

# Adaptive remodeling of cardiomyocytes under stress

Citation for published version (APA):

Driesen, R. B. M. A. (2007). *Adaptive remodeling of cardiomyocytes under stress*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20080320rd>

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## DOI:

[10.26481/dis.20080320rd](https://doi.org/10.26481/dis.20080320rd)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary

Most patients with congestive heart failure have underlying coronary artery disease in which the blood flow and concentration of oxygen to the myocardium is reduced. Under these partially anaerobic conditions, the mammalian heart muscle cannot produce enough energy to maintain proper cardiac function and viability, and has only a limited ability to regenerate. To survive under these conditions of elevated stress, it is essential for the heart to activate adaptive mechanisms. Hibernating myocardium can be considered as an example of chronic metabolic and structural adaptation of the heart to different forms of stress observed under various pathological conditions. These programmed cell survival mechanisms form the central topic of this thesis, and the main objective was to gain detailed information on the morphological aspects of adult cardiomyocytes adopting a “fetal-like phenotype” in models of hibernating myocardium.

**CHAPTER 1** gives an introductory description of the functional and morphological hallmarks of hibernating myocardium with an overview of the animal and cell culture models.

In **CHAPTER 2** it is shown that the low molecular weight tracer calcein is transferred from the preloaded fibroblasts to the cardiomyocytes within a few hours after co-culturing. These functional gap junctions have previously been described to occur between neonatal cardiomyocytes and fibroblasts. However, dye transfer of the high molecular weight tracer Dextran 10,000 at a later time-period of co-culturing disclosed a previously unknown type of heterocellular communication. Ultrastructural examination of the contact areas revealed intercytoplasmic membrane continuities between fibroblasts and dedifferentiating cardiomyocytes which we designated as partial cell fusions. A transient exposure of phosphatidylserine at the contact sites was proposed to represent a possible trigger mediating the plasma membrane fusion process. Finally, close contacts between cardiac fibroblasts and dedifferentiated cardiomyocytes were observed in the border zone of a rabbit myocardial infarction after previous disruption of the cardiomyocyte basal lamina.

In **CHAPTER 3** typical structural characteristics of hibernation-like dedifferentiation are induced in long-term co-cultures of adult rabbit cardiomyocytes and car-

diac fibroblasts. Fibroblasts show predominantly a binding to the distal ends of the cardiomyocytes after 1 day in culture and a shift towards the lateral sides in subsequent days. An upregulation of the cell adhesion proteins N-cadherin, vinculin,  $\beta$ 1-integrin and desmoplakin were observed at the heterocellular contact sites. Addition of autologous and non-autologous fibroblasts to the cardiomyocyte culture accelerated the dedifferentiation process, which we subdivided into 5 distinctive morphological steps. Dynamic passive stretch invoked by the fibroblasts involving cell adhesion molecule expression at the interaction sites is proposed to play an important role in the induction of hibernation-like dedifferentiation of the adult rabbit cardiomyocytes.

In **CHAPTER 4** the re-expression of  $\alpha$ -skeletal actin ( $\alpha$ SKA) together with a downregulation of  $\alpha$ -cardiac actin ( $\alpha$ CA) and cardiotin is described in hibernating cardiomyocytes from patients suffering from coronary artery stenosis. Furthermore, diffuse punctate expression patterns of  $\alpha$ SKA with concomitant accumulation of glycogen were observed in atrial tissue of goats with chronic atrial fibrillation and in rabbit left ventricular tissue subjected to pressure- and volume-overload. Dedifferentiation of adult rabbit ventricular myocytes *in vitro* revealed a degradation of the contractile apparatus and a subsequent formation of  $\alpha$ CA positive stress fibre-like structures which coincided with the re-expression of  $\alpha$ SKA. The combination of PAS positive glycogen and/or cardiotin expression patterns with  $\alpha$ SKA re-expression are suggested to offer an additional tool in the evaluation of myocardial dysfunction.

In **CHAPTER 5** the specific localization of cardiotin in mitochondria of adult cardiomyocytes and its downregulation during cardiomyocyte dedifferentiation is described. Western blot analysis revealed the presence of cardiotin in the mitochondria of pig heart. Immuno-electron microscopy not only confirmed the localization of cardiotin in mitochondria of adult rabbit papillary tissue and of freshly isolated adult rabbit cardiomyocytes, but also indicated a possible association of cardiotin with the mitochondrial inner membrane. Light microscopy of late stage embryonic rabbit heart tissue showed a weak staining of cardiotin which evolved to full-blown staining of longitudinal mitochondrial arrays in adult ventricular tissue. Pressure- and volume-overloaded myocardium triggered a reduction in cardiotin expression which was comparable to cell cultures of dedifferentiating adult cardiomyocytes. Despite the unknown function of cardiotin, the protein can be a useful tool as an early mitochondrial marker for cardiomyocyte adaptive remodeling.

In **CHAPTER 6** cardiomyocyte remodeling mechanisms were investigated in the border zone area of rabbit myocardial infarctions. Only a limited number of hibernating cardiomyocytes were found to be distributed in the non-infarcted region adjacent to the border zone of infarcted myocardium. In the border zone vacuolated cardiomyocytes were seen surrounded by fibrotic tissue. The inner mem-

brane side of the vacuoles revealed the presence of a basal lamina and the vacuoles further showed the occurrence of pinocytotic vesicles and associations with cisternae of the sarcoplasmic reticulum. A gradual increase in the ratio between vacuolar area and total cell area and in collagen fibril deposition inside the vacuoles was observed from 2 to 12 weeks post-infarction. It is suggested that the vacuoles represent plasma membrane invaginations and/or dilatations of T-tubular structures.

**CHAPTER 7** focuses on the possible molecular pathways responsible for metabolic adaptation and survival in hibernating myocardium. More detailed information is provided on the possible role of heat shock proteins and the influence of passive stretch on the development of hibernating myocardium in normally perfused myocardium is elaborated. Finally, the use of cell culture models for future research of cardiomyocyte dedifferentiation is discussed.



# Samenvatting

De aantasting van de coronaire bloedvaten is de meest voorkomende oorzaak van congestief hartfalen. De meeste van deze patiënten vertonen een daling van de bloedtoevoer en een vermindering van zuurstof naar het desbetreffende hartweefsel. Onder invloed van deze partiële anaërobe omstandigheden is het hart bij zoogdieren niet in staat om voldoende energie te leveren voor de instandhouding van de cardiale en vitale functie. Verder speelt ook de beperkte capaciteit van het hart tot regeneratie een rol. Daarom is de activatie van adaptieve mechanismen essentieel voor de overleving van het hart tijdens periodes van verhoogde stress. Hibernatie van het hart is een vorm van chronisch metabole en structurele adaptatie aan verschillende vormen van stress die hun oorsprong vinden in verscheidene pathologische aandoeningen. Deze geprogrammeerde celoverleving staat centraal in dit proefschrift dat als doel heeft het vergaren van gedetailleerde informatie over de morfologische en moleculaire aspecten van volwassen hartcellen die een foetaal fenotype verworven hebben in verschillende modellen van hibernatie.

In **hoofdstuk 1** wordt er naast een inleidende beschrijving over de functionele en morfologische kenmerken van hibernerend hartweefsel ook een overzicht gegeven van de beschikbare proefdier- en celweekmodellen.

In **hoofdstuk 2** wordt de overdracht van laag moleculair calceïne vanuit fibroblasten naar hartspiercellen beschreven na een aantal uren van celweek. De vorming van functionele gapjuncties werd eerder al beschreven tussen neonatale hartspiercellen en fibroblasten. De overdracht van het hoog moleculair gewicht dextraan 10.000 op een later tijdstip van co-cultuur impliceert een tot hier toe nog onbekende vorm van heterocellulaire communicatie. Na ultrastructureel onderzoek van de contactplaatsen werden intercytoplasmatische verbindingen tussen fibroblasten en dedifferentiërende hartcellen zichtbaar die vervolgens als partiële celfusies benoemd werden. Een tijdelijke localisatie van fosfatidylserine ter hoogte van de contactplaatsen kan medeverantwoordelijk zijn voor het tot stand komen van de plasmamembraanfusies. Tenslotte hebben we hechte contacten

waargenomen tussen cardiale fibroblasten en dedifferentiërende hartcellen in de grenszone van hartinfarcten bij konijnen. Deze heterocellulaire contacten zijn gekenmerkt door een voorafgaande ruptuur van de basale lamina.

In **hoofdstuk 3** worden naar analogie met het dedifferentiatieproces bij hibernatie gelijkaardige structurele kenmerken nagebootst in een co-cultuur van volwassen konijnenhartcellen met fibroblasten. Deze laatste vertonen een dominante binding met de distale uiteinden van de hartcellen na 1 dag in kweek, gevolgd door een progressieve verschuiving naar de laterale zijden. Een opregulatie van de celadhesie-eiwitten N-cadherine, vinculine,  $\beta$ 1-integrine en desmoplakine is vastgesteld aan de heterocellulaire contactplaatsen. Toevoeging van zowel autologe als niet-autologe fibroblasten aan de hartcelkweek veroorzaakt een versneling van het dedifferentiatieproces dat onderverdeeld kan worden in 5 opeenvolgende morfologische stadia. De hypothese wordt geopperd dat fibroblasten een dynamische passieve stretch kunnen uitoefenen na expressie van celadhesie-eiwitten en dat ze via dit proces een belangrijke rol spelen bij de inductie van dedifferentiatie.

In **hoofdstuk 4** wordt de re-expressie van  $\alpha$ -skeletspier actine ( $\alpha$ SKA) in combinatie met een afname van  $\alpha$ -cardiomyocyt actine ( $\alpha$ CA) en cardiotine beschreven in hibernerende hartcellen van patiënten met coronair vaatlijden. Verder is er ook een diffuus expressiepatroon van  $\alpha$ SKA tesamen met een accumulatie van glycogeen vastgesteld in atriaal hartweefsel van geiten met chronisch atriale fibrillatie en in linker ventriculair hartspierweefsel van konijnen na een langdurige blootstelling aan druk- en volumetoename in de ventrikel. Het dedifferentiatieproces *in vitro* bij volwassen konijnenhartcellen toont een afbraak van het contractiele apparaat, gepaard gaande met de vorming van  $\alpha$ CA positieve stressvezels en re-expressie van  $\alpha$ SKA. Door de glycogeenaccumulatie en de expressiepatronen van cardiotine te combineren met de re-expressie van  $\alpha$ SKA is er een nieuw hulpmiddel ter beschikking gekomen dat nuttig kan zijn bij de evaluatie van dysfunctioneel hartweefsel.

In **hoofdstuk 5** wordt de specifieke localisatie van het cardiotine beschreven in de mitochondriën van volwassen hartcellen. Tijdens dedifferentiatie van de hartcel wordt een afname van dit eiwit vastgesteld. Door gebruik te maken van Western blot analyse wordt de aanwezigheid van cardiotine aangetoond in gezuiverde mitochondriale fracties uit het varkenshart dat tot uiting komt als een specifieke eiwitband met een moleculair gewicht van 60 kDa. Immunoelectronenmicroscopie geeft niet alleen het onomstotelijke bewijs dat cardiotine aanwezig is in mitochondriën van hartspiercellen van het volwassen hart en van vers geïsoleerde hartspiercellen van volwassen konijnen, maar suggereert ook een mogelijke associatie van het cardiotine met de binnenste mitochondriale membraan. De lichtmicroscopische analyse van hartweefsel in het eindstadium van de embryonale ontwikkeling bij het konijn vertoont een zwak cardiotinesig-

naal dat verder evolueert naar een sterk positief longitudinaal expressiepatroon in het volwassen ventriculair hartweefsel. Een blootstelling aan verhoogde druk en volume in de ventrikel induceert een afname van cardiotine die ook waargenomen wordt in het celkweekstelsel, waarbij de hartcellen dedifferentiëren. Ondanks de onbekende functie van cardiotine kan dit eiwit een belangrijke rol vervullen als mitochondriale marker voor adaptieve remodellering.

In **hoofdstuk 6** worden verschillende types van remodellering beschreven in de grenszone van hartinfarcten bij konijnen. Enkel een beperkt aantal hibernerende hartcellen zijn aanwezig in het niet-geïnfarceerde gebied dat grenst aan het infarct. In deze laatste zijn gevacuoleerde hartcellen waargenomen die omringd zijn door fibrotisch bindweefsel. Deze vacuolen vertonen de aanwezigheid van een basale lamina en pinocytotische blaasjes en hebben een duidelijke associatie met de cisternae van het sarcoplasmatisch reticulum. Een geleidelijke toename in de ratio van de vacuole-oppervlakte ten opzichte van de totale celoppervlakte en een toename in het aantal collageenvezels per vacuole zijn kenmerkend voor 2 tot 12 weken postinfarct. Mogelijke redenen voor de aanwezigheid van deze vacuolen zijn ofwel de vorming van nieuwe plasmamembraaninvaginaties ofwel een dilatatie van de bestaande T-tubuli.

In **hoofdstuk 7** wordt de nadruk gelegd op de moleculaire routes die kunnen leiden tot de metabole adaptatie en celoverleving bij hibernerend hartweefsel. Gedetailleerde informatie over de mogelijke rol van heat shock eiwitten wordt gegeven. Verder wordt ook dieper ingegaan op de invloed van passieve stretch bij de ontwikkeling van hibernerend hartweefsel in normaal geperfuseerde hartregio's. Tenslotte wordt het gebruik van celkweekmodellen in het toekomstig onderzoek naar cardiomyocyt dedifferentiatie besproken.



