

АЛЬФА-Е-КАТЕНІН У ГІСТОЛОГІЧНИХ ПЕРЕБУДОВАХ МІОКАРДА ПРИ СТАРІННІ

Серце є високоспеціалізованим органом, який для виконання функції з перекачування крові потребує міцної міжклітинної адгезії між кардіоміоцитами. Утворення таких взаємодій забезпечується інтеркалярними дисками, до складу яких входять адгеринові з'єднання, десмосоми та гібридні контакти і щілинні з'єднання [1]. Адгеринові з'єднання відіграють ключову роль у забезпеченні міцності міжклітинної взаємодії. У свою чергу, ці з'єднання забезпечуються трансмембранними білками, виключно N-кадерином у міокарді, цитоплазматичні ділянки якого взаємодіють із бета- та/або гамма-катенінами, які в свою чергу поєднуються з актиновим цитоскелетом через альфа-Е-катенін [2].

Раніше у нашому відділі було показано, що ембріональна кардіоспецифічна делеція альфа-Е-катеніну не призводить до порушення розвитку серця під час ембріогенезу, можливо, за рахунок функціональної компенсації його структурної функції альфа-Т-катеніном [3]. Варто зауважити, що структурна функція альфа-Е-катеніну досліджувалась і іншими вченими. Так, із використанням дослідних мишей було виявлено порушення організації інтеркалярних дисків та розрив стінки серця після експериментального інфаркту міокарда [4]. Іншими авторами було встановлено, що зниження рівня експресії альфа-Е-катеніну спостерігається в ділянках розриву стінки серця й у людей, але механізми такого зниження поки що залишаються невідомими [5].

Проте роботи останніх років свідчать, що альфа-Е-катенін залучений не лише до утворення адгеринових з'єднань, але й регулює різні сигнальні каскади клітини. Так, було показано участь альфа-Е-катеніну у регуляції канонічного Wnt-сигнального шляху на різних рівнях, при цьому він може як інгібувати, так і активувати сигнальний каскад [6–9]. Також альфа-Е-катенін бере участь у негативній регуляції HIPPO-сигнального шляху [10, 11] та HEDGEHOG-сиг-

нального каскаду [12]. Більшість цих робіт було виконано з використанням як клітинних, так і тваринних моделей пухлин різного походження, тоді як можлива сигнальна функція альфа-Е-катеніну у дорослому серці вивчена гірше. Тож метою нашої роботи було дослідити, як повна та часткова втрата гена альфа-Е-катеніну під час кардіогенезу позначиться на післянатальному розвитку міокарда.

Матеріали і методи

Для отримання кардіоспецифічної делеції гена-мішені (альфа-Е-катеніну) схрещували мишей, що експресують бактеріальну Cre-рекомбіназу під контролем промотора важкого ланцюга α -міозину ((α МНС)-Cre) та з умовним нокаутом альфа-Е-катеніну ((α МНС)-Cre; α -cat^{flox/flox}) з тваринами, гомозиготними за умовним нокаутом альфа-Е-катеніну (α -cat^{flox/flox}). Варто зауважити, що Cre-рекомбіназа експресується, починаючи з 10,5 дня ембріонального розвитку [3]. Новонароджених тварин генотипували у віці 5–6 діб згідно зі стандартними протоколами. Мутантні та алелі дикого типу детектували за допомогою таких праймерів: прямий CATTTCTGTCCACCCCAAAGAC та зворотний GCAAAATGATCCAGCGTCTGGG, α МНС-Cre трансген – прямий GAACCTGAAGATGTTTCGC та зворотний TACACCTCGGTGCTAACCAG. Генотипування, виділення ДНК, проводили згідно зі стандартними протоколами [13].

Для оцінки стану серця використовували індекс співвідношення маси серця до маси тіла (HW/BW, мг/г) та маси тіла до довжини гомілки (HW/TL, мг/мм). Гістологічний аналіз тканини серця проводили з використанням забарвлення гематоксиліном та еозинном, наявність фіброзного заміщення кардіоміоцитів у тканині серця виявляли за допомогою забарвлення пікрофуксином за ван Гізеном [14].

Трансгенні тварини були люб'язно надані доктором Міхаелем Шнайдером (Медичний коледж, Байлор, США). Тварини, гомозиготні за умовним нокаутом альфа-Е-катеніну (α -catenin^{fllox/fllox}), були отримані з Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, USA).

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету STATISTICA 8. Для аналізу виживаності використовували метод Каплан-Мейєра.

Результати та обговорення

Раніше було показано, що кардіоспецифічна ембріональна делеція альфа-Е-катеніну не призводила до виражених вад розвитку як ембріона, так і ембріонального серця [3]. Тоді як при дослідженні функції альфа-Е-катеніну у тканині дорослого серця було показано, що через 32 тижні після делеції гена відбувалося витончення стінок правого шлуночка, а через 60 тижнів експерименту – значне розширення правого шлуночка, витончення стінок шлуночка порівняно з контролем та розвиток дилатативної кардіоміопатії. Також авторами цієї роботи було відзначено підвищення кількості апоптозних кардіоміоцитів у мутантному серці порівняно з контролем [4]. Окрім того, авторами спостерігались і порушення організації структури ІД у мутантному серці. Такі дані вказують на принципово важливу функцію альфа-Е-катеніну у підтриманні архітектурної організації дорослого серця. Однак виникало питання, ця функція є принципово важливою лише у дорослому серці чи порушення її під час кардіогенезу також можуть мати критичні наслідки? Тож у своїй роботі ми зосередилися на дослідженні ролі ембріональної кардіоспецифічної делеції альфа-Е-катеніну у післянатальному розвитку міокарда. Для встановлення ролі альфа-Е-катеніну ми проаналізували виживаність тварин із делецією одного та двох алелів альфа-Е-катеніну порівняно з тваринами контрольної групи. Також ми дослідили, як повна та часткова втрата гена альфа-Е-катеніну під час кардіогенезу позначиться на післянатальному розвитку серця та на його морфологічній організації.

У результаті проведених досліджень нами було встановлено, що як повна, так і часткова втрата гена альфа-Е-катеніну в ембріональному серці призводить до ранньої смертності дорослих тварин порівняно з контрольними мишами. Так, виявилося, що середня виживаність тварин із гетерозиготною делецією альфа-Е-катеніну становила $38,11 \pm 2,39$ тижня, у тварин із гомози-

готною делецією альфа-Е-катеніну – $36,44 \pm 2,62$ тижня, а у контрольних – $66,2 \pm 4,1$ тижня. Максимальна тривалість життя у тварин із частковою втратою альфа-Е-катеніну становила 48 тижнів, у тварин із повною втратою – 44 тижні, а у контрольних – 78 тижнів (рис. 1). Вочевидь, функція гена альфа-Е-катеніну є критичною для розвитку/росту післянатального серця і втрата цього гена, навіть часткова, має драматичні наслідки для дорослого серця порівняно з ембріональним [3]. Для з'ясування можливих причин смертності тварин, як гетерозиготних, так і гомозиготних за делецією досліджуваного гена, ми провели серію морфометричних та гістологічних досліджень, однак, зважаючи на попередні дані, у роботі використовували тварин віком 40 тижнів.

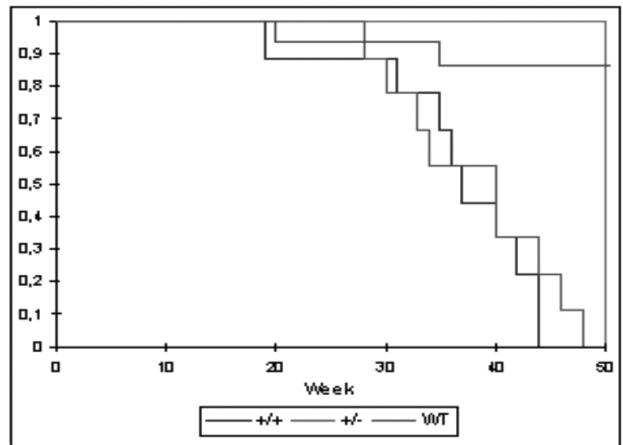


Рис. 1. Виживаність тварин із повною та частковою втратою гена альфа-Е-катеніну статистично достовірно нижча порівняно з тваринами дикого типу. На графіку наведено криву Каплан-Мейєра. Умовні позначення: +/+ – тварини з делецією двох алелів альфа-Е-катеніну; +/- – тварини з делецією одного алеля альфа-Е-катеніну, WT – тварини контрольної групи. Кількість тварин у кожній групі ≥ 9 ($p < 0,0001$)

Навіть простий візуальний аналіз сердець тварин із дефіцитом та повною втратою альфа-Е-катеніну в кардіогенезі виявив суттєве збільшення міокарда порівняно з тваринами дикого типу того ж віку (40 тижнів). Цікаво, що у таких тварин відбувалося суттєве збільшення передсердь, також спостерігали фіброзні новоутворення в ділянці коронарних судин. Аналіз індексів співвідношення маси серця до довжини гомілки та маси серця до маси тіла (рис. 2) підтвердив наші візуальні спостереження, дійсно обидва індекси були суттєво вищими у мутантних тварин порівняно з контрольними самцями.

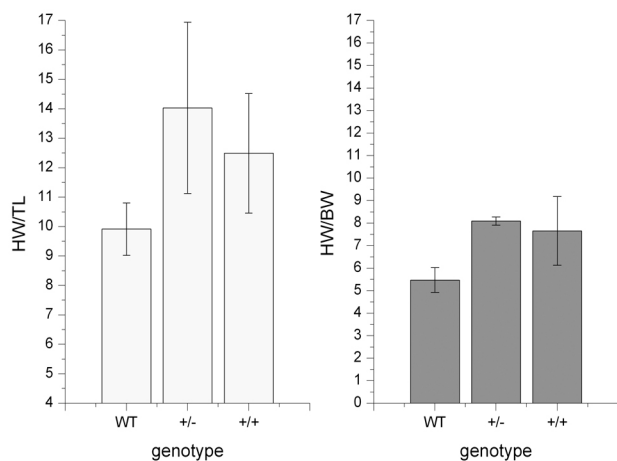


Рис. 2. Аналіз індексу співвідношення маси серця до довжини гомілки (HW/TL, мг/мм) та індексу маси серця до маси тіла (HW/BW, мг/г). +/+ – тварини з делецією двох генів альфа-Е-катеніну, +/- – тварини з делецією одного алеля гену альфа-Е-катеніну, WT – контрольні тварини ($p < 0,05$)

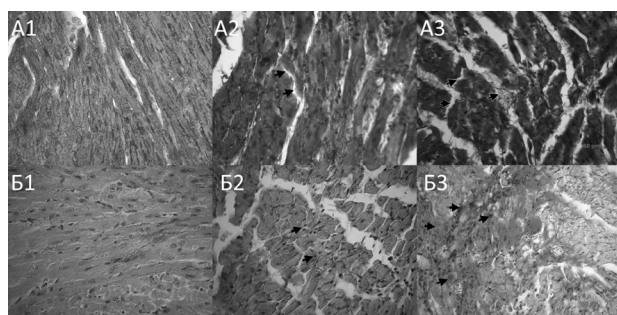


Рис. 3. Морфологічний аналіз зрізів тканини міокарда: А – забарвлення гематоксилін-еозинном; Б – забарвлення пікрофуксинном за ван Гізеном; 1 – контроль, 2 – делеція одного алеля альфа-Е-катеніну, 3 – делеція двох алелів альфа-Е-катеніну. Стрілки вказують на порушення структури міокарда – дезінтеграція кардіоміоцитів, фіброз. Збільшення $\times 400$

Отже, як повна, так і часткова делеція гену альфа-Е-катеніну в ембріональному серці призводить до порушень розвитку дорослого серця і підвищення гіпертрофічного індексу вже у віці 10 місяців.

При морфологічному аналізі зрізів тканини міокарда за допомогою гематоксилін-еозинового забарвлення виявили, що і повна, і часткова втрата гену альфа-Е-катеніну у кардіогенезі призводить до порушення організації тканини дорослого серця. Нами було виявлено, що у тварин, гетерозиготних та гомозиготних за нокаутом, порушувалася гістологічна структура міокарда, спостерігалася дезінтеграція кардіоміоцитів (рис. 3, А). Окрім того, аналіз із застосуванням забарвлення пікрофуксинном за ван Гізеном виявив інтенсивний фіброз тканини міокарда у мутантних тварин порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 3, Б). Цікаво також, що у тварин із повною втратою гену альфа-Е-катеніну спостерігали і більш масивне заміщення кардіоміоцитів сполучною тканиною порівняно з мишами, гетерозиготними за нокаутом досліджуваного гену (рис. 3, Б2 і Б3).

Висновки

Отже, нами показано, що ембріональна кардіоспецифічна делеція як одного, так і двох алелів гену альфа-Е-катеніну призводить до порушень структури серця, типових для дилатаційної кардіоміопатії, ішемічної хвороби серця, що супроводжується фіброзом та, як наслідок, ранньої смертності тварин. Ми припускаємо, що втрата альфа-Е-катеніну призводить до таких драматичних наслідків не лише внаслідок порушення міжклітинної взаємодії у структурі інтеркалярних дисків, а й дерегуляції сигнальних каскадів у кардіоміоцитах, що потребує подальших молекулярно-генетичних та фізіологічних досліджень.

Автори вдячні за фінансову підтримку цільовій комплексній міждисциплінарній програмі наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» на 2015–2019 рр. та спільному україно-польському конкурсу на 2015–2017 рр. на підставі угоди, укладеної між Національною академією наук України та Польською академією наук.

ЛІТЕРАТУРА

1. Li J., Radice G.L. A New Perspective on Intercalated Disc Organization: Implications for Heart Disease // *Dermatology Research and Practice*. – 2010. – 207835.
2. Півень О.О. Зміни адгезивних комплексів у тканині міокарда як один із механізмів порушень функції серця // *Український кардіологічний журнал*. – 2010. – № 6. – С. 110–117.
3. Piven O., Kostetskii I., Macewicz L., Kolomijec Y., Radice G., Lukash L. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development // *Exp. Biol. Med.* – 2011. – № 6. – P. 1–7.
4. Sheikh F., Chen Y., Liang X., Hirschy A., Stenbit A.E., Gu Y., Dalton N.D., Yajima T., MD, Lu Y., Knowlton K.U., Peterson K.L., Perriard J., Chen J. α -E-Catenin inactivation disrupts the cardiomyocyte adherens junction, resulting in cardiomyopathy and susceptibility to wall rupture // *Circulation*. – 2006. – 114, № 650. – P. 1046–1055.
5. van den Borne S., Narula J., Voncken W., Lijnen P., Vervoort-Peters H., BSC, Dahlmans V., Smits J., Daemen M., Blankesteyn W.M. Defective Intercellular Adhesion Complex in Myocardium Predisposes to Infarct Rupture in Humans // *JACC*. – 2008. – 51, № 22. – P. 2184–2192.
6. Giannini A.L., Vivanco M.d.M., Kypta R.M. Analysis of beta-catenin Aggregation and Localization Using GFP Fusion Proteins: Nuclear Import of alpha-catenin by the beta-catenin/Tcf Complex // *Experimental Cell Research*. – 2000. – 255. – P. 207–220.
7. Ana L. Giannini, Maria d. M. Vivanco, and Robert M. Kypta α -Catenin Inhibits β -Catenin Signaling by Preventing Formation of a β -Catenin-T-cell Factor-DNA Complex // *J. Biol. Chem.* – 2000. – 275. – 29. – P. 21883–21888.
8. Seung H. Choi, Conchi Estaras, James J. Moresco, John R. Yates III, Katherine A. Jones α -Catenin interacts with APC to regulate β -Catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes // *Gen&Dev*. – 2013. – 27. – P. 2473–2488.
9. Sascha Neumann, Maria Schneider, Rebecca L. Daugherty, Cara J. Gottardi, Sabine A. Eming, Asa Beijer, Angelika A. Noegel, Iakowos Karakesisoglou. Nesprin-2 Interacts with α -Catenin and Regulates Wnt Signaling at the Nuclear Envelope // *J. Biol. Chem.* – 2010. – 285. – № 45. – P. 34932–34938.
10. Mark R. Silvis, Bridget T. Kreger, Wen-Hui Lien, Olga Klezovitch, G. Marianna Rudakova, Fernando D. Camargo, Dan M. Lantz, John T. Seykora, Valeri Vasioukhin α -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1 // *Sci Signal*. – 2012. – 4. – P. 174.
11. Karin Schlegelmilch, Morvarid Mohseni, Oktay Kirak, Jan Pruszkak, J. Renato Rodriguez, Dawang Zhou, Bridget T. Kreger, Valera Vasioukhin, Joseph Avruch, Thijn R. Brummelkamp, Fernando D. Camargo. Yap1 Acts Downstream of α -Catenin to Control Epidermal Proliferation // *Cell*. – 2011. – 144. – P. 782–795.
12. Wen-Hui Lien, Olga Klezovitch, Tania E. Fernandez, Jeff Delrow, Valeri Vasioukhin. α E-catenin controls cerebral cortical size by regulating hedgehog signalling pathway // *Science*. – 2006. – 311. – P. 1609–1612.
13. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
14. Jocelyn H. Bruce-Gregorios, M.D.: *Histopathologic Techniques*, JMC Press Inc., 1974.

BALATSKYY V.V.¹, AKIMENKO I.², MACEWICZ L.L.¹, PIVEN O.O.¹, LUKASH L.L.¹

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150*

² *SEC «Institute of biology»,*

Ukraine, 01033, Kyiv, Volodymyrska str., 60, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

ALPHA-E-CATENIN IN HISTOLOGICAL RECONSTRUCTION OF MYOCARDIUM WITH AGING

Aim. In our current work we have focused on cardiospecific ablation of alpha-E-catenin during cardiogenesis and its reflection on postnatal heart. **Methods.** Kaplan-Meier analysis of mutant and WT mice survival. Histological analysis (hematoxylin-eosin and van Gieson stain) of old transgenic and wild-type animals. The HW/BW and HW/TL index was calculated to estimate myocardium hypertrophy development. **Results.** Alpha-E-catenin deletion leads to shorten life span of mutant mice. We observed increased heart weight, histological abnormalities of myocardium and increased fibrosis in hearts of mice with alpha-E-catenin deletion. **Conclusions.** We have shown that embryonic cardiac specific deletion of such as one as well as both alleles of the alpha-E-catenin gene leads to disorders of the heart structure, which typical of dilated cardiomyopathy, ischemic heart disease, accompanied by fibrosis. As a result all this violation of heart tissue structure occur early death of animals. We assume that the loss of alpha-E-catenin leads to such dramatic consequences not only due to violation of cells interactions, but deregulation of signalling passways in cardiomyocytes, it's should be clarified with further molecular genetics and physiological studies.

Keywords: α -catenin, gene deletion, heart, heart development.