є накопичення нейтральних жирів у кардіоміоцитах. Із використанням специфічного забарвлення жировим червоним О ми дійсно виявили накопичення ліпідів у кардіоміоцитах тварин із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.15.) порівняно із контролем.

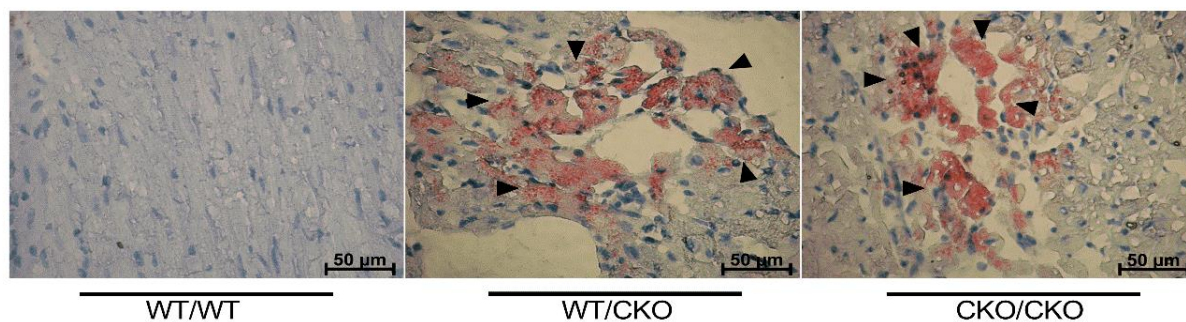


Рис. 3.15. Забарвлення кризрізів серця жировим червоним О контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. Збільшення 400х, лінійка 50 мкм. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи

Для більш детального аналізу механізмів накопичення ліпідів у кардіоміоцитах досліджуваних нами тварин ми проаналізували також і активність основних регуляторів окислення ліпідів: PPAR α та HSL. За допомогою вестерн-блот аналізу ми встановили двократне зниження вмісту PPAR α , як у лізатах сердець гетерозигот, так і гомозигот за нокаутом α -Е-катеніну порівняно із контролем (рис. 3.16). Ці дані узгоджуються із даними гістохімічного аналізу вмісту ліпідів (рис. 3.15) та свідчать про інгібування катаболізму ліпідів у міокарді мутантних тварин.

Аналіз вмісту гормон чутливої ліпази (HSL) у лізатах сердець тварин контрольної та дослідних груп виявив зниження вмісту тотального білка лише у гетерозигот за нокаутом α -Е-катеніну (рис. 3.17 *a* та *б*). Проте вміст фосфорильованої HSL за Сер 563 та Сер 565 статистично достовірно знижувався в обох дослідних групах тварин порівняно із контрольними мишами (рис. 3.17 *a*, *в* і *г*). Ці дані свідчать про інгібування активності HSL, яка здійснює гідроліз триацилгліцеридів та діацилгліцеридів [170], та є ферментом, що лімітує швидкість гідролізу нейтральних ліпідів.

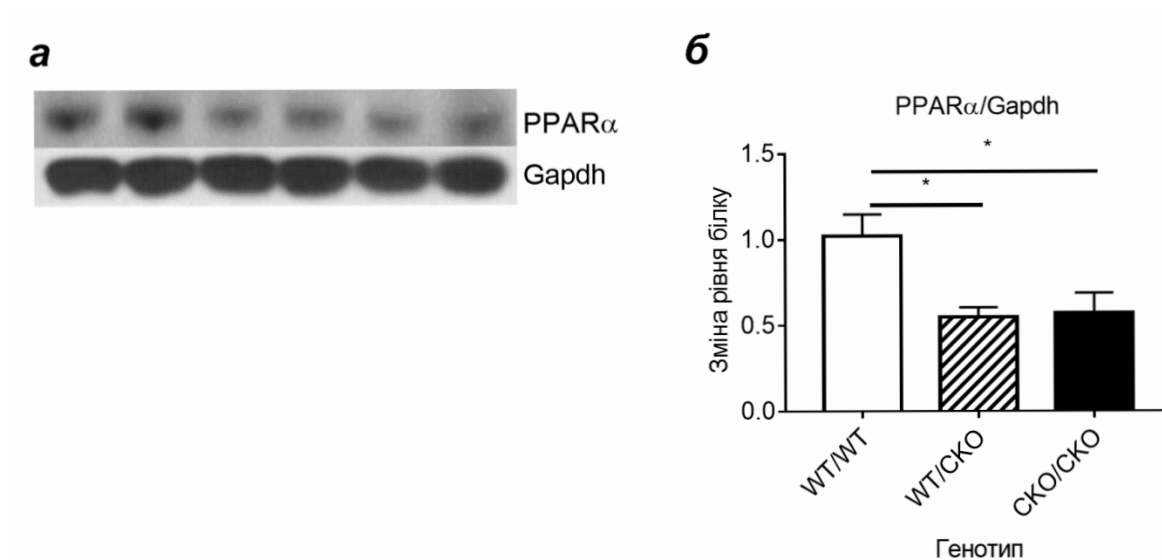


Рис. 3.16. Вестерн-блот аналіз вмісту PPAR α у лізатах сердець контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. **a** – типовий Вестерн блот, **б** – денситометрія експресії фосфорильованої PPAR α нормалізована відносно Gapdh. Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p < 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

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 діабету та/або метаболічного синдрому [142,101]. 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.

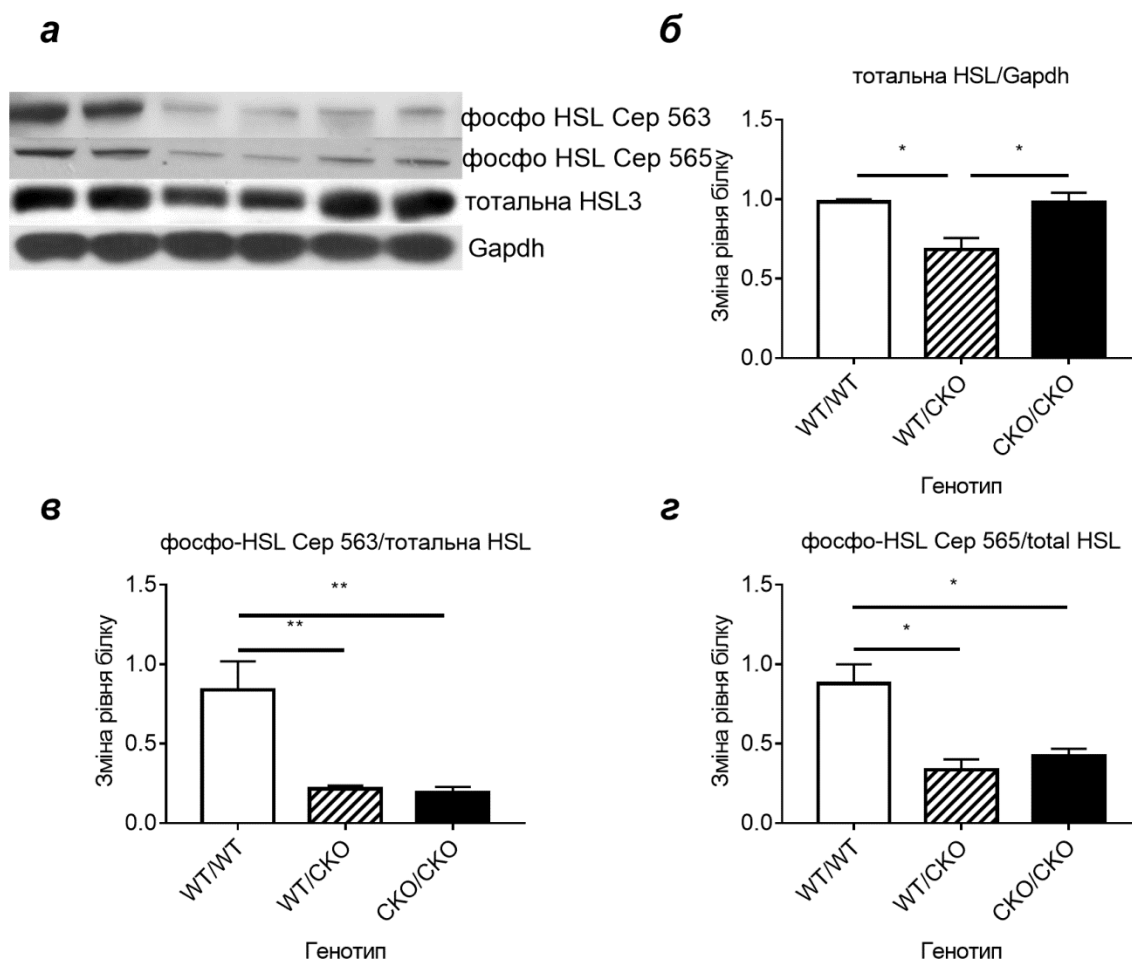


Рис. 3.17. Вестерн-блот аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої HSL у лізатах сердець контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. **а** – типовий Вестерн блот, **б** – денситометрія експресії тотальної HSL нормалізована відносно Gardh, **в** – денситометрія експресії фосфорильованої за Сер 563 HSL нормалізована відносно тотальної HSL. **г** – денситометрія експресії фосфорильованої за Сер 565 HSL нормалізована відносно тотальної HSL. 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. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

3.4.2. Нокаут α -Е-катеніну спричиняє інгібування основних регуляторів метаболізму нейтральних жирів. Для більш детального розуміння молекулярних механізмів, які призводять до інгібування катаболізму ліпідів, та їхнього накопичення у міокарді, ми проаналізували активність основних регуляторів метаболізму жирів: кінази, що активується цАМФ (АМРК) та ацетил-СоА-карбоксилази (АСС).

Ми виявили двократне зростання вмісту тотальної АМРК як у лізатах сердець гетерозигот, так і гомозигот за нокаутом α -Е-катеніну порівняно із контрольними зразками (рис. 3.18 *a* і *б*). Незважаючи на зростання вмісту тотального білка вміст фосфорильованої АМРК суттєво, знижувався в обох дослідних групах (рис. 3.18 *a* та *в*). При цьому вміст фосфорильованої АМРК у лізатах сердець гетерозиготних за нокаутом α -Е-катеніну тарин був статистично достовірно нижчим порівняно із гомозиготами (рис. 3.18 *a* та *в*).

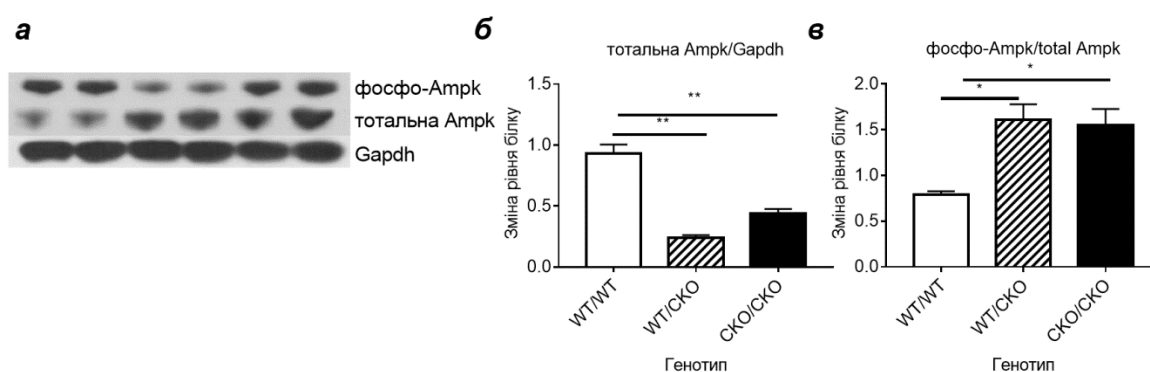


Рис. 3.18. Вестерн-блот експресії тотальної та фосфорильованої АМРК у серцях контрольних мишей, мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну та мишей із гомозиготною делецією α -Е-катеніну. *a* – типовий Вестерн блот, *б* – денситометрія експресії тотальної АМРК нормалізована відносно Gapdh, *в* – денситометрія експресії фосфорильованої АМРК нормалізована відносно тотальної АМРК. 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. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тьюкея

Окрім того, ми виявили значне зниження вмісту фосфорильованої АСС у лізатах сердець у обох дослідних групах тварин порівняно із контрольними (рис. 3.19). Ці дані підтверджують зниження рівня активності АМРК у мутантних тварин, оскільки АСС є субстратом АМРК [122].

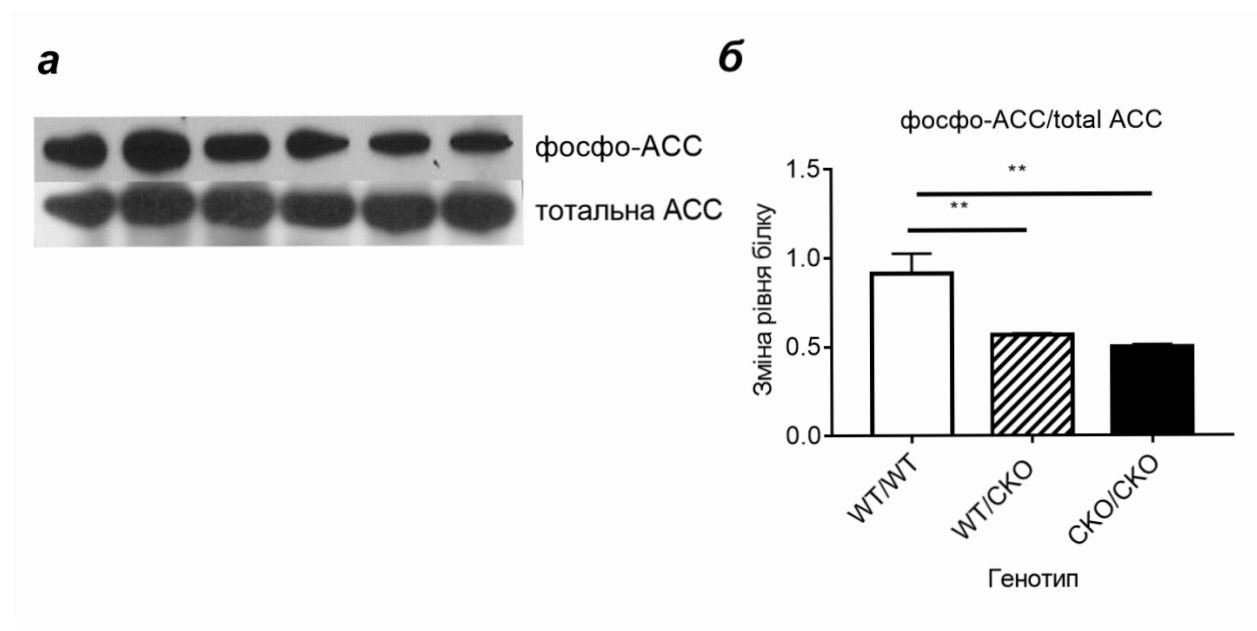


Рис. 3.19. Вестерн-блот аналіз вмісту тотальної та фосфорильованої АСС у лізатах сердець контрольних мишей, мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. **a** – типовий Вестерн блот, **б** – денситометрія експресії фосфорильованої АСС нормалізована відносно тотальної АСС. Дані експресії білка представлені, як відносна зміна рівня порівняно із контролем. WT/WT – контрольні миші, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. $n = 5$ у всіх групах. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ за допомогою ANOVA із post hoc тестом Тьюкея

Висновок до підрозділу.

У результаті проведених досліджень нами показано, що ембріональний кардіоспецифічний нокаут α -Е-катеніну призводить до накопиченням нейтральних ліпідів у кардіоміоцитах та інгібування β -окислення жирних кислот у дорослому міокарді мутантних тварин.

Результати викладені у підрозділі опубліковано у працях:

1. 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.
2. 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.

3.5. Делеція α -E-катеніну призводить до порушень неонатального серця

В попередніх розділах дисертаційного дослідження нами показано, що і гетерозиготна, і гомозиготна делеція α -E-катеніну у ембріональному серці спричиняє розвиток гістопатологічних, молекулярно-генетичних та гемодинамічних змін типових для серцевої недостатності. Окрім того, нами виявлені і нехарактерні для серцевої недостатності зміни у дорослих мутантних серцях а саме, накопичення нейтральних ліпідів. Незважаючи на це, виникало питання, чи є описані нами зміни і фенотип результатом порушення структурної функції за рахунок делеції α -E-катеніну, чи порушення саме сигнальної функції цього гену та активація канонічного Wnt- та Hippo-сигнальних каскадів є першопричиною розвитку описаного нами кардіального фенотипу. Також виникало питання, коли саме починаються зміни на морфологічному та генетичному рівнях що врешті решт спричиняють розвиток патології та летальність тварин. Тож для відповідей на ці питання, у подальшому ми зосередились на дослідженні неонатальних кардіоміоцитів виділених із мишей віком 1 доба (P1).

3.5.1. Нокаут α -E-катеніну призводить до порушення термінального диференціювання неонатальних кардіоміоцитів. Перш за все, ми проаналізували як гетеро- так гомозиготна делеція гену α -E-катеніну впливає на розміри новонародженого міокарду. Аналіз індексу МС/МТ у тварин P1 виявили достовірне зростання досліджуваного показника як у гетерозигот, так і гомозигот порівняно із контролем (рис. 3.20). Варто зауважити, що індекс МС/МТ був також достовірно вищим у гомозигот порівняно із гетерозиготами (рис. 3.20) що в цілому узгоджується із результатами попередніх спостережень. Так, підвищення індексу МС/МТ

спостерігали у дорослих гомо- та гетерозиготних за нокаутом α -Е-катеніну тварин (рис. 3.2 б).

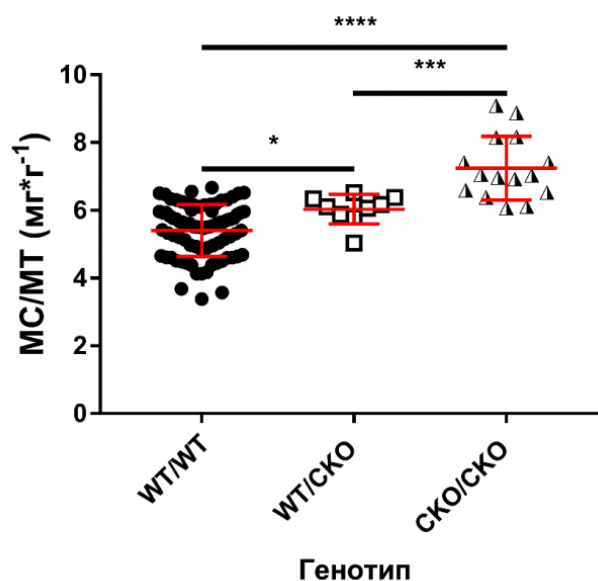


Рис. 3.20. Делеція α -Е-катеніну призводить до зростання маси серця у новонароджених тварин. Індекс співвідношення маси серця до маси тіла у мишей віком 1 доба, WT/WT – контроль ($n = 81$), WT/CKO – гетерозиготи ($n = 9$), CKO/CKO – гомозиготи ($n = 15$). * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,005$, **** – $p < 0,001$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Також ми проаналізували розміри ізольованих неонатальних кардіоміоцитів та виявили достовірне зниження і ширини, і довжини клітин із гетеро- та гомозиготним нокаутом α -Е-катеніну (рис. 3.21). Окрім того, за допомогою МТТ-тесту, ми виявили і підвищення рівня проліферативної активності неонатальних кардіоміоцитів із нокаутом α -Е-катеніну (рис. 3.22). Варто зауважити, що різниці в рівні проліферації між мутантними кардіоміоцитами обох генотипів ми не спостерігали.

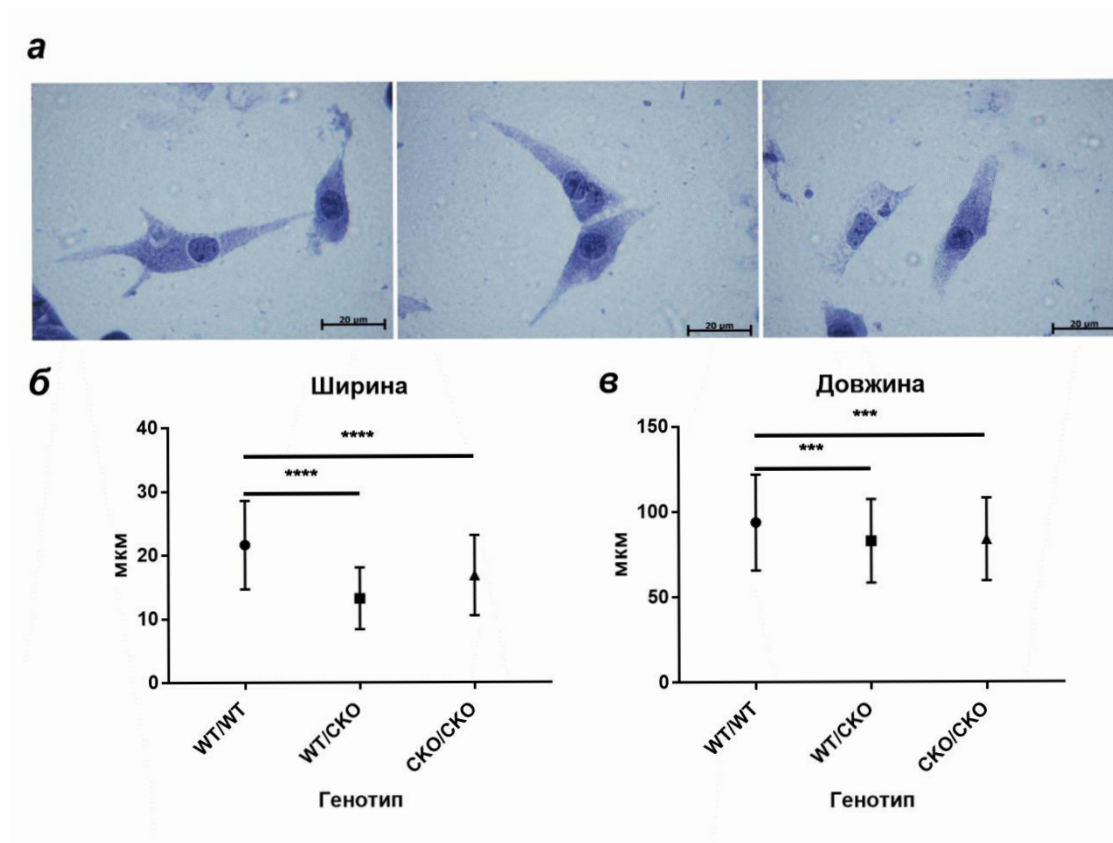


Рис. 3.21. Делеція α -Е-катеніну призводить до зменшення розмірів неонатальних кардіоміоцитів. **а** – морфологія ізольованих неонатальних кардіоміоцитів забарвлених гематоксилін та еозином, **б** та **в** – ширина та довжина ізольованих неонатальних кардіоміоцитів; WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. *** – $p < 0,005$, **** – $p < 0,001$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Тож, ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до підвищення маси серця та рівня проліферативної активності кардіоміоцитів та в одночас до зменшення розмірів мутантних клітин. Отримані нами дані узгоджуються із результатами Лі та інших [88] де було показано, що нокаут як α -Е- так і α -Т-катеніну спричиняв гіперпроліферацію клітин в наслідок активації транскрипційної активності γ ар. У цій же роботі автори спостерігали збільшення кількості кардіоміоцитів у новонароджених серцях з делецією α -катеніну. Вочевидь, збільшення маси серця у мутантних

новонароджених тварин (рис 3.19) є наслідком підвищеної проліферативної активності та гіперплазії. А делеція α -Е-катеніну спричиняє порушення контролю клітинного циклу та проліферації у новонароджених серцях.

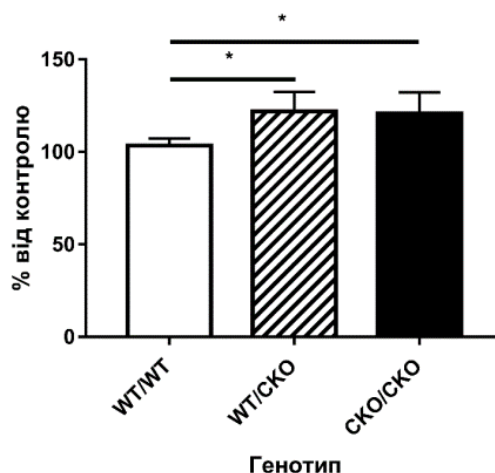


Рис. 3.22. Делеція α -Е-катеніну призводить до зростання рівня проліферації кардіоміоцитів із гетеро- та гомозиготною делецією. WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. * – $p < 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Відомо, що у неонатальному серці, протягом першої доби, у мишей відбувається каріокінез без цитокінезу [129] і це є головною ознакою термінальної диференціації неонатальних кардіоміоцитів та їхнього перемикання на дорослу генетичну програму. Зважаючи на отримані нами дані, ми вирішили проаналізувати частоту одно- та двоядерних кардіоміоцитів виділених із сердець новонароджених тварин гетерози- та гомозиготних за нокаутом α -Е-катеніну. У результаті, ми виявили достовірне зниження кількості двоядерних кардіоміоцитів із гетеро- та гомозиготною делецією α -Е-катеніну порівняно із контрольними клітини (рис. 3.23). Це спостереження свідчить про затримку термінальної диференціації

кардіоміоцитів у неонатальному серці за умов часткової та повної втрати α -Е-катеніну.

Аналіз рівня експресії фетальних або гіпертрофічних генів підтвердив порушення термінальної диференціації кардіоміоцитів за умов делеції α -Е-катеніну. За допомогою ПЛР в реальному часі ми виявили зростання у 2 рази рівня експресії *Anp* у обох мутантних груп (рис. 3.24). Рівень експресії *Vnp* та β -МНС зростав лише у кардіоміоцитах із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.24). Рівень експресії міозину дорослого серця – α -МНС не відрізнявся у мутантних кардіоміоцитах порівняно із контрольними (рис. 3.24). Цікаво, що при аналізі дорослих тварин з делецією α -Е-катеніну, ми спостерігали підвищення експресії саме *Anp* та міозину ембріонального серця β -МНС.

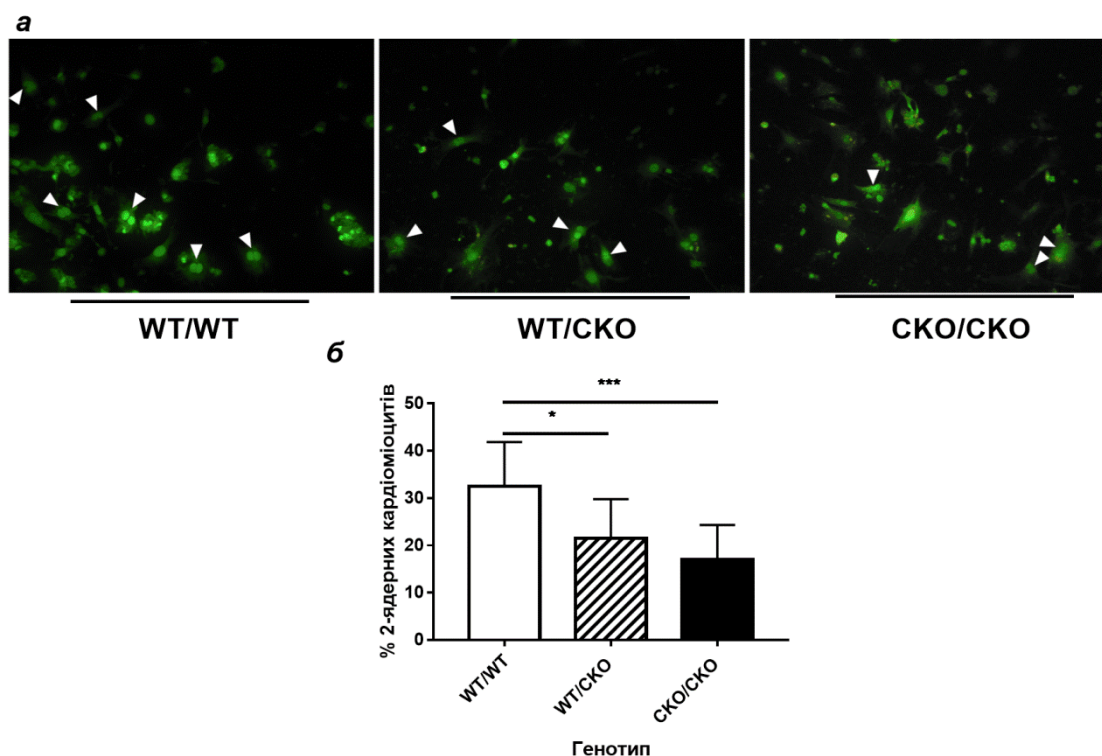


Рис. 3.23. Нокаут α -Е-катеніну супроводжується зниженням кількості двоядерних кардіоміоцитів. **а** – мікрофотографії кардіоміоцитів забарвлені акридиновим оранжевим. Стрілками вказано двоядерні кардіоміоцити. **б** – частота двоядерних неонатальних кардіоміоцитів. WT/WT – контроль,

WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,005$, за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Холма-Сідака

Тож, гетеро- і гомозиготна делеція α -Е-катеніну у ембріональному серці спричиняє затримку термінальної диференціації неонатальних кардіоміоцитів і порушення контролю їхньої проліферативної активності.

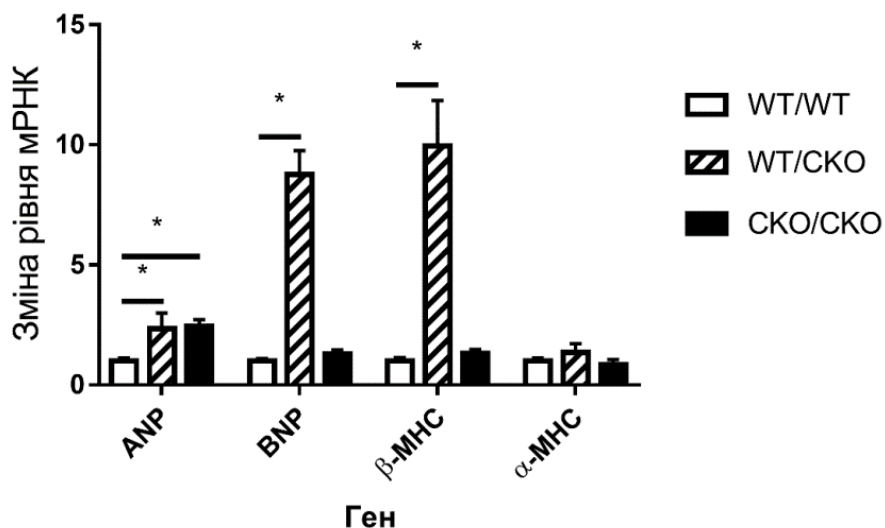


Рис. 3.24. Нокаут α -Е-катеніну спричиняє підвищений рівень експресії фетальних генів у мутантних кардіоміоцитах. WT/WT – контроль, WT/CKO – гетерозиготи, CKO/CKO – гомозиготи. * – $p < 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

3.5.2. Делеція α -Е-катеніну спричиняє підвищення транскрипційної активності β -катеніну та *Yap* у серцях новонароджених тварин. Тож нами було показано, що делеція α -Е-катеніну у ембріональному серці призводить до підвищення проліферативної активності клітин та затримки їхньої термінальної диференціації. Ми припустили що, такі зміни у неонатальному серці є наслідком порушення сигнальної функції α -Е-катеніну та як наслідок підвищення транскрипційної активності β -катеніну та *Yap*. Останні, як

відомо здатні регулювати проліферацію та ріст клітин [55,88]. Тож, для перевірки цього припущення, за допомогою ПЛР в реальному часі ми дослідили рівень експресії генів-мішеней β -катеніну та Υ ар за умови повної та часткової делеції α -Е-катеніну.

У результаті нами було виявлено зростання рівня експресії *c-Myc*, *Axin2* в обох дослідних групах (рис. 3.25 *a*), рівень експресії *Cyclin D1* зростав лише у кардіоміоцитах із гомозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.25 *a*), а рівень експресії *Tcf-4* – лише у кардіоміоцитах із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну (рис. 3.25 *a*). Підвищення рівня експресії генів *c-Myc* та *Axin2* свідчить про підвищення сигнальної активності канонічного WNT та β -катеніну зокрема, у обох дослідних групах неонатальних кардіоміоцитів.

Аналіз рівня експресії генів-мішеней Υ ар: *Ctgf*, *Tnfrsf1b* також показав зростання експресії цих генів у мутантних кардіоміоцитах обох дослідних груп (рис. 3.25 *б*) порівняно із контролем. Підвищення рівня експресії генів-мішеней Υ ар, свідчить і про підвищення його сигнальної активності, що також узгоджується з даними отриманими при дослідженні сигнальної активності цього транскрипційного фактору у дорослих тварин.

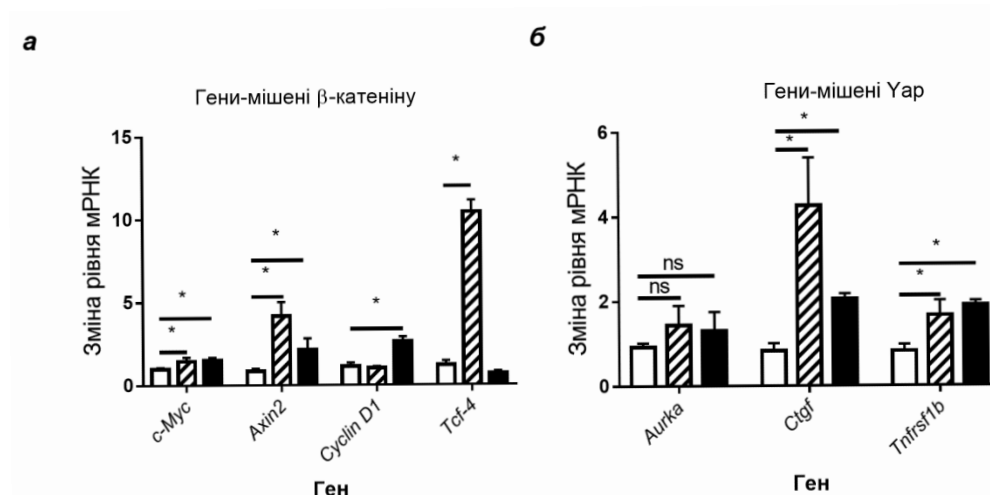


Рис. 3.25. Делеція α -Е-катеніну призводить до активації експресії генів-мішеней β -катеніну (*a*) та Υ ар (*б*). WT/WT – контроль, WT/СКО – гетерозиготи, СКО/СКО – гомозиготи. ns – $p > 0,05$, * – $p < 0,05$ за допомогою ANOVA із *post hoc* тестом Тукея

Отже, нами було встановлено, що ембріональна кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну спричиняє підвищення транскрипційної активності β -катеніну та Yap не лише у дорослому серці а й у неонатальних кардіоміоцитах.

Висновок до підрозділу.

Результати досліджень викладені у підрозділі вказують на те, що α -Е-катенін має важливе значення для регулювання проліферації та термінальної диференціації кардіоміоцитів у новонародженому серці. Так, ембріональна кардіоспецифічна гетеро- та гомозиготна делеція α -Е-катеніну призводить до підвищення сигнальної активності канонічного WNT та Yap у неонатальних кардіоміоцитах. У результаті чого активується проліферація неонатальних кардіоміоцитів та відбувається затримка їхньої термінальної диференціації.

Результати викладені у підрозділі опубліковано у працях:

1. 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.
2. V. V. Balatskyi Alpha-E-catenin signaling function in cardiomyocytes prolaliferation/ **V. Balatskyi**, O. Palchevska, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven, L. Lukash 1st Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv. – 2015.
3. V. V. Balatskyi Alpha-E-catenin in neonatal cardiomyocytes size regulation / V. Vaskyvskyu, **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.

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті проведених досліджень нами було показано, що класичний компонент міжклітинної адгезії – α -Е-катенін має комплексну функцію і залучений у контролювання активності кількох сигнальних каскадів у серці, а саме Yap - та канонічного Wnt -сигнальних шляхів (рис 4.1). Ембріональна делеція цього гену виключно у кардіоміоцитах спричиняє низку патологічних змін у дорослому міокарді.

Так, нами вперше було показано, що кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до розвитку серцевої недостатності та передчасної летальності дорослих тварин. Детальний гістопатологічний аналіз виявив суттєві порушення морфології міокарду у дорослих мишей з гетеро- та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. А саме, ми спостерігали низку ознак, що є типовими для дилатаційної кардіоміопатії та серцевої недостатності: гіпереозинофільні та хвилясті кардіоміоцити, кардіоміоцити із вакуолізованими ядрами, значний замісний фіброз, що свідчить про загибель кардіоміоцитів; також спостерігали інфільтрацію лімфоцитами тканини міокарда, що свідчить про розвиток запальних процесів. Дані кардіогемодинамічного дослідження функції серця вказують на дилатацію лівого шлуночка у мутантних мишей (зростання мінімального та максимального діастолічного і систолічного об'ємів, зсув кривих об'єм-тиск вправо), та підтверджують розвиток серцевої недостатності у мишей з

повною та частковою втратою гену α -E-катеніну. Ймовірно, саме серцева недостатність і є причиною зниження тривалості життя та передчасної летальності дослідних мишей.

Функція α -E-катеніну у міокарді вивчалась і іншими авторами, а саме Sheikh та ін. застосувавши умовний нокаут цього гену з використанням MLC2v-Cre трансгенних мишей виявили розвиток дилатаційної кардіоміопатії у мутантних тварин [144]. Проте, на відміну від нашої роботи, автори не спостерігали прогресії описаної ними патології до серцевої недостатності та летальності таких мишей. Варто зауважити, що різниця у описаному нами та Sheikh та ін. фенотипі пояснюється, перш за все, ефективністю застосованої Cre-системи для нокауту гену α -E-катеніну. Так, показано, що ефективність Cre рекомбінази під контролем промотора MLC2v становить 80% [29]. І навіть самі автори зазначають у своїй роботі, що, хоч і на нижчому рівні порівняно із контролем, але спостерігали експресію білка α -E-катеніну у серцях тварин із повним нокаутом його гену [144]. І навпаки, Cre рекомбіназа під контролем промотора α MHC-Cre, яку використовували ми у своєму дослідженні, забезпечує повну рекомбінацію і делецію фланкованого loxP сайтами фрагменту гену [5,125]. Тож можна зробити припущення, що наша робота є першою, де вплив повної делеції α -E-катеніну на функціонування дорослого серця детально вивчався.

Окрім того, у згаданій роботі, Sheikh та ін. розглядали α -E-катенін виключно як компонент міжклітинної адгезії і не фокусували свою увагу на його можливій сигнальній функції, а також не характеризували отриманий ними кардіальний фенотип на молекулярно-біологічному та біохімічному рівнях [144]. Тоді як, здатність α -E-катеніну регулювати цілу низку сигнальних каскадів була продемонстрована у поодиноких експериментальних роботах [48,135,157,93].

Як зазначалось вище, у своїй роботі ми показали, що і часткова, і повна делеція α -E-катеніну у ембріональному серці спричиняє підвищення

сигнальної активності канонічного WNT-сигнального шляху та Υ ар (основного медіатора HIPPO-сигналінгу) у неонатальних та дорослих кардіоміоцитах.

HIPPO-сигнальний шлях один із основних регуляторів розміру серця, проліферації та виживання кардіоміоцитів [175]. Відомо, що у пацієнтів із серцевою недостатністю відбувається активація деяких компонентів HIPPO-сигнального шляху [174], що свідчить про залучення останнього до патогенезу хвороби. Як зазначалось у Розділі 1, α -Е-катенін здатен взаємодіяти із Υ ар та секвеструвати його в цитоплазмі, інгібуючи його транскрипційну активність [146,88]. У своїх дослідженнях, ми виявили активацію експресії генів-мішеней у неонатальних кардіоміоцитах (*Ctgf*, *Tnfrsf1b*) та серцях дорослих мишей (*Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1* та *Tnfrsf1b*), що свідчить про активацію транскрипційної активності Υ ар у мишей із гетеро- і гомозиготною делецією α -Е-катеніну. Більша кількість генів (*Aurka* та *Tnfrsf1b*), що активуються у старших мишей порівняно із новонародженими свідчить про зростання транскрипційної активності Υ ар у таких тварин із віком.

Наші власні та літературні дані свідчать [85,138], що делеція α -Е-катеніну призводить до руйнування комплексу Υ ар/14-3-3/ α -Е-катенін та вивільнення Υ ар з подальшою активацією його транскрипційної активності. Транслокація Υ ар в ядро призводить не лише до увімкнення експресії генів-мішеней Υ ар, але й до Υ ар-залежної активації РіЗК/Акт-сигнального шляху опосередковано через дію miR-29 та IGF1R [172] (рис.4.1.). Окрім того, активований Υ ар взаємодіє із β -катеніном та призводить до розвитку гіпертрофії серця та гіперпроліферації кардіоміоцитів [54] (рис.4.1). Також, відомо, що Υ ар та β -катенін мають спільні гени-мішені (*Sox2* і *Snai2*) активуючи експресію яких, також регулюють проліферацію кардіоміоцитів (рис 4.1) [54].

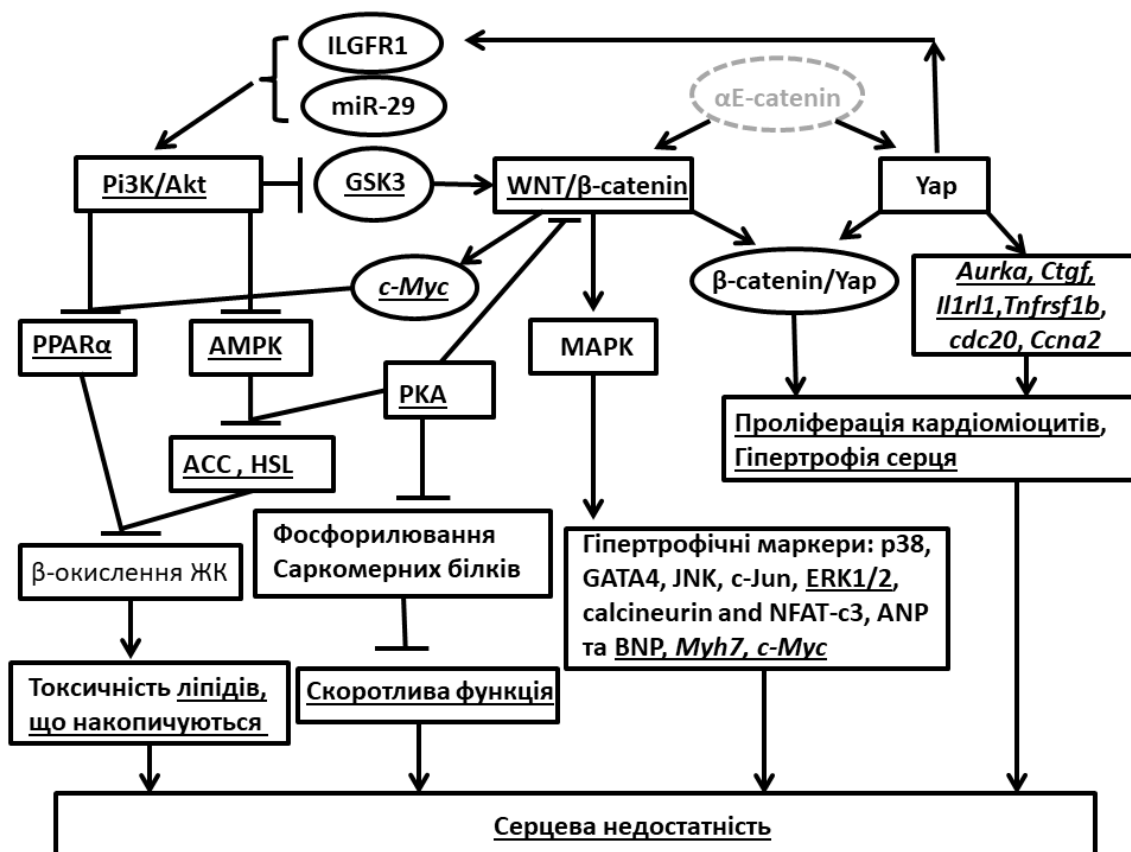


Рис. 4.1. Гіпотетична схема сигнальної функції α -Е-катеніну в серці. Делеція α -Е-катеніну призводить до вивільнення та активації транскрипційної функції Yap та β -катеніну. Активний Yap призводить до зростання експресії генів-мішеней та спричиняє активацію проліферації кардіоміоцитів та гіпертрофію серця [175]. Yap взаємодіє із β -катеніном, що також призводить до проліферації кардіоміоцитів та гіпертрофії серця [55]. Yap також активує Pi3K/Akt-сигнальний шлях через мікроРНК 29 та ILGFR1[175]. Канонічний Wnt призводить до гіпертрофії серця через активацію власних мішеней (c-Myc) [64,20]. Актиавція Wnt/ β -катеніновий сигнального шляху призводить до гіпертрофії кардіоміоцитів та експресії гіпертрофічних генів також і чере MAPK [87]. Актиавція канонічного Wnt-сигналінгу призводить пригнічення експресії PPAR α через c-Myc [6]. Активна Akt стабілізує β -катенін внаслідок інгібування GSK-3 β [14]. Akt також інгібує активність PPAR α та AMPK [28,63]. Зниження активності AMPK призводить до інгібування HSL, PPAR α та як наслідок пригнічує β -окислення жирних кислот [132]. Інгібування окислення жирних кислот

призводить до додаткового токсичного ефекту. Інгібування РКА призводить до призводить до зниження фосфорилування саркомерних білків (включаючи тітин), що призводить до порушення скоротливої функції серця [86,8]. Дані отримані в нашому дослідженні підкреслені

Роль Wnt/ β -катенінового сигнального шляху у ремоделюванні серця досить суперечлива. Так зокрема було встановлено, що активація транскрипційної активності β -катеніну призводить до дилатаційної кардіоміопатії та летальності [60]. Нещодавно було показано, що надекспресія β -катеніну призводить до гіпертрофії кардіоміоцитів та активації експресії гіпертрофічних маркерів (p38, GATA4, c-Jun, ERK1/2, кальцинейрин, NFAT-C3, ANP та BNP) [87]. Роль цього сигналіngu у формуванні та ремоделюванні міокарду досліджувалась і у нашому відділі. І наші результати узгоджуються із літературними даними. Так нами було показано, що гетерозиготний нокаут β -катеніну призводить до затримки росту серця [120], та затримки розвитку гіпертрофії у відповідь на фізичне навантаження [1]. А індукція патологічної гіпертрофії у BATGAL репортерних мишей супроводжується активацією β -катенінового сигналіngu [2]. Хоча іншими дослідниками було показано, що навпаки, саме пригнічення активності β -катеніну необхідно для ефективного ремоделювання серця [13].

У даному дисертаційному дослідженні ми встановили, що ембріональна кардіоспецифічна гетеро- і гомозиготна делеція α -E-катеніну призводить до активації Wnt/ β -катенінового сигнального шляху. У неонатальних мутантних кардіоміоцитах ми виявили зростання експресії генів-мішеней β -катеніну (*c-Myc*, *Axin2*, *Cyclin D1*, *Tcf-4*). А у міокарді дорослих мутантних мишей ми також виявили зростання вмісту активного β -катеніну, інгібованої GSK-3 β (фосфорильованої за Сер-9) та зниження вмісту Аксину-1 (основного компоненту деградувального комплексу). Аналіз експресії генів мішеней канонічного WNT- сигналіngu (*c-Myc* та *c-Fos*) також

вказує на активацію Wnt/ β -катенінового сигнального шляху у дорослому серці з гетеро- та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. Отримані дані свідчать про руйнування деградувального комплексу β -катеніну, його вивільнення та послідууючу активацію за умов як повної так і часткової делеції α -Е-катеніну.

Згідно літературних даних, активація сигнальної функції β -катеніну у кардіоміоцитах із делецією α -Е-катеніну може відбуватись принаймні за трьома шляхами: 1) Υ ар стимулює фосфорилування GSK-3 β через IGF1R/Pi3K/Akt-сигнальний шлях, що призводить до зростання рівня активного β -катеніну в цитоплазмі (рис. 4.1.); 2) делеція α -Е-катеніну призводить до дестабілізації деградувального комплексу та вивільнення β -катеніну із нього; 3) відсутність або знижений рівень α -Е-катеніну не перешкоджає утворенню потрібного комплексу β -катенін/LEF-TCF/ДНК [48,32,165] та послідууючій активації генів мішеней β -катеніну. Таким чином, α -Е-катенін модулює активність Wnt/ β -катенінового сигнального шляху або безпосередньо, або опосередковано, через HIPPO-сигнальний шлях і діє як супресор канонічного Wnt-сигналіngu.

Вочевидь, підвищення сигнальної активності двох принципових регуляторів проліферації та гіпертрофії, β -катеніну та Υ ар і є першопричиною розвитку описаного нами фенотипу, погіршення функції міокарду, серцевої недостатності та летальності мутантних тварин. Аналіз неонатальних кардіоміоцитів із частковою та повною втратою α -Е-катеніну підтверджує наше припущення. Дійсно, у таких клітинах ми спостерігали активацію канонічного WNT-сигнального шляху та Υ ар, що супроводжувалась порушеннями контролю клітинного циклу неонатальних кардіоміоцитів. А саме, зниження кількості двоядерних неонатальних кардіоміоцитів у серцях мутантних мишенят, зростання рівня їхньої проліферації свідчить про порушення дозрівання серця, пригнічення термінальної диференціації клітин та перемикання кардіоміоцитів на дорослу

генетичну програму. Такі зміни неонатального міокарду можуть прогресувати із віком до серцевої недостатності. Наші спостереження узгоджуються із опублікованими даними, де авторами із застосуванням подвійного нокауту α -E-катеніну та α -T-катеніну було показано підвищення транскрипційної активності *Yap*, що супроводжувалась гіперпроліферацією неонатальних кардіоміоцитів, зменшенням їхнього розміру та гіперплазією неонатального серця мутантних мишей [88].

Дані отримані у відділі раніше, при вивченні структурної функції α -E-катеніну у кардіогенезі, також свідчать на користь нашого припущення про критичну роль саме сигнальної функції α -E-катеніну [125]. Оскільки, у згаданій роботі не спостерігали ембріональної летальності, морфологічних вад ембріону та серця. А рівень експресії N-кадгерину свідчив про нормальну організацію адгеринових з'єднань які у свою чергу підтримувались за рахунок компенсаторної функції α -T-катеніну, експресія якого у мутантних ембріональних серцях зростала [125]. Варто також зауважити, що підвищення активності канонічного Wnt- та *Yap* у тварин із гетерозиготною делецією α -E-катеніну та розвиток у цих мишей фенотипу подібного до такого у мишей із повним нокаутом досліджуваного гену також свідчить на користь нашого припущення. Оскільки у серцях мишей із гетерозиготним нокаутом α -E-катеніну ми все ж таки спостерігали знижений вміст цього білка (Розділ 2.2, рис. 2.2), що свідчить про його потенційну участь і у формуванні комплексів міжклітинної адгезії. Тож, основним рушійним фактором у розвитку описаної патології є порушення саме сигнальної функції α -E-катеніну. До того ж, на противагу згаданій роботі із застосуванням подвійного нокауту α -E-катеніну та α -T-катеніну [88] наша робота та дослідження Півень та інш. [125] підтверджують принципову сигнальну функцію саме α -E-катеніну.

Тож, делеція α -E-катеніну призводить зменшення його супресорної функції у -контролюванні активності канонічного WNT- та *Yap*-сигналінгів,

спричиняє молекулярно-генетичні порушення ще у неонатальному серці та призводить до патологічних перебудов міокарду, серцевої недостатності, і як наслідок – загибелі мишей.

Серцева недостатність – комплексний синдром, який характеризується ремоделюванням міокарду (фіброз), запаленням, змінами в кардіогемодинаміці, електрофізіології та метаболізмі [22]. Розвиток усіх вище вказаних патологічних змін відбувається внаслідок комплексних молекулярних порушень. Відомо, що Hippo-, Wnt/ β -катеніновий-, Pi3K/Akt- та MAPK-сигнальні шляхи залучаються до росту та проліферації клітин і мають регуляторні перехрести один з одним. І що важливо, всі ці каскади разом або окремо залучаються до розвитку серцевої недостатності [12,83].

При проведенні детального молекулярно-біологічного аналізу дорослих сердець із кардіоспецифічною гетеро- та гомозиготною делецією α -E-катеніну ми спостерігали зростання фосфорильовання Akt за Сер 473, що свідчить про активацію Akt-сигналіну. Проте, рівень фосфорильовання останнього за Тре 308 знижувався, що дає нам змогу припустити, що активація Akt, у описаній нами моделі, відбувається через mTORC2 [167,23]. З одного боку, наші дані свідчать про молекулярно-біологічні порушення типові для гіпертрофії та серцевої недостатності – а саме, активацію Pi3K/Akt-сигнального каскаду. З іншого боку – про порушення окислення жирних кислот, внаслідок пригнічення експресії PPAR α , оскільки останній є мішенню Akt [28]. Однак, варто зауважити, що пригнічення експресії PPAR α відбувається і внаслідок активації канонічного WNT-сигнального шляху, а саме через одну з його мішеней – c-Myc [6] (рис 4.1.). У своїй роботі, ми спостерігали зниження вмісту PPAR α у серцях мишей із делецією α -E-катеніну. Варто зауважити, що PPAR α є транскрипційним фактором, який активує експресію генів залучених до катаболізму ліпідів. Зниження рівня PPAR α свідчить про пригнічення β -окислення жирних кислот, що підтверджується зниженням кількості фосфорильованої AMPK та її субстратів: ACC та HSL у серцях мутантних мишей.

АМРК – ключовий сенсор енергетичного стану клітини, а також активується при ішемії міокарда [132]. Відомо, що активація АМРК інгібує біосинтез білка та таким чином пригнічує розвиток гіпертрофії серця [40]. У нашій роботі, у серцях мутантних мишей ми виявили, що не зважаючи на зростання вмісту тотальної АМРК рівень її фосфорилування за Тре 172 знижувався, що свідчить про інгібування її активності. Цікаво, що отримані нами дані аналізу рівня фосфорилування АМРК узгоджуються із підвищенням активності Акт у мутантних мишей [63].

Окрім того, ми виявили зниження фосфорилування гормон-чутливої ліпази (HSL) за Сер 563 та Сер 565, що свідчить про пригнічення її ферментативної активності. Відомо, що HSL каталізує перший та другий етапи катаболізму ліпідів, а саме – гідроліз три- та диацилгліцеролів та є лімітуючим ферментом у ліполізі [170,7]. Ймовірно, зниження активності HSL є наслідком зниження вмісту фосфорильованої РКА у серцях мутантних мишей, відомо, що остання здійснює фосфорилування HSL саме за Сер 563 [61]. Зниження вмісту фосфорильованої HSL за Сер 565 узгоджується із зниженим рівнем фосфорильованої АМРК [46]. Рівень активності іншої мішень АМРК – ацетил-СоА карбоксилази (АСС), також також знижувався у серцях мишей із нокаутом α -Е-катеніну. АСС – ключовий регулятор транспорту жирних кислот до мітохондрій. Її продукт малоніл-СоА інгібує карнітин ацилтрансферазу, яка здійснює транспорт жирних кислот до мітохондрій [62,41].

Усі ці дані свідчать про пригнічення β -окислення жирних кислот у міокарді мишей із кардіоспецифічною делецією α -Е-катеніну та підтверджуються даним гістохімічного аналізу міокарда, де ми виявили накопичення нейтральних жирів у кардіоміоцитах дорослих мишей з частковою та повною втратою α -Е-катеніну. Варто зауважити, що накопичення нейтральних жирів не є характерною ознакою для серцевої недостатності і частіше спостерігається у пацієнтів із діабетом та/або метаболічним синдромом [142,101], оскільки у своїй роботі ми застосовували

мишей які не мали описаних патологій, ми схильні вважати, що такі порушення метаболізму жирних кислот є наслідком саме нокауту α -Е-катеніну та пригнічення його сигнальної функції (рис.4.1.).

У своїй роботі ми виявили також і зміни в активності MAPK-сигнального шляху. У серцях мишей із гетерозиготним нокаутом α -Е-катеніну рівень фосфорилування Erk1/2 знижувався, а у серцях із гомозиготним нокаутом α -Е-катеніну – зростав порівняно із контролем. Варто зауважити, що цей сигнальний каскад має важливе значення у розвитку серцевих патологій і активується та/або пригнічується у відповідь на вплив цілої низки патологічних факторів [56]. Проте, як зниження, так і зростання активності Erk1/2 призводить до патології серця [138]. Цікаво, що активацію MEK1/Erk1/2 каскаду при делеції α -Е-катеніну було показано у клітинах шкіри, навіть більше, автори спостерігали гіперпроліферацію таких кератиноцитів, але при цьому автори не спостерігали порушення міжклітинної адгезії [157]. Ці дані підтверджують наші спостереження, що α -Е-катенін є одним з важливих модуляторів клітинного циклу, проліферації саме через його сигнально-регуляторну функцію.

Проте, молекулярні механізми взаємодії α -Е-катеніну із Erk1/2 наразі не зрозумілі, але можливі два гіпотетичних механізми: 1) безпосередньо через взаємодію з α -Е-катеніном та 2) через канонічний WNT-сигнальний шлях. Можливість регуляції MAPK каскаду WNT-сигнальним шляхом нещодавно була показана [87], а активацію WNT/ β -катенінового сигналіну ми спостерігали у серцях мишей із нокаутом α -Е-катеніну. Подальші дослідження встановили, активація Erk1/2 у клітинах із активним канонічним WNT-сигнальним шляхом є Raf-1 залежною [119,173], а активність Raf-1 регулюється взаємодією із білком 14-3-3, і ця взаємодія може мати протилежні функціональні ефекти в залежності від сайту зв'язування [153,95,33]. Таким чином α -Е-катенін може залучатись до регуляції взаємодії Raf-1 із 14-3-3, а різний вміст α -Е-катеніну може змінювати специфічність білка 14-3-3 до Raf-1.

Як вже зазначалось вище, гетеро- і гомозиготний нокаут α -Е-катеніну негативно впливав на гемодинамічну функцію дорослого міокарду, а саме ми спостерігали порушення насосної, систолічної та діастолічної функції серця. Також, виявилось, що делеція α -Е-катеніну асоційована із нездатністю кардіоміоцитів адаптуватись до фізичних навантажень та зниженням їхньої здатності розслаблюватись після скорочень. Ми також уже зазначали що, у серцях тварин з делецією α -Е-катеніну ми спостерігали зниження активності РКА. Відомо, що РКА регулює каталітичну активність HSL, однак, окрім того РКА фосфорилує саркомерні білки міокарду, включаючи тітин [44,86]. Тітин критично необхідний для скорочення кардіоміоцитів, і зниження рівня його фосфорилування за рахунок пригнічення активності РКА призводить до послаблення скоротливості мутантних кардіоміоцитів [12] (рис 4.1).

Таким чином, нами було детально охарактеризовано функцію α -Е-катеніну у міокарді, показано що цей білок не лише важливий компонент міжклітинної адгезії, а й модулятор сигнально-регуляторних каскадів. Так, ембріональна кардіоспецифічна гетеро- та гомозиготна делеція α -Е-катеніну спричиняє молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні патерни змін, що призводять до розвитку серцевої недостатності. Нокаут α -Е-катеніну спричиняє вивільнення γ ар та β -катеніну із цитоплазматичних “пасток” та активацію їхньої транскрипційної функції. Активні γ ар та β -катенін здатні синергічно активувати Pi3K/Akt-сигнальний шлях (рис 4.1). Канонічний Wnt-сигнальний шлях призводить до розвитку гіпертрофії серця не лише через власні мішені (інгібує β -окислення жирних кислот через c-Myc [6]), а й через MAPK-сигналінг [20,87] (рис. 4.1). Таким чином делеція α -Е-катеніну запускає каскад молекулярних змін, а саме, порушення функціонування сигнальних каскадів необхідних для здорового функціонування серця (Pi3K/Akt, MEK1-Erk1/2, cAMP/РКА, PPAR α , and AMPK), що у свою чергу спричиняє зростання маси серця, запалення, фіброзу, ішемічного ушкодження кардіоміоцитів, погіршення функції серця, та призводить до серцевої недостатності і передчасної летальності.

ВИСНОВКИ

α -Е-катенін є супресором сигнальної активності γ ар 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 γ ар. 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 γ ар 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 PI3K/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 -E-катеніну спричиняє підвищення проліферативної активності неонатальних кардіоміоцитів та затримку їхньої термінальної диференціації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Пальчевська ОЛ, Балацький ВВ, Мацевич ЛЛ, Півень ОО, Лукаш ЛЛ.* Сигнальна функція β -катеніну при адаптації дорослого міокарда ссавців до фізичних навантажень. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015.Vol. 16. P. 225–9.
2. *Півень ОО.* Важливість сигнальної функції β -катеніну на початкових стадіях розвитку патологічної гіпертрофії дорослого серця. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2016.Vol. 14. №1. P. 44–51.
3. *Abe K, Takeichi M.* EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. Proc Natl Acad Sci. 2008.Vol. 105. №1. P. 13–9.
4. *Abe K, Chisaka O, van Roy F, Takeichi M.* Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by α N-catenin. Nat Neurosci. 2004.Vol. 7. №4. P. 357–63.
5. *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. 1997.Vol. 100. №1. P. 169–79.
6. *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.

7. *Anthonsen MW, Rönstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C.* Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem.* 1998.Vol. 273. №1. P. 215–21.
8. *Armstrong S, Ganote CE.* Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of glycolytic blockade, phorbol esters, and ischaemia. *Cardiovasc Res.* 1994.Vol. 28. №11. P. 1700–6.
9. *Bajpai S, Correia J, Feng Y, Figueiredo J, Sun SX, Longmore GD, et al.* {alpha}-Catenin mediates initial E-cadherin-dependent cell-cell recognition and subsequent bond strengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008.Vol. 105. №47. P. 18331–6.
10. *Barry AK, Tabdili H, Muhamed I, Wu J, Shashikanth N, Gomez GA, et al.* - Catenin cytomechanics - role in cadherin-dependent adhesion and mechanotransduction. *J Cell Sci.* 2014.Vol. 127. №8. P. 1779–91.
11. *Barry ER, Camargo FD.* The Hippo superhighway: signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development. *Curr Opin Cell Biol.* 2013.Vol. 25. №2. P. 247–53.
12. *Barry SP, Davidson SM, Townsend PA.* Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008.Vol. 40. №10. P. 2023–39.
13. *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.* 2007.Vol. 100. №9. P. 1353–62.
14. *Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh TC, Millhorn DE.* Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells. *Cell Signal.* 2001.Vol. 13. №1. P. 23–7.
15. *Benjamin JM, Kwiatkowski A V., Yang C, Korobova F, Pokutta S, Svitkina T, et al.* α E-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-

- mediated cell–cell adhesion. *J Cell Biol.* 2010.Vol. 189. №2.
16. *Bergmann MW.* WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development. *Circ Res.* 2010.Vol. 107. №10. P. 1198–208.
 17. *Bland JM, Altman DG.* Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *BMJ.* 1998.Vol. 317. №7172.
 18. *Borghi N, Sorokina M, Shcherbakova OG, Weis WI, Pruitt BL, Nelson WJ, et al.* E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proc Natl Acad Sci.* 2012.Vol. 109. №31. P. 12568–73.
 19. *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.* 2008.Vol. 51. №22. P. 2184–92.
 20. *Brade T, Männer J, Köhl 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.
 21. *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.
 22. *Breckenridge R.* Heart failure and mouse models. *Dis Model Mech.* 2010.Vol. 3. №3–4. P. 138–43.
 23. *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.* 2009.Vol. 8. №4. P. 742–53.

24. *C. N, Varela-Nallar L.* Wnt Signaling Roles on the Structure and Function of the Central Synapses: Involvement in Alzheimer's Disease. In: Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision. InTech; 2013.
25. *Cadigan KM, Nusse R.* Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997.Vol. 11. №24. P. 3286–305.
26. *Cavey M, Rauzi M, Lenne P-F, Lecuit T.* A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature.* 2008.Vol. 453. №7196. P. 751–6.
27. *Cerrone M, Delmar M.* Desmosomes and the sodium channel complex: Implications for arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome. *Trends Cardiovasc Med.* 2014.Vol. 24. №5. P. 184–90.
28. *Chaanine AH, Hajjar RJ.* AKT signalling in the failing heart. *Eur J Heart Fail.* 2011.Vol. 13. №8. P. 825–9.
29. *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.* 1998.Vol. 10. №125. P. 1943–9.
30. *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.
31. *Choi H-J, Pokutta S, Cadwell GW, Bobkov A a, Bankston L a, Liddington RC, et al.* α E-catenin is an autoinhibited molecule that coactivates vinculin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012.Vol. 109. №22. P. 8576–81.
32. *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.* 2013.Vol. 27. №22. P. 2473–88.
33. *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.
34. *Clevers H.* Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006.Vol. 127. №3. P. 469–80.
35. *Cohen ED, Tian Y, Morrisey EE.* Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development.* 2008.Vol. 135. №5. P. 789–98.
36. *Costa P, Parsons M.* New Insights into the Dynamics of Cell Adhesions. In: *International review of cell and molecular biology.* 2010. p. 57–91.
37. *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.* 2012.Vol. 60. №5. P. 416–21.
38. *Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI.* Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell.* 2005.Vol. 123. №5. P. 903–15.
39. *Duval C, Fruchart JC, Staels B.* PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2004.Vol. 97. №6. P. 665–72.
40. *Dyck JRB, Lopaschuk GD.* AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol.* 2006.Vol. 574. №1. P. 95–112.
41. *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.* 1999.Vol. 262. №1. P. 184–90.
42. *Folmsbee SS, Budinger GRS, Bryce PJ, Gottardi CJ.* The cardiomyocyte protein α T-catenin contributes to asthma through regulating pulmonary vein inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2016.Vol. 138. №1. P. 123–129.e2.

43. *Fu V, Plouffe SW, Guan K-L.* The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. *Curr Opin Cell Biol.* 2017.Vol. 49 P. 99–107.
44. *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.* 2005.Vol. 125. №3. P. 257–71.
45. *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.* 2011.Vol. 16. №1. P. 23–34.
46. *GARTON AJ, CAMPBELL DG, CARLING D, HARDIE DG, COLBRAN RJ, YEAMAN SJ.* Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem.* 1989.Vol. 179. №1. P. 249–54.
47. *Giannini A, Mazor M, Orme M, Vivanco M, Waxman J, Kypta R.* Nuclear export of α -catenin: overlap between nuclear export signal sequences and the β -catenin binding site. *Exp Cell Res.* 2004.Vol. 295. №1. P. 150–60.
48. *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.* 2000.Vol. 275. №29. P. 21883–8.
49. *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.* 2000.Vol. 255. №2. P. 207–20.
50. *Goossens S, Janssens B, Vanpoucke G, De Rycke R, van Hengel J, van Roy F.* Truncated isoform of mouse α T-catenin is testis-restricted in expression and function. *FASEB J.* 2007.Vol. 21. №3. P. 647–55.
51. *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.* 2012.Vol. 20. №12. P. 1295–9.

52. *Hansen SD, Kwiatkowski A V., Ouyang C-Y, Liu H, Pokutta S, Watkins SC, et al.* E-catenin actin-binding domain alters actin filament conformation and regulates binding of nucleation and disassembly factors. *Mol Biol Cell.* 2013.Vol. 24. №23. P. 3710–20.
53. *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.* 2017.Vol. 10. №3. P. 259–70.
54. *He Huang XH.* Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol.* 2009.Vol. 20. №2. P. 119–25.
55. *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-).* 2012.Vol. 332. №6028. P. 458–61.
56. *Heineke J, Molkentin JD.* Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006.Vol. 7. №8. P. 589–600.
57. *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.* 2013.Vol. 34. №3. P. 201–10.
58. *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.* 1991.Vol. 88. №20. P. 9156–60.
59. *Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, Hirohashi S, Takeichi M.* Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell.* 1992.Vol. 70. №2. P. 293–301.
60. *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.* 2010.Vol. 105. №5. P. 597–608.
61. *Holm C, Østerlund T, Laurell H, Contreras JA.* Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr.* 2000.Vol. 20. №1. P. 365–93.
62. *Hoppel CL.* Carnitine and carnitine palmitoyltransferase in fatty acid oxidation and ketosis. *Fed Proc.* 1982.Vol. 41. №12. P. 2853–7.
63. *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.* 2006.Vol. 281. №9. P. 5335–40.
64. *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.* 2016.Vol. 9. №6.
65. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/ru/. No Title.
66. *Hulpiau P, Gul IS, van Roy F.* New insights into the evolution of metazoan cadherins and catenins. 1st ed. Vol. 116, *Progress in molecular biology and translational science.* Elsevier Inc.; 2013. 71-94 p.
67. *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.* 2005.Vol. 280. №13. P. 12758–65.
68. *Imamura Y, Itoh M, Maeno Y, Tsukita S, Nagafuchi a.* Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol.* 1999.Vol. 144. №6. P. 1311–22.

69. *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.* 2008.Vol. 7. №6. P. 1386–97.
70. *Ishiyama N, Tanaka N, Abe K, Yang YJ, Abbas YM, Umitsu M, et al.* An autoinhibited structure of α -catenin and its implications for vinculin recruitment to adherens junctions. *J Biol Chem.* 2013.Vol. 288. №22. P. 15913–25.
71. *Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S.* Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol.* 1997.Vol. 138. №1. P. 181–92.
72. *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.* 2001.Vol. 114. №Pt 17. P. 3177–88.
73. *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.* 2003.Vol. 112. №3. P. 227–36.
74. *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.* 2011.Vol. 103. №3. P. 445–51.
75. *Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, MARRS JA.* Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995.Vol. 92. №11. P. 5067–71.
76. *Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S.* Morphological and Molecular Characterization of Adult Cardiomyocyte Apoptosis During Hypoxia and Reoxygenation. *Circ Res.* 2000.Vol. 87. №2.

77. *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*. 1987.Vol. 76. №6. P. 1422–36.
78. *Kato M, Katoh M.* WNT antagonist, DKK2, is a Notch signaling target in intestinal stem cells: augmentation of a negative regulation system for canonical WNT signaling pathway by the Notch-DKK2 signaling loop in primates. *Int J Mol Med*. 2007.Vol. 19. №1. P. 197–201.
79. *Kaushik G, Spencehauer A, Sessions AO, Trujillo AS, Fuhrmann A, Fu Z, et al.* Vinculin network-mediated cytoskeletal remodeling regulates contractile function in the aging heart. *Sci Transl Med*. 2015.Vol. 7. №292. P. 292ra99-292ra99.
80. *Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ.* Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol*. 1995.Vol. 130. №1. P. 67–77.
81. *Kobielak A, Fuchs E.* Links between alpha-catenin, NF-kappaB, and squamous cell carcinoma in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006.Vol. 103. №7. P. 2322–7.
82. *Kobielak A, Pasolli HA, Fuchs E.* Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol*. 2004.Vol. 6. №1. P. 21–30.
83. *Kontaridis MI, Geladari E V., Geladari C V.* Pathways to myocardial hypertrophy. In: *Introduction to Translational Cardiovascular Research*. 2015. p. 167–86.
84. *Koslov ER, Maupin P, Pradhan D, Morrow JS, Rimm DL.* Alpha-catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with beta-catenin. *J Biol Chem*. 1997.Vol. 272. №43. P. 27301–6.

85. *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.* 2005.Vol. 96. №3. P. 346–54.
86. *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.
87. *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.
88. *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.
89. *Li J, Radice GL.* A new perspective on intercalated disc organization: implications for heart disease. *Dermatol Res Pract.* 2010.Vol. 2010 P. 207835.
90. *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.* 2012.Vol. 125. №Pt 4. P. 1058–67.
91. *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.* 2011.Vol. 31. №6. P. 1134–44.
92. *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.* 2016.Vol. 30. №7. P. 798–811.

93. *Lien W-H*. E-Catenin Controls Cerebral Cortical Size by Regulating the Hedgehog Signaling Pathway. *Science* (80-). 2006.Vol. 311. №5767. P. 1609–12.
94. *Lien W-H, Gelfand VI, Vasioukhin V*. α -E-catenin binds to dynamitin and regulates dynactin-mediated intracellular traffic. *J Cell Biol*. 2008.Vol. 183. №6. P. 989–97.
95. *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.
96. *Ljungberg O, Tibblin S*. Peroperative fat staining of frozen sections in primary hyperparathyroidism. *Am J Pathol*. 1979.Vol. 95. №3. P. 633–41.
97. *Lu M, Muers MR, Lu X*. Introducing STRaNDs: shuttling transcriptional regulators that are non-DNA binding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016.Vol. 17. №8. P. 523–32.
98. *Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M*. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol*. 1990.Vol. 111. №6 Pt 1. P. 2427–36.
99. *Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J*. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.
100. *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*. 2017.Vol. 8. №1. P. e2546–e2546.
101. *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*. 2009.Vol. 50. №11. P. 2314–23.

102. Marie H, Pratt SJ, Betson M, Epple H, Kittler JT, Meek L, et al. The LIM Protein Ajuba Is Recruited to Cadherin-dependent Cell Junctions through an Association with α -Catenin. *J Biol Chem*. 2003.Vol. 278. №2. P. 1220–8.
103. *MBInfo contributors*. Hpo Pathway Schematic. 2014.
104. Merdek KD, Nguyen NT, Toksoz D. Distinct activities of the alpha-catenin family, alpha-cadherin and alpha-catenin, on beta-catenin-mediated signaling. *Mol Cell Biol*. 2004.Vol. 24. №6. P. 2410–22.
105. Mexal S, Berger R, Pearce L, Barton A, Logel J, Adams CE, et al. Regulation of a novel alphaN-catenin splice variant in schizophrenic smokers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008.Vol. 147B. №6. P. 759–68.
106. 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*. 2008.Vol. 54. №4. P. 752–6.
107. Mui KL, Chen CS, Assoian RK. The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J Cell Sci*. 2016.Vol. 129. №6. P. 1093–100.
108. Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell*. 1991.Vol. 65. №5. P. 849–57.
109. Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest*. 1997.Vol. 100. №9. P. 2362–70.
110. 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*. 2010.Vol. 285. №45. P. 34932–8.

111. *Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ, et al.* Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci.* 1997.Vol. 110 (Pt 8. №8. P. 1013–22.
112. *Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K.* Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol.* 2011.Vol. 57. №2. P. 131–40.
113. *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.* 2009.Vol. 16. №3. P. 398–410.
114. *Obama H, Ozawa M.* Identification of the domain of alpha-catenin involved in its association with beta-catenin and plakoglobin (gamma-catenin). *J Biol Chem.* 1997.Vol. 272. №17. P. 11017–20.
115. *Olinde, M.D KD, O'Connell, M.D JB.* INFLAMMATORY HEART DISEASE: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment of Myocarditis. *Annu Rev Med.* 1994.Vol. 45. №1. P. 481–90.
116. *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.* 1989.Vol. 8. №6. P. 1711–7.
117. *Ozawa M, Ringwald M, Kemler R.* Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990.Vol. 87. №11. P. 4246–50.
118. *Ozawa M, Kemler R.* Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *J Cell Biol.* 1992.Vol. 116. №4. P. 989–96.
119. *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.* 2017.Vol. 13. №5. P. 830–40.
120. *Palchevska OL, Balatskii V V., Andrejeva a. O, Macewicz LL, Piven OO, Lukash LL.* Embryonically induced β -catenin haploinsufficiency attenuates postnatal heart development and causes violation of foetal genes program. *Biopolym Cell.* 2013.Vol. 29. №2. P. 124–30.
121. *Pan D.* The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell.* 2010.Vol. 19. №4. P. 491–505.
122. *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.* 2002.Vol. 92. №6. P. 2475–82.
123. *Peng X, Maiers JL, Choudhury D, Craig SW, DeMali K a.* α -Catenin uses a novel mechanism to activate vinculin. *J Biol Chem.* 2012.Vol. 287. №10. P. 7728–37.
124. *Piao H, Yuan Y, Wang M, Sun Y, Liang H, Ma L.* α -catenin acts as a tumour suppressor in E-cadherin-negative basal-like breast cancer by inhibiting NF- κ B signalling. *Nat Cell Biol.* 2014.Vol. 16. №3. P. 245–54.
125. *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).* 2011.Vol. 236. №7. P. 816–22.
126. *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.
127. *Pokutta S, Weis WI.* Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell.* 2000.Vol. 5. №3. P. 533–43.
128. *Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ, Weis WI.* Biochemical and

- Structural Definition of the 1-Afadin- and Actin-binding Sites of α -Catenin. *J Biol Chem.* 2002.Vol. 277. №21. P. 18868–74.
129. *Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science.* 2011.Vol. 331. №6020. P. 1078–80.
130. *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.* 2001.Vol. 276. №6. P. 4175–81.
131. *Puchtler H, Sweat F.* Histochemical specificity of staining methods for connective tissue fibers: Resorcin-fuchsin and van Gieson's picro-fuchsin. *Histochemie.* 1964.Vol. 4. №1. P. 24–34.
132. *Qi D, Young LH.* AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab.* 2015.Vol. 26. №8. P. 422–9.
133. *Rangarajan ES, Izard T.* The cytoskeletal protein α -catenin unfurls upon binding to vinculin. *J Biol Chem.* 2012.Vol. 287. №22. P. 18492–9.
134. *Rauskolb C, Sun S, Sun G, Pan Y, Irvine KD.* Cytoskeletal Tension Inhibits Hippo Signaling through an Ajuba-Warts Complex. *Cell.* 2014.Vol. 158. №1. P. 143–56.
135. *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.* 2012.Vol. 287. №15. P. 11751–60.
136. *Rimm DL, Kebriaei P, Morrow JS.* Molecular cloning reveals alternative splice forms of human alpha(E)-catenin. Vol. 203, *Biochemical and biophysical research communications.* 1994. p. 1691–9.

137. *Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS.* Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. 1995.Vol. 92. №19.
138. *Rose BA, Force T, Wang Y.* Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev.* 2010.Vol. 90. №4. P. 1507–46.
139. *Salminen A, Kaarniranta K.* AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev.* 2012.Vol. 11. №2. P. 230–41.
140. *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.* 2011.Vol. 144. №5. P. 782–95.
141. *Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.* NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012.Vol. 9. №7. P. 671–5.
142. *Schulze PC.* Myocardial lipid accumulation and lipotoxicity in heart failure. *J Lipid Res.* 2009.Vol. 50. №11. P. 2137–8.
143. *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.* 1997.Vol. 139. №4. P. 1033–46.
144. *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.
145. *Shtutman M, Chausovsky A, Prager-Khoutorsky M, Schiefermeier N, Boguslavsky S, Kam Z, et al.* Signaling function of α -catenin in microtubule regulation. *Cell Cycle.* 2008.Vol. 7. №15. P. 2377–83.

146. *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.* 2011.Vol. 4. №174. P. ra33-ra33.
147. *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.* 1998.Vol. 141. №6. P. 1433–48.
148. *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.* 2012.Vol. 32. №6. P. 1056–67.
149. *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.* 2013.Vol. 73. №6. P. 772–6.
150. *Tachibana K, Nakanishi H, Mandai K, Ozaki K, Ikeda W, Yamamoto Y, et al.* Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J Cell Biol.* 2000.Vol. 150. №5. P. 1161–76.
151. *Taguchi K, Ishiuchi T, Takeichi M.* Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *J Cell Biol.* 2011.Vol. 194. №4. P. 643–56.
152. *Thakur J, Prinja S, Garg CC, Mendis S, Menabde N.* Social and Economic Implications of Noncommunicable diseases in India. *Indian J Community Med.* 2011.Vol. 36. №Suppl 1. P. S13-22.
153. *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.* 1998.Vol. 18. №9. P. 5229–38.
154. *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.* 1997.Vol. 94. №3. P. 901–6.
155. *Troyanovsky RB, Klingelhöfer J, Troyanovsky SM.* α -Catenin contributes to the strength of E-cadherin-p120 interactions. *Mol Biol Cell.* 2011.Vol. 22. №22. P. 4247–55.
156. *Uchida N, Shimamura K, Miyatani S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al.* Mouse alpha N-catenin: two isoforms, specific expression in the nervous system, and chromosomal localization of the gene. *Dev Biol.* 1994.Vol. 163. №1. P. 75–85.
157. *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.* 2001.Vol. 104. №4. P. 605–17.
158. *Vermij SH, Abriel H, van Veen TAB.* Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc Res.* 2017.Vol. 113. №3. P. cvw259.
159. *Vite A, Radice GL.* N-cadherin/catenin complex as a master regulator of intercalated disc function. *Cell Commun Adhes.* 2014.Vol. 21. №3.
160. *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.
161. *Watabe-Uchida M, Uchida N, Imamura Y, Nagafuchi A, Fujimoto K, Uemura T, et al.* alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol.* 1998.Vol. 142. №3. P. 847–57.

162. *Weiss EE, Kroemker M, Rüdiger AH, Jockusch BM, Rüdiger M.* Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol.* 1998.Vol. 141. №3. P. 755–64.
163. *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.* 2016.Vol. 291. №30. P. 15687–99.
164. *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. 2017. P. 192.
165. *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.* 2011.Vol. 4. №196. P. ra70-ra70.
166. *Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ.* Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell.* 2005.Vol. 123. №5. P. 889–901.
167. *Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE.* A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep.* 2015.Vol. 12. №6. P. 937–43.
168. *Yang J, Dokurno P, Tonks NK, Barford D.* Crystal structure of the M-fragment of alpha-catenin: implications for modulation of cell adhesion. *EMBO J.* 2001.Vol. 20. №14. P. 3645–56.
169. *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.
170. *Yeaman SJ.* Hormone-sensitive lipase — A multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 1990.Vol. 1052. №1. P.

- 128–32.
171. *Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, Nagafuchi A, Shibata M.* alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol.* 2010.Vol. 12. №6. P. 533–42.
 172. *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.* 2009.Vol. 8. №3. P. 277–87.
 173. *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.* 2005.Vol. 118. №Pt 2. P. 313–22.
 174. *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.
 175. *Zhou Q, Li L, Zhao B, Guan K-L.* The Hippo Pathway in Heart Development, Regeneration, and Diseases. *Circ Res.* 2015.Vol. 116. №8. P. 1431–47.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. 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.
2. 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 дисетантом проведено аналіз виживаності тварин, морфометричний та гістологічних аналіз).
3. Балацький В. В. α -Е-катенін потенційний регулятор канонічного Wnt та NIPPO- 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).
4. 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).
5. 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 дроведено гістологічний аналіз та дослідження рівня білків).
6. 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).
 7. V. V. Balatskyi Alpha-E-catenin signaling function in cardiomyocytes prolaliferation/ **V. Balatskyi**, O. Palchevska, L. Macewicz, T. Ruban, O. Piven, L. Lukash 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 Hippo-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.

ДОДАТОК Б

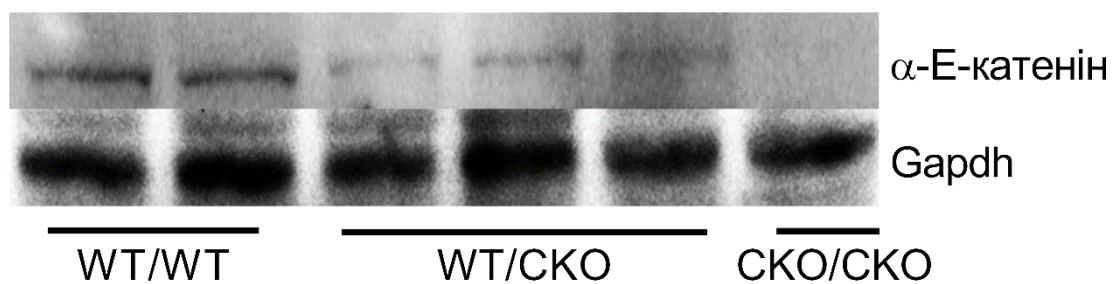
ТИПОВИЙ ТА ВЕСТЕРН-БЛОТ ЛІЗАТІВ СЕРДЕЦЬ ДЛЯ
ПЕРЕВІРКИ НАЯВНОСТІ α -Е-КАТЕНІНУ

Рис. Б1 Вестерн-блот лізатів сердець контрольних (WT/WT), із гетерозиготною (WT/SKO) та гомозиготною (SKO/SKO) делецією α -Е-катеніну

ДОДАТОК В

**ТИПОВИЙ АГАРОЗНИЙ ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗ РЕУЛЬАТИВ
ГЕНОТИПУВАННЯ МИШЕЙ**

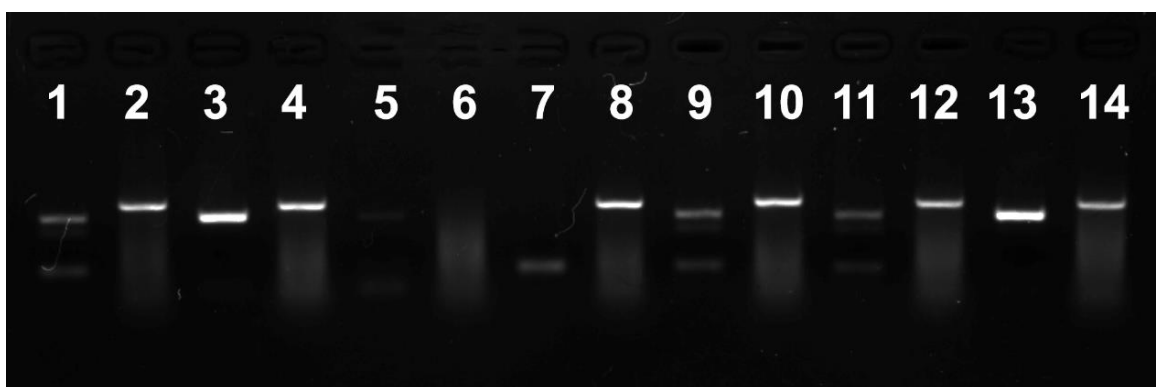


Рис. В1 Електрофореграма розділення продуктів ПЛР результатів генотипування на наявність франкованих алелів гена α -Е-катеніну та Cre-рекомбінази. 1 та 2, 3 та 4, 5 та 6, 7 та 8, 9 та 10, 11 та 12, 13 та 14 – результати ПЛР від окремих мишей відповідно. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – результати ПЛР на наявність LoxP-сайтів у гені α -Е-катеніну. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 – результати ПЛР на наявність α -MHC-Cre-рекомбінази у геномі. 7 – миші гомозиготні за геном α -Е-катеніну дикого типу; 1, 9, 11 – миші гетерозиготні за геном α -Е-катеніну, 3, 5, 13 – миші із гомозиготні за LoxP-сайтами у гені α -Е-катеніну. 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