

## Wstępne badania ultrastrukturalne kardiomiocytów dzieci z wrodzonymi wadami serca

Preliminary ultrastructural investigations of cardiomyocytes from children with different types of congenital heart malformations



Dariusz Tosik<sup>1</sup>, Jacek Moll<sup>2</sup>, Jadwiga Moll<sup>3</sup>, Hieronim Bartel<sup>1</sup>, Andrzej Kulig<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Zakład Histologii i Ultrastruktury Tkanek, Uniwersytet Medyczny, Łódź

<sup>2</sup>Klinika Kardiologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

<sup>3</sup>Klinika Kardiologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

<sup>4</sup>Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

Kardiologia i Torakochirurgia Polska 2009; 6 (2): 176–180

### Streszczenie

**Wstęp:** Prezentujemy wstępne badania ultrastrukturalne kardiomiocytów dzieci operowanych z powodu strukturalnych wad wrodzonych mięśnia sercowego.

**Cel:** Określenie charakteru zmian ultrastrukturalnych w kardiomiocytach trzech różnych rodzajów wad serca.

**Materiał i metody:** Fragmenty tkanek uzyskiwano w trakcie kardiologicznej korekcji wad wrodzonych. Badania ultrastrukturalne przeprowadzono w trzech grupach pacjentów w wieku od 11 dni do 6,5 roku. Oceniano zmiany ultrastrukturalne w kardiomiocytach pochodzących z następujących wad serca: ubytek międzykomorowy (VSD), tetralogia Fallota (TOF) i zespół hipoplazji lewego serca (HLHS). Grupę odniesienia stanowili pacjenci z grupy VSD.

**Wyniki:** W kardiomiocytach pochodzących z grupy VSD nie obserwowano istotnych cech uszkodzenia. W grupach TOF i HLHS w obrębie jąder komórkowych stwierdzono morfologiczne cechy apoptozy, polegające na ich znacznym obkurczeniu oraz charakterystycznej, brzeżnej kondensacji chromatyny. Z kolei mitochondria charakteryzowały się różnego stopnia uszkodzeniem polegającym na ich obrzęku, rozrzedzeniu, a w niektórych przypadkach – wakuolizacji macierzy i uszkodzeniu błon wewnętrznych. Obserwowano również nieprawidłowy układ włókien kurczliwych sarkomerów kardiomiocytów grup TOF i HLHS. W obrębie wstawek obserwowano odkładanie się elektronowo gęstej substancji.

**Wnioski:** Obserwacje ultrastrukturalne wskazują, że prawdopodobny mechanizm uszkodzenia kardiomiocytów w grupach TOF i HLHS jest ściśle związany z apoptozą aktywowaną na ścieżce mitochondrialnej. Zmiany morfologii wstawek sugerują również możliwość uszkodzenia białek CAM odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg organogenezy oraz tworzących aparat kotwiczący miofilamentów.

**Słowa kluczowe:** kardiomiocyty, wady wrodzone, ultrastruktura.

### Abstract

**Introduce:** We present ultrastructural investigations of cardiomyocytes of three types of heart congenital malformations.

**Aim:** Characterization of ultrastructural changes in cardiomyocytes from three different heart malformations.

**Material and Methods:** Tissue blocks were obtained during surgical correction of heart congenital malformations. Ultrastructural investigations were performed on three groups of patients. Their age varied from 11 days to 6.5 years. Ultrastructural changes of cardiomyocytes from the below mentioned congenital malformations were evaluated: ventricular septal defect (VSD), tetralogy of Fallot (TOF) and hypoplastic left heart syndrome (HLHS). The reference group was VSD.

**Results:** In cardiomyocytes of the VSD group significant features of injury were not observed. In nuclei of cardiomyocytes of TOF and HLHS groups, morphological signs of apoptosis, such as nuclear shrinkage and marginal chromatin condensation, were observed.

Mitochondria, on the other hand, were characterized by damages of a different degrees based on their oedema, matrix vacuolization and inner membranes injury. Abnormal configuration of myofilaments of cardiomyocytes' sarcomeres in case of TOF and HLHS was also observed. Within intercalated disks deposition of electron dense substance was observed.

**Conclusions:** Ultrastructural investigations indicate that the probable mechanism of cardiomyocyte injury in TOF and HLHS groups is closely connected with apoptosis activated in the mitochondrial pathway. Morphological changes of intercalated disks also suggest the possibility of injury of CAM proteins, responsible for normal organogenesis and forming the anchoring apparatus of myofilaments.

**Key words:** cardiomyocytes, congenital malformations, ultrastructure.

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Dariusz Tosik, Zakład Histologii i Ultrastruktury Tkanek, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź, tel./faks +48 42 632 40 87, e-mail: tosik@achilles.wam.lodz.pl

## Wstęp

W populacji światowej rodzi się rocznie około 1% dzieci z różnego rodzaju wrodzonymi wadami serca. Rocznie, w Klinice Kardiologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi z powodu różnego rodzaju wrodzonych wad serca operowanych jest około 250 dzieci. Wrodzone wady serca powstają pomiędzy 6. a 8. tygodniem życia płodowego, w okresie formowania się układu sercowo-naczyniowego. W zależności od rodzaju wady, jej manifestacja kliniczna może pojawiać się bezpośrednio po urodzeniu, w okresie dziecięcym lub, jeśli pacjent przeżyje, po osiągnięciu dojrzałości. Wady wrodzone, ze względu na występowanie zaburzeń hemodynamicznych, mogą w sposób istotny wpływać na prenatalny i pourodzeniowy rozwój dziecka.

Badania ultrastruktury mięśnia sercowego są prowadzone od wielu lat. Jednak w bazie MEDLINE na 3169 publikacji z lat 1965–2005 dotyczących ultrastrukturalnych badań serca u ludzi zarejestrowano jedynie 23 odnoszące się do pacjentów z tetralogią Fallota i ani jednej hipoplazji lewego serca. Większość prac zajmujących się problematyką molekularnych i komórkowych mechanizmów powstawania wrodzonych wad serca opiera się na badaniach modelu zwierzęcego lub komórek pochodzących z hodowli tkankowych.

## Cel pracy

Celem podjętych badań jest określenie charakteru morfologicznych zmian w kardiomiocytach dzieci z wrodzonymi wadami serca.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na fragmentach mięśnia sercowego, przeznaczonych do rutynowej diagnostyki patomorfologicznej, uzyskanych śródoperacyjnie w trakcie kardiologicznej korekcji wrodzonych wad serca. Do badań kwalifikowano pacjentów z wadami niesiniczymi i sinicznymi. Przebadano materiał pochodzący od 5 dzieci operowanych z powodu tetralogii Fallota (ang. *tetralogy of Fallot* – TOF), 6 dzieci operowanych z powodu zespołu niedorozwoju lewego serca (ang. *hypoplastic left heart syndrome* – HLHS) i 4 dzieci operowanych z powodu ubytku międzykomorowego (ang. *ventricular septal defect* – VSD). Wiek dzieci wahał się w granicach 11 dni – 6,5 roku. Fragmenty tkanek były niezwłocznie po pobraniu utrwalane przez 2 godziny w temperaturze 4°C, w 5-procentowym aldehydzie glutarowym z dodatkiem formaldehydu, następnie dotrwalane czterotlenkiem osmu. Po zatopieniu w Eponie krojono je na skrawki półcienkie o grubości 1 µm i cienkie o grubości 60 nm. Skrawki cienkie kontrastowano automatycznie w aparacie Ultrastainer LKB octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Następnie oglądano je w transmisyjnym mikroskopie elektronowym Philips EM301. Analizie morfologicznej poddano przede wszystkim te fragmenty preparatów, w których widoczne były podłużne przekroje włókien mięśniowych. W przekrojach poprzecznych badano jedynie, czy zachowany jest regularny układ włókien w poszczególnych częściach sarkomerów.

Zgodę na przeprowadzenie badań wydała Komisja Bioetyki Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

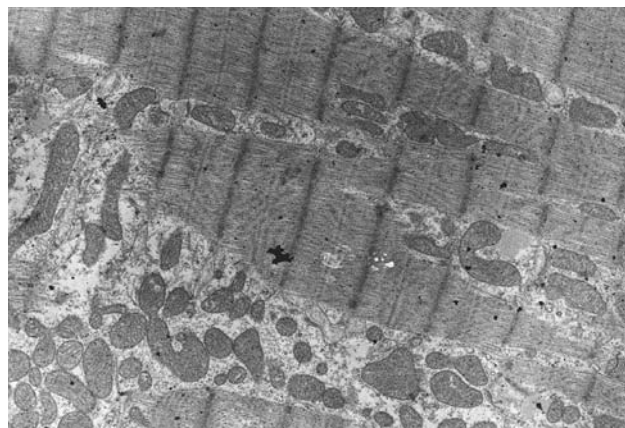
## Wyniki

Ultrastruktura kardiomiocytów w badanych grupach różniła się w zależności od rodzaju wady. W przypadku ubytków międzykomorowych (VSD) w kardiomiocytach nie stwierdzono istotnych odchyśleń od prawidłowego obrazu. Układ morfologiczny włókien oraz innych organelli komórkowych był typowy (ryc. 1).

W przypadku kardiomiocytów pochodzących z dwóch pozostałych grup (TOF, HLHS) obserwowano zmiany zarówno w obrębie cytoplazmy, jak i przestrzeni pozakomórkowej.

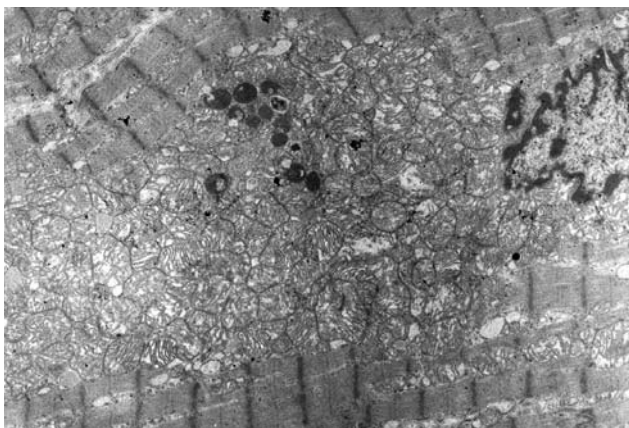
W obrębie cytoplazmy odchylenia od stanu prawidłowego dotyczyły przede wszystkim mitochondriów. Obserwowano ogniska hipertrofii mitochondriów, w obrębie których dochodziło do znacznego zwiększenia ich liczby. W ogniskach uszkodzenia profile mitochondrialne były kształtu owalnego. Ich przedział wewnętrzny był poszerzony. Macierz mitochondrialna miała niewielką gęstość elektronową w porównaniu z grupą VSD. W ogniskach zmian była najczęściej jasna, niekiedy częściowo zwakuolizowana. Grzebienie mitochondrialne były wąskie i nieliczne. Błona wewnętrzna mitochondriów wykazywała różny stopień uszkodzenia. W niektórych organellach widoczne było punktowe przerwanie jej ciągłości, w innych natomiast obserwowano formowanie struktur mielinowych, co świadczy o całkowitym zatrzymaniu ich czynności. Nie były natomiast widoczne uszkodzenia w obrębie błony zewnętrznej. Przestrzeń międzybłonowa była najczęściej wąska w porównaniu z mitochondriami kardiomiocytów grupy VSD (ryc. 2).

Miofilamenty w komórkach grup TOF i HLHS miały sporadycznie niespecyficzny układ. Były one równolegle ułożone, jednak nie wykazywały charakterystycznego dla sarkomerów uporządkowania. Włókna w tych miejscach nie posiadały również kontaktu z prążkami Z. W grupach TOF i HLHS obserwowano zróżnicowanie wyglądu wstawek w porównaniu z VSD. W przypadku wad sinicznych były poszerzone ze względu na obecność elektronowo gęstego materiału, którego wygląd ze względu na wielkość zdecydowanie od-

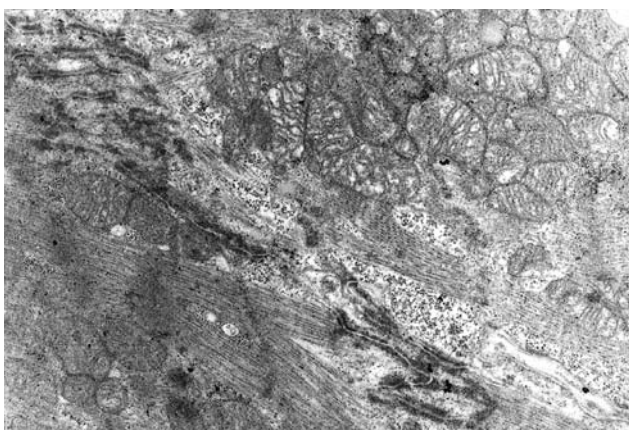


Ryc. 1. Ubytek międzykomorowy (VSD) – brak morfologicznych wykładników uszkodzenia mięśnia sercowego. 5400x

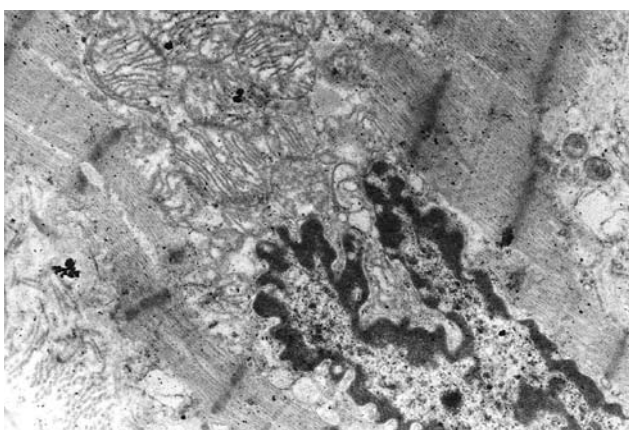




**Ryc. 2.** Tetralogia Fallota (TOF) – widoczne pofałdowanie otoczki jądrowej z brzezną kondensacją chromatyny. W części centralnej obszar hipertrofii mitochondriów. Mitochondria kształtu owalnego, ze zwakuolizowaną macierzą i uszkodzeniami błony wewnętrznej. Struktura sarkomerów prawidłowa. 5400x



**Ryc. 3.** Wstawka kardiomiocytów grupy TOF. Widoczne nagromadzenie elektronowo gęstej substancji wzdłuż jej przebiegu. 7800x



**Ryc. 4.** Zespół niedorozwoju lewego serca (HLHS) – kondensacja brzeżna chromatyny i pofałdowanie otoczki jądrowej. Ogniskowe uszkodzenie mitochondriów. 9100x

biegał od wyglądu płytek cytoplazmatycznych desmosomów (ryc. 3.).

W grupach TOF i HLHS obserwowano jądra komórkowe wykazujące cechy apoptozy. Miały one mocno pofałdowaną otoczkę jądrową, co wskazywało na obkurczenie jądra. Pod otoczką znajdował się elektronowo gęsty, szeroki rąbek heterochromatyny.

Jądra komórkowe w grupie VSD nie wykazywały cech uszkodzenia. Miały typowy dla komórek mięśnia sercowego pałeczkowaty kształt. Rąbek heterochromatyny rozmieszczony pod otoczką jądrową miał typową gęstość elektronową we wszystkich komórkach (ryc. 4.). W obrębie euchromatyny widoczne było najczęściej jedno jąderko typu gąbczastego.

## Dyskusja

Brak wyraźnych cech uszkodzenia włókien mięśniowych w grupie VSD wymaga dokładniejszej weryfikacji badaniami morfometrycznymi. Ze względu na ograniczenia etyczne, zabraniające pobierania zdrowych tkanek, może jednak stanowić w dalszych badaniach grupę odniesienia [1].

W przypadkach TOF i HLHS dominującymi zmianami morfologicznymi są zmiany w jądrach komórkowych, mitochondriach i wstawkach.

Widoczne w jądrach komórkowych cechy apoptozy obserwowano w komórkach mięśnia sercowego w różnych stacjach, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych [2–5]. Apoptoza jest czynnikiem niezbędnym w procesie prawidłowego rozwoju prenatalnego układu sercowo-naczyniowego [6–9]. Obecność jej morfologicznych wykładników w badanych preparatach może być, zwłaszcza w przypadku dzieci do 1. tygodnia życia, pozostałością procesów rozwojowych. Z drugiej strony, brak morfologicznych wykładników apoptozy w grupie VSD wskazuje, że jej przyczyną są innego rodzaju czynniki indukujące. Rozpatrzenia wymaga również brak w badanych preparatach morfologicznych cech zaawansowanej apoptozy, takich jak: fragmentacja jąder czy cytoplazmy, a elementy aparatu kurczliwego nie wykazują uszkodzeń.

Zaburzenia procesu apoptozy są od kilku lat uznawane za jeden z kluczowych czynników rozwoju różnego rodzaju patologii mięśnia sercowego [10–13]. Jednocześnie podkreśla się, że w mięśniu sercowym jest ona aktywowana przede wszystkim w wyniku uszkodzenia mitochondriów na skutek stresu oksydacyjnego lub niedotlenienia wywołanych różnego rodzaju czynnikami. Powoduje to przemieszczenie białek Bcl-2, uwolnienie cytochromu c i aktywację kaskady kaspaz [6, 10]. Z naszych obserwacji wynika, że mitochondria były strukturą kardiomiocytów uszkodzoną w największym stopniu. Występujący ogniskowo obrzęk macierzy mitochondrialnej, jej wakuolizacja oraz uszkodzenia błony wewnętrznej wskazują na częściowe lub całkowite zahamowanie procesów oksydacyjnych, za których prawidłowy przebieg struktury te odpowiadają.

Stres oksydacyjny może być wywołany również czynnikami występującymi w trakcie zabiegu kardiochirurgicznego. Schmitt i wsp. [14] wykazali obecność apoptozy w kardiomiocytach pacjentów po kardiochirurgicznym wstawieniu

bypassów. Po zatrzymaniu serca i reperfuzji obserwowali oni brzezną kondensację chromatyny i cechy uszkodzenia mitochondriów, podobne do prezentowanych w naszej pracy. Obserwacje morfologiczne potwierdzili metodą TUNEL *in situ* oraz biochemicznym oznaczeniem poziomu cytochromu c – kluczowego induktora apoptozy w ścieżce mitochondrialnej. Autorzy stwierdzają, że apoptoza jest kluczowym zjawiskiem występującym w kardiomiocytach po zabiegach na otwartym sercu. Nie można więc wykluczyć, że obserwowane przez nas jądrowe wykładniki apoptozy mogą być wynikiem hipotermii i zaburzeń perfuzji w trakcie zabiegu kardiochirurgicznego. Z drugiej strony stosunkowo niewielka liczba uszkodzonych mitochondriów w grupie VSD zmusza do szukania innych wyjaśnień tego zjawiska, takich jak mutacje mitochondrialnego lub jądrowego DNA wpływające na syntezę białek łańcucha oddechowego czy też przewlekłe mechaniczne przeciążenie miocytów prowadzące do upośledzenia ich czynności skurczowej.

Jednym z istotnych czynników wpływających na prawidłowy przebieg organogenezy mięśnia sercowego jest prawidłowe wykształcenie połączeń międzykomórkowych. W przeprowadzonych badaniach zauważyliśmy, że w przypadku wad sinicznych wstawki mają strukturę inną niż w preparatach z grupy VSD. Występująca w ich obrębie elektronowo gęsta substancja, podobna gęstością do płytek desmosomów, niewystępująca punktowo, lecz na całej długości wstawki, sugerować może nieprawidłowości w obrębie kompleksu białek kotwiczących miofilamenty. Nieprawidłowy rozwój połączeń międzykomórkowych w okresie embriogenezy może prowadzić do zaburzeń cytoarchitektoniki tkanek i powstania strukturalnych wad wrodzonych. Za prawidłowe formowanie połączeń międzykomórkowych odpowiadają adhezyjne białka transbłonowe (ang. *cell adhesion molecules* – CAM), których podstawową funkcją jest rozpoznawanie innych komórek i cząsteczek substancji międzykomórkowej oraz tworzenie z nimi mniej lub bardziej trwałych połączeń. Białka CAM obejmują kilka grup o różnej funkcji i lokalizacji. Do najważniejszych należą: selektyny, integryny i kadheryny [15].

Kadheryny są zależnymi od wapnia białkami transbłonowymi, tworzącymi homofilowe połączenia międzykomórkowe, szczególnie w tkankach nabłonkowej i nerwowej. Zdolność do tworzenia ścisłych połączeń międzykomórkowych przez kadheryny zależy od ich połączenia z innymi białkami – kateninami, poprzez które łączą się one z włóknami aktynowymi cytoszkieletu [16–18]. Cząsteczki kadheryn zbudowane są z trzech części: domeny cytoplazmatycznej, domeny transbłonowej i domeny zewnątrzkomórkowej. Domena cytoplazmatyczna posiada dwa miejsca łączenia się z kateninami oraz białkiem p120ctn [19] regulującymi zdolności adhezyjne kadheryn. Uszkodzenie cytoplazmatycznych domen kadheryn prowadzi do znacznego zmniejszenia adhezji komórek [20].

Kluczową rolę w prawidłowym rozwoju serca odgrywa kadheryna N [21–24]. Jest ona obecna w zarodku już od wczesnego okresu poimplantacyjnego w obrębie mezodermalnych pól sercotwórczych [25] i utrzymuje silną ekspresję w mięśniu sercowym, zarówno w okresie płodowym,

jak i pourodzeniowym [26]. W dojrzałym mięśniu sercowym kadheryna N jest zlokalizowana w obrębie obwódek zwierających (ang. *gap junctions*) wstawek, łącząc się poprzez kateninę z miofibrylami kardiomiocytów [27].

Nie jest do końca jasna rola kadheryn w procesie indukcji apoptozy. Wiadomo, że kadheryny VE hamują apoptozę w komórkach nabłonkowych [28, 29], wchodząc w skład kompleksu kadheryna VE/ $\beta$ -katenina/kinaza P13/VEGFR2 (ang. *vascular endothelial growth factor*). Z drugiej strony niedobór N-kadheryny nasila apoptozę u myszy transgenicznych N-cadherin-null w obrębie neuroepitelium i w somitach, przy jednoczesnym jej braku w kardiomiocytach. Świadczy to o istnieniu niezależnego od kadheryn mechanizmu hamującego apoptozę w mięśniu sercowym [30]. W opisywanym przypadku nie można jednak wykluczyć, że początkowe stadia apoptozy widoczne w elektronogramach mają związek z nieprawidłową budową białkową wstawek.

*Praca finansowana z funduszy grantu KBN nr 0714/P05/2005/28.*

## Piśmiennictwo

- Gregory MA, Whitton ID. A morphological control for ventricular pathology in man: a morphometric and morphologic assessment of LV myofibres in secundum ASD. *Int J Exp Pathol* 1990; 71: 771-783.
- Dispersyn GD, Ausma J, Thoné F, Flameng W, Vanoverschelde JL, Allessie MA, Ramaekers FC, Borgers M. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 947-957.
- Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8144-8149.
- Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 1999; 24: 189-195.
- Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2004; 104: 1-16.
- Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res* 1999; 85: 940-949.
- Fiorina P, Corradi D, Pinelli S, Maestri R, Lagrasta C, Buscaglia M, Davalli A, Folli F, Astorri E. Apoptotic/mytogenic pathways during human heart development. *Int J Cardiol* 2004; 96: 409-417.
- Hong JR, Lin GH, Lin CJ, Wang WP, Lee CC, Lin TL, Wu JL. Phosphatidylserine receptor is required for the engulfment of dead apoptotic cells and for normal embryonic development in zebrafish. *Development* 2004; 131: 5417-5427.
- Suzuki YJ, Evans T. Regulation of cardiac myocyte apoptosis by the GATA-4 transcription factor. *Life Sci* 2004; 74: 1829-1838.
- Kumar D, Jugdutt BI. Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 288-297.
- Mirkes PE, Little SA. Cytochrome c release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydroperoxycyclophosphamide, heat shock, and staurosporine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 162: 197-206.
- Nicol RL, Frey N, Olson EN. From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 179-223.
- Roucou X, Antonsson B, Martinou JC. Involvement of mitochondria in apoptosis. *Cardiol Clin* 2001; 19: 45-55.
- Schmitt JP, Schröder J, Schunkert H, Birnbaum DE, Aebert H. Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1229-1235.
- Kitlińska J, Wojciorowski J. Cząsteczki adhezyjne w nowotworach jelita grubego. *Post Biol Kom* 1996; 23: 705-716.
- Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 2000; 148: 399-403.

17. Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993; 9: 317-321.
18. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 619-627.
19. Anastasiadis PZ, Reynolds AB. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* 2000; 113: 1319-1334.
20. Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 1991; 65: 849-857.
21. García-Castro MI, Vielmetter E, Bronner-Fraser M. N-Cadherin, a cell adhesion molecule involved in establishment of embryonic left-right asymmetry. *Science* 2000; 288: 1047-1051.
22. Linask KK, Knudsen KA, Gui YH. N-cadherin-catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development. *Dev Biol* 1997; 185: 148-164.
23. Ong LL, Kim N, Mima T, Cohen-Gould L, Mikawa T. Trabecular myocytes of the embryonic heart require N-cadherin for migratory unit identity. *Dev Biol* 1998; 193: 1-9.
24. Shiraishi I, Takamatsu T, Fujita S. 3-D observation of N-cadherin expression during cardiac myofibrillogenesis of the chick embryo using a confocal laser scanning microscope. *Anat Embryol* 1993; 187: 115-120.
25. Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* 1997; 181: 64-78.
26. Angst BD, Khan LU, Severs NJ, Whitely K, Rothery S, Thompson RP, Magee AI, Gourdie RG. Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ Res* 1997; 80: 88-94.
27. Ferreira-Cornwell MC, Luo Y, Narula N, Lenox JM, Lieberman M, Radice GL. Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart. *J Cell Sci* 2002; 115: 1623-1634.
28. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999; 98: 147-157.
29. Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 1589-1601.
30. Luo Y, Ferreira-Cornwell M, Baldwin H, Kostetskii I, Lenox J, Lieberman M, Radice G. Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin. *Development* 2001; 128: 459-469.