

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



БИЛЬДЮГ Наталья Борисовна

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕСТРОЕК СОКРАТИТЕЛЬНОГО
АППАРАТА КАРДИОМИОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор Г.П. Пинаев

доктор биологических наук
С.Ю. Хайтлина

Санкт-Петербург 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
Актуальность исследования.....	8
Цели и задачи исследования	12
Основные положения, выносимые на защиту.....	13
Научная новизна работы	14
Теоретическое и практическое значение работы.....	14
Апробация работы.....	16
Вклад автора	17
Структура и объем диссертации.....	17
Финансовая поддержка работы	17
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Сократительный аппарат кардиомиоцитов	18
1.1.1. Строение сократительного аппарата кардиомиоцитов	18
1.1.2. Миофибриллогенез	21
1.2. Сократительная система немышечных клеток	23
1.2.1. Цитоскелет	23
1.2.2. Стресс-фибриллы	24
1.3. Актин	25
1.3.1. Структура актина	25
1.3.2. Полимеризация и деполимеризация актина.....	26
1.3.3. Актин-связывающие белки	28
1.3.4. Изоформы актина.....	29
1.3.5. Распределение изоформ актина.....	31
1.3.6. Механизмы, обеспечивающие разные функции изоформ актина .	37
1.3.7. Смена изформ актина в ходе дифференцировки кардиомиоцитов из стволовых клеток	38
1.3.8. Смена изформ актина при культивировании кардиомиоцитов	39

1.3.9. Экспрессия гладкомышечного α -актина при патологии	39
1.4. Регенерация сердца	40
1.5. Методы дифференцировки кардиомиоцитов	42
1.6. Первичная культура кардиомиоцитов	52
1.7. Внеклеточный матрикс	53
1.7.1. Внеклеточный матрикс сердца	53
1.7.2. Матриксные металлопротеиназы	57
1.7.3. Культивирование кардиомиоцитов в присутствии компонентов внеклеточного матрикса	64
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	69
2.1. Получение первичной культуры кардиомиоцитов	69
2.2. Получение культуры сердечных фибробластов	71
2.3. Культивирование кардиомиоцитов в кондиционированной среде от фибробластов	71
2.4. Культивирование кардиомиоцитов на отдельных белках внеклеточного матрикса	72
2.5. Получение проб внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами или сердечными фибробластами	72
2.6. Культивирование кардиомиоцитов на матриксе, полученном от кардиомиоцитов или сердечных фибробластов	73
2.7. Культивирование кардиомиоцитов в коллагеновых гелях	73
2.8. Флуоресцентное окрашивание структур сократительного аппарата кардиомиоцитов	74
2.9. Выявление внеклеточных коллагеновых структур	75
2.10. Конфокальная микроскопия	76
2.11. Получение клеточных лизатов	76
2.12. Электрофоретический анализ	77
2.13. Вестерн-блоттинг	78
2.14. Идентификация белков методом масс-спектрометрии	79

2.15. Идентификация матриксных металлопротеиназ методом зимографии.....	80
2.16. Экстракция РНК, синтез кДНК и ПЦР-реакции	81
2.17. Статистический анализ.....	82
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	83
3.1. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования.....	83
3.2. Влияние отдельных белков внеклеточного матрикса на перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре....	88
3.3. Синтез внеклеточного матрикса кардиомиоцитами в культуре	92
3.4. Продукция ламинина и коллагена кардиомиоцитами в культуре	93
3.5. Выявление коллагеновых структур во внеклеточном матриксе кардиомиоцитов.....	96
3.6. Матриксные металлопротеиназы на разных сроках культивирования кардиомиоцитов	97
3.7. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании на матриксе от таких же кардиомиоцитов	100
3.8. Сравнение внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами, и матрикса, наработанного сердечными фибробластами	102
3.9. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании на матриксе, наработанном сердечными фибробластами	104
3.10. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в кондиционированной среде от сердечных фибробластов.....	106
3.11. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в гелях с разной концентрацией коллагена.....	108
3.12. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов	

на разных сроках культивирования в коллагеновых гелях с концентрацией 1 мг/мл	110
3.13. Матриксные металлопротеиназы на разных сроках культивирования кардиомиоцитов в коллагеновых гелях с концентрацией коллагена 1 мг/мл	112
3.14. Экспрессия изоформ актина в кардиомиоцитах в процессе культивирования	114
3.15. Синтез α -гладкомышечного актина в кардиомиоцитах в процессе культивирования	115
3.16. Обратная корреляция между синтезом внеклеточного матрикса и гладкомышечного α -актина в кардиомиоцитах	117
3.17. Локализация гладкомышечного α -актина в сократительных структурах кардиомиоцитов на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата.....	118
3.18. Перераспределение саркомерных белков α -актинина и миозина при перестройке сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре	119
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ	123
4.1. Влияние внеклеточного матрикса на сократительный аппарат кардиомиоцитов	123
4.2. Синтез кардиомиоцитами белков внеклеточного матрикса и матриксных металлопротеиназ	124
4.3. Смена изоформ актина в кардиомиоцитах в процессе перестройки их сократительного аппарата	128
4.4. Обратная корреляция между гладкомышечным актином и внеклеточным матриксом	132
ВЫВОДЫ	136
Список работ, опубликованных по теме диссертации	137
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	140

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – внеклеточный матрикс

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

иКМЦ – индуцированные кардиомиоцит-подобные клетки

кДа – килодальтоны

КМЦ – кардиомиоциты

мкм – микрометры

ММП – матриксные металлопротеиназы

ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле

п.о. – пары оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТИММП – тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ

ЭДТА – этилендиамин тетраацетат натрия

ADP (adenosine diphosphate) – аденозиндифосфорная кислота

ATP (adenosine triphosphate) – аденозинтрифосфорная кислота

BMP (bone morphogenetic protein) – костный морфогенетический белок

cTnT (cardiac muscle troponin T) – сердечный тропонин T

DAPI (4,6-diamidinophenylindole) – 4,6-диамидофенилиндол

FITC (fluorescein isothiocyanate) – изотиоцианат флуоресцеина

MHC (myosin heavy chain) – тяжелая цепь миозина

P_i – неорганический фосфат

PVDF (polyvinylidene difluoride) – поливинилидендифторид

SDS (sodium dodecylsulfate) – додецилсульфат натрия

TGF (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли альфа

TnI (troponin I) – тропонин I

TNNI1 (ssTnI, skeletal muscle troponin I) – скелетный тропонин I

TNNI3 (cTnI, cardiac muscle troponin I) – сердечный тропонин I

TnT (troponin T) – тропонин T

TRITC (tetramethylrhodamine) – тетраметилродамин

α -CAA (α -cardiac muscle actin) – сердечный α -актин

α -SKA (α -skeletal muscle actin) – скелетный α -актин

α -SMA (α -smooth muscle actin) – гладкомышечный α -актин

β -CYA (β -cytoplasmic actin) – цитоплазматический β -актин

β -Mg1 (β -myoglobin) – β -миоглобин

γ -CYA (γ -cytoplasmic actin) – цитоплазматический γ -актин

γ -SMA (γ -smooth muscle actin) – гладкомышечный γ -актин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Кардиомиоциты являются функциональными клетками сердца и отвечают за его способность к сокращению. В ходе эмбрионального развития сердца млекопитающих кардиомиоциты активно пролиферируют, но через некоторое время после рождения претерпевают терминальную дифференцировку, которая сопровождается их выходом из клеточного цикла. Дальнейший рост клеток связан в основном с гипертрофией (Erokhina and Rumyantsev, 1986; Naqvi et al., 2014). Неспособность миокарда к самообновлению ставит целый ряд проблем, которые в первую очередь связаны с вопросами регенерации. Кроме того, неспособность кардиомиоцитов к делению ограничивает возможность получения стабильной линии этих клеток. Несмотря на огромное количество исследований, направленных на дифференцировку различных клеток в кардиомиоциты, использование дифференцированных кардиомиоцитов в качестве модели для фундаментальных, а также прикладных исследований *in vitro* пока еще ограничено в связи с отсутствием стандартного метода получения гомогенной культуры зрелых функционально активных клеток. На сегодняшний день единственной приемлемой моделью для изучения кардиомиоцитов *in vitro* является их первичная культура.

О возможности перевода кардиомиоцитов в культуру и поддержания их в условиях *in vitro* в течение длительного времени известно довольно давно. Однако при культивировании кардиомиоцитов происходят существенные изменения в их организации. При этом наблюдается перестройка их сократительного аппарата с обратимым преобразованием типичных миофибрилл в неисчерченные структуры, напоминающие структуры цитоскелета немышечных клеток. Такие перестройки сопровождаются временной утратой способности кардиомиоцитов к сокращению (Nag and Cheng, 1981; Борисов и др., 1989).

Несмотря на то что феномен перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре давно известен, его причины и механизмы до сих пор не изучались. Вместо этого большинство исследователей подбирает условия экспериментов, позволяющие обходить этот процесс. В частности, многие авторы используют в своих исследованиях клетки на ранних сроках культивирования до начала перестройки их сократительного аппарата.

Настоящая работа в целом направлена на изучение процессов, лежащих в основе перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре. Исследование этих процессов может внести существенный вклад в понимание механизмов пластичности сократительных систем клеток, поскольку данная модель является редким примером изменения организации стабильного высокодифференцированного сократительного аппарата мышечных клеток.

Многие клетки при помещении в культуру необратимо изменяют свою морфологию и свойства. Обратимый характер перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре указывает на то, что клетки успешно приспосабливаются к новым для них условиям. В связи с этим механизмы перестройки можно рассматривать как модель адаптации клеток к внеклеточному микроокружению во время ключевых физиологических и патологических процессов.

Процесс перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре имеет ряд сходных черт со стадиями эмбрионального развития этих клеток. При восстановлении исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов наблюдается постепенное формирование новых миофибрилл. Кроме того, некоторыми исследователями было показано, что кардиомиоциты в культуре начинают экспрессировать белки, характерные для ранних стадий эмбрионального развития, в частности, гладкомышечный α -актин (van Bilsen and Chien, 1993; Schaub et al. 1997). В связи с этим данные исследования изоформ актина и анализа корреляции их появления с

изменениями в организации сократительных структур могут стать хорошей моделью для изучения миофибриллогенеза в ходе эмбрионального развития. Понимание механизмов, лежащих в основе восстановления миофибриллярной организации КМЦ и их сократительной способности в системе *in vitro*, может позволить в дальнейшем управлять этим процессом и, возможно, найти подходы к созданию более эффективных методов получения дифференцированных кардиомиоцитов и способов их оценки. Кроме того, изучение причин перестройки сократительного аппарата КМЦ необходимо для возможности получения более оптимальной системы культивирования, позволяющей кардиомиоцитам непрерывно поддерживать миофибриллярную организацию их сократительного аппарата и функциональную активность.

Поскольку перестройка сократительного аппарата кардиомиоцитов не наблюдается в нормальной ткани сердца, мы предположили, что она может быть вызвана потерей клетками их естественного микроокружения. В организме фактически все клетки находятся в окружении внеклеточного матрикса, который образует упорядоченную пространственную сеть, на поверхности и внутри которой клетки могут перемещаться и взаимодействовать друг с другом. Внеклеточный матрикс является крайне динамичной системой и постоянно подвергается ремоделированию матриксными металлопротеиназами.

На сегодняшний день накопилась значительное количество данных, свидетельствующих о влиянии внеклеточного матрикса на организацию сократительных структур немышечных клеток (Grinnell, 1978). При этом данных о возможном влиянии внеклеточного матрикса на сократительный аппарат мышечных клеток, в частности, кардиомиоцитов, крайне мало. Известно, однако, что изменение экспрессии белков внеклеточного матрикса может оказывать существенное влияние на строение и функцию сердца и связано с рядом сердечных заболеваний (Barallobre-Barreiro et al., 2012). В

ткани сердца за синтез и ремоделирование внеклеточного матрикса отвечают фибробласты и клетки эндотелия (Charman et al., 2003; Camelliti et al., 2005), в то время как кардиомиоциты специализируются на функции сокращения и не участвуют в его формировании.

Поскольку культура кардиомиоцитов лишена основных продуцентов внеклеточного матрикса, мы предположили, что перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов могут быть вызваны отсутствием внеклеточного матрикса в системе культивирования. В таком случае восстановление исходной организации должно было бы объясняться появлением необходимых компонентов внеклеточного матрикса. Несмотря на отсутствие данных о способности кардиомиоцитов синтезировать внеклеточный матрикс, мы предположили, что кардиомиоциты в культуре могут приобретать эту не типичную для них функцию и нарабатывать собственные компоненты внеклеточного матрикса для возможности восстановления исходной организации сократительного аппарата и возвращения к сократительной активности.

Цели и задачи исследования

Цель настоящего исследования заключалась в определении причин и механизмов перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать стадии перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования;
2. Определить, могут ли различные белки внеклеточного матрикса влиять на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов;
3. Оценить способность кардиомиоцитов синтезировать внеклеточный матрикс на разных сроках культивирования, а также охарактеризовать полученный матрикс;
4. Изучить способность кардиомиоцитов синтезировать внеклеточные матриксные металлопротеиназы;
5. Определить влияние внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами или сердечными фибробластами, на перестройку сократительного аппарата кардиомиоцитов;
6. Определить влияние трехмерного коллагенового матрикса на перестройку сократительного аппарата кардиомиоцитов;
7. Определить изоформы актина на разных сроках перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В процессе культивирования кардиомиоцитов происходит перестройка их сократительного аппарата, которая характеризуется семью ключевыми стадиями обратимого преобразования миофибрилл в структуры немышечного типа.
2. Кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования синтезируют собственные белки внеклеточного матрикса коллаген и ламинин, причем синтез этих белков коррелирует со стадиями перестройки их сократительного аппарата.
3. Кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования синтезируют внеклеточные матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9, причем количество указанных металлопротеиназ коррелирует со стадиями перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов и количеством коллагена во внеклеточном матриксе.
4. При культивировании кардиомиоцитов на отдельных белках внеклеточного матрикса, а также на матриксе, наработанном сердечными фибробластами или такими же кардиомиоцитами, происходит сокращение периода перестройки их сократительного аппарата.
5. При культивировании кардиомиоцитов в трехмерных 0,1% коллагеновых гелях не происходит перестройки их сократительного аппарата и секреции матриксных металлопротеиназ.
6. В процессе перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов появление гладкомышечного α -актина предшествует преобразованию миофибрилл в структуры немышечного типа, а его подавление предшествует экспрессии сердечной изоформы и восстановлению исходной организации.
7. Наблюдается обратная корреляция между экспрессией гладкомышечного α -актина и синтезом белков внеклеточного матрикса кардиомиоцитами в культуре.

Научная новизна работы

В работе впервые описаны причины и механизмы перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования. Обнаружено, что перестройка сократительного аппарата сопровождается временным замещением сердечной изоформы актина на гладкомышечную и изменением функции кардиомиоцитов с сократительной на не типичную для них синтетическую. Впервые показана способность кардиомиоцитов синтезировать структурные компоненты внеклеточного матрикса, а также продуцировать внеклеточные матриксные металлопротеиназы. Впервые обнаружено, что восстановление миофибрилярного аппарата кардиомиоцитов в процессе культивирования происходит по мере накопления собственных компонентов внеклеточного матрикса и сопровождается возобновлением экспрессии сердечной изоформы актина. Таким образом, в работе впервые показано влияние внеклеточного матрикса на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов и выявлена обратная корреляция между гладкомышечной изоформой актина и синтезом компонентов внеклеточного матрикса в процессе перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов. Полученные данные предполагают существование петли отрицательной обратной связи между внеклеточным матриксом и динамикой сократительной системы кардиомиоцитов.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты нашей работы указывают на высокую степень пластичности сократительного аппарата кардиомиоцитов и позволяют рассматривать внеклеточный матрикс в качестве важного регулятора не только динамического цитоскелета, но и сложноорганизованной сократительной системы мышечных клеток.

Подробно описанный нами процесс перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов с преобразованием миофибрилл в структуры немышечного типа и координированной сменой изоформ актина указывает на то, что разные типы организации сократительной системы зависят не только и не столько от происхождения клеток, сколько от факторов микроокружения.

Данные, полученные в настоящей работе, позволяют говорить о механизмах регуляции сократительного аппарата кардиомиоцитов через петлю отрицательной обратной связи, включающую внеклеточный матрикс и гладкомышечную изоформу актина, и рассматривать гладкомышечный α -актин как регулятор нормального фенотипа кардиомиоцитов.

Кроме того, наши результаты являются дополнительным подтверждением уже имеющихся на сегодняшний день данных о том, что гладкомышечный α -актин несовместим с миофибриллярной организацией сократительного аппарата и, таким образом, не может замещать другие изоформы актина без изменения функции.

Результаты настоящей работы показывают, что в ходе культивирования кардиомиоциты проходят стадии, по многим параметрам соответствующие стадиям эмбрионального развития. В связи с этим данные о механизме обратной регуляции между гладкомышечным α -актином и внеклеточным матриксом в процессе восстановления исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре можно использовать для изучения роли внеклеточного матрикса в процессе миофибриллогенеза. Кроме того, эти данные можно применять в разработке более эффективных методов кардиогенной дифференцировки *in vitro*.

С другой стороны, описанные нами механизмы перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов на начальных стадиях культивирования могут быть полезны для изучения патологических процессов в сердце, поскольку изменения, которые наблюдаются при

различных заболеваниях сердца, часто также сопровождаются появлением гладкомышечного α -актина и деформацией внеклеточного матрикса.

Кроме того, данные по культивированию кардиомиоцитов в коллагеновых гелях, полученные в настоящей работе, предлагают систему культивирования с непрерывным поддержанием исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов, которая при должной оптимизации может обеспечить получение гомогенной культуры функционально активных кардиомиоцитов для ее использования в качестве модели для фундаментальных и прикладных исследований.

Материалы диссертации используются в курсах лекций для бакалавров и магистров кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого и могут быть использованы в общих и специальных курсах лекций биологических факультетов других университетов.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ: 7 статей в рецензируемых журналах, в том числе 5 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 7 тезисов докладов конференций. Основные научные результаты диссертации были представлены и обсуждены на международном симпозиуме «Биологическая подвижность», г. Пущино, Россия, 2016 г.; II Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет», Санкт-Петербург, 2015 г.; 44-ой Европейской мышечной конференции, Варшава, Польша, 2015 г.; 18-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», г. Пущино, 2014 г.; Всероссийском симпозиуме и Школе-конференции для молодых ученых «Биология клетки в культуре», Санкт-Петербург, 2013 г.; III Съезде Общества клеточной биологии, Санкт-Петербург, 2012 г., III конференции молодых ученых Института цитологии РАН, Санкт-Петербург,

2012 г.; 12-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», 2008 г., г. Пущино.

Вклад автора

Все основные результаты, включенные в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в представленную работу и опубликованные в виде статей, написаны самим автором и обсуждались совместно с соавторами и научными руководителями.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение», а также выводов и списка цитируемой литературы, включающего 430 источников, из них 423 – на английском языке. Работа содержит 26 рисунков и 1 таблицу.

Финансовая поддержка работы

Работа частично поддержана грантом РФФ № 14-50-00068 и грантом РФФНШ-7852.2006.4.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сократительный аппарат кардиомиоцитов

Кардиомиоциты (КМЦ) представляют собой мышечные клетки сердца, которые обеспечивают его основную функцию – сокращение – и составляют около 90 % общей массы миокарда (Herron et al, 1986). В связи со своей специализацией КМЦ имеют высокоорганизованный сократительный аппарат.

1.1.1. Строение сократительного аппарата кардиомиоцитов

Сократительный аппарат КМЦ образован миофибриллами, которые представляют собой нитевидные структуры диаметром 1-2 мкм. Миофибриллы располагаются параллельно друг другу вдоль продольной оси КМЦ и заполняют 80% объема клеток. Поперечная исчерченность миофибрилл обусловлена особым распределением в них так называемых толстых и тонких нитей. Тонкие нити образованы фибриллярным актином, тропомиозином и комплексом тропонинов. Фибриллярный актин представляет собой двунитевую спираль, каждая нить которой образована субъединицами глобулярного актина. Молекула тропомиозина состоит из двух α -спиралей и располагается в канавках актиновой нити в виде двух тяжей. В отсутствие кальция тропомиозин служит препятствием для взаимодействия миозина с актиновой фибриллой. Тропоминовые комплексы расположены вдоль тонкой нити через регулярные интервалы, соответствующие длине молекулы тропомиозина, и состоят из трех белков: тропонина I, связанного с актином, тропонина T, связанного с тропомиозином, и тропонина C. Тропонин C принадлежит к классу регуляторных белков, называемых кальмодулинами. Этот белок активируется при взаимодействии с ионами Ca^{2+} . Когда кальций присоединяется к определенным сайтам тропонина C, тропомиозин сдвигается с активных сайтов на актине таким образом, что миозин может присоединиться к актиновому волокну.

Толстая нить представляет собой веретенообразную структуру диаметром около 15 нм и длиной около 1,6 мкм (Huxley, 1963). Основным белком толстых нитей является миозин. Молекула миозина представляет собой гомодимер, образованный двумя сплетенными друг с другом мономерами. Каждый мономер состоит из одной тяжелой и двух легких цепей. На одном конце тяжелая цепь свернута в виде глобулы, образующей своеобразную головку миозина (субфрагмент S1). С помощью более тонкой шейки (субфрагмента S2) головка миозина соединяется с длинным хвостом, который образован протяженной полипептидной цепью, уложенной в виде вытянутой α -спирали. Хвосты двух мономеров миозина сплетены между собой и образуют вытянутый стержень. Каждая толстая нить миофибрилл образована жгутами из множества (около 300) димеров миозина, сплетенных между собой. Толстые нити имеют биполярную организацию (Huxley, 1963). С обеих сторон толстой нити выступают многочисленные подвижные мостики, образованные головками миозина, которые непосредственно взаимодействует с тонкой актиновой нитью и выполняют моторную функцию. В ходе работы сократительного аппарата изменяется наклон головок миозина по отношению к хвосту, что приводит к перемещению миозина относительно актиновой нити. В головке миозина находится каталитический центр, с которым связывается молекула аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Здесь же происходит ее гидролиз с образованием аденозиндифосфорной кислоты (ADP) и неорганического фосфата (Pi). При гидролизе АТФ выделяется энергия, за счет которой работает миозин (Huxley, 1963). Толстые нити имеют биполярную организацию (Huxley, 1963), в то время как тонкие нити прикреплены одним концом к так называемому Z-диску и с разных сторон от него имеют противоположную полярность. В состав Z-дисков входят белки α -актинин, филамин, десмин, а также белки CapZ, кэпирующие фибриллярный актин. Для всех перечисленных белков показана способность взаимодействовать с

актином *in vitro*. α -Актинин образует поперечные мостики между актиновыми нитями, объединяя их в пучки. Филамин, подобно α -актину, взаимодействует с F-актином, образуя пучки актиновых нитей. Оба белка локализируются внутри Z-дисков. В отличие от них десмин расположен на периферии Z-дисков, а также выявляется в зонах примыкания Z-дисков к плазматической мембране. Десмин объединяет тонкие нити одной миофибриллы, а также связывает Z-диски соседних миофибрилл, поддерживая их общий регистр (Granger and Lazarides, 1979; Lazarides et al., 1982; Schafer et al., 1993; Burgoyne et al., 2015).

Толстые и тонкие нити организованы в саркомеры – структурно-функциональные единицы миофибрилл. Длина саркомера может варьировать, но, как правило, составляет около 2-3 мкм. В середине саркомера выделяют анизотропный диск, или А-диск, шириной около 1.5 мкм. В этой зоне располагаются толстые нити. Изотропные диски (I-диски) шириной около 0,5 мкм находятся по краям саркомера и примыкают к Z-дискам. Они содержат тонкие нити, которые также заходят в промежутки между концами миозиновых нитей в А-дисках. В результате в А-диске образуются две зоны перекрытия и H-зона, свободная от тонких нитей (Рис. 1). Каждый саркомер на поперечном срезе состоит из двух перекрывающихся гексагональных решеток толстых и тонких нитей (Рере, 1971). При сокращении тонкие нити перемещаются к центру саркомера. При этом уменьшается длина саркомера, а также длина I- и H-зон, в то время как длина А-диска остается неизменной (Huxley and Hanson, 1954; Huxley and Niedergerke, 1954; Рис. 1).

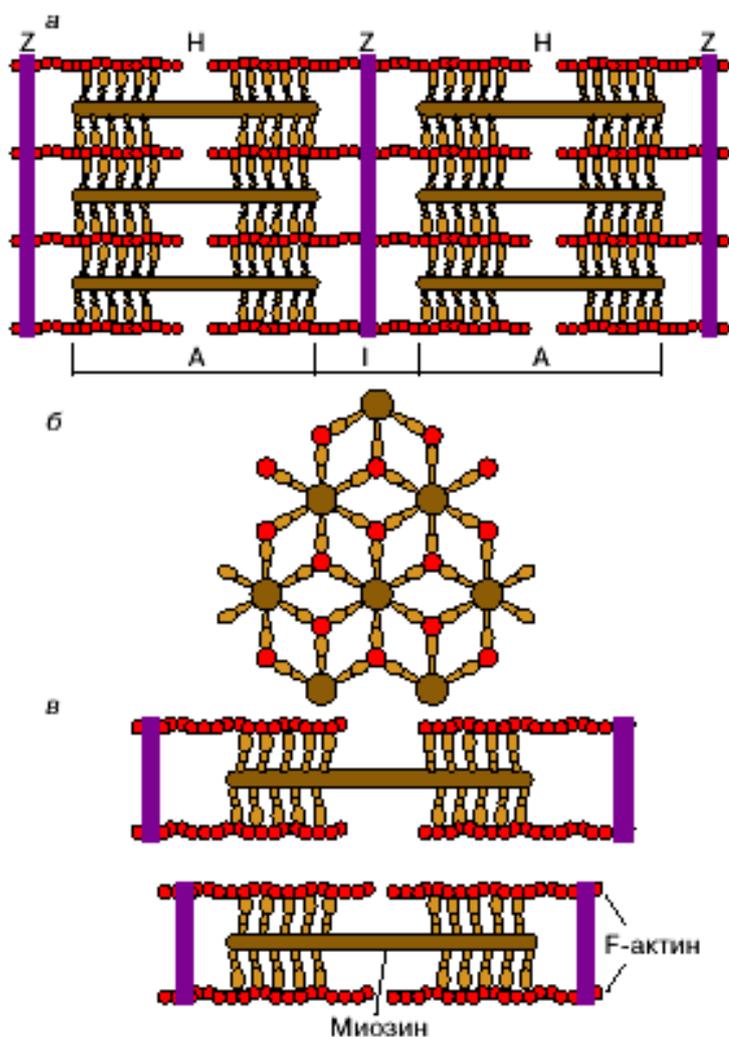


Рис. 1. Схематичное изображение строения саркомеров миофибрилл (цит. по Тихонов, 2006).

а - продольный разрез, б - поперечный разрез в области пересечения толстых и тонких нитей, в - изменение длины саркомера в результате движения толстых и тонких нитей.

1.1.2. Миофибриллогенез

Сердце является первым функциональным органом, который развивается в ходе эмбриогенеза позвоночных (Schoenwolf and Garcia-Martinez, 1995). Развитие сердца представляет собой многоступенчатый процесс, который начинается со спецификации клеток-предшественников КМЦ и их последующей дифференцировки. Миофибриллогенез был изучен на сердечных мышцах эмбрионов различных классов животных, а также на тканевых и клеточных культурах *in vitro* (Kelly, 1969; Fischman, 1970; Isobe

and Shimada, 1983; Lichnovský, 1983; Holtzer et al., 1986; Sanger et al., 1986; Imanaka-Yoshida, 1997; Du et al., 2008).

До начала сборки миофибрилл развивающиеся КМЦ прикрепляются к внеклеточному матриксу и соседним клеткам. Сборка миофибрилл начинается с ассоциации множества саркомерных белков в сложный комплекс. С помощью электронной микроскопии было показано, что образование Z-дисков начинается с появления плотного материала, представляющего собой малые ассоциированные с мембраной агрегаты, называемые Z-тельцами, которые связаны с линейно расположенными филаментами актина и миозина. С помощью иммунофлуоресцентного и электронномикроскопического анализа было показано наличие в Z-тельцах α -актинина и титина. В связи с этим Z-тельца считаются предшественниками Z-дисков. По мере дифференцировки КМЦ саркомеры постепенно увеличиваются в размере, выравниваются и соединяются друг с другом и с плазматической мембраной КМЦ – сарколеммой.

Даже на ранних стадиях образования миофибрилл на поперечных срезах наблюдается правильная гексагональная упаковка актиновых и миозиновых нитей в пучках, которые далее упорядочиваются в миофибрилле с образованием отчетливо видимых А- и I-полос. При этом Z-тельца преобразуются в четкие поперечные Z-диски, затем появляются М-полосы. Первые миофибриллы, называемые премиофибриллами, всегда выявляются непосредственно под сарколеммой и только потом начинают появляться в центральной части клеток (Kelly, 1969; Sanger et al., 2002, Wang et al., 2005). Премиофибриллы состоят из саркомерных белков, за исключением мышечного миозина II, который по мере созревания миофибрилл постепенно замещается мышечной изоформой (Rhee et al., 1994; Dabiri et al., 1997; Golson et al., 2004; Sanger et al., 2002). Саркомеры премиофибрилл могут иметь разную длину и расположение. По мере созревания миофибрилл длина саркомеров выравнивается, и соседние миофибриллы выстраиваются

друг относительно друга так, что их Z-диски формируют общий регистр. Таким образом, в клетках могут одновременно присутствовать незрелые и зрелые миофибриллы. К завершению миофибриллогенеза плотно упакованные миофибриллы заполняют примерно 80% объема клеток. Зрелые КМЦ называют терминально дифференцированными клетками, а их миофибрилярный аппарат в целом считается стабильной сократительной системой.

1.2. Сократительная система немышечных клеток

1.2.1. Цитоскелет

На основе актиновых филаментов формируются сократительные структуры как мышечных, так и немышечных клеток. Однако в отличие от стабильного миофибрилярного аппарата мышечных клеток немышечные клетки содержат высокодинамичную систему актиновых филаментов, которая называется актиновым цитоскелетом. Выделяют ряд характерных актиновых структур цитоскелета (Small et al., 1998), которые состоят из полимерного актина и актин-связывающих белков и включают сеть актиновых филаментов в ламеллоподии, пучки актиновых филаментов в филоподиях, актиновые стресс-фибриллы и арки (Рис. 2). Пространственная организация цитоскелета обеспечивается различным сочетанием этих структур и зависит от сложной комбинации факторов, взаимодействующих с поверхностными рецепторами клеток.

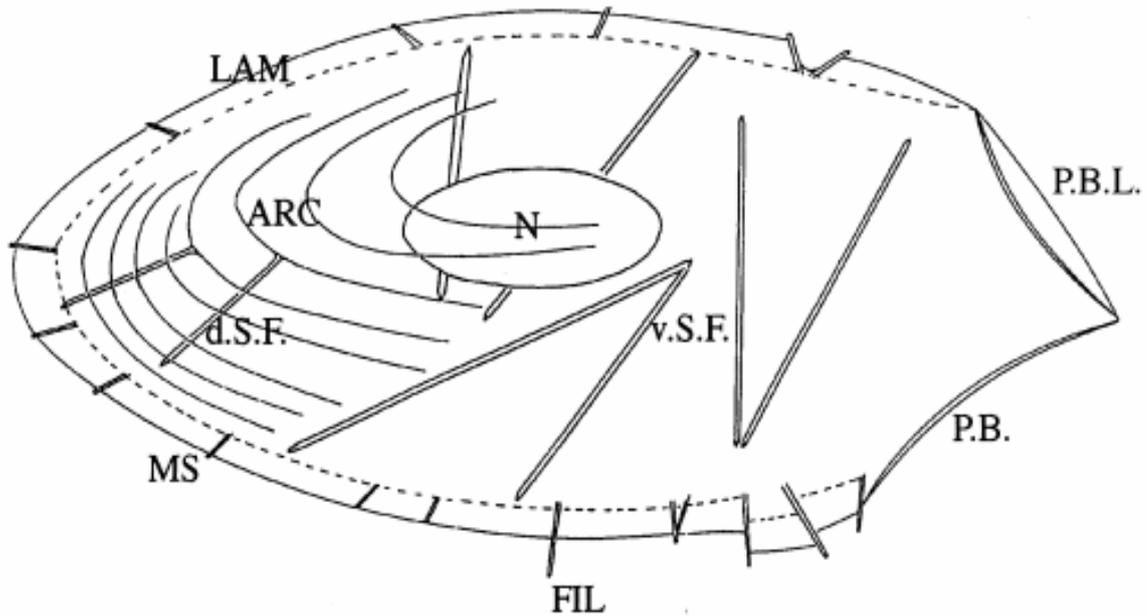


Рис. 2. Схематичное изображение основных актиновых структур цитоскелета (цит. по Small, 1998).

LAM – ламеллоподия; MS – микровыросты; FIL – филоподия; P.B. – периферические тяжи актиновых микрофиламентов; P.B.L. – периферические тяже актиновых микрофиламентов в ламеллоподии; v.S.F. – вентральные стресс-фибриллы; d.S.F. – дорзальные стресс-фибриллы; ARC - арки; N – ядро.

1.2.2. Стресс-фибриллы

Стресс-фибриллы представляют собой сократимые структуры цитоскелета, которые образуются только тогда, когда у клетки есть возможность прикрепиться к внеклеточным компонентам или к другим клеткам. В стресс-фибриллах помимо актина обнаруживается еще целый ряд актин-связывающих белков, таких как миозин II (Heggeness, 1977), тропомиозин (Lazarides, 1975), α -актинин (Lazarides and Burridge, 1975), филамин (Heggeness et al., 1977), киназа легкой цепи миозина (Tuker et al., 1978), кальдесмон (Bretscher, Lynch, 1985) и палладин (Ronty et al., 2004). Некоторые авторы считают, что общая организация указанных белков в стресс-фибриллах напоминает миофибриллы мышечных клеток (Gordon, 1978). Однако в стресс-фибриллах отсутствует саркомерная организация. Филамин распределен непрерывно вдоль актиновой фибриллы, тогда как миозин II и α -актинин имеют точечное периодичное распределение и

смежное расположение по отношению друг к другу. Киназа легкой цепи миозина, кальдесмон и тропомиозин солокализуются с миозином, а палладин солокализуется с α -актинином (Small, 1988; Ronty et al., 2004).

Способность стресс-фибрилл к сокращению была показана на живых клетках, а также в пермеабиллизированных детергентом клетках при добавлении АТФ (Chen, 1981, Isenberg et al., 1976; Kreis and Birchmeier, 1980). Однако в отличие от мышечных миофибрилл, для которых характерны повторяющиеся циклы сокращения и расслабления, стресс-фибриллы постоянно находятся в состоянии сокращения с нерегулярными актами расслабления или растяжения. Кроме того, стресс-фибриллы сокращаются неравномерно по всей длине, и расстояние между миозин- или актинин-содержащими участками стресс-фибрилл может варьировать (Peterson et al., 2004).

1.3. Актин

1.3.1. Структура актина

Как было описано выше, актин является ключевым белком сократительных систем мышечных и неммышечных клеток. Актины распространены повсеместно в эукариотических клетках и участвуют в различных клеточных функциях, включая мышечное сокращение, клеточную подвижность, адгезию, деление клеток и поддержание их формы. В цитоплазме актин играет как сократительную, так и структурную роль. Показано также, что динамика цитоплазматического актина может регулировать активность транскрипционных факторов и, таким образом, влиять на экспрессию генов (Haller et al., 2004; Németh et al., 2004; Favot et al., 2005). Кроме того, была описана роль актина в ядре в качестве промотора транскрипции или компонента некоторых ремоделирующих хроматин комплексов (Hofmann et al., 2004; Miyamoto and Gurdon, 2011).

Актин может существовать в двух формах – мономерной (G-актин) и полимерной (F-актин). Мономерный актин представляет собой глобулярный

белок с молекулярной массой около 42 кДа, образованный одной полипептидной цепью. Глубокая щель разделяет молекулу актина на две не совсем равные половины. Правая (чуть меньшая по размеру) половина состоит из двух компактно уложенных участков полипептидной цепи, так называемых субдоменов 1 и 2. Левая половина мономерного актина состоит из субдоменов 3 и 4. Каждый субдомен содержит в своем составе α -спиральные участки, β -складчатые структуры и неупорядоченные участки полипептидной цепи. В глубине щели, разделяющей молекулу актина на две части, располагаются сайты связывания АТФ или АДФ и сайты связывания ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} . Дивалентный катион связывается с β - и γ -фосфатами АТФ, стабилизируя ее взаимодействие с белком (Kabsch et al. 1990).

1.3.2. Полимеризация и деполимеризация актина

Главным свойством G-актина является его способность к полимеризации с образованием длинных тяжей фибриллярного актина (F-актин). F-актин представляет собой двунитевой спиральный полимер. Процесс полимеризации актина строго упорядочен, и момеры актина могут взаимодействовать, только будучи правильно ориентированными друг относительно друга. Следствием этого является так называемая полярность нити актина. Концы F-актина были названы «острым» и «тупым» в соответствии со структурой «наконечника стрел», образующейся при присоединении субфрагмента миозина S1 к F-актину в отсутствие АТФ (Craig et al., 1985). На «остром» конце нити, где с растворителем контактируют субдомены 2 и 4, присоединение новых мономеров актина затруднено. Поэтому процесс полимеризации на этом конце идет медленно. «Острый» конец нити также называют «медленным» концом филамента. На «тупом» конце нити, где с растворителем контактируют субдомены 1 и 3, присоединение новых мономеров актина более вероятно. На этом конце преимущественно происходит процесс полимеризации. «Тупой» конец нити также называют «быстрым» концом. Таким образом, нить актина

преимущественно растет со стороны «быстрого» конца и преимущественно укорачивается со стороны «медленного» конца. Полимеризация актина сопровождается гидролизом связанной АТФ с последующим медленным высвобождением P_i . Полимеризация актиновых филаментов *in vitro* происходит спонтанно в физиологических растворах солей при наличии одновалентных или дивалентных катионов в буфере. Связывание катионов со специфическими сайтами обеспечивает взаимодействие между субъединицами филамента (Kang et al., 2013).

Для удлинения микрофиламентов используется мономер актина, содержащий в своем составе молекулу АТФ. Таким образом, на быстро растущем конце нити актина располагаются в основном мономеры актина, содержащие молекулу АТФ. После встраивания в состав микрофиламента мономер актина приобретает способность гидролизовать АТФ. Поэтому часть мономеров актина, сравнительно долго пребывающих в составе полимера, содержит АDP и неорганический фосфат. Мономеры актина, находящиеся в составе полимера продолжительное время, оказываются способными не только гидролизовать АТФ до АDP и неорганического фосфата, но и выбрасывать неорганический фосфат из центральной щели. Таким образом, мономеры актина, расположенные в различных участках полимера актина, содержат либо АТФ, либо АDP и неорганический фосфат, либо, наконец, только АDP. Прочность контакта соседних мономеров актина зависит от того, какой нуклеотид находится в активном центре актина – мономеры актина, содержащие АТФ, прочнее взаимодействуют друг с другом по сравнению с мономерами актина, содержащими АDP. Таким образом, скорость процессов полимеризации и деполимеризации также зависит от того, какой нуклеотид находится в активном центре актина.

Функции актина в цитоплазме в основном связаны с его полимерной формой, тогда как его роль в ядре обеспечивается как мономерным, так и

полимерным актином (Hofmann and de Lanerolle, 2006; McDonald et al., 2006; Kapoor et al., 2013; Viita and Vartiainen, 2016).

1.3.3. Актин-связывающие белки

Динамика актиновых структур обеспечивается двумя факторами: способностью актина переходить из мономерного состояния в полимерное и его взаимодействием с актин-связывающими белками. Актин-связывающие белки могут способствовать нуклеации сборки актинового филамента, фрагментации актиновых нитей, объединению филаментов в пучки или их связыванию с мембраной клетки (Pantaloni et al., 2001; dos Remedios et al., 2003; Pollard, Borisy, 2003).

Актин-связывающие белки могут связываться с мономерами актина или с полимерной актиновой нитью. Одним из белков, взаимодействующих с мономерным актином, является профилин. Он связывается с «быстрым» концом мономера актина и обеспечивает аллостерическое ингибирование нуклеации сборки и элонгации актинового филамента на «медленном» конце (Courtemanche and Pollard, 2013). Кроме того, профилин может катализировать обмен нуклеотидов в активном центре мономера актина (Mockrin and Korn, 1980). Другим белком, который связывается с мономерами актина, является тимозин b4 (Safer et al., 1991). Он может секвестрировать большое количество актиновых мономеров, предотвращая их участие в реакциях полимеризации. Основные белки, которые взаимодействуют с полимерным актином и способны фрагментировать актиновые филаменты, представлены кофилином и белками семейства гельзолинов (Pollard, 1994). Другое семейство белков – формины – представлено мультидоменными гомодимерными белками, которые взаимодействуют с «быстрым» концом актинового филамента (Goode and Eck, 2007; Paul and Pollard, 2009) и участвуют в нуклеации, подавлении или стимуляции роста актинового филамента с «быстрого» конца (Paul and Pollard, 2009). Кроме того, по крайней мере два белка из семейства

форминов, FRL-а и INF-2 (Harris et al., 2004, Gurel et al., 2014), способны фрагментировать актиновый филамент. Подобно форминам, тетрамеры Epa/VASP связываются с «быстрым» концом растущего микрофиламента, обеспечивают его элонгацию и препятствуют кэпированию (Edwards et al. 2014). Кэпирующий белок представляет собой гетеродимер, который плотно связывается с «быстрым» концом актинового микрофиламента (Edwards et al., 2014). Некоторые белки семейства гельзолинов также могут кэпировать «быстрые» концы (Nag et al., 2013), обеспечивая рост филаментов с «медленного» конца (Nag et al., 2013). Тропомодулин представляет собой белок, который избирательно кэпирует «медленный» конец филаментов (Rao et al., 2014). Комплекс белков Arp2/3 из семейства родственных актину белков Arp обеспечивает ветвление активного филамента путем кэпирования «медленного» конца филамента и нуклеации ветвления на свободном «быстром» конце (Rouiller et al., 2008). Физическую связь между актиновыми филаментами обеспечивают поперечно-сшивающие белки, которые стабилизируют высокоупорядоченные актиновые структуры. К таким белкам относятся фимбрин, филамин, а также α -актинин, который является основным белком Z-дисков в саркомерах. Белок тропомиозин связывается с актиновыми филаментами (von der Ecken et al., 2015) и защищает их от разрезания кофилином. Кроме того, тропомиозин влияет на взаимодействие миозина с актиновым филаментом (Pollard and Lord, 2014), а в скелетных и сердечных мышечных клетках вместе с тропониновым комплексом обеспечивает регуляцию мышечного сокращения (Lehman et al., 2009).

Таким образом, динамика актина в клетке регулируется многочисленными актин-связывающими белками.

1.3.4. Изоформы актина

Семейство актинов у позвоночных состоит из шести близко родственных белков (McHugh et al., 1991; Vandekerckhove and Weber, 1978), которые кодируются отдельными генами и являются

высококонсервативными (Kabsch and Vandekerckhove, 1992). Все шесть функциональных генов актина располагаются на разных хромосомах. В зависимости от изоэлектрической точки актина делят на 3 класса – α -, β - и γ -актины (Garrels and Gibson, 1976; Whalen et al., 1976; Rubenstein and Spudich, 1977). β -Актины (β -СYA) и γ -актины (γ -СYA) характерны для немышечных клеток (Rubenstein and Spudich, 1977). Эти изоформы экспрессируются повсеместно и называются цитоплазматическими актинами. Напротив, α -актины считаются тканеспецифичными изоформами актина и характерны для мышечных клеток (Khaitlina, 2001). Миофибриллы скелетных и сердечных мышц содержат разные α -изоформы – скелетный α -актин (α -СКА) и сердечный α -актин (α -СAA). Другая α -изоформа актина представлена гладкомышечным α -актином (α -SMA), который характерен для гладких мышц сосудов и миоэпителиальных клеток, а также встречается в миофибробластах. Еще одной тканеспецифичной изоформой актина является γ -изоформа гладкомышечного актина (γ -SMA), которая в основном экспрессируется в гладких мышцах кишечника и других внутренних органов.

Максимальные различия аминокислотных последовательностей актинов, выделенных из разных клеток и тканей, не превышают 10 % (Sheterline et al., 1995), однако цитоплазматические немышечные актины имеют больше сходства друг с другом, чем с мышечными актинами. Четыре мышечных актина различаются между собой по 10 из 375 аминокислотных остатков. α -СAA отличается от α -СКА только по четырем остаткам в положениях 2, 3, 299 и 388. γ -SMA отличается от α -SMA по 4 остаткам в положениях 1, 4, 5 и 360. Цитоплазматические актины отличаются от мышечных актинов примерно по 25 аминокислотным остаткам, при этом между собой они различаются только по четырем остаткам в положениях 1, 2, 3 и 9, все из которых находятся в пределах 10 N-концевых аминокислотных остатков. Существует еще одна классификация актинов, основанная на специфичности N-концевого процессинга. Самый

вариабельный участок молекул актина представлен 10–20 N-концевыми аминокислотными остатками. Считается, что этот участок играет важную роль в регуляции полимеризации актина *in vivo* и *in vitro* (Chaponnier et al., 1995). N-конец молекулы актина ацетилован, и ацетилированный аминокислотный остаток (N-ацетил-Asp или N-ацетил-Glu) появляется в результате посттрансляционного многоступенчатого процесса (Rubenstein, 1990). Изоактины, названные молекулами класса I, кодируются как полипептиды, содержащие на N-конце Met-Asp/Glu. Этот N-конец удаляется, и новый N-концевой остаток (Asp или Glu) ацетируется, обеспечивая зрелую форму белка. Этот класс объединяет цитоплазматические β - и γ -актины и гладкомышечный γ -актин. Молекулы класса II кодируются как полипептиды, содержащие на N-конце Met-Cys-Asp/Glu. В этих актинах ацетилирование N-концевого Asp или Glu происходит после ступенчатого процесса, включающего удаление Met, ацетилирование Cys-Asp/Glu и удаление ацетил-Cys. Класс II включает скелетномышечный, сердечный и гладкомышечный α -актины.

Так как каждая изоформа актина кодируется отдельным геном, специфичность их синтеза регулируется на уровне экспрессии соответствующих генов. Соотношение между цитоскелетными и мышечными изоформами, по-видимому, может дополнительно регулироваться N-концевым процессингом, который является для них двухступенчатым или многоступенчатым соответственно (Хайтлина, 2007).

1.3.5. Распределение изоформ актина

Несмотря на тканеспецифичное распределение изоформ актина у взрослых организмов, в ходе развития позвоночных животных может наблюдаться сложный паттерн экспрессии разных изоформ в пределах одной ткани (McHugh et al., 1991). Предшественниками мышечных клеток являются немышечные клетки, в связи с этим в ходе миогенеза происходит замещение цитоплазматических изоформ актина на изоформы, характерные для данной

мышечной ткани. На ранних сроках эмбрионального развития как скелетной, так и сердечной мышечной ткани синтезируются β - и γ -актины (Weins and Spooner, 1983). Интенсивный синтез сократительных белков, специфичных для мышечных клеток, включается перед началом образования миофибрилл. Во время развития скелетных мышц первой мышечной изоформой является гладкомышечный α -актин (Sawtell and Lessard, 1989). Затем его экспрессия подавляется, и повышается экспрессия сердечного α -актина. К моменту рождения включается экспрессия скелетного α -актина, который является главной изоформой во взрослой скелетной мышце. В раннем кардиогенезе также наблюдается временная экспрессия гладкомышечного α -актина (Ruzicka and Schwartz 1988; Handel et al., 1991). В процессе развития гладкомышечный α -актин замещается на скелетную и сердечную изоформы α -актина (Vandekerckhove et al., 1986 Ruzicka and Schwartz, 1988; van Bilsen and Chien, 1993), экспрессия которых сохраняется и во взрослом миокарде, однако основным саркомерным белком взрослого сердца является сердечный α -актин (Vandekerckhove et al., 1986; Ruzicka and Schwartz 1988). Таким образом, в процессе дифференцировки сердечных и скелетных мышечных клеток образованию миофибрилл предшествует координированная смена изоформ актина. Кроме того, на промежуточных стадиях дифференцировки можно наблюдать сосуществование разных изоформ актина.

Одновременное присутствие разных изоформ актина также показано в зрелых клетках и тканях. С помощью антител, специфичных к разным изоформам актина, было показано разное распределение мышечных и неммышечных актинов в скелетных мышцах. Мышечный α -актин выявлялся в миофибриллах в центральной части клеток, тогда как цитоплазматические актины были обнаружены на периферии клеток в кортикальном слое филаментов (Lubit, Schwartz, 1980; Pardo et al., 1983; Otey et al., 1988). Показано, что кардиомиоциты взрослых мышей при культивировании в присутствии ростовых факторов или гормонов начинают синтезировать

значительное количество гладкомышечного α -актина (Erpenberger-Eberhardt et al., 1990). При этом наблюдается четкая граница между несаркомерными участками, содержащими гладкомышечный α -актин, и саркомерными структурами, ограниченными центральной частью клеток (Harder et al., 1998). В культивируемых гладкомышечных клетках сосудов и перицитах гладкомышечная изоформа α -актина локализуется в стресс-фибриллах и не смешивается с немышечными актинами, которые выявляются в кортикальном слое цитоплазмы (DeNofrio et al., 1989; Herman, 1993).

Кроме того, несколькими группами исследователей было показано, что β -актин преимущественно локализуется на ведущем крае культивируемых фибробластов и миобластов по сравнению со стресс-фибриллами, расположенными в центральной части клеток (Hoock et al., 1991; Hill and Gunning, 1993; Kislauskis et al., 1997; Shestakova et al., 2001). При этом для цитоплазматического γ -актина наблюдается равномерное распределение во всех актин-содержащих структурах фибробласта (Otey et al., 1986). В одной работе с использованием новых специфичных к изоформам антител было показано, что цитоплазматический β -актин, напротив, преимущественно выявляется в стресс-фибриллах, в то время как γ -актин локализуется на ведущем крае клеток. Однако сами авторы указывают, что полученные данные могут быть связаны с особым способом фиксации клеток (Dugina et al., 2009).

Описанные выше данные указывают на существование механизмов, регулирующих сегрегацию изоформ актина в клетках. Некоторые авторы считают, что одним из таких механизмов может являться сортировка мРНК разных изоформ актина до трансляции белка, при этом доставка мРНК к месту ее трансляции может опосредоваться РНК- и актин-связывающими моторными белками (Хайтлина, 2007, Kislauskis and Singer, 1992). В пользу этой гипотезы говорит то, что смена изоформ актина по времени коррелирует с накоплением соответствующей мРНК (Storti and Rich, 1976;

Paterson and Eldridge, 1984; Hayward et al., 1988; Хайтлина, 2007). Кроме того, изоформы актина и их соответствующая мРНК часто солокализуются в пределах компартментов клеток. Например, показано сходное распределение β -актина и его мРНК в ведущем крае фибробластов и перицитов капилляров (Lawrence and Singer, 1986; Sundell and Singer, 1991; Herman, 1993; Хайтлина, 2007), а также в конусе роста филоподий и дендритов развивающихся и зрелых нейронов (Bassell et al., 1998; Hannan et al., 1998; Eom et al., 2003; Tiruchinapalli et al., 2003; Хайтлина, 2007).

Предполагается, что посттрансляционные модификации могут обеспечивать еще один механизм, который вносит вклад в сегрегацию цитоплазматических β - и γ -актинов. Было показано, что из цитоплазматических актинов только β -изоформа подвергается N-концевому аргинилированию, когда ее N-конец не ацетилирован (Karakozova et al., 2006). С другой стороны, специфичное распределение изоформ актина также может регулироваться их различным взаимодействием с актин-связывающими белками (Peggin, 2010).

Тканеспецифичность изоформ актина и их неодинаковое распределение в пределах клеток указывает на то, что разные изоформы вносят вклад в формирование специфичных структур и имеют уникальные функции (Rubenstein 1990; Herman, 1993; Gunning et al., 1997; Khaitlina, 2001; Charonniier and Gabbiani, 2004).

Исследования на модельных организмах, включая *Drosophila* (Wagner et al., 2002) и *C. elegans* (MacQueen et al., 2005), предоставили большое количество данных, свидетельствующих о том, что изоформы актина имеют как перекрывающиеся, так и уникальные функции в клетках. Основные данные о функциональных различиях изоформ актина у млекопитающих были получены на мышинных моделях нокаута отдельных изоформ актина.

Мыши, у которых ген сердечного α -актина был разрушен гомологичной рекомбинацией, погибали до рождения или в течение первых

двух недель после рождения, при этом в сердце наблюдалась существенная дезорганизация миофибрилл. В сердцах таких мышей наблюдался повышенный уровень скелетного и гладкомышечного α -актина, однако эти изоформы не обеспечивали нормального формирования миофибрилл (Kumar et al., 1997). Удивительно, что при введении гена гладкомышечного γ -актина под контролем промотора гена тяжелой α -цепи сердечного миозина α -МНС такие животные доживали до взрослого состояния, однако их сердца были подвержены гипертрофическим изменениям и характеризовались пониженной сократимостью. Авторы объясняют такие данные тем, что гладкомышечный γ -актин и сердечный α -актин вносят разный вклад в функцию сердца (Kumar et al., 1997). Мартин с соавторами (Martin et al., 2002) показали, что замещение сердечного α -актина на гладкомышечный γ -актин в клетках миокарда приводит к изменению взаимодействия актина в миофибриллах с его партнерами тропонином и миозином. В другой работе было показано, что трансфекция неонатальных и взрослых КМЦ генами цитоплазматических β - и γ -актинов приводила к быстрому исчезновению сокращений и существенным изменениям морфологии клеток с их уплощением и появлением филоподий. (von Arx et al., 1995). На мышинных моделях нокаута скелетной изоформы α -актина был показан повышенный уровень мРНК сердечного α -актина и гладкомышечного α -актина в скелетных мышцах. Такие мыши доживали до рождения, но погибали в раннем неонатальном периоде – компенсаторного повышения экспрессии других мышечных изоформ актина оказалось недостаточным для поддержания нормального роста и функционирования скелетно-мышечной ткани (Crawford et al., 2002; Nowak et al., 2009). Трансгенная экспрессия сердечного α -актина обеспечивала выживание таких мышей и полностью компенсировала потери мышечной производительности, связанные с отсутствием скелетного α -актина (Nowak et al., 2009). Полученные результаты могут указывать на наличие у сердечного и скелетного α -актина

перекрывающихся функций. Это вполне вероятно, учитывая, что указанные изоформы идентичны на 99% и часто имеют перекрывающийся паттерн экспрессии (Vandekerckhove et al., 1986). Гиперэкспрессия цитоплазматического γ -актина, напротив, не предотвращала гибели животных, вызванной дефицитом скелетного α -актина, что указывает на более высокий уровень специализации между мышечными и неммышечными изоформами. В то же время трансгенная экспрессия цитоплазматического γ -актина у мышей дикого типа приводила к замещению на 40% скелетного α -актина в тонких нитях цитоплазматическим γ -актином (Jaeger et al., 2009). Такие данные указывают на то, что для поддержания функции мышечных клеток необходимы мышечные изоформы актина, однако существенное замещение цитоплазматическими актинами не приводит к нарушению функции мышечных сократительных структур.

В модели нокаута гладкомышечного α -актина у мышей была показана нарушенная сократимость сосудов и регуляция кровяного давления, однако явных изменений в формировании сердечно-сосудистой системы не наблюдалось (Schildmeyer et al., 2000). В сосудах таких мышей активировалась экспрессия скелетного α -актина, которой было недостаточно для компенсации на функциональном уровне недостатка гладкомышечной изоформы.

Мыши с дефицитом цитоплазматического β -актина погибали во время раннего эмбрионального развития (Shawlot et al., 1998; Shmerling et al., 2005). В то же время в модели нокаута цитоплазматического γ -актина многие мыши доживали до взрослого состояния (Belyantseva et al., 2009; Bunnell and Ervasti, 2010), однако были меньше по размеру, чем особи дикого типа. Нокаут разных изоформ актина приводил к различному фенотипу и функциональным характеристикам у животных, что указывает на уникальность каждой изоформы актина. Во всех описанных моделях наблюдалась компенсаторная экспрессия остальных изоформ. Однако общий

уровень актина во всех нокаутных моделях оставался пониженным по сравнению с диким типом. Некоторые авторы считают, что трансгенная гиперэкспрессия других изоформ актина может отчасти компенсировать нокаутный фенотип за счет повышения общего уровня актина и частично перекрывающихся функций разных изоформ (Perrin and Ervasti, 2010).

Несмотря на незначительные различия в первичной структуре изоформ актина, а также частично перекрывающиеся функции некоторых из них, множество данных указывает на то, что разные изоформы не могут замещать друг друга (Antin and Ordahl, 1991; von Arx et al., 1995; Kaech et al., 1997; Kumar et al. 1997; Mounier et al., 1997; Fyrberg et al., 1998; Khaitlina, 2001; Martin et al., 2002).

1.3.6. Механизмы, обеспечивающие разные функции изоформ актина

Существует несколько гипотез, объясняющих то, каким образом изоформы актина могут осуществлять разные клеточные функции. Некоторые авторы объясняют это явление специфичным взаимодействием актин-связывающих белков с определенными изоформами. В пользу этого предположения, в частности, говорит то, что некоторые белки, включая кофилин (De La Cruz, 2005), эзрин (Yao et al., 1996), I-пластин (Namba et al., 1992), bCAP73 (Shuster et al., 1996), тимозин b4 (Weber et al., 1992) и профилин (Larsson and Lindberg, 1988), по-разному связываются с мышечными и цитоплазматическими изоформами актина. Кроме того, аннексин 5a может предпочтительно связываться с γ -цитоплазматическим актином по сравнению с β -актином (Tzima et al., 2000; Wagner et al., 2002).

Согласно другому предположению, разные функции изоформ актина объясняются тем, что они имеют разную способность к полимеризации. Такое предположение основано на том, что в зависимости от динамических характеристик различные изоформы участвуют в формировании разных внутриклеточных структур. Например, α -актины формируют более

стабильные филаменты, которые принимают участие в сократительной активности, тогда как β - и γ -актины полимеризуются менее эффективно и легче диссоциируют и, соответственно, входят в состав динамичных структур цитоскелета (Khaitlina, 2001).

Поскольку аминокислотные замены, специфичные для конкретных изоформ находятся на удалении от сайтов взаимодействия между мономерами актина в полимере, различную скорость полимеризации изоформ актина объясняют аллостерической регуляцией сайтов взаимодействия их мономеров (Khaitlina, 2001).

Более простая гипотеза связывает разные функции актинов не с особенностями конкретных изоформ, а с их специфической внутриклеточной локализацией. Эта гипотеза согласуется с биохимическими данными, указывающими, что актиновый филамент может содержать смесь цитоплазматических изоформ актина (Bergeron et al., 2010), однако никак не объясняет различные свойства F-актина в зависимости от соотношения изоформ в филаменте (Bergeron et al., 2010). Интересно, что биохимические анализы показали, что цитоплазматический γ -актин и β -актин легко сополимеризуются, и динамика полученных филаментов изменяется в зависимости от соотношения этих изоформ (Bergeron et al., 2010). Помимо динамики полимеризации различные смеси изоформ актина отличаются по биофизическим свойствам или взаимодействию с актин-связывающими белками. Некоторые авторы предполагают, что варьирование соотношения разных изоформ актина может являться механизмом приспособления цитоскелета к осуществлению различных функций (Perrin and Ervasti, 2010).

1.3.7. Смена изоформ актина в ходе дифференцировки кардиомиоцитов из стволовых клеток

В процессе дифференцировки стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении (Clément et al., 2007; Potta et al., 2010) также происходит смена изоформ актина с временной экспрессией гладкомышечного α -актина

(Ruzicka and Schwartz 1988; Schultheiss et al., 1990; Handel et al., 1991). Например, при получении КМЦ из эмбриональных стволовых клеток мыши *in vitro* наблюдается такой же паттерн экспрессии изоформ актина, как в ходе эмбриогенеза сердца. Кроме того, было показано, что подавление экспрессии гладкомышечного α -актина с помощью РНК-интерференции приводит к нарушению дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мышей в КМЦ (Clément et al., 2007).

1.3.8. Смена изоформ актина при культивировании кардиомиоцитов

При помещении КМЦ в культуру наблюдается появление гладкомышечной изоформы α -актина (van Bilsen and Chien, 1993; Schaub et al., 1997). При этом различные агенты могут оказывать влияние на его экспрессию. Например, было показано, что IGF-I подавляет, а bFGF и T3 значительно стимулируют экспрессию гладкомышечного α -актина в КМЦ *in vitro*. (Harder et al., 1998). Поскольку гладкомышечная изоформа α -актина характерна для эмбриональных КМЦ, многие исследователи считают ее маркером дедифференцировки этих клеток (Ausma et al., 2001; Dispersyn et al., 2002).

1.3.9. Экспрессия гладкомышечного α -актина при патологии

Появление гладкомышечного α -актина часто связывают с реакцией клеток на стресс и патологические изменения. Гладкомышечный α -актин считается маркером многих заболеваний, включая гладкомышечные и скелетно-мышечные опухоли, такие как рабдомиосаркомы, а также сердечно-сосудистые заболевания (Charonnier and Gabbiani 2004; Clément et al. 2003). Известно также, что повреждения мышечных клеток часто сопровождаются возвращением к набору изоформ актина, характерных для ранних стадий миогенеза (Franke et al., 1996; Schaub et al., 1997; Harder et al., 1998; Charonnier and Gabbiani, 2004; Moll et al., 2006). Например, гладкомышечный α -актин в КМЦ считается общепринятым маркером гипертрофии миокарда (Winegrad et al., 1990; Clément et al., 1999; Suurmeijer et al., 2003). Кроме того,

гладкомышечный α -актин начинает экспрессироваться в фибробластах в ответ на стресс и патологические состояния (Wang et al., 2006).

1.4. Регенерация сердца

В ходе эмбрионального развития сердца млекопитающих КМЦ активно пролиферируют, при этом клеточное деление сопровождается значительными структурными изменениями, которые включают разборку миофибрилл (Ahuja et al., 2004). Во время деления КМЦ перестают сокращаться, сохраняя при этом межклеточные контакты. По окончании деления миофибриллы заново собираются, и клетки снова начинают сокращаться (Ahuja et al., 2004). Считается, что разборка миофибрилл является обязательным условием для осуществления полного цикла клеточного деления, поскольку миофибриллы занимают значительный объем зрелого КМЦ и могут физически препятствовать прохождению митоза и цитокинезу, в частности, расхождению хромосом и реорганизации различных клеточных компонентов (Ahuja et al., 2004). В связи с этим ограниченную способность к регенерации КМЦ млекопитающих после рождения часто объясняют их дифференцировкой и созреванием саркомерных структур. Показано, что ограничение пролиферативной способности КМЦ в сердце мышцы соответствует началу гипертрофии КМЦ и появлению двуядерных клеток (Soonpra et al., 1996). КМЦ однодневных мышей в основном являются одноядерными (99%), однако уже через 8–9 дней после рождения более 98% КМЦ становятся двуядерными и утрачивают способность к пролиферации (Walsh et al., 2010). Возникновение двуядерных клеток объясняют успешным кариокинезом с последующим неуспешным цитокинезом из-за недостаточной степени разборки миофибрилл в постнатальных КМЦ (Li et al. 1997a; Li F, 1997b). Таким образом, через некоторое время после рождения КМЦ претерпевают терминальную дифференцировку, которая сопровождается их выходом из клеточного цикла. Дальнейший рост клеток связан в основном с гипертрофией (Erokhina,

Rumyantsev, 1986; Naqvi, 2014). Однако все же имеются данные о том, что незначительное количество взрослых КМЦ может вступать в митоз. Было показано, что в нормальном сердце деление КМЦ происходит крайне редко (примерно 1% в год) (Senyo et al., 2013) и не может вносить существенный вклад в регенерацию сердца (Bergmann et al., 2009; Mollova et al., 2013). В свою очередь, некоторые исследователи предполагают, что в сердце может происходить самообновление за счет эндогенных предшественников КМЦ, которые называют стволовыми клетками сердца (Olivetti et al., 1997). Эти клетки идентифицируют по наличию различных маркеров клеточной поверхности, таких как *c-kit*, MDR, NKX2.5, CD195 и SCA-1 (Oh et al., 2003; Valente et al. 2014; Keith, Bolli 2015). Было описано, что стволовые клетки сердца могут дифференцироваться во все типы клеток сердечной ткани, самообновляться и являются клоногенными и мультипотентными, а также экспрессируют антигены и маркеры стволовых клеток и прогениторных клеток эндотелия (Stastna, 2010). Существуют данные, описывающие возможность дифференцировки выделенных стволовых клеток сердца и восстановления функции сердца при их трансплантации в зону повреждения (Beltrami et al., 2003; Karantalis et al., 2012). Однако намного меньшее количество данных может подтвердить их существование *in vivo*. На сегодняшний день функциональная роль эндогенных стволовых клеток в сердце не доказана. Исследование эндогенных *c-kit*-положительных стволовых клеток сердца путем их непосредственного мечения *in vivo* показало, что они составляют незначительный процент во взрослом миокарде даже после его повреждения (van Berlo, 2014). Таким образом, несмотря на то, что, вероятно, в сердце существует некоторое количество клеток, которые при выделении и культивировании *ex vivo* имеют ограниченную способность дифференцироваться в клетки сердечно-сосудистой системы, достоверные доказательства их роли в нормальном гомеостазе или при восстановлении сердца после повреждения отсутствуют.

Неспособность миокарда к самообновлению ставит целый ряд проблем, которые в первую очередь связаны с вопросами регенерации. Кроме того, неспособность КМЦ к делению ограничивает возможность получения стабильной линии этих клеток для ее использования в качестве модели для проведения фундаментальных и прикладных исследований. В связи с этим огромное количество исследований направлено на дифференцировку различных клеток в КМЦ для возможности получения неиссякаемого источника функционально активных клеток миокарда.

1.5. Методы дифференцировки кардиомиоцитов

Дифференцированные КМЦ получают *in vivo* и *in vitro* из различных стволовых клеток, включая эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), мезенхимные стволовые клетки, эндотелиальные прогениторные клетки и стволовые клетки сердца. Наиболее часто используют эмбриональные стволовые клетки и иПСК. Эмбриональные стволовые клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты на ранних стадиях эмбриогенеза. Эти клетки сохраняют способность дифференцироваться в любом направлении. Давно известно, что КМЦ могут быть получены в результате спонтанной дифференцировки при помещении мышинных эмбриональных стволовых клеток в суспензионную культуру (Doetschman et al., 1985). Подобные методы ненаправленной дифференцировки КМЦ из эмбриональных стволовых клеток имитируют стадии нормального эмбрионального развития сердца и используются для получения, в частности, человеческих КМЦ (Kehat et al., 2001). Однако такой подход является малоэффективным и приводит к получению не более чем 1% КМЦ от общей клеточной популяции (Kehat et al., 2001). Более эффективные методы получения КМЦ из стволовых клеток основаны на направленной дифференцировке. Такие методы, как правило, учитывают стадии нормального эмбрионального развития сердца и факторы, влияющие на их течение. В частности, в эмбриогенезе

последовательные этапы дифференцировки КМЦ и других клеток сердца зависят от сигнальных путей Nodal, костного морфогенетического белка (BMP), пути Wnt/ β -катенин, фактора роста фибробластов (Prowse et al., 2014) и ретиноевой кислоты (Evans et al., 2010). Различные способы направленной дифференцировки стволовых клеток в КМЦ включают воздействие на сигнальные пути Nodal/активин и BMP4 (Laflamme et al., 2007) и Wnt/ β -катенин (Naito et al., 2006; Yang et al., 2007; Paige et al., 2010). Янгом и соавторами (Yang et al., 2008) был разработан более эффективный протокол дифференцировки эмбриональных стволовых клеток человека, включающий последовательную стимуляцию сигнальных путей Nodal/активин, BMP4 и Wnt по мере прохождения клетками определенных стадий дифференцировки. Такой метод приводил к получению примерно 40% КМЦ от общей клеточной популяции (Yang et al., 2008). Также описано применение альтернативных низкомолекулярных соединений для имитации описанных выше сигнальных путей (Lian et al., 2013; Lam et al., 2014). Несмотря на определенные успехи в получении КМЦ из эмбриональных стволовых клеток, эффективность таких методов все же остается очень низкой (примерно от 1% до 40% от общей популяции клеток (Kehat et al., 2001; Yang et al., 2008) и варьирует от линии к линии. Кроме того, в случае применения дифференцированных клеток в регенеративных целях *in vivo* ограничением для использования КМЦ, полученных из эмбриональных стволовых клеток, является их аллогенное происхождение и выраженная геномная нестабильность (Полянская, 2014), а также этические проблемы (McLaren, 2001).

Появление методов дифференцировки КМЦ из иПСК позволило обойти некоторые из указанных выше проблем. иПСК получают путем индукции плюрипотентного состояния у зрелых соматических клеток млекопитающих с помощью набора транскрипционных факторов. иПСК впервые были описаны в 2006 г., когда группе Яманаки (Takahashi and Yamanaka, 2006) удалось превратить взрослые мышинные фибробласты в

иПСК путем ретровирусного введения в клетки набора транскрипционных факторов Oct4, Sox2, c-Мус и Klf4 (известных как факторы Яманаки). иПСК по своей морфологии и экспрессии генов сходны с эмбриональными стволовыми клетками (Takahashi and Yamanaka, 2006), включая экспрессию маркеров плюрипотентности и способность дифференцироваться в зародышевые листки (Nakagawa et al., 2008; Guenther et al., 2010). Различными исследователями было показано, что иПСК можно дифференцировать в КМЦ, при этом свойства полученных клеток сравнимы с характеристиками КМЦ, полученных из эмбриональных стволовых клеток (Schenke-Layland et al., 2008). Для повышения эффективности направленной дифференцировки иПСК в КМЦ используют различные цитокины, ростовые факторы и низкомолекулярные соединения, влияющие на сигнальные пути, важные в ходе развития сердца (Willems et al., 2009).

Огромное значение имели работы, показавшие возможность превращения фибробластов млекопитающих в функционально активные зрелые клетки различных типов путем «трансдифференцировки» (Ieda et al., 2010; Vierbuchen et al., 2010; Pournasr et al., 2011). Такие данные открыли новые возможности в изучении механизмов, лежащих в основе специализации клеток в ходе развития. Метод «трансдифференцировки» фибробластов в КМЦ включает несколько подходов, первый из которых связан с индукцией повышенной экспрессии транскрипционных факторов, характерных для КМЦ. В 2010 Йеда и соавторы (Ieda et al., 2010) показали, что введение транскрипционных факторов Gata4, Mefc2 и Tbx5 в сердечные и дермальные фибробласты мышей приводило к превращению 20% клеток в индуцированные КМЦ-подобные клетки (иКМЦ), при этом уже через 3 дня культивирования наблюдалась экспрессия специфичных для КМЦ белков (Ieda et al., 2010). Сходные результаты были получены другими авторами при использовании подобных наборов перепрограммирующих факторов (Protze et al., 2012; Xu, 2012). В полученных с помощью таких методов клетках

наблюдалась активация генов тяжелой α -цепи сердечного миозина (α МНС) и сердечного тропонина Т (сTnT1), а также повышенная экспрессия генов других кардиоспецифичных белков, таких как сердечный α -актин и α -актинин-2. Процент клеток с активированным промотором α МНС составлял 20% от общей популяции фибробластов, а процент клеток, экспрессирующих сTnT, составлял всего 6 % (Ieda et al., 2010). У большинства клеток с активным α МНС выявлялись саркомерные структуры, содержащие α -актинин. При этом большинство иКМЦ авторы описывают как «частично перепрограммированные» клетки. Эти клетки были сходны с неонатальными КМЦ по общему профилю экспрессии генов и электрофизиологическим показателям. Таким образом, эффективность дифференцировки оставалась достаточно низкой. Кроме того, возникали проблемы, связанные с воспроизводимостью таких методов получения КМЦ (Chen et al., 2012).

Другой подход к получению дифференцированных КМЦ связан с доставкой в клетки микроРНК (miRNA), которые играют важную роль в ходе развития сердца (Xu, 2012). Опосредованное miRNA превращение мышечных фибробластов в КМЦ было впервые описано Джайаварденой и соавторами (Jayawardena et al., 2012). Они использовали комбинацию из 4 miRNA (miR-1, -133, -208 и 499), которые, как известно, экспрессируются в КМЦ и вовлечены в развитие и нормальное функционирование сердца (Liu et al., 2008; Callis et al., 2009; Fu et al., 2011). В перепрограммированных клетках выявляли маркеры КМЦ, а также наблюдали саркомерную организацию сократительного аппарата и механические сокращения. Использование дополнительного этапа обработки клеток ингибитором Janus-киназы (JAK) приводило к повышению эффективности превращения мышечных фибробластов в КМЦ-подобные клетки *in vitro* (Jayawardena et al., 2012). Однако несмотря на то что клетки, дифференцированные с помощью miRNA, окрашивались на маркеры КМЦ, включая МНС, сердечный тропонин I

(TNNI3) и α -актинин, спонтанные сокращения наблюдались только у 1 - 2% клеток от общей популяции (Jayawardena et al., 2012).

Еще один подход называется методом «эпигенетической нестабильности» и объединяет в себе несколько описанных ранее способов дифференцировки. Он основан на временной индукции в фибробластах промежуточного состояния плюрипотентности с последующей направленной дифференцировкой в КМЦ (Efe et al., 2011). Такой метод включает гиперэкспрессию в эмбриональных фибробластах мышей транскрипционных факторов, используемых для получения иПСК (Oct4, Sox2 и Klf4), с последующей обработкой клеток низкомолекулярными ингибиторами Janus-киназы и их культивированием в кардиогенной среде с добавлением BMP4 (Efe et al., 2011; Xu, 2012). Дифференцированные клетки окрашивались на маркеры КМЦ, такие как сTnT (примерно 40% клеток), тяжелая цепь миозина и α -актинин. Интересно, что в этих клетках выявлялась только предсердная изоформа легкой цепи миозина (MLC-2 α), что указывает на специализацию подтипа полученных КМЦ. В некоторых колониях наблюдались сокращения (Efe et al., 2011; Xu, 2012).

Несмотря на наличие большого количества данных о получении дифференцированных КМЦ, методы дифференцировки имеют целый ряд ограничений, связанных с недостаточной степенью зрелости клеток и их гетерогенностью, а также низким процентом функционально активных КМЦ в популяции клеток.

Все доступные на сегодняшний день протоколы дифференцировки человеческих КМЦ из стволовых клеток приводят к получению смеси различных подтипов КМЦ, например, желудочковых, предсердных КМЦ и КМЦ проводящей системы сердца (Moore et al., 2008; Zhu et al., 2010; Zhang et al., 2012). Такая гетерогенность популяции затрудняет ее использование для исследований *in vitro*, а при введении *in vivo* приводит к проаритмогенному эффекту (Hartman and Laflamme, 2016).

В случае иПСК или иКМЦ проблема неоднородности популяции усугубляется геномной нестабильностью помещенных в культуру клеток (Полянская, 2014) и эпигенетическими модификациями, которые могут ограничивать способность клеток дифференцироваться в КМЦ (Polo et al. 2010). Например, мышинные иПСК на ранних пассажах сохраняют некоторые эпигенетические модификации клеток, из которых они были получены. Такие иПСК различаются по своей общей способности к дифференцировке (Polo et al., 2010). В результате получается культура, содержащая как КМЦ, так и недифференцированные клетки, что ограничивает ее использование *in vitro* и при введении *in vivo* может приводить к туморогенному эффекту.

Таким образом, получение гомогенной культуры дифференцированных КМЦ или, по крайней мере, хорошо охарактеризованной смешанной культуры клеток разных подтипов до сих пор остается проблемой.

Другим не менее важным ограничением является то, что большинство КМЦ, полученных из стволовых клеток, а также путем «трансдифференцировки», имеет так называемый «незрелый фенотип», т.е. отличается по своим характеристикам от КМЦ взрослого сердца. На ранних сроках культивирования КМЦ, дифференцированные из стволовых клеток, имеют намного меньшие размеры и обладают признаками эмбриональных КМЦ, такими как аморфная форма и короткие плохо организованные саркомеры (Mummery et al., 2003; Otsuji et al., 2010; Lundy et al., 2013). Кроме того, паттерн экспрессии генов у этих клеток соответствует стадиям эмбрионального развития сердца (Kehat et al., 2001; Bedada et al., 2014). В ходе длительного культивирования дифференцированные КМЦ увеличиваются в размере и приобретают более типичную морфологию (Foldes et al., 2011; Lundy et al., 2013) и более зрелый сократительный аппарат (Kamakura et al., 2013; Lundy et al., 2013). Однако даже на поздних сроках культивирования (около 180 дней в культуре) эти клетки не соответствуют взрослым КМЦ по электрофизиологическим показателям и экспрессии генов

(Moretti et al., 2010). Имеются данные, указывающие на пониженную массу митохондрий у дифференцированных КМЦ (Yang et al., 2014) и отсутствие Т-трубочек (Lieu et al., 2009). Для улучшения статуса созревания КМЦ некоторые исследователи используют трехмерные системы культивирования. Например, в КМЦ, полученных из человеческих эмбриональных стволовых клеток и помещенных в трехмерные условия, наблюдаются более длинные саркомеры и более высокий уровень экспрессии генов сердечного тропонина Т, тяжелой цепи α -миозина и кальсеквестрина по сравнению с клетками, помещенными в двумерные условия (Zhang et al., 2013). Клетки, полученные путем «трансдифференцировки», также не соответствуют взрослым КМЦ по морфологии, общему профилю экспрессии генов и электрофизиологическим показателям и, как правило, называются авторами «КМЦ-подобными клетками» (Chen et al., 2012; Shi et al., 2016).

Еще одна трудность связана с неоднозначностью интерпретации результатов дифференцировки клеток в КМЦ. В то время как существуют понятия «зрелого» и «незрелого» фенотипа КМЦ, общепринятые маркеры для идентификации дифференцированных КМЦ, а также определения статуса их созревания отсутствуют (Hansson and Chien, 2012; Qian et al., 2012; Shiba et al., 2012). Несмотря на наличие огромного количества кардиоспецифичных белков, которые имеют характерный паттерн экспрессии в ходе развития сердца и которые активно используются исследователями для идентификации дифференцированных КМЦ, многие из них имеют тенденцию изменяться при стрессе или патологических состояниях (Parker et al., 1990). Например, ген тяжелой цепи α -миозина является высокоспецифичным для КМЦ, однако при сердечных заболеваниях происходит изменение содержания изоформ миозина (Sasse et al., 1993). При сердечной недостаточности активируются гены, характерные для стадий эмбрионального развития, такие как гены предсердного натрийуретического фактора ANF, β МНС и скелетного актина (Parker et al., 1990; Razeghi et al.,

2001), при этом экспрессия некоторых генов, таких как ген α МНС и SERCA2a, напротив, снижается (Razeghi et al., 2001). В связи с этим результаты, полученные на основании таких нестабильных маркеров, следует интерпретировать с осторожностью (Bedada et al., 2016). Еще одним широко используемым маркером кардиомиоцитарной дифференцировки является сердечный тропонин Т (сTnT) (Chan et al., 2013). Однако было показано, что сTnT также экспрессируется и в других клетках, таких как гладкомышечные клетки (Porrello et al., 2011; Lu et al., 2013; Lundy et al., 2013), что ограничивает возможность его использования в качестве маркера КМЦ. На сегодняшний день единственным надежным критерием дифференцировки КМЦ можно считать соотношение изоформ сердечного тропонина I. В сердцах всех млекопитающих встречаются две изоформы тропонина I (TnI), которые кодируются двумя отдельными генами и последовательно экспрессируются в ходе развития сердца млекопитающих *in vivo* (Bhavsar et al., 1991; Sasse et al., 1993; Siedner et al., 2003; Metzger and Westfall, 2004). Ген медленного скелетного тропонина I (ssTnI) TNNI1 экспрессируется в саркомерах эмбриональных КМЦ. На поздних стадиях эмбрионального развития или на ранних стадиях постнатального развития его экспрессия подавляется, и происходит активация гена взрослого сердечного тропонина I (сTnI) TNNI3. Таким образом, во взрослом миокарде выявляется только белок сTnI с полным отсутствием ssTnI (Bhavsar et al., 1991; Sasse et al., 1993). Важно, что стресс и патологические состояния не оказывают влияния на динамику экспрессии изоформ ssTnI и сTnI (Sasse et al., 1993; Averyhart-Fullard et al., 1994) в отличие от обратимых маркеров кардиомиоцитарной дифференцировки, которые чаще всего используются исследователями в настоящее время (Razeghi et al., 2001). Результаты анализа соотношения изоформ ssTnI и сTnI показали, что экспрессия изоформ тропонина I в культуре неонатальных КМЦ грызунов, а также КМЦ мышечей, полученных из ЭСК, сравнима с паттерном их экспрессии *in vivo*. Однако в случае

дифференцировки из человеческих iPSC созревание КМЦ существенно запаздывает по сравнению с созреванием клеток в ходе нормального развития сердца (Bedada et al., 2014), при этом сTnI составляет только 2% от общего тропонина I даже через 9,5 месяцев культивирования (Bedada et al., 2014). Интересно, что в отличие от результатов Вестерн-блоттинга данные иммунофлуоресцентного анализа показывают значительное количество сTnI в саркомерах дифференцированных клеток (Shi et al., 2016). Такие результаты указывают на неприемлемость использования данных иммунофлуоресцентного окрашивания клеток для количественной оценки этого маркера созревания КМЦ (Bedada et al., 2014).

Таким образом, несмотря на то, что многие авторы описывают получение большого количества КМЦ в результате дифференцировки, способы оценки дифференцированных клеток, как правило, являются неоднозначными, и реальный процент функционально активных КМЦ оказывается намного меньше. Например, авторы, описывающие получение культур, содержащих 82% - 95% КМЦ, идентифицировали дифференцированные клетки по экспрессии транскрипционных факторов, а также по их окраске на сердечный тропонин Т, при этом из описания результатов исследования следует, что сокращения наблюдались лишь в некоторых участках культуры (Lian et al., 2013). В другой работе, несмотря на выявление в клетках различных кардиоспецифичных маркеров, сокращающиеся КМЦ полностью отсутствовали (Shi et al., 2016). Авторы еще одного исследования наблюдали спонтанные сокращения всего у 1% - 2% клеток от общей популяции при выявлении таких маркеров, как МНС, сердечный тропонин I (TNNI3) и α -актинин у значительно большего процента клеток (Jayawardena et al., 2012).

Несмотря на низкую эффективность известных на сегодняшний день методов получения дифференцированных КМЦ, они широко применяются в условиях *in vivo*. По данным разных авторов, трансплантация стволовых

клеток в поврежденную зону сердца часто приводит к положительному результату. Однако в связи с неоднозначностью оценки дифференцировки трансплантированных клеток и их участия в процессе регенерации поврежденной области мнения ученых о роли этих клеток различаются. В то время как некоторые исследователи считают, что благоприятный эффект, наблюдаемый при введении стволовых клеток в сердце, обусловлен их дифференцировкой в КМЦ, большинство все же объясняет его высвобождением растворимых факторов, которые опосредуют восстановление сердца и образование сосудов (Tang et al., 2010).

В то же время методы «трансдифференцировки» немышечных клеток сердца в КМЦ *in vivo* путем ретровирусной доставки GMT показывают хорошие результаты. В частности, индуцированные таким образом КМЦ являются более зрелыми по сравнению с клетками, полученными *in vitro*, и их введение в поврежденный миокард приводит к значительному уменьшению рубца после инфаркта и улучшению функции сердца (Qian et al., 2012). Следовательно, методы дифференцировки, в частности, «трансдифференцировки», даже при низкой эффективности получения КМЦ могут приводить к положительным результатам *in vivo* и в связи с этим имеют меньше ограничений по сравнению с методами получения КМЦ *in vitro*.

Таким образом, дифференцировка в кардиомиоцитарном направлении считается довольно перспективным методом с точки зрения регенеративной медицины и применения *in vivo*. Однако использование дифференцированных КМЦ *in vitro* для фундаментальных, а также прикладных исследований (например, для тестирования возможных лекарственных средств) пока еще ограничено в связи с отсутствием стандартного метода получения гомогенной культуры зрелых функционально активных КМЦ.

На сегодняшний день единственной приемлемой моделью для изучения КМЦ *in vitro* остается первичная культура этих клеток.

1.6. Первичная культура КМЦ

О возможности перевода КМЦ в культуру и поддержания их в условиях *in vitro* в течение длительного времени известно довольно давно. Однако при культивировании КМЦ происходят существенные изменения в их организации. При этом наблюдается перестройка их сократительного аппарата с обратимым преобразованием типичных миофибриллярных структур в неисчерченные структуры, что сопровождается утратой способности к сокращению (Борисов и др., 1989; Messerli et al., 1993; Nag et al., 1996; LoRusso et al., 1997). Неисчерченные (несаркомерные) структуры называют стресс-фибриллоподобными структурами, поскольку они напоминают стресс-фибриллы немышечных клеток. Кроме актина в них были обнаружены такие белки, как винкулин, миозин и α -актинин (Lu et al., 1992). Кроме того, КМЦ в процессе культивирования значительно увеличиваются в размере, что также наблюдается при гипертрофии сердца (Messerli et al., 1993, Simpson et al., 1982). Некоторыми исследователями было показано, что желудочковые КМЦ как взрослых, так и новорожденных крыс в культуре могут заново экспрессировать белки, которые в норме встречаются только в эмбриональных КМЦ, такие как гладкомышечный α -актин, скелетно-мышечный α -актин, а также тяжелая β -цепь миозина и предсердный натрийуретический фактор (van Bilsen and Chien 1993; Schaub et al. 1997).

В связи с этими изменениями, наблюдаемые при культивировании КМЦ, часто рассматривают как процесс дедифференцировки или возвращения клеток к эмбриональному фенотипу.

Несмотря на то что феномен перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре давно известен, его причины и механизмы до сих пор не изучались. Вместо этого большинство исследователей подбирает условия

экспериментов, позволяющие обходить этот процесс. В частности, многие авторы используют в своих экспериментах клетки на ранних сроках культивирования до начала перестройки их сократительного аппарата. Другие исследователи уходят от использования чистой культуры КМЦ и проводят эксперименты на смешанной культуре клеток сердца, поскольку на сегодняшний день отсутствуют данные, указывающие на перестройки сократительного аппарата КМЦ в смешанной культуре.

Смешанная культура клеток сердца содержит сердечные фибробласты, которые активно пролиферируют и в связи с этим являются доминирующими клетками в смешанной культуре. Фибробласты являются важным компонентом сердечной ткани и составляют примерно две трети клеточной популяции взрослого сердца (Nag and Zak, 1979; Vliegen et al., 1991). Они являются основными клетками, отвечающими за продукцию компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в сердечной ткани (Gupta and Grande-Allen, 2006; Castaldo et al., 2013) и играют ключевую роль в ремоделировании ВКМ путем регуляции его синтеза и деградации (Camelliti et al. 2005). В условиях *in vitro* сердечные фибробласты также активно синтезируют и ремоделируют ВКМ.

1.7. Внеклеточный матрикс

1.7.1. Внеклеточный матрикс сердца

Фактически все клетки организма окружены ВКМ, который образует упорядоченную пространственную сеть, на поверхности и внутри которой клетки могут перемещаться и взаимодействовать друг с другом. Показано, что ВКМ сердца необходим для миграции, пролиферации и дифференцировки клеток (Scott-Burden, 1994) и обеспечивает механическую жесткость и поддержание структуры и эластичности сердечной ткани. ВКМ также участвует в передаче механических усилий к мышечным волокнам (Kwak, 2013) и важен для структурной целостности сердца и его насосной функции (Curtis and Russell, 2011). Кроме того, ВКМ обеспечивает

микроокружение для сигнальных каскадов, необходимых для сердечного гомеостаза (Pelouch et al., 1993). Изменения ВКМ играют важную роль в ходе развитии сердца (Nakagawa et al., 1992).

Результаты исследований последних лет показали, что ВКМ миокарда имеет весьма сложную организацию, собственную систему регуляции и воспроизведения, а также способен быстро реагировать на изменения нагрузки на сердце. ВКМ миокарда состоит из коллагенов, гликопротеинов (фибронектина, эластина, ламининов и т.д.), протеогликанов и внеклеточных протеаз (Corda et al. 2000; Goldsmith and Borg, 2002). Наиболее многочисленным структурным компонентом ВКМ в сердце являются коллагены (Bowers and Vaudino, 2012), которые продуцируются главным образом фибробластами (Kjaer, 2004). Коллагены состоят из трех α -цепей, называемых молекулой тропоколлагена. Общая структура коллагенов представлена повторяющейся аминокислотной последовательностью (Gly-X-Y). Большинство коллагенов присутствуют в виде полипептидных цепей, называемых молекулой коллагена или α -цепью, состоящей из глицина, пролина и гидроксипролина с гидроксизином (Jugdutt, 2003). На сегодняшний день описано более 20 типов коллагена в различных тканях позвоночных. Все коллагены можно разделить на 2 основных класса – фибриллярные и нефибриллярные коллагены (Jugdutt, 2003). Пять фибриллярных коллагенов (I, II, III, V и XI) образуют фибриллы (Jugdutt, 2003) и обеспечивают структурный каркас тканей. Принято считать, что соотношение коллагенов I и III типов в физиологических условиях достаточно стабильно и является одной из основных характеристик ВКМ. Коллаген I образует толстые волокна и важен для обеспечения структурной стабильности тканей (Debessa et al., 2001), а также прочности на разрыв и жесткости (Jugdutt, 2003). Тонкие волокна коллагена III типа образуют тонкую ретикулярную сеть в большинстве мягких соединительных тканей

(Debessa et al., 2001) и обеспечивают высокую эластичность тканей (Jugdutt, 2003).

В сердце основным компонентом ВКМ является коллаген I типа. Он составляет примерно 85% всех коллагенов в сердце, тогда как коллаген III составляет около 11% (DeSouza, 2002). Другими важными компонентами ВКМ миокарда являются ламинин и фибронектин. Ламинин участвует в связывании сарколеммы КМЦ со стенкой сосудов, в то время как фибронектин осуществляет связь плазмолеммы фибробластов, макрофагов и миоцитов с коллагеновой сетью.

Изменение экспрессии белков ВКМ может оказывать значительное влияние на структуру и функцию сердца. Ряд заболеваний сердца, включая ишемию, связаны с качественными и количественными изменениями белков ВКМ (Barallobre-Barreiro et al., 2012). Изменения ВКМ также наблюдаются при дилатационной кардиомиопатии (Pauschinger et al., 2002), инфаркте миокарда (Lindsey et al., 2003) и сердечной недостаточности (Pelouch et al., 1993; Tyagi et al., 1996; Tyagi, 1997; Mishra et al., 2010; Mishra et al., 2012). Изменения ВКМ, связанные со старением, приводят к ремоделированию миокарда (Swynghedauw, 1999).

Помимо общего ВКМ кардиомиоциты имеют собственную базальную мембрану – высокоорганизованный слой белков на внешней поверхности сарколеммы, который состоит из гликопротеинов и протеогликанов, таких как коллагены IV, ламинины, энтактины, перлекан и хондроитинсульфат (Langer et al., 1976; Lundgren, et al. 1988; Farhadian et al., 1996; Yurchenco et al., 2004). Помимо КМЦ базальная мембрана характерна для таких клеток, как клетки эндотелия, подоциты (Miner, 2012), гладкомышечные клетки аорты (Thyberg, 1994), эпителиальные клетки трахеи (Hallmann et al., 2005) и шванновские клетки (McGarvey et al., 1984). Компоненты базальной мембраны являются первыми внеклеточными белками, синтезируемыми в ходе эмбриогенеза (Leivo et al., 1980). Было показано, что компоненты

базальной мембраны в сердце синтезируются в основном фибробластами и эндотелиальными клетками (Corda et al., 2000). Однако имеются данные, указывающие на то, что коллаген IV также может синтезироваться КМЦ (Corda et al., 2000).

Способность синтезировать компоненты ВКМ зависит от типа клеток сердца. Например, фибробласты и гладкомышечные клетки синтезируют коллаген I и III типа и фибронектин, тогда как эндотелиальные клетки и перициты синтезируют коллаген IV типа (Corda et al., 2000).

Несмотря на то что КМЦ специализируются на функции сокращения и в норме не продуцируют ВКМ, в литературе имеются данные, указывающие на то, что КМЦ могут синтезировать компоненты базальной мембраны, такие как коллаген IV (Corda et al., 2000). Кроме того, в одной из работ был описан синтез структурных компонентов ВКМ, в частности, эластина, культурой КМЦ P1-3 фирмы Lonza при их культивировании в гидрогелях (Gishto et al., 2015). Однако в описанных гидрогелях исходно присутствовали различные белки ВКМ, что делает интерпретацию результатов исследования неоднозначной. Кроме того, культура, используемая в данной работе, содержала также немышечные клетки сердца и лишь на 85% состояла из КМЦ. Таким образом, предполагаемый синтез ВКМ мог быть обусловлен активностью фибробластов. На сегодняшний день данные, показывающие способность КМЦ синтезировать основные структурные компоненты ВКМ, полностью отсутствуют.

Недавние исследования показали, что помимо основных продуцентов компоненты ВКМ также могут синтезироваться стволовыми клетками сердца (Kurazumi et al., 2011). Например, иммортализованные прогениторные клетки сердца линии L9TV продуцируют коллаген I и III типа, причем экспрессия этих белков повышается по мере дифференцировки клеток *in vitro* (Sato et al., 2006). В другой работе было показано, что недифференцированные стволовые клетки сердца экспрессируют коллагены I, III и IV типа и

фибронектин, но не экспрессируют эластин. В процессе их дифференцировки наблюдается повышение экспрессии коллагенов и фибронектина, а также начинается экспрессия эластина (Вах et al., 2012).

1.7.2. Матриксные металлопротеиназы

ВКМ является крайне динамичной системой. За процесс ремоделирования ВКМ в тканях отвечают матриксные металлопротеиназы (ММП). ММП представляют собой семейство цинк- и кальций-зависимых эндопептидаз, которые расщепляют компоненты ВКМ, в основном коллагены. Эти белки экспрессируются во всех тканях и на всех стадиях онтогенеза. Они играют важную роль во многих нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, морфогенез, репродукция и ремоделирование тканей, а также при различных патологиях (Brenner et al., 1989., Matrisian and Hogan, 1990, Woessner, 1991; Spinale et al., 1993., Werb and Alexander, 1993; Tyagi et al., 1995). ММП высвобождаются в виде неактивных проферментов (Tyagi et al., 1993; Dhanaraj et al., 1996). Молекулы всех ММП имеют несколько доменов. N-терминальный сигнальный домен способствует экспорту белка через цитоплазматическую мембрану в межклеточное пространство. Расположенный рядом с сигнальным пропептидным домен представляет собой пептидную последовательность PRCGV/NPD, получившую название «цистеиновый выключатель», поскольку содержит SH-группу, которая, связываясь с атомом Zn^{2+} в активном центре, поддерживает молекулу ММП в латентной форме. После гидролитического удаления пропептидного домена и освобождения Zn^{2+} -связывающего центра происходит активация ММП (Tyagi et al. 1993, Visse, 2003). Эндопептидазную активность ММП осуществляет каталитический домен, который включает в себя консервативную аминокислотную последовательность с тремя остатками гистидина, связанными с ионом цинка. Каталитический домен включает два иона Zn^{2+} и три иона Ca^{2+} .

К настоящему времени описано около 30 типов ММП. Как правило, ММП классифицируют по их субстратной специфичности (Hiller et al., 2000) и делят на коллагеназы (ММП-1, -8 и -13), желатиназы (ММП-2 и -9), стромелизины (ММП-3 и -10) и матрилизины (ММП-7 и -26). ММП-2 и ММП-9 относятся к одному подсемейству ферментов, обладающих сходной субстратной специфичностью. ММП-2 и ММП-9 способны связываться с денатурированным коллагеном – желатином. ММП-2 экспрессируется в клетках постоянно (Qin, 1999; Ma et al., 2004; Givvimani et al., 2010), тогда как ММП-9 является индуцибельной и провоцирует патофизиологическое ремоделирование (Gutierrez et al., 2008; Mishra et al., 2010). ММП-2 имеет наиболее широкое распространение из всех ММП и выявляется в большинстве тканей и клеток. Однако в основном ММП-2 экспрессируется в гладкомышечных клетках и клетках эндотелия. ММП-2 имеет широкую субстратную специфичность. Помимо желатина ММП-2 может расщеплять некоторые другие субстраты ВКМ, включая коллаген типа III, IV, V, VII, X и XI, фибронектин, витронектин, ламинин и верзикан, а также некоторые не матриксные субстраты, такие как α 1-антихимотрипсин, инсулиноподобный фактор роста связывающий белок IGFBP-3, IGFBP-5, субстанция P, интерлейкин 1- α , про-фактор некроза опухоли альфа, проММП-1, проММП-2, проММП-9, проММП-13, рецептор фактора роста фибробластов 1 и латентный трансформирующий фактор роста (TGF- α) (Visse and Nagase, 2003; Butler and Overall, 2009).

Экспрессия ММП-9, напротив, в норме ограничивается клетками воспаления, включая моноциты, тканевые макрофаги, полиморфноядерные клетки, а также кератиноцитами (Van den Steen et al. 2002). ММП-9 экспрессируется в поврежденных артериях, благодаря чему этот фермент считается маркером системного воспаления. ММП-9 имеет высокое сродство к денатурированному коллагену (желатину), но также способна расщеплять нативный коллаген VI, V и XI типов, эластин, IL-8, активирующий пептид

соединительной ткани III, пластиночный фактор-4, субстанцию P, амилоидный пептид β . В зависимости от места расщепления этих молекул ММП-9 может снижать или повышать их биологическую активность (Van den Steen et al., 2002). Показано, что ММП присутствуют в нормальном миокарде и являются важными регуляторами ВКМ в сердце, участвуя в поддержании его структуры и физиологической функции (Brenner et al., 1989; Matrisian and Hogan, 1990; Woessner, 1991; Werb et al., 1992; Spinale et al., 1993; Werb and Alexander, 1993; Tyagi et al., 1995; Jugdutt, 2003). Изменение экспрессии различных ММП в сердце может наблюдаться в ходе нормального развития (Matrisian and Hogan, 1990; Werb et al., 1992), а также при различных заболеваниях. Так, изменения активности ММР наблюдаются при острой ишемии и инфаркте миокарда, а также кардиомиопатиях, ишемически-реперфузионном повреждении и вызванной цитокинами дисфункции сердца (Takahashi et al., 1990; Coker et al., 1998; Spinale et al., 1998; Thomas et al., 1998; Romanic et al., 2002; Spinale, 2002; Gao et al., 2003; Fingleton, 2007).

Было показано зависимое от времени повышение уровня некоторых ММП на многих моделях сердечной недостаточности (Coker et al., 1998; Spinale et al., 1998; Spinale et al., 1999; Spinale, 2002). В частности, показана связь желатиназ с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Например, повышенная активность ММР-2 наблюдается при атеросклеротических повреждениях аорты (Li et al., 1996), на модели гипертрофии (Wang et al., 2004) и при ишемически-реперфузионном повреждении (Arnsdorf and Sawicki, 1981; Cheung et al., 2000; Bencsik et al., 2014; Gao et al., 2014). Повышенный уровень ММР-9 наблюдается при атеросклерозе, гипертензии и остром инфаркте миокарда (Yabluchanskiy et al., 2013), а также коррелирует с диастолической дисфункцией и является маркером сердечной недостаточности (Pavlovsky et al. 1999; Ovechkin et al. 2005; Felkin et al. 2006). Показано, что подавление ММП-9 улучшает сердечную функцию (Romanic et

al., 2002; Fingleton, 2007; Mishra et al., 2010). Например, направленная делеция ММП-9 приводит к улучшению сократимости КМЦ у мышей *in vivo* (Mishra et al., 2010). Кроме того, повышение уровня ММП-9 связывают с процессом старения (Gearing et al., 1994; Horstmann et al., 2009; Yabluchanskiy et al., 2014).

Активность ММП регулируется провоспалительными цитокинами, стероидными и тиреоидинами гормонами, нейропептидами, интегринами, факторами роста и индукторами апоптоза (Wahl, 1990; Cury et al., 1988 Schnee and Hsueh, 2000; Murphy-Ullrich, 2001). Например, такие цитокины, как фактор некроза опухоли (TNF- α) и интерлейкин-1 (IL-1) значительно влияют на экспрессию и активацию коллагеназ в человеческих фибробластах. Подобным образом, IL-1b стимулирует экспрессию и активность ММП-2 в эндотелиоцитах капилляров сердца (Hsieh et al., 2010) и фибробластах (Hsieh et al., 2012).

Кроме того, активность ММП может регулироваться непосредственно тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИММП) (Li et al., 2000; Spinale, 2007). Существуют четыре типа ТИММП: ТИММП -1, -2, -3 и -4. ТИММП-4 специфично экспрессируется в сердце (Greene et al., 1996) и играет важную роль в ремоделировании матрикса путем ингибирования активности ММП-9 (Koskivirta et al., 2010). Гиперэкспрессия ТИММП-4 в КМЦ приводит к повышению сократимости. Считается, что ТИММП-4 играет роль при дифференцировке прогениторных клеток сердца в КМЦ (Chaturvedi et al., 2015). Нарушение баланса ММП/ТИММП в сердце связано со многими сердечно-сосудистыми заболеваниями, включая сердечную недостаточность и инфаркт миокарда (Matsumura et al., 2005; Heymans et al., 1999; Lindsey et al., 2006; Creemers et al., 2003; Tian et al., 2007) и фиброз сердца (Spoto et al., 2012), а также со структурными и функциональными изменениями при гипертензивной кардиомиопатии (Spinale and Zile, 2006).

Ключевую роль в ремоделировании ВКМ в сердечной ткани с помощью ММП играют фибробласты (Chapman et al., 2003, Camelliti et al. 2005). Кроме того, показано, что фибробласты также являются продуцентами ММП в культурах клеток сердца (Nichol et al., 2008). Однако эндотелиальные и гладкомышечные клетки также экспрессируют ММП (Herron et al., 1986; Galis et al. 1994; Tyagi et al., 1995). Например, MMP-2 встречается в большинстве типов клеток сердца, включая клетки эндотелия сосудов (Arenas et al., 2004), гладкомышечные клетки (Risinger et al., 2006) и фибробласты (Stawowy et al., 2004).

Несмотря на то, что основными продуцентами ММП являются немышечные клетки, ММП были также обнаружены в культивируемых КМЦ. Кокер с соавторами в 1999 впервые показали с помощью иммунофлуоресцентного анализа присутствие ММП, в частности желатиназ, в КМЦ взрослых свиней через сутки после помещения клеток в культуру (Coker et al., 1999). Они также описали секрецию ММП в культуральную среду в процессе культивирования КМЦ. Однако исходя из методики получения и культивирования клеток, авторы данной работы использовали смешанную культуру клеток сердца, которая содержала фибробласты – основные продуценты ММП (Coker et al. 1999).

Была описана динамика ММП в ходе дифференцировки различных клеток в КМЦ. Например, показано участие MMP в кардиогенной дифференцировке эмбриональных стволовых клеток (Kawai et al., 2004). Также была описана экспрессия MMP-2, -3, -7 и -9 в ходе дифференцировки взрослых мезенхимных клеток в различные классы миоцитов (Mannello et al., 2006). На прогениторных клетках сердца человека линии L9TV была показана экспрессия MMP-1 -2 и -9, при этом в процессе их дифференцировки наблюдалось снижение экспрессии MMP-1 и повышение экспрессии MMP-9 (только на ранней стадии дифференцировки) и MMP-2 (Вах et al., 2012).

Несмотря на то, что основной ролью ММП считают ремоделирование ВКМ, и огромное количество исследований направлено на изучение внеклеточной роли ММП, относительно недавно было показано, что ММП также могут являться внутриклеточными протеазами. Они могут расщеплять цитозольные субстраты в клетке и модулировать различные клеточные функции, включая сократительную способность КМЦ (Wang et al., 2002б; Si-Yayeb et al., 2003; Kwan et al., 2004; Sawicki et al., 2005; Si-Tayeb et al., 2006; Sung et al., 2007; Moshal et al., 2008; Butler and Overall, 2009; Ali et al., 2010; Doroszko et al., 2010; Ali et al., 2011; Hadler-Olsen et al., 2015). С помощью электронной и конфокальной микроскопии, а также иммунопреципитации и зимографического анализа (Schulz, 2007), была показана активность MMP-2 в митохондриях (Wang et al., 2002a) и ядре КМЦ (Kwan et al., 2004). Показано, что повышенная активность MMP-2 в митохондриях связана с митохондриальной дисфункцией КМЦ (Zhou et al., 2007). Также описана связь между накоплением MMP-9 в митохондриях и аритмией и нарушением сократимости КМЦ (Moshal et al., 2008).

Ванг с соавторами (Wang et al., 2002a) впервые показали с помощью иммунофлуоресцентного анализа солокализацию внутриклеточной ММП-2 с саркомерами КМЦ на модели сердец, подверженных ишемически-реперфузионному повреждению (Wang et al., 2002a).

Позднее на сердцах, подверженных ишемически-реперфузионному повреждению, вызванному кислородным стрессом, было показано участие ММП-2 в деградации саркомерных белков (Wang et al., 2002б; Viappiani et al., 2009), включая α -актинин (Sung et al., 2007), тропонин I (Wang et al., 2002a), легкую цепь миозина-1 (Sawicki et al., 2005), титин (Ali et al., 2010) и MLC2 (Doroszko et al., 2010). Деградация саркомерных белков приводила к сократительной дисфункции, которая предотвращалась подавлением действия ММП-2 (Ali et al., 2011). Показано, что ММП-2 выявляется в саркомерах в основном в области Z-дисков (Ali et al., 2010), которые

считаются участками начала разборки миофибрилл (Ahuja et al., 2004). В связи с этим некоторые исследователи предполагают участие ММП в процессе деградации миофибрилл КМЦ в ткани (Ali et al., 2010). Кроме того, существует гипотеза о том, что MMP-2 может быть вовлечена в физиологическую регуляцию нормального оборота сердечных белков (Doroszko et al., 2009; Lin et al., 2014). Однако данные, подтверждающие участие ММП в разборке миофибрилл, отсутствуют. Несмотря на то что механизм разборки саркомеров до сих пор остается плохо изученным, известно о существовании зависимого от протеаз физиологического процесса, вовлеченного в сборку и разборку саркомеров во время деления эмбриональных КМЦ (Ahuja et al., 2004). Некоторые исследователи предполагают, что внутриклеточные протеазы могут облегчать разборку миофибрилл посредством протеолиза ключевых саркомерных белков. В свою очередь, ММП-2 может объединять другие внутриклеточные протеазы, такие как кальпаин, сериновые протеазы и протеазы протеасомной системы, для разборки саркомеров.

Механизмы, направляющие активные ММП во внутриклеточный компартмент, а также механизмы их внутриклеточной активации не полностью понятны. Считается, что внутриклеточные ММП в неонатальных и взрослых КМЦ представлены сплайс-вариантами ММП с отсутствием сигнальной последовательности или ММП с сигнальной последовательностью, неэффективной по своей способности направлять ММП в эндоплазматический ретикулум (Ali et al., 2011). Такой же механизм был описан для внутриклеточной ММП-2 в клетках HeLa и клетках почки эмбриона человека (Ali et al., 2012).

Несмотря на то что на различных моделях сердечных заболеваний было показано наличие ММП в КМЦ и описано их внутриклеточное действие, работы, описывающие способность КМЦ секретировать ММП во

внеклеточное пространство и вносить вклад в ремоделирование ВКМ, отсутствуют.

1.7.3. Культивирование кардиомиоцитов в присутствии компонентов внеклеточного матрикса

Известно, что белки ВКМ оказывают существенное влияние на формирование структур актинового цитоскелета в немышечных клетках (Grinnel, 1978). Например, исследования, проведенные на клетках линии A431, показали различия в организации цитоскелета клеток, культивируемых на разных компонентах ВКМ. В частности, при распластывании клеток линии A431 на подложке, покрытой фибронектином, в их цитоплазме выявляются многочисленные стресс-фибриллы. При распластывании этих же клеток на подложке, покрытой ламинином 2/4, наблюдается сеть актиновых филаментов в ламелле (Петухова и др., 2004). Аналогичные исследования проводились на фибробластах. Было показано, что при распластывании на фибронектине фибробласты утрачивают поляризованность, при этом стресс-фибриллы ориентируются хаотично и образуют многочисленные полигональные структуры. Фибробласты, распластанные на ламинине, существенно отличаются от клеток, распластных на фибронектине, и сохраняют поляризованность. При распластывании на коллагене III типа клетки принимают полигональную форму и образуют многочисленные ламеллоподии, в которых актиновый цитоскелет представлен сетью микрофиламентов (Арэ 1999). Таким образом, результаты, полученные на различных немышечных клетках, демонстрируют специфичность организации актинового цитоскелета в одних и тех же клетках при их культивировании на различных белках ВКМ.

Работ по культивированию КМЦ на различных компонентах ВКМ значительно меньше. В одном исследовании было показано, что неонатальные КМЦ крыс могут прикрепляться к 2-мерным субстратам из коллагена (тип I, II, III, IV и V), а также ламинина и фибронектина, при этом

согласно данным авторов скорость прикрепления повышалась с увеличением концентрации белков. В отличие от неонатальных КМЦ, взрослые КМЦ прикреплялись только к ламинину и коллагену IV типа (Borg et al., 1984; Lundgren et al., 1985). На основании полученных результатов авторы предположили различия в способности распознавать белки ВКМ между клетками животных разного возраста. В другой работе было показано, что при помещении КМЦ на различные белки ВКМ наблюдался разный характер распределения миофибрилл. Например, при культивировании клеток на коллагене I и коллагене III исчерпанные миофибриллы смещались к периферии, а при их культивировании на ламинине и фибронектине миофибриллы располагались в центральной части клеток. (Hilenski et al., 1989). Согласно другим исследованиям эмбриональные КМЦ, которые культивировали на ламинине, имели тенденцию сохранять палочковидную форму, тогда как КМЦ, культивируемые на коллагене, округлялись через несколько часов и быстро начинали расплываться (Claycomb et al., 1989).

Имеются многочисленные данные, свидетельствующие о том, что клетки в трехмерных условиях культивирования ведут себя более естественно по сравнению с двумерными условиями, поскольку трехмерные системы наиболее соответствуют окружению, в котором клетки находятся в организме (Mauch et al., 1988; Eschenhagen et al., 1997; Coker et al., 1999). Трехмерные системы культивирования также используются для улучшения дифференцировки клеток *in vitro*. Например, наиболее перспективным методом дифференцировки стволовых клеток сердца в КМЦ считается их культивирование в кардиосферах (Oltolina et al., 2015). Существует ряд работ по культивированию неонатальных и эмбриональных КМЦ в трехмерных условиях, указывающих на значительные морфологические различия между КМЦ, культивируемыми в 2-мерных и 3-мерных условиях. В частности, было показано, что КМЦ куриных эмбрионов на вторые сутки культивирования в трехмерных агрегатах лучше сохраняли морфологию и сократительную

способность по сравнению с КМЦ, помещенными на двумерные подложки (Soares et al., 2012). Согласно одной из работ, клетки сердца новорожденных крыс и куриц помещали в трехмерную систему, содержащую матригель и коллаген, и через 5-7 суток наблюдали спонтанные сокращения, которые при механическом растяжении гелей продолжались еще в течение нескольких дней (Zimmermann et al., 2004). В другой работе эмбриональные куриные КМЦ в смешанной культуре клеток сердца помещали в 1% коллагеновые гели при их механическом натяжении и наблюдали образование тканеподобных структур и спонтанные сокращения (Eschenhagen et al., 1997). При помещении КМЦ в ВКМ, полученный путем децеллюляризации сердечной ткани, через несколько дней культивирования наблюдали спонтанные сокращения (Eitan et al., 2010). Кроме того, при заселении дифференцированными из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток КМЦ нативного ВКМ, полученного путем децеллюляризации целого сердца, в условиях непрерывной перфузии и механической стимуляции наблюдали формирование сегментов миокарда, которые были метаболически и функционально активными (Guyette, 2016). За последние годы появилось много данных о том, что поведение и фенотип различных клеток в культуре может зависеть не только от пространственной организации, но также от жесткости ВКМ. Эластичность ВКМ, которая, в частности, сильно зависит от концентрации коллагена, влияет на форму разных клеток, экспрессию и организацию белков, а также дифференцировку клеток (Pelham and Wang, 1997; Discher et al., 2005; Peyton and Putnam, 2005). Например, слишком высокое содержание коллагена снижает дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека в КМЦ (Duan et al., 2011). Имеются данные, указывающие на то, что жесткость ВКМ может влиять на морфологию и функциональную активность эмбриональных и неонатальных КМЦ (Engler et al., 2008; Bhana et al., 2010; Majkut and Discher, 2012). Например, эмбриональные КМЦ лучше сокращаются на ВКМ, показатели эластичности

которого соответствуют характеристикам сердечной ткани (Engler et al., 2008). В другой работе эмбриональные КМЦ культивировали в полиакриламиде с добавлением коллагена I типа в различной концентрации и также показали, что оптимальным является субстрат, обладающий эластичностью, характерной для ткани сердца. При повышении жесткости субстрата КМЦ переставали сокращаться, утрачивали исчерченность и распластывались, при этом культивирование клеток в более мягком субстрате приводило к ослаблению силы сокращения (Bhana et al., 2010). При культивировании крысиных КМЦ P1-3 фирмы Lonza в гидрогелях, содержащих разное количество коллагена (1,2, 2 и 3 мг/мл), наилучшая выживаемость клеток наблюдалась в гелях с концентрацией коллагена 1 и 2 мг/мл. Повышение концентрации коллагена до 3 мг/мл вызывало значительное снижение выживаемости клеток (Gishto et al., 2015). Считается, что высокая концентрация коллагена может приводить к снижению пористости субстрата, что в свою очередь влияет на клеточную подвижность и, соответственно, выживаемость (Willits et al., 2004; Pok et al., 2013). Несмотря на описанные выше результаты, на сегодняшний день отсутствуют данные о динамике сократительного аппарата КМЦ в процессе их длительного трехмерного культивирования. Кроме того, фактически во всех опубликованных работах по культивированию КМЦ в трехмерных системах используется смешанная культура клеток сердца, в которой помимо КМЦ присутствуют сердечные фибробласты, способные оказывать как непосредственное, так и косвенное влияние на поведение КМЦ.

Имеющиеся на сегодняшний день данные о культивировании КМЦ в присутствии ВКМ довольно малочисленны и являются крайне разрозненными и часто даже противоречивыми. Однако они все же указывают на то, что ВКМ может оказывать влияние на морфологию и сократительную способность КМЦ.

Таким образом, на сегодняшний день хорошо известно, что ВКМ необходим для поддержания строения и сократительной способности сердца и играет важную роль в процессе кардиогенеза. Однако влияние ВКМ на динамику сократительного аппарата КМЦ не описано. В свою очередь, появляется все больше данных, указывающих на возможную взаимную регуляцию между белками ВКМ и динамикой актиновых микрофиламентов в неммышечных клетках. В связи с этим исследование перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре и изучение влияния ВКМ на этот процесс важно для понимания регуляции сократительной системы КМЦ в процессе их адаптации к внеклеточному микроокружению во время ключевых физиологических и патологических процессов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение первичной культуры кардиомиоцитов

Работу проводили на беспородных лабораторных крысах. Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с общепринятыми этическими принципами и международными нормами.

Клетки миокарда выделяли из желудочков сердец новорожденных 3-6-суточных животных. Крыс усыпляли эфиром, вскрывали грудную клетку, извлекали сердца и отсекали сосудистые пучки. Затем сердца промывали изотоническим фосфатным буфером (PBS, pH 7,4: 140 mM NaCl, 50 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄). При помощи скальпеля желудочки отделяли от предсердий в растворе PBS. Затем основной объем PBS удаляли и желудочки измельчали ножницами в небольшом объеме PBS. К измельченной ткани добавляли раствор трипсина (Биолот, Россия; 1 мг/мл) в PBS и инкубировали в термостате при 37°C в течение 20 мин при постоянном медленном перемешивании. Затем раствор трипсина с небольшим содержанием клеток (в основном поврежденных) удаляли и к оставшимся кусочкам ткани добавляли раствор протеолитических ферментов в PBS, содержащий коллагеназу I типа (коллагеназа краба, «Биолот», Россия; 0,5 мг/мл) и трипсин (Биолот, Россия; 1 мг/мл). Ткань инкубировали в растворе ферментов 2 раза по 30 мин при 37°C при постоянном медленном перемешивании. Для выхода клеток в суспензию смесь многократно пипетировали. Для инактивации ферментов в суспензию добавляли эмбриональную телячью сыворотку (Gibco, США) в концентрации 10% и полученную смесь центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Супернатант сливали и к осадку, содержавшему клетки сердца, добавляли питательную среду DMEM (Биолот, Россия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и гентамицином (Биолот, Россия, 50 мкг/мл). Суспензию снова центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Для освобождения полученной смеси от клеток эндотелия и клеток крови,

которые являются более легкими по сравнению с КМЦ и большей частью фибробластов, суспензию снова разводили в полной питательной среде и центрифугировали при 150 g 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM с сывороткой и гентамицином и высевали в чашки Петри (Nunc, Дания).

Для данной работы было важно получить чистую культуру КМЦ, свободную от сердечных фибробластов. Для того чтобы отделить более адгезивные фибробласты от медленно прикрепляющихся КМЦ, использовали метод селективной адгезии. В соответствии с методом полученную суспензию клеток разводили в среде DMEM с сывороткой и гентамицином, наносили на чашку Петри и помещали в инкубатор на 20-30 мин. За это время значительная часть фибробластов успевала прикрепиться к поверхности чашки, в то время как КМЦ оставались в суспензии. Среду, содержащую неприкрепившиеся клетки, осторожно собирали и переносили на новые чашки Петри. При этом на старой чашке оставалась культура, обогащенная фибробластами, которую в дальнейшем использовали для получения чистой культуры сердечных фибробластов. Процедуру повторяли от 4 до 6 раз (так, чтобы общее время составляло примерно 2 ч). Этого времени было достаточно для прикрепления практически всех фибробластов. В итоге получали суспензию, содержащую КМЦ, которые переносили на новые чашки Петри (с покровными стеклами или без них) в концентрации $\sim 6 \times 10^4$ клеток/см². Клетки культивировали в инкубаторе с 5%-ым содержанием CO₂ при температуре 37°C в питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицин (50 мкг/мл). Даже после селективной адгезии незначительное количество фибробластов все же может попадать в культуру КМЦ. Поскольку фибробласты являются быстро пролиферирующими клетками в отличие от неделящихся КМЦ, для предупреждения их возможной пролиферации на 2-е сутки культивирования и далее при каждой второй смене среды в культуру

добавляли ингибитор синтеза ДНК цитозин-арабинозид (Sigma-Aldrich США, 3 мкг/мл). Использование этого агента является общепринятым методом подавления пролиферирующих клеток. Смену среды производили каждые 2–3 суток. За состоянием клеток в процессе культивирования наблюдали с помощью инвертированного микроскопа (ЛОМО, Россия). Жизнеспособность клеток оценивали путем их окрашивания 0,1% раствором трипанового синего (Биолот, Россия).

2.2. Получение культуры сердечных фибробластов

Культуру сердечных фибробластов получали из обогащенной фибробластами культуры, полученной в результате первого этапа селективной адгезии. Такая культура могла содержать некоторое количество КМЦ, оставшихся после удаления среды. Для того чтобы избавиться от оставшихся КМЦ, фибробласты рассеивали в низкой концентрации, растили до монослоя и снова рассеивали (примерно 5—6 пассажей). При этом неделящиеся КМЦ постепенно терялись в ходе многократных пересевов. Таким образом, получали чистую культуру сердечных фибробластов. Далее клетки растили до состояния монослоя и рассеивали в отношении 1:2. Фибробласты культивировали в инкубаторе с 5%-ым содержанием CO₂ при температуре 37°C в питательной среде DMEM с 10% сывороткой и гентамицином (50 мкг/мл). За состоянием клеток в процессе культивирования наблюдали с помощью инвертированного микроскопа (ЛОМО, Россия). Жизнеспособность клеток оценивали путем их окрашивания 0,1% раствором трипанового синего (Биолот, Россия).

2.3. Культивирование кардиомиоцитов в кондиционированной среде от фибробластов

От культуры сердечных фибробластов, описанной выше, получали среду, кондиционированную клетками в течение 2 суток. Для эксперимента использовали клетки после 6 пассажа. Свежевыделенные КМЦ, полученные в результате ферментативной диссоциации, как описано выше, помещали

непосредственно в кондиционированную среду от фибробластов. На вторые сутки в культуру добавляли цитозин-арабинозид в концентрации 3 мкг/мл. Каждые 2-3 суток среду замещали на новую кондиционированную среду, отобранную от культуры сердечных фибробластов.

2.4. Культивирование кардиомиоцитов на отдельных белках внеклеточного матрикса

На покровные стекла наносили по 100 мкл раствора фибронектина (0.02 мг/мл; Sigma-Aldrich, США) или раствора ламинина 2/4 (0.02 мг/мл), который был любезно предоставлен И. В. Воронкиной (Институт цитологии РАН, С-Петербург), и инкубировали в холодильнике в течение ночи. Затем стекла промывали несколько раз раствором PBS. Для предотвращения неспецифического взаимодействия клеток с субстратом стекла дополнительно обрабатывали раствором 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 1 ч при 37 °С с последующей отмывкой PBS. Подготовленные стекла помещали в чашки Петри, на которые высевали культуру КМЦ в необходимой концентрации для дальнейшего исследования.

2.5. Получение проб внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами или сердечными фибробластами

Для выделения ВКМ с минимальными повреждениями клетки (КМЦ или фибробласты) на разных сроках культивирования на чашках Петри заливали PBS и инкубировали при 4 °С в течение 2 ч. Затем добавляли теплый 0,02%-ый раствор Версена (Биолот, Россия) и клетки инкубировали в термостате при 37°С в течение 30 мин. После этого клетки удаляли путем осторожного многократного пипетирования в растворе PBS. За процессом снятия клеток следили с помощью инвертированного микроскопа. Когда по всей площади чашек не наблюдали оставшихся клеток или их фрагментов, добавляли свежий PBS и чашки нагревали до 56 °С. Затем PBS удаляли и быстро добавляли небольшой объем (50 мкл на чашку) буфера для проб Лэммли (Laemmli, 1970). Белки тщательно соскребали с подложки при

помощи резинового скребка. Полученную суспензию переносили в пробирки и инкубировали при 90 °С в течение 5 мин. Пробы хранили при температуре -70 °С.

2.6. Культивирование кардиомиоцитов на матриксе, полученном от кардиомиоцитов или сердечных фибробластов

Клетки (фибробласты или КМЦ) снимали со стекол на разных сроках культивирования с минимальными повреждениями матрикса, как описано выше. Когда на стеклах не оставалось клеток или их фрагментов, стекла с оставшимся ВКМ несколько раз промывали PBS и помещали в новые чашки Петри, на которые затем наносили суспензию свежeweыделенных КМЦ для дальнейшего длительного культивирования.

2.7. Культивирование кардиомиоцитов в коллагеновых гелях

Для приготовления коллагеновых гелей с разной концентрацией белка (0,5, 1 и 1,5 мг/мл) использовали коллаген I типа, полученный по стандартной методике (Chandrakasan et al., 1967), стерильный 0.34 М раствор NaOH (для подведения pH до 7.0) и концентрированную (10×) питательную среду 199 (Sigma-Aldrich, США). Компоненты перемешивали и в полученную смесь добавляли суспензию КМЦ в полной питательной среде с достижением необходимой конечной концентрации коллагена. Полученную суспензию наносили на покровные стекла (по 100 мкл на стекло) и в стерильных чашках Петри помещали в инкубатор для полимеризации коллагена с образованием геля. Конечная концентрация клеток в гелях разной концентрации была одинаковой и составляла 3×10^5 клеток на стекло. После формирования гелей в чашки добавляли среду DMEM с сывороткой и гентамицином и культивировали клетки в течение трех недель. Смену среды проводили каждые 2–3 суток. На 2-е сутки культивирования и далее при каждой второй смене среды в культуру добавляли ингибитор синтеза ДНК цитозин-арабинозид в концентрации 3 мкг/мл. Жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания 0,1% раствором трипанового синего.

2.8. Флуоресцентное окрашивание структур сократительного аппарата кардиомиоцитов

Клетки на покровных стеклах промывали PBS, фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида на PBS в течение 10 мин, затем промывали несколько раз раствором PBS. Для проникновения красителя и антител через клеточную мембрану КМЦ обрабатывали 0,1%-ым раствором Triton X-100 в течение 3 мин, затем многократно промывали PBS.

Для выявления гладкомышечного актина клетки обрабатывали моноклональными мышинными антителами против гладкомышечной изоформы α -актина (Sigma-Aldrich, США) в течение 1 ч. Затем стекла промывали один раз 0.5%-ным раствором Tween (на PBS) и несколько раз раствором PBS. Наносили вторые поликлональные кроличьи антитела против IgG мыши (Sigma-Aldrich, США), конъюгированные с красителем TRITC (Tetramethylrhodamine isothiocyanate). Стекла промывали раствором 0.5% Tween с последующей многократной промывкой PBS.

Поскольку в КМЦ, полученных на раннем сроке культивирования, не выявлялось структур, окрашенных антителами против гладкомышечного α -актина, для визуализации положения клеток препараты на этом сроке культивирования дополнительно окрашивали с помощью DAPI (ДНК-красителя, окрашивающего ядра). В остальных случаях DAPI не использовали во избежание появления нежелательного фона при анализе с помощью конфокальной микроскопии. После окраски DAPI стекла промывали несколько раз раствором PBS.

Для выявления саркомерного α -актинина клетки обрабатывали моноклональными мышинными антителами против сердечного α -актинина (получены в Институте цитологии РАН) в течение 45 мин. Затем стекла промывали один раз 0.5%-ным раствором Tween (на PBS) и несколько раз раствором PBS. Наносили поликлональные кроличьи антитела против IgG мыши (Sigma-Aldrich, США), конъюгированные с красителем FITC

(Fluorescein Isothiocyanate). Стекла промывали раствором 0.5% Tween с последующей многократной промывкой PBS.

Для выявления саркомерного миозина клетки обрабатывали моноклональными мышинными антителами против тяжелой цепи сердечного миозина (Sigma-Aldrich, США) в течение 1 ч. Затем стекла промывали один раз 0.5%-ным раствором Tween (на PBS) и несколько раз раствором PBS. Наносили поликлональные кроличьи антитела против IgG мыши (Sigma-Aldrich, США), конъюгированные с красителем FITC. Стекла промывали раствором 0.5% Tween с последующей многократной промывкой PBS.

Для окрашивания всех актиновых структур клетки обрабатывали раствором родамин-фаллоидина (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:30 в течение 15 мин в защищенном от света месте. Для отмывки несвязавшегося красителя клетки несколько раз промывали PBS.

При окрашивании КМЦ в коллагеновых гелях время обработки каждым агентом увеличивали в два раза.

Для стабилизации флуоресцентной метки все препараты клеток после окраски заключали в специальную среду Mounting medium (Pharmacia Biotech, Швеция) под покровным стеклом. Препараты хранили при 4 °С в защищенном от света месте.

2.9. Выявление внеклеточных коллагеновых структур

Для выявления интактных внеклеточных коллагеновых структур использовали препараты культуры КМЦ без предварительного удаления клеток. В данном случае клетки не обрабатывали раствором Triton X100.

КМЦ на покровных стеклах фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида в течение 10 мин с последующей многократной промывкой PBS. Добавляли раствор поликлональных кроличьих антител к коллагену I типа (Chemicon, США) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Затем стекла промывали один раз 0.5%-ым раствором Tween и несколько раз раствором PBS. Добавляли вторые поликлональные козьи антитела против IgG кролика

(Sigma-Aldrich, США), конъюгированные с красителем FITC, и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре. Стекла промывали один раз раствором 0.5% Tween и несколько раз раствором PBS.

Для исключения возможного окрашивания антителами внутриклеточного коллагена в качестве контроля использовали препараты ВКМ, полученные в результате снятия КМЦ со стекол в соответствии со способом, описанным выше. Контрольные препараты окрашивали теми же антителами против коллагена I типа с использованием таких же процедур, как и в случае окраски коллагена на культуре клеток.

Для стабилизации флуоресцентной метки препараты заключали в среду Mounting medium (Pharmacia Biotech, Швеция) под покровным стеклом. Препараты хранили при 4 °С в защищенном от света месте.

2.10. Конфокальная микроскопия

Готовые препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LEICA TCS SL (Leica, Германия) при 40-кратном увеличении объектива. Флуоресценцию красителя FITC (зеленый цвет) возбуждали аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Флуоресценцию красителя TRITC и родамин-фаллоидина (красный цвет) возбуждали He-Ne лазером (длина волны 543 нм). Флуоресценцию от разных красителей на препаратах с двойной окраской сканировали отдельно. Оптические срезы обрабатывали с помощью программы Leica Confocal Software (Leica, Германия). На препаратах с окрашенными ядрами клеток люминесценцию красителя DAPI (синяя область) регистрировали на микроскопе LSM 5 Pascal с использованием ртутной лампы. Флуоресценцию красителя TRITC на данных препаратах анализировали на том же микроскопе (He-Ne, 543 нм).

2.11. Получение клеточных лизатов

КМЦ на разных сроках культивирования снимали с чашек Петри с помощью смеси 0,25%-ого раствора трипсина (Биолот, Россия) и 0,02%-ого

раствора Версена (Биолот, Россия) в отношении 1:1. Клетки лизировали на льду в 1 мл лизирующего буфера, содержавшего 1% Triton X-100, 50 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА и 1% смесь ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich, США), в течение 10 мин при непрерывном перемешивании. Затем клеточные лизаты центрифугировали при 500 g в течение 10 мин и собирали супернатанты. К супернатантам добавляли буфер для проб Лэммли и нагревали в течение 5 мин при 90°C. Концентрацию белка в лизатах определяли с помощью метода Дот-блоттинга, согласно которому образцы наносили в одинаковом объеме на поливинилидендифторидную (PVDF) мембрану Immobilon-P (Sigma-Aldrich, США), высушивали на воздухе и фиксировали в растворе, содержавшем 40% метанола, 10% уксусной кислоты и 50% дистиллированной воды. Далее мембрану обрабатывали раствором красителя Кумасси R-250 (Sigma-Aldrich, США) в течение двух часов при непрерывном перемешивании, а затем многократно отмывали 10% раствором уксусной кислоты. В качестве стандарта концентрации белка использовали БСА, который наносили на ту же мембрану в серийных разведениях в одинаковом объеме. Для проведения количественного анализа окрашенную мембрану сканировали и с помощью программы Quantity One рассчитывали концентрацию белка в пробах, которую далее выравнивали путем разведения проб в соответствии с рассчитанными показателями.

2.12. Электрофоретический анализ

Белки лизатов для последующего анализа с помощью Вестерн блоттинга разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS (Laemmli, 1970) на системе Bio-Rad (США). Концентрирующий гель (pH 6.8) содержал 4% полиакриламида, разделяющий гель (pH 8.8) содержал 10% полиакриламида. Разделение белков проводили при силе тока 40 мА.

Для общего анализа ВКМ, полученного от КМЦ или фибробластов, а также для последующей масс-спектрометрии белки проб разделяли методом

электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS при концентрации полиакриламида в разделяющем геле 10%. После электрофореза гели фиксировали в растворе, содержащем 50% этанола и 10% уксусной кислоты, промывали 30% раствором этанола и дистиллированной водой и окрашивали Кумасси R-250 (Sigma-Aldrich, США) или раствором нитрата серебра с использованием набора Proteosilver™ Plus Silver Stain kit (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Для проведения денситометрии окрашенные гели сканировали на системе ChemiDoc и анализировали полученные изображения с помощью программы Quantity One. Общее количество белка выражали в условных единицах, принятых в программе Quantity One. Результаты денситометрии представляли в виде гистограммы.

Для анализа отдельных белков с помощью Вестерн-блоттинга белки проб ВКМ разделяли на полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS при концентрации полиакриламида в разделяющем геле 7,5%.

2.13. Вестерн-блоттинг

Для дальнейшего выявления с помощью антител разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на PVDF-мембраны Immobilon-P (Sigma-Aldrich, США). Перенос осуществляли на системе для мокрого переноса (Bio-Rad, США) в трис-глициновом буфере (pH 8.3), содержащем 10% метанола и 0.1% SDS, по стандартной методике (Towbin et al., 1979). Для контроля полного переноса белков гели после процедуры переноса окрашивали Кумасси R-250. Мембраны блокировали в течение ночи при 4°C в 5%-ом растворе обезжиренного молока, приготовленном на PBS, содержащем 0,05% Tween 20 (PBST). Все растворы антител готовили на PBST, содержащем 5% обезжиренное молоко. Мембраны инкубировали в растворе моноклональных мышечных антител против гладкомышечного α -актина (Sigma-Aldrich США), растворе моноклональных мышечных антител

против коллагена I (Sigma-Aldrich США) или растворе поликлональных крысиных антител против ламинина (Sigma-Aldrich США) в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Для специфичного выявления белков использовали антитела, выявляющие как полноразмерные белки, так и их фрагменты. После интенсивной отмывки раствором PBST мембраны помещали в раствор козьих антител против IgG крысы (для ламинина) или козьих антител против IgG мыши (для гладкомышечного α -актина и коллагена I), конъюгированных с пероксидазой хрена (Pierce, США), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембраны интенсивно отмывали раствором PBST. Для выявления пероксидазной активности использовали субстрат SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, США). Хемилюминесцентное излучение регистрировали при помощи системы ChemiDoc (Bio-Rad, США). Для проведения количественного анализа гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One.

2.14. Идентификация белков методом масс-спектрометрии

Для идентификации белков после электрофореза интересующие полосы, окрашенные Кумасси R250, аккуратно вырезали из гелей и собирали в отдельные микропробирки. Для удаления красителя пробы дважды промывали 40%-ым раствором ацетонитрила в 0,1 М NH_4HCO_3 в течение 30 мин при 37°C. После удаления раствора добавляли ацетонитрил для дегидратации геля. Ацетонитрил удаляли, пробы сушили и добавляли раствор модифицированного трипсина (Promega, США) в 0,05 М NH_4HCO_3 в концентрации 12 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 12 ч при 37°C, затем к полученной смеси добавляли раствор 0,5%-ной трифторуксусной кислоты и 10%-ного ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Полученный раствор пептидов использовали для последующей масс-спектрометрии. Масс-спектры были получены на тандемном MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd)

в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-моду после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,005 %. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков млекопитающих с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

2.15. Идентификация матричных металлопротеиназ методом зимографии

Для определения ММП использовали метод зимографии с желатином (Oliver et al., 1999) в модификации Воронкиной с соавт. (Воронкина и др., 2002). Источником ММП служила среда, кондиционированная клетками в течение двух суток (Okada et al., 1990). Пробы кондиционированной среды отбирали на разных сроках культивирования КМЦ. Количество белка в пробах определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Пробы выдерживали в течение 30 мин в буфере для проб, содержащем 62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8 и 0,1%-ный SDS, и анализировали при помощи SDS-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии 0,5 мг/мл желатина в разделяющем геле. Пробы наносили в количестве, соответствующем 10 мкг белка на дорожку. По окончании электрофореза гель дважды отмывали 2,5%-ным раствором Triton-X100 для удаления SDS и инкубировали в буфере, содержащем 5 мМ CaCl₂ и 50 мМ Tris-HCl, pH 7,2 - 7,4, в течение 18 ч при 37°C для ренатурации протеаз и протекания протеолитических реакций. После инкубации гель фиксировали в растворе, содержащем 25% изопропанола и 10% уксусной кислоты, в течение 30 мин и окрашивали Кумасси G-250 (Sigma-Aldrich, США). В качестве контроля использовали пробы полной питательной среды (с добавлением сыворотки, гентамицина и цитозин-арабинозида),

которую использовали для культивирования КМЦ. Для выявления положения зон, соответствующих ММП-2 и ММП-9, использовали среду, кондиционированную фибробластами линии НТ-1080. Для проведения количественного анализа гели сканировали и полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One. Протеолитическую активность ММП выражали в условных единицах, принятых в программе Quantity One (количество пикселей на интенсивность окраски). Результаты денситометрии представляли в виде графиков.

2.16. Экстракция РНК, синтез кДНК и ПЦР-реакции.

Тотальную клеточную РНК экстрагировали с использованием реагента Trizol (Invitrogen Life Technologies, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию оценивали с использованием флуориметра Qubit® 2.0 (Life Technologies, США). Для устранения возможных примесей ДНК пробы инкубировали с ДНКазой I (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин при 37°C. Для синтеза кДНК использовали 1 мкг РНК (набор для синтеза комплементарной кДНК, Thermo Scientific, США). Полимеразную цепную реакцию осуществляли с использованием системы для ПЦР Terzig PCR system (DNA Technologies, США). В реакциях ПЦР использовали специфичные пары праймеров для сердечного α -актина (ACTA1-F (5'-3') CTCTTGTGTGTGACAACGGC; ACTA1-R (5'-3') CCCATACCGACCATGACACC) и гладкомышечного α -актина (ACTA2-F (5'-3') CATCCGACCTTGCTAACGGA; ACTA2-2R (5'-3') GTCCAGAGCGACATAGCACA). Продукты ПЦР наносили на 2% агарозный гель, окрашивали бромидом этидия и визуализировали с помощью системы Gel Doc XR (Bio-Rad). В качестве внутреннего контроля использовали экспрессию гена домашнего хозяйства β -миоглобина.

2.17. Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. Данные представляли как $M \pm SD$. Различия считали достоверными при $P < 0,05$ (ANOVA).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования

Ранее другими авторами было показано, что при переводе в культуру как взрослых, так и неонатальных КМЦ происходит перестройка их сократительного аппарата (см. Литературный обзор). Однако в литературе отсутствует подробное описание этого процесса. Кроме того, метод получения культуры КМЦ может влиять на характер и сроки перестройки. В связи с этим в настоящей работе необходимо было охарактеризовать организацию сократительных структур КМЦ на разных сроках их длительного культивирования и определить ключевые стадии процесса перестройки сократительного аппарата для используемой первичной культуры неонатальных КМЦ крыс. Поскольку сократительные системы клеток основаны на актиновых микрофиламентах, для оценки организации сократительного аппарата проводили флуоресцентный анализ клеток, окрашенных родамин-фаллоидином, который выявляет все полимерные актиновые структуры.

В процессе культивирования КМЦ наблюдались разнообразные варианты организации структур их сократительного аппарата. Однако на каждом конкретном сроке выявлялось от 75 до 95% клеток с одинаковым типом организации их сократительных структур. Такой тип организации считали характерным для данного срока культивирования.

На всех сроках культивирования жизнеспособность клеток составляла более 80%.

Свежевыделенные КМЦ оставались в течение первых суток в суспензии. Они имели характерную палочковидную форму. Прикрепление клеток к подложке начиналось примерно на вторые сутки культивирования, при этом КМЦ сохраняли палочковидную или полигональную форму. Наблюдалось появление небольших псевдоподий, которые, вероятно,

соответствовали участкам прикрепления клеток к подложке. На 2-3 сутки культивирования КМЦ начинали спонтанно сокращаться. В клетках выявлялась выраженная поперечная исчерченность, которая обеспечивается регулярной организацией миофибрилл (см. Рис. 1, Литературный обзор). Миофибриллы заполняли фактически весь объем клеток и располагались вдоль главной оси (Рис. 3, а). При этом наблюдалось совпадение исчерченности большинства миофибрилл от одного края клетки до другого таким образом, что миофибриллы формировали общий пласт одинаково ориентированных продольных пучков. Таким образом, КМЦ на 2-3 сутки культивирования в целом сохраняли типичную организацию сократительного аппарата, характерную для этих клеток в ткани сердца.

На 4-е сутки культивирования начиналась перестройка сократительного аппарата КМЦ. По краям клеток появлялись выраженные отростки, в области которых исчерченные структуры постепенно переходили в равномерно окрашенные пучки. Такие структуры по морфологии напоминали стресс-фибриллы, характерные для сократительных систем немышечных клеток (Рис. 3, б). Несмотря на сохраняющиеся миофибриллы, большинство КМЦ на этом сроке утрачивало способность к сокращению.

На 5-6-е сутки культивирования лишь небольшие фрагменты миофибрилл сохранялись в центральной части КМЦ. Остальной объем клеток был заполнен неисчерченными структурами, напоминающими стресс-фибриллы немышечных клеток (Рис. 3, в). КМЦ на этом сроке распластывались и увеличивались в размере.

На 8-10-е сутки культивирования наблюдались максимальные изменения сократительного аппарата КМЦ. На этом сроке исчерченные миофибриллы полностью исчезали. Все тело клеток было заполнено беспорядочными или упорядоченными тяжами непрерывно окрашиваемых филаментов (Рис. 3, г). Такая организация напоминала сложную систему

цитоскелета в немышечных клетках. Описанное состояние сократительного аппарата сохранялось до 13 суток культивирования.

На 14-15-е сутки культивирования сократительный аппарат КМЦ все еще находился в перестроенном состоянии, однако наблюдалось появление бусинообразных структур, предшествующих формированию саркомеров миофибрилл (Рис. 3, д).

На 16-18-е сутки в центральной части клеток выявлялись заново образованные миофибриллы, ориентированные в основном радиально от центра клетки к периферии. Миофибриллы непосредственно переходили в стресс-фибриллоподобные структуры на периферии клеток. На данном этапе наблюдалось восстановление способности клеток к спонтанным сокращениям (Рис. 3, е).

К 20-22-м суткам культивирования можно было наблюдать фактически полное восстановление миофибрилярного аппарата КМЦ. Миофибриллы снова заполняли практически весь объем клеток (Рис. 3, ж). КМЦ на этом сроке интенсивно сокращались. Однако клетки с восстановленным сократительным аппаратом все же существенно отличались от свежевыделенных из такни КМЦ. Они были сильно увеличены в размере, распластаны и имели не типичную для КМЦ форму с отсутствием продольной оси и общего миофибрилярного пласта. Миофибриллы и их пучки наслаивались друг на друга под разными углами и обычно были направлены радиально от центра клетки к псевдоподиям. Клетки имели отростки, в которых сохранялись равномерно окрашиваемые актиновые структуры. Эти отростки, по всей видимости, соответствовали участкам прикрепления КМЦ к подложке. Вероятно, такая организация являлась оптимальной и единственной возможной для КМЦ в новых для них двумерных условиях культивирования и позволяла им удерживаться на подложке при поддержании интенсивной сократительной активности.

Таким образом, в процессе монослойного культивирования КМЦ наблюдались существенные изменения в организации их сократительного аппарата, которые заключались в постепенном преобразовании миофибрилл в структуры, напоминающие сократительные структуры немышечных клеток, и последующем восстановлении исходной миофибриллярной организации. Весь процесс от начала реорганизации сократительного аппарата КМЦ до его восстановления занимал примерно три недели. Для удобства дальнейшего изучения этого процесса мы выделили семь ключевых стадий перестройки сократительного аппарата КМЦ, каждой из которых соответствует конкретный временной диапазон.

В Таблице 1 приведены соответствующие сроки и состояние сократительного аппарата КМЦ для разных стадий перестройки.

Таблица 1. Стадии перестройки сократительного аппарата КМЦ в процессе культивирования.

Стадия	Сутки культивирования	Организация сократительного аппарата КМЦ
1	2-3	Исходная организация; сохраненный миофибриллярный аппарат
2	4	Начало перестройки; появление неисчерченных структур на периферии
3	5-7	Частичная перестройка; фрагменты миофибрилл сохраняются только в центральной части клеток
4	8-13	Полная перестройка; миофибриллы полностью замещаются стресс-фибриллоподобными структурами
5	14-15	Предшествующий восстановлению этап; появление бусинообразных структур, предшествующих формированию миофибрилл
6	16-18	Начало восстановления; фрагменты миофибрилл появляются в центральной части клеток
7	19-22	Полное восстановление; миофибриллы заполняют фактически весь объем клеток, неисчерченные структуры сохраняются только в отростках

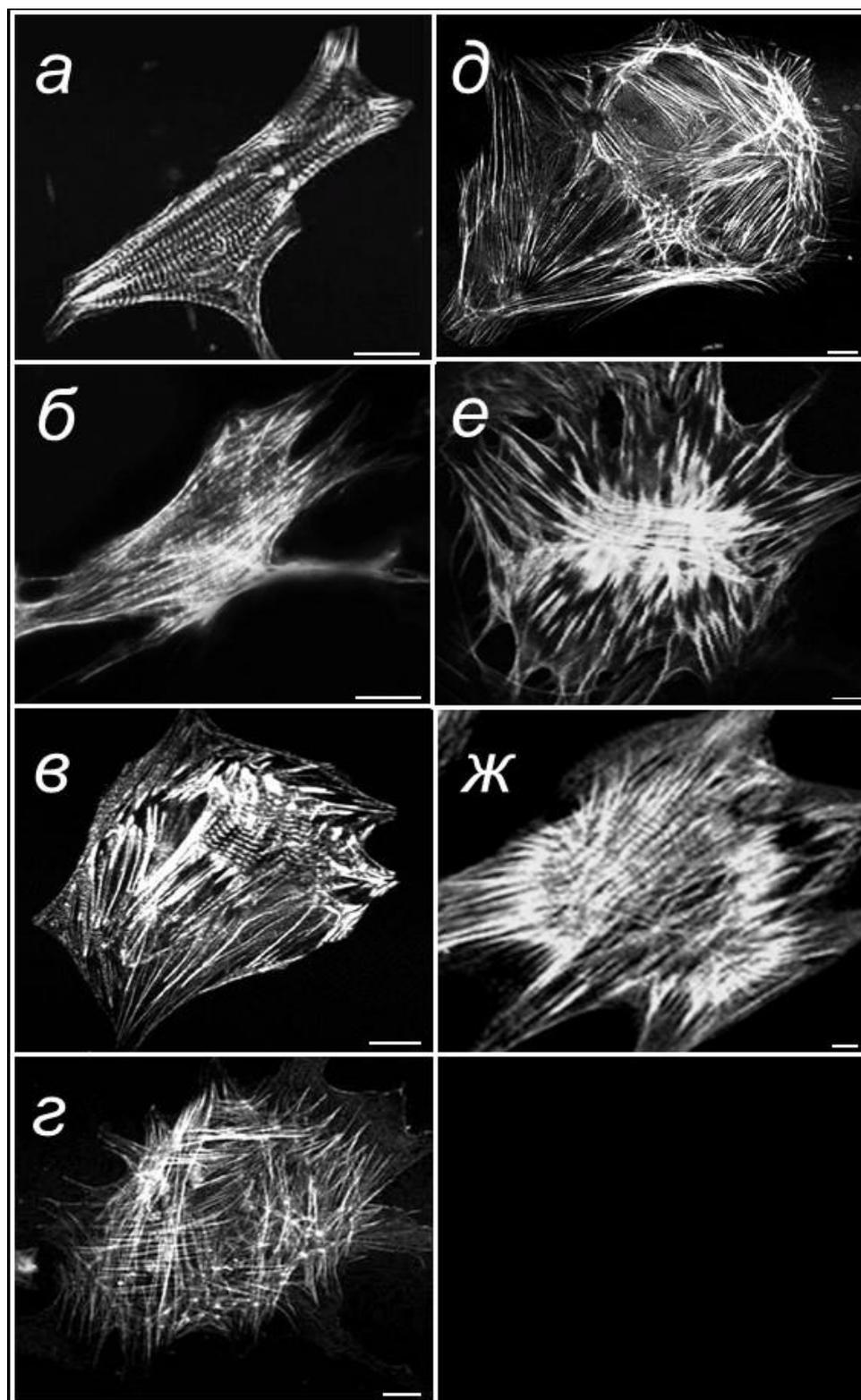


Рис. 3. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования.

Представлены фотографии кардиомиоцитов на разных сроках культивирования, соответствующих стадиям перестройки их сократительного аппарата. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. *а* – Стадия 1; *б* – Стадия 2; *в* – Стадия 3; *г* – Стадия 4; *д* – Стадия 5; *е* – Стадия 6; *ж* – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

Во всех экспериментах, проведенных на отдельных культурах, наблюдалась одинаковая динамика перестроек сократительного аппарата КМЦ. Сроки, соответствующие изменениям в организации сократительного аппарата, находились в пределах описанных диапазонов для всех исследуемых культур. В целом, описанные нами перестройки согласуются с данными, приведенным в литературе (Борисов и др., 1989; Nag et al., 1996; Messerli et al., 1993).

В настоящей работе получение чистой культуры КМЦ с отсутствием значимого количества других клеток сердца являлось принципиальным моментом. В связи с этим для остановки пролиферации оставшихся фибробластов в культуральную среду добавляли ингибитор пролиферации цитозин-арабинозид (см. Материалы и методы). Поскольку действие указанного агента на сократительную систему КМЦ ранее не исследовалось, необходимо было исключить его существенное влияние на перестройку сократительного аппарата КМЦ в культуре. В результате параллельного культивирования клеток в присутствии и в отсутствие цитозин-арабинозида было показано, что указанный агент не является причиной перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре и не влияет на общее время и характер перестройки (Бильдюг и Пинаев, 2013; данные не представлены). Все дальнейшие эксперименты в настоящей работе проводились на первичной культуре КМЦ с добавлением цитозин-арабинозида.

3.2. Влияние отдельных белков внеклеточного матрикса на перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре

Поскольку перестройка сократительного аппарата КМЦ не происходит в нормальной ткани сердца, было сделано предположение, что она может быть вызвана потерей клетками их естественного микроокружения, в частности, ВКМ. Изменение организации сократительных структур под влиянием ВКМ показано для многих немышечных клеток, однако данных о влиянии ВКМ на сократительную систему мышечных клеток крайне мало. В

связи с этим необходимо было проверить, может ли ВКМ оказывать влияние на организацию сократительного аппарата КМЦ. Для этого клетки культивировали на отдельных белках ВКМ. Для эксперимента в качестве подложки были выбраны ламинин и фибронектин, поскольку известно, что эти белки влияют на пространственную организацию сократительных структур в немышечных клетках (Арэ и др., 1999; Петухова и др., 2004).

На сроке, соответствующем Стадии 1 перестройки сократительного аппарата контрольных КМЦ (КМЦ, культивируемых без добавления белков ВКМ), клетки на фибронектине сохраняли миофибрилярную организацию. При этом выявлялась выраженная поперечная исчерченность, миофибриллы заполняли фактически весь объем клеток и располагались вдоль главной оси (Рис 4, а), что соответствовало организации сократительного аппарата в контрольных клетках на этом сроке. На сроке, соответствующем Стадии 3 перестройки, миофибриллы все еще занимали значительный объем клеток и частично сохраняли упорядоченность в отличие от контрольных клеток, в которых на этом сроке сохранялись лишь небольшие фрагменты миофибрилл. На периферии клеток исчерченные структуры постепенно переходили в равномерно окрашенные филаменты (Рис. 4, б).

На сроке, соответствующем Стадии 4, тоже наблюдались максимальные изменения сократительного аппарата клеток, как и в случае контрольных КМЦ. Все тело клеток было заполнено неисчерченными структурами с полным отсутствием миофибрилл (Рис. 4, в).

Однако на сроке, соответствующем Стадии 5, в КМЦ уже наблюдалось большое количество заново образованных миофибрилл, которые заполняли основной объем клеток. При этом на периферии еще сохранялись стресс-фибриллоподобные структуры, заходящие в псевдоподии. Такое состояние соответствовало фактически полному восстановлению сократительного аппарата КМЦ (Рис. 4, г). На сроке, соответствующем Стадии 7, клетки в целом не отличались от контрольных (Рис. 4, д).

Таким образом, при культивировании КМЦ на фибронектине происходило сокращение периода перестройки их сократительного аппарата.

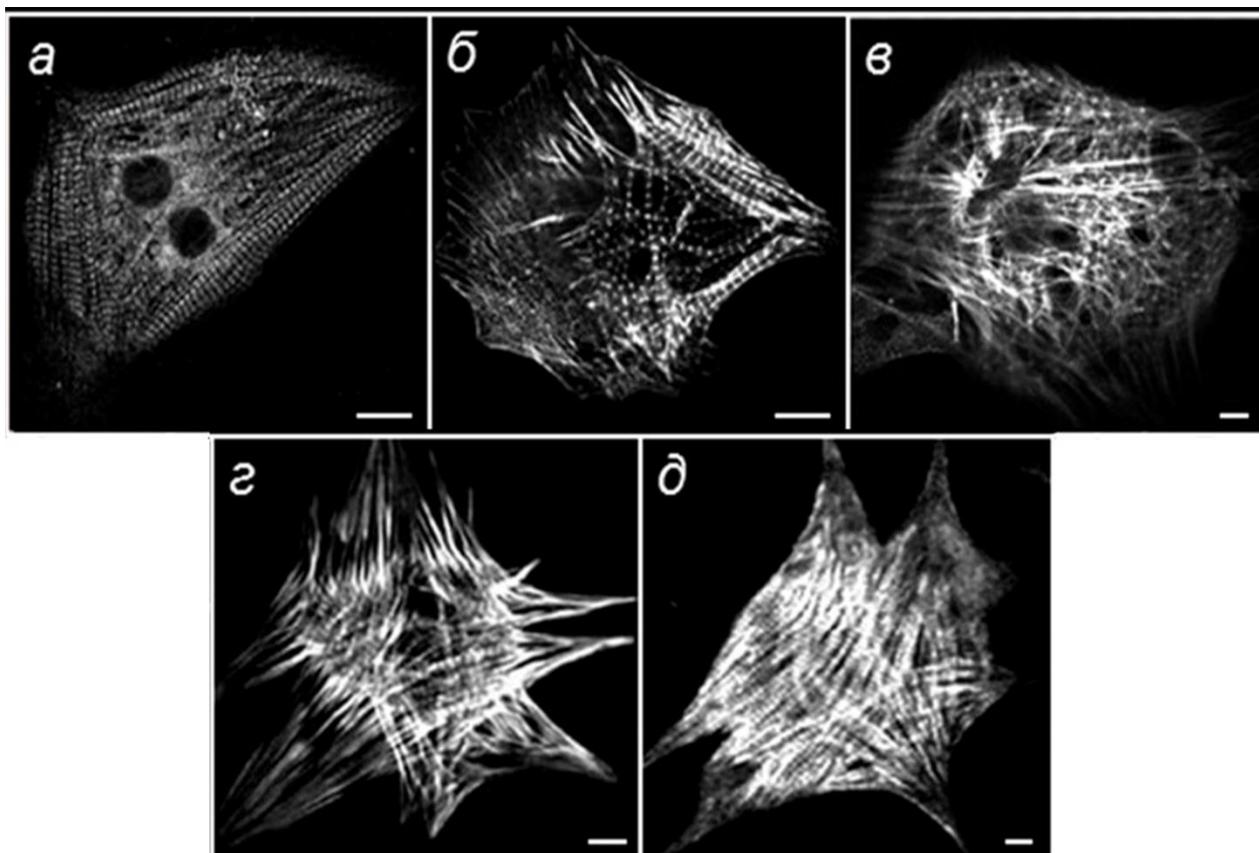


Рис. 4. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на фибронектине.

Представлены фотографии кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на фибронектине. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в отсутствие белков внеклеточного матрикса. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. *а* – Стадия 1; *б* – Стадия 3; *в* – Стадия 4; *г* – Стадия 5; *д* – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

При культивировании КМЦ на ламинине 2/4 происходило такое же сокращение периода перестройки их сократительного аппарата, как и в случае культивирования КМЦ на фибронектине. Однако в случае ламинина морфология клеток на всех исследуемых сроках отличалась от контрольных КМЦ (Рис. 5, а-д). В целом, клетки имели более вытянутую форму по сравнению с контрольными КМЦ. На сроке, соответствующем Стадии 4, в

клетках наблюдалось появление выраженной широкой ламеллы. Такие КМЦ напоминали немые мышечные клетки, культивируемые на ламинине 2/4 (Арэ и др., 1999, Петухова и др., 2004). Эти данные указывают на общие принципы регуляции сократительной системы КМЦ и цитоскелета немые мышечных клеток со стороны ВКМ. На поздних стадиях КМЦ приобретали характерную звездообразную форму с длинными отростками.

Таким образом, было показано, что белки ВКМ влияют на организацию сократительного аппарата культивируемых КМЦ, и их присутствие сокращает период перестройки сократительного аппарата (Бильдюг и Пинаев, 2013а).

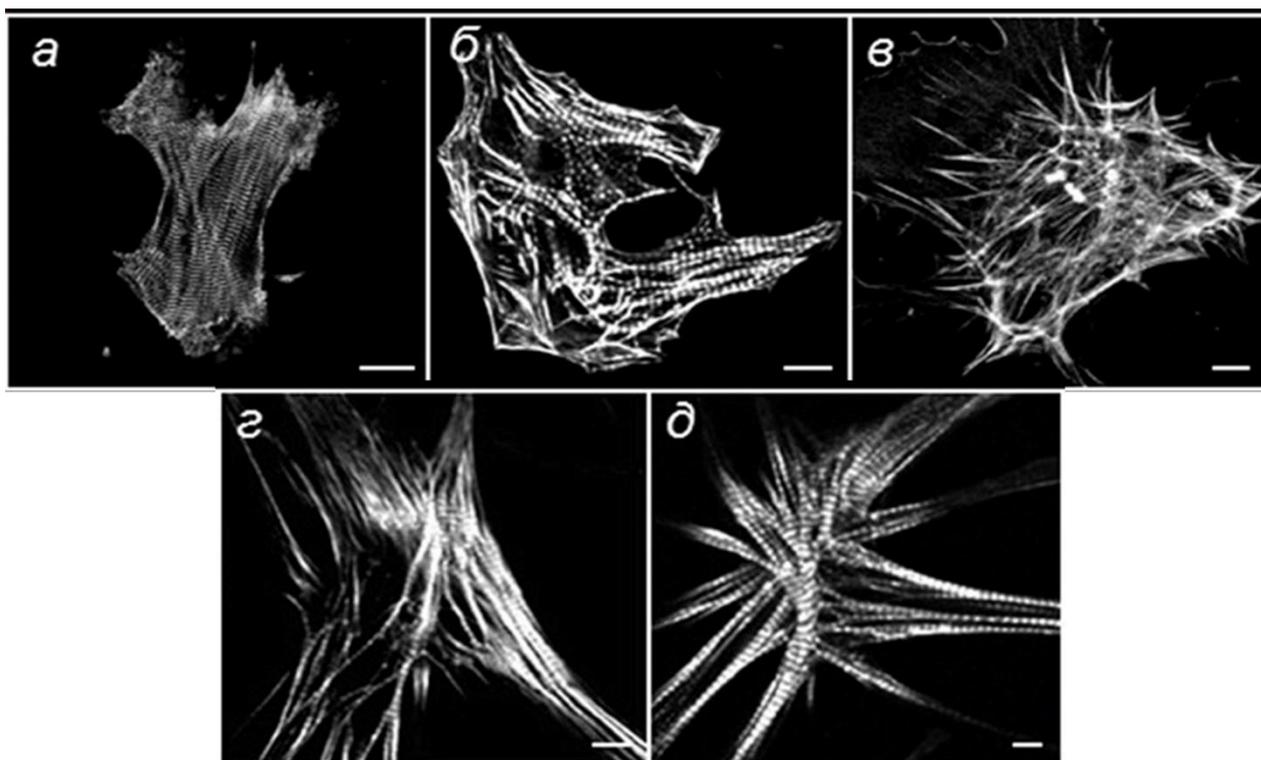


Рис. 5. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на ламинине 2/4.

Представлены фотографии кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на ламинине 2/4. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в отсутствие белков внеклеточного матрикса. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. *а* – Стадия 1; *б* – Стадия 3; *в* – Стадия 4; *г* – Стадия 5; *д* – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

3.3. Синтез внеклеточного матрикса кардиомиоцитами в культуре

Если отсутствие ВКМ может являться причиной перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре, то его восстановление должно объясняться появлением необходимых компонентов ВКМ. В настоящей работе использовалась чистая культура КМЦ, не содержащая немышечных клеток, которые являются продуцентами ВКМ в ткани. В связи с этим мы предположили, что КМЦ в культуре способны сами нарабатывать компоненты ВКМ для возможности восстановления исходной организации их сократительного аппарата и возвращения к сократительной активности. Поскольку способность КМЦ синтезировать белки ВКМ ранее не была описана, необходимо было проверить наличие ВКМ в культуре КМЦ на разных сроках культивирования. Пробы ВКМ получали с помощью адаптированного для КМЦ метода (см. Материалы и методы). На Рис. 6 показаны результаты электрофоретического анализа полученных проб. Было выявлено присутствие ВКМ в культуре КМЦ на сроках, соответствующих разным стадиям перестройки их сократительного аппарата. Белковый состав ВКМ фактически не различался на разных сроках (Рис.6), однако наблюдалось изменение общего количества белков, а также соотношения между некоторыми из них. Общее количество белков ВКМ постепенно увеличивалось от Стадии 1 к Стадии 5 перестройки сократительного аппарата КМЦ, при этом на Стадии 5, которая предшествует восстановлению исходной организации сократительного аппарата и возобновлению сокращений в культуре, наблюдалось максимальное накопление белков. На Стадии 7, соответствующей восстановлению миофибриллярного аппарата, наблюдалось снижение общего количества ВКМ (Рис. 6).

Таким образом, впервые показано, что КМЦ синтезируют собственный ВКМ в процессе культивирования (Бильдюг и Пинаев, 2013а).

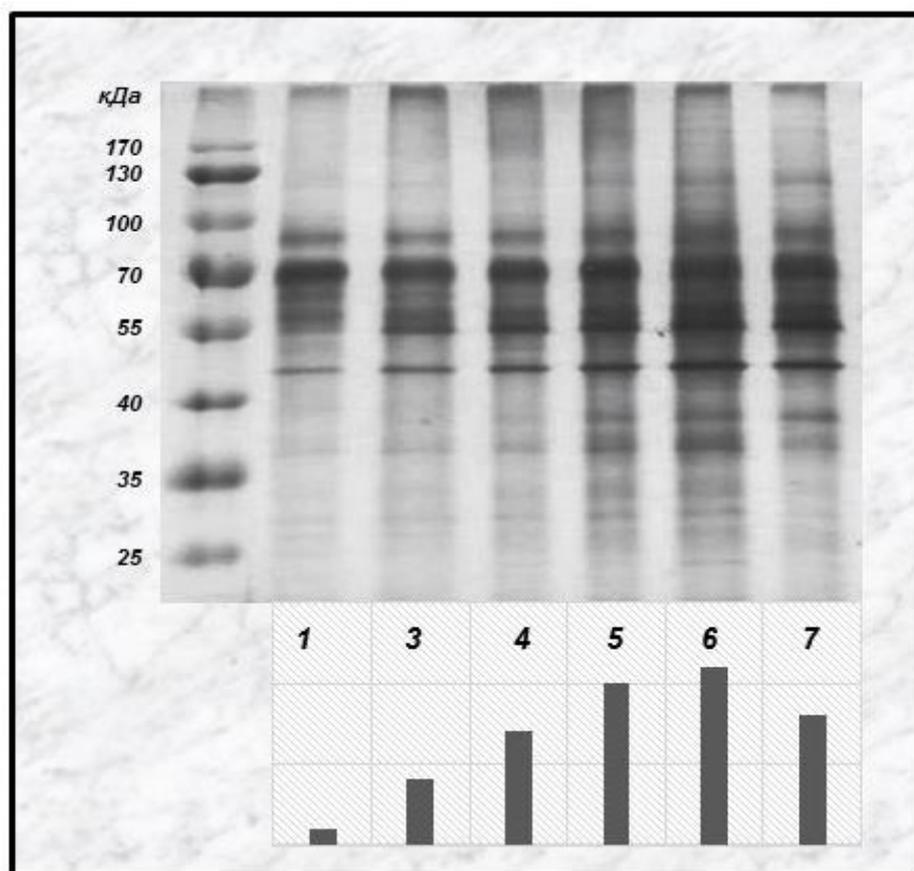


Рис. 6. Синтез внеклеточного матрикса кардиомиоцитами в культуре.

Представлены результаты электрофоретического анализа наработанного кардиомиоцитами внеклеточного матрикса на Стадиях 1, 3, 4, 5, 6 и 7 перестройки их сократительного аппарата. Числовые значения слева соответствуют положению маркеров молекулярного веса (кДа). Результаты денситометрии представлены в виде гистограммы.

3.4. Продукция ламинина и коллагена кардиомиоцитами в культуре

Для того чтобы охарактеризовать наработанный КМЦ ВКМ, необходимо было проверить наличие в нем основных компонентов, характерных для ВКМ сердца – коллагена I и ламинина. Для выявления динамики указанных белков в процессе культивирования КМЦ проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга на сроках, соответствующих разным стадиям перестройки сократительного аппарата КМЦ. С помощью антител, специфичных к ламинину, были выявлены фрагменты этого белка в области между 70 и 55 кДа на разных стадиях перестройки сократительного аппарата КМЦ. Поскольку условия проведения электрофореза и Вестерн-блоттинга

полностью соответствовали условиям для анализа как полноразмерных белков ВКМ, так и их фрагментов, мы считаем, что выявление фрагментов ламинина в ВКМ от кардиомиоцитов объясняется фрагментацией полноразмерных белков в процессе получения проб ВКМ (см. Материалы и методы). Контроль переноса белков, а также высокая специфичность антител (см. Материалы и методы) исключает возможность потери полноразмерного ламинина в процессе его выявления. В связи с этим мы считаем, что результаты выявления фрагментов ламинина полностью отражают динамику накопления ламинина в ВКМ, нарабатанном КМЦ.

По результатам Вестерн-блоттинга наблюдалось постепенное повышение количества ламинина от Стадии 3, соответствующей началу перестройки сократительного аппарата КМЦ, к Стадии 4 (стадии максимальной перестройки) и от Стадии 4 к Стадии 5, которая предшествует началу восстановления миофибриллярного аппарата (Рис. 7).

С помощью антител, специфичных к коллагену I типа, были выявлены фрагменты этого белка в области между 55 и 35 кДа на разных стадиях перестройки сократительного аппарата КМЦ. Как и в случае ламинина, мы считаем, что образование фрагментов коллагена объясняется фрагментацией полноразмерного белка в процессе получения проб ВКМ, и что результаты выявления фрагментов коллагена полностью отражают динамику накопления этого белка в ВКМ, нарабатанном КМЦ. С помощью Вестерн-блоттинга была выявлена сходная с ламинином динамика накопления коллагена от Стадии 3 к Стадии 4 и от Стадии 4 к Стадии 5 перестройки сократительного аппарата КМЦ. Максимальная продукция коллагена (Стадия 5) предшествовала началу восстановления миофибриллярного аппарата. Анализ коллагена проводили также на последней стадии перестройки (Стадии 7), когда миофибриллярный аппарат клеток восстановлен. На этом сроке наблюдалось небольшое снижение количества коллагена (Рис. 8).

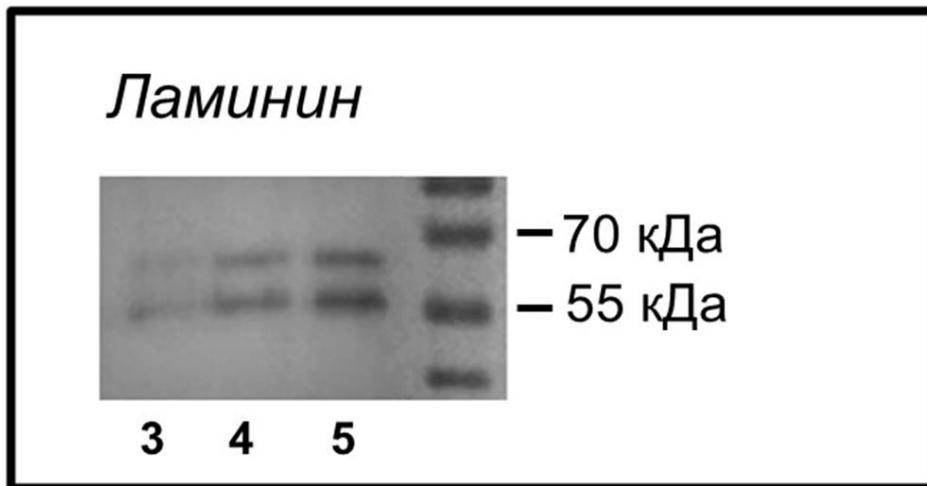


Рис. 7. Синтез ламинина кардиомиоцитами в культуре.

Представлены результаты анализа внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами, с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против ламинина. Антитела выявили фрагменты ламинина в области между 70 и 55 кДа на Стадиях 3, 4 и 5 перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов. Числовые значения соответствуют положению маркеров молекулярного веса.

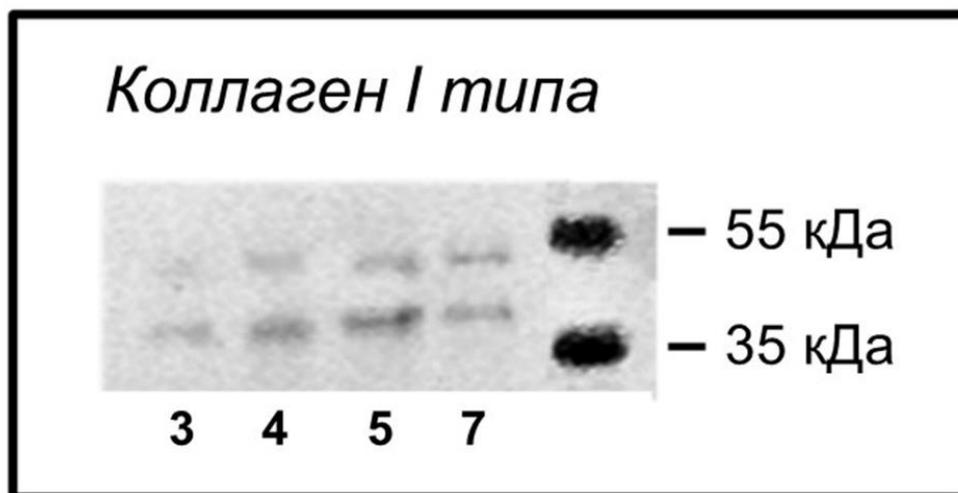


Рис. 8. Синтез коллагена кардиомиоцитами в культуре.

Представлены результаты анализа внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами, с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против коллагена I типа. Антитела выявили фрагменты коллагена в области между 55 и 35 кДа на Стадиях 3, 4, 5 и 7 перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов. Числовые значения соответствуют положению маркеров молекулярного веса.

3.5. Выявление коллагеновых структур во внеклеточном матриксе кардиомиоцитов

Для оценки распределения коллагена во внеклеточном пространстве проводили окраску культуры КМЦ с помощью антител против коллагена I типа без предварительной обработки клеток реагентом, обеспечивающим проникновение антител внутрь клеток. Для исключения прокрашивания антителами внутриклеточного коллагена в качестве контроля использовали препараты ВКМ, окрашенные теми же антителами (см. Материалы и методы). Результаты окраски препаратов ВКМ на различных сроках культивирования были аналогичны результатам окраски культуры с клетками на соответствующих сроках. Однако в случае использования культуры с клетками интенсивность окраски была выше и выявляемые структуры выглядели более отчетливыми. В связи с этим для оценки коллагеновых структур во внеклеточном пространстве использовали изображения, полученные на культуре с клетками.

На сроке, соответствующем Стадии 3 перестройки сократительного аппарата КМЦ, наблюдали диффузные включения коллагена во внеклеточном пространстве (Рис. 9, а). На Стадии 4 выявлялись структуры, включающие короткие коллагеновые фибриллы (Рис. 9, б). На Стадии 5 наблюдали образование выраженного коллагенового матрикса во внеклеточном пространстве (Рис. 9, в).

Таким образом, КМЦ в процессе монослойного культивирования синтезируют собственные белки внеклеточного матрикса коллаген и ламинин, причем синтез этих белков коррелирует со стадиями перестройки их сократительного аппарата (Бильдюг и Пинаев, 2013а; Bilydyug et al., 2016).

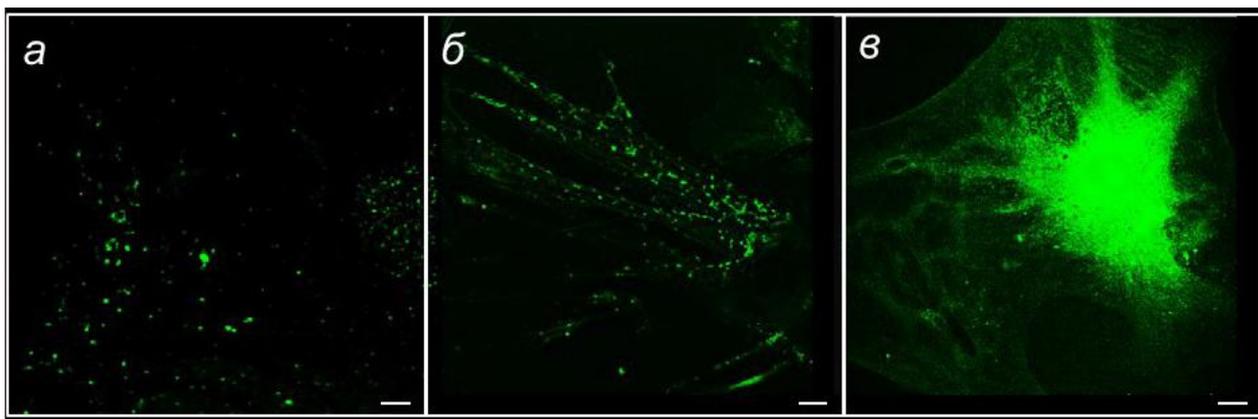


Рис. 9. Внеклеточный коллаген в культуре кардиомиоцитов на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата.

Представлены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания внеклеточного коллагена I в культуре кардиомиоцитов на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата.

a – Стадия 3; *б* – Стадия 4; *в* – Стадия 5. Масштабные отрезки – 10 мкм.

3.6. Матриксные металлопротеиназы на разных сроках культивирования кардиомиоцитов

ВКМ в ткани сердца является крайне динамичной системой и постоянно подвергается ремоделированию ММП. В сердечной ткани ключевую роль в синтезе ММП играют фибробласты (Herron et al., 1986). Кроме того, ММП синтезируются эндотелиальными и гладкомышечными клетками (Spinale et al., 1993; Chapman et al., 2003; Camelliti et al., 2005). Однако на сегодняшний день существует крайне мало литературных данных, описывающих продукцию ММП кардиомиоцитами, и полностью отсутствуют данные, указывающие на секрецию КМЦ матриксных металлопротеиназ в ВКМ. Поскольку в чистой культуре КМЦ отсутствуют немusечные клетки, необходимо было исследовать способность КМЦ продуцировать и секретировать собственные ММП в процессе культивирования. Поскольку необходимо было оценить наличие ММП во внеклеточном пространстве, в качестве источника ММП использовали не клетки, а среду, кондиционированную КМЦ. Для определения ММП на сроках, соответствующих разным стадиям перестройки сократительного

аппарата КМЦ, использовали метод зимографии с желатином, основанный на способности ММП к ренатурации после SDS-ПААГ-электрофореза, приводящей к расщеплению желатина в той зоне геля, в которой находится ММП. На всех исследуемых сроках была обнаружена желатиназная активность в области между 100 и 60 кДа (Рис. 10, а), что соответствует протеолитической активности MMP-9 и MMP-2 (Woessner, 1991; Werb and Alexander, 1993). Область 92 кДа соответствует ММП-9 (Woessner, 1991; Werb and Alexander, 1993). Наблюдалось небольшое повышение желатиназной активности в этой области от Стадии 3 к Стадии 4 перестройки (Рис. 10, б). Указанные сроки соответствуют реорганизации сократительного аппарата КМЦ в культуре, которая заключается в исчезновении миофибрилл и появлении структур немышечного типа. На Стадии 5, которая предшествует восстановлению сократительного аппарата КМЦ в культуре, и на Стадии 7, которая соответствуют полному восстановлению миофибриллярного аппарата КМЦ в культуре, наблюдалось снижение желатиназной активности в этой области (рис. 10, в).

Желатиназная активность в области 70–60 кДа соответствует активности ММП-2, неактивная форма которой (проММП-2) имеет молекулярную массу 72 кДа, а активированная форма – молекулярную массу 66 кДа (Dickson and Warburton, 1992). Желатиназная активность ММП-2 на всех исследуемых сроках культивирования значительно превышала контрольный уровень (Рис. 10, в). Наблюдалось постепенное повышение активности в данной области от Стадии 3 к Стадии 4 и от Стадии 4 к Стадии 5, которая предшествуют восстановлению сократительного аппарата КМЦ в культуре. На Стадии 7, соответствующей восстановлению миофибриллярного аппарата КМЦ, активность в данной области снижалась (Рис. 10, в). Повышение и снижение уровня ММП-2 коррелировало с количеством коллагена в ВКМ, синтезированном КМЦ.

Таким образом, КМЦ в процессе культивирования синтезируют внеклеточные матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9, причем количество указанных металлопротеиназ коррелирует со стадиями перестройки сократительного аппарата КМЦ (Бильдюг и др., 2015).

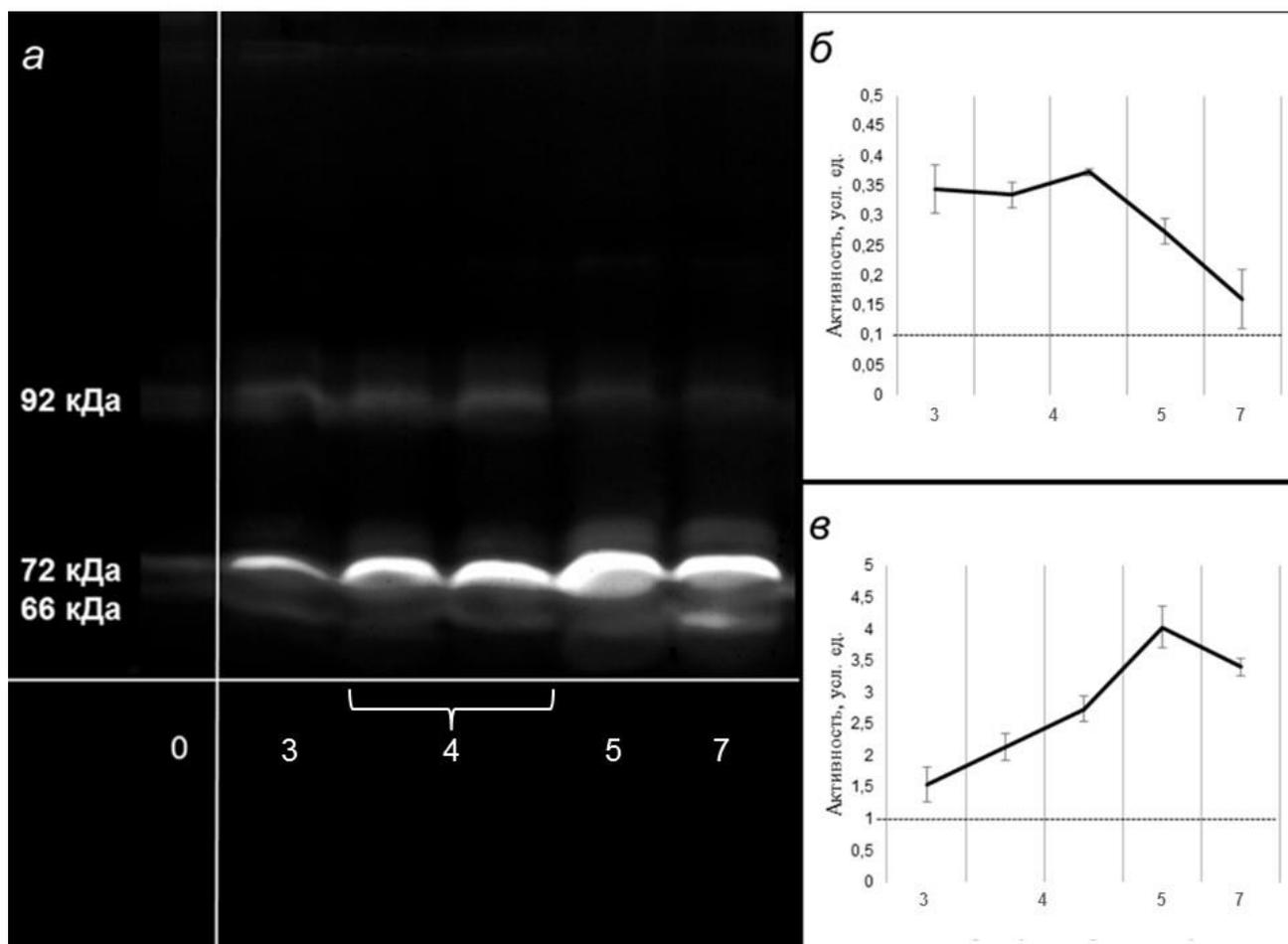


Рис. 10. Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 в культуре кардиомиоцитов.

a – Зимограмма среды, кондиционированной кардиомиоцитами, на разных сроках перестройки их сократительного аппарата. Уровень ММП в контроле (в полной питательной среде для кардиомиоцитов до начала культивирования) соответствует точке 0. Молекулярные массы 92, 72 и 66 кДа соответствуют ММП-9, неактивной и активированной форме ММП-2 соответственно; *б* – усредненные результаты денситометрии зимограмм для ММП-9. Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-9; *в* – усредненные результаты денситометрии зимограмм для ММП-2. Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-2.

3.7. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании на матриксе от таких же кардиомиоцитов

Для того чтобы проверить, является ли ВКМ, наработанный самими КМЦ, достаточным для поддержания типичной организации их сократительного аппарата, свежевыделенные клетки наносили и культивировали на ВКМ, полученном от таких же КМЦ после их длительного культивирования (см. Материалы и методы).

Проводили анализ сократительных структур на сроках, соответствующих разным стадиям перестройки сократительного аппарата контрольных КМЦ (Рис 11, а-д). На сроке, соответствующем Стадии 3, все еще сохранялась миофибриллярная организация, неисчерченные структуры выявлялись только на периферии клеток (Рис. 11, б). На сроке, соответствующем Стадии 4, сократительный аппарат полностью перестраивался (Рис. 11, в), но уже на Стадии 5 происходило полное восстановление исходной организации сократительного аппарата КМЦ (Рис.11, г).

Таким образом, при культивировании КМЦ на матриксе, синтезированном такими же кардиомиоцитами, сокращался период перестройки их сократительного аппарата (Бильдюг и Пинаев, 2013а).

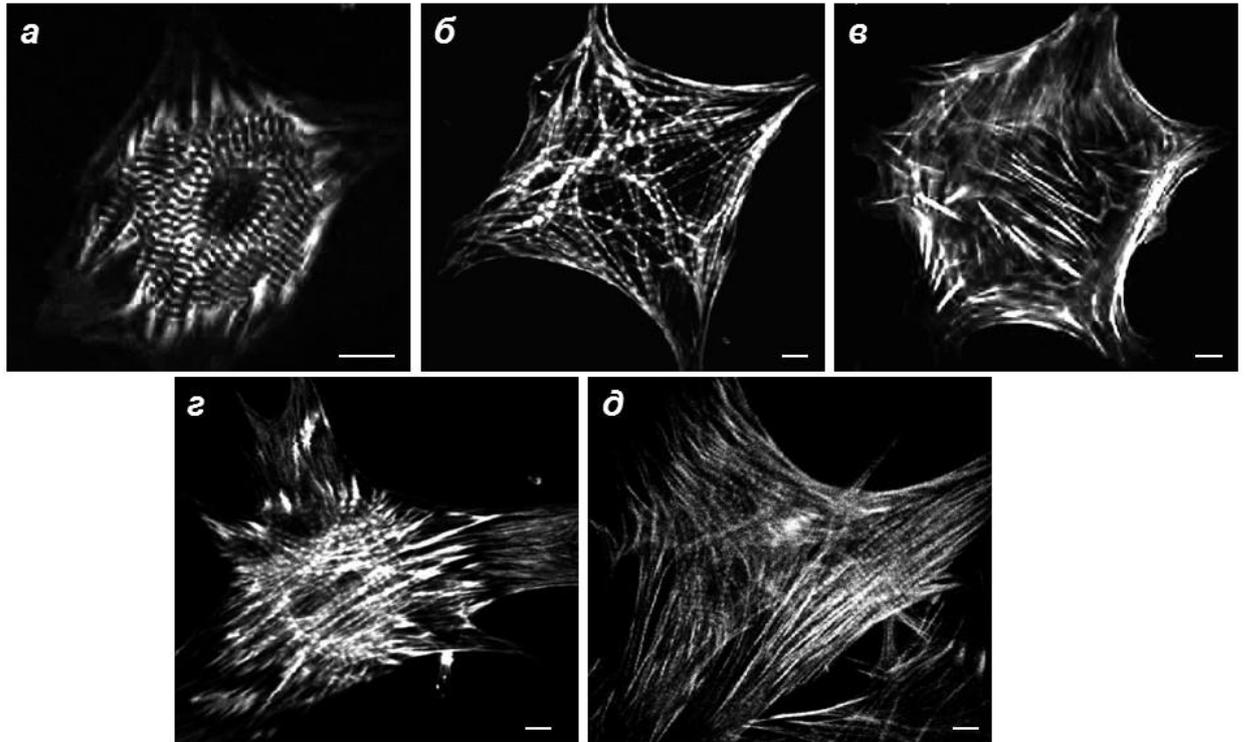


Рис. 11. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на матриксе, наработанном такими же кардиомиоцитами.

Представлены фотографии кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на матриксе, наработанном такими же кардиомиоцитами. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в отсутствие белков внеклеточного матрикса. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. *а* – Стадия 1; *б* – Стадия 3; *в* – Стадия 4; *г* – Стадия 5; *д* – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

3.8. Сравнение внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами, и матрикса, наработанного сердечными фибробластами

Поскольку при культивировании КМЦ на матриксе, наработанном такими же КМЦ, не наблюдалось непрерывного поддержания исходной организации их сократительного аппарата, было сделано предположение, что наработанный КМЦ матрикс может отличаться от матрикса в ткани сердца. Основными продуцентами ВКМ в сердечной ткани являются фибробласты. В связи с этим было решено провести сравнение ВКМ, наработанного КМЦ, и ВКМ, наработанного сердечными фибробластами. С помощью электрофоретического анализа были показаны различия в белковом составе и соотношении некоторых белков (Рис. 12). В частности, в матриксе, полученном от фибробластов, относительное количество белка с молекулярной массой более 170 кДа было значительно выше, чем в матриксе от КМЦ, в котором этот белок практически не выявлялся (Рис. 12). С помощью масс-спектрометрического анализа было определено, что этот белок представляет собой фибронектин (Рис. 13).

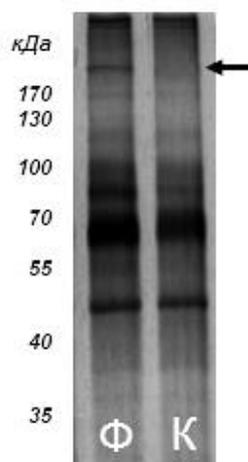


Рис. 12. Отличие внеклеточного матрикса, наработанного сердечными фибробластами, от матрикса, наработанного кардиомиоцитами.

Представлены результаты сравнения с помощью электрофоретического анализа белков внеклеточного матрикса, наработанного сердечными фибробластами (Ф), и внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами (К). Стрелка указывает на область основного отличия.

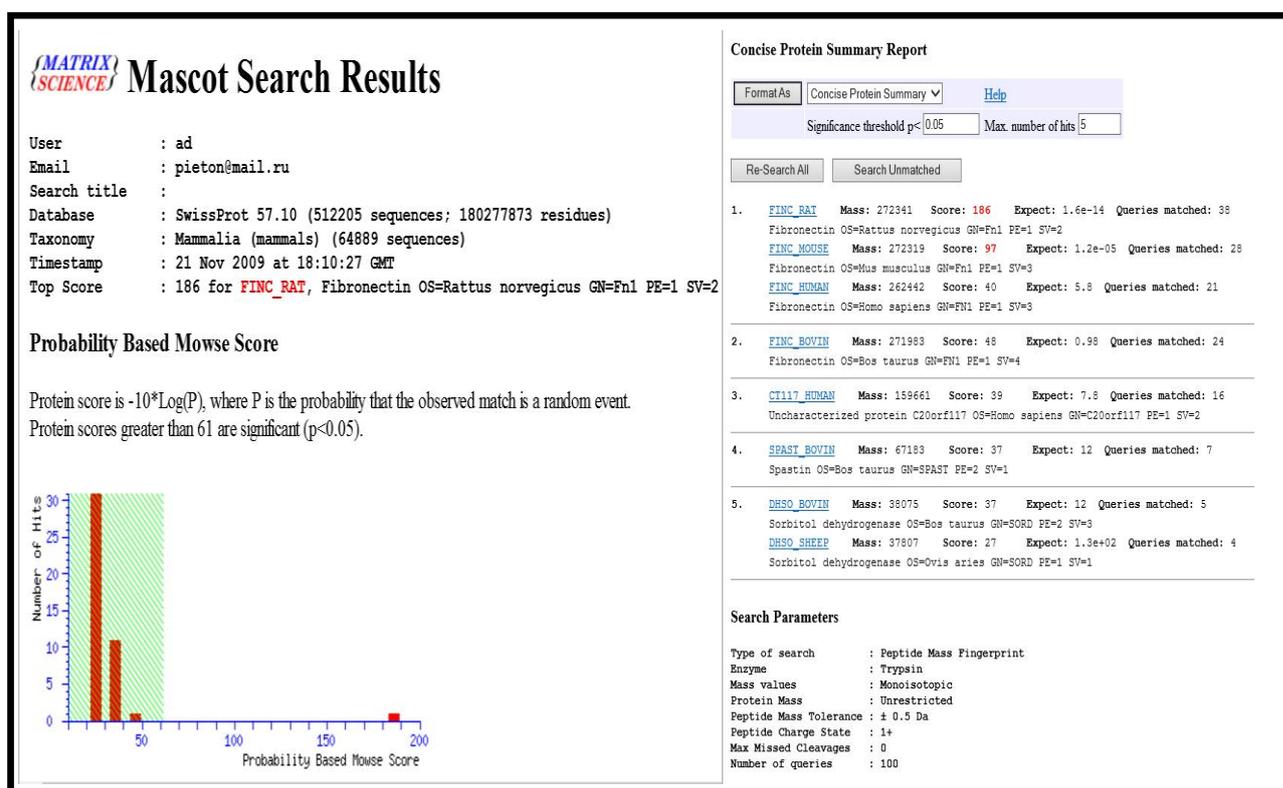


Рис. 13. Масс-спектрометрическое определение фибронектина.

Представлены результаты идентификации белка методом масс-спектрометрии. Данные обрабатывали с помощью программы Mascot (www.matrixscience.com). Идентифицируемый белок представляет собой крысиный фибронектин (Score 186).

3.9. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании на матриксе, наработанном сердечными фибробластами

Поскольку наблюдались различия между матриксом, наработанном КМЦ, и матриксом, наработанном фибробластами, было сделано предположение, что матрикс от сердечных фибробластов может являться более подходящим для поддержания типичной организации сократительного аппарата КМЦ. В связи с этим КМЦ культивировали на ВКМ, наработанном сердечными фибробластами, и анализировали состояние их сократительной системы на разных сроках культивирования. Наблюдало такое же сокращение периода перестройки сократительного аппарата КМЦ, как и в случае их культивирования на матриксе от КМЦ (Рис.14, а-д).

Таким образом, при культивировании КМЦ на матриксе, наработанном сердечными фибробластами или такими же КМЦ, происходит сокращение периода перестройки сократительного аппарата, как и в случае их культивирования на отдельных белках ВКМ (Бильдюг и Пинаев, 2013а).

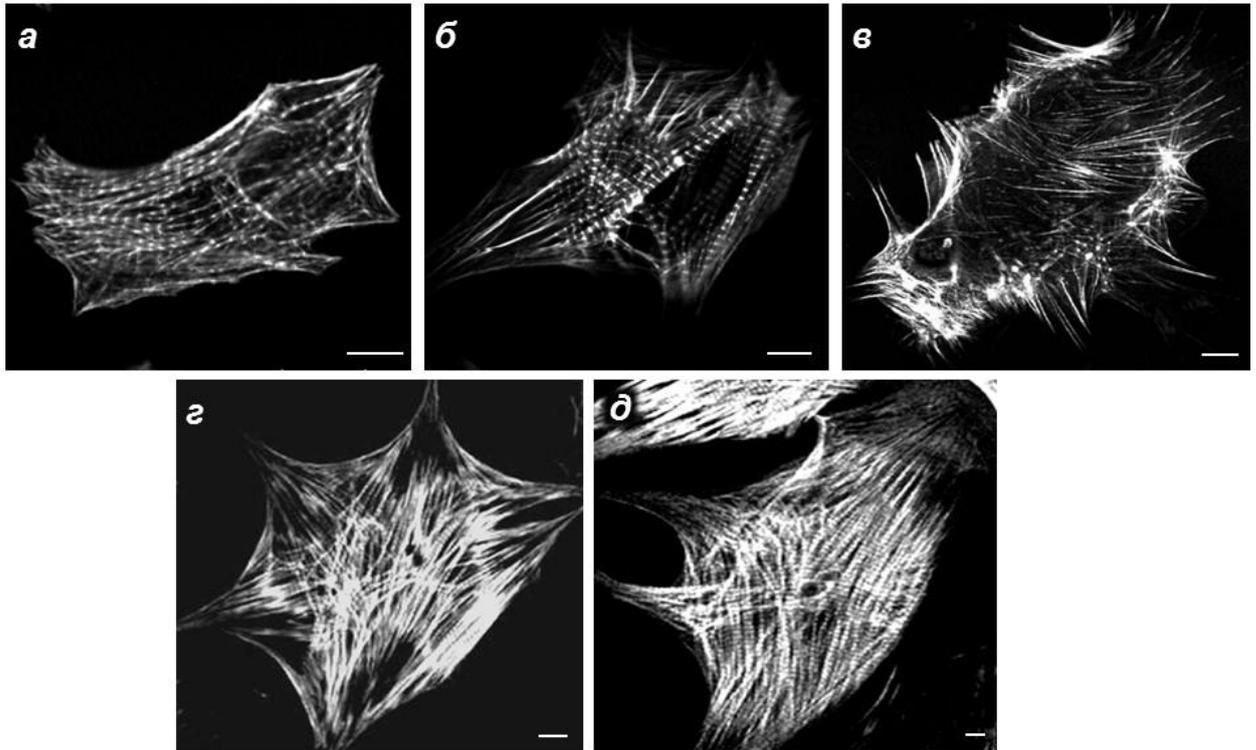


Рис. 14. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на матриксе, наработанном сердечными фибробластами.

Представлены фотографии кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на матриксе, наработанном сердечными фибробластами. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в отсутствие белков внеклеточного матрикса. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. *a* – Стадия 1; *б* – Стадия 3; *в* – Стадия 4; *г* – Стадия 5; *д* – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

3.10. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в кондиционированной среде от сердечных фибробластов

КМЦ в ткани взаимодействуют не только с матриксом, но и с растворимыми факторами микроокружения, которые синтезируются в первую очередь фибробластами. Чтобы оценить, могут ли растворимые факторы влиять на перестройку сократительного аппарата КМЦ, клетки культивировали в кондиционированной среде от сердечных фибробластов.

Анализ состояния сократительной системы КМЦ на разных сроках культивирования в этих условиях не выявил каких-либо изменений по сравнению с контрольными клетками (Рис. 15, а-д).

Таким образом, растворимые факторы, продуцируемые фибробластами, сами по себе не оказывают очевидного влияния на динамику сократительного аппарата КМЦ (Бильдюг и Пинаев, 2013а).

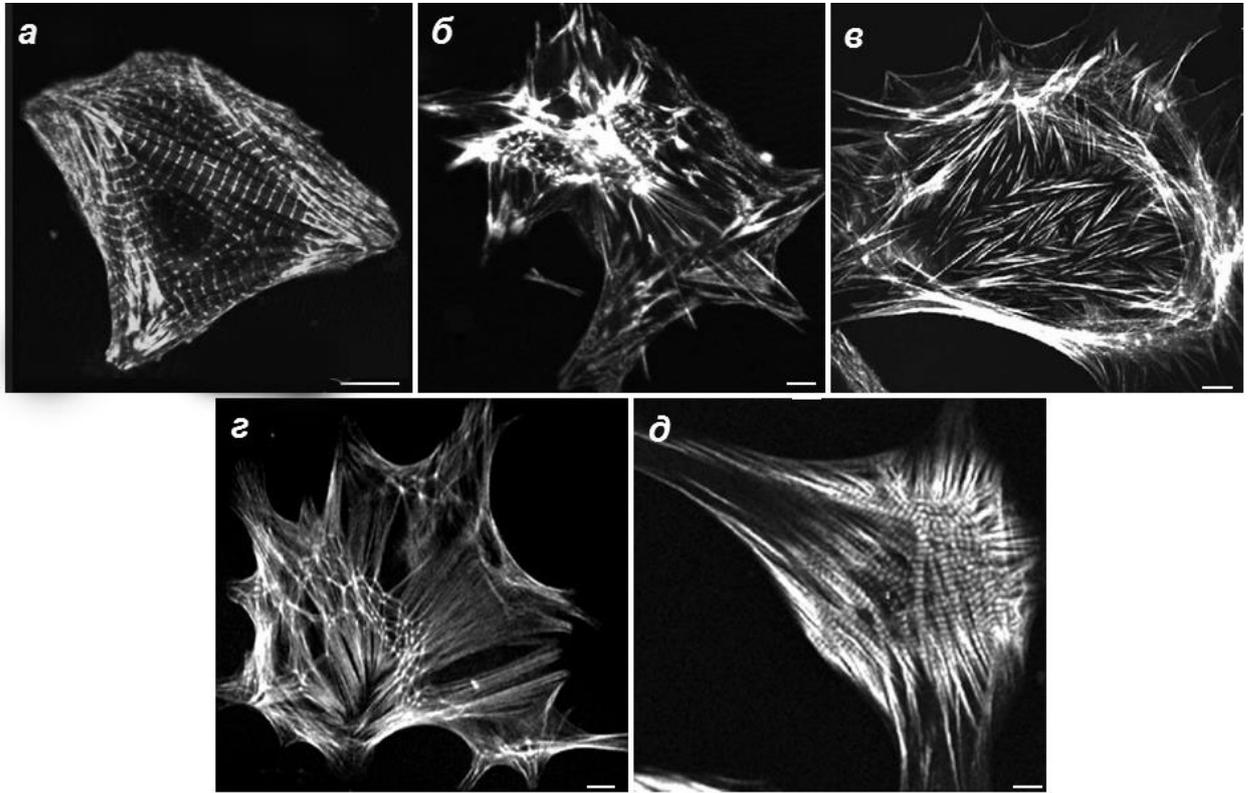


Рис. 15. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования в кондиционированной среде от сердечных фибробластов.

Представлены фотографии кардиомиоцитов на разных сроках культивирования в кондиционированной среде от сердечных фибробластов. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в стандартных условиях. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. *а* – Стадия 1; *б* – Стадия 3; *в* – Стадия 4; *г* – Стадия 5; *д* – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

3.11. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в гелях с разной концентрацией коллагена

Несмотря на то что подтвердилось предположение о влиянии белков ВКМ на перестройку сократительного аппарата КМЦ, мы не наблюдали непрерывного поддержания миофибриллярной организации при использовании ВКМ от КМЦ или сердечных фибробластов в качестве подложки для культуры КМЦ. В связи с этим мы предположили, что для клеток может быть необходима трехмерная организация матрикса, которая больше соответствует условиям микроокружения в сердечной ткани, где клетки окружены ВКМ со всех сторон.

Поскольку основным компонентом ВКМ в нормальном сердце является коллаген I типа, мы решили исследовать динамику сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в трехмерных коллагеновых гелях.

Были получены гели с тремя близкими концентрациями коллагена, которые чаще всего используются для получения трехмерных систем культивирования клеток – 0,5, 1 и 1,5 мг/мл. Чтобы выбрать гели с оптимальной концентрацией, КМЦ помещали в разные гели и исследовали организацию их сократительных структур на сроке, соответствующем полной перестройке сократительного аппарата при их культивировании в двумерных условиях ВКМ (Стадии 4). На указанном сроке культивирования в коллагеновых гелях с концентрацией коллагена 0,5 мг/мл в КМЦ выявлялись исчерченные миофибриллы, которые занимали практически весь объем клеток, при этом миофибриллы были расположены под разными углами друг к другу (Рис. 16, а). Клетки имели полигональную форму с наличием многочисленных небольших отростков. При культивировании КМЦ в гелях с концентрацией коллагена 1 мг/мл на Стадии 4 КМЦ имели типичную палочковидную форму с отсутствием отростков (Рис. 16, б). Весь объем клеток был заполнен четко исчерченными миофибриллами. Для клеток на этом сроке была характерна продольная ориентация миофибрилл.

Миофибриллы преимущественно располагались параллельно друг другу, при этом наблюдали совпадение исчерченности большинства миофибрилл от одного края клетки до другого. При культивировании КМЦ в гелях с концентрацией коллагена 1,5 мг/мл на этой же стадии в клетках выявлялись поперечно-исчерченные миофибриллы, которые заполняли почти весь объем клеток, но располагались неупорядоченно (Рис. 16, в). Клетки имели полигональную форму с наличием небольших отростков. Во всех исследуемых гелях жизнеспособность клеток составляла 75-80% на всех сроках культивирования.

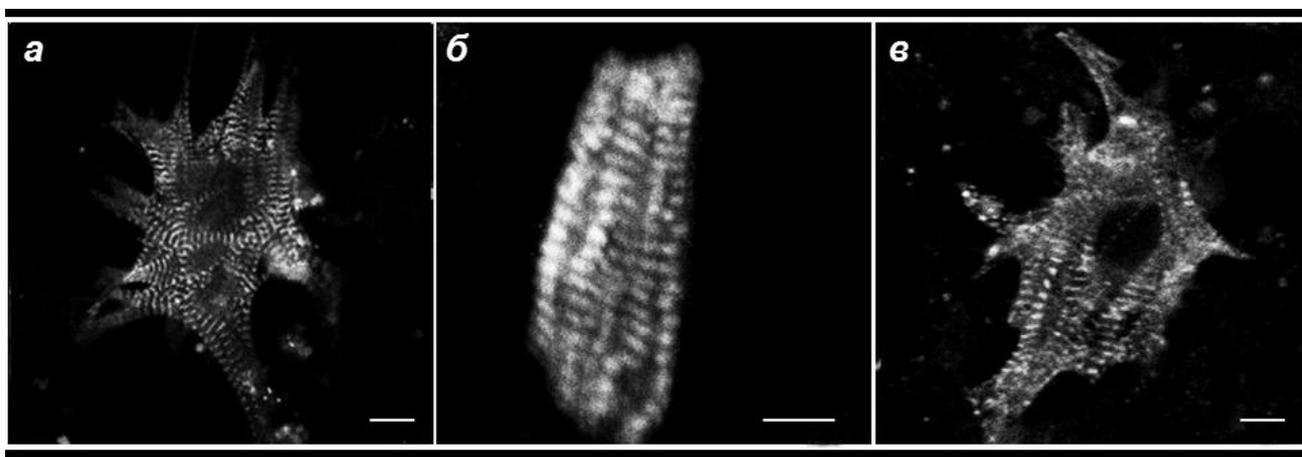


Рис. 16. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов в коллагеновых гелях разной плотности.

Представлены фотографии кардиомиоцитов в коллагеновых гелях с разной концентраций коллагена на сроке культивирования, соответствующем Стадии 4 перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в двумерных условиях. *а* – гель с концентрацией коллагена 0,5 мг/мл, *б* – гель с концентрацией коллагена 1 мг/мл; *в* – гель с концентрацией коллагена 1,5 мг/мл. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. Масштабные отрезки – 10 мкм.

Таким образом, несмотря на близкие концентрации гелей, организация сократительного аппарата КМЦ в них различалась. Из трех вариантов исследуемых гелей КМЦ сохраняли типичную морфологию и организацию сократительного аппарата только в гелях с концентрацией коллагена 1 мг/мл. В связи с этим для исследования динамики сократительного аппарата КМЦ в

процессе длительного культивирования в трехмерной системе использовали коллагеновые гели с указанной концентрацией (Бильдюг и др., 2014).

3.12. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования в коллагеновых гелях с концентрацией 1 мг/мл

При культивировании КМЦ в коллагеновых гелях с концентрацией коллагена 1 мг/мл на всех исследуемых сроках, которые соответствовали Стадиям 1, 3, 4, 5 и 7 перестройки сократительного аппарата КМЦ при их монослойном культивировании, морфология клеток и организация их сократительного аппарата оставалась одинаковой и соответствовала типичному состоянию, характерному для КМЦ в ткани сердца (Рис. 17, б-е). Подавляющее большинство клеток в гелях с указанной концентрацией коллагена имело характерную палочковидную форму с отсутствием отростков. Миофибриллы с четкой поперечной исчерченностью заполняли фактически весь объем клеток и располагались параллельно друг другу. Упорядоченная организация миофибрилл приводила к совпадению исчерченности у большинства миофибрилл от одного края клетки до другого и формированию общего миофибриллярного пласта (Рис. 17, а-е).

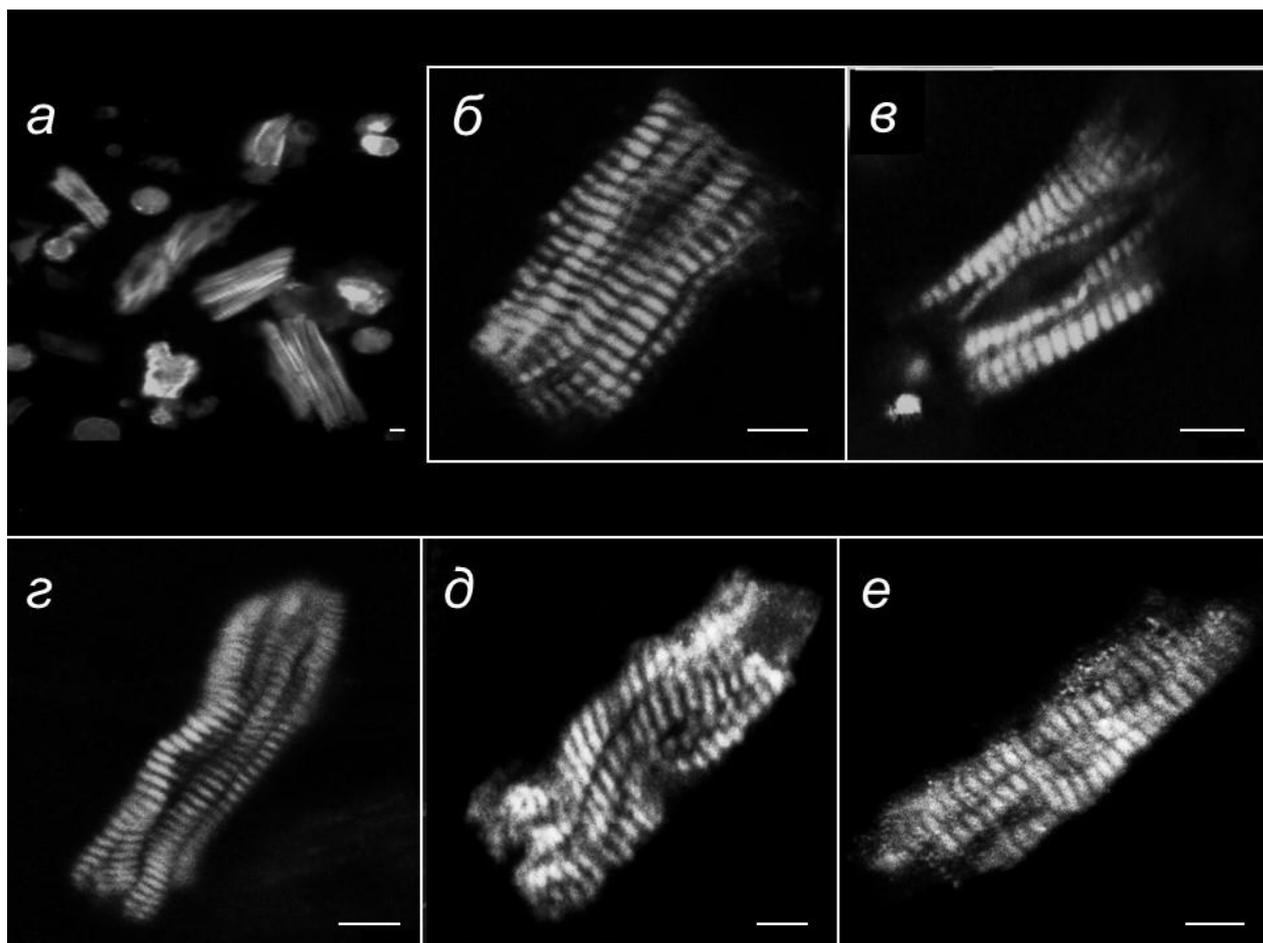


Рис. 17. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования в коллагеновом геле с концентрацией коллагена 1 мг/мл.

Представлены фотографии кардиомиоцитов на разных сроках культивирования в коллагеновом геле с концентрацией коллагена 1 мг/мл. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в двумерных условиях. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. *a* – общий вид клеток; *б* – Стадия 1; *в* – Стадия 3; *г* – Стадия 4; *д* – Стадия 5; *е* – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

Таким образом, при культивировании КМЦ в трехмерных коллагеновых гелях с концентрацией коллагена 1 мг/мл не происходила перестройка их сократительного аппарата (Бильдюг и др., 2014).

Несмотря на поддержание исходной организации сократительного аппарата КМЦ и жизнеспособность клеток, мы не наблюдали спонтанных сокращений КМЦ в коллагеновых гелях. Мы считаем, что важным фактором может являться отсутствие механического натяжения гелей. Согласно данным литературы, натяжение способствует сокращению КМЦ в

трехмерных системах (Eschenhagen et al., 1997; Zimmermann et al., 2004). Кроме того, физические параметры гелей могли препятствовать сокращению клеток. Поскольку получение трехмерной культуры сокращающихся КМЦ не входило в задачи работы, мы не проводили оценку соответствия физических характеристик гелей сердечному матриксу.

3.13. Матриксные металлопротеиназы на разных сроках культивирования кардиомиоцитов в коллагеновых гелях с концентрацией коллагена 1 мг/мл

Проводили анализ ММП в культуре КМЦ в коллагеновых гелях с концентрацией 1 мг/мл. Пробы кондиционированной среды отбирали на сроках, которые соответствовали разным стадиям процесса перестройки сократительного аппарата КМЦ в ходе их культивирования в двумерных условиях. Выявляли желатиназную активность в области между 100 и 60 кДа (Рис. 18, *а*), что соответствует протеолитической активности ММП-9 и ММП-2 (Woessner, 1991; Werb and Alexander, 1993). Было показано, что желатиназная активность в области 92 кДа, которая соответствует активности ММП-9, не превышала контрольный уровень на всех исследуемых сроках культивирования (Рис. 18, *б*), что указывает на отсутствие динамики секреции ММП-9 кардиомиоцитами в коллагеновых гелях. Желатиназная активность в области 60–72 кДа, соответствующая активности ММП-2, незначительно превышала контрольный уровень на сроках, соответствующих Стадиям 4, 5 и 7 перестройки сократительного аппарата КМЦ при их монослойном культивировании (Рис. 18, *в*).

Таким образом, КМЦ практически не секретируют матриксные металлопротеиназы в процессе их культивирования в трехмерных коллагеновых гелях с концентрацией 1 мг/мл (Бильдюг и др., 2015).

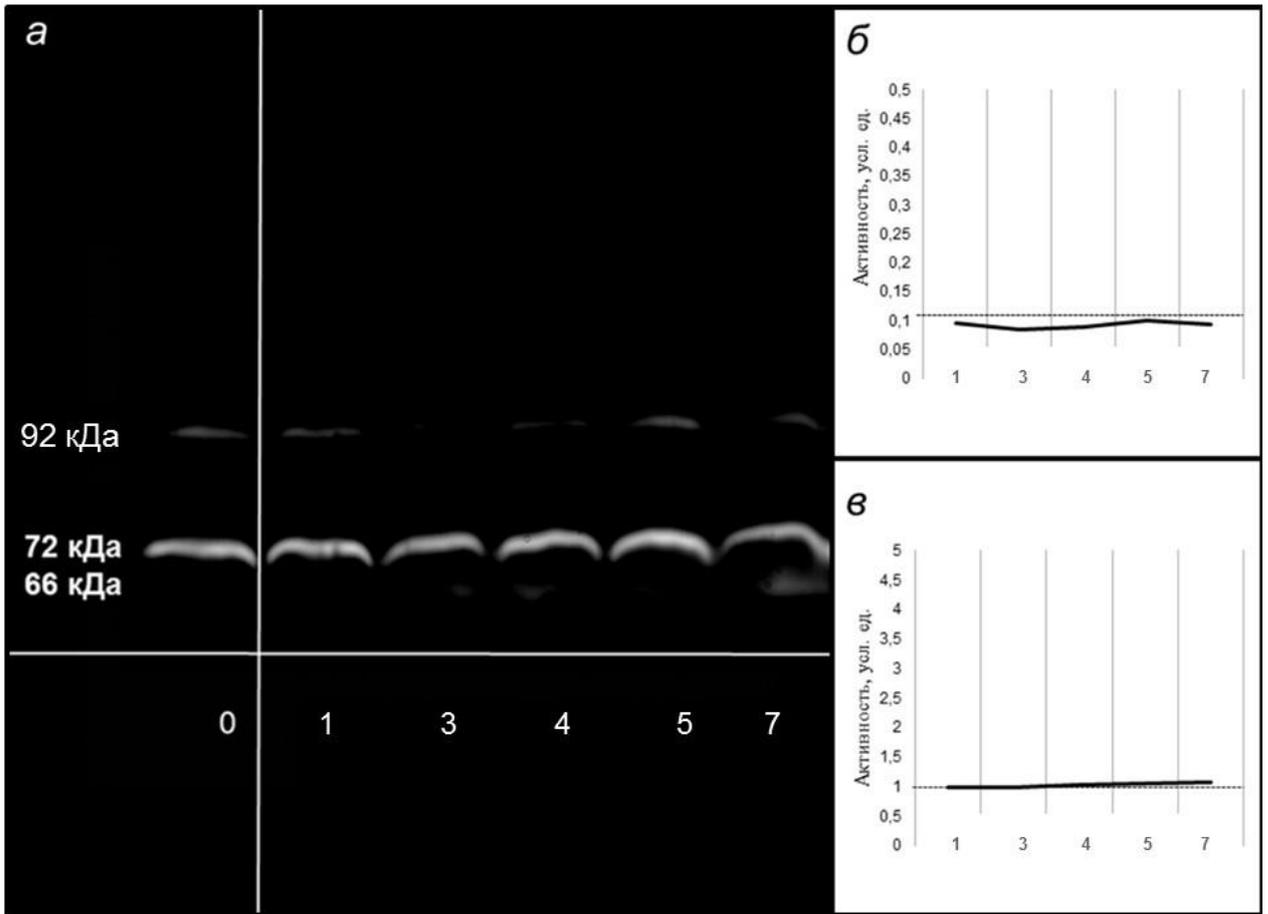


Рис. 18. Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 в культуре кардиомиоцитов при их культивировании в 0,1% коллагеновом геле.

а – Зимограмма среды, кондиционированной кардиомиоцитами, на разных сроках культивирования в коллагеновых гелях. Уровень ММП в контроле (в полной питательной среде для кардиомиоцитов до начала культивирования) соответствует точке 0. Молекулярные массы 92, 72 и 66 кДа соответствуют ММП-9, неактивной и активированной форме ММП-2 соответственно; *б* – усредненные результаты денситометрии зимограмм для ММП-9. Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-9. *в* – усредненные результаты денситометрии зимограмм для ММП-2. Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-2.

3.14. Экспрессия изоформ актина в кардиомиоцитах в процессе культивирования

Основная изоформа актина в терминально дифференцированных КМЦ представлена сердечным актином (Vandekerckhove et al., 1986). Однако известно, что адаптация КМЦ к условиям *in vitro* может сопровождаться появлением гладкомышечной изоформы α -актина, которая характерна для ранних стадий развития сердца (Erpenberger-Eberhardt et al., 1990; van Bilsen and Chien, 1993; Schaub et al., 1997). В связи с этим было необходимо определить изоформы актина в КМЦ на разных сроках перестройки их сократительного аппарата. Экспрессию изоформ актина анализировали с помощью ПЦР с использованием специфичных праймеров к сердечному и гладкомышечному α -актину (α -SMA). Временные точки, которые использовали в анализе, соответствовали ключевым этапам перестройки сократительного аппарата и включали стадию сохраненного миофибрилярного аппарата (Стадию 1), стадию полного преобразования миофибрилл в стресс-фибриллоподобные структуры (Стадию 4) и стадию восстановления миофибрилярного аппарата (Стадию 7). На Стадии 1 наблюдали высокий уровень экспрессии сердечного α -актина, тогда как гладкомышечный α -актин не выявлялся, что полностью соответствует нормальному паттерну экспрессии изоформ актина в зрелых КМЦ. На Стадии 4 выявлялась высокая экспрессия гладкомышечного α -актина с отсутствием сердечной изоформы. На Стадии 7 сердечный α -актин являлся доминирующей изоформой, при этом гладкомышечная изоформа выявлялась на низком уровне (Рис. 19). Полученные результаты указывают на временное замещение сердечного α -актина гладкомышечной изоформой в процессе культивирования КМЦ (Bilyug et al., 2016).

3.15. Синтез гладкомышечного α -актина в КМЦ в процессе культивирования

Для того чтобы подтвердить появление гладкомышечного α -актина в культивируемых КМЦ на белковом уровне, проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга на сроках культивирования, соответствующих разным стадиям перестройки сократительного аппарата КМЦ (Стадии 3, 5 и 7). Количество гладкомышечного α -актина постепенно снижалось от Стадии 3, соответствующей частичной перестройке сократительного аппарата КМЦ, к Стадии 7, соответствующей восстановлению миофибриллярной организации (Рис. 20), при этом на Стадии 7 он выявлялся на очень низком уровне (Рис. 20), что согласуется с данными ПЦР-анализа (Рис. 19).

Таким образом, в процессе перестройки сократительного аппарата КМЦ появление гладкомышечного α -актина соответствует преобразованию миофибрилл в структуры немышечного типа, а его подавление предшествует экспрессии сердечной изоформы и восстановлению исходной организации (Bilyug et al., 2016).

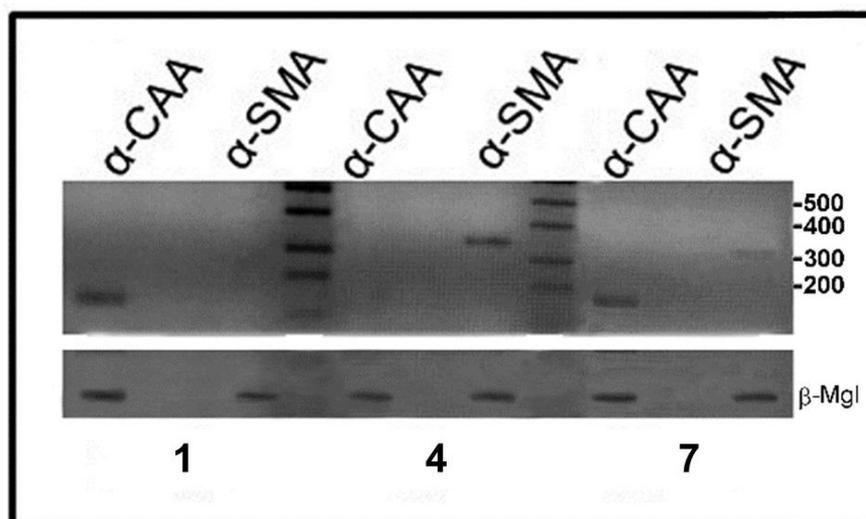


Рис. 19. Экспрессия изоформ актина в кардиомиоцитах на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата.

Представлены результаты ПЦР-анализа с использованием специфичных праймеров к сердечному α -актину (α -CAA) и гладкомышечному α -актину (α -SMA). На Стадии 1 перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов наблюдается экспрессия сердечного α -актина с отсутствием гладкомышечной изоформы. На Стадии 4 наблюдается экспрессия только гладкомышечного α -актина. На Стадии 7 экспрессия сердечного α -актина является доминирующей с экспрессией гладкомышечной изоформы на низком уровне. Числовые значения соответствуют положению маркеров молекулярного веса (п.о.). Для контроля нагрузки выявляли экспрессию β -миоглобина (β -Mgl).

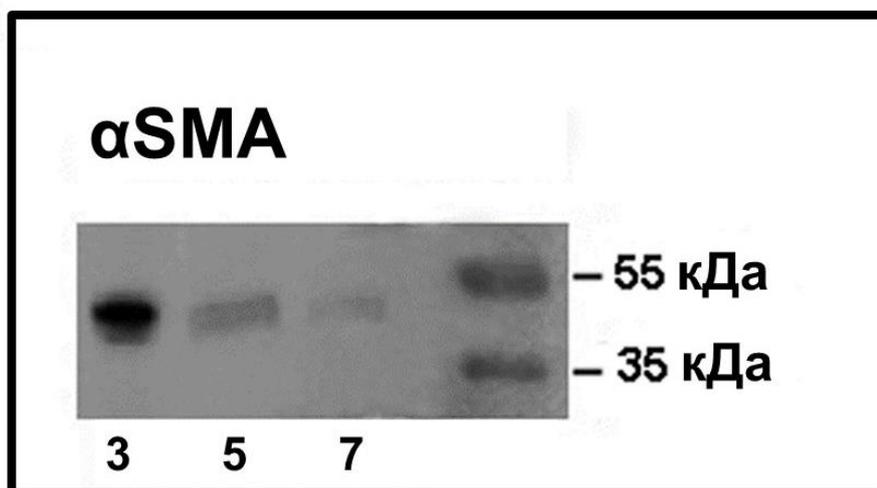


Рис. 20. Продукция гладкомышечного α -актина в кардиомиоцитах на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата.

Анализ с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против гладкомышечного α -актина (α -SMA) выявил продукцию гладкомышечной изоформы актина (42 кДа) в кардиомиоцитах на Стадиях 3, 5 и 7 перестройки их сократительного аппарата с постепенным снижением количества белка от Стадии 3 к Стадии 7. Числовые значения соответствуют положению маркеров молекулярного веса (кДа).

3.16. Обратная корреляция между синтезом внеклеточного матрикса и гладкомышечного α -актина в кардиомиоцитах

При сопоставлении данных Вестерн-блоттинга для внеклеточных белков и гладкомышечного актина было обнаружено, что накопление белков ВКМ сопровождается постепенным снижением количества гладкомышечной изоформы актина. Таким образом, была выявлена обратная корреляция между синтезом ВКМ и гладкомышечного α -актина (Bilyug et al., Рис. 21). При этом восстановлению исходной организации сократительного аппарата КМЦ в культуре предшествует максимальное накопление ВКМ и снижение гладкомышечной изоформы актина. Результаты сравнения представлены в виде графика зависимости количества указанных белков от стадий перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре. График построен на основе значений, рассчитанных с помощью программы Quantity One.

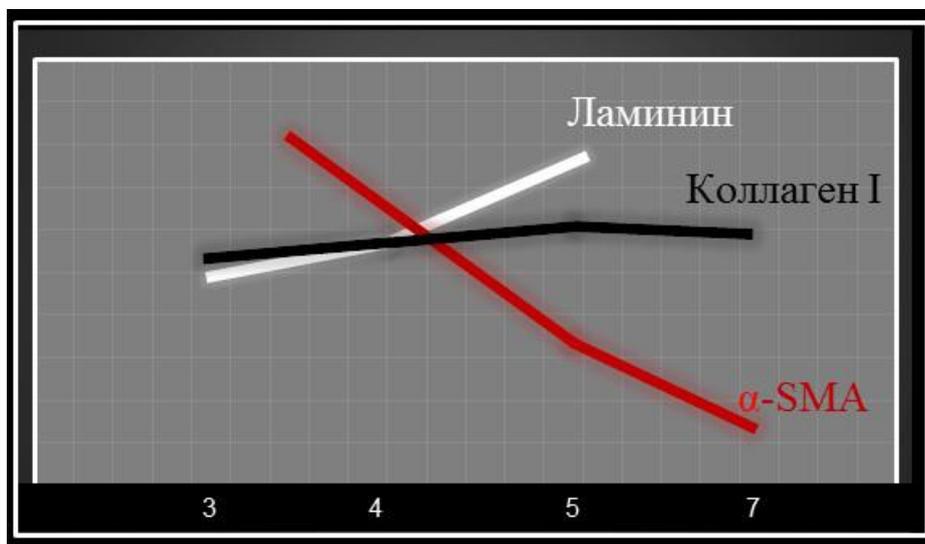


Рис. 21. Обратная корреляция между синтезом гладкомышечного α -актина и продукцией белков внеклеточного матрикса в кардиомиоцитах.

Представлен график зависимости количества гладкомышечного α -актина (α -SMA) в кардиомиоцитах и белков ламинина и коллагена во внеклеточном матриксе от стадии перестройки сократительного аппарата. График построен на основе значений, рассчитанных с помощью программы Quantity One. Показана корреляция между снижением гладкомышечного актина, с одной стороны, и накоплением коллагена и ламинина, с другой.

3.17. Локализация гладкомышечного α -актина в сократительных структурах кардиомиоцитов на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата

Для оценки включения гладкомышечного α -актина в сократительные структуры КМЦ клетки на разных сроках культивирования окрашивали с помощью антител против гладкомышечной изоформы α -актина и сравнивали полученные данные с результатами окраски клеток родамин-фаллоидином, который окрашивает все полимерные актиновые структуры, включающие разные изоформы. На Стадии 1 перестройки сократительной системы, когда КМЦ еще сохраняли миофибрилярный аппарат и активно сокращались, выявлялись только следы гладкомышечного α -актина в околядерной области (Рис. 22, а). Однако уже на Стадии 2, когда миофибриллы еще сохранялись в клетках, гладкомышечный α -актин выявлялся во всех актинсодержащих структурах, как миофибрилярных, так и стресс-фибриллоподобных (Рис. 22, б). На Стадии 4 гладкомышечный α -актин выявлялся во всех стресс-фибриллоподобных структурах, которые занимали весь объем клеток (Рис. 22, в). На Стадии 6 гладкомышечный α -актин выявлялся в стресс-фибриллоподобных структурах на периферии клеток, а также в некоторых фрагментах заново образующихся миофибрилл в центральной части клеток. При этом основная масса миофибрилл не окрашивалась антителами против гладкомышечной изоформы актина (Рис. 22, г). На Стадии 7 гладкомышечный α -актин выявлялся только в стресс-фибриллоподобных структурах в отростках клеток (Рис. 22, д).

Таким образом, в процессе восстановления миофибрилярного аппарата КМЦ гладкомышечный α -актин покидал область заново образующихся миофибрилл (Bildyug et al., 2016).

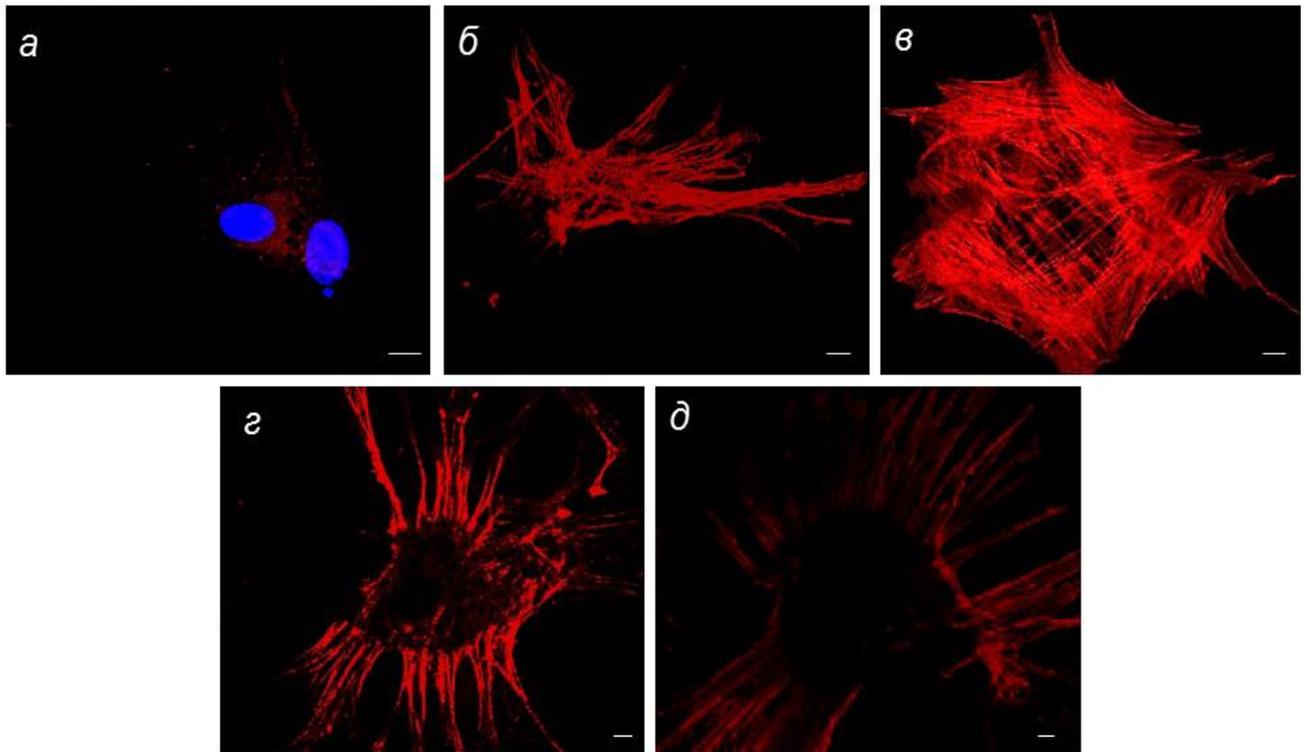


Рисунок 22. Гладкомышечный α -актин в структурах сократительного аппарата кардиомиоцитов.

Представлены фотографии кардиомиоцитов, окрашенных антителами против гладкомышечной изоформы актина на разных стадиях перестройки сократительного аппарата. *a* – Стадия 1, ядра окрашены DAPI для выявления положения клеток; *б* – Стадия 2; *в* – Стадия 4; *г* – Стадия 6; *д* – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

3.18. Перераспределение саркомерных белков α -актинина и миозина при перестройке сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре

Поскольку мы обнаружили, что в процессе перестройки сократительного аппарата КМЦ происходит смена изоформ актина с появлением несаркомерной гладкомышечной изоформы, необходимо было определить распределение ключевых белков саркомеров миозина и α -актинина на стадии, соответствующей полной перестройке сократительного аппарата КМЦ с появлением стресс-фибриллоподобных структур. Известно, что стресс-фибриллы немышечных клеток также содержат альфа-актинин и миозин. Однако в этих структурах указанные белки представлены несаркомерными изоформами (Kreis and Birehmeie, 1980). В связи с этим для выявления мышечного альфа-актинина и миозина проводили окрашивание с

помощью антител к саркомерным изоформам указанных белков на Стадии 1, соответствующей исходной организации сократительного аппарата КМЦ, и Стадии 4, соответствующей максимальной перестройке с исчезновением миофибрилл и замещением сердечного актина на гладкомышечную изоформу. С помощью метода непрямой иммунофлуоресценции было показано, что на Стадии 1 саркомерный α -актинин выявляется в миофибриллах с четкой периодичностью, что соответствует его локализации в Z-дисках саркомеров (Рис. 23, а, в). На Стадии 4 α -актинин выявляется в цитоплазме в виде включений, не связанных с полимерными актиновыми структурами (Рис. 23, а', в').

Для мышечного миозина наблюдалось сходное распределение на указанных стадиях перестройки сократительного аппарата КМЦ (Рис. 24, б, в; б', в').

Таким образом, саркомерные белки α -актинин и миозин при перестройке сократительного аппарата КМЦ выходят из актин-содержащих структур и запасаются в виде включений в цитоплазме.

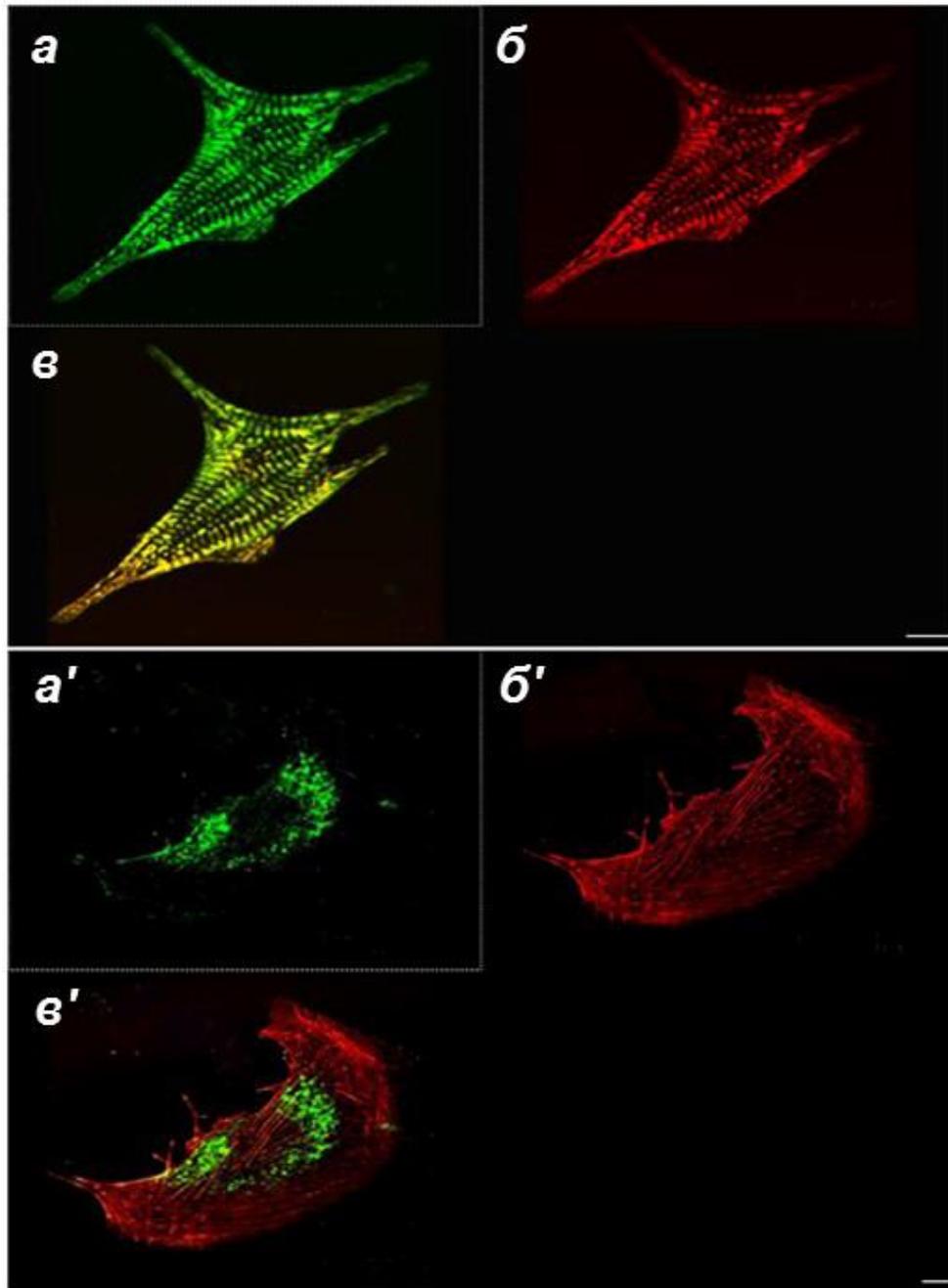


Рис. 23. Распределение саркомерного α -актинина в кардиомиоцитах на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата.

Представлены результаты выявления саркомерного α -актинина в кардиомиоцитах на Стадии 1 (а – в) и Стадии 4 (а' – в') перестройки их сократительного аппарата. а – антитела против саркомерного α -актинина (окраска красителем FITC) выявляют его периодичное распределение в области миофибрилл на Стадии 1; б – окраска родамин-фаллоидином показывает миофибрилярную организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов на Стадии 1; в – наложение изображений от двух красителей; а' – антитела против саркомерного α -актинина (краситель FITC) выявляют его распределение в цитоплазме в виде не связанных с актином включений на Стадии 4; б' – окраска родамин-фаллоидином выявляет неисчерченные актиновые структуры на Стадии 4; в' – наложение изображений от двух красителей.

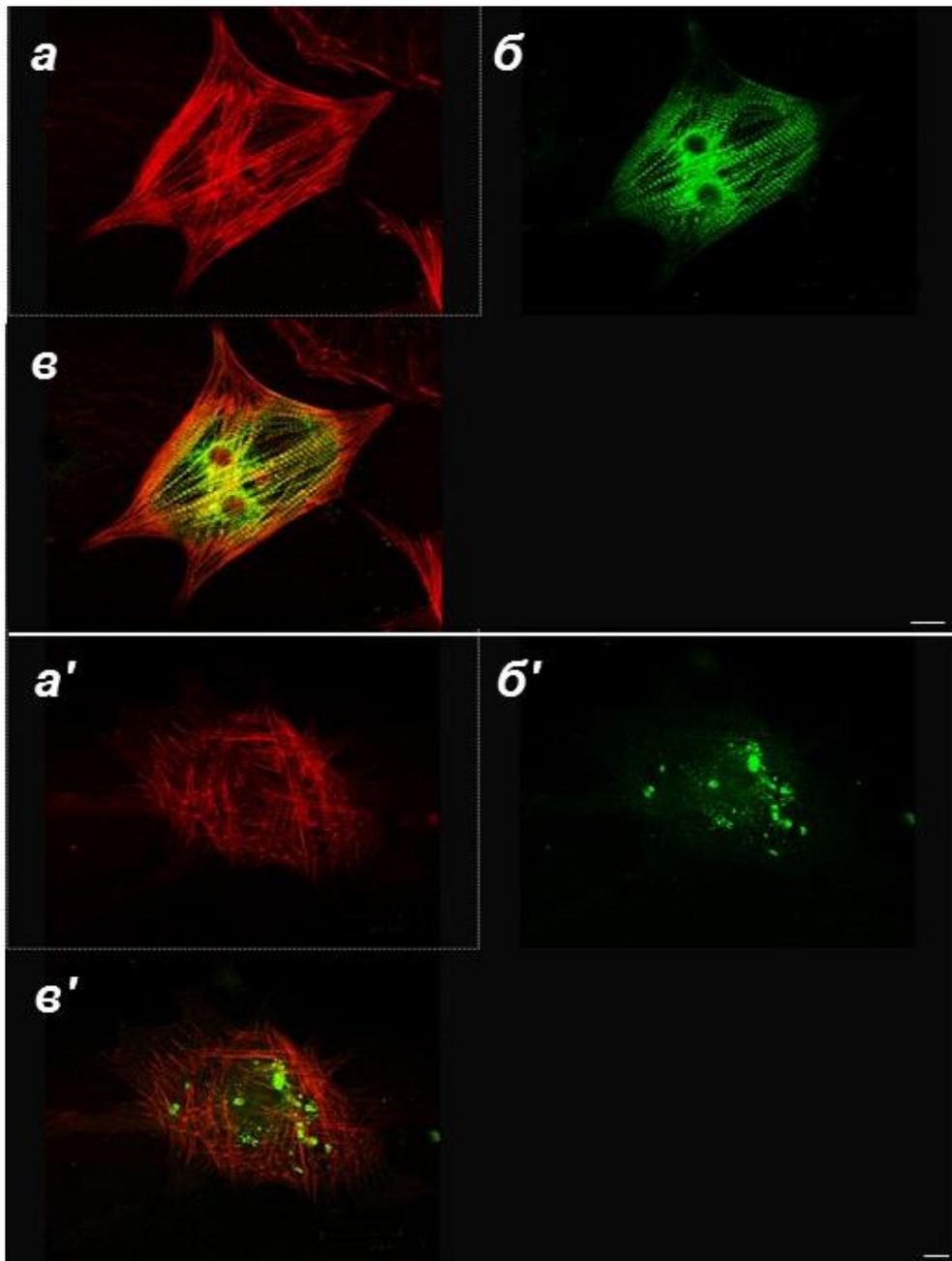


Рис. 24. Распределение саркомерного миозина в кардиомиоцитах на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата.

Представлены результаты выявления саркомерного миозина в кардиомиоцитах на Стадии 1 (а – в) и Стадии 4 перестройки их сократительного аппарата (а' – в'). а – окраска родамин-фаллоидином показывает миофибриллярную организацию сократительного аппарата на Стадии 1; б – антитела против мышечного миозина (окраска красителем FITC) выявляют его периодичное распределение в миофибриллах на Стадии 1; в – наложение изображений от двух красителей; а' – окраска родамин-фаллоидином выявляет неисчерченные актиновые структуры на Стадии 4; б' – антитела против мышечного миозина (краситель FITC) выявляют его распределение в цитоплазме в виде не связанных с актином включений на Стадии 4; в' – наложение изображений от двух красителей.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Влияние внеклеточного матрикса на сократительный аппарат кардиомиоцитов

На сегодняшний день имеются представления о существовании двух принципиально разных систем на основе актиновых микрофиламентов, обеспечивающих сократительные реакции клеток. Это сократительный аппарат мышечных клеток, с одной стороны, и цитоскелет немышечных клеток, с другой. В немышечных клетках система структур, обеспечивающих двигательные реакции, в высшей степени динамична и постоянно подвергается перестройкам. В свою очередь, сократительный аппарат мышечных клеток считается стабильной системой, организация которой в дифференцированных клетках не изменяется. Подробно описанная в настоящей работе перестройка сократительного аппарата КМЦ с преобразованием миофибрилл в структуры, напоминающие сократительные структуры немышечных клеток, свидетельствует о высокой степени пластичности сложноорганизованной сократительной системы КМЦ. Обратимый характер перестройки указывает на то, что изменения, наблюдаемые в процессе культивирования КМЦ, в целом отражают процесс успешной адаптации клеток к новым для них условиям микроокружения. На переходных стадиях перестройки можно наблюдать одновременное присутствие в клетках миофибрилл и стресс-фибриллоподобных структур, что свидетельствует о возможности сосуществования двух типов организации сократительной системы в пределах одной клетки и может указывать на общие принципы их регуляции.

Известно, что актиновый цитоскелет в немышечных клетках активно регулируется со стороны ВКМ (Grinnel, 1978, Are et al., 2001, Петухова и др., 2004). При этом данные о роли ВКМ в регуляции сократительного аппарата КМЦ отсутствуют. Результаты настоящей работы показывают, что период перестройки сократительного аппарата КМЦ сокращается при их

культивировании на различных подложках, включающих белки ВКМ. Кроме того, мы показали, что динамика сократительного аппарата КМЦ зависит от пространственной организации и плотности ВКМ. При культивировании КМЦ в коллагеновых гелях с разной концентрацией коллагена наблюдалось сохранение миофибриллярного аппарата, однако были показаны различия в морфологии клеток и организации миофибрилл. Эти результаты согласуются с данными последних лет о влиянии жесткости ВКМ на поведение и фенотип различных клеток в культуре (Discher et al., 2005; Peyton and Putnam, 2005; Bhana et al., 2010; Duan et al., 2011; Pok et al., 2013; Gisho et al., 2015).

В целом, наши данные по культивированию КМЦ в присутствии компонентов ВКМ свидетельствуют о том, что ВКМ является важным регулятором не только динамического цитоскелета немышечных клеток, но и сократительного аппарата мышечных клеток.

Непрерывное поддержание миофибриллярного аппарата КМЦ при их культивировании в 0,1% коллагеновых гелях показывает, что наличие подходящего внеклеточного микроокружения предотвращает перестройку их сократительной системы. Такие данные подтверждают наше предположение о том, что перестройка сократительного аппарата КМЦ в культуре вызвана отсутствием необходимого ВКМ.

4.2. Синтез кардиомиоцитами белков внеклеточного матрикса и матриксных металлопротеиназ

В сердце за синтез ВКМ отвечают немышечные клетки, такие как фибробласты и клетки эндотелия, в то время как КМЦ специализируются на функции сокращения. Данные электрофоретического анализа и Вестерн-блоттинга, полученные в настоящей работе, а также результаты иммунофлуоресцентной окраски коллагена, свидетельствуют о том, что КМЦ при помещении в культуру начинают синтезировать собственный ВКМ. Это первые данные, показывающие способность КМЦ синтезировать структурные компоненты ВКМ. Поскольку на сроках, которые

соответствуют интенсивной нагрузке ВКМ, КМЦ не сокращаются, можно говорить о временной смене их функции с сократительной на не типичную для них секреторную. Интересно, что для некоторых типов клеток описаны разные фенотипы, соответствующие сократительной активности, с одной стороны, и миграции и синтетической активности, с другой. Указанные фенотипы характеризуются разным типом организации системы актиновых микрофиламентов и считаются взаимоисключающими (Owens et al., 2004; Howard et al., 2012; Krause and Gautreau 2014; Рис. 25).

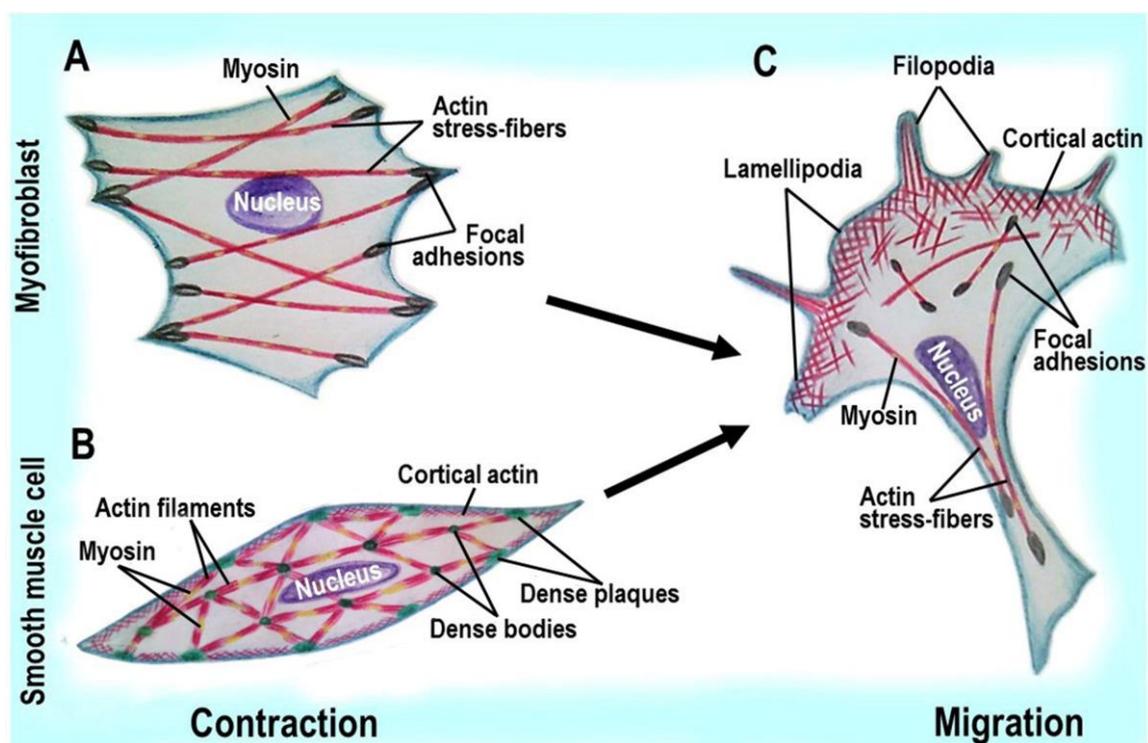


Рис. 25. Различия между сократительным и миграционным фенотипом в фибробластах и гладкомышечных клетках (Bildyug, 2016).

А – сократительный фенотип фибробласта, называемый миофибробластом, характеризуется формированием актиновых стресс-фибрилл, содержащих миозин. В – в сокращающихся гладкомышечных клетках актин организован в миозин-содержащий сократительный аппарат и подмембранную сеть актиновых филаментов. С – миграция как фибробластов, так и гладкомышечных клеток сопровождается сходной реорганизацией системы актиновых структур, включающей формирование актиновых филаментов в ламеллоподиях и филоподиях.

В случае КМЦ описанный нами переход к синтетической активности также сопровождается изменением организации их сократительного

аппарата. Мы считаем, что перестройка с преобразованием миофибрилл в структуры немышечного типа является необходимым условием для возможности синтеза КМЦ компонентов ВКМ, поскольку сложноорганизованный миофибриллярный аппарат, занимающий основной объем клеток, может препятствовать протеканию активных синтетических процессов. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что сократительная и секреторная функция в КМЦ являются взаимоисключающими.

Поскольку максимальное накопление ВКМ предшествует возвращению клеток к исходной организации их сократительного аппарата, мы считаем, что наработанный КМЦ к этому сроку ВКМ является необходимым и достаточным для возможности восстановления миофибриллярной системы. Снижение количества ВКМ по результатам электрофореза и Вестерн-блоттинга на сроке, соответствующем восстановлению сократительного аппарата КМЦ и возобновлению сокращений, подтверждает снижение синтетической активности в клетках и, соответственно, их возвращение к исходной функции.

Известно, что ВКМ в ткани сердца постоянно подвергается ремоделированию с помощью ММП, за синтез и секрецию которых отвечают немышечные клетки, в основном фибробласты (Herron et al., 1986). В нашей работе впервые показано, что КМЦ в процессе культивирования также могут синтезировать ММП и секретировать их во внеклеточное пространство. Поскольку ММП-9 является металлопротеиназой, характерной для реакции на стресс и воспаление (Koivukangas et al., 1994; Richard et al., 2002; Onoue et al., 2003; Woo et al., 2004; Hsieh et al., 2012), мы полагаем, что ее накопление на ранних сроках культивирования КМЦ связано с адаптацией клеток к непривычным для них условиям в культуре. Указанные сроки соответствуют реорганизации сократительного аппарата КМЦ с полным исчезновением миофибрилл и появлением структур немышечного типа. Начальные стадии

восстановления миофибриллярного аппарата КМЦ и способности к сокращению сопровождаются снижением уровня ММП-9. В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что подавление ММП-9 улучшает сократительную способность КМЦ (Romanic et al., 2002; Mishra et al., 2010), а также приводит к повышению выживаемости и дифференцировки стволовых клеток сердца в кардиомиоциты (Mishra et al., 2012). Таким образом, показанная нами корреляция между снижением уровня ММП-9 и восстановлением миофибриллярного аппарата КМЦ согласуется с описанными в литературе данными.

Постепенное повышение уровня ММП-2 коррелирует с накоплением внеклеточного коллагена по результатам Вестерн-блоттинга и может объясняться необходимостью его укладки – данные иммунофлуоресцентного анализа подтвердили формирование выраженных коллагеновых структур во внеклеточном пространстве в культуре КМЦ. Снижение уровня ММП-2 на момент полного восстановления миофибриллярного аппарата КМЦ соответствует снижению количества коллагена и, вероятно, связано с возвращением клеток к сократительной функции и прекращением синтетической активности. Интересно, что в фибробластах переход к сократительному фенотипу также сопровождается подавлением ММП-2 (Howard et al., 2012).

Мы наблюдали повышение уровня ММП-2 и снижение уровня ММП-9 по мере накопления компонентов ВКМ в монослойной культуре КМЦ, в которой исходно отсутствовал ВКМ. В то же время при наличии готового трехмерного коллагенового матрикса был показан низкий уровень желатиназ с отсутствием выраженной динамики. Такие результаты могут указывать на регуляцию секреции ММП со стороны ВКМ. В пользу этого предположения говорят данные о том, что наличие некоторых компонентов ВКМ, таких как ламинин и фибронектин, может влиять на активность ММП в клетках разных типов (Turpeenniemi-Hujanen et al., 1986; Werb et al., 1989).

4.3. Смена изоформ актина в кардиомиоцитах в процессе перестройки их сократительного аппарата

Результаты Вестерн-блоттинга, ПЦР-анализа, а также иммунофлуоресценции показывают, что перестройка сократительного аппарата КМЦ в процессе культивирования сопровождается сменой изоформ актина с временной экспрессией гладкомышечного α -актина, который в норме характерен для гладкомышечных клеток и миофибробластов, а также экспрессируется в КМЦ ходе эмбрионального развития (Vandekerckhove, et al., 1986; Ruzicka and Schwartz, 1988; Handel et al., 1991; van Bilsen and Chien, 1993). Известно, что гладкомышечный α -актин может появляться в различных клетках при патологических изменениях, а также в результате реакции на стресс (Wang et al., 2006; Tomasek et al., 2002). В связи с этим мы считаем, что в нашей модели его появление на ранних сроках культивирования может являться ответом клеток на непривычные для них условия культивирования и отсутствие ВКМ. Анализ с помощью Вестерн-блоттинга и иммунофлуоресцентного окрашивания показал, что появление гладкомышечного α -актина предшествует превращению миофибрилл в структуры немышечного типа. Кроме того, его появление соответствует прекращению сократительной активности клеток, несмотря на сохранение миофибрилл, которые интенсивно окрашиваются антителами против гладкомышечного актина наряду с неисчерченными структурами. На сегодняшний день накопилось достаточно много данных, указывающих на то, что разные изоформы актина, несмотря на консервативные последовательности, не могут замещать друг друга без изменения функции (Antin and Ordahl, 1991; von Arx et al., 1995; Kaech et al., 1997; Kumar et al., 1997; Mounier et al., 1997; Fyrberg et al., 1998; Khaitlina, 2001; Martin et al., 2002). В частности, гладкомышечная и скелетная изоформы актина не могут обеспечить нормальное формирование миофибриллярного аппарата в моделях нокаута сердечной изоформы (Kumar et al., 1997). В свете этих

данных мы считаем, что именно включение гладкомышечного α -актина в миофибриллярные структуры на раннем сроке культивирования является причиной прекращения сократительной активности КМЦ и приводит к преобразованию миофибрилл в структуры, напоминающие стресс-фибриллы немышечных клеток. Данные о том, что гладкомышечный α -актин является основным белком стресс-фибрилл в миофибробластах (Wang et al., 2006; Driesen et al., 2014) подтверждает предположение о том, что стресс-фибриллоподобная организация сократительной системы может быть более предпочтительной для данной изоформы актина. Несовместимость гладкомышечного актина с миофибриллярной организацией подтверждается выходом саркомерных белков альфа-актинина и миозина из актин-содержащих структур при перестройке сократительного аппарата КМЦ. Поскольку известно, что в состав стресс-фибрилл немышечных клеток также входят альфа-актинин и миозин, которые представлены в этих структурах несаркомерными изоформами (Kreis and Virehmeie, 1980), мы предполагаем, что выход миофибриллярных белков в цитоплазму сопровождается их замещением на соответствующие изоформы в стресс-фибриллоподобных структурах клеток.

Таким образом, мы считаем, что перестройка сократительного аппарата КМЦ обусловлена замещением сердечного актина гладкомышечной изоформой. По результатам ПЦР гладкомышечный актин полностью замещает сердечную изоформу на сроке, соответствующем полной перестройке сократительного аппарата КМЦ.

Интересно, что многие сердечные заболевания также сопровождаются экспрессией гладкомышечной изоформы актина (Winegrad et al., 1990; Clément et al., 1999; Suurmeijer et al., 2003) и часто характеризуются деградацией миофибрилл и деформацией ВКМ (Pauschinger et al., 2002; Lindsey et al. 2003; Barallobre-Barreiro et al., 2012; Mishra et al., 2012). В связи с этим процессы, которые происходят на начальных стадиях перестройки

сократительного аппарата КМЦ в культуре можно рассматривать как модель для изучения патологических изменений КМЦ при различных заболеваниях.

Восстановление миофибриллярного аппарата сопровождается снижением гладкомышечной изоформы, при этом по результатам иммунофлуоресцентного окрашивания гладкомышечный актин покидает область, которую занимают заново образующиеся миофибриллы. Такие данные указывают на то, что миофибриллярные структуры формируются на основе сердечной изоформы актина - по результатам ПЦР сердечный актин экспрессируется на высоком уровне в КМЦ с восстановленной сократительной системой. Интересно, что на начальных стадиях восстановления миофибриллярного аппарата небольшое количество гладкомышечного актина выявляется в некоторых фрагментах образующихся миофибрилл. Согласно данным литературы, в ходе миофибриллогенеза в мышечных тканях предшественниками миофибрилл являются премиофибриллы (Kelly, 1969; Sanger et al., 2002, Wang et al., 2005). Было показано, что ранние премиофибриллы представляют собой неисчерченные структуры и содержат некоторые несаркомерные белки, в частности, немышечную изоформу миозина (White et al., 2014). На основании этих данных мы предполагаем, что при восстановлении сократительного аппарата КМЦ миофибриллы образуются в центральной части клеток не как независимые структуры, вытесняющие на периферию стресс-фириллоподобные филаменты, а в результате постепенного замещения в неисчерченных структурах гладкомышечной изоформы на сердечный актин и их дальнейшего преобразования в миофибриллы. Данные о том, что при перестройке сократительного аппарата саркомерные белки α -актинин и миозин сохраняются в виде включений в цитоплазме клеток, дают основание полагать, что восстановление исходной организации сократительного аппарата КМЦ может регулироваться не только на уровне экспрессии сердечных изоформ белков миофибрилл, но также путем включения в

формирующиеся миофибриллы некоторых саркомерных белков из запасаемого в цитоплазме пула.

Процесс восстановления исходной организации сократительного аппарата КМЦ во многом напоминает стадии эмбрионального развития сердца, в ходе которых происходит формирование новых миофибрилл. Показано, что в раннем кардиогенезе также наблюдается временная экспрессия гладкомышечного актина (Ruzicka and Schwartz 1988; Schultheiss et al., 1990; Handel et al., 1991), который в процессе развития замещается на скелетную и сердечную изоформу α -актина. В дифференцированных КМЦ основной изоформой является сердечный актин с полным отсутствием экспрессии гладкомышечного актина (Vandekerckhove et al., 1986; Ruzicka and Schwartz, 1988; Woodcock-Mitchell et al. 1988; van Bilsen and Chien, 1993). Однако в случае нашей модели экспрессия гладкомышечной изоформы не полностью подавляется в КМЦ с восстановленной сократительной системой, а сохраняется на низком уровне наряду с сердечной изоформой. Мы объясняем это наличием гладкомышечного актина в отростках клеток, где его распределение, вероятно, соответствует области фокальных контактов – структур, обеспечивающих прикрепление клеток к подложке. Показано, что строение фокальных контактов существенно отличается от строения контактов, с помощью которых КМЦ в ткани соединяются с соседними клетками и ВКМ, и требует несаркомерной организации актиновых микрофиламентов, участвующих в их формировании (Atherton et al., 1986). Эти данные могут объяснять сохранение в отростках КМЦ стресс-фибриллоподобных структур, содержащих гладкомышечную изоформу актина.

Полученные результаты особенно интересны при их совместном рассмотрении с нашими данными о том, что восстановление миофибриллярной организации сократительного аппарата КМЦ происходит по мере накопления белков ВКМ. Поскольку в ходе кардиогенеза также

наблюдаются изменения ВКМ (Nakagawa et al., 1992), такие данные могут указывать на роль ВКМ в формировании миофибрилл как в процессе культивирования КМЦ, так и в ходе их эмбрионального развития. Полученные данные также свидетельствуют о том, что влияние ВКМ следует учитывать при дифференцировке клеток в кардиомиоцитарном направлении *in vitro*. Важное значение ВКМ для поддержания дифференцированного состояния клеток подтверждают недавно опубликованные данные о том, что нативный ВКМ, полученный путем децеллюляризации сердца, может обеспечивать поддержание полученных *in vitro* КМЦ в дифференцированном состоянии, а также способствовать образованию функционально активных сегментов сердечной ткани (Guyette et al., 2015).

4.4. Обратная корреляция между гладкомышечным актином и внеклеточным матриксом

Мы наблюдали явную корреляцию между накоплением белков ВКМ, с одной стороны, и снижением гладкомышечного актина, с другой. Такие данные могут указывать на их взаимную регуляцию. Известно, что взаимодействие клеток с компонентами ВКМ опосредуется трансмембранными белками – интегринами (Hynes, 1992; Borg et al., 1996; Hemler, 1999). Интегрины экспрессируются во всех клетках и представляют собой семейство рецепторов, состоящих из альфа-бета гетеродимерных единиц. Интегрины взаимодействуют с компонентами ВКМ через внеклеточный домен и с сократительными структурами клеток с помощью внутриклеточного домена (Рис. 26). Исходно считалось, что основная функция интегринов заключается в обеспечении физической связи между цитоскелетом клеток и ВКМ (Codra et al., 2000; Sarasa-Renedo and Chiquet, 2005). Однако в настоящее время существует много данных о том, что интегрины также играют важную роль в бинаправленной передаче сигналов между клетками и внеклеточным окружением (Clark and Brugge, 1995;

Defilippi et al., 1997; Tuckwell and Humphries, 1997; Shattil and Ginsberg, 1997; Giancotti and Ruoslahti, 1999; Ross and Borg, 2001).

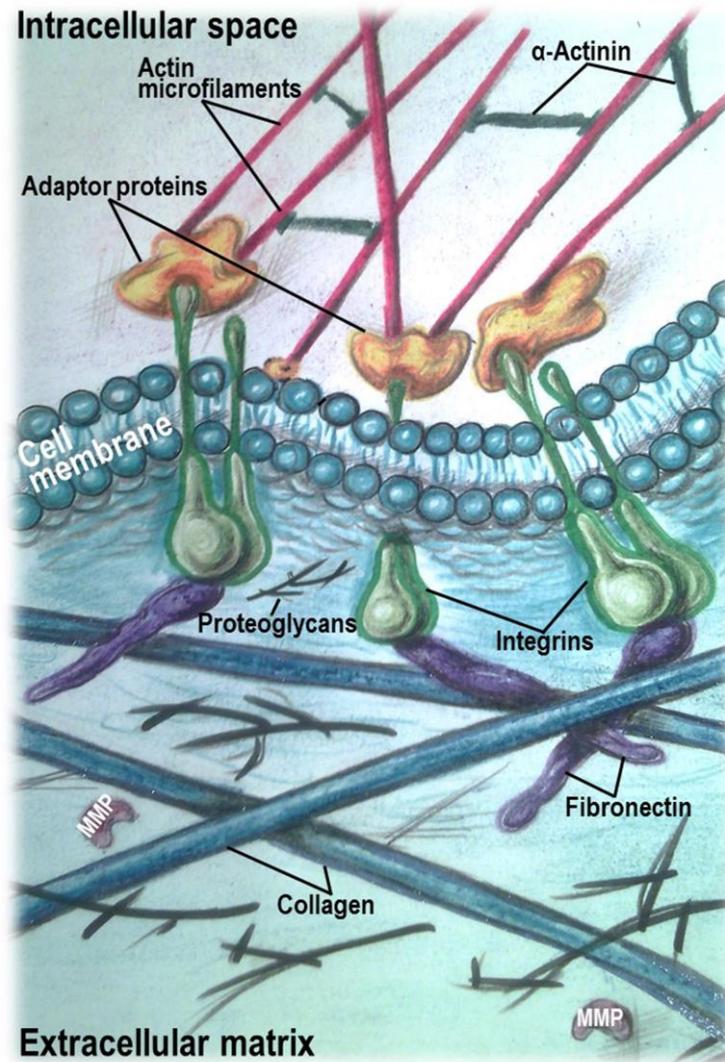


Рис. 26. Взаимодействие внеклеточного матрикса с системой актиновых микрофиламентов, опосредованное интегринами (Bilyug, 2016).

Внеклеточный домен интегринов взаимодействует с компонентами внеклеточного матрикса, тогда как цитоплазматический домен связывается с актиновыми микрофиламентами через адаптерные белки.

Интегрины могут передавать сигнал из клетки в ВКМ посредством изменения конформации их цитоплазматического домена, которое приводит к активации и усиленному связыванию интегринов с компонентами ВКМ и, таким образом, регулирует формирование сети ВКМ (Israeli-Rosenberg et al., 2014). Показано, что в фибробластах генерируемые клетками силы

натяжения, связанные с гладкомышечной изоформой актина, воздействуют на интегрины и опосредуют ремоделирование ВКМ (Wang et al., 2006), что, например, наблюдается в случае закрытия раны путем тракционной реорганизации коллагеновых волокон (Grinnell, 1994). С другой стороны, на сегодняшний день накопилось много данных о роли актина в регуляции экспрессии генов (Viita and Vartiainen, 2016). В частности, показано, что динамика цитоплазматического актина может влиять на активность транскрипционных факторов и, таким образом, модулировать экспрессию различных генов (Haller et al., 2004; Németh et al., 2004; Favot et al., 2005). Эти данные позволяют предположить, что система микрофиламентов на основе гладкомышечного актина может быть вовлечена в регуляцию ВКМ как путем опосредованного интегринными ремоделирования, так и посредством влияния на экспрессию генов белков ВКМ и ММП.

В свою очередь, показано, что интегрины могут передавать сигналы из внеклеточного пространства в клетки посредством механотрансдукции (Israeli-Rosenberg et al., 2014) – процесса, с помощью которого клетки превращают механические усилия (в частности, натяжение ВКМ) в биохимические сигналы. (Ko and McCulloch, 2001; Huang et al., 2004). Роль интегринов как механорецепторов была описана для различных типов клеток, включая клетки сердечно-сосудистой системы, остециты и хондроциты (Wright et al., 1997; Millward-Sadler et al., 1999; Gupta and Grande-Allen, 2006; Holledge et al., 2008; Kock et al., 2009). После активации интегринов происходит их кластеризация с привлечением адаптерных белков и нерецепторных киназ к их цитоплазматическому домену (Liu et al., 2000). Считается, что ключевую роль в дальнейшей передаче внутриклеточных сигналов после активации интегринов играет киназа фокальной адгезии (ФАК), привлекаемая интегрин-ассоциированными адаптерными белками (Yano et al., 1996, Ali et al., 2006, Young et al., 2009). С помощью такого механизма внеклеточные сигналы могут переводиться в соответствующие

клеточные ответы, такие как изменение формы, миграция, дифференцировка, рост и выживание клеток, а также ремоделирование ткани (Ko and McCulloch, 2001; Huang et al., 2004; Israeli-Rosenberg et al., 2014). Участие сократительных структур клеток в передаче сигнала посредством механотрансдукции описано в основном на миофибробластах (Tomasek et al., 2002; Shikata et al., 2005; Yoshigi et al., 2005). Показано, что механотрансдукция в этих клетках обеспечивается гладкомышечной изоформой актина (Wang et al., 2006), экспрессия которой сильно зависит от жесткости и натяжения ВКМ (Wang et al., 2006).

На сегодняшний день существует мало данных об интегрин-опосредованной передаче сигналов в миокарде. Однако было показано, что интегрины необходимы для нормального развития и функционирования сердца и могут участвовать в регуляции экспрессии и синтеза белков в кардиомиоцитах (Clark and Brugge, 1995; Eble and Spinale, 1995; Janmey, 1998; Ross and Borg, 2001). В ходе развития сердца взаимодействие КМЦ с ВКМ через рецепторы интегринового семейства отвечает за палочковидный фенотип КМЦ (Terracio et al., 1991; Goldsmith and Borg, 2002). При этом ингибирование интегринового взаимодействия КМЦ с ВКМ приводит к нарушению формы сердца (Borg et al., 1985).

В свете описанных данных показанная нами обратная корреляция между гладкомышечным α -актином и белками ВКМ позволяет говорить о механизмах регуляции динамики сократительного аппарата КМЦ в культуре через петлю отрицательной обратной связи, где гладкомышечный α -актин модулирует синтез ВКМ, который в свою очередь подавляет гладкомышечную изоформу актина посредством интегрин-опосредованной механотрансдукции и стимулирует экспрессию сердечного актина.

Наши данные позволяют рассматривать гладкомышечный α -актин не только в качестве маркера дедифференцировки или клеточного ответа на стресс и патологию, но и как важный регулятор нормального фенотипа КМЦ.

ВЫВОДЫ

1. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре определяется присутствием и пространственной организацией внеклеточного матрикса.
2. Перестройка сократительного аппарата кардиомиоцитов с преобразованием миофибрилл в структуры немышечного типа вызвана отсутствием внеклеточного матрикса и обусловлена экспрессией гладкомышечной изоформы α -актина, которая несовместима с саркомерными белками и миофибриллярной организацией сократительного аппарата.
3. Изменение организации сократительного аппарата кардиомиоцитов позволяет клеткам сменить сократительную функцию на синтетическую для продукции и ремоделирования необходимых компонентов внеклеточного матрикса.
4. Нарботка оптимального внеклеточного матрикса кардиомиоцитами обеспечивает восстановление исходной организации их сократительного аппарата и сократительной функции.
5. Существует петля отрицательной обратной связи между гладкомышечным α -актином и внеклеточным матриксом, в которой гладкомышечная изоформа α -актина модулирует синтез внеклеточного матрикса, что в свою очередь подавляет экспрессию гладкомышечного α -актина и индуцирует экспрессию сердечного α -актина.

Список работ, опубликованных по теме диссертации*Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ:*

1. **Bildyug N.** (2016) Matrix metalloproteinases: an emerging role in regulation of actin microfilament system. *Biomol Concepts*. 2016-0022/bmc-2016-0022.xml. doi: 10.1515/bmc-2016-0022. [Epub ahead of print].
2. **Bildyug N.**, Vozhokina E., Khaitlina S. (2016) Contribution of α -smooth muscle actin and extracellular matrix to the in vitro reorganization of cardiomyocyte contractile system. *Cell Biol Int*, 40(4): 472-7.
3. **Бильдюг Н.Б.**, Воронкина И.В., Смагина Л.В., Юдинцева Н.М., Пинаев Г.П. (2015) Матриксные металлопротеиназы в первичной культуре кардиомиоцитов. *Биохимия*, 80(10): 1595-1604.
4. **Бильдюг Н.Б.**, Юдинцева Н.М., Пинаев Г.П. (2014) Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в коллагеновых гелях. *Цитология*, 56(11): 822–827.
5. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г.П. (2013) Зависимость организации сократительного аппарата кардиомиоцитов от внеклеточного матрикса. *Цитология*, 55(10): 713-724.

Статьи в других рецензируемых изданиях:

1. **Бильдюг Н.Б.** (2016) Проблема получения кардиомиоцитов с помощью методов дифференцировки (Обзор). *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*. 32: 82-95.
2. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г.П. (2013) Влияние ингибитора пролиферации цитозин-арабинозида на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов. *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*. 29: 36-42.

Тезисы:

1. **Bildyug N.B.** 2016. Plasticity of contractile system in cultivated rat neonatal cardiomyocytes and its regulation by extracellular matrix. International Symposium Biological Motility. Pushchino, Russia. May 12-15, Materials of symposium, pp. 30-31.
2. **Бильдюг Н.Б.**, Божокина Е.С., Хайтлина С.Ю. 2015. Корреляция накопления белков внеклеточного матрикса со сменой изоформ актина в культуре кардиомиоцитов. II Всероссийская конференция «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет». Санкт-Петербург, 20 - 22 октября. Тезисы докладов и сообщений. Цитология 57(9): 619.
3. **Bildyug N.**, Bozhokina E., Khaitlina S. 2015. Reorganization of the contractile system in rat neonatal cardiomyocytes is regulated by extracellular matrix. J Muscle Res Cell Motil. European Muscle Conference 2015 Abstracts, 36:577.
4. **Бильдюг Н.Б.**, Юдинцева Н.М. 2014. Влияние трехмерных условий культивирования на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов. 18-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». Пушино, 21 - 25 апреля. Сборник тезисов, с.11.
5. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г.П. 2013. Зависимость изменений в организации сократительного аппарата культивируемых кардиомиоцитов от секретируемых ими белков внеклеточного матрикса. Всероссийский симпозиум и Школа-конференция для молодых ученых «Биология клетки в культуре». Санкт-Петербург, 21-25 октября. Тезисы докладов и сообщений. Цитология, 55(9): 630-631.
6. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г. П. 2012. Влияние белков внеклеточного матрикса на сократительный аппарат кардиомиоцитов. III конференция молодых ученых Института цитологии РАН. Санкт-Петербург, 15 – 16 мая 2012. Тезисы докладов и сообщений. Цитология, 54(4): 336.

7. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г.П. 2008. Реорганизация сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования. 12-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». 10-14 ноября, Пущино. Сборник тезисов, с. 73-74.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арэ А.Ф., Поспелова Т.В., Пинаев Г.П. (1999) Особенности структурной организации актинового цитоскелета нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластов крысы и ее изменения под влиянием белков внеклеточного матрикса. *Цитология*, 41(8): 707-715.
2. Борисов А.Б., Гончарова Е.И., Пинаев Г.П., Румянцев П.П. (1989) Изменения локализации α -актинина и миофибриллогенез в кардиомиоцитах крыс при культивировании. *Цитология*, 31(6): 642-646.
3. Воронкина И.В., Харисов А.М., Блинова М.И., Парамонов Б.А., Потокин И.Л., Пинаев Г.П. (2002) Исследование протеолитической активности раневых экссудатов на модели воздушного пузыря у мышей. *Цитология*, 44: 270-276.
4. Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Пинаев Г.П. (2004) Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы A431, распластанных на иммобилизованных лигандах. *Цитология*, 46(1): 5-15.
5. Полянская Г.Г. (2014) Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. *Цитология*, 56(10): 697-707.
6. Тихонов А.Н. (1999) Молекулярные моторы. Ч. 2: Молекулярные основы биологической подвижности. *Соросовский Образовательный Журнал*, 6: 17-24.
7. Хайтлина С. Ю. (2007) Механизмы сегрегации изоформ актина в клетке. *Цитология*, 49(5): 345-354.
8. Ahuja P., Perriard E., Perriard J-C., Ehler E. (2004) Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes. *J Cell Sci*, 117: 3295–3306.
9. Ali M.A., Cho W.J., Hudson B., Kassiri Z., Granzier H., Schulz R. (2010) Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 122(20): 2039-47.
10. Ali M.A., Cho W.J., Hudson B., Kassiri Z., Granzier H., Schulz R. (2010) Titin is a target of matrix metalloproteinase-2. *Circulation*, 122: 2039–2047.
11. Ali M.A., Fan X., Schulz R. (2011) Cardiac sarcomeric proteins: novel intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in heart disease. *Trends Cardiovasc Med*, 21:112–8.
12. Ali M.H., Mungai P.T., Schumacker P.T. (2006) Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291: L38–45.
13. Antin P. B. and Ordahl C. P. (1991) Isolation and characterization of an avian myogenic cell line. *Dev Biol*, 143: 111-121.

14. Arenas A., Xu Y., Lopez-Jaramillo P., and Davidge S. T. (2004) Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF- α . *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 286(4): C779–C784.
15. Arnsdorf M.F. and Sawicki G.J. (1981) The effects of lysophosphatidylcholine, a toxic metabolite of ischemia, on the components of cardiac excitability in sheep Purkinje fibers. *Circ Res*, 49: 16–30.
16. Atherton B.T., Behnke M.M. (1988) Structure of myofibrils at extra-junctional membrane attachment sites in cultured cardiac muscle cells. *J Cell Sci*, 89: 97-106.
17. Ausma J., Litjens N., Lenders M.H., Duimel H., Mast F., Wouters L., Ramaekers F., Allessie M., Borgers M. (2001) Time course of atrial fibrillation-induced cellular structural remodeling in atria of the goat. *J Mol Cell Cardiol*, 33: 2083-94.
18. Averyhart-Fullard V., Fraker L.D., Murphy A.M., Solaro, R.J. (1994). Differential regulation of slow-skeletal and cardiac troponin I mRNA during development and by thyroid hormone in rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 26: 609–616.
19. Barallobre-Barreiro J., Didangelos A., Schoendube F.A., Drozdov I., Yin X., Fernández-Caggiano M., Willeit P., Puntmann V.O., Aldama-López G., Shah A.M., Doménech N., Mayr M. (2012) Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 125: 789-802.
20. Bassell G.J., Zhang H., Byrd A.L., Femino A.M., Singer R.H., Taneja K.L., Lifshitz L.M., Herman I.M., Kosik K.S. (1998) Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci*, 18(1):251-65.
21. Bax N.A., van Marion M.H., Shah B., Goumans M.J., Bouten C.V., van der Schaft D.W. (2012) Matrix production and remodeling capacity of cardiomyocyte progenitor cells during in vitro differentiation. *J Mol Cell Cardiol*, 53(4):497-508.
22. Bedada F.B., Chan S.S., Metzger S.K., Zhang L., Zhang J., Garry D.J., Kamp T.J., Kyba M., Metzger J.M. (2014) Acquisition of a quantitative, stoichiometrically conserved ratio metric marker of maturation status in stem cell-derived cardiac myocytes. *Stem Cell Rep*, 3: 594–605.
23. Bedada F.B., Wheelwright M., Metzger J.M. (2016) Maturation status of sarcomere structure and function in human iPSC-derived cardiac myocyte. *Biochim Biophys Acta*, 1863(7 Pt B): 1829-38.
24. Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. (2003)

- Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114: 763–776.
25. Belyantseva I.A., Perrin B.J., Sonnemann K.J., Zhu M., Stepanyan R., McGee J., Frolenkov G.I., Walsh E.J., Friderici K.H., Friedman T.B., Ervasti J.M. (2009) Gamma-actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(24): 9703-8
 26. Bencsik P., Paloczi J., Kocsis G.F., Pipis J., Beleczi I., Varga Z.V., Csonka C., Görbe A., Csont T., Ferdinandy P. (2014) Moderate inhibition of myocardial matrix metalloproteinase-2 by ilomastat is cardioprotective. *Pharmacological Research*, 80: 36-42.
 27. Bergeron S.E., Zhu M., Thiem S.M., Friderici K.H., Rubenstein P.A. (2010) Iondependent polymerization differences between mammalian beta- and gamma-nonmuscle actin isoforms. *J Biol Chem*, 285(21): 16087–16095.
 28. Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S., Zdunek S., Barnabé-Heider F., Walsh S., Zupicich J., Alkass K., Buchholz B.A., Druid H. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 324: 98-102.
 29. Bhana B., Iyer R.K., Chen W.L., Zhao R., Sider K.L., Likhitpanichkul M., Simmons C.A., Radisic M. (2010) Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells. *Biotechnol Bioeng*, 105(6): 1148-60.
 30. Bhavsar P.K., Dhoot G.K., Cumming D.V., Butler-Browne G.S., Yacoub M.H., Barton P.J. (1991) Developmental expression of troponin I isoforms in fetal human heart. *FEBS Lett*, 292: 5-8.
 31. Borg TK, Klevay LM, Gay RE, Siegel R, Bergin ME. 1985. Alteration of the connective tissue network of striated muscle in copper deficient rats. *Cardiology* 1985;17:1173–83.
 32. Borg T.K., Rubin K., Lundgren E., Borg K., Obrink B. (1984) Recognition of extracellular matrix components by neonatal and adult cardiac myocytes. *Dev Biol*, 104(1): 86-96.
 33. Borg, TK, Rubin K, Carver W, Samarel AM, and Terracio L. 1996. The cell biology of the cardiac interstitium, *Trends Cardiovasc. Med.*, 6, 65–70.
 34. Bowers S.L., Baudino T.A. (2012) Cardiac myocyte-fibroblast interactions and the coronary vasculature. *J Cardiovasc Transl Res*, 5: 783-793.
 35. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

36. Brenner C.A., Adler R.R., Rappolee D.A., Pedersen R.A., Werb Z. (1989) Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev*, 3: 848-859.
37. Bretscher A., Lynch W. (1985) Identification and localization of immunoreactive forms of caldesmon in smooth and nonmuscle cells: a comparison with the distributions of tropomyosin and alpha-actinin. *J Cell Biol*, 100(5): 1656-63.
38. Bunnell T.M., Ervasti J.M. (2010) Delayed embryonic development and impaired cell growth and survival in *Actg1* null mice. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(9):564-72.
39. Burgoyne T., Morris E.P., Luther P.K. (2015) Three-dimensional structure of vertebrate muscle Z-band: the small-square lattice Z-band in rat cardiac muscle. *J Mol Biol*, 427(22): 3527-37.
40. Butler G.S., Overall C.M. (2009) Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new ‘‘intracellular’’ substrates revealed by degradomics. *Biochemistry*, 48: 10830–10845.
41. Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y., Tang R.H., Tatsuguchi M., Huang Z.P., Chen J.F., Deng Z., Gunn B., Shumate J., Willis M.S., Selzman C.H., Wang D.Z. (2009) MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*, 119: 2772–2786.
42. Camelliti P., Borg T.K., Kohl P. (2005) Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 65: 40-51.
43. Castaldo C., Di Meglio F., Miraglia R., Sacco A.M., Romano V., Bancone C., Della Corte A., Montagnani S., Nurzynska D. (2013) Cardiac fibroblast-derived extracellular matrix (biomatrix) as a model for the studies of cardiac primitive cell biological properties in normal and pathological adult human heart. *Biomed Res Int*, 2013: 352370.
44. Chan Y.C., Ting S., Lee Y.K., Ng K.M., Zhang J., Chen Z., Siu C.W., Oh S.K., Tse H.F. (2013) Electrical stimulation promotes maturation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *J Cardiovasc Transl Res*, 6: 989–999.
45. Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. (1967) Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution, *J Biol Chem*, 251: 6062–6067.
46. Chapman R.E., Scott A.A., Deschamps A.M., Lowry A.S., Stroud R.E., Ikonomidis J.S., Spinale F.G. (2003) Matrix metalloproteinase abundance in human myocardial fibroblasts: effects of sustained pharmacologic matrix metalloproteinase inhibition, *J Mol Cell Cardiol*, 35: 539–548.

47. Chaponnier C., Gabbiani G.(2004) Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol*, 204(4): 386-95.
48. Chaponnier C., Goethals M., Janmey P.A., Gabbiani F., Gabbiani G., Vandekerckhove J. (1995) The specific NH₂-terminal sequence Ac-EEED of alpha-smooth muscle actin plays a role in polymerization in vitro and in vivo. *J Cell Biol*, 130: 887–895.
49. Chaturvedi P., Kalani A., Familtseva A., Kamat P.K., Metreveli N., Tyagi S.C. (2015) Cardiac tissue inhibitor of matrix metalloprotease 4 dictates cardiomyocyte contractility and differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes: Road to therapy *Int J Cardiol*,184: 350-63.
50. Chen JX., Krane M., Deutsch M.A., Wang L., Rav-Acha M., Gregoire S., Engels M.C., Rajarajan K., Karra R., Abel E.D., Wu J.C., Milan D., Wu S.M. (2012) Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res*, 111: 50–55.
51. Chen W. (1981) Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J Cell Biol*, 90(1): 187-200.
52. Cheung Y., Sawicki G., Wozniak M. W., Wang W., Radomski M. W., Schulz R. (2000) Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*, (1833–1839).
53. Clark E.A., Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 268: 233–239.
54. Claycomb W.C., Delcarpio J.B., Guice S.E., Moses R.L. (1989) Culture and characterization of fetal human atrial and ventricular cardiac muscle cells. *In vitro cell Dev Boil*, 25: 1114-1120.
55. Clément S., Chaponnier C., Gabbiani G. (1999) A subpopulation of cardiomyocytes expressing α -skeletal actin is identified by a specific polyclonal antibody. *Circ Res*, 85: e51-8.
56. Clément S., Orlandi A., Bocchi L., Pizzolato G., Foschini M.P., Eusebi V., Gabbiani G. (2003) Actin isoform pattern expression: a tool for the diagnosis and biological characterization of human rhabdomyosarcoma. *Virchows Arch*, 442(1): 31-8.
57. Clément S., Stouffs M., Bettiol E., Kampf S., Krause K.H., Chaponnier C., Jaconi M.J. (2007) Expression and function of alpha-smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation. *Cell Sci*, 120: 229-38.
58. Coker M. L., Doscher M. A., Thomas C. V., Galis Z. S., Spinale F. G. (1999) Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. *Am J*

Physiol, 277: 777-87.

59. Coker M.L., Thomas C.V., Clair M.J., Hendrick J.W., Krombach R.S., Galis Z.S., Spinale F.G. (1998) Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure. *Am J Physiol*, 274: 1516–1523.
60. Corda S., Samuel J.L., Rappaport L. (2000) Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev*, 5: 119–130.
61. Courtemanche N., Pollard T.D. (2013) Interaction of profilin with the barbed end of actin filaments. *Biochemistry*, 52(37): 6456-66.
62. Craig R., Greene L.E., Eisenberg E. (1985) Structure of the actin-myosin complex in the presence of ATP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(10): 3247-51.
63. Crawford K., Flick R., Close L., Shelly D., Paul R., Bove K., Kumar A., Lessard J. (2002) Mice lacking skeletal muscle actin show reduced muscle strength and growth deficits and die during the neonatal period. *Mol Cell Biol*, 22: 5887-5896.
64. Creemers E.E., Davis J.N., Parkhurst A.M., Leenders P., Dowdy K.B., Hapke E., Hauet A.M., Escobar P.G., Cleutjens J.P., Smits J.F., Daemen M.J., Zile M.R., Spinale F.G. (2003) Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284: H364-371.
65. Curtis M.W., Russell B. (2011) Micromechanical regulation in cardiac myocytes and fibroblasts: implications for tissue remodeling. *Pflugers Arch*, 462: 105-117.
66. Cury J.D. Campbell E.J., Lazarus C.J., Albin R.J., Welgus H.G. (1988) Selective Up-Regulation of Human Alveolar Macrophage Collagenase Production by Lipopolysaccharide and Comparison to Collagenase Production by Fibroblasts. *Immunol*, 141: 4306-4312.
67. Dabiri G.A., Turnacioglu K.K., Sanger J.M., Sanger J.W. (1997) Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 9493–9498.
68. De La Cruz E.M. (2005) Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: Isoform-dependent cooperative interactions. *J Mol Biol*, 346(2): 557-564.
69. Debessa C.R.G, Maifrino L.B.M, de Sousa R.R. (2001) Age related changes of collagen network of the human heart. *Mech Ageing Dev*, 122: 1049-1058.
70. Defilippi P., Gismondi A., Santoni A., Tarone G. (1997) in “Signal transduction by integrins”, Springer-Verlag, Berlin, Landes Bioscience, Austin, USA, 1997
71. DeNofrio D., Hooek T.C., Herman I.M. (1989) Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes. *J Cell Biol*, 109(1):191-202.
72. DeSouza R.R. (2002) Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*, 3:325-335.

73. Dhanaraj V., Ye Q.Z., Johnson L.L., Hupe D.J., Ortwine D.F., Dunbar J.B. Jr, Rubin J.R., Pavlovsky A., Humblet C., Blundell T.L. (1996) X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. *Structure*, 4:375-386.
74. Dickson S.R., Warburton M.J. (1992) Enhanced synthesis of gelatinase and stromelysin by myoepithelial cells during involution of the rat mammary gland. *J Histochem Cytochem*, 40: 697-703.
75. Discher D.E., Janmey P.A. Wang Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310: 1139-1143.
76. Doetschman T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morpholog*, 87: 27-45.
77. Doroszko A., Polewicz D., Cadete V.J., Sawicka J., Jones M., Szczesna-Cordary D., Cheung P.Y., Sawicki G. (2010) Neonatal asphyxia induces the nitration of cardiac myosin light chain 2 that is associated with cardiac systolic dysfunction. *Shock*, 34(6): 592-600.
78. Doroszko A., Polewicz D., Sawicka J., Richardson J.S., Cheung P.Y., Sawicki G. (2014) Cardiac dysfunction in an animal model of neonatal asphyxia is associated with increased degradation of MLC1 by MMP-2. *Basic Res Cardiol*, 104:669-79.
79. dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J. (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, 83(2): 433-73.
80. Driesen R.B., Nagaraju C.K., Abi-Char J., Coenen T., Lijnen P.J., Fagard R.H., Sipido K.R., Petrov V.V. (2014) Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 101(3): 411-22
81. Driesen R.B., Verheyen F.K., Debie W., Blaauw E., Babiker F.A., Cornelussen R.N., Ausma J., Lenders M.H., Borgers M., Chaponnier C., Ramaekers F.C. (2009) Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *J Cell Mol Med*, 13: 896-908.
82. Du A., Sanger J.M., Sanger J.W. (2008) Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Dev Biol*, 318(2): 236-46.
83. Duan Y., Liu Z., O'Neill J., Wan L.Q., Freytes D.O., Vunjak-Novakovic G. (2011) Hybrid gel composed of native heart matrix and collagen induces cardiadifferentiation of human embryonic stem cells without supplemental growth factors. *J Cardiovasc Transl Res*, 4(5): 605-615.

84. Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G., Clément S., Chaponnier C. (2009) Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J Cell Sci*, 122(16): 2980-2988.
85. Eble D., Spinale F. (1995) Contractile and cytoskeletal content, structure, and mRNA levels with tachycardia-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol*, 268: 2426-2439.
86. Edwards M., Zwolak A., Schafer D.A., Sept D., Dominguez R., Cooper J.A. (2014) Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(10):677-89.
87. Efe J.A., Hilcove S., Kim J., Zhou H., Ouyang K., Wang G., Chen J., Ding S. (2011) Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol*, 13: 215–222.
88. Eitan Y., Sarig U., Dahan N., Machluf M. (2010) Acellular cardiac extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering: in vitro cell support, remodeling, and biocompatibility. *Tissue Eng Part C Methods*, 16(4):671-683.
89. Engler J., Carag-Krieger C., Johnson C.P., Raab M., Tang H.-Y., Speicher D.W., Sanger J.W., Sanger J.M., Discher D.E. (2008) Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *Cell Sci*, 121(22): 3794-3802.
90. Eom T., Antar L.N., Singer R.H., Bassell G.J. (2003) Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J Neurosci*, 23(32): 10433-44.
91. Eppenberger-Eberhardt M., Flamme I., Kurer V., Eppenberger H.M. (1990) Reexpression of α -smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes. *Dev Biol*, 139: 269-278.
92. Erokhina I.L., Romyantsev P.P. (1986) Ultrastructure of DNA-synthesizing and mitotically dividing myocytes in sinoatrial node of mouse embryonal heart. *J Mol Cell Cardiol*, 18: 1219-1231.
93. Eschenhagen T., Fink C., Remmers U., Scholz H., Wattchow J., Weil J., Zimmerman W., Dohmen H.H., Schafer H., Bishopric N., Wakatsuki T., Elson E.L. (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb J*, 11: 683-694.
94. Evans S.M., Yelon D., Conlon F.L., Kirby M.L., Myocardial lineage development. *Circulation research*, 107: 1428-1444.

95. Farhadian F., Contard F., Sabri A., Samuel J.L., Rappaport L. (1996) Fibronectin and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. *Cardiovasc Res*, 32(3): 433-442.
96. Favot L., Hall S.M., Haworth S.G., Kemp P.R. (2005) Cytoplasmic YY1 is associated with increased smooth muscle-specific gene expression: implications for neonatal pulmonary hypertension. *Am J Pathol*, 167: 1497-1509.
97. Felkin L.E., Birks E.J., George R., Wong S., Khaghani A., Yacoub M.H., Barton P.J. (2006) A quantitative gene expression profile of matrix metalloproteinases (MMPS) and their inhibitors (TIMPS) in the myocardium of patients with deteriorating heart failure requiring left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant*, 25: 1413-1419.
98. Fingleton B. (2007) Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des*, 13: 333-346.
99. Fischman D.A. (1970) The synthesis and assembly of myofibrils in embryonic muscle. *Curr Top Dev Biol*, 5: 235-280.
100. Foldes G., Mioulane V., Wright J.S., Liu A.Q., Novak P., Merkely B., Gorelik J., Schneider M.D., Ali N.N., Harding S.E. (2011) Modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte growth: a testbed for studying human cardiac hypertrophy? *J Mol Cell Cardiol*, 50: 367-376.
101. Franke W.W., Stehr S., Stump S., Kuhn C., Heid H., Rackwitz H.R., Schnölzer M., Baumann R., Holzhausen H.J., Moll R. (1996) Specific immunohistochemical detection of cardiac/fetal alpha-actin in human cardiomyocytes and regenerating skeletal muscle cells. *Differentiation*, 60(4): 245-50.
102. Fu J.D., Rushing S.N., Lieu D.K., Chan C.W., Kong C.W., Geng L., Wilson K.D., Chiamvimonvat N., Boheler K.R., Wu J.C., Keller G., Hajjar R.J., Li R.A. (2011) Distinct roles of microRNA-1 and -499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PloS One*, 6: e27417.
103. Fyrberg E.A., Fyrberg C.C., Biggs J.R., Saville D., Beall C.J., Ketchum A. (1998) Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. *Biochem Genet*, 36: 271-287.
104. Galis Z., Muszynski M., Sukhova G., Simon-Morrissey E., Unemori E., Lark M., Amento E., Libby P. (1994) Cytokine stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res*, 75: 181-189.
105. Gao C.Q., Sawicki G., Suarez-Pinzon W.L., Csont T., Wozniak M., Ferdinandy P., Schulz R. (2003) Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res*, 57(2): 426-33.

106. Gao L., Chen L., Lu Z.Z., Gao H., Wu L., Chen Y.X., Zhang C.M., Jiang Y.K., Jing Q., Zhang Y.Y., Yang H.T. (2014) Activation of α_1 Adrenoceptors contributes to intermittent hypobaric hypoxia-improved post-ischemic myocardial performance via inhibiting MMP-2 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(11): H1569-81.
107. Garrels J., Gibson W. (1976) Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell*, 9: 793-805.
108. Gearing A.J.H., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M. Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, Leber T.M., Mangan M., Miller K., Nayee P., Owen K., Patel S., Thamas W., Wells G., Wood L.M., Woolley K. (1994) Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature*, 370: 555-557.
109. Giancotti F.G., Ruoslahti E. (1999) Integrin signaling. *Science*, 285: 1028-1032.
110. Gishto A., Farrell K., Kothapalli C.R. (2015) Tuning composition and architecture of biomimetic scaffolds for enhanced matrix synthesis by murine cardiomyocytes. *Biomed Mater Res A*, 103(2): 693-708.
111. Givvimani S., Tyagi N., Sen U., Mishra P.K., Qipshidze N., Munjal C., Vacek J.C., Abe O.A., Tyagi S.C. (2010) MMP-2/TIMP-2/TIMP-4 versus MMP-9/TIMP-3 in transition from compensatory hypertrophy and angiogenesis to decompensatory heart failure. *Arch Physiol Biochem*, 116: 63-72.
112. Goldsmith E.C., Borg T.K. (2002) The dynamic interaction of the extracellular matrix in cardiac remodeling. *J Card Fail*, 8: 314-318.
113. Golson M.L., Sanger J.M, Sanger J.W. (2004) Inhibitors arrest myofibrillogenesis in skeletal muscle cells at early stages of assembly. *Cell Motil Cytoskeleton*, 59: 1-16.
114. Goode B.L., Eck M.J. (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 76: 593-627.
115. Gordon W.E. 3rd. (1978) Immunofluorescent and ultrastructural studies of "sarcomeric" units in stress fibers of cultured non-muscle cells. *Exp Cell Res*, 117(2): 253-60.
116. Granger B.L., Lazarides E. (1979) Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell*, 18(4): 1053-63
117. Greene J., Wang M., Liu Y.E., Raymond L.A., Rosen C., Shi Y.E. (1996) Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem*, 271: 30375-30380.
118. Grinnell F. (1978) Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *Int Rev Cytol*, 53: 65-144.

119. Grinnell F. (1994) Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol*, 124: 401-404.
120. Guenther M.G., Frampton G.M., Soldner F., Hockemeyer D., Mitalipova M., Jaenisch R., Young R.A. (2010) Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7: 249-257.
121. Gunning P., Ferguson V., Brennan K., Hardeman E. (1997) Impact of alpha-skeletal actin but not alpha-cardiac actin on myoblast morphology. *Cell Struct Funct*, 22(1): 173-9.
122. Gupta V., Grande-Allen K.J. (2006) Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res*, 72: 375-383.
123. Gurel P.S., Ge P., Grintsevich E.E., Shu R., Blanchoin L., Zhou Z.H., Reisler E., Higgs H.N. (2014) INF2-mediated severing through actin filament encirclement and disruption. *Curr Biol*, 24(2): 156-164.
124. Gutierrez F.R., Lalu M.M., Mariano F.S., Milanezi C.M., Cena J., Gerlach R.F., Santos J.E., Torres- Duenas D., Cunha F.Q., Schulz R., Silva J.S. (2008) Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis*, 197:1468-1476.
125. Guyette J.P., Charest J.M., Mills R.W., Jank B.J., Moser P.T., Gilpin S.E., Gershlak J.R., Okamoto T., Gonzalez G., Milan D.J., Gaudette G.R., Ott H.C. (2016) Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res*, 118(1): 56-72.
126. Hadler-Olsen E., Solli A.I., Hafstad A., Winberg J.O., Uhlin-Hansen L. (2015) Intracellular MMP-2 activity in skeletal muscle is associated with type II fibers. *J Cell Physiol*, 230(1): 160-169.
127. Haller K., Rambaldi I., Daniels E., Featherstone M. (2004) Subcellular localization of multiple PREP2 isoforms is regulated by actin, tubulin, and nuclear export. *J Biol Chem*, 279: 49384-49394.
128. Hallmann R., Horn N., Selg M., Wendler O., Pausch F., Sorokin L.M. (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*, 85(3): 979-1000.
129. Handel S.E., Greaser M.L., Schultz E., Wang S.M., Bulinski J.C., Lin J.J., Lessard J.L. (1991) Chicken cardiac myofibrillogenesis studied with antibodies specific for titin and the muscle and nonmuscle isoforms of actin and tropomyosin. *Cell Tissue Res*, 263: 419-30.

130. Hannan A.J., Gunning P., Jeffrey P.L., Weinberger R.P. (1998) Structural compartments within neurons: developmentally regulated organization of microfilament isoform mRNA and protein. *Mol Cell Neurosci*, 11(5-6): 289-304.
131. Hansson E.M., Chien K.R. (2012) Reprogramming a broken heart. *Cell Stem Cell*, 11: 3-4.
132. Harder B.A., Hefti M.A., Eppenberger H.M., Schaub M.C. (1998) Differential protein localization in sarcomeric and nonsarcomeric contractile structures of cultured cardiomyocytes. *J Struct Biol*, 122: 162-175.
133. Harris E.S., Li F., Higgs H.N. (2004) The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J Biol Chem*, 279(19): 20076-20087.
134. Hartman M.E., Dai D.F., Laflamme M.A. (2016) Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 96: 3-17.
135. Hayward L.J., Zhu Y.Y., Schwartz R.J. (1988) Cellular localization of muscle and nonmuscle actin mRNAs in chicken primary myogenic cultures: the induction of alpha-skeletal actin mRNA is regulated independently of alpha-cardiac actin gene expression. *J Cell Biol*, 106(6): 2077-86.
136. Heggenes M., Wang K., Singer S. (1977) Intracellular distributions of mechanochemical proteins in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(9): 3883-3887
137. Hemler M. (1999) Integrin associated proteins. *Curr Opin Biol*, 10: 585-587.
138. Herman I.M. (1993) Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol*, 5(1): 48-55.
139. Herron G., Werb Z., Dwyer K., Banda M. (1986) Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem*, 261: 2810-2813.
140. Heymans S., Lutun A., Nuyens D., Theilmeier G., Creemers E., Moons L., Dyspersin G.D., Cleutjens J.P., Shipley M., Angellilo A., Levi M., Nübe O., Baker A., Keshet E., Lupu F., Herbert J.M., Smits J.F., Shapiro S.D., Baes M., Borgers M., Collen D., Daemen M.J., Carmeliet P. (1999) Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*, 1135-1142.
141. Hilenski L.L., Terracio L., Sawyer R., Borg T.K. (1989) Effects of extracellular matrix on cytoskeletal and myofibrillar organization in vitro. *Scanning Microsc*, 3(2): 535-48.
142. Hill M.A., Gunning P. (1993) Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J Cell Biol*, 122(4): 825-32.

143. Hiller O., Lichte A., Oberpichler A., Kocourek A., Tschesche H. (2000) Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem*, 275: 8–13.
144. Hofmann W.A., de Lanerolle P. (2006) Nuclear actin: to polymerize or not to polymerize. *J Cell Biol*, 172(4): 495-496.
145. Hofmann W.A., Stojiljkovic L., Fuchsova B., Vargas G.M., Mavrommatis E., Philimonenko V., Kysela K., Goodrich J.A., Lessard J.L., Hope T.J., Hozak P., de Lanerolle P. (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*, 6(11): 1094-1101.
146. Holledge M.M., Millward-Sadler S.J., Nuki G., Salter D.M. (2008) Mechanical regulation of proteoglycan synthesis in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes—roles for alpha5 and alphaVbeta5 integrins. *Biorheology*, 45: 275–288.
147. Holtzer H., Sasse J., Horwitz A., Antin P., Pacifici M. (1986) Myogenic lineages and myofibrillogenesis. *Bibl Anat*, 29: 109-125.
148. Hooek T.C., Newcomb P.M., Herman I.M. (1991) Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J Cell Biol*, 112(4): 653-664.
149. Horstmann S., Koziol J. A., Martinez-Torres F., Nagel S., Gardner H., Wagner S. (2009) Sonographic monitoring of mass effect in stroke patients treated with hypothermia. Correlation with intracranial pressure and matrix metalloproteinase 2 and 9 expression. *J Neurol Sci*, 276: 75-78.
150. Howard E.W., Crider B.J., Updike D.L., Bullen E.C., Parks E.E., Haaksma C.J., Sherry D.M., Tomasek J.J. (2012) MMP-2 expression by fibroblasts is suppressed by the myofibroblast phenotype. *Exp Cell Res*, 318(13): 1542-53.
151. Hsieh H.L., Lin C.C., Shih R.H., Hsiao L.D., Yang C.M. (2012) NADPH oxidase-mediated redox signal contributes to lipoteichoic acid-induced MMP-9 upregulation in brain astrocytes. *J Neuroinflammation*, 9: 110.
152. Hsieh H.L., Wang H.H., Wu W.B., Chu P.J., Yang C.M. (2010) Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF- κ B pathways, *J Neuroinflammation*, 7: 88.
153. Huang H., Kamm R.D., Lee R.T. (2004) Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am J Physiol: Cell Physiol*, 287: C1-C11.

154. Huxley A.F., Niedergerke R. (1954) Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, 173: 971-973.
155. Huxley H., Hanson J. (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 22: 973-976.
156. Hynes R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11–25.
157. Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B.G., Srivastava D. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 142: 375-386.
158. Imanaka-Yoshida K. (1997) Myofibrillogenesis in precardiac mesoderm explant culture. *Cell Struct Funct*, 22(1): 45-49.
159. Isenberg G., Rathke P., Hulsmann N., Franke W., Wohlfarth-Bottermann K. (1976) Cytoplasmic actomyosin fibrils in tissue culture cells: direct proof of contractility by visualization of ATP-induced contraction in fibrils isolated by laser micro-beam dissection. *Cell Tissue Res*, 27: 427-443.
160. Isobe Y., Shimada Y. (1983) Myofibrillogenesis in vitro as seen with the scanning electron microscope. *Cell Tissue Res*, 231(3): 481-94.
161. Israeli-Rosenberg S., Manso A.M., Okada H., Ross R.S. (2014) Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ Res*, 114(3): 572–586.
162. Jaeger M.A., Sonnemann K.J., Fitzsimons D.P., Prins K.W., Ervasti J.M. (2009) Context-dependent functional substitution of alpha-skeletal actin by gamma-cytoplasmic actin. *FASEB J*, 23(7): 2205-2214.
163. Janmey P. (1998) The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev.*, 78: 763-781.
164. Jayawardena T.M., Egemnazarov B., Finch E.A., Zhang L., Payne J.A., Pandya K., Zhang Z., Rosenberg P., Mirotsoy M., Dzau V.J. (2012) MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*, 110: 1465-1473.
165. Jugdutt B.I. (2003) Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 3(1): 1-30.
166. Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F., Holmes K.C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*, 347: 37-44.
167. Kabsch W., Vandekerckhove J. (1992) Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 21: 49-76.

168. Kaech S., Fischer M., Doll T., Matus A. (1997). Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines. *J Neurosci*, 17: 9565-9572.
169. Kamakura T., Makiyama T., Sasaki K., Yoshida Y., Wuriyanghai Y., Chen J., Hattori T., Ohno S., Kita T., Horie M., Yamanaka S., Kimura T. (2013) Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. *Circ J*, 77: 1307-1314.
170. Kang H., Bradley M.J., Elam W.A., De La Cruz E.M. (2013) Regulation of actin by ion-linked equilibria. *Biophys J*, 105(12): 2621-2628.
171. Kapoor P., Chen M., Winkler D.D., Luger K., Shen X. (2013) Evidence for monomeric actin function in INO80 chromatin remodeling. *Nat Struct Mol Biol*, 20(4): 426-432.
172. Karakozova M., Kozak M., Wong C.C., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd, Mogilner A., Zebroski H., Kashina A. (2006) Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science*, 313(5784): 192-196.
173. Karantalis V., Balkan W., Schulman I.H., Hatzistergos K.E., Hare J.M. (2012) Cell-based therapy for prevention and reversal of myocardial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303: H256-270.
174. Kawai T., Takahashi T., Esaki M., Ushikoshi H., Nagano S., Fujiwara H, Kosai K. (2004) Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J*, 68: 691-702.
175. Kehat I., Kenyagin-Karseni D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L. (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 108: 407-416.
176. Keith M.C.L., Bolli R. (2015) "String theory" of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. *Circ Res*, 116: 1216-1230.
177. Kelly D. (1969) The fine structure of skeletal muscle triad junctions. *J Ultrastruct Res*, 29(1): 37-49.
178. Kelly D.E. (1969) Myofibrillogenesis and Z-band differentiation. *Anat Rec*, 163(3): 403-25.
179. Khaitlina S.Y. (2001) Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol*, 202: 35-98.
180. Kislauskis E.H., Singer R.H. (1992) Determinants of mRNA localization. *Curr Opin Cell Biol*, 4(6): 975-8.

181. Kislauskis E.H., Zhu X., Singer R.H. (1997) beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J Cell Biol*, 136(6): 1263-1270.
182. Kjaer M. (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*, 84: 649-698.
183. Ko K.S., McCulloch C.A. (2001) Intercellular mechanotransduction: cellular circuits that coordinate tissue responses to mechanical loading. *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 1077-1083.
184. Kock L.M., Schulz R.M., van Donkelaar C.C., Thummler C.B., Bader A., Ito K. (2009) RGD-dependent integrins are mechanotransducers in dynamically compressed tissue-engineered cartilage constructs. *J Biomech*, 42: 2177-2182.
185. Koivukangas V., Kallioinen M., Autio-Harminen H., Oikarinen A. (1994) UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol*, 74: 279-282.
186. Koskivirta I., Kassiri Z., Rahkonen O., Kiviranta R., Oudit G.Y., McKee T.D., Kyto V., Saraste A., Jokinen E., Liu P.P., Vuorio E., Khokha R. (2010) Mice with tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (Timp4) deletion succumb to induced myocardial infarction but not to cardiac pressure overload. *J Biol Chem*, 285(32): 24487-24493.
187. Krause M., Gautreau A. (2014) Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(9): 577-90.
188. Kreis T., Birchmeier W. (1980) Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell*, 22: 555-61.
189. Kumar A., Crafword K., Close L., Madison M., Lorenz J., Doetschman T., Pawlowski S., Duffy J., Neumann J., Robbins J., Boivin G.P., O'Toole B.A., Lessard J.L. (1997) Rescue of cardiac α -actin-deficient mice by enteric smooth muscle-actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 4406-4411.
190. Kumar A., Glover G. (1995) Induction of tissue inhibitor and matrix metalloproteinases by serum in human heart-derived fibroblast and endomyocardial endothelial cells. *J Cell Biochem*, 58: 360-371.
191. Kurazumi H., Kubo M., Ohshima M., Yamamoto Y., Takemoto Y., Suzuki R., Ikenaga S., Mikamo A., Udo K., Hamano K., Li T.S. (2011) The effects of mechanical stress on the growth, differentiation, and paracrine factor production of cardiac stem cells. *PLoS One*, 6:e28890.
192. Kwak H.B. (2013) Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. *J Exerc Rehabil*, 9: 338-347.

193. Kwan J.A., Schulze C.J., Wang W., Leon H., Sariahmetoglu M., Sung M., Sawicka J., Sims D.E., Sawicki G., Schulz R. (2004) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J*, 18: 690-692.
194. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
195. Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V., Muskheli V., Fugate J.A., Dupras S.K., Reinecke H., Xu C., Hassanipour M., Police S., O'Sullivan C., Collins L., Chen Y., Minami E., Gill E.A., Ueno S., Yuan C., Gold J., Murry C.E. (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, 25: 1015-1024.
196. Lam A.Q., Freedman B.S., Morizane R., Lerou P.H., Valerius M.T., Bonventre J.V. (2014) Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers, *J Am Soc Nephrol*, 25: 1211-1225
197. Langer G.A., Frank J.S., Nudd L.M., Seraydarian K. (1976) Sialic acid: effect of removal on calcium exchangeability of cultured heart cells. *Science*, 193(4257): 1013-1015.
198. Larsson H., Lindberg U. (1988). The effect of divalent cations on the interaction between calf spleen profilin and different actins. *Biochim Biophys Acta*, 953(1): 95-105.
199. Lawrence J.B., Singer R.H. (1986) Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell*, 45(3): 407-15.
200. Lazarides E. (1975) Immunofluorescence studies on the structure of actin filaments in tissue culture cells. *J Histochem Cytochem*, 23(7) 507-528.
201. Lazarides E., Burridge K. (1975) Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell*, .6(3): 289-298.
202. Lazarides E., Gard D.L., Granger B.L., O'Connor C.M., Breckler J., Danto S.I. (1982) Regulation of the assembly of the Z-disc in muscle cells. *Prog Clin Biol Res*, 85: 317-40.
203. Lehman W., Galińska-Rakoczy A., Hatch V., Tobacman L.S., Craig R. (2009) Structural basis for the activation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *J Mol Biol*, 388(4): 673-81.
204. Leivo I., Vaheri A., Timpl R., Wartiovaara J. (1980) Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 76(1): 100-114.

205. Li F., Wang X., Bungler P.C., Gerdes A.M. (1997a) Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *J Mol Cell Cardiol*, 29(6): 1541-51.
206. Li F., Wang X., Gerdes A.M. (1997b) Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: II. Cytoskeletal organisation. *J Mol Cell Cardiol*, 29(6): 1553-65.
207. Li Y.Y., McTiernan C.F., Feldman A.M. (2000) Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res*, 46: 214-224.
208. Li Z., Li L., Zielke H.R., Cheng L., Xiao R., Crow M.T., Stetler-Stevenson W.G., Froehlich J., Lakatta E.G. (1996) Increased expression of 72-kd type IV collagenase MMP-2 in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 148:121-128.
209. Lian X., Zhang J., Azarin S.M., Zhu K., Hazeltine L.B., Bao X., Hsiao C., Kamp T.J., Palecek S.P. (2013) Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells 1207 by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*, 8: 162-175.
210. Lichnovský V. (1983) Early stages of myofibrillogenesis in human embryonic and fetal heart. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*, 104: 151-66.
211. Lieu D.K., Liu J., Siu C.W., McNerney G.P., Tse H.F., Abu-Khalil A., Huser T., Li R.A. (2009) Absence of transverse tubules contributes to non-uniform Ca(2+) wavefronts in mouse and human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev*, 18: 1493-1500.
212. Lin HB, Sharma K, Bialy D, Wawrzynska M, Purves R, Cayabyab FS, Wozniak M, Sawicki G. (2014) Inhibition of MMP-2 expression affects metabolic enzyme expression levels: Proteomic analysis of rat cardiomyocytes. *J Proteomics*, 2014, 106: 74-85.
213. Lindsey M.L., Escobar G.P., Mukherjee R., Goshorn D.K., Sheats N.J., Bruce J.A., Mains I.M., Hendrick J.K., Hewett K.W., Gourdie R.G., Matrisian L.M., Spinale F.G. (2006) Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction. *Circulation* 113: 2919-2928.
214. Lindsey M.L., Mann D.L., Entman M.L., Spinale F.G. (2003) Extracellular matrix remodeling following myocardial injury. *Ann Med*, 35: 316-326.
215. Liu N., Bezprozvannaya S., Williams A.H., Qi X., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. (2008) MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Gene Dev*, 22: 3242-3254.

216. Liu S., Calderwood D.A., Ginsberg M.H. (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*, 113(20): 3563-3571.
217. LoRusso S.M., Rhee D., Sanger J.M., Sanger J.W. (1997) Premyofibrils in spreading adult cardiomyocytes in tissue culture: evidence for reexpression of the embryonic program for myofibrillogenesis in adult cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 37: 183-198.
218. Lu M.H., DiLullo C., Schultheiss T., Holtzer S., Murray J.M., Choi J., Fischman D.A., Holtzer H. (1992) The vinculin/sarcomeric- α -actinin/ α -actin nexus in cultured cardiac myocytes. *J Cell Biol*, 117(5): 1007-1022.
219. Lu T.Y., Lin B., Kim J., Sullivan M., Tobita K., Salama G., Yang L. (2013) Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat Commun*, 4: 2307.
220. Lubit B.W., Schwartz J.H. (1980) An antiactin antibody that distinguishes between cytoplasmic and skeletal muscle actins. *J Cell Biol*, 86(3): 891-897.
221. Lundgren E., Gullberg D., Rubin K., Borg T.K., Terracio M.J., Terracio L. (1988) In vitro studies on adult cardiac myocytes: attachment and biosynthesis of collagen type IV and laminin. *J Cell Physiol*, 136(1): 43-53.
222. Lundgren E., Terracio L., Mårdh S., Borg T.K. (1985) Extracellular matrix components influence the survival of adult cardiac myocytes in vitro. *Exp Cell Res.*, 158(2): 371-81
223. Lundy S.D., Zhu W.Z., Regnier M., Laflamme M.A. (2013) Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, 22: 1991-2002.
224. Ma Z., Chang M.J., Shah R., Adamski J., Zhao X., Benveniste E.N. (2004) Brg-1 is required for maximal transcription of the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J Biol Chem*, 279: 46326-46334.
225. MacQueen A.J., Baggett J.J., Perumov N., Bauer R.A., Januszewski T., Schriefer L., Waddle J.A. (2005) ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation. *Mol Biol Cell*, 16(7): 3247-3259.
226. Majkut S.F., Discher D.E. (2012) Cardiomyocytes from late embryos and neonates do optimal work and striate best on substrates with tissue-level elasticity: metrics and mathematics. *Biomech Model Mechanobiol*, 11(8): 1219-1225.
227. Mannello F., Tonti G.A.M., Bagnara G.P., Papa S. (2006) Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24: 475-81.

228. Martin A.F., Phillips R.M., Kumar A., Crawford K., Abbas Z., Lessard J.L., de Tombe P., Solaro R.J. (2002) Ca(2+) activation and tension cost in myofilaments from mouse hearts ectopically expressing enteric gamma-actin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283: H642-649.
229. Matrisian L.M., Hogan B.L. (1990) Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr Top Dev Biol*, 24: 219-259.
230. Matsumura S., Iwanaga S., Mochizuki S., Okamoto H., Ogawa S., Okada Y. (2005) Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*, 115: 599-609.
231. Mauch C., Hatamochi A., Scharffetter K., Krieg T. (1988) Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three dimensional collagen gel. *Exper Cell Res*, 178: 493-503.
232. McDonald D., Carrero G., Andrin C., de Vries G., Hendzel M. (2006) Nucleoplasmic β -actin exists in a dynamic equilibrium between low mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol*, 172: 541-552.
233. McGarvey M.L., Baron-Van Evercooren A., Kleinman H.K., Dubois-Dalcq M. (1984) Synthesis and effects of basement membrane components in cultured rat Schwann cells. *Dev Biol*, 105(1): 18-28.
234. McHugh K.M., Crawford K., Lessard J.L. (1991) A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. *Dev Biol*, 148: 442-458.
235. McLaren A. (2001) Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*. 414(6859): 129-131.
236. Messerli J., Eppenberger-Eberhardt M., Rutishauser B., Schwarb P., von Arx P., Koch-Schneidemann S., Eppenberger H., Perriard J. (1993) Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy. *Histochemistry*, 100(3): 193-202.
237. Metzger J.M., Westfall M.V. (2004) Covalent and noncovalent modification of thin filament action: the essential role of troponin in cardiac muscle regulation. *Circ Res*, 94: 146-158.
238. Millward-Sadler S.J., Wright M.O., Lee H., Nishida K., Caldwell H., Nuki G., Salter D.M. (1999) Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J Cell Biol*, 145: 183-189
239. Miner J.H. (2012) The glomerular basement membrane. *Exp Cell Res*, 318(9): 973-978.

240. Mishra P.K., Chavali V., Metreveli N., Tyagi S.C. (2012) Ablation of MMP9 induces survival and differentiation of cardiac stem cells into cardiomyocytes in the heart of diabetics: a role of extracellular matrix. *Can J Physiol Pharmacol*, 90: 353-360.
241. Mishra P.K., Metreveli N., Tyagi S.C. (2010) MMP-9 gene ablation and TIMP-4 mitigate PAR-1-mediated cardiomyocyte dysfunction: a plausible role of dicer and miRNA. *Cell Biochem Biophys*, 57: 67-76.
242. Mishra P.K., Tyagi N., Sen U., Joshua I.G., Tyagi S.C. (2010) Synergism in hyperhomocysteinemia and diabetes: role of PPAR gamma and tempol. *Cardiovasc Diabetol*, 9: 49.
243. Miyamoto K., Gurdon J.B. (2011) Nuclear actin and transcriptional activation. *Commun Integr Biol*, 4(5): 582-3.
244. Mockrin S.C., Korn E.D. (1980) Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*, 19(23): 5359-5362.
245. Moll R., Holzhausen H.J., Mennel H.D., Kuhn C., Baumann R., Taege C., Franke W.W. (2006) The cardiac isoform of alpha-actin in regenerating and atrophic skeletal muscle, myopathies and rhabdomyomatous tumors: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Virchows Arch*, 449(2): 175-91.
246. Mollova M., Bersell K., Walsh S., Savla J., Das L.T., Park S.-Y., Silberstein L.E., dos Remedios C.G., Graham D., Colan S. (2013) Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(4): 1446-1451.
247. Moore J.C., Fu J., Chan Y.C., Lin D., Tran H., Tse H.F., Li R.A. (2008) Distinct cardiogenic preferences of two human embryonic stem cell (hESC) lines are imprinted in their proteomes in the pluripotent state. *Biochem Biophys Res Commun*, 372: 553-558.
248. Moretti A., Bellin M., Welling A., Jung C.B., Lam J.T., Bott-Flugel L., Dorn T., Goedel A., Hohnke C., Hofmann F., Seyfarth M., Sinnecker D., Schomig A., Laugwitz K.L. (2010) Patient specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*, 363: 1397-1409.
249. Moshal K.S., Tipparaju S.M., Vacek T.P., Kumar M., Singh M., Frank I.E., Patibandla P.K., Tyagi N., Rai J., Metreveli N., Rodriguez W.E., Tseng M.T., Tyagi S.C. (2008) Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(2): H890-897.

250. Mounier N., Perriard J.-C., Gabbiani G., Chaponnier C. (1997) Transfected muscle and nonmuscle actins are differentially sorted by cultured smooth muscle and nonmuscle cells. *J Cell Sci*, 110: 839-846.
251. Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spijker R., van den Brink S., Hassink R., van der Heyden M., Opthof T., Pera M., de la Riviere A.B., Passier R., Tertoolen L. (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*, 107: 2733-2740.
252. Murphy-Ullrich J.E. (2001) The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest*, 107(7): 785-790.
253. Nag A.C., Cheng M. (1981) Adult mammalian cardiac muscle cells in culture. *Tissue Cell*, 13: 515-523.
254. Nag A.C., Lee M.L., Sarkar F.H. (1996) Remodelling of adult cardiac muscle cells in culture: dynamic process of disorganization and reorganization of myofibrils. *J Muscle Res Cell Motility*, 17(3): 313-334.
255. Nag A.C., Zak R. (1979) Dissociation of adult mammalian heart into single cell suspension: an ultrastructural study. *J Anat*, 129: 541-549.
256. Nag S., Larsson M., Robinson R.C., Burtnick L.D. (2013) Gelsolin: the tail of a molecular gymnast. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 70(7): 360-384.
257. Naito A.T., Shiojima I., Akazawa H., Hidaka K., Morisaki T., Kikuchi A., Komuro I. (2006) Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 19812-19817.
258. Nakagawa M., Terracio L., Carver W., Birkedal-Hanse H, Borg T.K. (1992) Expression of collagenase and IL-1a in developing rat hearts. *Dev dyn*, 195: 87-99.
259. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., Yamanaka S. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 26: 101-106.
260. Namba Y., Ito M., Zu Y., Shigesada K., Maruyama K. (1992) Human T cell Lplastin bundles actin filaments in a calcium-dependent manner. *J Biochem*, 112(4): 503-507.
261. Naqvi N., Li M., Calvert J.W., Tejada T., Lambert J.P., Wu J., Kesteven S.H., Holman S.R., Matsuda T., Lovelock J.D., Howard W.W., Iismaa S.E., Chan A.Y., Crawford B.H., Wagner M.B., Martin D.I., Lefer D.J., Graham R.M., Husain A. (2014) A proliferative burst during preadolescence establishes the final cardiomyocyte number. *Cell*, 157(4): 795-807.

262. Németh Z.H., Deitch E.A., Davidson M.T., Szabó C., Vizi E.S., Haskó G. (2004) Disruption of the actin cytoskeleton results in nuclear factor-kappaB activation and inflammatory mediator production in cultured human intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol*, 200(1): 71-81.
263. Nichol J.W., Engelmayr G.C. Jr, Cheng M., Freed L.E. (2008) Co-culture induces alignment in engineered cardiac constructs via MMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 373(3): 360-365.
264. Nowak K.J., Ravenscroft G., Jackaman C., Filipovska A., Davies S.M., Lim E.M., Squire S.E., Potter A.C., Baker E., Clément S., Sewry C.A., Fabian V., Crawford K., Lessard J.L., Griffiths L.M., Papadimitriou J.M., Shen Y., Morahan G., Bakker A.J., Davies K.E., Laing N.G. (2009) Rescue of skeletal muscle alpha-actin-null mice by cardiac (fetal) alpha-actin. *J Cell Biol*, 185(5): 903-915.
265. Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L.H., Behringer R.R., Garry D.J., Entman M.L., Schneider M.D. (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 12313-12318.
266. Okada Y., Morodomi T., Enghild J.J., Suzuki K., Yasui A., Nakanishi I., Salvesen G., Nagase H. (1990) Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem*, 194: 721-730.
267. Oliver G.W., Stettler-Stevenson W.G., Kleiner D.E. (1999) Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors, in *Handbook of proteolytic enzymes*. San Diego: Acad Press, 61–76.
268. Olivetti G., Abbi R., Quaini F., Kajstura J., Cheng W., Nitahara J.A., Quaini E., Di Loreto C., Beltrami C.A., Krajewski S., Reed J.C., Anversa P. (1997) Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*, 336: 1131-1141, 1997.
269. Oltolina F., Zamperone A., Colangelo D., Gregoletto L., Reano S., Pietronave S., Merlin S., Talmon M., Novelli E., Diena M., Nicoletti C., Musarò A., Filigheddu N., Follenzi A., Prat M. (2015) Human Cardiac Progenitor Spheroids Exhibit Enhanced Engraftment Potential. *PLoS One*, 10(9): 0137999.
270. Onoue S., Kobayashi T., Takemoto Y., Sasaki I., Shinkai H. (2003) Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci*, 33: 105-111.

271. Otey C.A., Kalnoski M.H., Bulinski J.C. (1988) Immunolocalization of muscle and nonmuscle isoforms of actin in myogenic cells and adult skeletal muscle. *Cell Motil Cytoskeleton*, 9(4): 337-48.
272. Otey C.A., Kalnoski M.H., Lessard J.L., Bulinski J.C. (1986) Immunolocalization of the gamma isoform of nonmuscle actin in cultured cells. *J Cell Biol*, 102(5): 1726-37.
273. Otsuji T.G., Minami I., Kurose Y., Yamauchi K., Tada M., Nakatsuji N. (2010) Progressive maturation in contracting cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: qualitative effects on electrophysiological responses to drugs. *Stem Cell 1242 Res*, 4: 201-213.
274. Ovechkin A.V., Tyagi N., Rodriguez W.E., Hayden M.R., Moshal K.S., Tyagi S.C. (2005) Role of matrix metalloproteinase-9 in endothelial apoptosis in chronic heart failure in mice. *J Appl Physiol*, 99: 2398-2405.
275. Owens G.K., Kumar M.S., Wamhoff B.R. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 84(3): 767-801.
276. Paige S.L., Osugi T., Afanasiev O.K., Pabon L., Reinecke H., Murry C.E. (2010) Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One*, 5: e11134.
277. Pantaloni D., Le Clainche C., Carlier M.F. (2001) Mechanism of actin-based motility. *Science*, 292(5521): 1502-1506.
278. Pardo J.V., Pittenger M.F., Craig S.W. (1983) Subcellular sorting of isoactins: selective association of gamma actin with skeletal muscle mitochondria. *Cell*, 32(4): 1093-103.
279. Parker T.G., Packer S.E., Schneider M.D. (1990) Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 85: 507-514.
280. Paterson B.M., Eldridge J.D. (1984) alpha-Cardiac actin is the major sarcomeric isoform expressed in embryonic avian skeletal muscle. *Science*, 224(4656): 1436-1438.
281. Paul A.S., Pollard T.D. (2009) Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(8): 606-617.
282. Pauschinger M., Chandrasekharan K., Li J., Schwimmbeck P.L., Noutsias M., Schultheiss H.P. (2002) Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy. *Herz*, 27(7): 677-682.
283. Pavlovsky A.G., Williams M.G., Ye Q.Z., Ortwine D.F., Purchase C.F., White A.D., Dhanaraj V., Roth B.D., Johnson L.L., Hupe D., Humblet C., Blundell T.L. (1999) X-ray

- structure of human stromelysin catalytic domain complexed with nonpeptide inhibitors: implications for inhibitor selectivity. *Protein Sci*, 8: 1455-1462.
284. Pelham R. J., Wang Y.-L. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13661-13665.
285. Pelouch V., Dixon I.M., Golfman L., Beamish R.E., Dhalla N.S. (1993) Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem*, 129: 101–120.
286. Pepe I.M. (1971) Electron spin resonance studies of ultraviolet irradiation effects on some proteins. *Biophysik*, 7(2): 115-119.
287. Perrin B.J., Ervasti J.M. (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(10): 630-634.
288. Peterson L.J., Rajfur Z., Maddox A.S., Freel C.D., Chen Y., Edlund M., Otey C., Burridge K. (2004) Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Mol Biol Cell*, 15(7): 3497-3508.
289. Peyton S.R., Putnam A.J. (2005) Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J Cell Physiol*, 204: 198-209.
290. Pok S., Myers J.D., Madihally S.V., Jacot J.G. (2013) A multilayered scaffold of a chitosan and gelatin hydrogel supported by a PCL core for cardiac tissue engineering. *Acta Biomater*, 9: 5630-5642.
291. Pollard T.D., Almo S., Quirk S., Vinson V., Lattman E.E. (1994) Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Annu Rev Cell Biol*, 10: 207-49.
292. Pollard T.D., Borisy G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4): 453-65.
293. Polo J.M., Liu S., Figueroa M.E., Kulalert W., Eminli S., Tan K.Y., Apostolou E., Stadtfeld M., Li Y., Shioda T., Natesan S., Wagers A.J., Melnick A., Evans T., Hochedlinger K. (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 28: 848-855.
294. Porrello E.R., Mahmoud A.I., Simpson E., Hill J.A., Richardson J.A., Olson E.N., Sadek H.A. (2011) Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, 331: 1078-1080.
295. Potta S.P., Liang H., Winkler J., Doss M.X., Chen S., Wagh V., Pfannkuche K., Hescheler J., Sachinidis A. (2010) Isolation and functional characterization of alpha-smooth muscle actin expressing cardiomyocytes from embryonic stem cells. *Cell Physiol Biochem*, 25: 595-604.

296. Pournasr B., Khaloughi K., Salekdeh G.H., Totonchi M., Shahbazi E., Baharvand H. (2011) Concise review: alchemy of biology: generating desired cell types from abundant and accessible cells. *Stem Cells*, 29: 1933-1941.
297. Protze S., Khattak S., Poulet C., Lindemann D., Tanaka E.M., Ravens U. (2012) A new approach to transcription factor screening for reprogramming of fibroblasts to cardiomyocyte-like cells. *J Mol Cell Cardiol*, 53: 323-332.
298. Prowse A.B., Timmins N.E., Yau T.M., Li R.-K., Weisel R.D., Keller G., Zandstra P.W. (2014) Transforming the Promise of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to a Therapy: Challenges and Solutions for Clinical Trials. *Canadian Journal of Cardiology*, 30: 1335-1349.
299. Qian L., Huang Y., Spencer C.I., Foley A., Vedantham V., Liu L., Conway S.J., Fu J.D., Srivastava D. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 485: 593-598.
300. Qin H., Sun Y., Benveniste E.N. (1999) The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem*, 274: 29130-29137.
301. Rao J.N., Madasu Y., Dominguez R. (2014) Mechanism of actin filament pointed-end capping by tropomodulin. *Science*, 345(6195): 463-467.
302. Razeghi P., Young M.E., Alcorn J.L., Moravec C.S., Frazier O.H., Taegtmeier H. (2001) Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*, 104: 2923-2931.
303. Rhee D., Sanger J.M., Sanger J.W. (1994) The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 28: 1-24.
304. Richard D., Hollender P., Chenais B. (2002) Involvement of reactive oxygen species in aclarubicin-induced differentiation and invasiveness of HL-60 leukemia cells. *Int J Oncol*, 21: 393-399.
305. Risinger G.M. Jr., Hunt T.S., Updike D.L., Bullen E.C., Howard E.W. (2006) Matrix metalloproteinase-2 expression by vascular smooth muscle cells is mediated by both stimulatory and inhibitory signals in response to growth factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 36: 25915-25925.
306. Romanic A.M., Harrison S.M., Bao W., Burns-Kurtis C.L., Pickering S., Gu J., Grau E., Mao J., Sathe G.M., Ohlstein E.H., Yue T.L. (2002) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res*, 54: 549-558.

307. Rönty M., Taivainen A., Moza M., Otey C.A. (2004) Molecular analysis of the interaction between palladin and alpha-actinin. *Carpén O.FEBS Lett*, 566(1-3): 30-4.
308. Ross R.S., Borg T.K. (2001) Integrins and the myocardium. *Circ Res*, 88: 1112-1119.
309. Rouiller I., Xu X.P., Amann K.J., Egile C., Nickell S., Nicastro D., Li R., Pollard T.D., Volkman N., Hanein D. (2008) The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 180(5): 887-95.
310. Roy R.K., Sreter F.A., Sarkar S. (1979) Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. *Dev Biol*, 69(1): 15-30.
311. Rubenstein P. (1990) The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 12(7): 309-15.
312. Rubenstein P., Spudich J. (1977) Actin microheterogeneity in chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(1): 120-3.
313. Ruzicka D.L., Schwartz R.J. (1988). Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol*, 107:2575-2586.
314. Safer D., Elzinga M., Nachmias V.T. (1991) Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem*, 266(7): 4029-4032.
315. Sanger J.M., Mittal B., Pochapin M.B., Sanger J.W. (1986) Myofibrillogenesis in living cells microinjected with fluorescently labeled alpha-actinin. *J Cell Biol*, 102(6): 2053-66.
316. Sanger J.W., Chowrashi P., Shaner N.C., Spalthoff S., Wang J., Freeman N.L., Sanger J.M. (2002) Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin Orth Relat Res*, 403S: S153-162.
317. Sarasa-Renedo A., Chiquet M. (2005) Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Scand J Med Sci Sports*, 15; 223-230.
318. Sasse S., Brand N.J., Kyprianou P., Dhoot G.K., Wade R., Arai M., Periasamy M., Yacoub M.H., Barton P.J. (1993). Troponin I gene expression during human cardiac development and in endstage heart failure. *Circ Res*, 72: 932-938.
319. Sato H., Takahashi M., Ise H., Yamada A., Hirose S.-I., Tagawa Y.-I., Morimoto H., Izawa A., Ikeda U. (2006) Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 342: 107-12.
320. Sawicki G., Leon H., Sawicka J., Sariahmetoglu M., Schulze C.J., Scott P.G., Szczesna-Cordary D., Schulz R. (2005) Degradation of Myosin Light Chain in Isolated Rat Hearts Subjected to Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation*, 112: 544-552.

321. Sawtell N.M., Lessard J.L. (1989) Cellular distribution of smooth muscle actins during mammalian embryogenesis: expression of the alpha-vascular but not the gamma-enteric isoform in differentiating striated myocytes. *J Cell Biol*, 109(6 Pt 1): 2929-2937.
322. Schafer D.A., Waddle J.A., Cooper J.A. (1993) Localization of CapZ during myofibrillogenesis in cultured chicken muscle. *Cell Motil Cytoskeleton*. 25(4): 317-35.
323. Schaub M.C., Hefti M.A., Harder B.A., Eppenberger H.M. (1997). Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med*, 75: 901-920.
324. Schenke-Layland K., Rhodes K.E., Angelis E., Butylkova Y., Heydarkhan-Hagvall S., Gekas C., Zhang R., Goldhaber J.I., Mikkola H.K., Plath K., MacLellan W.R. (2008) Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells*, 26: 1537-1546.
325. Schildmeyer L.A., Braun R., Taffet G., DeBiasi M., Burns A.E., Bradley A., Schwartz R.J. (2000) Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. *FASEB J* 2000, 14: 2213-2220.
326. Schnee J.M., Hsueh W.A. (2000) Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res*. 46(2): 264-8.
327. Schoenwolf G.C., Garcia-Martinez V. (1995) Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos. *Cell Mol Biol Res*, 41(4): 233-40.
328. Schultheiss T., Lin Z.X., Lu M.H., Murray J., Fischman D.A., Weber K., Masaki T., Imamura M., Holtzer H. (1990) Differential distribution of subsets of myofibrillar proteins in cardiac nonstriated and striated myofibrils. *J Cell Biol*, 110: 1159-1172.
329. Schulz R. (2007) Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47: 211-42.
330. Scott-Burden T. (1994) Extracellular matrix: the cellular environment. *NiPS*, 9: 110-115.
331. Senyo S.E., Steinhauser M.L., Pizzimenti C.L., Yang V.K., Cai L., Wang M., Wu T.D., Guerquin-Kern J.L., Lechene C.P., Lee R.T. (2013) Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 493: 433-436.
332. Shattil S.J., Ginsberg M.H. (1997) Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest*, 100: 91-95.
333. Shawlot W., Deng J.M., Fohn L.E., Behringer R.R. (1998) Restricted beta-galactosidase expression of a hygromycin-lacZ gene targeted to the beta-actin locus and embryonic lethality of beta-actin mutant mice. *Transgenic Res*, 7(2): 95-103.

334. Shestakova E.A., Singer R.H., Condeelis J. (2001) The physiological significance of beta - actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(13): 7045-50
335. Sheterline P., Clayton J., Sparrow J. (1995) Actin. *Protein Profile*, 2(1): 1-103.
336. Shi S., Wu X., Wang X., Hao W., Miao H., Zhen L., Nie S. (2016) Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte-like cells is regulated by the combined low dose treatment of transforming growth factor- β 1 and 5-azacytidine. *Stem Cells Int*, 2016: 3816256.
337. Shiba Y., Fernandes S., Zhu W.Z., Filice D., Muskheli V., Kim J., Palpant N.J., Gantz J., Moyes K.W., Reinecke H., Van Biber B., Dardas T., Mignone J.L., Izawa A., Hanna R., Viswanathan M., Gold J.D., Kotlikoff M.I., Sarvazyan N., Kay M.W., Murry C.E., Laflamme M.A. (2012) Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature*, 489: 322-325.
338. Shikata Y., Rios A., Kawkitinarong K., DePaola N., Garcia J.G.N., Birukov K.G. (2005) Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodelling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells. *Exp Cell Res*, 304: 40-9.
339. Shmerling D., Danzer C.P., Mao X., Boisclair J., Haffner M., Lemaistre M., Schuler V., Kaeslin E., Korn R., Bürki K., Ledermann B., Kinzel B., Müller M. (2005) Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the beta-actin locus by Cre/lox cassette replacement. *Genesis*, 42(4): 229-35.
340. Shuster C.B., Lin A.Y., Nayak R., Herman I.M. (1996) Beta cap73: A novel beta actin-specific binding protein. *Cell Motil Cytoskeleton*, 35(3): 175-187.
341. Siedner S., Krüger M., Schroeter M., Metzler D., Roell W., Fleischmann B.K., Hescheler J., Pfitzer G., Stehle R. (2003). Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol*, 548: 493-505.
342. Simpson P., McGrath A., Savion S. (1982) Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res*, 51(6): 787-801.
343. Si-Tayeb K., Monvoisin A., Mazzocco C., Lepreux S., Decossas M., Cubel G., Taras D., Blanc J.F., Robinson D.R., Rosenbaum J. (2006) Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol*, 169(4): 1390-401.

344. Si-Yayeb K., Monvoisin A., Mazzocco C., Lepreux S., Rosenbaum J. (2003) Unexpected localization of the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) within the cell nucleus in liver cancer cells. *J Hepatology*, 38: 353.
345. Small J.V. (1988) The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev*, 1(1): 155-174.
346. Small J.V., Rottner K., Kaverina I., Anderson K.I. (1998) Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta*, 16: 271-281.
347. Soares C.P., Midlej V., de Oliveira M.E., Benchimol M., Costa M.L., Mermelstein C. (2012) 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PLoS ONE*, 7: e38147.
348. Soonpaa M.H., Kim K.K., Pajak L., Franklin M., Field L.J. (1996) Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 2): H2183-2189.
349. Spinale F., Mukherjee R., Fulbright B., Hu J., Crawford F., Zile M. (1993) Contractile properties of isolated porcine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 27: 304-311.
350. Spinale F.G. (2002) Matrix metalloprotease: regulation and dysfunction in the failing heart. *Circ Res*, 90: 520-30.
351. Spinale F.G. (2007) Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*, 87: 1285-1342.
352. Spinale F.G., Coker M.L., Krombach S.R., Mukherjee R., Hallak H., Houck W.V., Clair M.J., Kribbs S.B., Johnson L.L., Peterson J.T., Zile M.R. (1999) Matrix metalloprotease inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and functions. *Circ Res*, 85: 364-76.
353. Spinale F.G., Coker M.L., Thomas C.V., Walker J.D., Mukherjee R., Hebbar L. (1998) Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocytes function. *Circ Res*, 82: 482-95.
354. Spinale F.G., Zile M.R. (2006) Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation*, 113: 2089-2096.
355. Spoto B., Testa A., Parlongo R.M., Tripepi G., D'Arrigo G., Mallamaci F., Zoccali C. (2012) Tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1, genetic markers of insulin resistance and cardiomyopathy in patients with kidney failure. *Nephrol Dial Transplant*, 27: 2440-2445.

356. Stastna M., Chimenti I., Marbán E., Van Eyk J.E. (2010) Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. *Proteomics*, 10: 245-253.
357. Stawowy P., Margeta C., Kallisch H., Seidah N.G., Chrétien M., Fleck E., Graf K. (2004) Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF- β 1 involves furin-convertase. *Cardiovascular Research*, 63(1): 87-97.
358. Storti R.V., Rich A. (1976) Chick cytoplasmic actin and muscle actin have different structural genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73(7): 2346-50.
359. Sundell C.L., Singer R.H. (1991) Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science*, 253(5025): 1275-1277.
360. Sung M.M., Schulz C.G., Wang W., Sawicki G, Bautista-López N.L., Schulz R. (2007) Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein [alpha]-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*, 43: 429-436.
361. Suurmeijer A.J.H., Clément S., Francesconi A., Bocchi L., Angelini A., Van Veldhuizen J., Spagnoli L.G., Gabbiani G., Orlandi A. (2003) α -Actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. *J Pathol*, 199: 387-397.
362. Swynghedauw B. (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*, 79: 215-262.
363. Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676.
364. Takahashi S., Barry A.C., Factor S.M. (1990) Collagen degradation in ischemic rat hearts. *Biochem J*, 265: 233-241.
365. Tang X.L., Rokosh G., Sanganalmath S.K., Yuan F., Sato H., Mu J., Dai S., Li C., Chen N., Peng Y., Dawn B., Hunt G., Leri A., Kajstura J., Tiwari S., Shirk G., Anversa P., Bolli R. (2010) Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*, 121: 293-305.
366. Terracio L., Rubin K., Gullberg D., Balog E., Carver W., Jyring R., Borg T. (1991) Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ Res*, 68:734-44.
367. Thomas C., Coker M.L., Zellner J.L., Handy J.R., Crumbley A.J., Spinale F.G. (1998) Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 97: 1708-1715.

368. Thyberg J., Hultgardh-Nilsson A. (1994) Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res*, 276(2): 263-271.
369. Tian H., Cimini M., Fedak P.W., Altamentova S., Fazel S., Huang M.L., Weisel R.D., Li R.K. (2007) TIMP-3 deficiency accelerates cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 43: 733-743.
370. Tiruchinapalli D.M., Oleynikov Y., Kelic S., Shenoy S.M., Hartley A., Stanton P.K., Singer R.H., Bassell G.J. (2003) Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci*, 23(8): 3251-3261.
371. Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 349-363.
372. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76(9): 4350-4354.
373. Tucker R., Sanford K., Frankel R. (1978) Tubulin and actin in paired nonneoplastic and spontaneously transformed neoplastic cell lines in vitro: fluorescent antibody studie. *Cell*, 13(4): 629-42.
374. Tuckwell D., Humphries M.J. (1997) Ligand binding sites within the integrins. In: *Integrin-ligand interaction*. Eds: Eble J.A., Kühn K., Landes, Texas.
375. Turpeenniemi-Hujanen T., Thorgeirsson U., Rao C., Liotta L. (1986) Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *J Biol Chem*, 261: 1883-1889.
376. Tyagi S., Kumar S., Glover G. (1995) Induction of tissue inhibitor and matrix metalloproteinases by serum in human heart-derived fibroblast and endomyocardial endothelial cells. *J Cell Biochem*, 58: 360-371.
377. Tyagi S.C. (1997) Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Mol Cell Biochem*. 168: 1-12.
378. Tyagi S.C., Kumar S.G., Haas S.J., Reddy H.K., Voelker D.J., Hayden M.R., Demmy T.L., Schmaltz R.A., Curtis J.J. (1996) Post-transcriptional regulation of extracellular matrix metalloproteinase in human heart end-stage failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 28: 1415-1428.
379. Tyagi S.C., Ratajska A., Weber K.T. (1993) Myocardial matrix metalloproteinase(s): localization and activation. *Mol Cell Biochem*, 126: 49-59.

380. Tzima E., Trotter P.J., Orchard M.A., Walker J.H. (2000) Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem*, 267(15): 4720-4730.
381. Valente M., Nascimento D.S., Cumano A., Pinto-do-Ó P. (2014) Sca-1(+) cardiac progenitor cells and heart-making: a critical synopsis. *Stem Cells Dev*, 23(19): 2263-2273.
382. van Berlo J.H., Kanisicak O., Maillet M., Vagnozzi R.J., Karch J., Lin S.C., Middleton R.C., Marban E., Molkenin J.D. (2014) c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*, 509: 337-341.
383. van Bilsen M., Chien K.R. (1993). Growth and hypertrophy of the heart: Toward an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc Res*, 27: 1140-1149.
384. Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Rudd P.M., Dwek R.A., Opdenakker G. (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochem and Molec Biology*, 37(6): 375-536.
385. Vandekerckhove J., Bugaisky G., Buckingham M. (1986) Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. *J Biol Chem*, 261: 1838-1843.
386. Vandekerckhove J., Weber K. (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol*, 126: 783-802.
387. Viappiani S., Nicolescu A.C., Holt A., Sawicki G., Crawford B.D., León H., van Mulligen T., Schulz R. (2009) Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol*, 77: 826-834.
388. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463: 1035-1041.
389. Viita T., Vartiainen M.K. (2016) From Cytoskeleton to Gene Expression: Actin in the Nucleus. *Handb Exp Pharmacol* 2016; Jun 18 [Epub ahead of print].
390. Visse R., Nagase H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8): 827-839.
391. Vliegen H.W., van der Laarse A., Cornelisse C.J., Eulderink F. (1991) Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J*, 12: 488-494.

392. von Arx P., Bantle S., Soldati T., Perriard J.C. (1995) Dominant negative effect of cytoplasmic actin isoforms on cardiomyocytes cytoarchitecture and function. *J Cell Biol*, 131: 1759-1773.
393. von der Ecken J., Müller M., Lehman W., Manstein D.J., Penczek P.A., Raunser S. (2015) Structure of the F-actin-tropomyosin complex. *Nature*, 519(7541): 114-117.
394. Wagner C.R., Mahowald A.P., Miller K.G. (2002) One of the two cytoplasmic actin isoforms in *Drosophila* is essential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(12): 8037-8042.
395. Wahl L.M., Corcoran M.E., Mergenhagen S.E., Finbloom D.S. (1990) Inhibition of phospholipase activity in human monocytes by IFN- γ blocks endogenous prostaglandin E₂-dependent collagenase production. *Immunol*, 144: 3518–22.
396. Walsh S., Pontén A., Fleischmann B.K., Jovinge S. (2010) Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo - an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res*, 86(3): 365-373.
397. Wang J., Shaner N., Mittal B., Zhou Q., Chen J., Sanger J.M., Sanger J.W. (2005) Dynamics of Z-band based proteins in developing skeletal muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 61: 34-48.
398. Wang J., Zohar R., McCulloch C.A. (2006). Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res*, 312: 205-214.
399. Wang T.L., Yang Y.H., Chang H., Hung C.R. (2004) Angiotensin II signals mechanical stretch-induced cardiac matrix metalloproteinase expression via JAK-STAT pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 37: 785-794.
400. Wang W., Sawicki G., Schulz R. (2002a) Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovas Res*, 53: 165-174.
401. Wang W., Schulze C.J., Suarez-Pinzon W.L., Dyck J.R.B., Sawicki G., Schulz R. (2002b) Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*, 106: 1543-1549.
402. Weber A., Nachmias V.T., Pennise C.R., Pring M., Safer D. (1992). Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin: Implications for actin sequestration in resting platelets. *Biochemistry*, 31(27): 6179-6185.
403. Werb Z., Alexander C. (1993) Proteinases and matrix degradation. In: *Textbook of Rheumatology*, edited by W. N. Kelly. New York: Saunders: 248-268.
404. Werb Z., Alexander C.M., Adler R.R. (1992) Expression and function of matrix metalloproteinases in development. *Matrix Suppl*, 1: 337-343.

405. Werb Z., Tremble P., Behrendtsen O., Crowley E., Damsky C. (1989) Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol*, 109: 877-889.
406. Whalen R., Butler-Browne G., Gros F. (1976) Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73(6): 2018-2022.
407. White J, Barro M.V., Makarenkova H.P., Sanger J.W., Sanger J.M. (2014) Localization of sarcomeric proteins during myofibril assembly in cultured mouse primary skeletal myotubes. *Anat Rec (Hoboken)*, 297(9): 1571-84.
408. Willems E., Bushway P.J., Mercola M. (2009) Natural and synthetic regulators of embryonic stem cell cardiogenesis. *Pediatr Cardiol*, 30: 635-642.
409. Willits R.K., Skornia S.L. (2004) Effect of collagen gel stiffness on neurite extension. *J Biomater Sci Polym Ed*, 15: 1521-1531.
410. Winegrad S., Wisnewsky C., Schwartz K. (1990) Effect of thyroid hormone on the accumulation of mRNA for skeletal and cardiac alpha-actin in hearts from normal and hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(7): 2456-60.
411. Woessner J. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 5: 2145-2154.
412. Woo C.H., Lim J.H., Kim J.H. (2004) Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J. Immunol*, 173: 6973-6980.
413. Woodcock-Mitchell J., Mitchell J.J., Low R.B., Kieny M., Sengel P., Rubbia L., Skalli O., Jackson B., Gabbiani G. (1988) Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation*. 39(3): 161-6.
414. Wright M.O., Nishida K., Bavington C., Godolphin J.L., Dunne E., Walmsley S., Jobanputra P., Nuki G., Salter D.M. (1997) Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for alpha 5 beta 1 integrin as a chondrocyte mechanoreceptor. *J Orthop Res*, 15: 742-747.
415. Xu C. (2012) Turning cardiac fibroblasts into cardiomyocytes in vivo. *Trends Mol Med*, 18: 575-576.
416. Yabluchanskiy A., Ma Y., Chiao Y.A., Lopez E.F., Voorhees A.P., Toba H., Hall M.E., Han H.C., Lindsey M.L., Jin Y.F. (2014) Cardiac aging is initiated by matrix metalloproteinase-9-mediated endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306: H1398-H1407.

417. Yabluchanskiy A., Ma Y., Iyer R.P., Hall M.E., Lindsey M.L. (2013) Matrix metalloproteinase-9: many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology*, 28: 391-403.
418. Yang L., Soonpaa M.H., Adler E.D., Roepke T.K., Kattman S.J., Kennedy M., Henckaerts E., Bonham K., Abbott G.W., Linden R.M., Field L.J., Ueno S., Weidinger G., Osugi T., Kohn A.D., Golob J.L., Pabon L., Reinecke H., Moon R.T., Murry C.E. (2007) Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 9685-9690.
419. Yang L., Soonpaa M.H., Adler E.D., Roepke T.K., Kattman S.J., Kennedy M., Henckaerts E., Bonham K., Abbott G.W., Linden R.M., Field L.J., Keller G.M. (2008) Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell- derived population. *Nature*, 453: 524-528.
420. Yang X., Rodriguez M., Pabon L., Fischer K.A., Reinecke H., Regnier M., Sniadecki N.J., Ruohola-Baker H., Murry C.E. (2014) Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*, 72: 296-304.
421. Yano Y., Geibel J., Sumpio B.E. (1996) Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. *Am J Physiol*, 271: C635-649.
422. Yao X., Cheng L., Forte J.G. (1996) Biochemical characterization of ezrin-actin interaction. *J Biol Chem*, 271(12): 7224-7229.
423. Yoshigi M., Hoffman L.M., Jensen C.C., Yost H.J., Beckerle M.C. (2005) Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol*, 171: 209-15.
424. Young S.R., Gerard-O'Riley R., Kim J.B., Pavalko F.M. (2009) Focal adhesion kinase is important for fluid shear stress-induced mechanotransduction in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 24: 411-424.
425. Yurchenco P.D., Amenta P.S., Patton B.L. (2004) Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biology*, 22(7): 521-538.
426. Zhang D., Shadrin I.Y., Lam J., Xian H.Q., Snodgrass H.R., Bursac N. (2013) Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes. *Biomaterials*, 34: 5813-5820.
427. Zhang J., Klos M., Wilson G.F., Herman A.M., Lian X., Raval K.K., Barron M.R., Hou L., Soerens A.G., Yu J., Palecek S.P., Lyons G.E., Thomson J.A., Herron T.J., Jalife J., Kamp

- T.J. (2012) Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ Res*, 111: 1125-1136.
428. Zhou H.Z., Ma X., Gray M.O., Zhu B.Q., Nguyen A.P., Baker A.J., Simonis U., Cecchini G., Lovett D.H., Karliner J.S. (2007) Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, 358: 189-195.
429. Zhu W.Z., Xie Y., Moyes K.W., Gold J.D., Askari B., Laflamme M.A. (2010) Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res*, 107: 776-786.
430. Zimmermann W.H., Melnychenko I., Eschenhagen T. (2004) Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials*, 25: 1639-1647.