

Diss. ETH No 11448

**The Creatine Kinase Isoenzyme Family:
Mi₂-CK Gene Structure, Expression during
Embryonic Development and Evolution**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

Stephan Markus Mühlebach
Dipl. Natw. ETH

born July 23, 1966
citizen of Tegerfelden (AG)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. J.-C. Perriard (examiner)
Prof. Dr. H. M. Eppenberger (co-examiner)
Dr. B. Schäfer (co-examiner)

1996

Summary

The gene of the chicken Mi_a -CK (a = more acidic pI) was isolated by screening a genomic EMBL3-library by plaque hybridization. The gene is about 7.6 kb long and contains 9 exons. A large intron of 4.2 kb length separates the first exon from the compact, main part of the gene. The region of the first exon and its flanking sequences show a peculiar base composition, with more than 80 % GC, and have the characteristic of a CpG-island. The upstream sequences lack TATA or CCAAT boxes and display thus further properties of housekeeping genes. The putative promoter region contains two binding sites for the ubiquitous transcription factor SP1 and several for the transcription factor AP2, which are also present in the promoter regions of the cloned, mammalian Mi_a -CK genes. Several additional binding sites can be found in the promoter of the chicken Mi_a -CK gene, while other sites, known from the promoters of the mammalian Mi_a -CK genes, are absent.

The 9 exons of the gene give rise to only one transcript in all tissues that were looked at. The length of the cDNA is about 1480 bp, but the transcription start site could not be mapped by any of the known standard methods due to the high GC-content at the 5'-end. The cDNA codes for a protein of 417 amino acids, of which 39 amino acids represent the mitochondrial import peptide. The protein sequence of the mature Mi_a -CK and also the mature Mi_b -CK protein are highly conserved to the homologous mammalian proteins. The mitochondrial import peptides, however, which are isoenzyme-specifically conserved among the mammalian Mi -CKs, are quite different in the chicken.

A more extensive, comparative protein sequence analysis of all known, active CKs was used to identify highly conserved regions and to correlate these regions with known enzymatic or structural properties of the CKs. An extended comparison, including other guanidino kinases, allows to discuss some aspects of the evolution of the guanidino kinases and the CKs.

The expression of Mi_a -CK and B-CK was analysed in different adult tissues by RNase protection and in situ hybridization experiments. Mi_a -CK transcripts are not present in all the tissues, that display B-CK expression. In addition Mi_a -CK expression is limited in the other tissues to specific cells, while B-CK mRNA is detectable in more cell types. Hence, the promoter

elements of the chicken Mi_a -CK gene, which would predict an ubiquitous range of expression, are misleading.

The expression of the four CK-genes was analysed during embryonic development of the chicken by in situ hybridization and RNase protection experiments. B-CK is first expressed in neural tube and developing brain at Hamburger-Hamilton stage (HHst) 8 (after 1 day) and in earliest heart anlage at HHst 9. B-CK transcripts appear in the myotome at HHst 13 (after 2 days) together with the myogenic factor MyoD. Hence, B-CK is a full day earlier than M-CK, which is first detectable at HHst 19 in the myotome. The earliest expression of Mi_a -CK is observed in a part of the retina at HHst 21. At HHst 34 (8 days) Mi_a -CK can be found in different other neural tissues. Mi_b -CK expression is detected not until day 15 in heart and skeletal muscle. The data on the CK expression during embryonic development show, that no Mi-CK is ever expressed alone in a tissue, that there is no isoenzyme switch of the Mi-CKs in skeletal muscle, as has been observed for the cytosolic CKs, and that the early embryonic development can proceed without Mi-CKs. Aspects of the regulation of the CK expression during embryonic development are, finally, discussed for the different isoenzymes.

Zusammenfassung

Das Gen der Hühnchen Mi_a -CK (a = tieferer, d. h. azider pI) wurde durch das Absuchen einer EMBL3-Genbank mittels Plaquehybridisierung isoliert. Dieses Einzelkopie-Gen ist etwa 7.6 Kilobasenpaare gross und enthält 9 Exons. Ein grosses Intron mit einer Länge von 4.2 Kilobasenpaaren trennt den ersten Exon vom kompakten, nur 3 Kilobasenpaare umfassenden Rest des Genes. Der Bereich des ersten Exons und seine flankierenden Regionen zeigen mit einem GC-Gehalt von über 80 % eine spezielle Basenzusammensetzung und haben die Charakteristika einer sogenannten "CpG-insel". Im 5'-flankierenden Bereich des Genes fehlen sowohl TATA- wie auch CCAAT-box und die Promotor Region des Hühnchen Mi_a -CK Genes zeigt damit weitere, typische Eigenschaften, wie sie in konstitutiv exprimierten Genen gefunden werden. Die 5'-flankierende Region enthält zwei mögliche Bindungsstellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor SP1 und mehrere für den Transkriptionsfaktor AP2, welche auch in den zwei klonierten Mi_a -CK Genen der Säugetiere vorhanden sind. Der Promotor des Hühnchen Genes weist Bindungsstellen für zusätzlich Transkriptionsfaktoren auf während andere, bei den Säugetier-Genen vorhandene Bindungsstellen fehlen.

Die 9 Exone des Genes ergeben in allen untersuchten Geweben nur ein Transkript. Die Länge der cDNS beträgt circa 1480 Basenpaaren, jedoch konnte der genaue Transkriptionsstart auf Grund des hohen GC-Gehaltes am 5'-Ende mit keiner der bekannten Standardmethoden bestimmt werden. Die cDNS codiert für ein Protein von 417 Aminosäuren, wovon 39 das mitochondriale Importpeptid repräsentieren. Die Aminosäuresequenz des reifen Mi_a -CK -, wie auch diejenige des reifen Mi_b -CK Proteins sind hoch konserviert zu den homologen Proteinen der Säugetiere. Während diese Konservierung der Primärstruktur sich bei den Säugetieren auch in den Importpeptiden zeigt, sind die Importpeptide der Mi -CKs der Hühnchen von den Importpeptiden der zu ihnen homologen Mi -CKs der Säugetiere verschieden.

Eine weitergehende, vergleichende Proteinsequenzanalyse aller bekannten aktiven CKs wurde dazu verwendet hoch konservierte Regionen zu identifizieren und diese Regionen mit bekannten enzymatischen oder strukturellen Eigenschaften der CKs zu korrelieren. Der Einbezug anderer Guanidino Kinasen in einen erweiterten Vergleich erlaubt es schliesslich

gewisse Aspekte der Evolution der Guanidino Kinasen und der CKs zu diskutieren.

Die Expression von Mi_a -CK und B-CK wurde in verschiedenen adulten Geweben mittels RNase-Protektionsexperimenten und In situ Hybridisierungen analysiert. Mi_a -CK Transkripte sind nicht in allen Geweben vorhanden, in welchen B-CK vorkommt. Im weiteren beschränkt sich die Expression von Mi_a -CK auf spezifische Zellen, während B-CK-Transkripte in viel mehr Zelltypen detektierbar sind. Die Promotorelemente des Mi_a -CK Genes, die eine ubiquitäre Expression erwarten liessen, sind daher irreführend.

Die Expression der vier CK-Gene wurde in der Embryonalentwicklung des Hühnchens mittels In situ Hybridisierung und RNaseprotektionsexperimenten analysiert. B-CK wird im Neuralrohr und im sich entwickelnden Hirn ab Hamburger-Hamiltonstadium (HHst) 8 (nach 1 Tag) und in der frühesten Herzanlage ab HHst 9 als erste CK exprimiert. B-CK Transkripte erscheinen gleichzeitig mit Transkripten für den myogenen Faktor MyoD ab HHst 13 (nach 2 Tagen) im Myotom und sind damit einen Tag früher als M-CK, welches erst ab HHst 19 detektierbar ist. Mi_a -CK ist erstmals ab HHst 21 in einem Teil der Retina zu beobachten und kann bei einem Embryo des HHst 34 (8 Tage) auch in verschiedenen anderen neuralen Geweben festgestellt werden. Mi_b -CK expression wird erst ab Tag 15 in Herz und Skelettmuskulatur beobachtet. Die Daten über die CK Expression in der Embryonalentwicklung zeigen, dass keine Mi-CK zu irgendeinem Zeitpunkt alleine in einem Gewebe exprimiert wird, dass es in der Skelettmuskulatur keinen Isoenzymwechsel bei den Mi-CKs gibt, wie er bei den zytosolischen CKs festgestellt wurde, und dass die frühe Embryonalentwicklung ohne die Mi-CKs auszukommen scheint. Aspekte der Regulation der CK-Expression während der Embryonalentwicklung werden für die verschiedenen Isoenzyme diskutiert.