

Summary

Actin is one of the most abundant and conserved eukaryotic protein consisting of four tissue specific isoforms and two ubiquitous cytoplasmic isoforms. Among two smooth muscle cell (SMC) specific actin isoforms (α and γ), the contractile α -smooth muscle actin (Acta2) constitutes the major isoform in vascular SMC differentiation during the development of the vascular system in the mouse embryo (Skalli et al. 1986).

We have generated a transgenic ES cell line expressing both the puromycin acetyl transferase and enhanced green fluorescent protein cassettes under the control of the Acta2 promoter. Depending upon the culture conditions mixture of cells containing cardiomyocytes and SMCs or contractile SMCs alone were derived from this Acta2 ES cell line. The identity of the cells in each case was examined by RT-PCR, immunostainings and electrophysiology.

Using a specific monolayer culture protocol, an Acta2⁺ SMC population of 95% purity was isolated and was extensively characterized. Complete transcriptome profiling of contractile SMCs has shown that GOs associated with classic SMC cytoskeletal and muscle developmental genes and increase of cell size via hypertrophy were enriched in upregulated transcripts of Acta2⁺ SMCs. GOs such as M phase and pathways such as the cell cycle, which are associated with a high proliferation rate, were markedly enriched in downregulated transcripts of Acta2⁺ SMCs. Culturing of Acta2⁺ SMCs in serum-containing medium resulted in a significant number of hypertrophic and binucleated cells failing to complete cell division. Functional characterization of the cells has been done by stimulation of these cells with vasoactive agents such as angiotensin II and endothelin. I conclude that our ESC-derived SMC population possesses the contractile and hypertrophic phenotype of SMCs incapable of proliferation.

Using the conventional “embryoid body” (EB) differentiation conditions I was able to isolate in addition to SMCs, functional beating Acta2⁺ cardiomyocytes expressing genes and proteins characteristic of cardiomyocytes. Electrophysiological characterization demonstrated that over 75% of the Acta2⁺ cardiomyocytes displayed ventricular-like action potentials.

This is the first study demonstrating the generation and characterization of functional early contractile Acta2⁺ SMCs as well as Acta2⁺ cardiomyocytes, from the same Acta2 ESC line.

Zusammenfassung

Aktin ist eines der am häufigsten vorhandenen und stark konservierten eukaryotischen Proteine, von dem es vier gewebespezifische und zwei ubiquitär exprimierte Isoformen gibt. Von den zwei für glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) spezifischen Aktinisoformen (α und γ -Aktin) ist die kontraktile Isoform α -smooth muscle actin (Acta2) die vorherrschende Isoform während der glatten Gefäßmuskelzelldifferenzierung im Gefäßsystem des Mausembryos (Skalli et al. 1986). Ich habe eine transgene ES-Zelllinie hergestellt, in denen die Kassetten für die Puromycin-Acetyltransferase und das verstärkt grün fluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent, EGFP) unter der Kontrolle des Acta2-Promoters exprimiert werden. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen konnten entweder Mischpopulationen aus Herzmuskelzellen und glatten Muskelzellen oder reine Populationen kontraktiler glatter Muskelzellen aus dieser Acta2-ES-Zelllinie gezüchtet werden. Die Identität der Zellen wurde in beiden Fällen mittels RT-PCR, Immunfärbungen und Elektrophysiologie untersucht. Unter Anwendung eines spezifischen Monolayerkulturprotokolls wurde eine Acta2-positive glatte Muskelzellpopulation mit 95% Reinheit isoliert und detailliert charakterisiert. Die Analyse des kompletten Transkriptom der Zellen zeigte, dass solche GO-Annotationen in den in Acta2-positiven Zellen induzierten Transkripten verstärkt anzutreffen waren, die mit klassischen glatten Muskelzellgenen für Cytoskelett- und Muskelentwicklung sowie Zellwachstum durch Hypertrophie assoziiert sind. GOs zur M-Phase und zu Signaltransduktionswegen, die am Zellzyklus und der verstärkten Zellproliferation beteiligt sind, waren dagegen besonders stark in den Transkripten vertreten, die in Acta2-positiven SMCs herunterreguliert waren. Wenn Acta2⁺ SMCs in serumhaltigem Medium kultiviert werden, wurden signifikante Mengen von hypertrophierten und zweikernigen Zellen beobachtet, die die Zellteilung nicht vollständig durchlaufen konnten. Die funktionelle Charakterisierung dieser Zellen erfolgte durch Stimulation mit vasoaktiven Agenzien wie Angiotensin II und Endothelin. Diese Untersuchungen zeigen, dass die ES-Zell-abgeleiteten SMCs den nichtproliferativen, kontraktilen und hypertrophierten Phänotyp besitzen. Wenn dieselbe Zelllinie im konventionellem "Embryoid Body" (EB)-Protokoll differenziert wurde, wurden zusätzlich zu glatten Muskelzellen funktionale, schlagende Acta2-positive Herzmuskelzellen isoliert, die kardiomyozyten-spezifische Gen- und Protein expressions muster besaßen. Die elektrophysiologische Charakterisierung dieser Zellpopulation zeigte, dass über 75% der Acta2-positiven Herzmuskelzellen ventrikelähnliche Aktionspotentiale besaßen. Durch die vorliegende Arbeit wurde erstmalig die Erzeugung und Charakterisierung funktionaler, früher Acta2-positiver SMCs sowie Acta2-positiver Herzmuskelzellen aus derselben Acta2-ES-Zelllinie gezeigt.