

## КАРДИОСПЕЦИФІЧНА ЕМБРІОНАЛЬНА ДЕЛЕЦІЯ ГЕНА $\alpha$ -КАТЕНІНУ ПРИЗВОДИТЬ ДО ГІПЕРТРОФІЇ СЕРЦЯ У ДОРΟΣЛИХ МИШЕЙ

В. Балацький, Л. Мацевич, О. Півень\*

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

Альфа-Е-катенін – важливий компонент адгеринових з'єднань у міокарді. Раніше було показано, що генетичний нокаут цього гена в ембріональному серці не спричиняє летальності чи порушень розвитку ембріонального серця. Однак роль цього гена в розвитку та функціонуванні серця дорослих мишей, а саме в розвитку гіпертрофії не до кінця з'ясована. Метою нашої роботи було дослідити роль гена  $\alpha$ -Е-катеніну в гіпертрофії міокарда. Дослідження проводили з використанням мишей із умовним нокаутом  $\alpha$ -Е-катеніну і трансгенних  $\alpha$ МНС-Cre тварин. Застосовували гістологічні методи дослідження, а саме забарвлення гематоксилін-еозином і піркофуксином за ван Гізеном. Зміни рівня експресії генів-маркерів гіпертрофії аналізували за допомогою зворотно-полімеразної ПЛР у реальному часі. Було показано, що як повна, так і часткова делеція гена  $\alpha$ -Е-катеніну в ембріональному серці спричиняє розвиток гіпертрофії у тварин віком 10 місяців. Це супроводжується масивними гістопатологічними перебудовами тканини міокарда: фіброз, інфільтрація лімфоцитами, вакуоляризація ядер, кардіоміоцити із хвилястою деформацією, розриви стінок судин. Також спостерігали підвищення рівня експресії гіпертрофічних генів (ANP та  $\beta$ -МНС) у тварин із гомо- та гетерозиготним нокаутом  $\alpha$ -Е-катеніну. Як повна, так і часткова втрата гена  $\alpha$ -Е-катеніну призводить до порушень структури міокарда і розвитку гіпертрофії серця дорослих мишей.

*Ключові слова:*  $\alpha$ -Е-катенін, експресія генів, гіпертрофія, міокард, фіброз

Серцево-судинні захворювання вважаються головною медичною проблемою ХХІ століття. Згідно зі статистикою ВООЗ, щороку у світі через серцево-судинні хвороби помирають близько 17,5 млн людей. За прогнозами лікарів, смертність від захворювань серцево-судинної системи до 2020 р. зросте до 20 млн, а до 2030 р. – до 24 млн осіб [19]. Одне із найпоширеніших захворювань серцево-судинної системи – гіпертрофія міокарда, і вона є одним із ключових факторів ризику розвитку серцевої недостатності. Варто зауважити, що низка сигнально-регуляторних каскадів залучена до регулювання постнатального міокарда та розвитку гіпертрофії. До таких належать GPCR, кальцінеурин/NFAT, MAPK, PI3K/AKT/mTOR сигнальні шляхи [10] та канонічний Wnt сигналінг [8]. Проте не можна погодитися з тим, що механізми розвитку гіпертрофії міокарда є до кінця з'ясованими. Тому вивчення цих процесів і пошук нових гравців – медіаторів гіпертрофії міокарда – є надзвичайно актуальним завданням.

У своїй роботі ми зосередилися на дослідженні ролі гена  $\alpha$ -Е-катеніну в гіпертрофії серця дорослих мишей. Раніше було показано, що  $\alpha$ -Е-катенін є необхідним компонентом адгеринового комплексу, який забезпечує міжклітинну адгезію, а втрата гена  $\alpha$ -Е-катеніну дає летальні наслідки ще у ранньому ембріогенезі [12]. Цікаво, що кардіоспецифічна делеція  $\alpha$ -Е-катеніну не спричиняла порушень розвитку ембріона чи ембріонального серця та не призводила до летальності новонароджених тварин [14]. Із застосуванням генетичного нокауту було показано, що делеція гена  $\alpha$ -Е-катеніну в серці дорослих тварин спричиняє

розвиток кардіоміопатії та супроводжується порушеннями структури інтеркалярних дисків (ІД), але тільки у мишей із гомозиготною делецією останнього [17]. Участь  $\alpha$ -Е-катеніну в патологічних перебудовах дорослого серця була показана і в іншій роботі, де автори спостерігали зниження експресії  $\alpha$ -Е-катеніну в зоні ураження інфарктного міокарда [4]. Втрата не лише  $\alpha$ -Е-катеніну, а й  $\alpha$ -Т-катеніну призводила до розвитку гіпертрофії та підвищеної проліферації кардіоміоцитів у тварин віком три місяці [11]. Підсумовуючи короткий огляд експериментальних робіт, можемо зауважити, що  $\alpha$ -Е-катенін є не лише важливим структурним компонентом міжклітинної адгезії, а й вочевидь бере участь у патологічних перебудовах міокарда. Однак значення цього гена в розвитку гіпертрофії серця у дорослих мишей потребує детального аналізу.

Тож у своїй роботі, із застосуванням технології умовного нокауту гена виключно в ембріональному серці, ми зосередилися на вивченні впливу  $\alpha$ -Е-катеніну на розвиток гіпертрофії серця у дорослих тварин. Використання Cre-рекомбінази під контролем  $\alpha$ -МНС промотора дає можливість досліджувати вплив втрати функції гена, починаючи з ембріогенезу. Також варто зауважити, що саме ця модель є високоефективною і дає змогу повністю видалити досліджуваний ген (у гомозиготному нокауті) в серці мишей. Такий методичний підхід є більш близьким до оцінки впливу можливої мутації гена  $\alpha$ -Е-катеніну у людей.

#### Матеріали та методи

**Генерація тварин із делецією гена  $\alpha$ -Е-катеніну в ембріональному серці.** Для генерації дослідної групи тварин із кардіоспецифічною делецією гена  $\alpha$ -Е-катеніну схрещували мишей, що експресують Cre-рекомбіназу під контролем промотора важкого ланцюга  $\alpha$ -міозину (( $\alpha$ МНС)-Cre) та з умовним нокаутом гена  $\alpha$ -Е-катеніну (( $\alpha$ МНС)-Cre;  $\alpha$ -cat<sup>fllox/fllox</sup>) із тваринами, гомозиготними за умовним нокаутом  $\alpha$ -Е-катеніну ( $\alpha$ -cat<sup>fllox/fllox</sup>). У застосованій нами моделі Cre-рекомбіназа експресується, починаючи із 10,5 дня ембріонального розвитку і видаляє фланкований loxP сайтами фрагмент геному з високою ефективністю [14]. Новонароджених тварин генотипували у віці 5–6 діб згідно зі стандартними протоколами. Мутантні алелі й алелі дикого типу визначали за допомогою таких праймерів: прямий: CATTTCTGTACCCCCAAAGAC і зворотний GCAAAATGATCCAGCGTCCTGGG,  $\alpha$ МНС-Cre трансген – прямий: CAGAACCTGAAGATGTTCCGC і зворотний TACACCTCGGTGСТААССAG. Генотипування, виділення ДНК проводили згідно зі стандартними протоколами [13]. Під час дослідження використовували самців мишей віком 10 місяців.

Трансгенні тварини були отримані доктором Міхаелем Шнайдером (Медичний коледж, Байлор, США). Тварини, гомозиготні за умовним нокаутом  $\alpha$ -Е-катеніну ( $\alpha$ -catenin<sup>fllox/fllox</sup>), були отримані із Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, USA).

**Гістологічний і морфологічний аналіз.** Для оцінки стану серця використовували індекс співвідношення маси серця до маси тіла (HW/BW, мг/г) та маси серця до довжини гомілки (HW/TL мг/мм). Гістологічний аналіз тканини серця проводили з використанням парафінових зрізів, які готували, як описано раніше [14]. Архітектуру міокарда аналізували із застосуванням забарвлення гематоксиліном та еозином (ГЕ), наявність фіброзного заміщення кардіоміоцитів у тканині серця виявляли за допомогою забарвлення пікрофуксином за ван Гізеном [15]. Інтенсивність фіброзу аналізували за допомогою програмного забезпечення NIH ImageJ. [16].

**Дослідження рівня експресії генів-маркерів гіпертрофії.** Тотальну РНК виділяли із тканини лівого шлуночка серця миші за допомогою innuSOLV RNA Reagent (Analytikjena)

згідно з рекомендаціями виробника. Отриману РНК обробляли ДНК-азою I та використовували для синтезу кДНК. Синтез кДНК здійснювали за допомогою First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) згідно з рекомендаціями виробника. Реакцію ПЛР у реальному часі проводили з використанням суміші Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific) на приладі iCycler single-color real-timePCR detection system (IQ5, BioRad). Аналізували зміну рівня експресії генів *ANP*, *BNP*,  $\alpha$ -*MHC* та  $\beta$ -*MHC*. Як референтний ген використовували *Gapdh*. Праймери, які застосовували для ПЛР у реальному: 1) *ANP*: прямий – 5'-CATCACCTGGGCTTCTTCT-3' і зворотний – 5'-TGG-GCTCCAATCCTGTC AATC-3'; 2) *BNP*: прямий – 5'-GCGGCATGGATCTCCTGAAGG-3' і зворотний – 5'-CCCAGGCAGAGTCAGAACTG-3'; 3)  $\beta$ -*MHC*: прямий – 5'-ATGTGC-CGGACCTTGGA-3' і зворотний – 5'-CCTCGGGTTAGCTGAGAGATCA-3'; 4)  $\alpha$ -*MHC*: прямий – 5'-GGCACAGAAACACCTGAAGA-3' і зворотний – 5'-CATTGGCATGGACAG-CATCATC-3'; 5) *Gapdh*: прямий – 5'-CCACTCTTCCACCTTCGATG-3' і зворотний – 5'-TC-CACCACCTGTTGCTGTA-3'.

Дані зміни рівня експресії розраховували за допомогою формули  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , де  $Ct$  – граничне значення циклу,  $\Delta Ct = Ct_{\text{(досліджуваного гена)}} - Ct_{\text{(Gapdh)}}$ , а  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{(експеримент)}} - \Delta Ct_{\text{(контроль)}}$ .

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету GraphPad Prism7 (GraphPad Software Inc., США). Дані представлено у вигляді середнього арифметичного  $\pm$  стандартне відхилення. Перевірку розподілу на нормальність здійснювали за допомогою тесту Д'Агостіно-Пірсона. Подальший статистичний аналіз проводили з використанням Красскела-Уолліса із посттестом Дана.  $P < 0,05$  вважали статистично достовірним.

#### Результати і їхнє обговорення

Як уже зазначалося вище,  $\alpha$ -Е-катенін є необхідним компонентом адгезивних з'єднань, і ціла низка робіт переконливо свідчить про його виняткову роль у підтримці клітинної адгезії під час розвитку організму. У серці експресуються дві ізоформи  $\alpha$ -катеніну:  $\alpha$ -Е-катенін і  $\alpha$ -Т-катенін [17]. Як відомо,  $\alpha$ -Т-катенін постійно взаємодіє із кадєрин-катеніновим комплексом [20], забезпечуючи міцну адгезію, в той час як  $\alpha$ -Е-катенін діє як механосенсор і забезпечує підтримання адгезії під час зростання навантаження [21]. У своїй роботі, застосовуючи тварин із умовним нокаутом гена  $\alpha$ -Е-катеніну, ми генерували мишей із гетеро- та гомозиготною делецією цього гена виключно в ембріональних кардіоміоцитах. Для дослідження ролі гена  $\alpha$ -Е-катеніну в серці дорослих тварин ми провели морфологічний і молекулярно-генетичний аналіз сердець дослідних та контрольних мишей віком 10 місяців.

У результаті досліджень, перш за все, ми виявили гістопатологічні аномалії тканини міокарда мутантних мишей, що є типовими ознаками гіпертрофії дорослого серця та свідчать про порушення його функції. Так під час аналізу парафінових зрізів сердець із фарбуванням за ван Гіzenом ми виявили розвиток замісного та периваскулярного фіброзу в серцях тварин із делецією гена  $\alpha$ -Е-катеніну (рис. 1). Як відомо, останній асоційований із порушеннями коронарного кровообігу [6], тоді як замісний фіброз є ознакою втрати функціональних кардіоміоцитів [7]. Проте поява фіброзу як такого є однією з ознак патологічних перебудов міокарда за розвитку гіпертрофії серця. Варто також зауважити, що у тварин із гетерозиготною делецією  $\alpha$ -Е-катеніну фіброз був менш вираженим порівняно з тваринами із повною делецією цього гена (рис. 1). Так, аналіз зрізів тканини серця мишей із гетерозиготним нокаутом гена  $\alpha$ -Е-катеніну показав відсоток фіброзу  $1,8\% \pm 0,14$ , тоді як у тварин із гомозиготною делецією –  $2,4\% \pm 0,8$ .

Аналіз гістологічних зрізів зафарбованих ГЕ показав також інші гістопатологічні порушення тканини міокарда у тварин як із гетеро-, так і з гомозиготною делецією гена

*$\alpha$ -Е-катеніну* (рис. 2). Нами були зареєстровані типові ознаки ішемічного ушкодження кардіоміоцитів, а саме кардіоміоцити із хвилястою деформацією та кардіоміоцити із гіпереозинофільною цитоплазмою (рис. 2) [9, 3]. Про ішемічне ураження кардіоміоцитів у серцях із делецією досліджуваного нами гена свідчить і наявність вакуолізованих ядер (рис. 2). Окрім того, в обох групах мутантних тварин реєстрували дифузну інфільтрацію тканини міокарда лімфоцитами (рис. 2), що свідчить про запальні процеси [13]. Також мікроскопічний аналіз парафінових зрізів показав порушення цілісності судин (рис. 2). Усе разом вказує на масивні патологічні перебудови міокарда за умови генетичного нокауту гена  *$\alpha$ -Е-катеніну*.

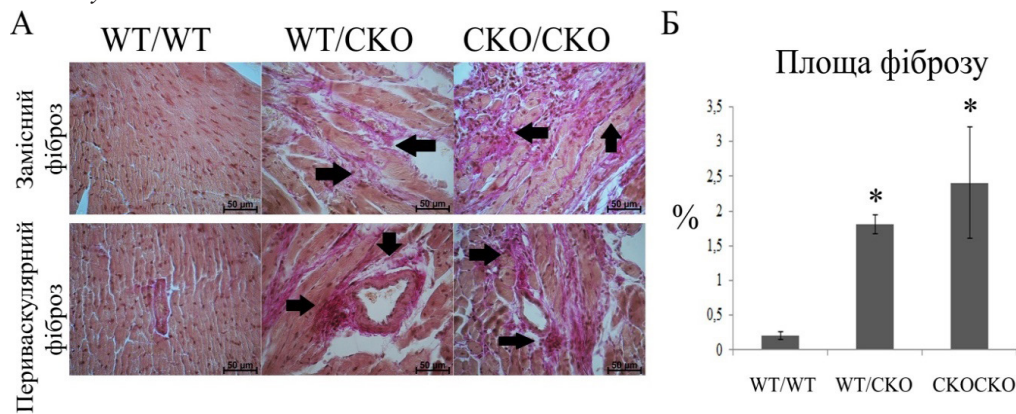


Рис. 1. Нокаут гена  *$\alpha$ -Е-катеніну* в ембріональному серці спричиняє розвиток фіброзу міокарда дорослих мишей: А – морфологічні зрізи серця пофарбовані пікрофуксином за ван Гізеном, замісний і периваскулярний фіброз пофарбовано у рожевий і позначено стрілочками; Б – аналіз інтенсивності фіброзу в препаратах сердець контрольних і дослідних тварин віком 10 місяців. Примітки: WT/WT – тварини контрольної групи; WT/CKO – тварини із гетерозиготною делецією  *$\alpha$ -Е-катеніну*, CKO/CKO – тварини із гомозиготною делецією гена  *$\alpha$ -Е-катеніну*. Кількість тварин у досліді: 5. \* –  $P < 0,05$  щодо WT/WT

Підвищення індексу співвідношення маси серця до маси тіла (HW/BW) і маси серця до довжини гомілки (HW/TL) у тварин як із повною, так і з частковою втратою гена  *$\alpha$ -Е-катеніну*, порівняно з контрольними мишами того ж віку (рис. 3, А, Б) також свідчить про розвиток гіпертрофії серця у мутантних мишей. Варто також зауважити, що аналіз індексів: HW/BW і HW/TL не виявив достовірної різниці між двома застосованими індексами під час оцінки стану міокарда.

Аналіз змін експресії генів гіпертрофічної відповіді: *ANP*, *BNP* та  *$\beta$ -MHC* узгоджується з нашими попередніми даними і свідчить про розвиток гіпертрофії у мутантних тварин віком 10 місяців. Так, із застосуванням ПЛР у реальному часі ми виявили достовірне підвищення експресії генів *ANP* та  *$\beta$ -MHC* у тварин із гомо- та гетерозиготним нокаутом  *$\alpha$ -Е-катеніну* (рис. 3, С). Варто також зауважити, що рівень експресії міозину дорослого серця ( *$\alpha$ -MHC*) у серцях дослідних тварин був нижчим порівняно з контрольними тваринами того ж віку (рис. 3, С). Такі зміни експресії генів дорослого ( *$\alpha$ -MHC*) та ембріонального ( *$\beta$ -MHC*) міозинів і гена натрійуретичного пептиду А (*ANP*) є типовими для гіпертрофії міокарда [18] й узгоджуються з результатами морфометричних і гістологічних досліджень. Активація експресії фетальних генів є типовою ознакою розвитку серцевої недостатності й регулюється різними транскрипційними факторами, серед яких, зокрема: *Gata*, *NFAT* та *Mef* [9]. Також було показано, що натрійуретичні пептиди А та В є мішенями  $\beta$ -катеніну



[22], а у своїй попередній роботі ми показали активацію канонічного WNT/ $\beta$ -катенінового сигнального шляху в серці тварин із гетеро- та гомозиготною делецією  $\alpha$ -Е-катеніну [1]. Тож активація експресії фетальних генів у міокарді мишей із гетеро- та гомозиготним нокаутом  $\alpha$ -Е-катеніну може бути як наслідком порушення активності сигнальних каскадів у серці дослідних тварин (активація канонічного Wnt-сигналіну), так і результатом патології, що розвивається.

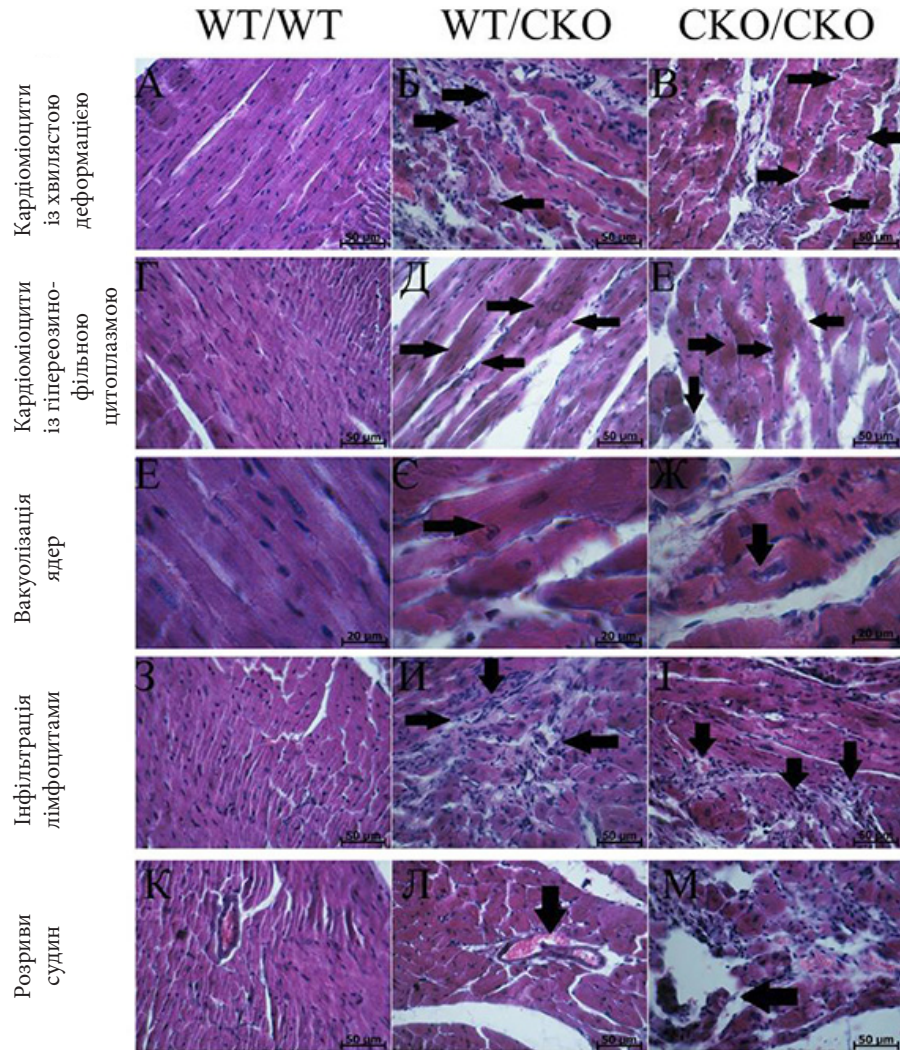


Рис. 2. Делеція гена  $\alpha$ -Е-катеніну в ембріональному серці спричиняє масивні гістопатологічні порушення тканини міокарда мишей віком 10 місяців. Забарвлення парафінових зрізів тканини міокарда гематоксилін еозинном (ГЕ), на мікрофотографії наведено типові аномалії: Б, В – кардіоміоцити із хвилястою деформацією; Д, Е – кардіоміоцити із гіперезиофільною цитоплазмою; Є, Ж – вакуолізація ядер; И, І – інфільтрація лімфоцитами; Л, М – повні та часткові розриви судин (усі вказані зміни зазначено стрілочками). Примітки: WT/WT – тварини контрольної групи; WT/CKO – тварини із гетерозиготною делецією  $\alpha$ -Е-катеніну, CKO/CKO – тварини із гомозиготною делецією гена  $\alpha$ -Е-катеніну. Кількість тварин у дослідженні: 5

Загалом наші дані свідчать, що втрата гена  $\alpha$ -E-катеніну в ембріональному серці спричиняє розвиток гіпертрофії міокарда у дорослих тварин, яка супроводжується численними гістопатологічними перебудовами тканини міокарда. Вочевидь,  $\alpha$ -E-катенін має принципове значення для функціонування серця дорослих тварин і його адаптацій до фізіологічних і вікових факторів. Така думка узгоджується з результатами досліджень Sheikh і співавторів, де було показано, що делеція гена  $\alpha$ -E-катеніну в дорослому серці спричиняє розвиток кардіоміопатії, однак, на відміну від нашої роботи, автори не спостерігали фіброзу міокарда й інших гістопатологічних змін, описаних вище [17]. На нашу думку, такі суперечності можна пояснити різною ефективністю Cre-систем, застосованих авторами та в нашій роботі. Так, Sheikh і колеги використовували Cre-рекомбіназу, експресія якої контролюється промотором легкого ланцюга 2v і характеризується меншою ефективністю, приблизно до 80 % [5]. Тоді як застосована нами система характеризується вищою ефективністю і, на відміну від попередньої роботи, ми не спостерігали залишкової експресії білка [2, 14].

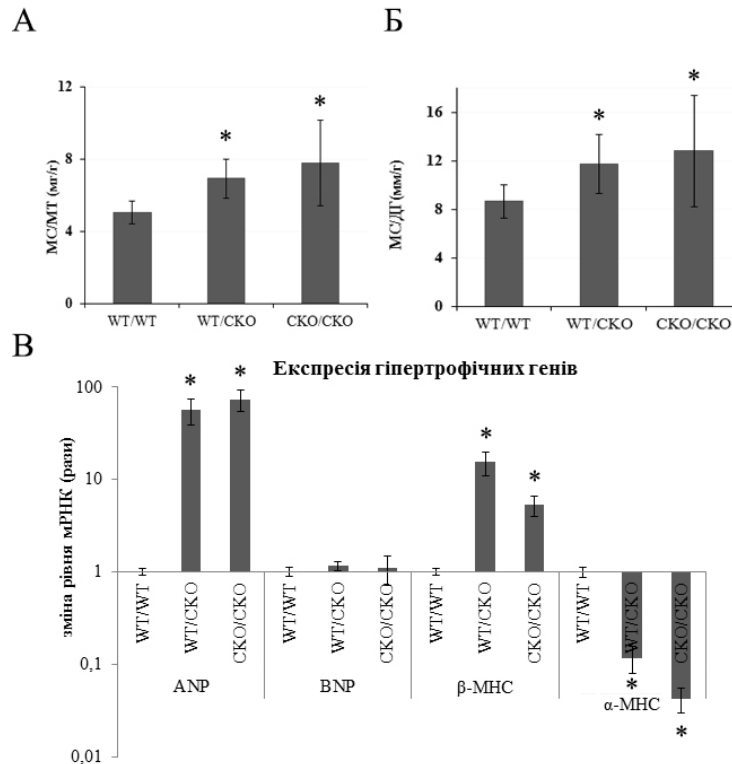


Рис. 3. Повна та часткова делеція гена  $\alpha$ -E-катеніну спричиняє розвиток гіпертрофії серця у дорослих мишей: А – аналіз індексу відношення маси серця до маси тіла (HW/BW, мг/г); Б – аналіз індексу відношення маси серця до довжини голілки (HW/TL, мг/мм) (\* –  $p < 0,05$ ); В – аналіз зміни рівня експресії генів-гіпертрофічної відповіді. Примітки: WT/WT – тварини контрольної групи; WT/CKO – тварини з гетерозиготною делецією  $\alpha$ -E-катеніну; CKO/CKO – тварини з гомозиготною делецією гена  $\alpha$ -E-катеніну. Рівень експресії в контролі: 1. Кількість тварин у дослідженні: 3 (\* –  $P < 0,05$  відносно WT/WT)

На користь нашої думки свідчить і робота Li та співавторів, де генетичний нокаут не лише  $\alpha$ -E-катеніну, а й  $\alpha$ -T-катеніну в ембріональному серці призводив до розвитку гіпертрофії та підвищеної проліферації кардіоміоцитів у тварин віком три місяці [11]. Однак нами було показано, що навіть делеція тільки  $\alpha$ -E-катеніну спричиняє патологічні зміни

серця і, вочевидь, компенсаторної ролі  $\alpha$ -Т-катеніну недостатньо для підтримки нормальної морфології післянатального серця. Загалом, можемо припустити, що  $\alpha$ -Е-катенін має супресорну функцію в серці, а саме запобігає патологічним перебудовам у процесі старіння, за гемодинамічних навантажень та інших стресів.

#### Подяки

Автори вдячні д-ру Гленну Редісу за нокаутних і трансгенних тварин, які він люб'язно надав у наше розпорядження.

Робота виконується в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України „Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства” (грант N40/2015-2020).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Балацький В. В., Пальчевська О. Л., Мацевич Л. Л., Півень О. О.  $\alpha$ -Е-катенін потенційний регулятор канонічного Wnt та HIPPO-сигналінгів у міокарді // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. 2016. Vol. 14. № 2. P. 168–73.
2. Agah R., Frenkel P. A., French B. A. et al. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle *in vivo* // J. Clin. Invest. 1997. Vol. 100. N 1. P. 169–79.
3. Armstrong S., Ganote C. E. Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of glycolytic blockade, phorbol esters, and ischaemia // Cardiovasc. Res. 1994. Vol. 28. N 11. P. 1700–1706.
4. van den Borne S. W. M., Narula J., Voncken J. W. et al. Defective Intercellular Adhesion Complex in Myocardium Predisposes to Infarct Rupture in Humans // J. Am. Coll Cardiol. 2008. Vol. 51. N 22. P. 2184–2192.
5. Chen J., Kubalak S. W., Chien K. R. Ventricular muscle-restricted targeting of the RXR $\alpha$  gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis // Development. 1998. Vol. 10. N 125. P. 1943–1949.
6. Dai Z., Aoki T., Fukumoto Y., Shimokawa H. Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure // J. Cardiol. 2012. Vol. 60. N 5. P. 416–421.
7. Gandhi M. S., Kamalov G., Shahbaz A. U. et al. Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis // Heart Fail Rev. 2011. Vol. 16. N 1. P. 23–34.
8. Grigoryan T., Wend P., Klaus A., Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice // Genes Dev. 2008. Vol. 22. N 17. P. 2308–2341.
9. Hasham M. G., Baxan N., Stuckey D. J. et al. Systemic autoimmunity induced by the TLR7/8 agonist Resiquimod causes myocarditis and dilated cardiomyopathy in a new mouse model of autoimmune heart disease // Dis. Model Mech. 2017. Vol. 10. N 3. P. 259–270.
10. Kontaridis M. I., Geladari E. V., Geladari C. V. Pathways to myocardial hypertrophy. In: Introduction to Translational Cardiovascular Research. 2015. P. 167–186.
11. Li J., Gao E., Vite A. et al. Alpha-catenins control cardiomyocyte proliferation by regulating yap activity // Circ. Res. 2015. Vol. 116. N 1. P. 70–79.
12. Ohsugi M., Hwang S-Y., Butz S. et al. Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development // Dev Dyn. 1996. Vol. 206. N 4. P. 391–402.
13. Olinde M.D KD, O'Connell, M.D JB. Inflammatory heart disease: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment of Myocarditis // Annu. Rev. Med. 1994. Vol. 45. N 1. P. 481–490.
14. Piven O. O., Kostetskii I. E., Macewicz L. L. et al. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development // Exp. Biol. Med. 2011. Vol. 236. N 7. P. 816–822.

15. Puchtler H., Sweat F. Histochemical specificity of staining methods for connective tissue fibers: Resorcin-fuchsin and van Gieson's picro-fuchsin // *Histochemie*. 1964. Vol. 4. N 1. P. 24–34.
16. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9. N 7. P. 671–675.
17. Sheikh F., Chen Y., Liang X. et al.  $\alpha$ -E-catenin inactivation disrupts the cardiomyocyte adherens junction, resulting in cardiomyopathy and susceptibility to wall rupture // *Circulation*. 2006. Vol. 114. N 10. P. 1046–1055.
18. Taegtmeyer H., Sen S., Vela D. Return to the fetal gene program // *Ann. N Y Acad Sci*. 2010. Vol. 1188. N 1. P. 191–198.
19. Townsend N., Wilson L., Bhatnagar P. et al. Cardiovascular disease in Europe: Epidemiological update 2016. *European Heart Journal*. 2016.
20. Wickline E. D., Dale I. W., Merkel C. D. et al.  $\alpha$ T-Catenin Is a Constitutive Actin-binding  $\alpha$ -Catenin That Directly Couples the Cadherin-Catenin Complex to Actin Filaments // *J. Biol. Chem*. 2016. Vol. 291. N 30. P. 15687–15699.
21. Yao M., Qiu W., Liu R. et al. Force-dependent conformational switch of  $\alpha$ -catenin controls vinculin binding. Vol. 5. *Nature communications*. 2014.
22. Zhang C.-G., Jia Z.-Q., Li B.-H. et al.  $\beta$ -Catenin/TCF/LEF1 can directly regulate phenylephrine-induced cell hypertrophy and Anf transcription in cardiomyocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009. Vol. 390. N 2. P. 258–262.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.17

доопрацьована 28.11.17

прийнята до друку 04.12.17

## EMBRYONIC CARDIOSPECIFIC KNOCKOUT OF $\alpha$ -E-CATENIN GENE LEADS TO ADULT HEART HYPERTROPHY

V. Balatskyy, L. Macewicz, O. Piven

*Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine*

*150, Akad. Zabolotnyi St., Kyiv 03680, Ukraine*

*e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua*

Alpha-E-catenin is important component of adherent junction in adult myocardium. Early was shown that genetic knockout of this gene during cardiogenesis doesn't leads to lethality or embryonic heart development violation. However,  $\alpha$ E-catenin role in adult heart development and function is far from understood. Aim of our work is recovering of  $\alpha$ E-catenin function in heart hypertrophy. In our experiment we have used  $\alpha$ E-catenin conditional knockout and  $\alpha$ MHC-Cre transgenic mice. We have utilized histological methods of analysis: hematoxylin and eosin (H&E), van Gieson staining. The level of hypertrophic genes expression was studied with qPCR. We found that hetero- and homozygous knockout of  $\alpha$ E-catenin in embryonic heart occur heart hypertrophy in adult mice at 10 months of age, which accompanied by massive histopathological remodelling of heart tissue: fibrosis, infiltration by lymphocytes, nuclear vacuolation, waived cardiomyocytes, vessel walls rapture. Also, the higher levels of hypertrophic genes (*ANP* and  $\beta$ -MHC) expression were observed in mice with hetero- and homozygous knockout of  $\alpha$ E-catenin. Thus, hetero- and homozygous deletion of  $\alpha$ E-catenin is leads to violation of heart tissue structure and hypertrophy in adult heart.

**Keywords:**  $\alpha$ E-catenin, hypertrophy, gene expression, myocardium, fibrosis