

УДК 576.52

БАЛАЦЬКИЙ В.В., МАЦЕВИЧ Л.Л., ПІВЕНЬ О.О.✉*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,**Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua*

✉ o.o.piven@imbg.org.ua

КАРДІОСПЕЦИФІЧНА ДЕЛЕЦІЯ α -Е-КАТЕНІНУ СПРИЧИНЯЄ ЗМЕНШЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА ДЕСМОСОМ γ -КАТЕНІНУ

Серцево-судинні захворювання становлять основну причину смерті та інвалідності серед населення. Окрім інших факторів, важливу роль у механізмах патогенезу таких захворювань відіграють і білки міжклітинної адгезії. Відомо, що для функціонування серця як єдиного синцитію принципове значення має правильна організація інтеркалярних дисків (ІД) [1]. До складу останніх входять адгеринові з'єднання, десмосоми, гібридні з'єднання та щільні контакти [2]. Роль білків-компонентів зазначених макромолекулярних комплексів у функціонуванні серця вивчалася як із застосуванням модельних об'єктів, так і в зразках від пацієнтів. Низка експериментальних робіт свідчить про те, що порушення структури інтеркалярних дисків є летальним у ранньому ембріогенезі, а у дорослих тварин призводить до розвитку кардіоміопатій та смертності [3, 4]. Так, раніше нами було показано, що кардіоспецифічна делеція N-кадєрину та β -катеніну призводить до виражених порушень розвитку ембріонального серця і як наслідок до ембріональної летальності [4]. Гетерозигтна делеція β -катеніну та гомозигтна α -Е-катеніну в ембріональному серці не спричиняла порушень розвитку ембріона та ембріональної летальності. Однак нами було показано, що втрата β -катеніну та α -Е-катеніну у кардіогенезі спричиняє певні порушення у новонародженому та дорослому серці, а гомозигтна делеція β -катеніну навіть летальна одразу після народження [4, 5].

Раніше нами було показано, що і гетерозигтна, і гомозигтна делеція α -Е-катеніну в ембріональному серці мишей спричиняє виражені морфологічні вади у дорослому міокарді, а саме: фібрози, витончення стіночок лівого шлуночка, збільшення співвідношення маси серця до маси тіла та підвищення експресії гіпертро-

фічних генів [6]. Усе це разом призводило до летальності тварин, починаючи з 10 місяця життя. Отриманий нами фенотип та молекулярно-генетичний профіль таких сердець свідчить про розвиток серцевої недостатності та, ймовірно, дилатаційної кардіоміопатії (ДКМП) у тварин із делецією α -Е-катеніну. Однак відомо, що ДКМП характеризується не лише збільшенням внутрішнього об'єму лівого шлуночка та витонченням його стінок, а й порушенням структури десмосом [7]. Це захворювання досить часто ще називають «хворобою демосом». Варто зауважити, що основним структурним компонентом цього комплексу є плакоглобін (або γ -катенін). Як було виявлено, мутації у гені γ -катеніну призводять до розвитку синдрому Наксос, що характеризується аритмогенною кардіоміопатією правого шлуночка [8, 9]. Тому у цій роботі ми вирішили дослідити вплив гетерозиготної та гомозиготної кардіоспецифічної делеції α -Е-катеніну на експресію гена γ -катеніну – основного компонента десмосом.

Матеріали і методи

Генерація мишей із гетерозиготною та гомозиготною делецією гена α -Е-катеніну. Гомозиготних мишей, у яких 2 екзон гена α -Е-катеніну фланкований LoxP-сайтами (Flox/Flox; aMHC-Cre⁻), схрещували із мишами, які експресують Cre-рекомбіназу під контролем промотора гена важкого ланцюга міозину α (WT/WT; aMHC-Cre⁺). Потомство F1, що мало генотип α -Е-катеніну Flox/WT; aMHC-Cre⁺, зворотно схрещували із тваринами із генотипом: Flox/Flox; aMHC-Cre⁻. Отримане у результаті таких схрещувань потомство мишей F2 використовували в подальших дослідженнях, а саме: Flox/WT; aMHC-Cre⁺ – миші із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, Flox/Flox; aMHC-Cre⁺ –

миші із гомозиготною делецією α -Е-катеніну, Flox/WT; aMHC-Cre⁻ та Flox/Flox; aMHC-Cre⁻ – слугували у якості контрольної групи тварин. Варто зауважити, що aMHC-Cre експресується лише в кардіоміоцитах, починаючи із 10,5 дня ембріонального розвитку [4]. У своїх дослідженнях ми використовували лише самців віком 10 місяців.

Генотипування тварин. ДНК із кінчика хвоста використовувалася для генотипування. Виділення ДНК та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали за стандартними протоколами [10]. Для виявлення фланкованих LoxP-сайтами алелів використовували таку пару праймерів: 5'CATTTCTGTCCACCCCAAAGACAC3' і 5'GCAAAATGATCCAGCGTCCTGGG3' (Flox-алель – 350 п. н., WT-алель – 100 п. н.). aMHC-Cre-трансген виявили за допомогою таких

праймерів: 5'GAACCTGAAGATGTTCCGC-3' та 5'TACACCTCGGTGCTAACCAG3' (430 п. н.).

Виділення РНК, синтез кДНК та ПЛР в реальному часі. Тотальну РНК виділяли із тканини лівого шлуночка за допомогою innuSOLV RNA Reagent (Analytikjena) згідно з рекомендаціями виробника. Отриману РНК обробляли ДНКазою 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 із використанням суміші Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific) на приладі iCycler single-color real-timePCR detection system (IQ5, BioRad). Аналізували рівень експресії γ -катеніну. В якості референсного гена використовували *Gapdh*. Праймери, які використовували для ПЛР в реальному часі, наведені в таблиці.

Таблиця. Праймери для ПЛР в реальному часі

Ген	Праймер прямий	Праймер зворотний
<i>γ-Catenin</i>	5'CCTGTGGACTCTGCGCAAT3'	5'GACCAGGATCTTCAGCACACTCT3'
<i>Gadph</i>	5'CCACTCTTCCACCTTCGATG3'	5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'

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

Виділення білка та Вестерн-блот аналіз.

Тканину шлуночків гомогенізували у 50 мМ NEPES (рН 7,4) буфері, що містить 2 мМ етилендіамінтетраацетат, 1 % Nonidet P-40, 10 % гліцерол, інгібітори протеаз (10 мкг/мкл лейпептину, 5 мкг/мкл пепстатину А, 2 мкг/мкл апротиніну, 1 мМ фенілметилсульфоніл флуориду) та інгібітори фосфатаз (1 мМ натрій ортованадат та 10 мМ натрій флуорид). Після цього центрифугували при 10500g протягом 20 хв. Концентрацію білка визначали за допомогою Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), як стандарт використовували BSA. Визначали рівень γ -катеніну (610253, BD Transduction Laboratories™) та GAPDH (MA5-15738, ThermoFisher Scientific) у 50 мкг білкових лізатів за допомогою специфічних антитіл. Розділення білків проводили в 10 % поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. Потім білок перенесли на PVDF мембрану (Millipore, Billerica, MA, USA). Візуалізацію здійснювали за допомогою хемілюмінесцентного субстрату HR Substrate reagent (Millipore). Для визначення умовних

одиниць експресії γ -катеніну: інтенсивність сигналу в доріжках, які відповідали γ -катеніну, ділили на інтенсивність сигналу в доріжках для GAPDH. 1 у. о. – рівень білка в контрольних (WT/WT) тварин.

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

Результати та обговорення

Плакоглобін або γ -катенін – головний компонент десмосом у складі інтеркалярних дисків, окрім того, цей білок може брати участь і у формуванні адгеринових з'єднань, які забезпечують міцні міжклітинні контакти у тканині міокарда [11]. Відомо також, що мутація гена γ -катеніну спричиняє розвиток Наксос синдрому, який характеризується кучерявим волоссям та аритмогенною кардіоміопатією правого шлуночка у людей [8, 12]. Окрім того, порушення структури десмосом майже завжди спостерігається і при розвитку ДКМП [7]. Ми вже повідомляли, що делеція іншого білка – компонента адгеринових з'єднань та інтеркалярних дисків α -Е-катеніну – спричиняє морфологічні вади та фіб-

роз дорослого міокарда, призводить до розвитку гіпертрофії й активації канонічного WNT-сигналіngu. Окрім того, отриманий та описаний нами фенотип був асоційований із летальністю тварин [6]. Загалом морфологічний, молекулярно-генетичний та фізіологічний аналіз (не опубліковані дані) сердець із гетеро- та гомозиготною делецією гена α -Е-катеніну дає змогу говорити про розвиток у таких тварин серцевої недостатності і, ймовірно, ДКМП. Тож ми вирішили проаналізувати зміни рівня експресії γ -

катеніну у серцях із втратою α -Е-катеніну віком 10 місяців.

Із застосуванням трПЛР та Вестрен-блот аналізу ми проаналізували рівень експресії мРНК та білка γ -катеніну (рис.) у тварин із делецією одного та двох алелів гена α -Е-катеніну. У результаті проведеної роботи виявили 20-ти кратне зниження рівня мРНК γ -катеніну у тварин із гомозиготною делецією α -Е-катеніну, в той час кількість мРНК γ -катеніну у тварин із гетерозиготною делецією не відрізнялася від такої в контролі (рис. А).

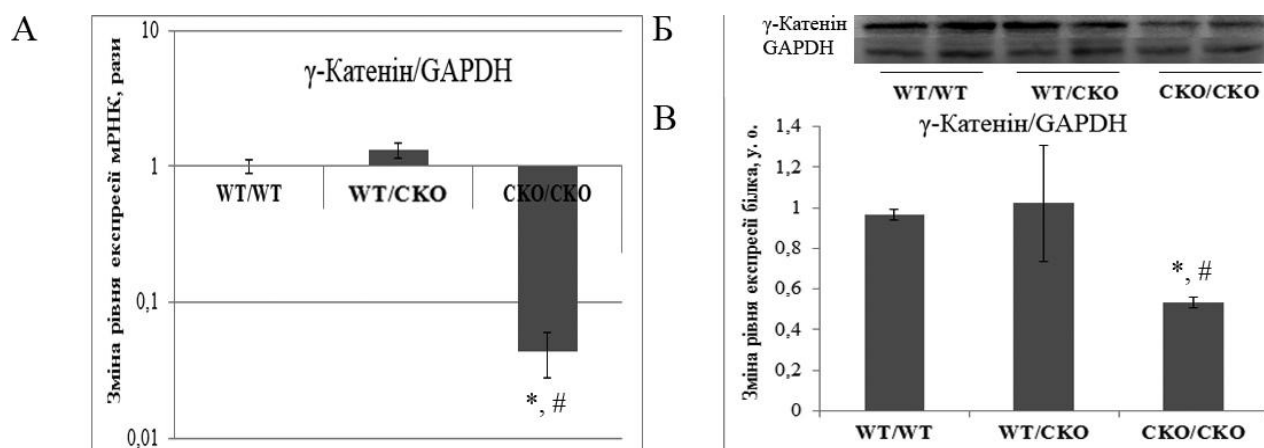


Рис. Експресія мРНК та білка гена γ -катеніну у тканині міокарда контрольних та дослідних тварин віком 10 місяців. А – відносний рівень експресії гена γ -катеніну. Б – результати Вестерн-блоту. В – денситограма рівнів експресії γ -катеніну та GAPDH. WT/WT – контрольні тварини, SKO/WT – тварини із делецією одного алеля гена α -Е-катеніну, SKO/SKO – тварини із делецією двох алелів гена α -Е-катеніну. * – $p < 0,05$ відносно WT/WT, # – $p < 0,05$ відносно SKO/WT. у. о. – умовні одиниці. Кількість тварин у кожній групі – не менше 3.

За допомогою Вестерн-блот аналізу ми також визначили рівень експресії білка γ -катеніну та встановили, що у тварин із повною втратою α -Е-катеніну відбувається 2-ох кратне зниження білка порівняно із контрольними тваринами, а у тварин із частковою втратою α -Е-катеніну рівень γ -катеніну не змінювався (рис. Б, В). Дані Вестерн-блот аналізу узгоджуються із результатами ПЛР у реальному часі і свідчать про зменшення кількості білка γ -катеніну у серцях тварин із гомозиготною делецією гена α -Е-катеніну.

Отримані нами дані свідчать не лише про суттєві порушення розвитку дорослого серця, а саме: фіброз, збільшення маси серця та активацію гіпертрофічних генів, а й про порушення рівня експресії основного компонента демосом

за умови повної втрати гена α -Е-катеніну. Ймовірно, при делеції цього гена в ембріональному серці порушується організація десмосомальних з'єднань у структурі ІД дорослого міокарда, що може призводити до розвитку ДКМП та летальності. Звісно, наше припущення потребує детального імуногістохімічного аналізу структури ІД у таких серцях.

Висновки

Нами було показано, що повна втрата гена α -Е-катеніну у кардіоміоцитах ембріонального серця спричинює зменшення експресії основного компонента десмосом – γ -катеніну – на рівні мРНК та білка, що може призводити до порушення організації структури демосом у дорослому міокарді.

Література

1. Vite A., Radice G.L. N-cadherin/catenin complex as a master regulator of intercalated disc function // *Cell. Commun. Adhes.* – 2014. – V. 21. – P. 169–179. doi: 10.3109/15419061.2014.908853.
2. Li J., Radice G.L. A new perspective on intercalated disc organization: implications for heart disease. // *Dermatol Res Pract.* – 2010. – V. 2010. – P. 207835. doi: 10.1155/2010/207835.
3. Kostetskii I., Li J., Xiong Y., Zhou R., Ferrari V., Patel V., Molkentin J., Radice G. Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. // *Circ. Res.* – 2005. – V. 96. – P. 346–354. doi: 10.1161/01.RES.0000156274.72390.2c.
4. Piven O.O., Kostetskii I.E., Macewicz L.L., Kolomiets Y.M., Radice G.L., Lukash L.L. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development // *Exp Biol Med (Maywood)*. – 2011. – V. 236. – P. 816–822. doi: 10.1258/ebm.2011.010362.
5. Palchevska O.L., Balatskii V.V., Andrejeva A.O., Macewicz L.L., Piven O.O., Lukash L.L. Embryonically induced β -catenin haploinsufficiency attenuates postnatal heart development and causes violation of foetal genes program // *Biopolym. Cell* – 2013. – V. 29. – P. 124–130. doi: 10.7124/bc.00080F.
6. Балацький В.В., Акіменко І., Мацевич Л.Л., Півень О.О., Лукаш Л.Л. Альфа-Е-катенін у гістологічних перебудовах міокарда при старінні // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – К.: Логос, 2016. – Т. 18 – С. 219–222.
7. Pluess M., Daeubler G., Dos Remedios C.G., Ehler E. Adaptations of cytoarchitecture in human dilated cardiomyopathy // *Biophys. Rev.* – 2015. – V. 7. – P. 25–32. doi: 10.1007/s12551-014-0146-2
8. Li D., Liu Y., Maruyama M., Zhu W., Chen H., Zhang W., Reuter S., Lin S.F., Haneline L.S., Field L.J., Chen P.S., Shou W. Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy. // *Hum. Mol. Gen.* – 2011. – V. 20. – P. 4582–4596. doi: 10.1093/hmg/ddr392.
9. Li J., Swope D., Raess N., Cheng L., Muller E.J., Radice G.L. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of β -catenin signaling // *Mol. Cell. Biol.* – 2011. – V. 31. – P. 1134–1144. doi: 10.1128/MCB.01025-10.
10. Wang T.Y., Wang L., Zhang J.H., Dong W.H. A simplified universal genomic dna extraction protocol suitable for per // *Genet. Mol. Res.* – 2011. – V. 10. – P. 519–525. doi: 10.4238/vol10-1gmr1055.
11. Gutstein D.E. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions // *J. Cell Sci.* – 2003. – V. 116. – P. 875–885. doi: 10.1242/jcs.00258.
12. Asimaki A., Syrris P., Wichter T., Matthias P., Saffitz J.E., McKenna W.J. A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy // *Am. J. Hum. Genet.* – 2007. – V. 81. – P. 964–973. doi: 10.1086/521633.

BALATSKYI V.V., MACEWICZ L.L., PIVEN O.O.

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

CARDIAC DELETION OF α -E-CATENIN LEADS TO REDUCED EXPRESSION OF THE MAIN COMPONENT OF DESMOSOMES – γ -CATENIN

Aim. In our present work, we have addressed to the γ -catenin, known main component of desmosomes, expression in hearts with heterozygous and homozygous knockout of α -E-catenin gene. **Methods.** Alpha-E-catenin conditional knockout mice were bred with α -MHC-Cre transgenic mice. We analyze expression of γ -catenin with real time qPCR and Western blot. **Results.** Cardiac α -E-catenin deletion leads to downregulation of γ -catenin mRNA and protein levels only in homozygous mice, while we not observed any perturbation of γ -catenin expression in heterozygous mice. **Conclusions.** We have shown that homozygous knockout of α -E-catenin gene in embryonic heart occur reduction of the main component of desmosomes – γ -catenin mRNA and protein level of expression, which can lead to disruption of the desmosomes structure in adult myocardium.

Keywords: α -E-catenin, heart failure, γ -catenin.