

DISS. ETH-No. 14536

**Targeting the Cell Cycle  
in Postmitotic Cardiomyocytes  
Genetic Engineering of Terminally Differentiated Cells**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
**Daniel Andreas Dätwyler**  
Dipl. Natw. ETH  
born March 8, 1973  
from Unterentfelden AG

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Hans M. Eppenberger, examiner  
Prof. Dr. Ueli Suter, co-examiner  
PD Dr. Martin Fussenegger, co-examiner

Zurich, 2002

## SUMMARY

---

Cardiomyocytes cease to divide shortly after birth and an irreversible cell cycle arrest becomes evident. Proliferation of differentiated cardiomyocytes and an eventual tissue repair are blocked. The here presented work focused on the question how the control of the cell cycle of this specific cell type is organized. Particular attention was given to the G2/M transition and the molecules involved in the mentioned checkpoint. Primary cultures of ventricular adult rat cardiomyocytes (ARC) were established and served as model for the postmitotic phenotype in the adult mammalian heart. They provided the platform for the presented investigations. The functional recovery of the mitosis-promoting factor (MPF) by genetic means was of special interest; it consists of cyclin B1 and the cyclin-dependent kinase Cdc2. This implicated the evaluation of appropriate gene delivery systems for ARC, which are known for their resistance to transfection.

Sindbis virus (SIN)-based vectors proved to be a powerful gene transfer vehicle for cultured ARC. Coming along with an infection efficiency of more than 80%, SIN exerted a remarkably lower cytopathogenicity on cultured ARC than on other cell types investigated in parallel. SIN achieved high transgene expression levels within a short period of time and allowed the expression of genetically engineered contractile proteins in cardiomyocytes. Localization of fluorescence protein-tagged myofibrillar components could thus be readily accomplished, revealing SIN as a straightforward means to study sarcomeric protein interactions.

The implementation of the adenovirus-enhanced transferrinfection (AVET) system allowed the reliable expression of cell cycle-dependent genes in cultured ARC. The AVET system permitted plasmid transfection of cultured ARC, reaching under optimized conditions and depending on the plasmid used an efficiency of more than 20% without affecting cell morphology and behavior. The AVET system represented a novelty, able of plasmid transfection of cultured ARC without the need of active viral particles. This made AVET not only very useful for the present work but will turn out to be attractive for a wide range of applications in cardiobiology research.

The influence of the *in vitro* environment on the cell cycle in cardiomyocytes was assessed. Whereas ARC proved to be resistant to cell cycle re-entry, neonatal rat

cardiomyocytes (NRC) in culture displayed eventually mitotic figures that allowed to propose ongoing cytokinesis in a few instances.

Reactivation of MPF in cultured cardiomyocytes was accomplished by applying elaborated gene engineering techniques. Functional characterization of exogenous cyclin B1 and Cdc2 in cultured ARC became feasible using AVET-mediated gene transfer. Proteolysis of mitotic cyclins, being in cells present in late M and G1 phase, was not active enough in ARC to degrade exogenous cyclin B1. Simultaneous ectopic expression of wild-type versions of cyclin B1 and Cdc2 was sufficient to induce MPF activity, which hold also true for cultured NRC. Re-established MPF resulted in an arrest of the cells with a mitotic phenotype, characterized by abnormal condensation of the nuclei, histone H3 phosphorylation and a variable degree of decay of the myofibrillar apparatus. Although cell division was not observed, the results provided first evidence that cell cycle-related events could be triggered by genetic intervention at the G2/M boundary in postmitotic cardiomyocytes.

Taken together, the findings offer not only novel insights about the G2/M checkpoint and its regulatory factors in postnatal cardiomyocytes, but will also be of importance to formulate novel strategies to overcome the proliferation arrest in adult cardiomyocytes.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Kurz nach der Geburt hören beim Säuger die Herzmuskelzellen mit der Zellteilung auf und treten in einen irreversiblen Zellzyklusarrest, der ein nahezu unüberwindliches Hindernis darstellt, um nach Zellverlust wiederum funktionstüchtiges Herzgewebe herzustellen. In der hier vorliegenden Doktorarbeit stand die Regulation des Zellzykluses in Herzmuskelzellen im Zentrum, wobei man sich vor allem auf die Phase des G2/M Uebergangs und den damit assoziierten Proteinen konzentrierte. Als Modell diente das Primärkultursystem von ventrikulären, adulten Rattenherzmuskelzellen (ARC). Von speziellem Interesse war die Regulation der Aktivität von MPF (engl. "mitosis-promoting factor"), einem Protein Komplex, der sich aus Cyclin B1 und der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2 zusammensetzt. Es wurden geeignete Methoden, die einen zuverlässigen Gentransfer in ARC ermöglichen, erarbeitet, um MPF sich anhand ektoptischer Expression des Komplexes in den Herzmuskelzellen neu bilden zu lassen.

Vektoren, die auf den Sindbis Virus (SIN) basieren, stellten sich als äusserst effiziente Transgen-Transporter in kultivierte ARC heraus. Neben der hohen Infektionsrate von mehr als 80%, zeigte sich, dass SIN eine merklich niedrigere zytopathologische Reaktion in kultivierten ARC, im Vergleich zu anderen untersuchten Zelltypen, auslöste. Eine weitere Eigenschaft dieses viralen Vektors zeigte sich im hohen Expressionsniveau, welches die Synthese von genetisch modifizierten Proteinen des kontraktiven Apparates in Herzmuskelzellen ermöglichte. Dies erlaubte die genaue Lokalisierung von genetisch veränderten myofibrillären Proteinen in Herzmuskelzellen und die Untersuchung von möglichen Interaktionen von sarkomerischen Proteinen.

Eine weitere Transfektionsmethode zeigte sich als hervorragenden Weg, um ARC zu transduzieren. Der Vektor besteht aus einem Polykation-DNA-Protein Komplex, der mit inaktivierten Adenoviren gekoppelt ist. Diese sogenannte AVET (engl. "adenovirus-enhanced transferrinfection") Methode zeichnete sich durch eine relativ hohe Effizienz in kultivierten ARC aus, welche in gewissen Fällen mehr als 20% erreichte. Es zeigte sich auch, dass zytotoxische Effekte auf die Zellen kaum nachzuweisen waren und damit das grosse Potenzial dieser Methode für weitere Anwendungen in der kardiobiologischen Grundlagenforschung.

Die Untersuchung des Einflusses der Kulturbedingungen (u.a. des Serumanteils) auf das Verhalten des Zellzykluses in ARC war von grosser Bedeutung. Dabei stellte sich heraus, dass es einen generellen Unterschied zwischen ARC und neonatalen Rattenherzmuskelzellen (NRC) in Bezug auf das Verhalten im Zellzyklus gab. Dies unterstreicht einmal mehr den Unterschied zwischen den zwei Zelltypen; während ARC kaum einen Hinweis auf eine Reaktivierung des Zellzyklus zeigte, konnte in NRC Zytokinese in einigen wenigen Zellen gezeigt werden.

Die im Laufe dieser Dissertation etablierten Technologien eröffneten die Möglichkeit, MPF in postmitotischen Herzmuskelzellen zu aktivieren. Die Charakterisierung der Funktionalität von exogenem Cyclin B1 und Cdc2 wurde durch ein auf AVET beruhendem Gentransfer ermöglicht. Es wurde nachgewiesen, dass in ARC keine Proteolyse von mitotischen Cyclinen stattfand, oder jedenfalls nicht in einem Masse, dass exogenes Cyclin B1 signifikant abgebaut wurde. Auf der post-transkriptionellen Ebene konnten weitere Regulationen der MPF Aktivität ausgeschlossen werden, da eine gleichzeitige Expression der Wildtyp-Formen von Cyclin B1 und Cdc2 genügte, um MPF von Neuem zu aktivieren. Dies traf nicht nur für kultivierte ARC zu, sondern war auch in kultivierten NRC zu beobachten. Die Aktivierung von MPF führte in den Herzmuskelzellen zu einer abnormalen Kondensation der Zellkerne, welche von einer Phosphorylierung des H3 Histons und einem in seiner Stärke unterschiedlichen Zerfall des kontraktiven Apparates begleitet war. Obschon eine Zellteilung noch nicht beobachtet werden konnte, sind mit dem Zellzyklus assoziierte Ereignisse durch genetische Manipulierung am G2/M Uebergang in ARC erstmals initiiert worden.

Die hier gemachten Befunde liefern nicht nur neue Erkenntnisse über die Regulation am G2/M Kontrollpunkt in postmitotischen Herzmuskelzellen, sondern geben wichtige Hinweise für die Ausarbeitung von neuen experimentellen Ansätzen, um die Zellteilung wieder in Gang zu bringen.