

УДК 001.1+575+576.52

КАРДІОСПЕЦИФІЧНА ДЕЛЕЦІЯ ГЕНУ β -КАТЕНІНУ, АСОЦІЙОВАНА ІЗ ПОРУШЕННЯМ АКТИВНОСТІ СИГНАЛЬНИХ КАСКАДІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО РОЗВИТКУ ГІПЕРТРОФІЇ МІОКАРДУ

О. Л. ПАЛЬЧЕВСЬКА, В. В. БАЛАЦЬКИЙ, Л. Л. МАЦЕВИЧ, О. О. ПІВЕНЬ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
 Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150,
 e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

Мета. Дослідити молекулярні механізми розвитку гіпертрофії за умови кардіоспецифічної гетерозиготної делеції β -катеніну. **Матеріали і методи.** Дослідження проводили із використанням мишей, що мають умовний нокаут гену β -катеніну (β -cat^{flox/flox}), та трансгенних тварин, що експресують Cre-рекомбіназу під контролем промотора важкого ланцюга α -міозину (α MHC)-Cre). Для індукції гіпертрофії застосовували плавальний тест протягом 6 тижнів. Зміни вмісту досліджуваних білків аналізували за допомогою Western-blot аналізу. **Результати.** Було показано, що гетерозиготна кардіоспецифічна делеція однієї алелі гену β -катеніну асоційована із підвищенням сигнальної активності MAPK, PI3-кіназного-mTOR-залежного сигнальних каскадів як при тривалому фізичному навантаженні так і без нього. Однак, навіть за умови підвищеної активності останніх, тварини з гетерозиготною кардіоспецифічною делецією однієї алелі гену β -катеніну мають слабшу гіпертрофічну відповідь. **Висновки.** Транскрипційна активність β -катеніну є необхідною умовою для правильної взаємодії сигнальних каскадів при формуванні серця та його адаптації до стресу.

Ключові слова: β -катенін, гіпертрофія, Wnt-сигналінг, MAPK сигналінг, PI3-кіназний-mTOR-залежний каскад, PKA — сигналінг, міокард.

Вступ. Адаптація дорослого міокарда до стресу, в тому числі фізичних навантажень та вікових змін, супроводжується значними морфологічними перебудовами структури тканини серця та змінами на молекулярному рівні [1]. Такі адаптації можуть призводити до розвитку хвороб міокарда та спричиняти погіршення його функції. Цікаво, що при цьому гіпертрофію розглядають як один із основних факторів ризику виникнення серцевих хвороб, поряд зі старінням, ожирінням, нездоровим способом життя, діабетом, анемією та підвищеним кров'яним тиском. Відомо, що тривалий стан гіпертрофії міокарда може призвести до серцевої недостатності та раптової серцевої смерті. При пристосуванні дорослого міокарда до фізичних та/або фізіологічних навантажень активуються численні сигнально-регуляторні шляхи клітини, що й забезпечує реконструкції міокарда. До таких відносять G-білок пов'язаний рецептор, кальцінеурін/NFAT, MAPK, PI3K/AKT/mTOR сигнальний шлях [2] та канонічний Wnt сигналінг [3].

Раніше, із застосуванням трансгенної мишачої моделі нами було показано, що при розвитку патологічної гіпертрофії внаслідок хронічного підвищення артеріального тиску відбувається активація канонічного Wnt сигналіngu [4]. Однак активація канонічного Wnt сигналіngu і β -катеніну зокрема, подія рання і вочевидь необхідна для запуску генетичної програми ембріоналізації міокарду, тобто гіпертрофії. Окрім того, із застосуванням плавального тесту та тварин із кардіоспецифічною делецією однієї алелі гену β -катеніну, ми з'ясували що дефіцит гену β -катеніну асоційований із слабшою гіпертрофічною відповіддю до тривалих фізичних навантажень [5].

Варто зауважити, що канонічний Wnt — сигналінг має безліч взаємодій із іншими сигнальними каскадами клітини і здатен впливати на їхню активність як при розвитку міокарду так і при адаптації дорослого серця до фізичних навантажень [6, 7]. Нещодавно також було продемонстровано, що активація канонічного Wnt-сигналіngu спричиняє розвиток гіпертрофії, у тому числі і опосередковано через порушення MAPK сигнального каскаду клітини [8].

© О. Л. ПАЛЬЧЕВСЬКА, В. В. БАЛАЦЬКИЙ, Л. Л. МАЦЕВИЧ, О. О. ПІВЕНЬ, 2017

ISSN 2415-3680 (Online), ISSN 1810-7834 (Print). Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2017, том 15, № 2

Добре відомо, що активація PI3-кіназного-mTOR-залежного каскаду не лише є типовою для гіпертрофії серця а й регулює активність канонічного Wnt.

Так, відомо що активований Akt пригнічує GSK-3 β , внаслідок чого відбувається руйнування деградувального комплексу β -катеніну та послідує підвищення його транскрипційної активності [9]. Окрім того, було показано, що пригнічення іншого сигнального каскаду — HIPPO, що відіграє принципову роль у регуляції розмірів кардіоміоцитів та серця, також спричиняє розвиток гіпертрофії. Цікаво, що активний Yap, компонент HIPPO сигналіну здатен взаємодіяти з цитоплазматичним β -катеніном і це призводить до підвищення проліферації кардіоміоцитів і збільшення маси серця [10].

Підсумовуючи такий короткий огляд власних та літературних даних, можемо зробити висновок, що гіпертрофія є наслідком згаданої взаємодії цілої низки сигнально-регуляторних каскадів клітини. Вивчення та розуміння молекулярно-генетичного профілю гіпертрофії має важливе значення не лише для нашого розуміння механізмів розвитку патології серця а й для клініцистів. Тож у своїй роботі ми зосередились на аналізі канонічного Wnt, MAPK, PI3-кіназного та PKA сигнальних каскадів клітини при адаптації серця до фізичних навантажень за умови дефіциту гену β -катеніну та у контролі.

Матеріали і методи

Для отримання кардіоспецифічної делеції гена-мішені (β -катеніну) схрещували мишей, що експресують Cre-рекоміназу під контролем промотора важкого ланцюга α -міозину ((α MHC)-Cre) і гетерозиготних за умовним нокаутом β -катеніну ((α MHC)-Cre; β -cat^{flox/wt}) із тваринами, гомозиготними за умовним нокаутом β -катеніну (β -cat^{flox/flox}) [11]. Новонароджених тварин генотипували згідно зі стандартними протоколами. Фізичне навантаження тварин моделювали із застосуванням плавального тесту за описаною та адаптованою методикою [12]. Контролем слугували тварини дикого типу та з кардіоспецифічною делецією гену β -катеніну що не отримували фізичного навантаження.

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

Виділення білка та Western-blott аналіз.

Сумарний білок виділяли за методом [13] та розділяли за допомогою електрофорезу в 15 % поліакриламідному гелі у присутності 0,1 %-го додецилсульфату натрію за методом Лемлі [14]. Для оцінки активності канонічного Wnt-сигналіну аналізували зміни вмісту Phospho-GSK3 β (Ser9) фосфорильованого за серином 9 та активованого β -катеніну. Використовували комерційні специфічні поліклональні антитіла проти phospho-GSK3 β (#9336, Cell Signalling technology), моноклональні антитіла проти сумарного β -катеніну (#8480, Cell Signalling technology), моноклональні антитіла проти активованого β -катеніну (#8814, Cell Signalling technology). Для аналізу активності PI3-кіназного-mTOR-залежного каскаду застосовували моноклональні антитіла проти сумарного Akt1 (sc-1618, SantaCruz Biotechnology,) моноклональні антитіла проти phosphoAkt Ser-473 (sc-101629, SantaCruz Biotechnology) та Thr-308 (sc-135650, SantaCruz Biotechnology). При дослідженні MAPK сигнального каскаду використовували моноклональні антитіла проти сумарного Erk1/2 (#9102, Cell Signaling), та phosphoErk1/2 Thr-202/Thr-204 (#437, Cell Signaling). Окрім того вивчали активність протеїнової кінази A (PKA) за допомогою моноклональних антитіл проти сумарного PKA (sc-390548, SantaCruz Biotechnology) та phosphoPKA (sc-32968, SantaCruz Biotechnology) а як контроль рівномірності навантаження доріжок білком — моноклональні антитіла проти актину (#3700, Cell Signalling technology). Проведено три повтори кожного експерименту. Кількість досліджуваних білків представлено у відносних одиницях, які вираховували як відношення вмісту досліджуваного білку до вмісту контрольного білку актину на тій самій доріжці гелю, або сумарного білка для оцінки змін вмісту його фосфорильованої форми.

Статистичну обробку даних проводили із використанням GraphPad Prism7. Застосовували двох факторний дисперсійний аналіз (ANOVA) із *post hoc* тестом Тукея. $P < 0.05$ вважали статистично достовірним.

Результати та обговорення

Раніше нами було показано, що адаптація серця до тривалого фізичного навантаження у тварин із кардіоспецифічною делецією однієї алелі гену β -катеніну була слабшою порівняно із тваринами контрольної групи. Однак, у цих тварин відбувалось збільшення індексу гіпертрофії (показника МС/МТ) порівняно з тваринами, що не

отримували фізичного навантаження. Тож ми припустили, що канонічний Wnt є важливим регулятором розвитку гіпертрофії, а за умови пригнічення його активності залучаються і інші сигнально-регуляторні механізми клітини. Тож, логічним було проаналізувати зміни активності ERK та AKT, які є компонентами MAPK та PI3-кіназного-mTOR-залежного шляхів у дослідних та контрольних груп тварин. А також РКА сигнального каскаду, що не лише залучений у розвиток гіпертрофії а й має важливу роль у скорочувальній функції серця [15].

Аналіз активності канонічного Wnt сигналіну у серцях тварин, що отримували тривале фізичне навантаження та тварин що лишались у контролі, не виявив статистично вірогідних змін вмісту як сумарного так і активованого білка β -катеніну (Рис. 1б, в), що свідчить про відсутність активації його транскрипційної активності. Це спостереження узгоджується із попередньо опублікованими даними, де ми також не спостерігали підвищення рівня експресії гену TCF4 та деяких генів — мішеней канонічного Wnt сигналіну [5]. Це також узгоджується з даними де нами було продемонстровано, що кардіоспецифічна делеція однієї алелі гену β -катеніну асоційована зі зниженням сигнальної активності канонічного Wnt у серцях тварин різних вікових груп [16].

Проте ми реєстрували підвищення вмісту фосфорильованої форми GSK3 α/β що свідчить про дисоціацію деградувального комплексу та підвищення сигнальної активності β -катеніну (Рис. 1г, д). Рівень деактивованого GSK3 α/β був статистично вірогідно вищим у тварин з гетерозиготною делецією однієї алелі β -катеніну у контрольній групі тварин, що не отримували фізичного навантаження та у групі тварин що отримували його протягом шести тижнів.

Така знахідка не узгоджується з даними щодо вмісту активованого β -катеніну у мутантних тварин, але пояснюється аналізом змін вмісту фосфорильованого AKT (Рис. 2б, в). Так, за допомогою Western-blot аналізу ми реєстрували статистично вірогідне підвищення вмісту фосфорильованих форм AKT за Thr308 Ser473 у мутантних тварин як без фізичного навантаження так і при тривалих тренуваннях. По-перше, ця знахідка вказує на певну дисрегуляцію сигнальних каскадів у тварин з дефіцитом β -катеніну навіть за умов відсутності стресу. По-друге, це пояснює підвищений рівень фосфорильованого GSK3 α/β у мутантних тварин, оскільки відомо що останній є мішенню активованого AKT [9].

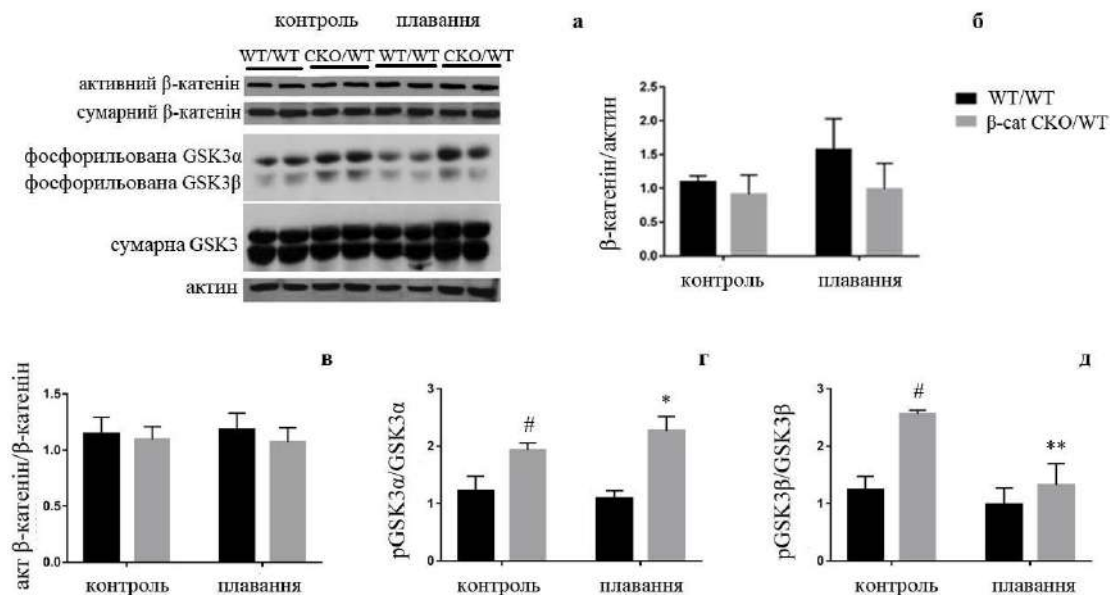


Рис 1. Western-blot аналіз кінетика канонічного Wnt сигналіну у тварин дикої типу та з делецією однієї алелі гену β -катеніну при тривалому фізичному навантаженні (плавання) та без нього (контроль): а — Western-blot аналіз змін вмісту досліджуваних білків; б — вміст сумарного білка β -катеніну; в — вміст активованого β -катеніну; г — вміст активованої GSK3 α ; д — вміст активованої GSK3 β ; n = 5 у кожній групі; # — різниця між мутантними та дикотипними тваринами у контрольній групі; * — різниця між мутантними та дикотипними тваринами при фізичному навантаженні; ** — різниця між мутантними тваринами у контролі та досліді (при тривалому фізичному навантаженні) $P < 0.05$.

Варто також зауважити що у тварин дико-го типу, що слугували контролем для тварин з дефіцитом β -катеніну, при тривалому фізичному навантаженні ми також спостерігали статистично вірогідне підвищення вмісту фосфорильованих форм АКТ за Thr308 Ser473 (Рис. 2б, в) це є цілком очікуваним результатом, оскільки активація АКТ є одним з механізмів розвитку гіпертрофії [9]. Однак, підвищення вмісту активованих форм АКТ було майже вдвічі нижчим у цієї групи тварин порівняно із

мутантними мишами, що також отримували фізичне навантаження (Рис. 2б, в).

Аналіз активності MAPK сигнального шляху виявив суттєве, більш ніж у два рази, підвищення фосфорильованої форми ERK1/2 у мутантних тварин у обох групах експерименту. Варто зауважити що як пригнічення так і активація ERK1/2 сигналіну має негативний вплив на функціонування серця, та спричиняє розвиток гіпертрофії, ішемії і серцевої недостатності [17, 18]. Проте активація цього сигнального каскаду частіше за все має антиапоптичну дію [18].

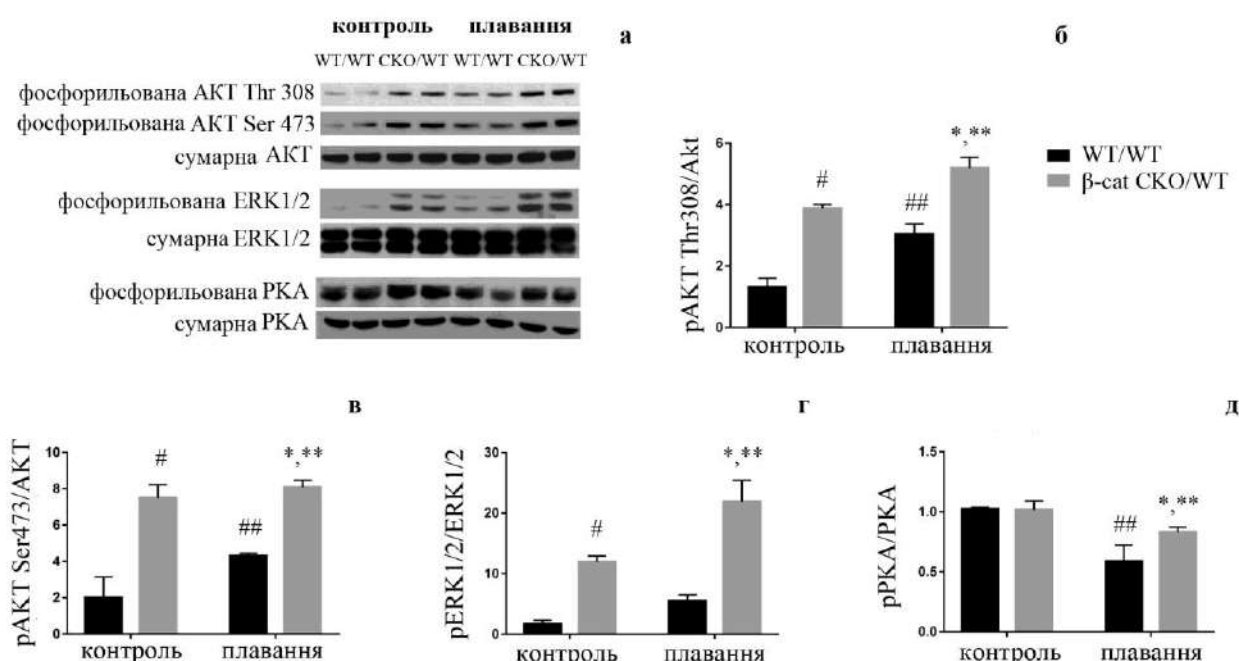


Рис 2. Western-blot аналіз кінетики гіпертрофічних сигнальних каскадів у тварин дико-го типу та з делецією однієї алелі гену β -катеніну при тривалому фізичному навантаженні (плавання) та без нього (контроль): а — Western-blot аналіз змін вмісту досліджуваних білків; б — вміст фосфорильованої АКТ Thr308; в — вміст фосфорильованої АКТ; г — вміст фосфорильованої ERK1/2; д — вміст фосфорильованої PKA. $n = 5$ у кожній групі; # — різниця між мутантними та дикотипними тваринами у контрольній групі; ## — різниця між дикотипними тваринами у контролі та досліді (при тривалому фізичному навантаженні); * — різниця між мутантними та дикотипними тваринами при фізичному навантаженні; ** — різниця між мутантними тваринами у контролі та досліді (при тривалому фізичному навантаженні) $P < 0.05$.

Той факт що саме у мутантних тварин ми спостерігали статистично вірогідне підвищення вмісту активованих форм Акт та ERK1/2 при тривалому фізичному навантаженні і не спостерігали у цих тварин вираженої гіпертрофічної відповіді, як у дикотипних мишей, свідчить на користь припущення про принципову роль транскрипційної активності β -катеніну у розвитку гіпертрофії. Очевидно певну роль відіграє і той факт, що окремі компоненти зазначених шляхів фосфори-

люються навіть більшою мірою, ніж у контрольній групі тварин за умов експерименту. Можливо це наслідок компенсаторної функції цих сигнально-регуляторних шляхів при розвитку гіпертрофії за умов відсутності активації канонічного Wnt. Отже наші дані свідчать про те, що навіть активація цих сигналінів за умови зниженої транскрипційної активності β -катеніну не є достатньою умовою для ефективного адаптації дорослого міокарда до фізичних тренувань.

По-друге, наші дані вказують на те що кардіоспецифічна делеція однієї алелі гену β -катеніну, навіть за відсутності стресу, спричиняє активацію проаналізованих нами сигнальних каскадів що є не лише типовим для гіпертрофії а й для ембріонального серця, котре не пройшло термінальної диференціації та специфікації. І хоча нам не вдалось виявити статистичних змін вмісту активованого білка β -катеніну, ми припускаємо що гетерозиготний нокаут його гену впливає вочевидь на кількість білка у канонічних та не канонічних білкових комплексах β -катеніну [9, 10] і це спричиняє порушення активності MAPK та PI3-кіназного-mTOR-залежного сигналінгів, затримку розвитку постнатального серця та його адаптації до фізичного навантаження [5, 16].

Аналіз активності PKA не виявив суттєвої різниці у тварин обох генотипів що не отримували фізичного навантаження, тоді як у групі тварин що плавали спостерігалось зниження вмісту фосфорильованої PKA. Зниження активності цього білка зазвичай пов'язане з нижчим рівнем фосфорилування саркомерних білків та погіршення скорочувальної функції серця [15]. Цікаво що зниження активності PKA у тварин дикою типу було статистично вірогідно вищим порівняно з мутантними тваринами що отримували тривале фізичне навантаження. Це також вказує на той факт що гіпертрофічна відповідь у тварин з гетерозиготною делецією однієї алелі гену β -катеніну була слабшою порівняно з дикотипними тваринами.

Висновки. Гетерозиготна кардіоспецифічна делеція однієї алелі гену β -катеніну асоційована із підвищенням сигнальної активності MAPK, PI3-кіназного сигнальних каскадів як при тривалому фізичному навантаженні так і без нього. Однак навіть за умови підвищеної активності останніх тварини з гетерозиготною кардіоспецифічною делецією однієї алелі гену β -катеніну мають слабшу гіпертрофічну відповідь. Вочевидь, транскрипційна активність β -катеніну є необхідною умовою для правильної взаємодії сигнальних каскадів при формуванні серця та його адаптації до стресу.

Автори висловлюють подяку за допомогу при виконанні досліджень доктору Павлу Добжину (Nencki Institute of Experimental Biology, PAS, Poland).

Перелік літератури

1. Nadal-Ginard B. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure / B. Nadal-Ginard // *Circulation Research*. — 2003. — Vol. 92, No. 2. — P. 139–150.
2. Kontaridis M. I., Geladari E. V., Geladari C. V. Pathways to Myocardial Hypertrophy // *Int Cardiovasc Res J*. — DOI 10.1007/978-3-319-08798-6_10. — P. 167–186.
3. Grigoryan T., Wend P., Klaus A., Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of b-catenin in mice // *Genes Dev*. — 2008. — Vol. 22, № 17. — P. 2308–2341.
4. Півень О. О. Сигнальна функція β -катеніну важлива на початкових стадіях розвитку патологічної гіпертрофії дорослого серця // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. — 2016. — Том 14, No 1. — С 44–51.
5. Пальчевська О. Л., Балацький В. В., Мацевич Л. Л., Лукаш Л. Л., Півень О. О. Сигнальна функція β -катеніну при адаптації дорослого міокарду свавців до фізичних навантажень // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. — 2015. — Том 16. — С. 225–229.
6. Padala R. R., Karnawat R., Viswanathan S. B. 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. — V 13. — P. 830–840. doi: 10.1039/C6MB00786D.
7. Barry S. P., Davidson S. M., Townsend P. A. Molecular regulation of cardiac hypertrophy // *Int J Biochem Cell Biol*. — 2008. — V 40. — P. 2023–39. doi: 10.1016/j.biocel.2008.02.020.
8. Lee C.-Y., Kuo W. W., Baskaran R., Day C. H., Pai P. Y., Lai C. H., Chen Y.-F., Chen R.-J., Padma V. V., Huang C. Y. Increased β -Catenin Accumulation and Nuclear Translocation are Associated with Concentric Hypertrophy in Cardiomyocytes // *Cardiovasc Pathol*. — 2017. — doi: 10.1016/j.carpath.2017.07.003.
9. Breuleux M., Klopfenstein M., Stephan C., Dougherty C. A., Barys L., Maira S.-M., Kwiatkowski D., Lane H. A. 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. — P. 742–753. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0668.
10. Heallen T., Zhang M., Wang J., Bonilla-Claudio M., Klysik E., Johnson R. L., Martin J. F. Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size // *Science*. — 2011. — № 332. — P. 458–461. doi: 10.1126/science.1199010.
11. 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.
12. 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, № 12. — P. 1751.
 13. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. — M.: Mir, 1984. — 425 P.
 14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227, № 5259. — P. 680.
 15. Krüger M., Linke W. A. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension // J Muscle Res Cell Motil. — 2006. — V 27. — P. 435–444. doi: 10.1007/s10974-006-9090-5.
 16. Oksana L. Palchevska, Volodymyr V. Balatskii, Anastasija O. Andrejeva, Larysa L. Macewicz, Oksana O. Piven and Lubov L. Lukashn. Studying of canonical Wnt-signaling in animals of different ageing groups under cardiospecific embryonic ablation of β -catenin // Tsiol Genet. — 2015. — V 49(1). — P. 6–11.
 17. Rose B. A., Force T., Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale // Physiol Rev. — 2010. — V. 90. — P. 1507–1546. doi: 10.1152/physrev.00054.2009.
 18. Purcell N. H., Wilkins B. J., York A., Saba-El-Leil M. K., Meloche S., Robbins J., Molkentin J. D. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy *in vivo* // Proc Natl Acad Sci USA. — 2007. — V. 104. — P. 14074. doi: 10.1073/pnas.0610906104.

Представлено Г. Д. Телгеевим
Надійшла 08.11.2017

CARDIOSPECIFIC β -CATENIN HAPLOINSUFFICIENCY ASSOCIATED WITH HYPERTROPHY SIGNALINGS ACTIVITY VIOLATIONS

O. L. Palchevska, V. V. Balatskyi,
L. L. Macewicz, O. O. Piven

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS
of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, 150, Zabolotnoho St.
e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

The **aim** of our study was to investigate the molecular mechanisms of hypertrophy response under cardiospecific β -catenin haploinsufficiency condition. **Materials and methods.** Studies were done with β -catenin conditional knockout mice (β -cat^{fllox/fllox}) and α -MHC-Cre transgenic mice. To induce hypertrophy we used swimming test during 6 weeks. With Western-blot using we have analyzed the level of studied proteins. **Results.** It has been shown that the β -catenin haploinsufficiency is associated with increased signaling activity of MAPK, PI3-kinase-mTOR-dependent signaling cascades in both: with prolonged physical activity and without it. However, even with an increased activity of this signaling, β -catenin haploinsufficient mice expressed weaker hypertrophic response. **Conclusions.** The transcriptional activity of β -catenin is necessary for the proper interaction of signaling cascades during heart maturation and adaptation to stress.

Keywords: β -catenin, hypertrophy, Wnt-signalling, MAPK signalling, PI3-kinase-mTOR-dependent cascade, PKA-signalling, myocardium.