

СИГНАЛЬНА ФУНКЦІЯ β -КАТЕНІНУ ПРИ АДАПТАЦІЇ ДОРОСЛОГО МІОКАРДА ССАВЦІВ ДО ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ

Дослідження сигнально-регуляторних механізмів, залучених до контролю роботи дорослого серця та адаптацій міокарда до стресових факторів, є надзвичайно актуальним, зважаючи на загальну статистику розповсюдження і смертності від захворювань серця. Щороку у світі від серцево-судинних захворювань помирає близько 9,4 мільйона людей. Серед них 51% людей гине від інсульту та 45% — від ішемічної хвороби серця [1]. Цілком очевидно, що розуміння основних рушійних сил, які контролюють реорганізацію міокарда та його регенерацію, має не лише фундаментальне загальнобіологічне значення, а й є підґрунтям для розвитку нових підходів до лікування хвороб серця. Суттєві реконструкції міокарда під час розвитку адаптивних змін серця при фізичних навантаженнях, старінні та відновленні відбуваються загалом за рахунок активації внутрішньоклітинних сигнально-регуляторних шляхів, до яких належить і канонічний Wnt-сигналінг [2]. Цей сигнально-регуляторний шлях відіграє важливу роль у кардіогенезі та формуванні фетального серця, однак після народження його сигнальна активність пригнічується до базального рівня і залишається такою в умовно здоровому серці. Основним медіатором канонічного Wnt-сигнального шляху є білок β -катенін, стабілізована форма якого, потрапляючи в ядро клітин, зв'язується з транскрипційними факторами TCF/LEF і активує гени-мішені. Серед генів-мішеней цього сигнального шляху є такі, які відіграють важливу роль у функціонуванні дорослого міокарда (гени гіпертрофічної відповіді, кадгерин, конексин 43, деякі протоонкогени та ін.) [2, 3].

Раніше нами показано, що повна втрата гена β -катеніну в ембріональному серці є летальною у пізньому ембріогенезі або ранньому післянатальному періоді розвитку [4]. Оскільки структурна функція β -катеніну була функціонально компенсована плакоглобіном, то ми припускаємо, що саме сигнальна функція досліджуваного нами білка є важливою на пізніх стадіях кардіогенезу та у новонародженому міокарді. Ціла низ-

ка експериментальних робіт також свідчить про важливість сигнальної функції β -катеніну при розвитку деяких патологій дорослого серця та при адаптації міокарда до стресових факторів [5, 6]. Відомо, що активація Wnt/ β -катенінового сигнального шляху необхідна для регенерації міокарда після інфаркту [7–10], а також при адаптації дорослого серця до гемодинамічного стресу [5, 6, 11–13]. Однак не існує одностайної думки вчених щодо участі канонічного Wnt-сигнального шляху та β -катеніну у цих процесах, оскільки дані, отримані різними групами авторів, є досить суперечливими. Так, показано, що для ефективної регенерації міокарда необхідною умовою є саме пригнічення сигнальної функції β -катеніну [7, 14]. Не існує одностайної думки і стосовно ролі сигнальної функції β -катеніну в розвитку гіпертрофічної відповіді. Експериментально було показано, що саме інгібування цього сигналіngu спричиняє розвиток патології [15].

Отже, сигнальна функція канонічного Wnt-шляху загалом та β -катеніну зокрема при адаптаціях дорослого міокарда до фізичних навантажень та/або інших стресових факторів потребує детальнішого вивчення. Саме тому у своїй роботі ми зосередили увагу на дослідженні динаміки активності канонічного Wnt-шляху та β -катеніну при адаптивних змінах дорослого серця, пов'язаних із фізичними навантаженнями. Ми дослідили зміни експресії генів гіпертрофічної відповіді та генів, що залучені до реалізації канонічного Wnt-сигналіngu, за умов індукованого дефіциту гена β -катеніну та у нормі при тривалому фізичному навантаженні. Для досягнення мети ми індукували ембріональну кардіоспецифічну делецію одного алеля гена β -катеніну з використанням умовно нокаутних та трансгенних тварин.

Матеріали і методи

Для отримання кардіоспецифічної делеції гена-мішені (β -катеніну) схрещували мишей, що експресують бактеріальну Cre-рекоміназу під

контролем промотора важкого ланцюга α -міозину ((α МНС)-Cre) і гетерозиготних за умовним нокаутом β -катеніну ((α МНС)-Cre; β -cat^{flox/wt}) із тваринами гомозиготними за умовним нокаутом β -катеніну (β -cat^{flox/flox}) [16]. Новонароджених тварин генотипували у віці 5–6 діб згідно зі стандартними протоколами.

Сигнальну функцію β -катеніну при адаптаціях тварин до фізичного навантаження досліджували із використанням самців мишей віком три місяці. Фізичне навантаження тварин моделювали із застосуванням плавального тесту за описаною та адаптованою методикою [17]. Для оцінки гіпертрофічної відповіді використовували індекс співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ). Сигнальну функцію β -катеніну при фізичному навантаженні міокарда досліджували у тварин із кардіоспецифічною делецією одного алеля гена β -катеніну та у дикотипних тварин.

Трансгенні тварини були люб'язно надані доктором Міхаелєм Шнайдером (Медичний коледж, Байлор, США). Тварини, гомозиготні за умовним нокаутом β -катеніну (β -catenin^{flox/flox}), були отримані із Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, USA).

Генотипування, виділення ДНК, виділення тотальної РНК, синтез кДНК, полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили згідно зі стандартними протоколами [18]. Для аналізу експресії генів із тканини ізольованого міокарда без передсердь виділяли тотальну РНК за допомогою UltraClean[®]Tissue & Cells RNA Isolation Kit (MO BIO) згідно з рекомендаціями виробника. Отриману РНК обробляли ДНКазою I та використовували для синтезу кДНК. Синтез кДНК здійснювали за допомогою First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) згідно з рекомендаціями виробника. Реакцію ПЛР у реальному часі проводили з використанням суміші Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific) на приладі iCycler single-color real-time PCR detection system (IQ5, BioRad). Аналізували зміни рівня експресії таких генів: *ANP*, *BNP*, *β -МНС*, *TCF-4* та *cMyc* [19].

Експресію генів представляли як ΔC_T , нормалізовану відносно референтного гена GAPDH. $\Delta\Delta C_T$ кожного цільового гена вираховували з середнього значення ΔC_T контрольної групи. Різницю в кількості між дослідом і контролем розраховували, використовуючи формулу $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету STATISTICA 8.0.

Результати та обговорення

Для дослідження сигнальної функції гена β -катеніну при адаптаціях дорослого міокарда до фізичних навантажень ми використали стандартний плавальний тест [17]. Самці мишей контрольної та дослідної (з делецією одного алеля гена β -катеніну) груп тварин отримували фізичні навантаження протягом 6 тижнів. Тривалість таких навантажень починалась із 5 хвилин плавання та поступово збільшувалася на 1,5 хвилини щоденно до досягнення 1 години тренування. Застосування такого методу дозволяло моделювати тривале фізичне навантаження, що призводило до розвитку фізіологічної гіпертрофії міокарда або атлетичного міокарда. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла (МС/МТ) тварин контрольної та дослідної груп, що отримували тривале тренування, та тварин, що не отримували фізичного навантаження, виявив достовірне збільшення індексу МС/МТ у обох груп мишей за умов фізичного тренування (рис. 1).

Про розвиток гіпертрофічної відповіді у тварин під впливом фізичних навантажень свідчить і аналіз зміни рівня експресії деяких генів — маркерів гапертрофії (рис. 2).

Однак варто зауважити, що у тварин дослідної групи з дефіцитом гена β -катеніну навіть за умов відсутності фізичного навантаження спо-

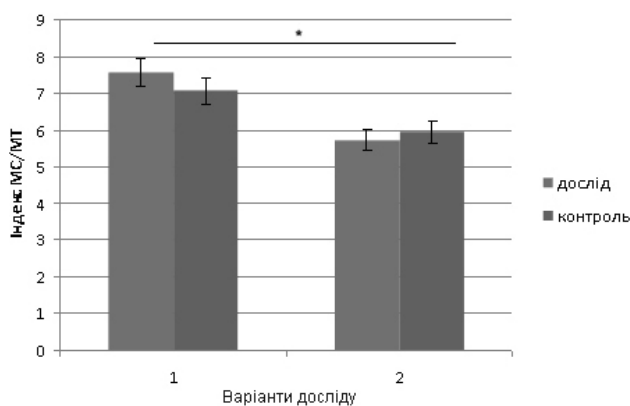


Рис. 1. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин, що отримували тривале фізичне навантаження (1), у порівнянні з тваринами, що не перебували під впливом фізичного стресу (2). Підвищення індексу МС/МТ свідчить про збільшення маси серця у тварин, що перебували під впливом фізичного стресу. Кількість тварин у групах — 7–18.

* $p = 0,07$

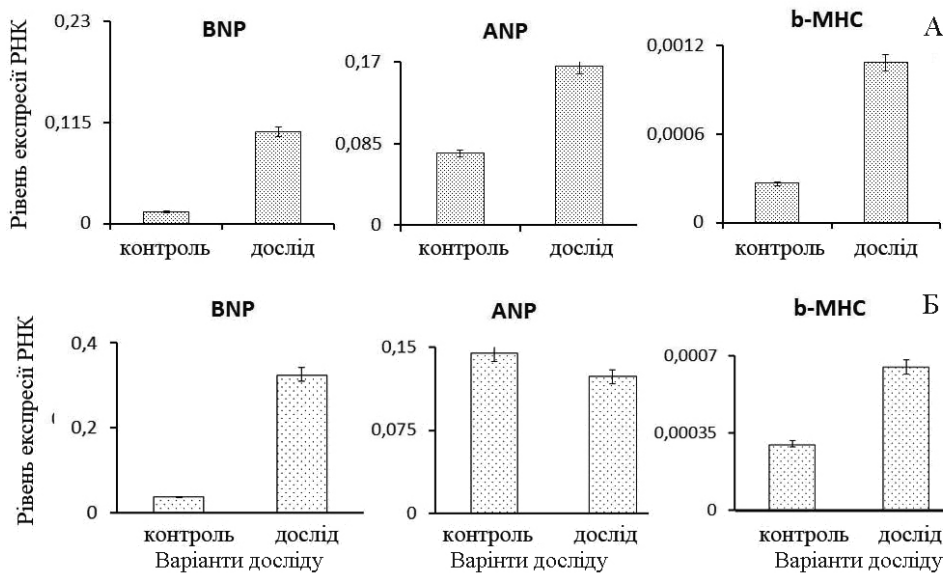


Рис. 2. Дослідження рівня експресії генів гіпертрофічної відповіді при тривалому фізичному навантаженні. Контроль — дикотипні самці; дослід — група тварин з ембріональною кардіоспецифічною делецією одного алеля гена β -катеніну. Кількість тварин у групах — 2–3

стерігалось підвищення рівня експресії нутріуретичних пептидів А- та В-типів та міозину ембріонального серця β -MHC (рис. 2, А). Ймовірно, дефіцит гена β -катеніну у тканині міокарда призводить до порушення експресії фетальних або гіпертрофічних генів навіть за нормальних умов утримання тварин (без впливу стресових факторів або навантажень). Цікаво також, що за умов тривалого фізичного стресу достовірно підвищувалась експресія гена *ANP* як у тварин контрольної групи, так і у тварин із дефіцитом гена β -катеніну у тканині міокарда. Ймовірно, саме нутріуретичний пептид типу А залучений до фізіологічної гіпертрофії більшою мірою, ніж *BNP*.

Для з'ясування участі канонічного Wnt-сигналіну та β -катеніну в адаптаціях дорослого міокарда до фізичних навантажень ми проаналізували зміни рівня експресії гена *TCF-4* — транскрипційного ко-активатора канонічного Wnt-сигналіну та одного з генів-мішеней β -катеніну — *c-тус*. Результати аналізу виявили, що при тривалому фізичному навантаженні у дослідних тварин спостерігали підвищення рівня експресії генів *TCF-4* та *c-тус* у тканині міокарда (рис. 3).

Відомо, що адаптація дорослого міокарда до фізичних навантажень та інших стресових чинників відбувається за рахунок гіпертрофічного росту кардіоміоцитів. Отримані нами дані свід-

чать про те, що сигнальна функція β -катеніну є важливою умовою ефективної адаптації дорослого серця до тривалих фізичних навантажень. Цікаво, що у дослідній групі тварин з дефіцитом гена β -катеніну спостерігалась вища активність канонічного Wnt/ β -катенінового сигналіну. Тож сигнальна функція β -катеніну в адаптивних змінах дорослого міокарда потребує детальнішого дослідження.

Висновки

У результаті проведеної роботи було показано, що дефіцит гена β -катеніну призводить до порушення експресії фетальних (гіпертрофіч-

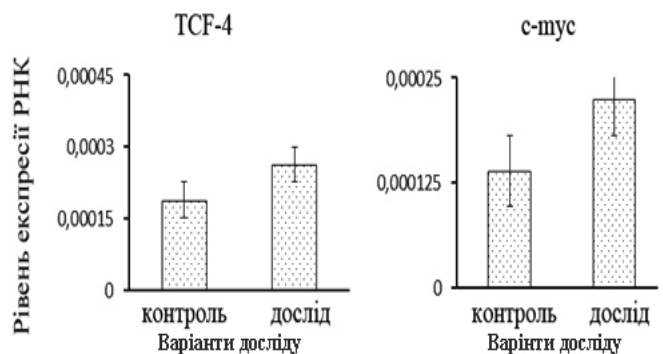


Рис. 3. Дослідження рівня активності канонічного Wnt-сигналіну при тривалому фізичному навантаженні: контроль — дикотипні самці; дослід — група тварин з ембріональною кардіоспецифічною делецією одного алеля гена β -катеніну. Кількість тварин в групах — 2–3

них) генів навіть за умов відсутності стресу. Було виявлено активацію канонічного Wnt-сигналіngu при адаптації дорослого міокарда до тривалого

фізичного навантаження, що свідчить про важливість сигнальної функції β -катеніну при адаптації дорослого міокарда до стресових чинників.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сердечно-сосудистые заболевания [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/ru/.
2. Deb A. Cell-cell interaction in the heart via Wnt/ β -catenin pathway after cardiac injury // *Cardiovasc. Res.*— 2014.— N 102.— P. 214–223.
3. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease // *Cell.*— 2006.— 127, N 3.— P. 470–480.
4. Piven O., Kostetskii I., Macewicz L., Kolomijec Y., Radice G., Lukash L. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development // *Exp. Biol. Med.*— 2011.— N 6.— P. 1–7.
5. Malekar P., Hagenmueller M., Anyanwu A., Buss S., Streit M.R., Weiss C.S., Wolf D., Riffel J., Bauer A., Katus H.A., Hardt S.E. Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling // *Hypertension.*— 2010.— N 55.— P. 939–945.
6. Brade T., Manner J., Kuhl M. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodeling in the mature heart // *Cardiovasc. Res.*— 2006.— N 2006.— P. 198–209.
7. Barandon L., Couffignal T., Ezan J., Dufourcq P., Costet P., Alzieu P., Leroux L., Moreau C., Dare D., Duplaa C. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA // *Circulation.*— 2003.— 108, N 18.— P. 2282–2289.
8. Hahn J.Y., Cho H.J., Bae J.W., Yuk H.S., Kim K.I., Park K.W., Koo B.K., Chae I.H., Shin C.S., Oh B.H., Choi Y.S., Park Y.B., Kim H.S. β -Catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts // *J. Bio. Chem.*— 2006.— 281, N 41.— P. 30979–30989.
9. Duan J., Gherghe C., Liu D., Hamlett E., Srikantha L., Rodgers L., Regan J.N., Rojas M., Willis M., Leask A., Majesky M., Deb A. Wnt1/ β catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair // *EMBO J.*— 2011.— 31, N 2.— P. 429–442.
10. Oerlemans M.I., Goumans J., van Middelaar B., Clevers H., Doevendans P.A., Sluijter J.P. Active Wnt signaling in response to cardiac injury // *Bsic. Res. Cardiol.*— 2010.— 105, N 5 — P. 631–641.
11. Sugden P.H., Fuller S.J., Weiss S.C., Clerk A. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signaling and a therapeutic target? A critical analysis // *Brit. J. Pharmac.*— 2008.— N 153.— P. 137–153.
12. Chen X., Shevtsov S.P., Hsieh E., Cui L., Haq S., Aronovitz M., Kerkela R., Molkentin J.D., Liao R., Salomon R.N., Petten R., Force T. The β -catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress induced cardiac hypertrophy // *Mol. Cell. Biol.*— 2006.— 26, N 12.— P. 4462–4473.
13. Qu J., Zhou J., Yi X.P., Dong B., Zheng H., Miller L.M., Wang X., Schneider M.D., Li F. Cardiac-specific haploinsufficiency of β -catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction // *J. Mol. Cell. Cardiol.*— 2007.— 43, N 3.— P. 319–326.
14. Zelarayan L.C., Noack C., Sekkali B., Kmecova J., Gehrke C., Renger A., Zafiriou M.P., van der Nagel R., Dietz R., de Windt L.J., Balligand J.L., Bergmann M.W. β -Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2008.— 105, N 50.— P. 19762–19767.
15. Baurand A., Zelarayan L., Betney R., Gehrke C., Dunger S., Noack C., Busjahn A., Huelsken J., Taketo M.M., Birchmeier W., Dietz R., Bergmann M.W. β -Catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling // *Circ. Res.*— 2007.— 100, N 9.— P. 1353–1362.
16. Agah R., Frenkel P.A., French B.A., Michael L.H., Overbeek P.A., Schneider M.D. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle *in vivo* // *J. Clin. Invest.*— 1997.— 100.— P. 169–179.
17. Evangelista F.S., Brum P.C., Krieger J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice // *Braz. J. Med. Biol. Res.*— 2003.— 36, N 12.— P. 1751–1759.
18. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
19. Li J., Swope D., Raess N., Cheng L., Muller E.J., Radice G.L. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of β -catenin signaling // *Mol. Cell. Biol.*— 2011.— 31, N 6.— P. 134–144.

PALCHEVSKA O.L., BALATSKYY V.V., MACEWICZ L.L., PIVEN O.O., LUKASH L.L.

*Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua*

SIGNALING FUNCTION OF β-CATENIN DURING ADULT MYOCARDIUM ADAPTATION TO PHYSICAL TRAINING

Aims. Our current work is devoted to the adaptation of the myocardium of wild-type and animals with embryonic cardiospecific haploinsufficiency of β-catenin to physical training, namely swimming. **Methods.** Transgenic and wild-type animals were subjected to swimming test. The qPCR analysis of hypertrophic (*ANP*, *BNP*, *β-MHC* and *α-MHC*) and Wnt/β-catenin pathway target genes (*TCF4* and *c-myc*) was performed for control and trained mice. The HW/BW index was calculated to estimate myocardium hypertrophy development. **Results.** The increase of HW/BW index for trained animals was shown. The increase of hypertrophic genes (*ANP*, *BNP*, *β-MHC*, and *α-MHC*) were detected in both trained and control animals with β-catenin gene haploinsufficiency. It is also important to note that Wnt target genes were upregulated only in the β-catenin haploinsufficient stressed animals. **Conclusions.** The results show that β-catenin gene deficiency leads to fetal (hypertrophic) genes violation even for unstressed animals. The activation of Wnt-signaling pathway was detected during adult myocardium adaptation to physical stress. These observations point to the conclusion that β-catenin gene function plays important role in the heart adaptation and remodeling during stress.

Keywords: physiological cardiac hypertrophy, β-catenin haploinsufficiency, canonical Wnt signaling, heart adaptation, physical training.