

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
"КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені Ігоря СІКОРСЬКОГО"  
Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра біоінформатики**

**"На правах рукопису"**  
УДК 581.1

**До захисту допущено**  
Завідувач кафедру

\_\_\_\_\_ **Юрій ГОРГО**

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

**Магістерська дисертація  
на здобуття ступеня магістра  
за освітньо-професійною програмою «Біотехнологія»  
зі спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія»  
на тему: «Роль WNT-сигналіngu та ауто - і мітофагії у постнатальній  
диференціації кардіоміоцитів щурів»**

**Виконав:**

студент VI курсу, групи БМ-91мн  
Луцко Роман Андрійович \_\_\_\_\_

**Науковий керівник:**

в.о. зав. каф.біоінформатики, д.б.н., професор  
Горго Юрій Павлович \_\_\_\_\_

**Консультант з експериментальної частини:**

провідний інженер відділу генетичної інженерії  
ІМБіГ НАН України, д.б.н., ст.н.с.  
Півень Оксана Олександрівна \_\_\_\_\_

**Рецензент:**

Завідувач відділу загальної та молекулярної  
патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України, д.м.н., професор  
Досенко Віктор Євгенович \_\_\_\_\_

Засвідчую, що у цій магістерській  
дисертації немає запозичень з праць інших  
авторів без відповідних посилань  
Студент \_\_\_\_\_

Київ – 2021 року

**Національний технічний університет України**  
**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**  
**Факультет біотехнології і біотехніки**  
**Кафедра біоінформатики**

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)  
 Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»:  
 Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ  
 Завідувач кафедру  
 \_\_\_\_\_ Юрій ГОРГО  
 «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

**ЗАВДАННЯ**  
**на магістерську дисертацію студенту**  
**Лучку Роману Андрійовичу**

1. **Тема дисертації** «Роль WNT-сигналіngu та ауто - і мітофагії у пост-натальній диференціації кардіоміоцитів щурів», науковий керівник в.о. зав. каф.біоінформатики, д.б.н., професор Горго Юрій Павлович затверджений наказом по університету від «\_\_»\_\_ 2021р. №\_\_\_\_\_
2. **Термін** подання студентом дисертації 13.05. 2021
3. **Об'єкт дослідження** – культура неонатальних КМЦ щурів породи *Wistar*, доступні в публічних БД дані стосовно молекулярних елементів Wnt-енхансеосоми, їх мотиви, а також послідовності генів задіяних у ауто - і мітофагії в КМЦ *atg5*, *atg7* та *becn1*.
4. **Предмет дослідження** – визначення впливу модуляції канонічного Wnt-сигналіngu на неонатальні КМЦ щура в культурі та взаємодія канонічного Wnt-сигналіngu і компонентів ауто- і мітофагії..
5. **Перелік завдань, які потрібно розробити:** проаналізувати відому інформацію про молекулярну механіку канонічного Wnt-сигналіngu і його взаємодію з ауто- і мітофагією; дослідити вплив модуляції канонічного Wnt-сигналіngu на стан да диференціацію неонатальних КМЦ щурів у культурі; здійснити пошук потенційних WRE у послідовностях центральних генів ауто- і мітофагії КМЦ; розробити стартап-проект за темою дослідження.
6. Орієнтовний перелік графічного (ілюстративного) матеріалу: презентація
7. Орієнтовний перелік апробацій:  
 Лучко Р. А., Півень О. О. Пошук потенційних WRE у генах аутофагії BECN1 та ATG7 людини. XV Всеукр. науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття»

присвяченої 20-річчю факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського. Київ, 04 2021, с.125.

#### 8. Консультанти розділів дисертації\*

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Експериментальна частина	Півень Оксана Олександрівна, провідний інженер відділу генетичної інженерії ІМБіГ НАН України, д.б.н., ст.н.с.		
Розробка стартап-проєкту	Ткаченко Тетяна Петрівна, к.е.н., доцент		

9. Дата видачі завдання 22. 04. 2021\_\_\_\_\_

#### Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Визначення предмету дослідження	12. 02. 2021	виконано
2	Характеристика об'єкту дослідження	26. 02. 2021	виконано
3	Огляд літератури	19. 03. 2021	виконано
4	Визначення матеріалів і методів дослідження	02. 04. 2021	виконано
5	Виконання експериментальної частини	23. 04. 2021	виконано
6	Аналіз отриманих результатів	30. 04. 2021	виконано
7	Розробка стартап-проєкту	5. 05. 2021	виконано
8	Оформлення магістерської дисертації	13. 05. 2020	виконано

Студент

**Роман Лучко**

Науковий керівник дисертації

**Юрій ГОРГО**

---

\*Якщо визначені консультанти. Консультантом не може бути зазначено наукового керівника магістерської дисертації.

## ВМІСТ

ВСТУП .....	9
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	11
1.1 Wnt-сигналінг. Складові та еволюційний контекст .....	11
1.2 Механізми шляху клітиної долі .....	18
1.3 Ранній розвиток серця і роль Wnt-сигналінгу у цьому процесі .....	25
1.4 Фактори та ефектори перебудови неонатального серця .....	28
Висновки до розділу 1 .....	31
<b>1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....</b>	<b>32</b>
2.1. Об'єкт дослідження .....	32
2.2. Матеріали та обладнання дослідження.....	32
2.2.1 Поживні середовища .....	32
2.2.2 Реактиви та обладнання.....	33
2.3. Методи дослідження.....	34
2.3.1 Виділення, посів та культивування неонатальних КМЦ щура .....	34
2.3.2 Підготовка клітин і їх аналіз на проточному цитометрі.....	35
2.3.3. Підготовка імуногістохімічних препаратів КМЦ.....	36
2.4. Результати та їх обговорення .....	37
2.4.1. Біоінформатичний пошук WRE у генах <i>atg5</i> , <i>atg7</i> та <i>becn1</i> людини .	37
2.4.2. Визначення впливу модуляції канонічного Wnt-сигналінгу на виживаність КМЦ в культурі.....	41
2.4.3. ІГХ аналіз фізіологічних змін у клітинах при модуляції Wnt-сигналінгу .....	43
Висновки до розділу 2 .....	50
<b>3 СТАРТАП ПРОЕКТ .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінностей .....</b>	<b>51</b>
3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовищ стартапу та ключові фактори його успіху.....	54
3.3. Визначення потенційних споживачів .....	59
3.5 Оцінка ринкових позицій інноваційної розробки.....	61
3.6 Оцінка ризиків та страхування розробки.....	68

ВИСНОВКИ.....	74
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	75
ДОДАТКИ.....	83

## РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація: 84 сторінки, 24 таблиці, 14 рисунків, 4 додатки.

Канонічний Wnt-сигналінг, ауто- і мітофагія є важливими детермінантами клітинної долі кардіоміоцитів ссавців у кардіогенезі, гомеостазі та патології. Демографічне старіння, розповсюдження нездорового способу життя та деградація екосфери спричиняють ріст кількості випадків серцевих патологій, які не підлягають конвенційному лікуванню. Розуміння функціонування детермінант клітинної долі у розвитку серця може допомогти відкрити як можна відновлювати пошкоджені органи чи попереджати їх ушкодження.

Під час постнатальної диференціації серця змінюється його енергетичний метаболізм, розщеплюються перехідні структури і відбувається спеціалізація протеому для механічної стійкості і постійної скоротливої роботи. Аналогічні процеси є необхідними для відновлення серця після ушкоджень, і частково відбуваються у окремих випадках. Канонічний Wnt-сигналінг, ауто- і мітофагія задіяні у цих перетвореннях, як уже було показано, та їх достеменна роль і взаємозв'язок лишаються невідомими.

**Предмет дослідження** – вплив модуляції канонічного Wnt-сигналінгу на неонатальні КМЦ щура в культурі та взаємодія канонічного Wnt-сигналінгу і компонентів ауто- і мітофагії.

**Об'єкт дослідження** – культура неонатальних КМЦ щурів породи *Wistar*, доступні в публічних БД дані стосовно молекулярних елементів Wnt-енхансеосом, їх мотиви, а також послідовності генів задіяних у ауто- і мітофагії в КМЦ *atg5*, *atg7* та *becn1*.

Вперше було ідентифіковано потенційні WRE у послідовностях генів *atg5* та *atg7*, показано що модуляція канонічного Wnt-сигналінгу покращує виживаність неонатальних КМЦ в культурі і пригнічує їх диференціацію.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** КАНОНІЧНИЙ WNT-СИГНАЛІНГ, АУТОФАГІЯ, МІТОФАГІЯ, WRE, ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ КАРДІОМІОЦИТІВ.

## ABSTRACT

Master's dissertation: 84 pages, 24 tables, 14 figures, 4 appendices.

Canonical Wnt-signalling, auto- and mitophagy are key determinants of mammalian cardiomyocytes' cell fate in cardiogenesis, homeostasis and pathology. Population ageing, spread of unhealthy lifestyle and environmental crisis increase occurrence of conventionally untreatable heart conditions. Understanding of function of cell fate determinants in heart development may reveal ways to restore damaged organs or prevent the damage.

In course of postnatal differentiation the heart undergoes a set of metamorphoses – energy metabolism switches to different source, transient structures disappear and cells specialize their proteomes in order to withstand dynamic mechanical tension and unending repetitive contraction. Similar processes are must take place in order to restore a damaged heart, and sometimes they do. Canonical Wnt-signalling, auto- and mitophagy are involved into these transitions, as shown before, though their exact function and interaction remain unknown.

The subject of the study is the influence of canonical Wnt-signalling modulation onto cultured neonatal rat cardiomyocytes, and interaction of canonical Wnt-signalling and auto- and mitophagy components.

The objects of the study are cultured neonatal cardiomyocytes of *Wistar* rats, and publically available data on molecular elements of Wnt-enhanceosome, their motives and sequences of auto- and mitophagy-related genes *atg5*, *atg7* and *becn1*.

We managed to identify potential Wnt-responsive elements in genes *atg5* and *atg7*, show that modulation of canonical Wnt-signalling improves survival rate of cultured neonatal cardiomyocytes and inhibits their differentiation.

**KEY WORDS:** CANONICAL WNT-SIGNALLING, AUTOPHAGY, MITOPHAGY, WRE, CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

DMEM – Dulbecco’s modified Eagle medium

DMSO – диметил сульфоксид

ChIP-seq – chromatin immunoprecipitation-sequencing

PCP – planar cell polarity

WRE – Wnt-responsive elements

АК – адгезивні контакти

БД – база даних

ІГХ - імуногістохімія

КМЦ – кардіоміоцити

ПКМ – позаклітинний матрикс

ТФ – транскрипційні фактори

## ВСТУП

Фізіологічно та еволюційно першою функцією Wnt-сигналіngu є закладення первинної вісі у зародку. Цей шлях лежить в основі дерева справжнього багатоклітинного життя, і у сучасних високоорганізованих багатоклітинних тварин (як, наприклад, людини) відіграє важливу роль у формуванні багатьох тканин і органів при розвитку, а також у підтримці гомеостазу і регенерації дорослого організму. Порушення активності цього сигнального каскаду асоційоване з низкою патологій, а мутації, що призводять до його гіперактивації, є онкогенними.

Під час постнатальної диференціації серця воно змінює свій енергетичний метаболізм, розщеплює перехідні структури і спеціалізує протеом для механічної стійкості і постійної скоротливої роботи. Аналогічні процеси є необхідними для відновлення серця після ушкоджень, і частково відбуваються у окремих випадках. Канонічний Wnt-сигналінг, ауто- і мітофагія задіяні у цих перетвореннях, як уже було показано, та їх достеменна роль і взаємодія лишається невідомою.

**Актуальність.** Канонічний Wnt-сигналінг, ауто- і мітофагія є важливими детермінантами клітинної долі кардіоміоцитів ссавців. Демографічне старіння, розповсюдження нездорового способу життя та деградація екосфери спричинюють ріст кількості випадків серцевих патологій, які не підлягають конвенційному лікуванню. Наразі, нам бракує знань щодо тонкощів регуляторної динаміки серця у нормі, патології і регенерації. Розуміння того, як саме функціонують детермінанти клітинної долі у розвитку серця, ремоделюючи тканини у напрямку повної функціональності, може допомогти зрозуміти як можна відновити пошкоджений орган чи попередити його ушкодження. Окрім цього, вищезгадані фактори диференціації приймають участь у структуруванні тканин в ході розвитку, і, відповідно, розуміння цих явищ є необхідним для розробки технологій вирощування органодів і тканин придатних до трансплантації. Даний напрям досліджень є

фундаментальним і, хоч і не має багатьох безпосередніх практичних застосувань, неодмінно допоможе зрушити з мертвої точки розвиток багатьох біомедичних технологій.

**Метою роботи** є дослідження впливу модуляції канонічного Wnt-сигналіngu на фізіологічний стан неонатальних КМЦ та пошук контактних точок між процесами канонічного Wnt-сигналіngu та ауто- і мітофагією.

Відповідно до мети дослідження поставлені наступні **завдання**:

1. Проаналізувати відому інформацію про молекулярну механіку канонічного Wnt-сигналіngu і його взаємодію з ауто- і мітофагією.
2. Дослідити вплив модуляції канонічного Wnt-сигналіngu на стан та диференціацію неонатальних КМЦ щурів у культурі
3. Здійснити пошук потенційних WRE у послідовностях центральних генів ауто- і мітофагії КМЦ
4. Розробити стартап проект

**Предмет дослідження** – вплив модуляції канонічного Wnt-сигналіngu на неонатальні КМЦ щура в культурі та взаємодія канонічного Wnt-сигналіngu і компонентів ауто- і мітофагії.

**Об'єкт дослідження** – культура неонатальних КМЦ щурів породи *Wistar*, доступні в публічних БД дані стосовно молекулярних елементів Wnt-енхансеосом, їх мотиви, а також послідовності генів задіяних у ауто- і мітофагії в КМЦ *atg5*, *atg7* та *becn1*.

**Практичне значення роботи.** Результати цієї роботи будуть використані як основа для експериментального підтвердження зв'язку між канонічним Wnt-сигналіngом і системами ауто- і мітофагії, і для розробки стратегії дослідження постнатальної диференціації КМЦ.

**Наукова новизна.** Вперше було ідентифіковано потенційні WRE у послідовностях генів *atg5* та *atg7*, показано що модуляція канонічного Wnt-сигналіngu покращує виживаність неонатальних КМЦ в культурі і пригнічує їх диференціацію.

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Wnt-сигналінг. Складові та еволюційний контекст

Wnt-сигналінгом, або ж Wnt-сигнальними шляхами, називають цілу сукупність сигнальних і спряжених з ними регуляторних каскадів, первинними сигналами яких є глікопротеоліпиди родини Wnt. Wnt-сигналінг це висококонсервативний регуляторний механізм притаманний багатоклітинним тваринам (царство Metazoa)[1, 2], і, вважається, що виникнення подібного механізму було необхідною умовою виникнення справжньої багатоклітинності[3]. Wnt білки є міжклітинними сигналами, що регулюють проліферацію і диференціацію клітин. Вони задіяні у розвитку, рості, підтримці і патологіях багатьох різних тканин[4]. Такий широкий спектр функцій пов'язаний з фундаментальною роллю цього шляху у впорядкуванні багатоклітинних структур і забезпечується великим різноманіттям сигнальних лігандів (19 Wnt білків у людини[5]), гомологів рецепторів спроможних їх зв'язувати (10 гомологів Fzd в людини[5], а також велика кількість ко-рецепторів) та різними ефекторними шляхами, що активуються після зв'язування лігандів з рецепторами. Дія ефекторних шляхів є контекст-специфічною, а первинним сигналам (білкам Wnt) і рецепторам (білкам Fzd) характерна складна часопросторова динаміка експресії *in vivo*[3]. Цей розділ присвячується ознайомленню читача з загальною інформацією про Wnt-сигналінг, канонічний Wnt-шлях, також відомий як шлях долі клітини (cell-fate pathway), та його ключовими компонентами.

Початком досліджень Wnt-сигналінгу вважаються ранні 1980-ті, оскільки тоді було незалежно ідентифіковано перших представників Wnt-родини у дрозофіли і миші. У дрозофіли було виявлено ген полярності сегментів – *wingless*[6], а у миші новий протоонкоген – *int-1*[7]. Пізніше виявилось, що продукти цих генів гомологічні[8], і, згодом, шляхом об'єднання назв цих генів було отримано назву Wnt. Гени, явно залучені до розвитку раку та ембріонального розвитку, ще й висококонсервативні, як

мінімум, на проміжку між ссавцями і артроподами, викликали великий інтерес наукової спільноти, і досі активно досліджуються.

За майже 40 років інтенсивних досліджень було ідентифіковано і описано первинні, проміжні та цільові елементи Wnt-шляхів, їх варіантів та версій у різних організмах, визначено їх функції, описано еволюційний контекст, та розроблено терапевтичні стратегії націлені на Wnt-шлях[9, 10]. Попри це, очевидно, що до повного розуміння цієї системи ще далеко – через її багатогранність нам все ще бракує даних і цілісних підходів для їх інтерпретації[3, 11].

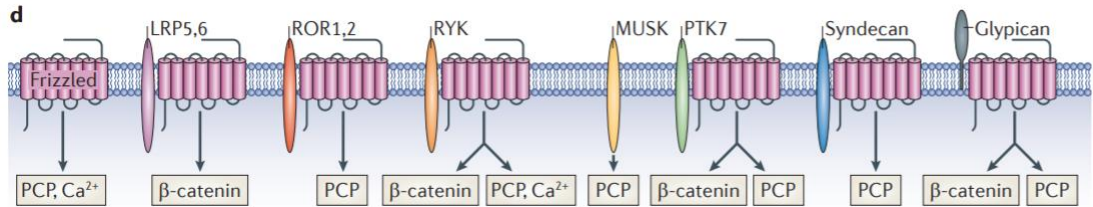
Як і будь-який регуляторний механізм, Wnt-шлях складається з первинних сигналів, їх рецепторів, каскадно-ефекторної системи і цільових генів чи систем. Первинні сигнали це Wnt-білки. Це білки довжиною 350-400 амінокислот[12], середньою масою ~40 кДа. Їм характерні 22-24 консервативні позиції цистеїнів, які є необхідними для правильного фолдингу і залучені у внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язках[13]. Незрілий поліпептид має 20-амінокислотну послідовність, що є секреторним сигналом, який відщеплюється в ході посттрансляційної обробки[14]. Також в ході посттрансляційних модифікацій до Wnt приєднується залишок пальмітинової кислоти (у консервативній позиції), який є необхідним для транспорту і виділення Wnt в позаклітинний простір[15], а також відіграє критичну роль у зв'язуванні з цільовими рецепторами[16]. Схоже на те, що цей же залишок відповідає за гідрофобні властивості Wnt-білків, чим визначається переважно юкстакринний характер дії сигналіngu[17]. Однак, з цього приводу консенсусної думки поки не досягнуто, оскільки, по-перше, виявлено активний Wnt-сигналінг на відстані, що перевищує 20 клітинних діаметрів від Wnt-синтезуючих клітин (це значно перевищує дистанцію дифузії гідрофобних молекул у ПКМ)[17], а по-друге, Wnt-білки також мають заряджені ділянки, яких, згідно з моделями, мало би бути достатньо для їх водорозчинності[14].

Нещодавно було показано, що у дрозозі для повноцінної реалізації функції Wnt-сигналіngu достатньо і обмежених лише мембранною дифузиею, спряжених з мембраною форм Wnt[18]. Аналогічно, у культурі органоїдів миші спостерігалась міжклітинна передача сигналу лише у сусідніх клітин, мембрани яких контактували[19]. Ці та інші дослідження свідчать про вторинність паракринних ефектів Wnt-сигналіngu. Ці ефекти можуть реалізуватися різними механізмами, як, наприклад, міграцією Wnt-секретуючих клітин, розповсюдженням Wnt спряжених з рецепторами та мембранами по мірі руху і поділу клітин-носіїв, везикулярним транспортом та дифузиею у мембранах довгих відростків клітин (наприклад, аксонів)[3].

У людини, як і більшості хребетних, є 19 генів *Wnt*, що належать до 13 підродин[20]. В людини, амінокислотні послідовності різних Wnt-білків співпадають на 27-83%[21], а при порівнянні між собою відповідних ортологів Wnt у людини та інших ссавців послідовності ДНК, в основному, співпадають на >90%. Внутрішньовидова ідентичність гомологів свідчить про збереження функції, а міжвидова про високу консервативність шляху. З умовним спрощенням організму, як правило, спостерігається і зменшення кількості різних Wnt, що в ньому експресуються. Так, хребетним характерна експресія 19 Wnt-білків, голкошкірим 11, членистоногим 7, молюсками 6, нематодам 5, а губкам всього 2, однак мають місце і винятки[22].

З рецепторами-мішенями Wnt-білків усе також доволі складно. Основними рецепторами, що зв'язують Wnt-ліганди є представники родини Frizzled (Fzd)[23]. В людини є 10 Fzd, і усі експресуються у тих чи інших тканинах та приймають участь у реалізації Wnt-сигналіngu[24]. При зв'язуванні ліганда, Fzd рекрутують ко-рецептори і утворюють з ними комплекс за участі вже зв'язаного Wnt. Комбінація рецептора і ко-рецептора вважається ключовим визначником сценарію подальшого розвитку подій[23]. Залежно від комбінації рецепторів, на внутрішній стороні мембрани можуть формуватися різні комплекси, що ініціюють подальші внутрішньоклітинні сигнальні каскади. Досі не дуже зрозуміло, чи можуть Fzd-рецептори без

допомоги ко-рецепторів передавати сигнал всередину клітини. Ко-рецептори представлені білками LRP5, LRP6, ROR1, ROR2, RYK, MUSK, PTK7, Syndecan та Glypican, на рисунку 1.1 зображені варіанти Wnt-шляхів, що можуть ними ініціюватись[23].



**Рисунок 1.1** – Різні Wnt-індуковані регуляторні каскади (за матеріалами[23])

При цьому, деякі з ко-рецепторів можуть зв'язувати Wnt-ліганди і передавати сигнал всередину клітини без допомоги Fzd, тобто функціонують як повноцінні рецептори[25, 26]. Усі рецептори задіяні у Wnt-сигналінгу регулюються транскрипційно і пост-трансляційно з високою точністю, оскільки їх над- чи неоекспресія призводить до порушень контролю проліферації та диференціації, що, як правило, призводить до розвитку онкопатологій. Усі рецептори підлягають різносайтовим фосфорилуванням, убіквітинуванням та іншим модифікаціям, які можуть прискорювати чи сповільнювати їх обіг, та підлягають протеолізу чи відщепленню ліпідних якорів[23]. Таким чином клітини можуть швидко змінювати рецепторний ландшафт мембран і регулювати активацію ефektorних Wnt-шляхів, що вони постійно роблять[27].

Виходячи з вищесказаного, активація Wnt-рецепторів може запускати ряд внутрішньоклітинних сигнальних каскадів. Класично використовуваною номенклатурою є поділ Wnt-сигналінгу на канонічний і неканонічний. Варто зауважити, що підстав, окрім історичних, для такої категоризації нема – вона вказує лише на те, що канонічний шлях було відкрито першим і, загалом, досліджено краще. Без повного контексту, може здатися нібито різні ефektorні каскади, що можуть викликатися Wnt-білками, взаємовиключні чи функціонально протилежні, але це не так[28]. Натомість, є свідчення про

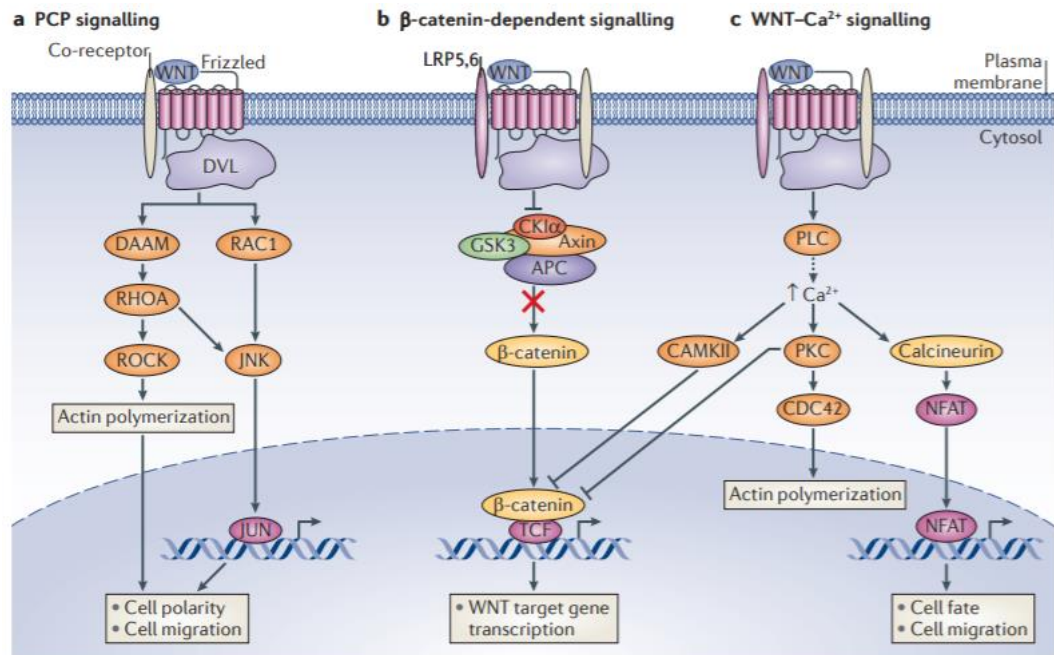
одночасну активність різних шляхів[29, 30] та, як буде видно нижче, між елементами цих шляхів відсутній антагонізм.

На заміну старій, та не функціональній, класифікації ефекторних сценаріїв Wnt, було запропоновано умовно поділити їх на каскади «долі клітини» та «поляризації клітини», відповідно до функціональних особливостей[3]. Такий поділ вирішує і проблему антагонізації канонічного і неканонічного Wnt-сигналіngu, оскільки вибір долі клітини та її поляризація є не взаємовиключними, а, навпаки, взаємокоординуючими процесами.

Шлях клітинної долі, раніше відомий як канонічний Wnt-сигналінг, наразі, вивчено найкраще. Центральним цитоплазматичним елементом у цьому шляху є так званий комплекс знищення (destruction complex)[31]. Він контролює обіг білку  $\beta$ -катеніну у клітині. В нормі, цей комплекс конститутивно активний і фосфорилує вільний цитоплазматичний  $\beta$ -катенін, прискорюючи його деградацію. Коли формується комплекс з Fzd, Wnt та Lrp5/6, до його внутрішньомембранної сторони рекрутується білок Disheveled (Dvl), який в свою чергу інактивує комплекс знищення. У цитоплазмі відбувається накопичення стабільного  $\beta$ -катеніну, він просочується у ядро, де, зв'язуючись з транскрипційними факторами Tcf/Lef, активує цільові гени. Таким чином реалізуються програми специфікації чи підтримки поточного клітинного стану. Більш детально про цей механізм буде сказано нижче.

Неканонічні Wnt-шляхи, вони ж шляхи поляризації клітини є більш різноманітними у плані ефекторів і безпосередніх мішеней, але не мають такої кількості різних кінцевих результатів. Якщо шлях клітинної долі може призводити до різних результатів у різних типах клітин, то поляризація має цілком визначені можливі результати – це поляризація клітин в межах асиметричного поділу, конвергентного видовження[32] чи планарної поляризації (PCP)[33]. Попри різні ефекторні шляхи, ці варіанти Wnt-сигналіngu сходяться на просторовій поляризації клітини і орієнтуванні клітинного поділу, міграції чи деформації вздовж утвореної осі. Наприклад, у PCP-шляху при утворенні комплексу Wnt з рецепторами на внутрішній

стороні мембрани рекрутується Dvl[34] (як і у канонічному сигналінгу). Далі, незалежно від  $\beta$ -катеніну, може відбуватися поляризація клітини за допомогою різних механізмів – позиціонування centrosом[35], активація RhoA[36], JNK[37] чи  $Ca^{2+}$  сигнальних каскадів[38]. Усі ці каскади призводять до одного і того ж фенотипового результату – просторової поляризації клітини.

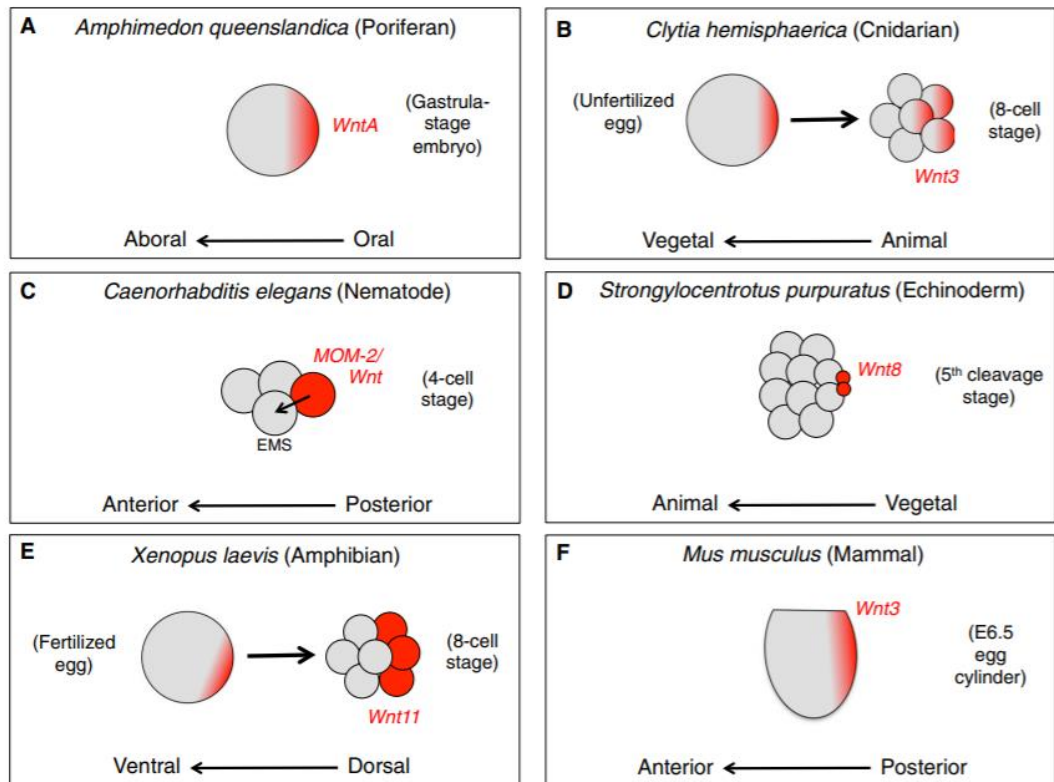


**Рисунок 1.2** – Різні ефекторні каскади Wnt-сигналінгу (адаптовано з[23]).

Зважаючи на те, що усі ефекторні шляхи Wnt починаються зі спільних елементів (Fzd і Dvl), а також опираючись на експериментальні дані[29, 30, 35], бачимо, що локалізований Wnt сигнал може паралельно ініціювати шляхи долі і поляризації клітини, таким чином надаючи клітині інформацію і про її положення, і про потребу у диференціації. Схоже, об'єднання цих двох інформаційних складових в одному молекулярному сигналі відіграло ключову роль у еволюції багатоклітинності[3], і, враховуючи те, наскільки багато функцій виконує Wnt-сигналінг на всіх стадіях життя тварин, ця система є критичною для впорядкування і підтримки складних неоднорідних тканин. Філогенетичний аналіз Wnt-білків, рецепторів та інших компонентів Wnt-сигналінгу, а також функціональний аналіз різних варіантів його розвитку

вказує на те, що цей сигналінг виник водночас зі справжніми багатоклітинними тваринами[2]. Така складна система, звісно ж, мала свої прекурсори у до-багатоклітинних істот, і, схоже, успішне об'єднання цих компонентів у єдиний механізм і зробило можливою багатоклітинність[39]. Еволюційно найпізнішим елементом системи є Wnt-білки, які, вочевидь, були об'єднуючим фактором[3]. Каскади, керуючі долею клітин і їх поляризацією, як і відповідні їм регулятори, мають місце і у одноклітинних та несправжніх багатоклітинних. Наприклад, слизовики *Dictyostelium* експресують Fzd-подібні рецептори[40] і модуль контролю клітинної долі за участю  $\beta$ -катеніну[41].

Еволюційні дослідження вказують на те, що поява справжніх тварин вимагала появи хоча б двох типів клітин і їх просторової організації відносно певної осі, відомої як первинна вісь[42]. Консенсусною є думка, що першою віссю асиметрії багатоклітинних є та, вздовж якої тіло ділиться на передню (anterior) і задню (posterior) частини[42]. Звісно ж, положення первинної осі залежить від топології конкретно взятої тварини, однак вона безумовно формується першою на ранніх стадіях розвитку. Експериментально встановлено, що майже у всіх тварин Wnt є першим ламаючим симетрію сигналом[3]. Wnt експресуються на задньому полюсі, до цього симетричних, зародків, тим самим формуючи первинну вісь (рисунок 1.3).



**Рисунок 1.3** – Вплив Wnt-сигналіngu на ранні зародки різних тварин (за матеріалами[3]).

Закладення первинної осі це фізіологічно та еволюційно перша функція Wnt-сигналіngu, оскільки вона реалізується на ранніх етапах розвитку. Однак, функціонал Wnt-сигналіngu цим не обмежується – Wnt-шляхи необхідні для підтримки і закладення нових асиметрій у розвитку, підтримці гомеостазу, та регенерації[43]. Реалізація цих функцій є контекст-специфічною для кожного досліджуваного виду, типу клітин, етапу розвитку і так далі. У наступних розділах буде оглянуто контекст для цієї роботи.

## 1.2 Механізми шляху клітиної долі

Перш ніж розглядати події при активації канонічного Wnt-сигналіngu, варто висвітлити функціонування задіяних в ньому систем за нормальних обставин. Кінцевим ефектором у даному сценарії виступає  $\beta$ -катенін, що, проникаючи в ядро, діє як фактор транскрипції і виконує кінцеву генетичну програму канонічного Wnt.

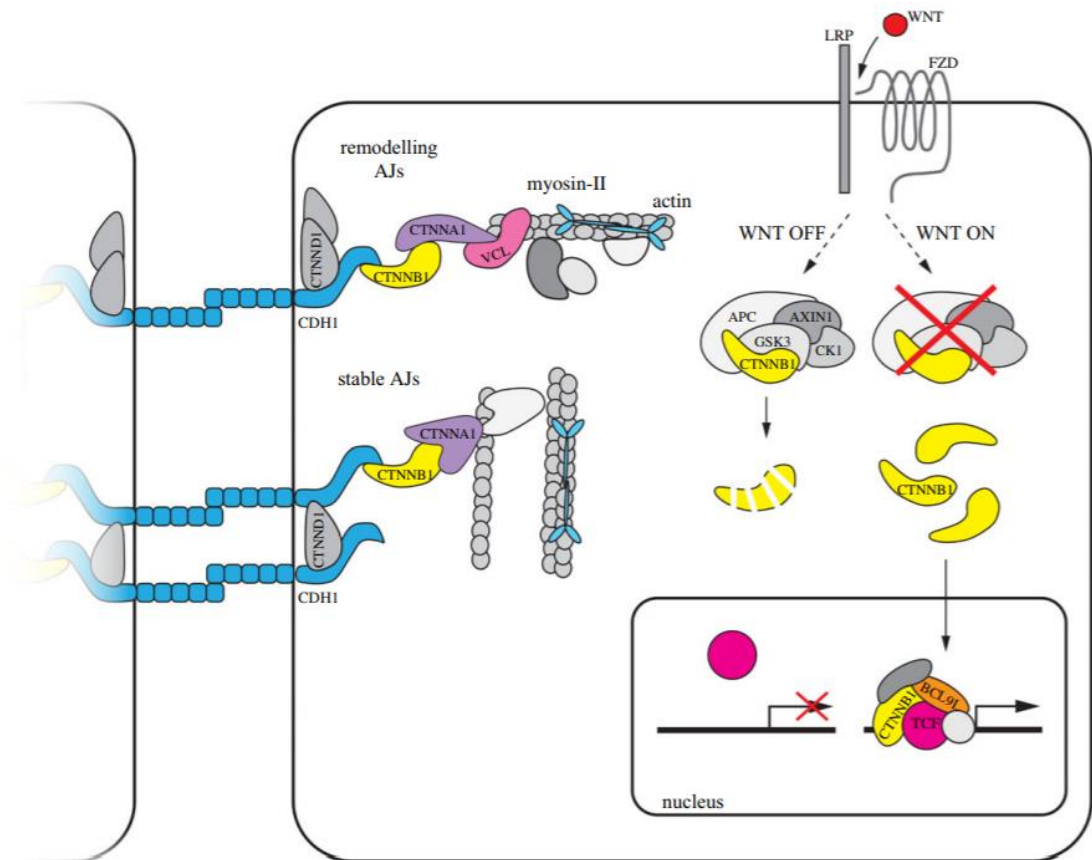
$\beta$ -катенін – неоднозначна фігура у клітині. Окрім регуляції транскрипції він виконує і структурну функцію у адгезивних контактах. Адгезивні контакти (АК) це особливий тип міжклітинних з'єднань, який, практично, забезпечує механічну стабільність тканин[44]. АК це трансмембранні комплекси, що сполучають між собою сусідні клітини і є посередньою ланкою між їх цитоскелетами. Позаклітинна складова АК це трансмембранні білки Е-кадгерин та N-кадгерин.  $\beta$ -катенін же зв'язується з внутрішньоклітинним доменом кадгерину, і з  $\alpha$ -катеніном приєднується до цитоскелету[45] (рис. 3).

Така незвична комбінація транскрипційної і адгезивної функції в одному білку є еволюційно консервативною і спостерігається водночас у таких далеких родичів як ссавці і губки[46]. Не ясно, яка з цих функцій є первинною, і чи взагалі можна якусь з них ставити першою. Однак, ці дві функції можуть розділятися, як бачимо з існування різних гомологів  $\beta$ -катеніну у *C. elegans*, одні з яких задіяні виключно у регуляції транскрипції, а інші у АК[47].

Інформація щодо генетичного контролю експресії  $\beta$ -катеніну та рівнів його мРНК, в основному, обмежена дослідженнями раку, тож тяжко щось казати про це у контексті нормальних клітин. Вважається, що основною точкою контролю цитоплазматичної концентрації  $\beta$ -катеніну є комплекс знищення, про який уже згадувалось вище. Комплекс знищення фосфорилує вільний цитоплазматичний  $\beta$ -катенін, що призводить до його убіквінтинування і швидкого транспорту до протеасом, тобто контроль має місце на рівні уже синтезованого білку. Зважаючи на це, а також на асоціацію підвищення рівнів катеніну з деактивацією комплексу знищення та відсутність інших свідчень, можна припускати, що  $\beta$ -катенін експресується конститутивно.

Що стосується канонічного Wnt-сигналіngu, то тут однозначно рівень цитоплазматичного і, відповідно, ядерного  $\beta$ -катеніну контролюється комплексом знищення. Його ще називають аксиною деградосою[48]. Деградосома складається з риштувальних білків (scaffold proteins) Arc та Axin1, що просторово організують навколо себе кінази CK1 та GSK3[49] (рис.

1.4). Ці білки можуть формувати великі конденсати у цитоплазмі, оскільки що Axin1, що Арс можуть і полімеризуватись, і багатовалентно взаємодіяти з різними цитоплазматичними агентами[50].



**Рисунок 1.4** – Подвійна роль  $\beta$ -катеніну у клітинах і будова аксинової деградосоми (за матеріалами[51]).

Коли Wnt утворює комплекс з Fzd та Lrp рецепторами, утворюється так звана Wnt сигналосома[52]. Це відбувається за рахунок полімеризації спряженого з Fzd білку Dvl, що призводить до зосередження комплексів Fzd/Lrp/Wnt. Dvl та цитоплазматична частина Lrp мають домени зв'язуючі Axin1, при цьому Lrp також сполучається з Gsk3[52]. Таким чином деградосоми розщеплюються, оскільки втрачають центральний рекрутуючий елемент. Через це у клітині поступово зростає концентрація цитоплазматичного і ядерного  $\beta$ -катеніну. Варто зазначити, що конкретні механізми інактивації деградосом все ще є предметом дебатів спеціалістів[53], і вищесказане є коротким консенсусом існуючих моделей.

Дослідження живих клітин з флуоресцентно міченим  $\beta$ -катеніном відкрили цікаву особливість зростання його цитоплазматичної та ядерної концентрацій внаслідок активації Wnt-сигналіngu, а саме – ядерна концентрація зростає в рази швидше ніж цитоплазматична[54]. Це, а також інші свідчення[51, 55], вказують на те, що активація сигнального шляху клітинної долі не просто регулює абсолютний рівень  $\beta$ -катеніну у клітині, а й впливає на роботу ядерного імпорту/експорту та механізми затримки  $\beta$ -катеніну в ядрі. У послідовності  $\beta$ -катеніну не виявлено сигналу ядерної локалізації. Існують різні моделі транспорту  $\beta$ -катеніну у ядро, однак, знову ж, консенсусу наразі не досягнуто. Вторинні ефекти, скоріше за все, викликані зміною профілю посттрансляційних модифікацій  $\beta$ -катеніну[54, 56].

Як би там не було, внаслідок Wnt-індукованої інактивації аксинових деградосом у ядрі накопичується  $\beta$ -катенін. У ядрі він має різних партнерів, з якими може зв'язуватись щоб активувати цільові гени. Таким чином формується Wnt енхансеосома[57] - ядерний комплекс, що ремоделює хроматин і реалізує Wnt-індуковані зміни експресії. Точний склад енхансеосоми може варіювати залежно від типу і стану клітин, але має певні конститутивні елементи – це транскрипційні фактори родини TCF/LEF, білок BCL9/BCL9-2,  $\beta$ -катенін, ядерний адапторний комплекс CHIP/LDB-SSDB, а також медіаторний комплекс (також відомий як TRAP і DRIP)[58]. TCF/LEF слугує інтерфейсом між ДНК і комплексом активації транскрипції, що збирається після зв'язування  $\beta$ -катеніну з TCF/LEF, а BCL9 є рибозувальним білком, що взаємоорганізує решту компонентів разом з адапторним комплексом та медіатором. Є ще один елемент, який вважався конститутивним, однак, схоже він не є необхідним для активації усіх Wnt-реактивних генів - мова йде про Pygo2 і гени задіяні у роботі серця[59].

Решта елементів Wnt енхансеосоми зберігають функціональну конститутивність, однак можуть бути представлені різними молекулами[60]. Перша функція – це ремоделювання хроматину, а саме модифікація гістонів. Прикладами білків виконуючих цю функцію у енхансеосомі є гістонна

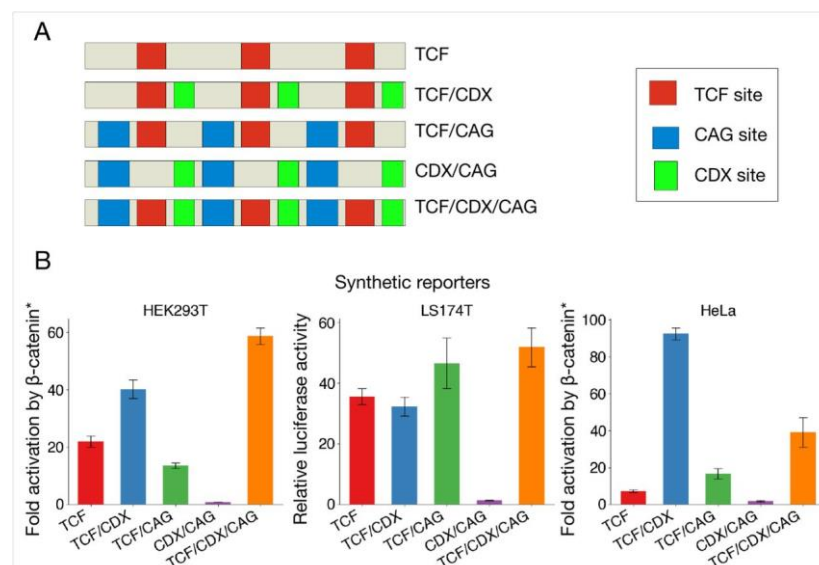
метилтрансфераза SET-1[61 р. 4] та гістонна ацетилтрансфераза CBP/p300[62]. Друга функція – це підтримка TCF/LEF та Gro/TLE у дисоційованому стані. При відсутності канонічного Wnt-сигналіngu TCF/LEF перебуває у комплексі з Gro/TLE, і цей комплекс має репресорні властивості. Ядерний  $\beta$ -катенін рекрутує E3 убіквітиніві лігази (наприклад, XIAP[63] або Hyd/UBR5[64]) до TCF/LEF, де ті спрацьовують на Gro/TLE і змушують його дисоціювати.

Отож,  $\beta$ -катенін не взаємодіє безпосередньо з ДНК, а ініціює збір Wnt-енхансеосоми. Взаємодія між цим комплексом і ДНК реалізується за посередництвом фактора транскрипції з родини TCF/LEF, а саме TCF7L2 (ще відомий як TCF4). Цей білок зв'язується з ДНК за допомогою домену HMG (high mobility group)[60]. Імунопреципітація хроматину з секвенуванням (ChIP-seq) виявила дуже велику кількість сайтів зв'язування TCF7L2 з ДНК[65 р. 2], як і у різних функціональних дослідженнях було ідентифіковано чимало генів, на експресію яких впливає даний регуляторний елемент[66]. Гени, що регулює TCF7L2 не обмежуються набором генів-мішеней Wnt. Іншими словами, Wnt-енхансеосома збирається далеко не на кожному TCF7L2 у клітині. Вочевидь, щоби бути спроможним зібрати енхансеосому і, відповідно, реалізувати Wnt-індуковану активацію генів, TCF7L2 повинен перебувати у підходящому для цього контексті[67]. Послідовності ДНК, що містять сайти необхідні для збору енхансеосоми, тобто можуть зібрати на собі необхідний «контекст» транскрипційних факторів, називають WRE – Wnt-responsive elements[68]. Для з'ясування цього контексту можна використати кореляційні експерименти з тим же ChIP-Seq. Так було виявлено деякі транскрипційні фактори, що часто розташовуються поруч з TCF7L2. Якщо для цих факторів транскрипції також доведена можливість взаємодії з TCF7L2, і вони розташовані в межах WRE, то можна припускати їх участь у зборі Wnt-енхансеосоми. Такими є, наприклад, CDX1/2[69 р. 2] людини та Sp5 і Sp8 миші[70].

Систематичних досліджень спрямованих на з'ясування універсальної граматики WRE, наразі, опубліковано не дуже багато, що свідчить про

відносну свіжість цього наукового питання і, відповідно, відсутність відповідей. Однак, деякі результати уже є. Наприклад, існують синтетичні WRE, що складаються з кластеру сайтів з високою афінністю до TCF розташованих трохи вище від мінімального промотора[68]. Такі конструкти дозволяють певною мірою зчитувати активність Wnt у клітинних культурах, але явно не відображають всієї можливої складності WRE. Так, репортери вбудовані під контроль оригінальних WRE значно краще дозволяють зчитувати активність Wnt-сигналіngu[71]. Це значить, що нативні WRE містять ще якусь інформацію необхідну для збору енхансеосоми, окрім сайтів зв'язуючих TCF.

Як було згадано вище, є підстави вважати білки CDX1/2 одним з учасників формування Wnt-енхансеосоми. Як і TCF7L2, CDX1/2 безпосередньо зв'язується з ДНК, і має визначені нуклеотидні мотиви, з якими може контактувати. Аналіз послідовностей відомих WRE показує, що там присутні мотиви сайтів TCF7L2 та CDX1/2, а також те, що ці ділянки багаті на CAG-повтори[67 р. 2]. Базуючись на цьому було створено бібліотеку синтетичних WRE, що містили різні комбінації мотивів TCF, CDX та CAG[67]. При випробовуванні цих WRE з репортерним геном у культурах клітин було отримано такі результати (рис. 1.5):



**Рисунок 1.5** – Будова різних синтетичних WRE та їх активність у різних клітинних лініях (за матеріалами[67]).

Ці результати демонструють деякі аспекти логіки збору енхансеосоми. По-перше, наявність мотивів TCF є необхідною і, часом, достатньою умовою для активації Wnt-індукованої експресії. Інші мотиви CDX та CAG не можуть самостійно реалізувати цю функцію, однак сприяють її реалізації разом з TCF. По-друге, оптимальна комбінація мотивів є різною для різних типів клітин, як видно з того, що найвища активація експресії  $\beta$ -катеніном у різних досліджуваних типах клітин спостерігається у різних конструктах.

Такі дані узгоджуються з моделлю «гнучкого білборда»[72]. Це модель роботи енхансерів, згідно з якою вони представлені наборами сайтів зв'язування факторів транскрипції, що можуть варіювати за складом і взаєморозташуванням. Тоді для активації достатньо зібрати разом певний набір факторів транскрипції, не важливо у якій послідовності. Така модель застосовна до деяких енхансерів[73], інші можуть працювати за більш суворими правилами[74], для третіх застосовують гібридні моделі. У випадку індукованої  $\beta$ -катеніном Wnt-енхансеосоми, як мінімум на рівні сайтів зв'язування, спостерігається логіка моделі «гнучкого білборда».

Канонічний Wnt-сигналінг регулює роботу багатьох генів водночас, і спільний ефект Wnt-індукованих змін експресії може призводити до системних змін клітини, реалізуючи програми трансформації. Вище було оглянуто механізми, які безпосередньо змінюють доступність цільових ділянок хроматину. Через природу цих механізмів, Wnt-індуковані зміни експресії є дуже контекст-специфічними, і, відповідно, Wnt-індуковані генетичні програми варіюють між різними типами клітин.

Наразі, ідентифіковано багато мішеней Wnt-сигналінгу людини, переважно техніками, що досліджують кореляцію змін експресії з активацією Wnt, і в контексті раку. Через природу Wnt-сигналінгу, результати кореляційних досліджень, як правило, є неоднозначними, оскільки тяжко

відрізнити зміни експресії викликані безпосередньою дією Wnt-енхансеосом і зміни експресії, що є вторинними. Завдяки розвитку методу імунопреципітації хроматину, ідентифікація прямих цілей Wnt-сигналінгу стала більш реальною, та все ж, існують певні обмеження. При дослідженні систем такого рівня складності, однією з основних проблем є складність валідації отриманих результатів і доведення наявності причинно-наслідкового зв'язку там, де спостерігається кореляція. Останнім часом, все більше дослідників обирають синтетичні підходи направлені на визначення граматики послідовностей ДНК, що можуть регулюватися Wnt-сигналінгом, але, як було зазначено вище, ця територія лишається практично незвіданою.

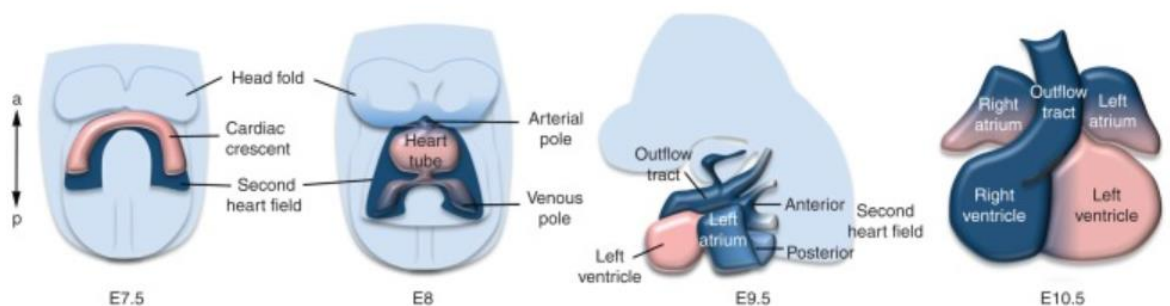
Беручи до уваги вищесказане, підтвердженими мішенями Wnt можна вважати гени для яких виявлено кореляцію експресії з активністю Wnt-сигналінгу (RNA-Seq, методи протеоміки), підтверджено наявність характерних елементів Wnt-енхансеосоми у проксимальному радіусі від кодуючої послідовності (ChIP-Seq), та доведено, що ця послідовність містить WRE (мутаційний аналіз та аналіз синтетичних конструктів). Дослідження останнього типу сприяють нарощенню масивів даних, на підставі яких можна було би проводити достовірний біоінформатичний пошук цілей Wnt, оскільки існуючі біоінформатичні підходи видають багато фальшиво-позитивних результатів[75].

Зі списком прямих і непрямих мішеней Wnt можна ознайомитись на веб-ресурсі “The Wnt Homepage”. Мішені включають гени задіяні у регулюванні клітинного циклу, ремоделюванні цитоскелету та міжклітинних контактів, контролі епітеліально-мезенхімального переходу, метаболізмі цукрів та жирів. Конкретні мішені і їх ролі буде розглянуто у контексті розвитку серця в наступному розділі.

### **1.3 Ранній розвиток серця і роль Wnt-сигналінгу у цьому процесі**

В ході ембріонального розвитку серце формується і починає функціонувати першим серед окремо взятих органів, оскільки транспорт газів і поживних речовин є необхідним з самого початку життя[4]. Процес утворення серця складний, і покладається на впорядковану одночасну проліферацію, міграцію і диференціацію клітин. Порядок забезпечується тонко налаштованою і чітко визначеною у часопросторі взаємодією різних сигнальних шляхів, включаючи  $\beta$ -катеніновий Wnt, Nodal, FGF та BMP[76].

Популяції клітин-попередників серця відслідковуються до первинної смуги на бластулі[77]. У людини ці клітини мігрують до своєї позиції нижче від головної складки і формують там серцеві зародки (cardiac primordia) – паралельні трубки направлені від голови до хвоста ембріона. У мишей серцевий зародок, ще званий серцевим півмісяцем (cardiac crescent), цілісний і схожий на підкову, рукава якої направлені каудально. Далі ці трубки/рукава зливаються, формуючи серцеву трубку, яка вже скорочується. Трубка скручується, утворюючи S-подібну структуру. Утворені внаслідок скручування контактні поверхні зростаються, перфоруються і стають анатомічно повноцінним серцем – з чітко видимими передсерддями та шлуночками (рисунок 1.6)[77].



**Рисунок 1.6** – Схема розвитку серця і вклад різних серцевих полів у різні елементи сформованого серця (за матеріалами[77]).

Безпосередньо перед формуванням серцевого зародку, канонічний Wnt індукує експресію мезодермальних маркерів *Vry* та *EOMES*, які в свою чергу активують первинний регулятор серцевої диференціації – *Mesp1*[78]. На цьому етапі формування серцевого зародка виокремлюють дві популяції клітин-

попередників – перше серцеве поле та друге серцеве поле. Клітини першого поля утворюють серцевий зародок і диференціюються першими, а клітини другого поля підтримують формування і диференціацію півмісяця і служать джерелом недиференційованих клітин на пізніших етапах. Цим групам характерні різні генетичні маркери[76]. Клітини першого поля швидко диференціюються і набувають скоротливий фенотип за короткий проміжок часу. Це відбувається завдяки інактивації Wnt-сигналіngu. Є свідчення, що у цій популяції реалізована *Mesp1* програма активує експресію інгібітора Wnt-сигналіngu – *Dkk1*[79]. З іншої сторони, інгібування Wnt відбувається зі сторони ектодерми[80]. В будь-якому разі, вимкнення Wnt-сигналіngu сприяє диференціації у напрямку кардіоміоцитів. Так, інактивація цього шляху у інших популяціях клітин за рахунок умовного нокауту  $\beta$ -катеніну призводить до утворення багатьох серцевих зародків у ембріоні[80].

Водночас, активність канонічного Wnt-сигналіngu у другому серцевому полі є необхідною для нормального перебігу процесу розвитку, оскільки без неї клітини другого поля передчасно виходять з проліферативного стану і диференціюються[81]. По мірі нормальної інтеграції клітин другого поля у згорнуту серцеву трубку і формуванні анатомічних компартаментів серця, активність канонічного Wnt-сигналіngu поступово спадає, і зростає активність неканонічних шляхів[82]. На цьому етапі відбувається побудова тонкої архітектури серця, і відслідковування активації різних шляхів та їх ефектів значно ускладнюється. Дослідження впливу Wnt-сигналіngu на пізніші етапи розвитку серця *in vivo* є проблематичним, оскільки дуже важко реалізувати пригнічення сигналіngu саме на цих етапах, не порушуючи їх функціональність на попередніх.

Для заповнення цих прогалів у розумінні процесу розвитку серця прибігають до досліджень з штучною індукцією кардіогенезу у культурах стовбурових клітин та ембріодних тілець. Очевидно, що таким системам бракує складності і впорядкованості, але це водночас дозволяє більш вільно використовувати синтетичні підходи. Наразі, інтенсивно ведуться роботи у

напрямку вирощування кардіальних органоїдів. Безумовно, прогрес у цьому напрямку допоможе зрозуміти як саме формуються тонка архітектура серця і диференціюються і розподіляються різні типи серцевих клітин.

#### **1.4 Фактори та ефектори перебудови неонатального серця**

Тонка архітектура серця визначена його функцією і її механічною реалізацією. Чотири камери є морфологічно та функціонально різними, і, відповідно, переживають різний гемодинамічний стрес та підтримують різні робочі режими. Різні популяції клітин, впорядковані у тканину, формують орган спроможний до постійного почергового скорочення та розслаблення, генеруючи різний тиск крові, створюючи різні натяги тканини та відповідаючи на різні біофізичні та біохімічні стимули у кожній з камер. Згідно з останніми транскриптомічними даними, у дорослому серці людини можна виокремити одинадцять основних типів клітин[83] – шлуночкові КМЦ, передсердні КМЦ, фібробласти, ендотеліальні клітини, перицити, гладенькі міоцити, імунні клітини (мієлоїдні та лімфоїдні), адипоцити, мезотеліальні клітини та нейрони. Камери серця мають різний відсотковий склад за типами клітин. Що стосується самих КМЦ, то видна чітка різниця між шлуночковими та передсердними популяціями. При цьому, ці популяції є неоднорідними – у шлуночках та у передсердях можна виокремити по 5 підтипів КМЦ. Не заглиблюючись в деталі, можна сказати що у шлуночкові КМЦ експресують більше білків задіяних у підтримці механічної цілісності тканини та генерації сильних скорочень, в той час як у передсерді КМЦ експресують більшу кількість механорецепторів і, що цікаво, ензим ROR2, що приймає участь у неканонічному Wnt[83].

Наразі, такого детального аналізу транскриптомів і, відповідно, ідентифікації клітинних типів, у пре- та неонатальних серцях не опубліковано. Однак транскриптоми[84] та протеоми[85] сердець на різних етапах розвитку значно відрізняються, що свідчить про диференціацію, яка має місце на проміжку часу між народженням та становленням серця дорослим. Гістологічні та біохімічні методи показують, що найінтенсивніших змін серце зазнає на ранніх етапах життя - мова йде про перші тижні та місяці життя для гризунів і людей відповідно[86].

Серце починає функціонувати ще на ранніх стадіях ембріогенезу, однак набуває повної функціональності лише у цей критичний проміжок часу після народження[4]. При народженні серце переходить у повноцінний робочий режим, і зазнає важливих фізіологічних змін необхідних для підтримки цього робочого режиму у перші години та дні після народження. Ці зміни, в свою чергу, індукують диференціацію клітин і ремоделювання тканин.

У ссавців, серцево-судинна система ембріона має артеріальну протоку (ductus arteriosus) – судину, що сполучає дихальну артерію та аорту[87]. По суті, це шунт, що дозволяє крові обходити наповнені рідиною, поки не функціонуючі, легені плоду. В нормі, у перші години після народження ця протока закривається, і, пізніше, зникає взагалі. Подібний шунт є також для печінки (ductus venosus), і його спіткає така ж доля в ранньому постнатальному розвитку[88]. Ця подія, а також відділення кровоносної системи плоду від кровоносної системи матері, призводять до різких змін у гемодинаміці. В цей же час змінюється  $pO_2$  крові новонародженого, оскільки в утробі плід перебуває у відносно гіпоксичних умовах[89]. Паралельно зростає загальне навантаження на серце, оскільки збільшуються енергетичні потреби організму, у зв'язку з початком автономного термогенезу, живлення та дихання[90]. Ці чинники є ініціаторами фізіологічних та анатомічних змін серця, що супроводжують постнатальну диференціацію.

У відповідь на збільшення механічного стресу та збільшення доступності кисню в серці відбувається два ключові процеси – зміна

енергетичного метаболізму[91], з переключенням на жирні кислоти як на основне джерело енергії, та кінцева диференціація клітин і їх перехід у фазу спокою[92]. При цьому КМЦ стають тетраплоїдними, за рахунок каріокінезу без цитокінезу[93], що, як вважається, дозволяє клітинам швидше синтезувати мРНК і, відповідно, білки. Після цього переходу КМЦ втрачають здатність до поділу і, значить, подальший ріст серця відбувається за рахунок гіпертрофії, а не гіперплазії[92]. Впродовж перших місяців життя людини середній об'єм КМЦ зростає у 30 разів[90]. Такі багатосторонні зміни явно перебігають за участі багатьох сигнальних шляхів. Раніше було показано, що  $\beta$ -катеніновий Wnt-сигналінг приймає участь у регуляції енергетичного метаболізму, а саме активації  $\beta$ -окиснення жирних кислот, а також сприяє гіпертрофічному росту серця у дорослих щурів[94]. Значна частина  $\beta$ -окиснення відбувається у мітохондріях, і масовий перехід клітин на цей тип енергетичного обміну на перманентній основі не обходиться без глобальних перебудов мітохондріюму[85].

КМЦ дорослого серця, як клітини з високим оборотом білків і енергетичним обміном, мають базову активну аутофагію[95]. В ході постнатального розвитку відбувається нарощення активності аутофагічних процесів до базального рівня. Зміна напрямків, сили і часової динаміки механічного натягу шлуночків і передсердь викликають активну перебудову цитоскелетів та ПКМ, що, звісно ж, включає переробку старих структур за участі фагосом[96]. Окрім цього, у певних ділянках серця аутофагія є особливо активною у зв'язку з фізичним ремоделюванням органу, як, наприклад, при розщепленні артеріальної протоки, чи закритті овального вікна передсердь (foramen ovale). Ключовими генами аутофагії у серці є *atg5*, *atg7* та *becn1*, і дослідження з нокадауном цих генів призводять до дефектів розвитку неонатального серця[97]. Мітофагія, як сукупність клітинних процесів і явищ, відноситься до аутофагії як підмножина. Вищезгадані гени *atg5* та *atg7* також є ключовими учасниками процесу мітофагії[98].

## Висновки до розділу 1

Отож, в ході раннього постнатального розвитку серце зазнає значних метаболічних, анатомічних та гістологічних змін. Ці перебудови є результатом взаємодії багатьох клітинних процесів, включаючи канонічний Wnt-сигналінг, ауто- і мітофагію. Конкретна роль цих явищ та їх молекулярні механізми лишаються нез'ясованими. Потенційною точкою сходження Wnt-сигналінгу та мітофагії є метаболічний перехід від вуглеводної до жирно кислотної енергетики. На підставі цього можна припускати, що існує зв'язок і між Wnt-сигналінгом та аутофагією, оскільки міто- та аутофагія мають багато спільних компонентів.

Пошук підтвердження взаємодії між ключовими генами ауто- і мітофагії (*atg5*, *atg7*, *becn1*) і загальне дослідження впливу канонічного Wnt-сигналінгу на стан та диференціацію неонатальних КМЦ можуть бути напрямками роботи для розширення розуміння процесу ранньої постнатальної диференціації КМЦ.

## 1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1. Об'єкт дослідження

В роботі використовували лінію лабораторних щурів *Wistar* – широко розповсюджену лабораторну породу без генетичних модифікацій. 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. У дослідах використовувались новонароджені щури (P1-3), забій проводився методом декапітації.

Усі манпуляції з живими тваринами проводилися експертами ІМБГ НАН України згідно європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також були схвалені комісією з біоетики ІМБГ НАН України.

### 2.2. Матеріали та обладнання дослідження

#### 2.2.1 Поживні середовища

Для культивування ізолюваних клітин використовували мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM) з додаванням кінської сироватки до 4%. Для різних варіантів дослідів було використано модифіковані середовища на основі DMEM (Sigma Aldrich):

- Середовище для інгібування канонічного Wnt-сигналіngu готувалось шляхом додавання до DMEM розчиненого у DMSO інгібітора XAV939 (ab120897, Abcam) до кінцевої концентрації 10  $\mu$ M.
- Середовище для активації канонічного Wnt-сигналіngu готувалось шляхом додавання до DMEM хлориду літію до концентрації 20 mM та кількості DMSO рівної кількості у середовищі для інгібування.

- Контрольне середовище для культивування без модуляції канонічного Wnt-сигналіngu готувалось шляхом додавання до DMEM кількості DMSO рівної кількості у середовищах для інгібування та активації.

### 2.2.2 Реактиви та обладнання

Для виконання експериментальної частини роботи використано наступні реактиви: етилендіамінтетрааміноацетат натрію (EDTA2Na), PBS, диметилсульфоксид, хлорид натрію (NaCl), глікоген, формальдегід, XAV939 (ab120897, Abcam), хлорид літію (вітчизняний виробник), антибіотики пеніцилін і трептоміцин, ензими трипсин і колагеназа, кінська сироватка крові, сироватка крові кози, желатин, 7-аміноактиноміцин D (7-AAD) (Becton Dickinson, США), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Германия), антитіла «anti-mouse Alexa Fluor® 488» (1:250, ab150113, Abcam), антитіла «Cardiac Troponin I Antibody» (19C7, Covalab), антитіла «Mouse anti-N-Cadherin» (33-3900, ZYMED Laboratories), антитіла до Ki67 (отримані і люб'язно надані у наше розпорядження канд. Біол наук, старшим науковим співробітником відділу сигнальних систем клітини ІМБГ НАН України Хоруженко А.І).

Лабораторне обладнання: мікроскоп PrimoStar (Carl Zeiss Microscopy, Німеччина), конфокальний мікроскоп Zeiss LSM510/uv Axiovert 200M, центрифуга Marathon Micro A (Fisher Scientific, США), шейкер (BIOSAN, Литва), CO<sub>2</sub>-інкубатор Jouan IGO 150 Cell Life (Thermo Fisher Scientific, США), фотометр для виміру оптичної густини ELx800 (BioTek, США), лазерний проточний цитофлуориметр BD FACSAria (Becton Dickinson, США), водяна баня (BIOSAN, Литва), стерильні шприцові фільтри з розміром пор 70 мкм (MilliPore, Германия) автоматичні піпетки, ваги, штативи, скальпелі.

А також лабораторний посуд: конічні колби, скляні лійки, паперові фільтри, скляні палички, чашки Петрі, скляні банки 200 мл, пробірки «Eppendorf», одноразові мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл та 0,2 мл,

одноразові наконечники для автоматичних піпеток, пластикові планшети на 12 та 96 лунок.

## **2.3. Методи дослідження**

### **2.3.1 Виділення та культивування неонатальних КМЦ щура**

Новонароджені щуренята віком до однієї доби забивались шляхом декапітації. Через торакальний надріз серця виймались, далі від них відокремлювались шлуночки. Шлуночки стерилізувались і тричі замивались від крові і уламків тканин у 10х-розчині пеніциліну і стрептоміцину (1000 од/мл та 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  відповідно) у PBS по 30 хв. Далі передсердя поміщались у 0,025% розчин трипсину і 0,01% EDTA у PBS та інкубувалися протягом ночі при 4° C для м'якої дисоціації тканин. Після цього розчин замінювали на 0,75 мг/мл розчин колагенази у середовищі L15 і шлуночки інкубувались протягом 5 хвилин при 37° C. На даному етапі шлуночки частково розчинялись, і клітинна суспензія переносилась у середовище DMEM. До нерозчинених фрагментів додавали свіжу порцію розчину колагенази і повторювали етап інкубації. Цей крок ітерувався до повного розчинення шлуночків.

Отриману клітинну суспензію у DMEM пропускали через нітроцелюлозний фільтр з розміром пор 70  $\mu\text{m}$  і центрифугували при 300 G протягом 5 хвилин. Супернатант зливали, клітини ресуспендували у свіжому DMEM з високим вмістом глюкози, 5% кінської сироватки і 10% сироватки великої рогатої худоби. Суспензію переносили у чаші Петрі і лишали на 30 хв у інкубаторі з температурою 37° C та 5% CO<sub>2</sub>. Цей етап дозволяє позбутися основної маси фібробластів, оскільки вони встигають седиментувати і прикріпитися до поверхні культурального посуду. Далі суспензія клітин відбиралась у окрему посудину, звідти брали зразок для встановлення кількості клітин у камері Горяєва. Після цього клітини розсівали на скельця

оброблені 1% розчином желатину розташовані у лунках 12-луночного планшету з щільністю 120 000 клітин на сантиметр квадратний скельця.

Далі клітини культивувались у інкубаторі з температурою 37° С та 5% CO<sub>2</sub>. На наступний день (приблизно 18 година культивування) середовище замінювали на відповідне для експерименту. Після цього середовище замінювали кожні 24 години.

### **2.3.2 Підготовка клітин та аналіз виживаності методом проточної цитометрії**

Після екстракції неонатальних КМЦ, їх було висіяно у 12-лункові планшети зі щільністю 250 000 клітин на лунку. Середовище для культивування було приготовано зарання з додаванням необхідних модуляторів для різних варіантів досліду. Також було зроблено варіант досліду без додавання DMSO. Планшет з культурою культивувався у інкубаторі з температурою 37° С і 5% CO<sub>2</sub> у атмосфері без перемішування. Кожні 24 години проводилась заміна середовища.

На третю добу культивування клітини відмивали від середовища розчином PBS, після чого клітини знімали розчином трипсину і версену та ресуспендували. Потім клітини осаджувалися центрифугуванням за 300 G протягом 10 хвилин і ресуспендувалися у середовищі DMEM.

Далі клітини було транспортовано у контейнері з танучим льодом до лабораторії клітинних та тканинних культур Інституту генетичної та регенеративної медицини АМН України. Там клітини було проаналізовано на лазерному проточному цитофлуориметрі BD FACSAria (Becton Dickinson, США) завідувачем лабораторії Кириком Віталієм Михайловичем. Безпосередньо перед аналізом суспензію клітин пропускали через клітинні фільтри з діаметром пор 70 μm. Відсоток загиблих та життєздатних клітин визначали за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину D (7-AAD) (Becton Dickinson, США), який додавали в

об'ємі 5 мкл та інкубували протягом 10 хв перед аналізом. Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програмного забезпечення BD FACS Diva 6.1.2 (Becton Dickinson, США). Підраховували 20 000 клітин для кожного зразка.

### **2.3.3. Підготовка імуногістохімічних препаратів КМЦ.**

Після екстракції неонатальних КМЦ, їх було висіяно у 12-лункові планшети на покриті желатином скельця зі щільністю 120 000 клітин на квадратний сантиметр скла. Середовище для культивування було приготовано зарання з додаванням необхідних модуляторів для різних варіантів досліду.

На третій день обробки хлоридом літію, інгібітором XAV939 чи нічим клітини було промито від залишків середовища у PBS і зафіксовано 4% розчином формальдегіду у воді протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Після трикратного промивання клітин PBS протягом 5 хвилин, клітини оброблювалися 0.1% розчином реактиву Triton X-100 (Sigma-Aldrich) протягом 10 хвилин для пермеабілізації. Після цього клітини були промиті у PBS тричі по 15 хвилин.

Для погашення аутофлуоресценції, клітини було оброблено 10 мМ розчином  $\text{CuSO}_4$  у 50 мМ амоній-ацетатному буфері (pH = 5) протягом 10 хвилин, після чого клітини знову було промито у PBS двічі по 10 хвилин. На наступному кроці клітини було витримано у 10% розчині сироватки кози протягом однієї години для блокування неспецифічних епітопів. Далі клітини було тричі промито у PBS по 10 хвилин. Після цього клітини інкубувалися з різними первинними антитілами, залежно від експерименту; обробка тривала по 16 годин при температурі 4° С. Після дворазового промивання у PBS по 10 хвилин, на клітини було нанесено вторинні антитіла «anti-mouse Alexa Fluor® 488» (1:250, ab150113, Abcam), обробка тривала 90 хвилин і проводилась при кімнатній температурі.

Зі скелець було обережно зняту зайву вологу і приготовано постійні препарати. Для цього скельця були закладені на предметне скло з середовищем для покриття, що містило ядерний барвник DAPI. Препарат фіксувався на склі і герметизувався толуол-сульфонамід-формальдегідним лаком.

## 2.4. Результати та їх обговорення

### 2.4.1. Біоінформатичний пошук WRE у генах *atg5*, *atg7* та *becn1* людини

Після проведення літературного пошуку було встановлено, що для WRE наразі не визначено консенсусну граматику. Один з підтверджених граматичних варіантів WRE включає сайти CDX1/2 та TCF7L2 взаєморозташовані за логікою гнучкого білборда[67 р. 2]. Експериментально було показано, що, по-перше, наявність мотивів TCF є необхідною і, часом, достатньою умовою для активації Wnt-індукованої експресії. Інші мотиви CDX та CAG не можуть самостійно реалізувати цю функцію, однак сприяють її реалізації разом з TCF. По-друге, оптимальна комбінація мотивів є різною для різних типів клітин.

Виходячи з цього, було вирішено почати пошук потенційних WRE у центральних генах аутофагії КМЦ з аналізу даних отриманих у експериментах з імунопреципітацією хроматину та секвенуванням (ChIP-seq). Для цього було здійснено пошук доступних результатів у БД ENCODE[99] (<https://www.encodeproject.org/>). Було знайдено результати для TCF7L2 (2011-2014 роки) для різних клітинних ліній людини. Далі було завантажено кінцеві результати цих дослідів, а саме піки зв'язування після відсічення піків з високим значенням невідтворюваності відкриття (IDR-thresholded peaks) у форматі .bigBed. Досліджені клітинні типи, каталогові коди експериментів з ENCODE та присутність піків зв'язування TCF7L2 у послідовностях цільових

генів наведено у таблиці 2.1. Аналогічний пошук варто було здійснити для CDX1/2, однак для них не було знайдено даних ChIP-seq у відкритому доступі. Таблиця 2.1 Результати пошуку ChIP-seq піків зв'язування TCF7L2 у сигнатурних генах аутофагії в КМЦ.

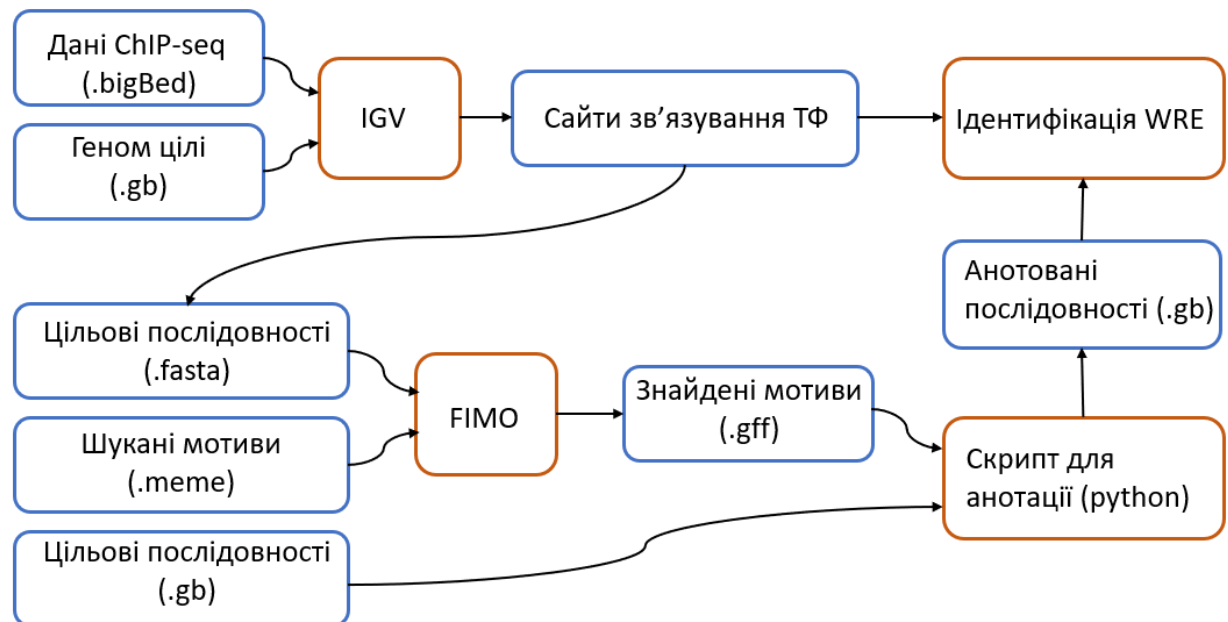
Клітинна лінія	Каталоговий код ENCODE	TCF7L2 при <i>atg5</i>	TCF7L2 при <i>atg7</i>	TCF7L2 при <i>becn1</i>
HCT116	ENCSR000EUV	-	+	-
HEK293	ENCSR000EUU	-	+	-
HeLa-S3	ENCSR000EVF	+	-	-
HepG2	ENCSR000EVQ	-	-	-
K562	ENCSR888XZK	-	-	-
MCF-7	ENCSR000EWT	+	-	-
Panc1	ENCSR000EXL	+	+	-

При вирівнюванні піків зв'язування TCF7L2 з референтним геномом hg18[100 р. 18] з допомогою програми Integrative Genomics Viewer[101] (IGV) стало видно, що TCF7L2 має консервативні локуси зв'язування у інтронах *atg5* та *atg7*, але не *becn1* (додатки 1-3). Піки для *atg5* та *atg7* було виявлено у різних клітинних лініях, однак, у контексті даного аналізу це не є критично, оскільки нас цікавить сама можливість зв'язування TCF7L2 у локусах цих генів. Після підтвердження такої можливості, наступним кроком є пошук WRE у цих локусах для з'ясування причетності виявлених TCF7L2 до формування Wnt-енхансеосоми і наявності зв'язку між канонічним Wnt-сигналіном та аутофагією.

Для цього було здійснено пошук мотивів TCF7L2 та CDX1 у послідовностях *atg5* та *atg7*. Для цього з бази даних JASPAR[102] було витягнуто матриці частот нуклеотидів для мотивів TCF7L2 та CDX1 людини у форматі .meme, а з NCBI нуклеотидну послідовність *atg5* та *atg7* у форматі .fasta. Далі через веб-інтерфейс MEME Suite[103] (<https://meme-suite.org/meme/>) було здійснено послідовний пошук мотивів у послідовностях

з допомогою інструменту FIMO[104] зі стандартними параметрами. В послідовності *atg5* було виявлено 52 та 68 мотивів TCF7L2 та CDX1 відповідно, і 89 та 81 у послідовності *atg7*. Результати пошуку було збережено у форматі .gff (General Feature Format).

На наступному етапі роботи було завантажено послідовності досліджуваних генів у форматі .gb (GenBank DNA). Для додання анотацій знайдених мотивів до послідовностей, необхідно було перевести записану у .gff-файлах інформацію про розташування мотивів у формат розділу “FEATURES” .gb-файлів. Для цього було написано скрипт мовою Python 3.9, з яким можна ознайомитися у додатку 2. Скрипт повертає відформатовані за стандартами .gb дані про розташування мотивів у послідовності у текстовому файлі, з якого ці дані було вручну внесено у .gb-файли послідовностей *atg5* та *atg7*. Таким чином було отримано анотовані послідовності *atg5* та *atg7*, які можна аналізувати з допомогою різних знарядь. Блок-схема пайплайну вищеописаного процесу наведена на рисунку 2.1.

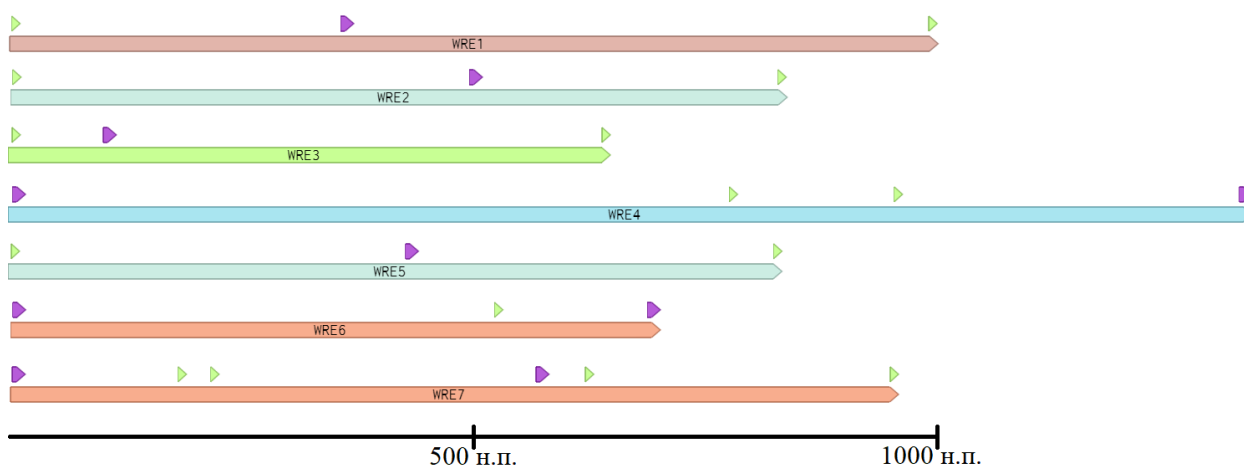


**Рисунок 2.1** – Пайплайн підготовки до пошуку WRE. Сині рамки позначають дані, коричневі – процеси.

Далі пошук потенційних WRE було здійснено вручну – отримані анотовані послідовності було візуалізовано у веб-сервісі Benchling

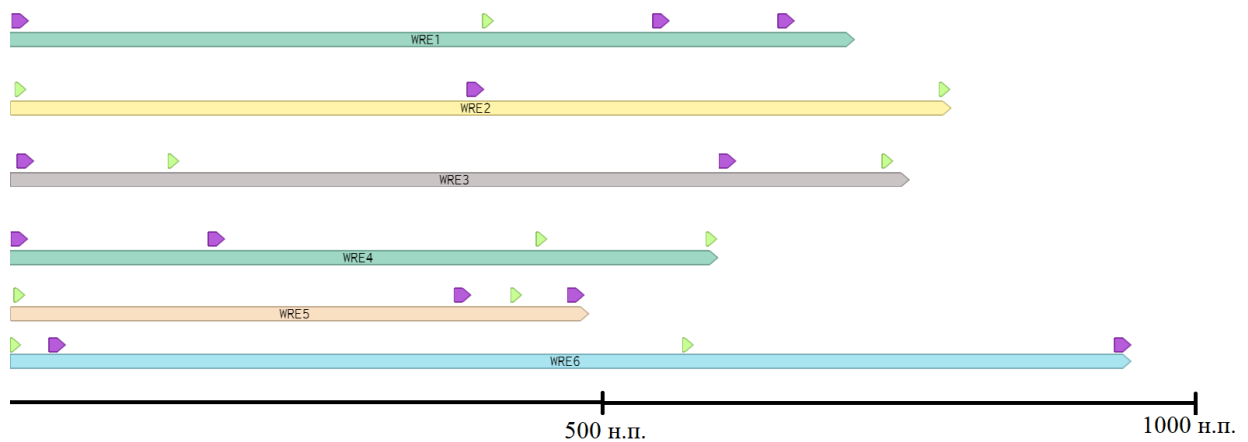
(<https://benchling.com>), і на отриманих картах генах розглянуто розташування мотивів CDX1 та TCF7L2. Керуючись граматиною розкритою раніше[67], було прийнято, що послідовності, які містять кластери TCF та CDX мотивів у безпосередній близькості (на проміжку до 1 т.п.н.), є потенційними WRE.

У *atg5* таким чином було ідентифіковано сім потенційних WRE, будова яких зображена на рисунку 2.2. Два з цих WRE співпадають за розташуванням з консервативними піками зв'язування TCF7L2 – посередині сьомого інтрону (WRE7), та у безпосередній близькості до другого екзону (WRE1). Як бачимо, WRE7 має складну структуру подібну до встановленої у іншій роботі[67] (рисунок 1.5).



**Рисунок 2.2** – Структура потенційних WRE у гені *atg5*. Фіолетові трикутники позначають мотиви TCF7L2, світло-зелені – CDX1.

У *atg7* також було ідентифіковано шість потенційних WRE (рисунок 2.3), однак достатньо чітких співпадінь за локусом з піками зв'язування TCF7L2 знайдено не було. При цьому WRE3, WRE5, WRE6 мають будову подібну до WRE7 у *atg5*.



**Рисунок 2.3** – Структура потенційних WRE у гені *atg7*. Фіолетові трикутники позначають мотиви TCF7L2, світло-зелені – CDX1.

#### 2.4.2. Визначення впливу модуляції канонічного Wnt-сигналіngu на виживаність КМЦ в культурі

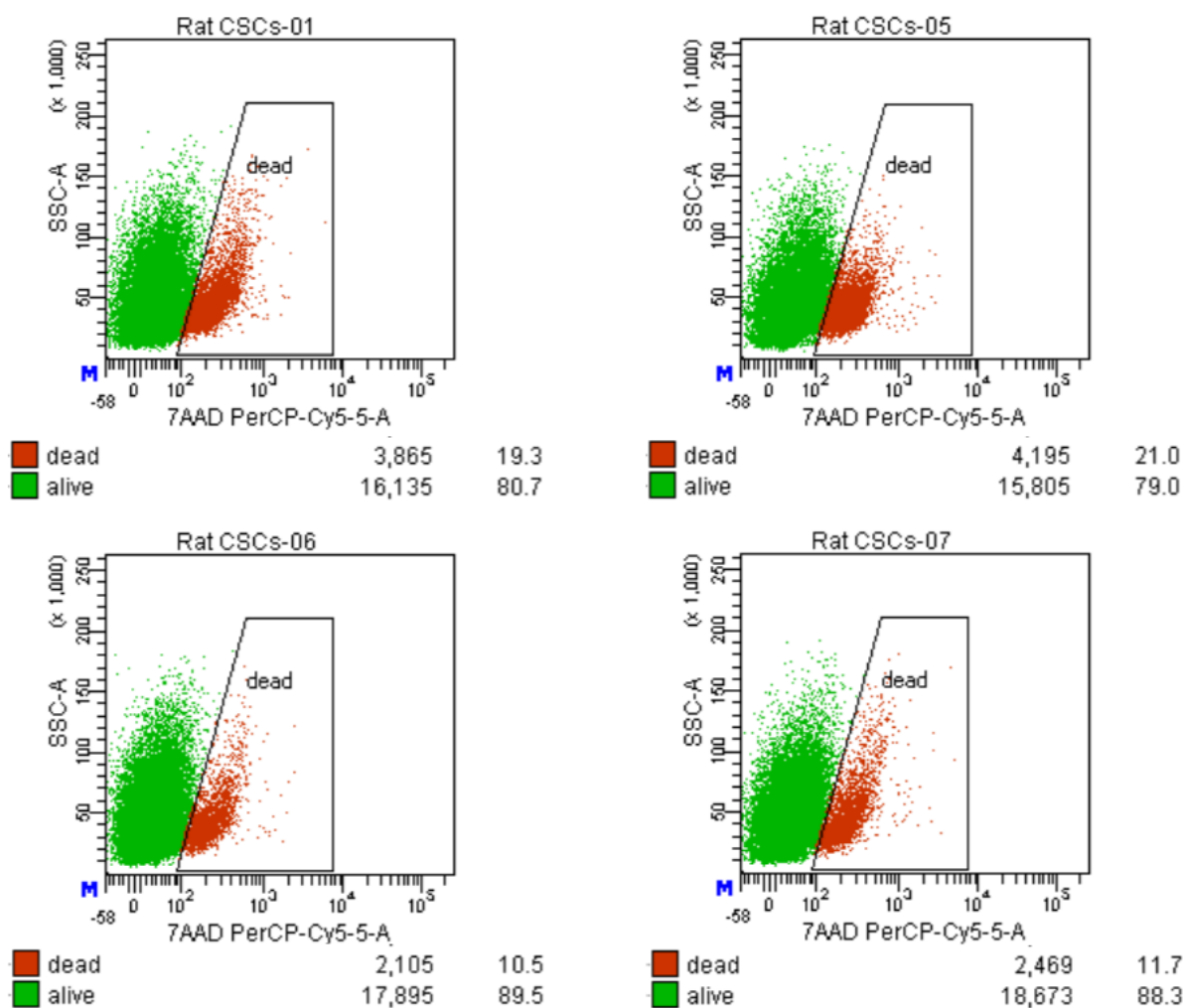
Після екстракції неонатальних КМЦ, їх було висіяно у 12-лункові планшети зі щільністю 250 000 клітин на лунку. Середовище для культивування було приготовано зарання з додаванням необхідних модуляторів для різних варіантів досліду. Також було зроблено варіант досліду без додавання DMSO. Планшет з культурою культивувався у інкубаторі з температурою 37° С і 5% CO<sub>2</sub> у атмосфері без перемішування. Кожні 24 години проводилась заміна середовища.

На третю добу обробки КМЦ знімалися як описано у методах, осаджувалися центрифугуванням за 300 G протягом 10 хвилин і ресуспендувалися у середовищі для культивування.

Далі клітини було транспортовано у контейнері з танучим льодом до лабораторії клітинних та тканинних культур Інституту генетичної та регенеративної медицини АМН України. Там клітини було проаналізовано на лазерному проточному цитофлуориметрі BD FACSAria (Becton Dickinson, США) завідувачем лабораторії Кириком Віталієм Михайловичем. Безпосередньо перед аналізом суспензію клітин пропускали через клітинні фільтри з діаметром пор 70 мкм. Відсоток загиблих та життєздатних клітин визначали за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину D (7-AAD) (Becton Dickinson, США), який додавали в об'ємі 5 мкл та інкубували протягом 10 хв перед аналізом. Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програмного забезпечення BD FACS Diva 6.1.2 (Becton Dickinson, США). Підраховували 20 000 клітин для кожного зразка.

Таким чином було отримано профілі флуоресцентності та розсіювання світла для популяцій КМЦ з індукцією канонічного Wnt-сигналіngu (Rat CSCs-06), інгібуванням канонічного Wnt-сигналіngu (Rat CSCs-07), присутністю DMSO у середовищі (Rat CSCs-05) та без DMSO (Rat CSCs-01). На основі цих даних було визначено відсоток живих клітин у популяції (рисунок 2.4).

Як бачимо, додавання DMSO у середовище не впливає на виживаність КМЦ. Цікаво те, що і інгібування, і активація канонічного Wnt-сигналіngu призводять до збільшення виживаності на приблизно 10%. Зважаючи на те, що для цього дослідження не було проведено достатньої кількості повторів, важко казати, наскільки це спостереження є достовірним. Однак, за умови що ці дані буде підтверджено, можна припускати, що нормальна для екстрагованих неонатальних КМЦ активність канонічного Wnt-сигналіngu робить клітини більш вразливими до стресу при культивуванні чи більш схильними до клітинної смерті.



**Рисунок 2.4** – Профілі розсіювання світла та виживаності у популяціях КМЦ без DMSO у середовищі (Rat CSCs-01), з DMSO (Rat CSCs-05), з індукцією канонічного Wnt-сигналіngu (Rat CSCs-06) та інгібуванням канонічного Wnt-сигналіngu (Rat CSCs-07).

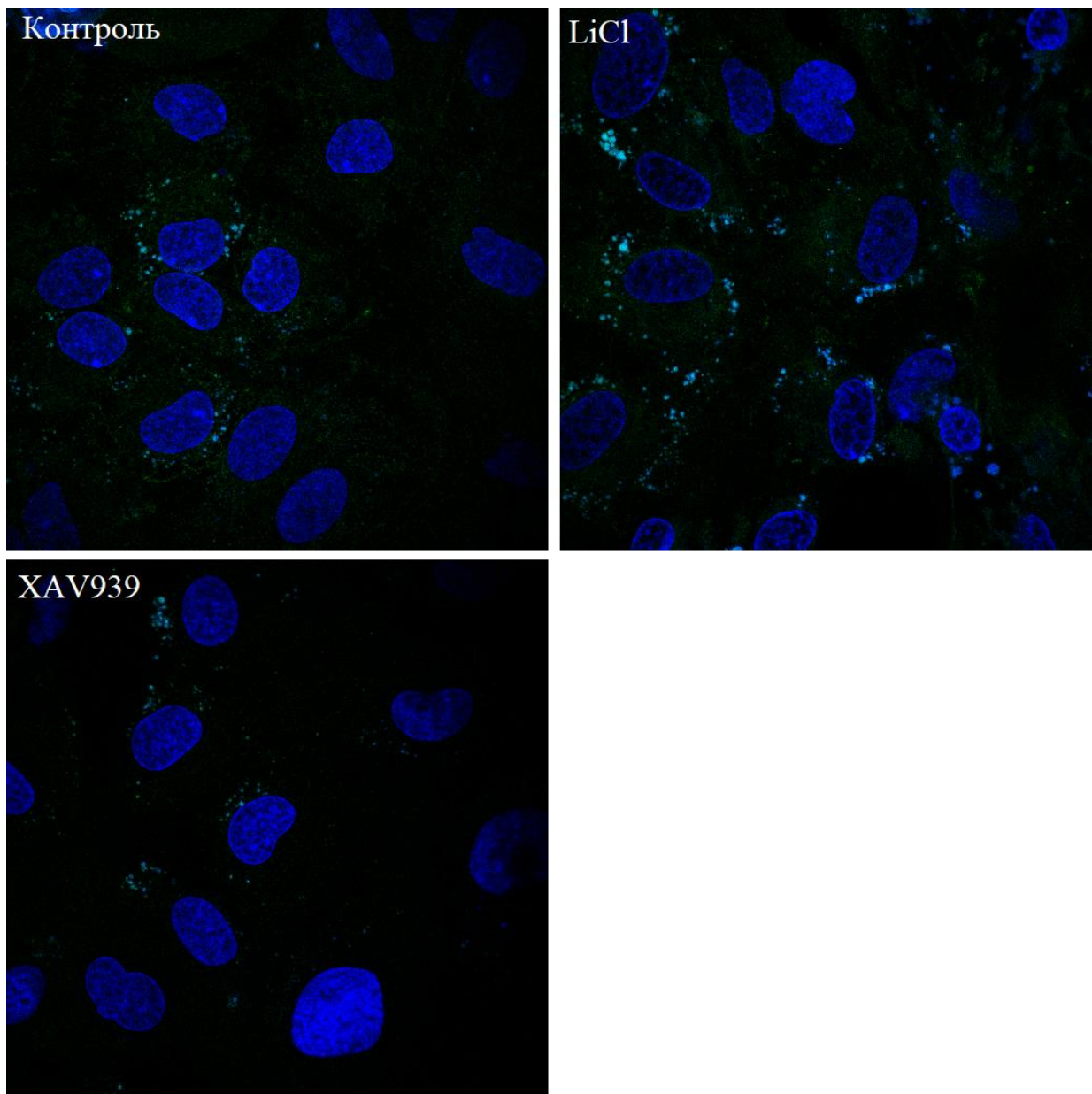
### 2.4.3. ІГХ аналіз фізіологічних змін у клітинах при модуляції Wnt-сигналіngu

Для дослідження впливу модуляції канонічного Wnt-сигналіngu на неонатальні КМЦ було підготовано препарати мічені антитілами до різних білків, задіяних у різних фізіологічних процесах (таблиця 2.2).

Таблиця 2.2 Використані у роботі антитіла

Білок	Антитіло	Функція	Локалізація
β-катенін	sc-7963, Santa Cruz	Елемент адгезивних контактів та канонічного Wnt-сигналіngu	Біля мембрани, при активному Wnt у цитоплазмі і ядрі
Ki67	Надане колегами	Маркер проліферації	У ядрі
N-кадгерин	(33-3900, ZYMED Laboratories	Центральний елемент адгезивних контактів	Біля і поза мембраною
Кардіальний тропонін I	19C7, Covalab	Елемент тропонінового комплексу, маркер диференціації КМЦ	Біля актинових філаментів

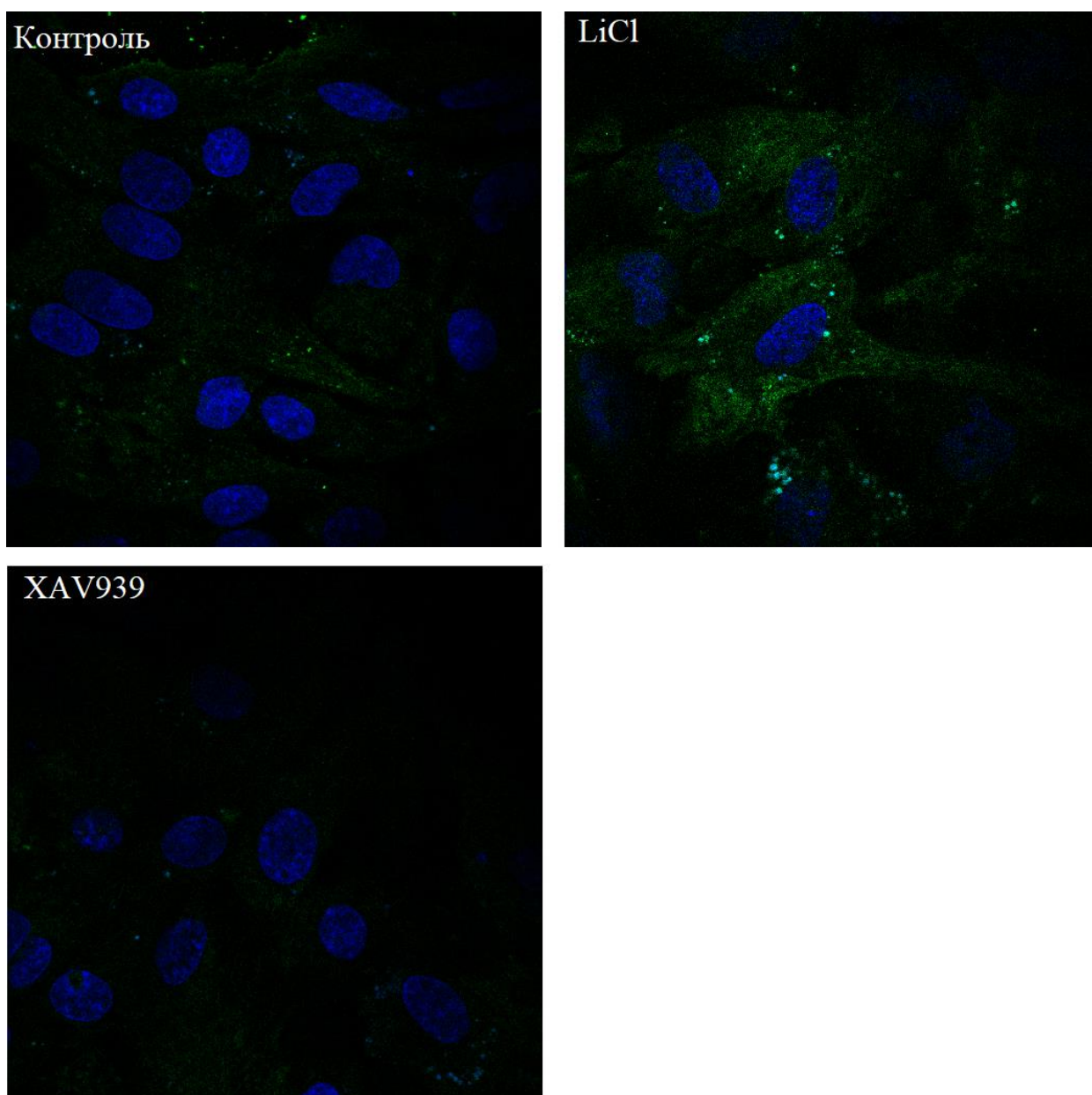
Для мічення антитілами мішеней використовувалися розведення стокового розчину антитіл у пропорції 1:100 у MilliQ воді. Флуоресцентна мітка вторинних антитіл поглинає довжину хвилі 495 нм і випромінює 519 нм. Аналіз препаратів проводився з допомогою конфокального мікроскопа Zeiss LSM510/uv Axiovert 200M разом зі старшим науковим співробітником ІМБГ НАН України Юнгін Ольгою Сергіївною.



**Рисунок 2.5** – Знімки препаратів КМЦ культивованих з модуляторами канонічного Wnt-сигналіngu з антитілами до  $\beta$ -катеніну. Барвник DAPI синій, флуоресцентна мітка антитіл зелена, бірюзовий – накладення синього і зеленого сигналів або артефакти.

Як видно зі знімків (рис. 2.5), канонічний Wnt-сигналінг в нормі активний у неонатальних КМЦ, що свідчить про його роль на даному етапі диференціації серця. Гіперактивація хлоридом літію не збільшує інтенсивність фарбування  $\beta$ -катеніну значною мірою. Зелений сигнал відслідковується і у цитоплазмі, і у ядрі досліджуваних клітин, також за ним

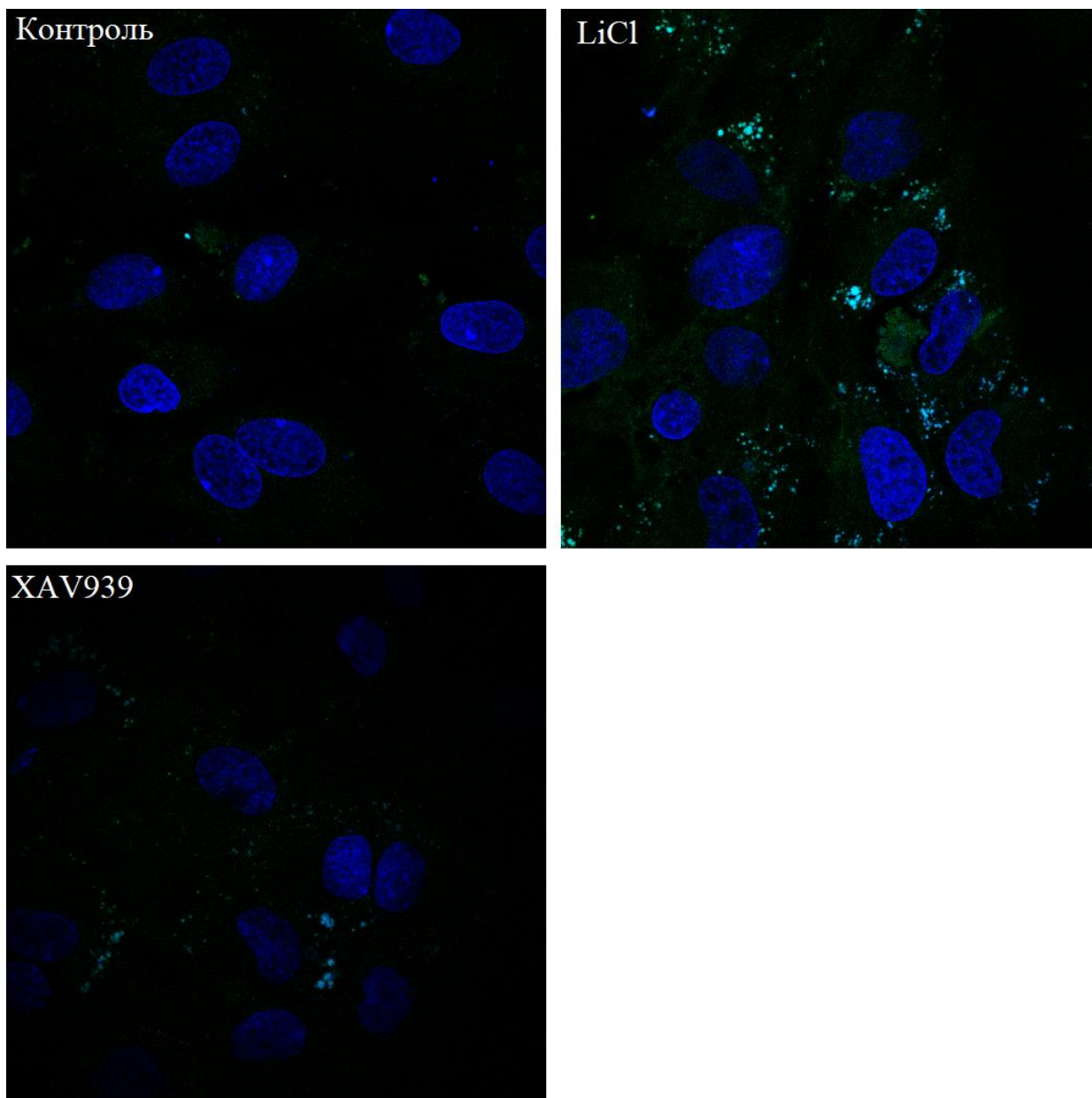
можна чітко визначити контури клітин. Чітких кластерів  $\beta$ -катеніну на мембранах виявлено не було, що, напевно, викликано недостатньою роздільною здатністю використовуваного обладнання. У КМЦ культивованих у середовищі з інгібітором зелений сигнал практично відсутній, тобто кількість вільного  $\beta$ -катеніну нижча від порогу детекції. Це також свідчить про функціональність використовуваної системи модуляції.



**Рисунок 2.6** – Знімки препаратів КМЦ культивованих з модуляторами канонічного Wnt-сигналіngu з антитілами до маркера проліферації Ki67.

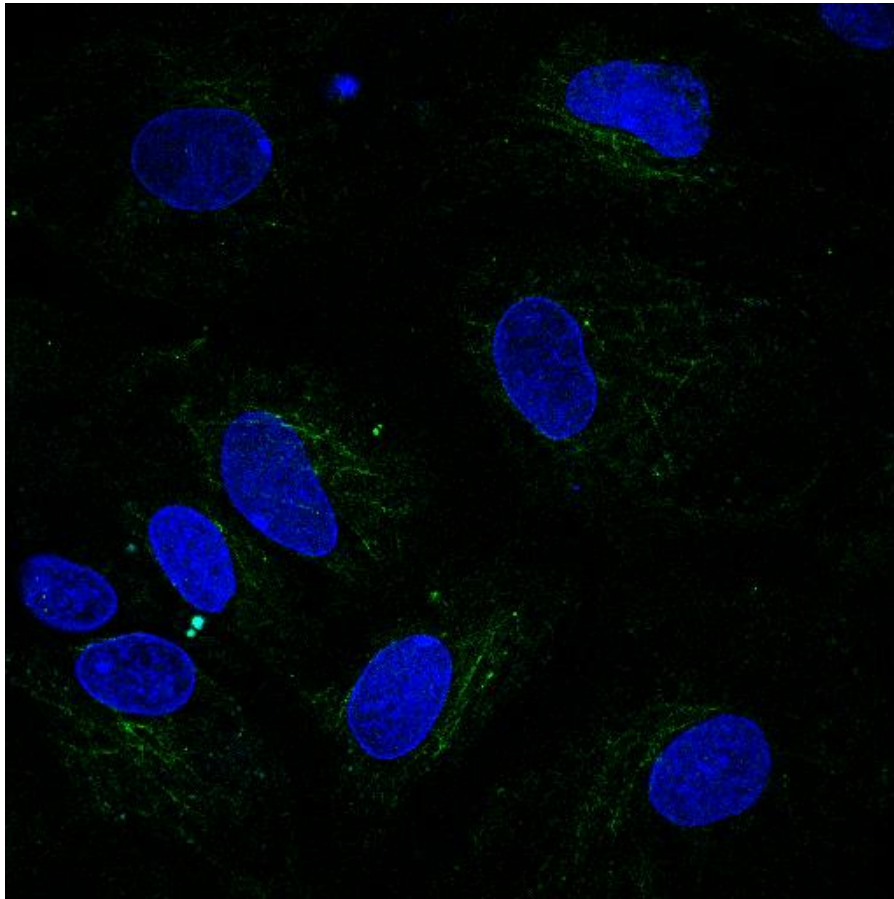
Барвник DAPI синій, флуоресцентна мітка антитіл зелена.

На препараті з антитілами до маркера проліферації Ki67 видно (рис. 2.6), що зелений сигнал, переважно, знаходиться у цитоплазмі і чітко означає контури клітин. Особливої різниці між контролем і індукцією Wnt-сигналіngu не спостерігається, однак при інгібуванні сигнал практично відсутній. Варто зауважити, що такий результат є вкрай сумнівним, оскільки згідно зі свідченнями знайденими у літературі, Ki67 локалізується у ядрі, і тому така кількість сигналу у цитоплазмі є підозрілою. Ймовірно, якість використовуваних антитіл на момент підготовки препаратів була сумнівною, що привело до неспецифічного зв'язування і фарбування невизначених цілей у цитоплазмі. На жаль, на підставі отриманого препарату не можна робити висновки щодо впливу модуляції канонічного Wnt-сигналіngu на проліферацію неонатальних КМЦ.



**Рисунок 2.7** – Знімки препаратів КМЦ культивованих з модуляторами канонічного Wnt-сигналіngu з антитілами до N-кадгерину. Барвник DAPI синій, флуоресцентна мітка антитіл зелена, бірюзовий – накладення синього і зеленого сигналів або артефакти.

На препаратах з антитілами до N-кадгерину видно, що при гіперактивації канонічного Wnt-сигналіngu збільшується кількість цього білку у клітині, при чому локалізується він у цитоплазмі. На знімку КМЦ культивованих без модуляціх Wnt-сигналіngu видно, що N-кадгерин локалізується кластерами, як, напевно, є місцем розташування адгезивних контактів.



**Рисунок 2.8** – Знімок препарату КМЦ з антитілами до кардіального тропоніну I без модуляції канонічного Wnt-сигналіngu. Барвник DAPI синій, флуоресцентна мітка антитіл зелена, бірюзовий – накладення синього і зеленого сигналів або артефакти.

Аналіз препаратів з антитілами до кардіального тропоніну I показав, що і активація, і інгібування канонічного Wnt-сигналіngu призводить до зменшення синтезу кардіального тропоніну I клітинами до рівнів, які неможливо визначити методами ПГХ. Тропонін I є компонентом скоротливого апарату клітини і одним з маркерів диференціації КМЦ. Відсутність зеленого сигналу на препаратах КМЦ культивованих з модуляцією Wnt-сигналіngu свідчить про те, що нормальна активність цього шляху є необхідною для постнатальної диференціації КМЦ.

## Висновки до розділу 2

Отож, було на підставі доступних у публічних БД експериментальних даних і відомих фактів про логіку роботи WRE було ідентифіковано 6 потенційних WRE у послідовності гена *atg7* та 7 потенційних WRE у послідовності гена *atg5* людини. В ході аналізу отриманих даних було знайдено підстави вважати, що один з цих елементів (WRE7 гену *atg5*) дійсно є WRE. Це є сильним свідченням на користь існування зв'язку між канонічним Wnt-сигналіном і ауто- та мітофагією кардіоміоцитів. Для остаточного підтвердження цього необхідно перевірити здатність послідовності WRE7 ініціювати транскрипцію у відповідь на канонічний Wnt-сигналінг *in vitro*.

Окрім цього було проведено ряд експериментів для дослідження впливу модуляції канонічного Wnt-сигналінгу на неонатальні КМЦ. Аналіз виживаності КМЦ на проточному цитометрі показав, що модуляція канонічного Wnt-сигналінгу призводять до збільшення виживаності на приблизно 10%. Можна припускати, що нормальна для екстрагованих неонатальних КМЦ активність канонічного Wnt-сигналінгу робить клітини більш вразливими до стресу при культивуванні чи більш схильними до клітинної смерті, однак такі висновки вимагають додаткового підтвердження.

Імуногістохімічний аналіз підтвердив дієвість використовуваної системи модуляції канонічного Wnt-сигналінгу, а також показав, що його модуляція порушує процес ранньої постнатальної диференціації КМЦ щура.

## 3 СТАРТАП ПРОЕКТ

### 3.1 Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінностей

Загальна характеристика розробки: створення генетичних конструктів з синтетичними і природними WRE для репортування активності канонічного Wnt-сигналіngu у лабораторній практиці.

Бізнес ідея: виробництво і продаж специфічних тест-систем.

Об'єкт дослідження: WRE різних генів людини та інших тварин.

Місце розробки в інноваційному ланцюжку цінності: проект знаходиться на стадії proof-of-concept, необхідні подальші дослідження і інженерні зусилля для створення першого прототипу.

Продукт наукової розробки: послідовності WRE та синтетичні WRE-подібні послідовності на їх основі.

Технології: різні варіанти синтезу послідовностей ДНК.

Доступність сировинної бази: сировина у вигляді хімічних та біологічних реактивів, а також необхідних культур доступна на ринку.

Кваліфікація персоналу: у технологічному процесі задіяні типовий персонал молекулярно-біологічного комплексу (генні інженери, біохіміки, клітинні біологи, наукові менеджери)

Ринок збуту: державні і приватні науково-дослідницькі інститути зацікавлені у Wnt-сигналіngu, структуруванні органоїдів чи синтетичних тканин.

Цінність: набір тест-систем для спеціалізованих досліджень.

Модель підприємництва: B2B

Розширені характеристики подано в таблиці 3.1

Таблиця 3.1. Характеристики підприємства.

Сутність ідеї	Виробництво і продаж специфічних тест-систем.
Продукт	Синтетичні послідовності WRE та репортерні конструкти на їх основі
Наявність аналогів або прототипів	Неспецифічні репортери під контролем синтетичних та натуральних WRE
Основна потреба, яку задовільнить реалізований стартап	Відслідковування контекст-специфічної активації WNT-сигналіngu для наукових потреб.
Суб'єкт замовлення	Не визначено
Об'єкт дослідження	Гени, що містять WRE
Мета наукової розробки	Створення бібліотеки послідовностей що є специфічними для різних клітинних ліній та організмів WRE
Ступінь розробленості технології реалізації	На початковому етапі, не завершено proof-of-concept для першого прототипу
Наявність готового технологічного обладнання	Надається суб'єктом замовлення
Готовність бази постачальників для реалізації замовлень стартапу	В процесі фіналізації
КВЕД	72.11 (дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій)
Очікувана потужність стартапу	Мале підприємство (на старті)
За масштабом виробництва	Серійне
За рівнем спеціалізації	Вузкопрофільне
За ресурсами, що споживатимуться	Капіталомістке
За чисельністю персоналу	Мале
За рівнем технологічної цілісності	Дочірнє утворення
За організацією виробничих процесів	Періодичне
Органи управління	Національні

Продовження Таблиця 3.1

Географічне розташування а) потужностей	Європа, Китай та інші місця з достатньо розвиненою інфраструктурою пов'язаною з синтезом і аналізом послідовностей ДНК.
б) офісу	Безпосередньо при потужностях.
в) збутової мережі	Науково-дослідні інститути по всьому світу
г) постачальників комплектуючих	Європа і Китай
Місце ідеї у ланцюжку цінностей	Розробка
Бізнес-модель стартапу	B2B
Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Відсутні
Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Відсутні
Ключові фактори успіху стартапу	Унікальність продукту, зручність дизайну.
Споживачі на етапі розвитку	Державні і приватні науково-дослідницькі інститути зацікавлені у Wnt-сигналінгу, структуруванні органоїдів чи синтетичних тканин.
Споживачі на етапі зрілості	Державні і приватні науково-дослідницькі інститути зацікавлені у Wnt-сигналінгу, структуруванні органоїдів чи синтетичних тканин.
Конкурентна ціна на продукт стартапу	60 000 грн
Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	30.9%
Капіталовкладення у проект	90 577 140 грн
Період повернення капіталовкладень у проект	10 років
Джерела фінансування	Національні, зовнішні, внутрішні

Продовження Таблиця 3.1

Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Плазмідна ДНК з послідовностями синтетичних WRE та спряжених репортерів.
Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)	Відсутні

### 3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовищ стартапу та ключові фактори його успіху

Таблиця 3.2 – Загрози і можливості зовнішнього середовища

Загрози	Можливості
<b>Фактор – Політика</b>	
Погіршення політичної ситуації та, відповідно, відносин із державами, на території яких розташовані цільові споживачі	Приваблення закордонних інвесторів та розширення ринку збуту
Зміни у податковій системі і законодавстві стосовно досліджень біології розвитку та розробок у серії регенеративної та трансплантологічної медицини.	Законодавче полегшення досліджень біології розвитку та розробок у серії регенеративної та трансплантологічної медицини.
<b>Фактор – Економіка</b>	
Збільшення цін на сировину необхідну для розробки і синтезу синтетичних послідовностей ДНК	Збільшення цін на продукт
Криза економіки через епідеміологічну ситуацію	Інтенсивний розвиток економіки у післякризовий період

## Продовження Таблиця 3.2

<b>Фактор - Географія</b>	
Сировина доступна, а модифікація незапатентована, що може стати причиною появи конкурентів	Погіршення стану середовища привабить більший інтерес до напрямків досліджень, в яких застосовується продукт.
<b>Фактор – Демографія</b>	
Скептичне ставлення народних мас до біомедицини	Демографічне старіння створить попит на продукти, для розробки яких необхідний наш
<b>Фактор – Науково-технічний прогрес</b>	
Ймовірність появи розробок і відкриттів, що дозволять обійти потребу у тонкому контролі цільових генів Wnt-сигналіngu	Можливість механізації і автоматизації більшості технологічних процесів. Можливе знаходження нових потенційних генів та послідовностей, що будуть цікавими споживачу.

Зовнішнє оперативне середовище містить наступні фактори: постачальників, посередників, споживачів. Його переваги та недоліки наведено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Переваги і недоліки зовнішнього оперативного середовища

<b>Переваги</b>	<b>Недоліки</b>
<b>Фактори – Постачальник, Виробник</b>	
Впевненість у якості сировини.	Обов'язкова сертифікація сировини.
Виробництво вимагає стандартне неспецифічне біотехнологічне обладнання, що доступне у багатьох країнах.	Виробництво вимагає великих вкладень у вигляді обладнання і факторів для залучення рідкісних кадрів.
<b>Фактор - Споживач</b>	
Оптимальна тест-система для складного досліджу.	Специфіка роботи, що не дозволить використовувати наші тест-системи.

Продовження Таблиця 3.3

<b>Фактор - Посередники</b>	
Основні функції посередника та логістичні функції бере на себе потенційний суб'єкт замовлення	Збільшення вартості готової продукції.
<b>Фактор - Конкуренти</b>	
У даній специфічній ніші продукт має перевагу над альтернативами внаслідок їх відсутності.	Потенційні: компанії що займаються синтезом генів та генетичних тест-систем.

За результатами аналізу факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ було сформовано перелік зацікавлених сторін (Таблиця 3.4)

Таблиця 3.4 – Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив на реалізацію проекту	Цікавість до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
<b>Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища</b>			
Конкурент	В разі недобросовісності, може впливати негативно шляхом демпінгування цін на власну сировину	Зацікавлений у тому, щоб проект не був реалізований чи не окупився	0,1
Посередник	Керує логістичними процесами, відповідає за збут продукції.	Зацікавлений у тривалій співпраці на взаємовигідних умовах, тобто у розвитку виробництва	0,5

Продовження Таблиця 3.4

Споживачі	Формують попит, що впливає на обсяги виробництва та продажу	Зацікавлені у покупці ефективного товару за оптимальною ціною	0,2
Суб'єкти зовнішнього середовища			
Суб'єкти економічного середовища	Впливають на обсяги продажів через зміну економічних показників (інвестування коштів, курси валют, умови кредитування тощо)	Розвиток регенеративної медицини – перспективна сфера, так як є пунктом у стратегіях розвитку більшості країн.	0,1
Суб'єкти географії	Невизначений вплив	Зацікавленості немає	0,05
Суб'єкти демографії	Старіння населення (збільшує кількість потенційних споживачів)	Зацікавлені у розробках продуктів, що можуть покращити якість життя або вберегти від її погіршення	0,1

Продовження Таблиця 3.5

Суб'єкти культурного середовища	Новини про продукт стартапу можуть нести позитивний чи негативний відтінок, а, відповідно, чинити позитивний чи негативний вплив на обсяги реалізації	Зацікавлені в появі нових технологій та продуктів	0,1
Суб'єкти НТП	Підвищення якості освіти та розробка нових технологій приведе до появи конкуруючих виробників	Незацікавлені у релокації фахівців за кордон	0,1

Також було проведено аналіз внутрішнього середовища, що забезпечує визначення сильних та слабких сторін в процесі реалізації стартап-проекту (Таблиця 3.5).

Таблиця 3.5 – Переваги і недоліки внутрішнього середовища

Складові внутрішнього середовища	Переваги	Недоліки
Реклама	В2В-продажі, участь у заходах присвячених біотехнологіям та високим медичним технологіям (форуми, симпозиуми), просування продукції через потенційних партнерів	Високий вплив репутації та бізнес-процесів потенційного суб'єкта замовлення на ефективність реалізації проекту

Продовження Таблиця 3.5

Фінанси	Велика кількість потенційних інвесторів	Залежність від зовнішніх інвестицій
Виробництво	Не залежить від географічних факторів	Вимагає дорогого обладнання
Персонал	Міжнародний ринок праці	Більшість співробітників потребують специфічної освіти або високої кваліфікації, а відповідно – високих зарплат.
Організація управління	Залучення до роботи підприємства спеціалістів з бізнес планування та маркетингів.	Невелика чисельність адміністративного персоналу на етапі розвитку.

### 3.3. Визначення потенційних споживачів

Огляд основних груп потенційних споживачів та їх потреб наведено у Таблиця 3.10.

Таблиця 3.10 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія (група) клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
Суб'єкт замовлення	Вихід на світовий ринок
Біотех та біомедтех компанії	Знаряддя необхідне для технологічних процесів вирощування структурованих органів та тканин

Таблиця 3.11 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
Науково-дослідні інститути	
1. Форма власності	Державні та приватні
2. КВЕД	72.11: Дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій
3. За потужністю	середні, великі
4. За масштабом виробництва	серійні, масові
5. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільні, багатoproфільні
6. За ресурсами, що споживаються	Працемістки, матеріаломістки
7. За чисельністю персоналу	середні, великі
8. За сферою діяльності	Оптова торгівля
9. За приналежністю капіталу і контролю	Національні, іноземні
9. За приналежністю капіталу і контролю	національні, іноземні, спільні багатонаціональні
10. За географічним розташуванням	Україна, інші країни
11. За віддаленістю органів управління	Національні, іноземні, транснаціональні
12. За характером господарської діяльності	Науково-дослідні, медичні
13. За рівнем технологічної цілісності	Провідні, дочірні, філії
14. За долею іноземного капіталу	Без іноземних інвестицій, з іноземними інвестиціями, іноземні
15. За формуванням статутного капіталу	Унітарні, корпоративні
16. За організацією виробничих процесів	періодичні, безперервні

17. За роботою протягом року	позасезонні
------------------------------	-------------

Основними клієнтом на старті виробництва виступає потенційний суб'єкт замовлення, а в подальшому при підтвердженні рентабельності розробки – можливе залучення чи асиміляція іншими компаніями.

Проведено планування обсягу реалізації продукції у початковому періоді – на перший рік виробництва (Таблиця 3.12). Враховано цикл розробки і підтвердження генетичного дизайну, який займає 8-16 місяців. У початковій, випробувальній стадії реалізації планується створити специфічні репортери для трьох клітинних ліній.

### **3.5 Оцінка ринкових позицій інноваційної розробки**

#### **3.5.1 Джерела фінансування**

Основними джерелами фінансування є кошти компанії-суб'єкта замовлення, державні та міжнародні інвестиційні фонди.

#### **3.3.2 Розрахунок ціни інноваційної пропозиції**

Проведено розрахунки ціни інноваційної пропозиції на ринку за різними методами. Для розрахунку розміру амортизаційних відрахувань необхідно розрахувати розмір основних фондів стартапу, що наведені у таблиці 3.14.

Таблиця 3.14 – Вартість основних фондів стартапу

Одиниця	Кількість, шт	Вартість одиниці, грн	Вартість за кількість обладнан ня, грн
Ламінарна шафа	2	967 000	1 934 000
Термосайклер	2	540 000	1 080 000
Конфокальний мікроскоп	1	1 620 000	1 620 000
Термостат з регуляцією атмосфери і температури	3	440 000	1 320 000
Автоклав	1	200 000	200 000
Загальний лабораторний інвентар	2	1 000 000	2 000 000
<b>Загальна вартість</b>			<b>8 234 000 грн</b>

Амортизація техніки, інвентарю, споруд – термін експлуатації 5 років:

$$A = OЗ / T_{\text{експл}} = 8\,234\,000 / 5 = 1\,646\,800 \text{ грн/рік.}$$

В таблиці 3.15 наведені заробітні плати працівників для розрахунку фонду оплати праці.

Таблиця 3.15– Заробітні плати працівників

Посада	Кількість працівників	Заробітна плата на одного працівника грн/міс	ЗП, грн/рік
Директор- розробник	1	80 000	960 000
Генний інженер	2	50 000	600 000
Клітинний біолог	1	50 000	600 000
Технічний персонал	2	25 000	300 000
Всього			2 460 000

Таблиця 3.16 – Вартість оборотних засобів

Оборотні засоби	Ціна, грн/од	Кількість, шт	Загальна вартість, грн/рік
Витратне лабораторне обладнання	2000	50	100 000
Реактиви та середовище	1000	300	300 000
Електроенергія	2,5 грн/кВт*год	250 кВт*год/міс	5040
Водопостачання	21,756 за 1м <sup>3</sup>	20 м <sup>3</sup> /міс	5221
Трансфер			150 000
Адміністративні витрати			500 000
Оборотні засоби			1 242 140

Отже собівартість проекту складає:

$$C = A + \text{ОбЗ} = 1\,160\,261 + 1\,242\,140 = 2\,403\,401 \text{ грн/рік.}$$

Плановий вихід продукту: 300 од/рік

Собівартість одиниці: 8 011,33 грн

1. Витратний метод.

$$Ц = C + \%П = 8\,011,33 \text{ грн} + 2\% = 8\,172 \text{ грн.}$$

Де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн., %П – відсоток прибутку, %П = 1-3%.

2. Параметричний метод.

$$Ц_n = \frac{B_n}{B_b} \cdot Ц_b = \frac{4.5}{4} \cdot 14150 = 15\,918,75 \text{ грн}$$

Де Ц<sub>н</sub> – ціна нового продукту, грн., Ц<sub>б</sub> – ціна базового продукту (був ріпак), грн., B<sub>б</sub> – бали за властивості базового продукту, B<sub>н</sub> – бали за властивості нового продукту

3. Метод точки беззбитковості.

$$Ц = C = 10\,123,9/9\,925,4 = 1.02 \text{ грн.}$$

Де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн.

## 4. Метод конкурентних цін.

$$Ц = \frac{Ц_{x1} + Ц_{x2} + Ц_{x3}}{N} = \frac{14150 + 7550 \text{ грн}}{2} = 10\,850 \text{ грн.}$$

Де Ц – ціна одиниці товару, грн.,  $Ц_{x1,x2}$  – ціни конкурентів, грн., N – кількість використаних цін конкурентів.

Для ціноутворення були проаналізовані різні методи, а також вибрана ціна продукту у 13 000 грн.

### 3.3.3 Техніко-економічні показники стартап-проекту

## 1. Річний обсяг реалізації ідеї:

$$B = 300 \text{ од.}$$

## 2. Капіталовкладення у проект:

$$K = OF + OB3 = 5\,616\,000 + 961\,140 = 6\,577\,140 \text{ грн.}$$

на одиницю продукції:

$$K = 6\,577\,140 / 210 = 31\,319,71 \text{ грн/од.}$$

## 3. Повна собівартість:

$$C = A + OB3 = 1\,123\,200 + 961\,140 = 2\,084\,340 \text{ грн.}$$

на одиницю продукції:

$$C = 2\,084\,340 / 210 = 9\,925,4 \text{ грн/од.}$$

## 4. Відносний прибуток:

$$П = 13\,000 - 9\,925,4 = 3\,074,6 \text{ грн/од.}$$

## 5. Рентабельність:

$$P = (П/C) \times 100\% = (3\,074,6 / 9\,925,4) \times 100\% = 30,9\%.$$

## 5. Період повернення капіталовкладень:

$$T_{\text{пов}} = K/П = 31\,319,71 / 3\,074,6 \sim 10 \text{ років}$$

## 6. Фондовіддача виробничих фондів:

$$ФВ = (Ц \times B) / OF = (13000 \times 210) / 5\,616\,000 = 4,86 \text{ грн}$$

## 7. Фондоємність:

$$ФЄ = 1/ФВ = 1/4,86 = 0,2 \text{ грн/грн.}$$

## 8. Коефіцієнт економічної ефективності:

$$E = П/K = 3\,074,6 / 31\,319,71 = 0,09\%$$

Усі техніко-економічні показники зібрано до таблиці 3.17.

Таблиця 3.17 – Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Значення
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	одиниця	300
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком	осіб	6
3. у тому числі - основних - інженерно-технічного персоналу	осіб	5
4. Середньорічний виробіток робітника	од/особу	19.5
5. Капіталовкладення у проект: - всього - на одиницю продукції	грн. грн/од	61 577 140 31 319,71
6. Повна собівартість - всього - на одиницю продукції	грн. грн/од	2 444 340 108,25
7. Відносний прибуток - всього - на одиницю продукції	грн. грн/од	618 600 9 925,4
8. Рентабельність	%	8.9%
9. Період повернення капіталовкладень	років	15
10. Фондовіддача виробничих фондів	грн/грн	4.86
11. Фондоємкість	грн/грн	0,2
12. Продуктивність праці	грн/особу	635
13. Коефіцієнт економічної ефективності		0,03%

### 3.3.4 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів

Розробниками була обрана концепція B2B або Business to business, що найбільше відповідає діяльності стартапу та передбачає співпрацю з іншими компаніями через компанію-посередника.

Також було побудовано карту бізнес-процесів стартапу, де визначено основні характеристики процесів поетапно (Таблиця 3.18).

Таблиця 3.18 – Карта бізнес-процесів

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Приблизна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
Розробка ідеї стартапу	Генерація ідеї	2 особи	10 год	80 грн
	Пошук наукових статей	2 особи	10 год	80 грн
	Зустріч зі спеціалістом	3 особи	2 год	16 грн
	Створення команди	3 особи	4 год	320 грн
	Домовленості з суб'єктом замовлення	3 особи	7 год	25 000 грн
	Вибір локації тестових полей	3 особи	50 годин	3000 грн
Реалізація ідеї	Підготовка полей та персоналу	2 особи	15 днів	4000 грн
	Вирощування та збір врожаю	11 осіб, спецтехніка	3,7 місяці/цикл	16000 грн
	Контроль якості	2 особи. Лабораторія-підрядник	12 год/рік	6000 грн
Реалізація				
	Встановлення контактів зі споживачами через посередників	1 особа	24 год	10 000 грн

Продовження Таблиця 3.18

Продаж проекту	Договори із покупцями	2 особи	10 год	-
	Проведення тендеру	2 особи	8 год	-
	Вибір місця проведення торгів	1 особа	2 год	-
	Формування договору продажу та остаточний продаж стартапу	2-4 особи	5 год	-

На основі карти бізнес-процесів виконання стартап-проекту, було проведено розподіл функцій між відповідальними за їх реалізацію працівниками та визначено кадрові потреби стартап-проекту на кожному із етапів (Таблиця 3.19).

Таблиця 3.19 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Розробник	Генний інженер	Клітинний біолог	Технічний працівник
Генерування ідеї	+			
Формування команди та домовленостей	+			
Огляд літератури	+	+	+	
Пошук і доставка сировини	+			+
Проведення досліджень	+	+	+	
Домовленості з суб'єктом замовлення	+			
Підготовка обладнання та персоналу	+	+	+	+

Продовження Таблиця 3.19

Контроль якості		+	+	+
Перепідготовка кадрів	+	+		+
Формування договорів	+			
Договори із покупцями	+			
Проведення тендеру	+			
Вибір місця проведення торгів	+			
Продаж проекту	+			

### 3.6 Оцінка ризиків та страхування розробки

Сформовано перелік ризиків, що можуть загрожувати підприємству. Для кожного з ризиків оцінювалася імовірність настання та вплив на очікуваний результат. Результати системного аналізу ризиків бізнес-процесу наведено у Таблиця 3.20

Таблиця 3.20 – Оцінка ризиків

Бізнес-процес	Ризик	Ймовірність настання ризику	Вплив ризику на дохід
Генерування ідеї	Втома автора	Низька	Середній
Формування команди	Некомпетентність членів команди	Низька	Високий
Огляд літератури	Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою	Низька	Низький
Пошук і доставка сировини	Використання непідходящої сировини	Низька	Високий
Проведення досліджень	Похибки досліджень: людський фактор, несправність обладнання	Низька	Високий

Продовження Таблиця 3.20

Домовленості з суб'єктом замовлення	Дискомунікація, конфлікт інтересів	Середня	Високий
Вибір локації потужностей	Невдале місце вирощування	Середня	Високий
Підготовка обладнання та персоналу	Неякісна підготовка	Низька	Середній
Напрацювання біологічного матеріалу	Контамінація	Середня	Середній
Контроль якості	Недотримана технологічна наповненість інструкції	Низька	Середній
Перепідготовка кадрів	Некомпетентність кадрів та/або спеціаліста з перепідготовки	Низька	Середній
Формування договорів	Невдало вибрані методи контролю	Середня	Середній
Договори із покупцями	Недієва реклама	Середня	Середній
Проведення тендеру	Занадто низька/висока ціна проекту. Проект не окупиться.	Середня	Середній

Результати оцінювання всіх ризиків за критеріями настання та впливом на очікуваний результат наведено у матриці оцінки ризиків (Таблиця 3.21).

Таблиця 3.21 – Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат	За ймовірністю настання ризиків			
	Критерій ризику	Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
		Числове значення	1	2
Високий рівень впливу	3	- Використання невідповідної сировини, - некомпетентність членів команди, - похибки досліджень: людський фактор, несправність обладнання	- Вибір невідповідної локації - Неправильно вибране обладнання, невдала технологія -пожежа	
Середній рівень впливу	2	- Втома автора, - погодні умови - недотримана технологічна наповненість інструкції, - некомпетентність кадрів та/або спеціаліста з перепідготовки,	- невдало вибрані методи контролю - занадто низька/висока ціна проекту	
Низький рівень впливу	1	- Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою		

Для усіх визначених ризиків розроблено план з управління ними (Таблиця 3.22).

Таблиця 3.22 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Втома автора	Попередження ризику	Директор	Стадія генерування ідеї	Подовження тривалості реалізації стартапу
Некомпетентність членів команди	Попередження ризику	Директор	Стадія створення команди	Ретельний підбір кваліфікованих людей
Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою	Попередження ризику	Директор	Стадія генерування ідеї	Виділити більшу кількість часу
Використання непідходящої сировини	Передача ризику	Директор, лаборант	Стадія досліджень	Детальне обговорення із технологом
Похибки досліджень: людський фактор, несправність обладнання	Попередження ризику	Лаборант, технолог	Стадія впровадження у виробництво	Ретельне проведення досліджень із перевіркою на різному обладнанні

Продовження Таблиця 3.22

Вибір невідповідної локації вирощування	Попередження та передача ризику	Науковий консультант, директор	Стадія досліджень	Довший час для підбору оптимальних параметрів, консультації зі спеціалістом
Неправильно вибране обладнання, невдала технологія	Передача ризику	Технолог, науковий консультант	Стадія досліджень, впровадження у виробництво	Консультації з технологом
Невдале уточнення параметрів	Попередження ризику	Директор, науковий консультант		Уважна перевірка усіх розрахунків
Некомпетентність кадрів та/або спеціаліста з перепідготовки	Передача ризику	Технолог	Стадія впровадження у виробництво	Проведення перепідготовки особисто
Невдало вибрані методи контролю	Передача ризику	Технолог	Стадія впровадження у виробництво	Обговорення вибору методів контролю із науковим консультантом
Занадто низька/висока ціна проекту. Проект не окупиться.	Передача ризику	Пакувальник-продажник, директор	Стадія продажу проекту	Перевірка розрахунків із досвідченим економістом

### **Висновки до розділу 3**

Бізнес ідея яка представлена в даній дисертації є потенційно вигідною за рахунок відсутності на світовому ринку та ринку України аналогів представленої продукції. Даний продукт забезпечує можливість точного та специфічного аналізу активності Wnt-сигналіngu у різних клітинних культурах.

## ВИСНОВКИ

1. На підставі доступних у публічних БД експериментальних даних і відомих фактів про логіку роботи WRE було ідентифіковано 6 потенційних WRE у послідовності гена *atg7* та 7 потенційних WRE у послідовності гена *atg5* людини.

2. В ході аналізу отриманих даних було знайдено, що один з цих елементів (WRE7 гену *atg5*) дійсно є WRE. Це є свідченням на користь існування зв'язку між канонічним Wnt-сигналінгом і ауто- та мітофагією кардіоміоцитів, для чого необхідно перевірити здатність послідовності WRE7 ініціювати транскрипцію у відповідь на канонічний Wnt-сигналінг *in vitro*.

3. Аналіз виживаності КМЦ на проточному цитометрі показав, що модуляція канонічного Wnt-сигналінгу призводить до збільшення виживаності приблизно на 10%. Це дозволяє припускати, що нормальна для екстрагованих неонатальних КМЦ активність канонічного Wnt-сигналінгу робить клітини більш вразливими до стресу при культивуванні чи більш схильними до клітинної смерті, що потребує додаткового підтвердження.

4. Імуногістохімічний аналіз підтвердив дієвість використовуваної системи модуляції канонічного Wnt-сигналінгу, а також показав, що його модуляція порушує процес ранньої постнатальної диференціації кардіоміоцитів щура.

5. Розроблено стартап проєкт, в якому показано, що запропонований проєкт комерціалізації є потенційно прибутковим, але об'єкт комерціалізації наразі перебуває на ранньому етапі розробки, і може змінити техніко-економічні параметри використані для обрахунків.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Holstein, T.W.: The Evolution of the Wnt Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4** (7), 2012, p. a007922.
- [2] Croce, J.C., McClay, D.R.: Evolution of the Wnt Pathways. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, **469**, 2008, p. 3–18.
- [3] Loh, K.M. et al.: Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals. *Dev. Cell*, **38** (6), 2016, p. 643–655.
- [4] Piven, O.O., Winata, C.L.: The canonical way to make a heart:  $\beta$ -catenin and plakoglobin in heart development and remodeling. *Exp. Biol. Med.*, **242** (18), 2017, p. 1735–1745.
- [5] Yu, H. et al.: Frizzled 2 and frizzled 7 function redundantly in convergent extension and closure of the ventricular septum and palate: evidence for a network of interacting genes. *Dev. Camb. Engl.*, **139** (23), 2012, p. 4383–4394.
- [6] Sharma, R.P., Chopra, V.L.: Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, **48** (2), 1976, p. 461–465.
- [7] van Ooyen, A., Nusse, R.: Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene *int-1*; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell*, **39** (1), 1984, p. 233–240.
- [8] Rijsewijk, F. et al.: The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*, **50** (4), 1987, p. 649–657.
- [9] Serafino, A. et al.: Developing drugs that target the Wnt pathway: recent approaches in cancer and neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Drug Discov.*, **12** (2), 2017, p. 169–186.
- [10] Liu, C. et al.: Targeting Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway for Drug Therapy. *Med. Drug Discov.*, **8**, 2020, p. 100066.
- [11] Wiese, K.E. et al.: Wnt signalling: conquering complexity. *Dev. Camb. Engl.*, **145** (12), 2018.
- [12] MacDonald, B.T. et al.: Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell*, **17** (1), 2009, p. 9–26.
- [13] MacDonald, B.T. et al.: Disulfide Bond Requirements for Active Wnt Ligands \*. *J. Biol. Chem.*, **289** (26), 2014, p. 18122–18136.

- [14] Willert, K., Nusse, R.: Wnt Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4** (9), 2012.
- [15] Takada, R. et al.: Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell*, **11** (6), 2006, p. 791–801.
- [16] Hirai, H. et al.: Crystal structure of a mammalian Wnt–frizzled complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26** (5), 2019, p. 372–379.
- [17] Routledge, D., Scholpp, S.: Mechanisms of intercellular Wnt transport. *Development*, **146** (10), 2019.
- [18] Alexandre, C. et al.: Patterning and growth control by membrane-tethered Wntless. *Nature*, **505** (7482), 2014, p. 180–185.
- [19] Farin, H.F. et al.: Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature*, **530** (7590), 2016, p. 340–343.
- [20] Schubert, M., Holland, L.Z.: *The Wnt Gene Family and the Evolutionary Conservation of Wnt Expression*. Landes Bioscience, 2013.
- [21] Miller, J.R.: The Wnts. *Genome Biol.*, **3** (1), 2002, p. REVIEWS3001.
- [22] *Evolutionary conservation of Wnt signaling | The Wnt Homepage*. no date.
- [23] Niehrs, C.: The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13** (12), 2012, p. 767–779.
- [24] Ueno, K. et al.: Frizzled homolog proteins, microRNAs and Wnt signaling in cancer. *Int. J. Cancer*, **132** (8), 2013, p. 1731–1740.
- [25] Oishi, I. et al.: The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.*, **8** (7), 2003, p. 645–654.
- [26] Hikasa, H. et al.: The *Xenopus* receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development*, **129** (22), 2002, p. 5227–5239.
- [27] Sercan, Z. et al.: Expression profile of WNT, FZD and sFRP genes in human hematopoietic cells. *Leuk. Res.*, **34** (7), 2010, p. 946–949.
- [28] van Amerongen, R., Nusse, R.: Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, **136** (19), 2009, p. 3205–3214.
- [29] Green, J.L. et al.: Opposing Wnt pathways orient cell polarity during organogenesis. *Cell*, **134** (4), 2008, p. 646–656.

- [30] Flores-Hernández, E. et al.: Canonical and non-canonical Wnt signaling are simultaneously activated by Wnts in colon cancer cells. *Cell. Signal.*, **72**, 2020, p. 109636.
- [31] Stamos, J.L., Weis, W.I.: The  $\beta$ -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5** (1), 2013.
- [32] Kim, G.-H. et al.: Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements. *J. Cell Biol.*, **182** (6), 2008, p. 1073–1082.
- [33] Wu, J. et al.: Wg and Wnt4 provide long-range directional input to planar cell polarity orientation in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.*, **15** (9), 2013, p. 1045–1055.
- [34] Wu, J. et al.: Frizzled–Dishevelled signaling specificity outcome can be modulated by Diego in *Drosophila*. *Mech. Dev.*, **125** (1), 2008, p. 30–42.
- [35] Habib, S.J. et al.: A Localized Wnt Signal Orients Asymmetric Stem Cell Division in Vitro. *Science*, **339** (6126), 2013, p. 1445–1448.
- [36] Habas, R. et al.: Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1. *Cell*, **107** (7), 2001, p. 843–854.
- [37] Boutros, M. et al.: Dishevelled Activates JNK and Discriminates between JNK Pathways in Planar Polarity and wingless Signaling. *Cell*, **94** (1), 1998, p. 109–118.
- [38] Angers, S., Moon, R.T.: Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10** (7), 2009, p. 468–477.
- [39] Somorjai, I.M.L. et al.: Wnt evolution and function shuffling in liberal and conservative chordate genomes. *Genome Biol.*, **19** (1), 2018, p. 98.
- [40] Prabhu, Y., Eichinger, L.: The *Dictyostelium* repertoire of seven transmembrane domain receptors. *Eur. J. Cell Biol.*, **85** (9), 2006, p. 937–946.
- [41] Grimson, M.J. et al.: Adherens junctions and beta-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. *Nature*, **408** (6813), 2000, p. 727–731.
- [42] Niehrs, C.: On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development*, **137** (6), 2010, p. 845–857.

- [43] Clevers, H. et al.: An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, **346** (6205), 2014.
- [44] Oda, H., Takeichi, M.: Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J. Cell Biol.*, **193** (7), 2011, p. 1137–1146.
- [45] Yap, A.S. et al.: Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13** (1), 1997, p. 119–146.
- [46] Schippers, K.J., Nichols, S.A.: Evidence of Signaling and Adhesion Roles for  $\beta$ -Catenin in the Sponge Ephydatia muelleri. *Mol. Biol. Evol.*, **35** (6), 2018, p. 1407–1421.
- [47] L, N. et al.: The divergent *Caenorhabditis elegans* beta-catenin proteins BAR-1, WRM-1 and HMP-2 make distinct protein interactions but retain functional redundancy in vivo. *Genetics*, **159** (1), 1AD.
- [48] Gammons, M., Bienz, M.: Multiprotein complexes governing Wnt signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **51**, 2018, p. 42–49.
- [49] Hart, M.J. et al.: Downregulation of  $\beta$ -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor,  $\beta$ -catenin and GSK3 $\beta$ . *Curr. Biol.*, **8** (10), 1998, p. 573–581.
- [50] Schaefer, K.N., Peifer, M.: Wnt/Beta-Catenin Signaling Regulation and a Role for Biomolecular Condensates. *Dev. Cell*, **48** (4), 2019, p. 429–444.
- [51] van der Wal, T., van Amerongen, R.: Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: a balancing act for  $\beta$ -catenin. *Open Biol.*, **10** (12), 2020.
- [52] Bilic, J. et al.: Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, **316** (5831), 2007, p. 1619–1622.
- [53] Tortelote, G.G. et al.: Complexity of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway: Searching for an activation model. *Cell. Signal.*, **40**, 2017, p. 30–43.
- [54] Man, S.M.A. de et al.: Quantitative live-cell imaging and computational modelling yield novel insight into endogenous WNT/CTNNB1 signaling dynamics. *bioRxiv*, 2021, p. 2020.05.28.120543.
- [55] Jamieson, C. et al.: Regulation of  $\beta$ -catenin nuclear dynamics by GSK-3 $\beta$  involves a LEF-1 positive feedback loop. *Traffic Cph. Den.*, **12** (8), 2011, p. 983–999.
- [56] Valenta, T. et al.: The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.*, **31** (12), 2012, p. 2714–2736.

- [57] Fiedler, M. et al.: An ancient Pygo-dependent Wnt enhanceosome integrated by Chip/LDB-SSDP. *eLife*, **4**, 2015, p. e09073.
- [58] Franz, A. et al.: Probing the canonicity of the Wnt/Wingless signaling pathway. *PLoS Genet.*, **13** (4), 2017, p. e1006700.
- [59] Cantù, C. et al.: Mutations in Bcl9 and Pygo genes cause congenital heart defects by tissue-specific perturbation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Genes Dev.*, **32** (21–22), 2018, p. 1443–1458.
- [60] Anthony, C.C. et al.: Nuclear Regulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: It's a Complex Situation. *Genes*, **11** (8), 2020, p. 886.
- [61] Sierra, J. et al.: The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.*, **20** (5), 2006, p. 586–600.
- [62] Sustmann, C. et al.: Cell-Type-Specific Function of BCL9 Involves a Transcriptional Activation Domain That Synergizes with  $\beta$ -Catenin. *Mol. Cell. Biol.*, **28** (10), 2008, p. 3526–3537.
- [63] Hanson, A.J. et al.: XIAP Monoubiquitylates Groucho/TLE to Promote Canonical Wnt Signaling. *Mol. Cell*, **45** (5), 2012, p. 619–628.
- [64] Flack, J.E. et al.: Wnt-Dependent Inactivation of the Groucho/TLE Co-repressor by the HECT E3 Ubiquitin Ligase Hyd/UBR5. *Mol. Cell*, **67** (2), 2017, p. 181-193.e5.
- [65] Frieze, S. et al.: Cell type-specific binding patterns reveal that TCF7L2 can be tethered to the genome by association with GATA3. *Genome Biol.*, **13** (9), 2012, p. R52.
- [66] Norton, L. et al.: The mechanisms of genome-wide target gene regulation by TCF7L2 in liver cells. *Nucleic Acids Res.*, **42** (22), 2014, p. 13646–13661.
- [67] Ramakrishnan, A.-B. et al.: Wnt target enhancer regulation by a CDX/TCF transcription factor collective and a novel DNA motif. *bioRxiv*, 2021, p. 2021.01.15.426889.
- [68] Barolo, S.: Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef? *Oncogene*, **25** (57), 2006, p. 7505–7511.
- [69] Verzi, M.P. et al.: TCF4 and CDX2, major transcription factors for intestinal function, converge on the same cis-regulatory regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107** (34), 2010, p. 15157–15162.

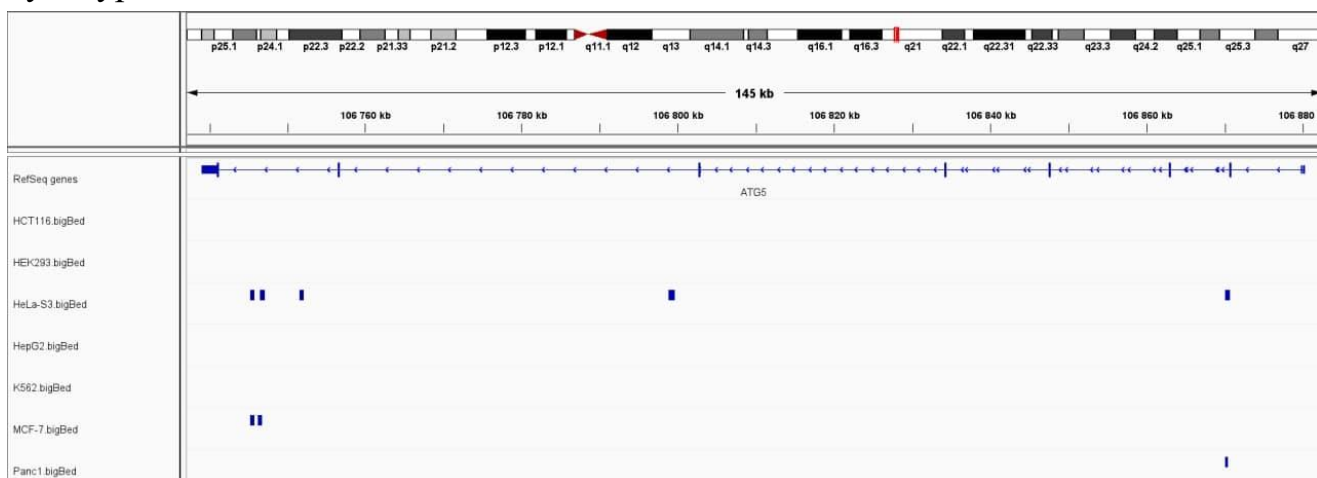
- [70] Kennedy, M.W. et al.: Sp5 and Sp8 recruit  $\beta$ -catenin and Tcf1-Lef1 to select enhancers to activate Wnt target gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113** (13), 2016, p. 3545–3550.
- [71] van Amerongen, R. et al.: Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/ $\beta$ -catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell*, **11** (3), 2012, p. 387–400.
- [72] Arnosti, D.N., Kulkarni, M.M.: Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J. Cell. Biochem.*, **94** (5), 2005, p. 890–898.
- [73] Smith, R.P. et al.: Massively parallel decoding of mammalian regulatory sequences supports a flexible organizational model. *Nat. Genet.*, **45** (9), 2013, p. 1021–1028.
- [74] Farley, E.K. et al.: Syntax compensates for poor binding sites to encode tissue specificity of developmental enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113** (23), 2016, p. 6508–6513.
- [75] Ramakrishnan, A.-B., Cadigan, K.M.: Wnt target genes and where to find them. *F1000Research*, **6**, 2017.
- [76] Brade, T. et al.: Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **3** (10), 2013, p. a013847.
- [77] Kelly, R.G. et al.: Heart Fields and Cardiac Morphogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **4** (10), 2014.
- [78] Costello, I. et al.: The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of *Mesp1* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat. Cell Biol.*, **13** (9), 2011, p. 1084–1091.
- [79] Bondue, A., Blanpain, C.: *Mesp1*: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circ. Res.*, **107** (12), 2010, p. 1414–1427.
- [80] Lickert, H. et al.: Formation of Multiple Hearts in Mice following Deletion of  $\beta$ -catenin in the Embryonic Endoderm. *Dev. Cell*, **3** (2), 2002, p. 171–181.
- [81] Freire, A.G. et al.: Building and Repairing the Heart: What Can We Learn from Embryonic Development? *BioMed Res. Int.*, **2014**, 2014.
- [82] Cohen, E.D. et al.: *Wnt5a* and *Wnt11* are essential for second heart field progenitor development. *Dev. Camb. Engl.*, **139** (11), 2012, p. 1931–1940.
- [83] Litviňuková, M. et al.: Cells of the adult human heart. *Nature*, **588** (7838), 2020, p. 466–472.

- [84] Cui, Y. et al.: Single-Cell Transcriptome Analysis Maps the Developmental Track of the Human Heart. *Cell Rep.*, **26** (7), 2019, p. 1934-1950.e5.
- [85] Pohjoismäki, J.L.O. et al.: Postnatal cardiomyocyte growth and mitochondrial reorganization cause multiple changes in the proteome of human cardiomyocytes. *Mol. Biosyst.*, **9** (6), 2013, p. 1210–1219.
- [86] Chen, H.-W. et al.: Dynamic changes of gene expression profiles during postnatal development of the heart in mice. *Heart*, **90** (8), 2004, p. 927–934.
- [87] Hung, Y.-C. et al.: Molecular Mechanisms for Regulating Postnatal Ductus Arteriosus Closure. *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (7), 2018.
- [88] Poeppelman, R.S., Tobias, J.D.: Patent Ductus Venosus and Congenital Heart Disease: A Case Report and Review. *Cardiol. Res.*, **9** (5), 2018, p. 330–333.
- [89] Blackburn, S.: Placental, fetal, and transitional circulation revisited. *J. Perinat. Neonatal Nurs.*, **20** (4), 2006, p. 290–294.
- [90] Tan, C.M.J., Lewandowski, A.J.: The Transitional Heart: From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life. *Fetal Diagn. Ther.*, **47** (5), 2020, p. 373–386.
- [91] Makinde, A.O. et al.: Maturation of fatty acid and carbohydrate metabolism in the newborn heart. *Mol. Cell. Biochem.*, **188** (1–2), 1998, p. 49–56.
- [92] Li, F. et al.: Rapid Transition of Cardiac Myocytes from Hyperplasia to Hypertrophy During Postnatal Development. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **28** (8), 1996, p. 1737–1746.
- [93] Manasek, F.J.: Mitosis in developing cardiac muscle. *J. Cell Biol.*, **37** (1), 1968, p. 191–196.
- [94] Balatskyi, V.V. et al.:  $\beta$ -Catenin Regulates Cardiac Energy Metabolism in Sedentary and Trained Mice. *Life*, **10** (12), 2020.
- [95] Lavandero, S. et al.: Autophagy in cardiovascular biology. *J. Clin. Invest.*, **125** (1), 2015, p. 55–64.
- [96] Gatica, D. et al.: Molecular Mechanisms of Autophagy in the Cardiovascular System. *Circ. Res.*, **116** (3), 2015, p. 456–467.
- [97] Lee, E. et al.: Autophagy is essential for cardiac morphogenesis during vertebrate development. *Autophagy*, **10** (4), 2014, p. 572–587.
- [98] Hirota, Y. et al.: Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways. *Autophagy*, **11** (2), 2015, p. 332–343.

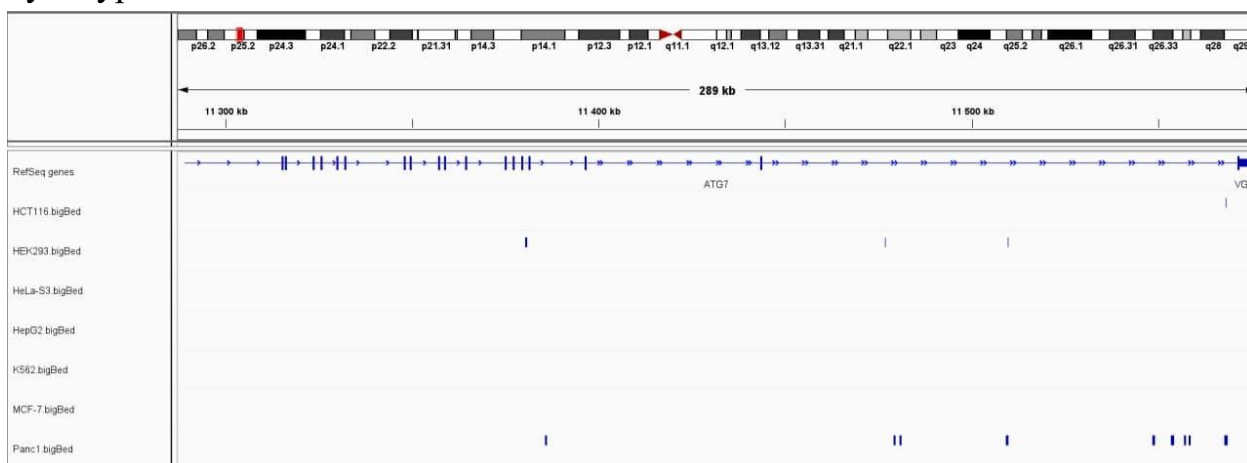
- [99] ENCODE Project Consortium: An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, **489** (7414), 2012, p. 57–74.
- [100] NCBI36 - hg18 - Genome - Assembly - NCBI. no date.
- [101] Thorvaldsdóttir, H. et al.: Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.*, **14** (2), 2013, p. 178–192.
- [102] Fornes, O. et al.: JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.*, **48** (D1), 2020, p. D87–D92.
- [103] Bailey, T.L. et al.: MEME Suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.*, **37** (suppl\_2), 2009, p. W202–W208.
- [104] Grant, C.E. et al.: FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*, **27** (7), 2011, p. 1017–1018.

## ДОДАТКИ

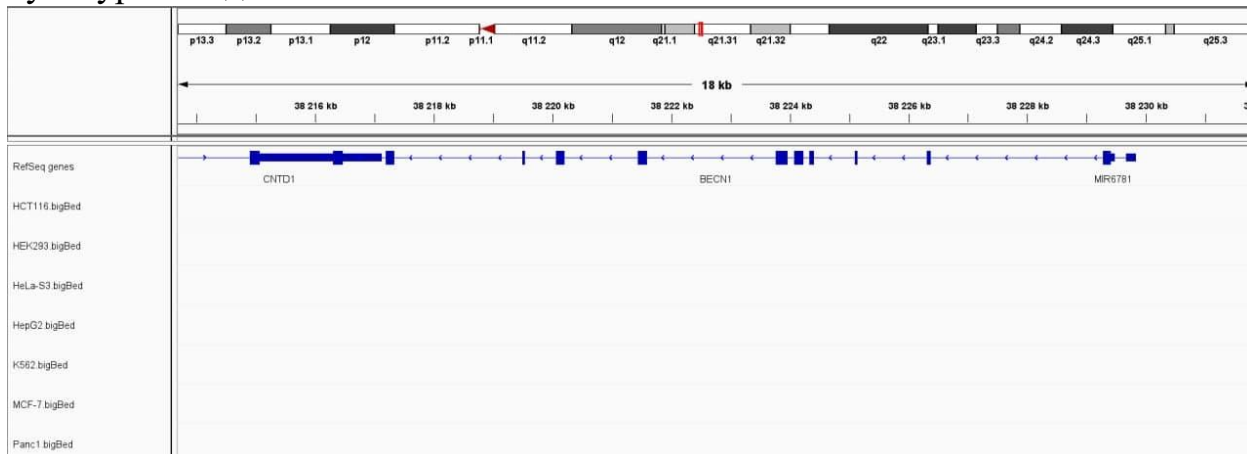
**Додаток 1.** Піки зв'язування TCF7L2 у межах гену *atg5* у різних клітинних культурах людини.



**Додаток 2.** Піки зв'язування TCF7L2 у межах гену *atg7* у різних клітинних культурах людини.



**Додаток 3.** Піки зв'язування TCF7L2 у межах гену *becn1* у різних клітинних культурах людини.



**Додаток 4.** Скрипт на Python написаний для переведення інформації про знайдені мотиви з формату .gff у формат розділу “FEATURES” .gb-файлів.

```
gfftofeature.py X
C: > Users > luchk > Desktop > gfftofeature.py > ...
1  ini = open("CDX1xATG7.gff", "r")
2  fin = open("annotation.txt", "a")
3
4  ini_data = ini.readlines()
5  ini_data.pop(0)
6  poss = []
7  for i in ini_data:
8      els = i.split()
9      poss.append([els[3], els[4]])
10
11 print(poss[0])
12 print("From %s to %s" %(poss[0][0], poss[0][1]))
13
14
15 for i in poss:
16     fin.write("          tf_bs          %s..%s\n"%(i[0], i[1]))
17     fin.write("                                /label='CDX1'\n")
18     fin.write("                                /ApEinfo_revcolor=#c8ff94\n")
19     fin.write("                                /ApEinfo_fwdcolor=#c8ff94\n")
20
21 fin.close()
```