

**ПАЛЬЧЕВСЬКА О.Л.<sup>1</sup>, ХАЗЄЄВА А.А.<sup>2</sup>, БАЛАЦЬКИЙ В.В.<sup>1</sup>, РУБАН Т.А.<sup>1</sup>, МАЦЕВИЧ Л.Л.<sup>1</sup>, ПІВЕНЬ О.О.<sup>1</sup>✉**

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

<sup>2</sup> Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, Україна, 61022, м. Харків, пл. Свободи, 4

✉ o.o.piven@imbg.org.ua

**ГЕТЕРОЗИГОТНА ДЕЛЕЦІЯ ГЕНА  $\beta$ -КАТЕНІНУ У РАНЬОМУ КАРДІОГЕНЕЗІ СПРИЧИНЯЄ ЗАТРИМКУ РОСТУ СЕРЦЯ І ПОРУШУЄ КІНЕТИКУ КАНОНІЧНОГО WNT-СИГНАЛІНГУ**

Формування та розвиток серця вищих хребетних перебуває під контролем низки сигнально-регуляторних каскадів, включаючи Nodal/Activin, FGF та BMP<sup>2,5,6</sup>. Протягом останніх років, доведено, що до важливих регуляторів розвитку та формування серця належить і канонічний Wnt-сигналінг [1, 2]. Низка експериментальних робіт *in vitro* та *in vivo* із застосуванням різноманітних модельних об'єктів дещо пролили світло на складну та багаторівневу участь Wnt/ $\beta$ -катенінового сигналінгу у зазначеному процесі. Мутації або порушення експресії компонентів канонічного Wnt-сигналінгу можуть спричинити різноманітні порушення розвитку ембріону та серця. Як відомо, Wnt-сигналінг відіграє важливу функцію у підтриманні та експансії кардіальних прогеніторних клітин на початкових стадіях їхньої проліферації та розвитку серця. На відповідних стадіях кардіогенезу Wnt/ $\beta$ -катеніновий сигналінг повинен бути репресований для того, щоб відбулася специфікація та диференціація кардіальних прогеніторних клітин у кардіоміоцити [3, 4]. Загалом вважається, що Wnt/ $\beta$ -катеніновий сигналінг пригнічується у пізньому кардіогенезі і не робить ніякого внеску у розвиток та ріст післянатального міокарду [3, 4]. У своїй роботі ми показали, що гомозиготна делеція гена  $\beta$ -катеніну не спричиняє морфологічних вад серця та ембріону, однак призводить до пізньої ембріональної та післянатальної летальності останніх [5]. При аналізі дорослих тварин із гетерозиготною делецією гена  $\beta$ -катеніну у ембріональному серці ми виявили затримку росту серця та підвищений рівень експресії гіпертрофічних (або фетальних) генів [6]. Із застосуванням культури первинних кардіоміоцитів нам також вдалось виявити, що і повна і часткова втрата

гена  $\beta$ -катеніну впливала на кількість двоядерних кардіоміоцитів та на ріст клітин у відповідь на гіпертрофічні стимули [7].

Наші та літературні дані свідчать на користь припущення, що канонічний Wnt сигналінг має важливе значення не лише при ініціації кардіальної мезодерми та закладки нормального органу, а й у більш пізні терміни розвитку, а саме: при визріванні новонародженого органу, термінальному диференціюванню кардіоміоцитів та перемиканню серця з фетальної на дорослу генетичну програму. Тож у своїй роботі ми зосередилися на аналізі ембріональних та новонароджених сердець тварин із гетерозиготною втратою гена  $\beta$ -катеніну.

**Матеріали і методи**

Генерація новонароджених мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією гена  $\beta$ -катеніну. Для отримання кардіоспецифічної делеції гена-мішені ( $\beta$ -катеніну) схрещували мишей, що експресують бактеріальну Cre-рекомбіназу під контролем промотора важкого ланцюга  $\alpha$ -міозину ((bMHC)-Cre) і гетерозиготних за умовним нокаутом  $\beta$ -катеніну ((aMHC)-Cre;  $\beta$ -cat<sup>flox/wt</sup>), із тваринами, гомозиготними за умовним нокаутом  $\beta$ -катеніну ( $\beta$ -cat<sup>flox/flox</sup>) [8].

Трансгенні тварини були люб'язно надані доктором Міхаелем Шнайдером, Медичний коледж, Байлор, США. Тварини, гомозиготні за умовним нокаутом  $\beta$ -катеніну ( $\beta$ -catenin<sup>flox/flox</sup>), були отримані із Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, USA).

Генотипування, виділення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція проводилися як описано [9].

Аналіз розвитку міокарду новонароджених тварин. Для оцінки розвитку серця новона-

роджених тварин використовували індекс співвідношення маси серця/маси тіла (МС/МТ) [6].

*Виділення РНК, синтез кДНК та ПЛР в реальному часі.* Виділення тотальної РНК, синтез кДНК та реакцію ПЛР у реальному часі проводили, як описано раніше [6]. Аналізували рівень експресії генів залучених до реалізації канонічного Wnt-сигналіngu: *TCF-4* та *Axin2*; генів – мішеней канонічного Wnt-сигналіngu: *c-Fos* і *CyclinD2*; а також гена *γ-катеніну*, що є високо-

мологічним до *β-катеніну*. Як референсний ген використовували *Gadph*. Праймери, які використовували для ПЛР в реальному часі, наведені в таблиці 1. У роботі використовували зразки контрольних сердець (WT) та сердець із гетерозиготною делецією *β-катеніну* (WT/СКО) на стадіях P1-2 (1 або 2 доби після народження) та на пізніх стадіях ембріогенезу: E14,5 (14,5 діб гестації) і E12,5 (12,5 діб гестації).

Таблиця 1. Праймери для ПЛР в реальному часі

Ген	Праймер прямий	Праймер зворотній
<i>TCF-4</i>	5' AACGGAACAGACAGTATAATGG3'	5' CACAGGAGTTGAAGGATTGG3'
<i>Axin2</i>	5' GAGTAGCGCCGTGTTAGTGACT3'	5' CCAGGAAAGTCCGGAAGAGGTATG3'
<i>c-Fos</i>	5' CCGACTCCTTCTCCAGCAT3'	5' TCACCGTGGGGATAAAGTTG3'
<i>CyclinD2</i>	5' CCACAGATGTGAAGTTCATTTCCA3'	5' GCAGTCCGGGTCACTTGT3'
<i>γ-катенін</i>	5' CCTGTGGACTCTGCGCAAT3'	5' GACCAGGATCTTCAGCACACTCT3'
<i>Gadph</i>	5' CCACTCTCCACCTTCGATG3'	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'

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

Статистичну обробку даних проводили за допомогою теста Манна-Уїтні з використанням пакету STATISTICS 8.0.  $p < 0,05$  вважали статистично достовірним. Усі значення представлені у вигляді середнього  $\pm$  стандартне відхилення.

### Результати та обговорення

Ембріональний розвиток серця є результатом чітко злагодженої взаємодії цілої низки сигнальних каскадів, серед таких і канонічний Wnt-сигналінг [1, 2]. 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 [10]. Окрім того, *β-катенін* має важливу структурну функцію, а саме він входить до складу адгезивних з'єднань (A3) і таким чином залучений до підтримання міжклітинної адгезії у тканині як ембріонального так і постнатального серця [11]. Оскільки повна втрата цього гена в ембріональному серці вже після формування першого та

другого серцевих полів не спричиняла морфологічних порушень його розвитку, ми вважаємо, що структурна функція *β-катеніну* не є критичною для формування та росту ембріонального серця, починаючи з 10 доби гестації (E10,5). Дійсно, втрата білка *β-катеніну* у структурі A3 може бути компенсована іншим білком – *γ-катеніном*, який, як відомо, має високий ступінь гомології із *β-катеніном* і може підтримувати формування не лише демосом, а й A3 [12]. З іншого боку, гомозиготна делеція гена *β-катеніну* в ембріональному серці спричиняла летальність таких ембріонів, починаючи з 16,5 доби гестації та одразу після народження, що свідчить про порушення іншої функції цього гена, а саме сигнальної [5]. Експерименти із застосуванням культури первинних кардіоміоцитів, підтверджуються отриманими на тваринах результатами, а саме: кардіоміоцити із повною втратою гена *β-катеніну* гинули у культурі, не утворювали двоядерних кардіоміоцитів, та не реагували на гіпертрофічні стимули [7]. Усе це разом, свідчить про важливість канонічного Wnt-сигналіngu та *β-катеніну*, зокрема на пізніх стадіях кардіогенезу та для розвитку і росту постнатального міокарда. Ми вважаємо, що порушення цього сигнального каскаду спричиняє і порушення росту міокарда та перемикає його на дорослу генетичну програму, що є необхідною умовою його функціонування.

Ми проаналізували розвиток міокарда в новонароджених мишей на першу та/або другу добу життя (P1-2) із застосуванням індексу співвідношення маси серця до маси тіла. Нами було виявлено, що гетерозиготна делеція гена  $\beta$ -катеніну в ембріональному серці спричиняє зменшення маси останнього у новонароджених тварин порівняно із контрольними зразками (рис. 1). Отримані дані узгоджуються із результатами аналізу тварин віком 1 та 3 місяці із делецією однієї алелі гена  $\beta$ -катеніну, де ми також спостерігали зменшення маси серця порівняно із контрольними мишами [6].

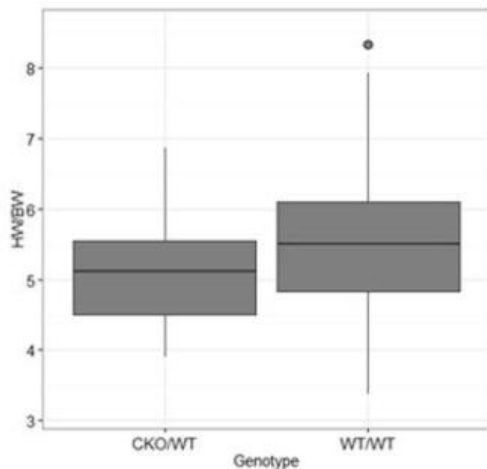


Рис. 1. Співвідношення маси серця до маси тіла (HW/BW) у новонароджених мишей із гетерозиготною делецією гена  $\beta$ -катеніну (CKO/WT) та у контрольних зразках (WT/WT) того ж віку (P1-2). Кількість тварин у групах: 16 і 66 відповідно.

За допомогою ПЛР у реальному часі ми також проаналізували і зміни рівнів експресії генів, залучених до реалізації канонічного Wnt-сигналіну (*TCF-4* та *Axin2*), і генів що перебувають під його регуляцією (*c-Fos* і *CyclinD2*). Аналіз ембріональних зразків сердець виявив, що в серцях WT ембріонів відбувається поступове підвищення рівнів експресії генів *TCF-4* та *Axin2* з 12,5 по 14,5 добу ембріонального розвитку (рис. 2). Дані ПЛР у реальному часі стосовно експресії генів – мішеней канонічного Wnt-сигналіну *c-Fos* і *CyclinD2* узгоджуються із попередніми результатами та також свідчать про активацію канонічного Wnt-сигналіну у пізньому ембріогенезі між 12,5 та 14, 5 добою розвитку. Цікаво, що у новонароджених серцях контрольних тварин рівень експресії генів *TCF-4* та *Axin2* зменшувався майже вдвічі порівняно із зразками на стадії розвитку E14,5. Це свідчить

про пригнічення активності Wnt у постнатальному серці до базального рівня і узгоджується із літературними даними. Однак, під час аналізу зразків сердець із гетерозиготною втратою гена  $\beta$ -катеніну нами було виявлено, що рівень експресії генів *TCF-4*, *Axin2*, *c-Fos* і *CyclinD2* суттєво, а іноді навіть вдвічі вищий, ніж такий у контрольних зразках новонароджених сердець та сердець на стадії E14,5 (рис. 2). Загалом складається таке враження, що в ембріональних серцях із втратою одного алеля гена  $\beta$ -катеніну активація канонічного Wnt починається пізніше – з 14,5 доби розвитку і у постнатальному серці, однак рівень цієї активації суттєво вищий. І, незважаючи на це, серця з гетерозиготною делецією мають меншу масу порівняно із контрольними серцями на P1-2 (рис. 1) і навіть у дорослому віці цей показник нижчий [6].

Вище ми вже зазначали, що у клітинах серця експресується й інший білок, що здатен функціонально компенсувати втрату  $\beta$ -катеніну –  $\gamma$ -катенін. Останнім часом накопичені дані і стосовно його можливої участі в регуляції активності канонічного Wnt-сигналіну [13]. Тож ми припустили, що, ймовірно, у нашій моделі, за умови дефіциту  $\beta$ -катеніну, до регуляції активності канонічного Wnt залучається і  $\gamma$ -катенін також, ми проаналізували зміни рівнів експресії цього гена у досліджуваних зразках. Виявилось, що рівень експресії  $\gamma$ -катеніну був майже у двічі нижчим в ембріональних серцях із гетерозиготною делецією гена  $\beta$ -катеніну (рис. 3). І, навпаки, у постнатальному серці цей рівень був удвічі вищим (рис. 3).

Отже, нами було виявлено, що у ембріональному серці канонічний Wnt-сигналінг, вочевидь, активується не лише для того, щоб відбулася ініціація кардіальної мезодерми та пізніше експансія прогеніторних кардіальних клітин, а й для того, щоб на більш пізніх стадіях кардіогенезу, вже сформоване серце ембріона росло. Пригнічення цього сигнального каскаду у тварин із контрольним генотипом відбувається у постнатальному серці, ймовірно, це є необхідною умовою для термінального диференціювання кардіоміоцитів. Однак при порушенні функціонування канонічного Wnt-сигналіну, а саме делеції одного алеля гена  $\beta$ -катеніну (основного транскрипційного ко-активатора Wnt), відбувається не лише затримка росту новонародженого серця, а й зміна кінетики активності Wnt.

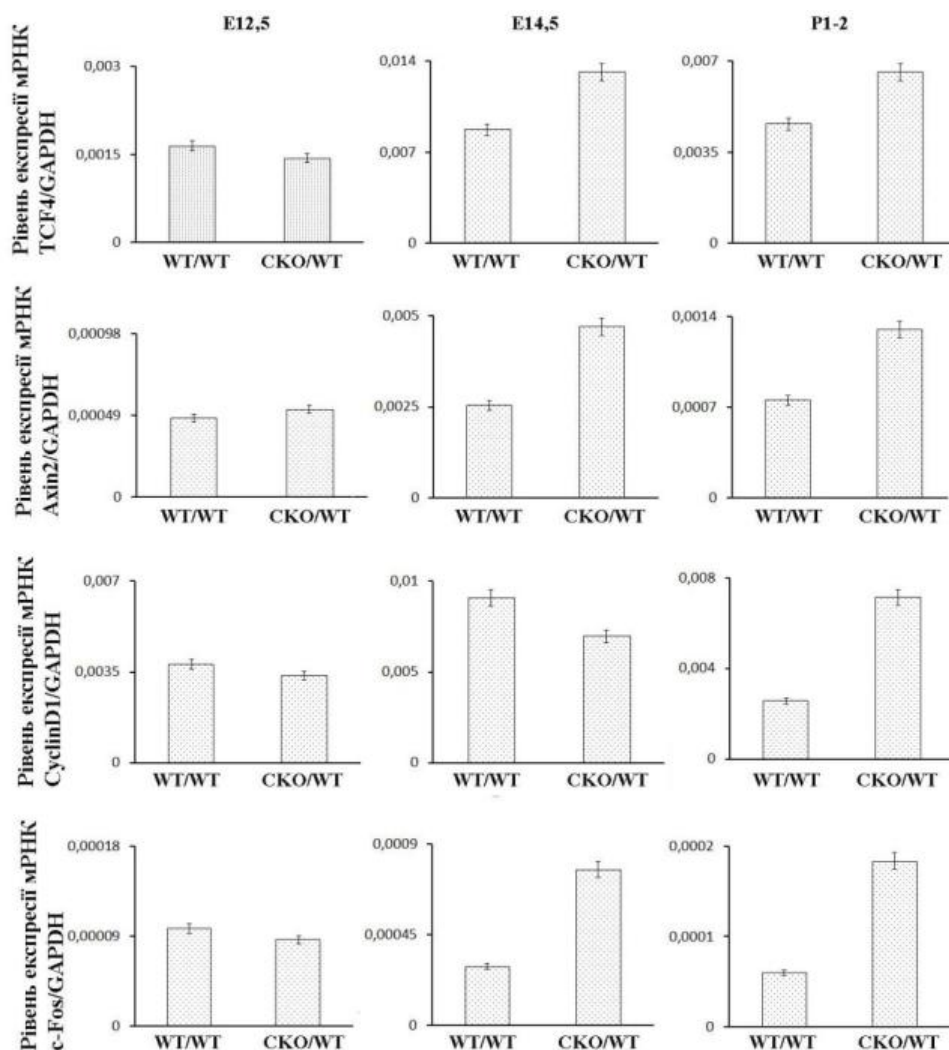


Рис. 2. Кінетика активності Wnt/ $\beta$ -катенінового сигнального шляху у ембріональних (E12,5 і E14,5) та новонароджених серцях тварин контрольної групи (WT/WT) і тварин із гетерозиготною делецією гена  $\beta$ -катеніну (CKO/WT). Кількість тварин у кожній групі – не менше 2.

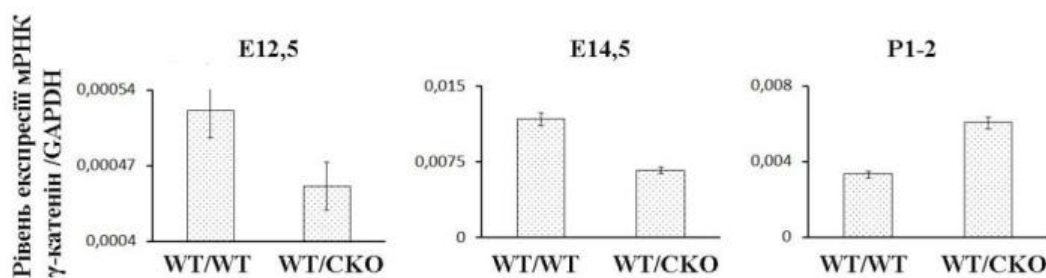


Рис. 3. Рівень експресії гена  $\gamma$ -катеніну в ембріональних (E12,5 і E14,5) та новонароджених серцях тварин контрольної групи (WT/WT) і тварин із гетерозиготною делецією гена  $\beta$ -катеніну (CKO/WT). Кількість тварин у кожній групі – не менше 2.

Сигналінг активується пізніше (E14,5 – P1-2), однак рівень цієї активності вищий, аніж у контролі. Окрім того, нам вдалось зареєструвати підвищення рівня експресії гена  $\gamma$ -катеніну у новонароджених серцях.

Ймовірно, останній бере участь у регулюванні канонічного Wnt-сигналінгу у якості транскрипційного ко-активатора, однак цього не достатньо, щоб новонароджене серце розвивалося як за нормальних умов. Згідно з літературними даними,  $\gamma$ -катенін дійсно може зв'язуватися із TCF4, і його локалізація була показана у ядрі клітин, однак попередні дані стосовно його сигнальної функції досить суперечливі. Одні експериментальні роботи свідчать на користь того, що  $\gamma$ -катенін здатен повністю підтримувати сигналізацію і компенсувати  $\beta$ -катенін [14], інші – що  $\gamma$ -катенін пригнічує Wnt залежну транскрипцію генів [15], ще інші – що  $\gamma$ -катенін має свої

гени – мішені і це абсолютно змінює сенс канонічного Wnt-сигналінгу [16]. Наша робота свідчить на користь останньої гіпотези, однак сигнальна функція  $\gamma$ -катеніну та ідентифікація його генів-мішеней потребує більш глибокого аналізу.

### Висновки

Нами було показано активацію канонічного Wnt-сигналінгу у пізньому кардіогенезі, а саме між 12,5 та 14, 5 добою ембріонального розвитку, і пригнічення цього каскаду у новонародженому серці. Виявлено, що гетерозиготна делеція транскрипційного ко-активатора Wnt-сигналінгу гена  $\beta$ -катеніну спричиняє затримку росту новонародженого серця, порушення кінетики канонічного Wnt і асоційована із підвищенням експресії гена  $\gamma$ -катеніну у новонародженому серці.

### Література

1. Bruneau B.G. Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – № 5. – p. a008292. doi: 10.1101/cshperspect.a008292.
2. Freire A.G., Resende T.P., Pinto-do O.P. Building and repairing the heart: what can we learn from embryonic development? // BioMed Res. Int. – 2014. – p. 679168. doi: 10.1155/2014/679168.
3. Bergmann M.W. WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development // Circ Res. – 2010. – № 107. – p. 1198–1208. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223768.
4. Jain R., Li D., Gupta M., Manderfield L.J., Ifkovits J.L., Wang Q., Liu F., Liu Y., Poleshko A., Padmanabhan A., Raum J.C., Li L., Morrissey E.E., Lu M.M., Won K.J., Epstein J.A. Heart development. Integration of Bmp and Wnt signaling by Hox specifies commitment of cardiomyoblasts // Science. – 2015. – № 348. – p. aaa6071. doi: 10.1126/science.aaa6071.
5. Piven O.O., Kostetskii I.E., Macewicz L.L., Kolomiets Y.M., Radice G.L., Lukash L.L. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development // Exp Biol Med. – 2011. – № 236. – p. 816–822. doi: 10.1258/ebm.2011.010362.
6. Palchevska O.L., Balatskii V.V., Andrejeva A.O., Macewicz L.L., Piven O.O., Lukash L.L. Embryonically induced  $\beta$ -catenin haploinsufficiency attenuates postnatal heart development and causes violation of foetal genes program // Biopolymers and Cell. – 2013. – V. 29, No. 2. – P. 124–130.
7. Пальчевська О.Л., Хазєєва А.А., Мачушинець Н.Н., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Півень О.О. Вплив делеції гена  $\beta$ -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2016. – Т. 18. – P. 242–248.
8. 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.
9. 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.
10. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease // Cell. – 2006. – V. 3, № 127. – p. 469–480.
11. Stepniak E., Radice G.L., Vasioukhin V. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2009. – № 1. – p. a002949. doi: 10.1101/cshperspect.a002949.
12. Butz S., Stappert J., Weissig H., Kemler R. Plakoglobin and beta-catenin: distinct but closely related // Science. – 1992. – № 257. – p. 1142–1144.
13. Zhurinsky J., Shtutman M., Ben-Ze'ev A. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin // Mol Cell Biol. – 2000. – V. 20. – P. 4238–4252.
14. Mahendram S., Kelly K.F., Paez-Parent S., Mahmood S., Polena E., Cooney A.J., Doble B.W. Ectopic gamma-catenin expression partially mimics the effects of stabilized beta-catenin on embryonic stem cell differentiation // PloS one. – 2013. – V. 8. – P. e65320. doi: 10.1371/journal.pone.0065320.
15. Aktary Z., Pasdar M. Plakoglobin represses SATB1 expression and decreases *in vitro* proliferation, migration and invasion // PloS one. – 2013. – V. 8. – P. e78388. doi: 10.1371/journal.pone.0078388.
16. Swope D., Cheng L., Gao E., Li J., Radice G.L. Loss of cadherin-binding proteins beta-catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis // Mol Cell Biol. – 2012. – V. 32. – P. 1056–1067. doi: 10.1128/MCB.06188-11.

**PALCHEVSKA O.L.<sup>1</sup>, HAZEEVA A.A.<sup>2</sup>, BALATSKYI V.V.<sup>1</sup>, RUBAN T.P.<sup>1</sup>, MACEWICZ L.L.<sup>1</sup>, PIVEN O.O.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua*

<sup>2</sup> *Karazin Kharkiv National University, Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody Sqr., 4*

### **HETEROZYGOS ELETION OF $\beta$ -CATENIN IN EARLY CARDIOGENESIS ATTENUATED THE HEART GROWTH AND AFFECTED ON CANONICAL WNT KINETICS**

**Aim.** In our present work, we have analyzed newborn and embryonic heart under the  $\beta$ -catenin haploinsufficiency.

**Methods.** Beta-catenin conditional knockout mice were bred with  $\alpha$ -MHC-Cre transgenic mice. In such way we generate the  $\beta$ -catenin haploinsufficient new born (P1-2) and embryonic hearts (E12,5 and E14,5) With rtPCR using we analyze the canonical WNT signalling kinetics in embryonic and newborn hearts. Namely we have analyzed the level of *TCF-4*, *Axin2*, *c-Fos* and *CyclinD2* genes expression. Beside of this we have studied the  $\gamma$ -catenin gene expression under normal and  $\beta$ -catenin haploinsufficient conditions. **Results.** Cardiac  $\beta$ -catenin knockout leads attenuated newborn heart growth and associated with  $\gamma$ -catenin expression up-regulation. Canonical Wnt signalling activated in later cardiogenesis (E12,5-14,5) in WT heart and downregulated in newborns. **Conclusions.** We have shown the importance of canonical Wnt during later cardiogenesis. Thus  $\beta$ -catenin haploinsufficiency leads to violation of WNT kinetic in latter embryos and attenuated the heart growth.

**Keywords:** heart development, cardiogenesis, WNT signalling,  $\beta$ -catenin,  $\gamma$ -catenin.