

Diss ETH No 13264

CELL-CELL AND CELL-SUBSTRATUM INTERACTIONS
IN THE LONG-TERM CULTURE OF ADULT CARDIOMYOCYTES

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Science

presented by

LIUDMILA OLEGOVNA POLONTCHOUK

Diplom Biophysicist

Moscow State University named after M.V.Lomonosov, Moscow, Russia.

Born 11th November 1971

citizen of Russia

accepted on the recommendation of
Prof.Dr. H.M.Eppenberger, examiner
Prof.Dr. R.Weingart, co-examiner
Prof.Dr. E.Wintermantel, co-examiner

Zurich 1999

Summary

Regulation of the gap junction remodelling plays an important role in response to cardiac injury. Dissociated adult rat ventricular myocytes were used as an experimental system to study the re-establishment of cardiac gap junctions during the heart tissue regeneration *in vitro*. Gap junctions were assayed during the re-differentiation of the adult rat ventricular cardiomyocytes in long-term primary culture to gain insight into the process underlying their remodelling. The cells were examined for the presence of Cx40, Cx43 and Cx45 at the protein level using specific antibodies. Western blot analysis was done to study the expression patterns of connexins. Immunofluorescent labelling of the cells was performed to localise the channel proteins by means of confocal microscopy.

Immunofluorescent studies showed that cultured adult cardiomyocytes lose the normal pattern containing large gap junctions concentrated at the cell ends and exhibit many small junctions, which become uniformly distributed over the whole length of the cell contact membrane. These morphological transformations resembled the alterations in the organisation of gap junctions observed at the edges of an infarct during the active phase of healing. Double immunostaining studies indicated the localisation of connexins Cx40, Cx43 and Cx45 in the intercalated discs between cardiomyocytes. Their co-expression in the same cell and co-localisation in the same gap junction plaque raised the possibility for the heterotypic and/or heteromeric gap junction channels formation between the cardiac cells.

Western blot analysis showed time-dependent changes in the expression and phosphorylation of the connexins in the cultured cells. The total amount of all three cardiac connexins and the proportion of their phosphorylated forms to non-phosphorylated forms gradually increased during the re-establishment of the intercellular communication between the heart muscle cells in culture. The main connexin phosphorylation events were found to take place during and after the assembly of gap junctions within the cytoskeleton-associated regions of the cell-cell contacts in cultured cardiomyocytes. Connexin phosphorylation seems to be required to stabilise the intermolecular interactions within the new adhesion complexes formed between re-differentiated cardiomyocytes *in vitro*. The co-ordinated activation of the cytoplasmic and membrane-bound p70S6 kinase by TPA stimulates the expression of Cx43 and its phosphorylation in the plasma membrane. The elevated incorporation of the protein into sites of cell-to-cell contacts results in an increase of the metabolic coupling between the cardiomyocytes in culture.

Myocardial gap junctions display dynamic changes in co-ordination with cell behaviour. The results of the present study implicate multiple mechanisms for the regulation of intercellular communication by the gap junctions having different connexins. Some of them may be the results of the cell's switch to an early developmental program. Hence, the co-expression of cardiac connexins seems to play a major regulatory role in the heart morphogenesis and remodelling.

Zusammenfassung

Die Regulation der Wiederherstellung von Gap Junctions spielt eine wichtige Rolle, wie das Herz auf Schädigungen reagiert. Isolierte ventrikuläre Myozyten adulter Ratten dienten als *in vitro* System zur Untersuchung der Regeneration von Gap Junctions im Herz. Der Prozessablauf beim Wiederaufbau von Gap Junctions wurde während der Redifferenzierung ventrikulärer Myozyten aus dem Herz adulter Ratten in langzeitigen Primärkulturen verfolgt und mit Hilfe spezifischer Antikörper auf das Vorhandensein der Gap Junction Proteine Cx40, Cx43 und Cx45 untersucht. Das Expressionsmuster der Connexine wurde mit Hilfe von Western Blots studiert. Immunfluoreszenzmarkierung der Zellen wurde verwendet, um die Kanalproteine mittels konfokaler Mikroskopie zu lokalisieren.

Die Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass adulte Kardiomyozyten in Kulturen das normale Verteilungsmuster der Gap Junctions, nämlich eine Konzentration an den Zellenden verlieren. Sie zeigten viele kleine Gap Junctions, die sich gleichmässig über die ganze Fläche der Zellkontaktmembran ausbreiten. Diese morphologische Veränderung ähnelt der Verteilung von Gap Junctions, wie sie an den Rändern einer Infarktregion des Herzmuskels während der aktiven Heilungsphase beobachtet werden. Doppelte Immunfluoreszenzmarkierung lokalisierte die Connexine Cx40, Cx43 und Cx45 in den Glanzstreifen zwischen Kardiomyozyten. Ihre Expression in der gleichen Zelle und ihre gemeinsame Lokalisierung in der gleichen Gap Junction Plaue deuteten auf die Bildung heterotypischer und/oder heteromerer Gap Junction Kanäle zwischen den Herzzellen hin.

Western Blot Untersuchungen zeigten in Zellkulturen zeitliche Änderungen in der Expression und Phosphorylierung der Connexine. Die Gesamtmenge aller drei Connexine und das Verhältnis von phosphorylierten zu nichtphosphorylierten Formen stieg bei den Herzmuskelzellen in der Kultur während der Wiederherstellung der interzellulären Kommunikation allmählich an. Die Phosphorylierung der Connexine konnte hauptsächlich während und nach dem Zusammenbau der Gap Junctions innerhalb jenes Zellkontaktbereiche beobachtet worden, wo Interaktion mit dem Zytoskelett stattfand. Sie scheint *in vitro* zur Stabilisierung der intermolekularen Wechselwirkungen in den neu entstandenen Adhäsionskomplexen zwischen redifferenzierten Herzmyozyten wichtig zu sein. Nach der koordinierten Aktivierung der zytoplasmatischen und membrangebundenen p70S6 Kinase durch TPA wurden Expression und Phosphorylierung von Cx43 in der Zellmembran angeregt. Der erhöhte Einbau des Proteins gerade in Regionen, wo unter *in vitro* Bedingungen Zellkontakt stattfindet führte zu einer erhöhten metabolischen Kopplung zwischen den Herzmyozyten.

Gap Junctions im Herzen öffneten einen potentiellen Weg zu dynamischen, mit dem Verhalten der Zellen koordinierten Veränderungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, nämlich aus unterschiedlichen Connexinen zusammengesetzte Gap Junctions, implizieren mögliche unterschiedliche Mechanismen bei der Regulation der interzellulären Kommunikation. Einige davon könnten die Folge einer Umstellung der Zelle auf ein früheres Entwicklungsprogramm sein. Die gemeinsame Expression von unterschiedlichen Connexinen könnte eine regulatorische Funktion in der Morphogenese und im Remodeling des Herzens haben.