

Diss ETH No. 12131

**REMODELING OF CYTOSKELETAL AND CONTRACTILE
STRUCTURES BY GROWTH FACTORS AND THYROID HORMONE
IN CULTURED CARDIOMYOCYTES**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences



presented by

BEATRICE ANDREA HARDER
Pharmacist
born 24th November 1968
citizen of Zurich (ZH) and Eschenz (TG)
Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H.M. Eppenberger, examiner
Prof. Dr. M.C. Schaub, co-examiner

Zurich 1997

SUMMARY

Most cardiovascular disorders induce cardiac hypertrophy which eventually ends in heart failure. The cause may be multifactorial involving mechanical stretch, neural or endocrine stimuli. Adult mammalian cardiomyocytes are terminally differentiated cells which lose their ability to undergo mitosis soon after birth, thus hypertrophy is achieved predominantly by an increase in myocyte size. This process is different from normal postnatal growth, characterized by the upregulation of a number of fetal proteins and downregulation of some others being specific for the fully differentiated adult phenotype.

Cardiomyocytes in culture represent an excellent experimental system to study remodeling of myofibrillar and cytoskeletal structures during the cardiac hypertrophy reaction *in vitro*. When ventricular adult rat cardiomyocytes (vARC) were kept in long term culture up to three weeks in the presence of 20/10% fetal calf serum, their characteristic sequence of morphological transformations comprised aspects of de-differentiation followed by re-differentiation. They grew into flat polygonal shapes, made new cell-cell contacts and resumed rhythmical contractions within one week. Double immunofluorescence stainings showed an initial breakdown of myofibrils and a subsequent regeneration. Myofibrils followed exactly the actin stress fiber-like structures in growing out into the periphery until they filled out the whole cells. vARC in culture express fetal gene products such as α -smooth muscle actin (α -sm actin), β -myosin heavy chain and atrial natriuretic factor reminiscent of the hypertrophied heart tissue *in vivo*. vARC grown in serum-free medium, however, did not show these typical morphological alterations and they survived only for about one week.

Various cell mediators were tested for their effects in this system and the growth factors bFGF and IGF-I as well as thyroid hormone T3 were chosen for further studies. IGF-I and bFGF are upregulated after myocardial infarction, and T3 is known to induce hypertrophy *in vivo*. Most striking was that in vARC bFGF and T3 induced a drastic restriction of myofibrillar growth to the central cell area whereas IGF-I enhanced myofibrillar growth. Nevertheless beating frequency with bFGF and T3 was enhanced. In addition, bFGF and T3

increased α -sm actin protein up to 14-17 fold and immunopositive cells from 4% in controls to 36% and 62%, respectively, while α -sm actin mRNA showed only a moderate increase of 2-3 fold. IGF-I had the opposite effects. These results confirm the generally held view that bFGF induces some degree of de-differentiation while IGF-I promotes differentiation. It is surprising that T3 lead to similar ultrastructural changes as bFGF since it can directly act on nuclear receptors whereas bFGF activates its receptor tyrosine kinase and triggers the Ras-Raf-MAP kinases pathway. α -sm actin was incorporated in the stress fiber-like actin cytoskeleton with an accumulation outside the myofibrillar boundary, but it left the myofibrillar region practically unstained. When the two growth factors were applied together or in sequence, myofibrillar growth restriction went in parallel with the up-regulation of α -sm actin in all treatments. This suggests the hypothesis that up-regulation of α -sm actin is directly related to restriction of myofibrillar growth in vARC in culture. The content of α -actinin and of vinculin was only moderately increased by bFGF, yet these proteins showed a distinct localization in cells with restricted myofibrils. When bFGF or IGF-I were added to vARC cultured in T3 depleted serum, their effect on α -sm actin was abolished. It was shown that T3 is permissive for the effects of the two growth factors on α -sm actin expression.

In atrial adult rat cardiomyocytes and in ventricular neonatal rat cardiomyocytes (NRC) in culture, on the other hand, the three applied cell mediators did not induce such drastic morphological changes. Myofibrillar restriction was only seen in NRC with bFGF. Nevertheless, α -sm actin was upregulated by bFGF and T3 in both cell types, albeit only by a factor of 2-4. In contrast to vARC it was also incorporated into the myofibrils, suggesting different properties of these structures between different cell types.

ZUSAMMENFASSUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen induzieren Herzhypertrophie und können zu Herzversagen führen. Ursachen sind mechanische Belastung, neuronale und endokrine Stimuli. Herzmuskelzellen von adulten Säugern proliferieren kurz nach der Geburt nicht mehr und sind terminal ausdifferenziert, sodass Hypertrophie durch Grössenwachstum zustande kommt. Dieser Prozess unterscheidet sich von normalem postnatalen Wachstum insofern, dass fetale Proteine vermehrt und adulte weniger exprimiert werden.

Kultivierte Herzmuskelzellen stellen ein gutes experimentelles System dar um Strukturänderungen von myofibrillären und zytoskelettalen Strukturen in der Herzhypertrophiereaktion *in vitro* zu studieren. Wurden ventrikuläre Kardiomyozyten adulter Ratten (vARC) bis zu drei Wochen in Langzeitkulturen mit 20/10% fetalem Kälberserum gehalten, zeigten sie charakteristische morphologische Veränderungen, zuerst De- und später Redifferenzierung. Innerhalb einer Woche breiteten sich die Zellen in der Kultur aus, stellten Zell-Zell Kontakte her und begannen wieder zu kontrahieren. Doppel-Immunfluoreszenz-Markierungen zeigten einen Abbau und späteren Wiederaufbau der Myofibrillen, welche dann entlang der Stressfaser-ähnlichen Aktin-Strukturen in die Peripherie wuchsen, bis sie die Zellen ausfüllten. Ähnlich der Herzhypertrophie *in vivo* exprimierten vARC in Kultur die folgenden fetalen Proteine: α -Aktin glatter Muskelzellen (α -sm Actin), die β -Isoforme der schweren Myosinkette und den atrialen natriuretischen Faktor. vARC, die in serumfreiem Medium kultiviert wurden, zeigten keine solch typischen morphologischen Veränderungen und sie überlebten nur während einer Woche.

Die Effekte verschiedener Zellmediatoren auf dieses System wurden getestet, und die Wachstumsfaktoren bFGF und IGF-I sowie Schilddrüsenhormon T3 für weitere Untersuchungen ausgewählt. bFGF und IGF-I werden nach einem Myokardinfarkt vermehrt exprimiert, und T3 kann Hypertrophie auslösen. bFGF und T3 führten in vARC zu einer drastischen Restriktion des Myofibrillenwachstums während IGF-I letzteres förderte. Die Schlagfrequenz war durch bFGF und T3 Behandlungen sogar erhöht. bFGF und T3 erhöhten den Gehalt an α -sm Actin Protein 14-17 mal, die Menge

immunopositiver Zellen von 4% in Kontrollen bis auf 36% bzw. 62%, währenddem die mRNA nur 2-3mal anstieg. IGF-I zeigte entgegengesetzte Effekte. Diese Resultate bestätigen die generelle Annahme, dass bFGF die Dedifferenzierung und IGF-I die Differenzierung fördert. Es ist erstaunlich, dass T3 und bFGF dieselben ultrastrukturellen Veränderungen hervorrufen, da T3 direkt via nukleäre Rezeptoren agieren kann, während bFGF über Rezeptor Tyrosin Kinasen den Ras-Raf-MAP Kinasen Signalweg aktiviert. Immunfluoreszenz-Markierungen zeigten, dass α -sm Actin in das Stressfaser-ähnliche Aktin-Zytoskelett inkorporiert wurde mit starker Akkumulation gerade ausserhalb der Myofibrillen, während letztere praktisch ungefärbt blieben. Wurden die beiden Wachstumsfaktoren zusammen oder sequentiell zugegeben, ging die Expression von α -sm Actin immer parallel zur Myofibrillenrestriktion. Dies impliziert die Hypothese, dass die Expression von α -sm Actin in vARC in direktem Bezug zur Myofibrillenrestriktion steht. Der Proteingehalt an α -Aktinin und Vinculin war nur durch bFGF Behandlung leicht erhöht, aber diese Proteine waren in Zellen mit eingeschränktem Myofibrillenwachstum spezifisch lokalisiert. In Kulturen, in denen T3 aus dem Serum entfernt wurde, zeigten bFGF und IGF-I keinen Effekt auf die Expression von α -sm Actin. T3 agiert demnach als permissiver Faktor für die Effekte dieser Wachstumsfaktoren auf α -sm Actin.

Im Gegensatz zu vARC zeigte die Zugabe dieser drei Zellmediatoren zu Kulturen von atrialen Kardiomyozyten adulter Ratten und zu ventrikulären Kardiomyozyten neonataler Ratten keine solch drastischen morphologischen Veränderungen. Eingeschränktes Myofibrillenwachstum wurde nur durch bFGF in den neonatalen Zellen beobachtet. Dennoch war α -sm Actin Protein in beiden Systemen sowohl mit bFGF als auch mit T3 erhöht, jedoch nur um einen Faktor von 2-4. In diesen Zellen wurde α -sm Actin sowohl in das Zytoskelett als auch in die Myofibrillen inkorporiert.