



Doctoral Thesis

## The molecular biology of chicken myomesin

**Author(s):**

Bantle, Stefan Franz

**Publication Date:**

1997

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001843467> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No 12157

# **The molecular biology of chicken myomesin**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Science

presented by  
Stefan Franz Bantle  
Dipl. Natw. ETH  
born July 9, 1964  
citizen of Obfelden, Zurich

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Jean-Claude Perriard, Referent  
Prof. Dr. Hans M. Eppenberger, Koreferent  
Prof. Dr. Dieter Fürst, Koreferent  
1997

## Summary

---

During the past 50 years of muscle research, a lot of information has been accumulated. Nevertheless, we don't know enough about many muscle proteins to understand the muscles in every detail, which is, however, absolutely necessary in order to heal diseases affecting muscle.

Fully differentiated and contracting muscle cells in skeletal muscle and heart contain myofibrils consisting of three types of filaments, thick (myosin), thin (actin), and third elastic (titin) filaments. Besides their main components, myosin, actin, and titin, the three filament types consist of many associated proteins without which muscle contraction would not be possible. These proteins are responsible for the stabilization of the myofibrils, they seem to have regulatory functions, and last but not least, they seem to direct the assembly of the three filament types and the formation of new myofibrils.

In this work the structure and the function of the myofibrillar protein myomesin has been addressed. Myomesin has been discovered in the early eighties in the Institute of Cell Biology at the Swiss Federal Institute of Technology (Eppenberger et al., 1981). It is a high molecular weight protein, which is present in all fiber types of cross-striated skeletal muscle and heart. It is located in the middle of the myofibrillar sarcomere, in the M-band region, where thick filaments are cross-linked. We have isolated two cDNAs encoding tissue-specific isoforms of chicken myomesin with calculated molecular masses of 174 kDa in skeletal muscle and 182 kDa in heart. Distinct sequences are found at the 3'-end of the two cDNAs, giving rise to different C-terminal domains. Partial analysis of the gene structure has shown that in chicken, both isoforms are generated from a putatively single gene by alternative splicing of a complex exon. As shown by *in situ* hybridization and Northern blot analysis, the two isoforms are expressed in a tissue-specific manner in the chicken embryo. Cardiac myomesin with the bigger C-terminal domain is expressed in the heart of 8-day-old chicken embryos, exclusively, whereas the skeletal isoform with the shorter C-terminal domain is mainly expressed in cells of the developing skeletal muscle but also in heart, even though to a lesser extent. Accordingly, the length of the myomesin transcripts varies between skeletal muscle and heart: A 5.5 kb long transcript is present in skeletal muscle and two transcripts of 7.5 kb and 9.0 kb occur in the heart. The strictly heart-specific expression of cardiac chicken myomesin was also confirmed by RT-PCR carried out on the same RNA, which was used for the Northern blot analysis. Although RT-PCR is much more sensitive than the Northern blot technology, the specific 3'-sequence of cardiac myomesin could not be detected

in the leg derived RNA. The skeletal muscle-specific sequence, however, could be easily amplified from the corresponding cardiac RNA. Comparison of the chicken myomesin sequences with partial rat myomesin sequences, isolated from a heart cDNA library, have shown that the C-terminus of rat myomesin occurring in heart is highly homologous with the corresponding domain of chicken skeletal myomesin. This observation and the presence of only one 5.5 kb transcript in rat skeletal muscle and heart strongly indicate, that the same isoform of myomesin is expressed in both tissues and that no second isoform is present in rat.

Inspection of the amino acid sequence has shown that myomesin has a main body consisting of five fibronectin type III (class I motifs) as well as seven immunoglobulin-like domains (class II motifs), and particular domains at both ends. Therefore, myomesin belongs to the permanently growing immunoglobulin superfamily. Expression of full length chicken myomesin in cultured neonatal rat cardiomyocytes, as well as several deletion mutants thereof, has shown that the first immunoglobulin-like domain of myomesin is essential for the correct M-band localization of myomesin.

The results obtained from this work will contribute to a better understanding of the myofibril in the first order and the muscle in the second order. Furthermore, it will hopefully contribute to a complete understanding of the formation, structure and function of skeletal and cardiac muscle, in order to help people suffering from severe muscle diseases.

## Zusammenfassung

---

Alle kontrahierenden Muskelzellen der quergestreiften Muskulatur enthalten Myofibrillen. Die Myofibrillen bestehen aus drei Filamenttypen, nämlich dicken Myosin-Filamenten, dünnen Aktin-Filamenten und elastischen Titinfilamenten. Neben ihren Hauptbestandteilen, dem Myosin, dem Aktin und dem Titin, enthalten alle drei Filamenttypen zusätzliche Proteine. Diese tragen im adulten Gewebe massgeblich zur Stabilität der Myofibrillen bei. Die meisten dieser assoziierten Proteine scheinen aber auch für die Myofibrillogenese wesentlich zu sein, indem sie die Vernetzung der erwähnten Filamente steuern. In der fertigen Myofibrille scheinen sie ausserdem regulatorisch von Bedeutung zu sein. Obwohl wir in den letzten 50 Jahren viel über die Vorgänge in den Muskelzellen lernten, ist unser Wissen über die Myofibrille immer noch unvollständig. Dieses ist aber von grundlegender Bedeutung, wenn wir eines Tages alle Erkrankungen, bei denen die Muskulatur betroffen ist und von denen zahlreiche sehr schwerwiegend sind, verstehen und heilen wollen.

Die vorliegende Arbeit möchte zum exakten Verständnis der Myofibrille beitragen. Es wurde das M-Bandenprotein Myomesin untersucht, das anfangs der 80er Jahre am Institut für Zellbiologie der ETH Zürich entdeckt wurde (Eppenberger et al., 1981). Myomesin kommt in allen Fasertypen der quergestreiften Muskulatur vor und ist dort in der M-Bande lokalisiert. Es wurden zwei Hühner cDNAs isoliert, die für zwei verschiedene Isoformen von Myomesin codieren. Der Unterschied zwischen den beiden cDNAs liegt am 3'-Ende und führt zu Isoform-spezifischen C-Termini in den reifen Isoproteinen, die unterschiedliche berechnete Massen von 174 kDa und 182 kDa aufweisen. Wie eine partielle Analyse der Genstruktur ergab, entstehen die beiden Isoformen von Myomesin durch alternatives Splicing. In situ Hybridisierung und Northern Blots haben ausserdem gezeigt, dass die beiden Isoformen im Hühnerembryo und vermutlich auch im ausgewachsenen Huhn gewebsspezifisch exprimiert werden. Mittels in situ Hybridisierung wurde die RNA der grösseren Isoform in 8 Tage alten Hühnerembryonen ausschliesslich im Herz detektiert, während das Transkript für die kleinere Isoform zwar hauptsächlich in den Skelettmuskelanlagen, aber in geringerem Ausmass auch im Herz gefunden wurde. Dementsprechend wurden durch Northern Blot Hybridisierung unterschiedlich lange Transkripte im Beinmuskel und im Herz von 17 Tage alten Hühnerembryonen gefunden: Im Skelettmuskel findet man ein 5.5 kb langes Transkript und im Herz ein 7.5 kb, sowie ein 9.0 kb langes Transkript. Das identische Muster wurde mit adulter RNA erhalten. Die Herz-Spezifität der 182 kDa Isoform von Hühnermyomesin konnte

durch RT-PCR weiter bestätigt werden. Obwohl diese Methode sensitiver ist als die Northern Blot Hybridisierung, konnte die 3'-Sequenz, die spezifisch im Myomesin des Herzmuskels gefunden wurde, in der Bein-RNA von 17 Tage alten Hühnerembryonen nicht nachgewiesen werden. Die Skelettmuskel-spezifische 3'-Sequenz hingegen konnte aus der Herz-RNA von 17 Tage alten Embryonen problemlos amplifiziert werden konnte.

Um herauszufinden, ob auch Säuger verschiedene Myomesin-Isoformen haben, wurden verschiedene cDNAs aus einer embryonalen Rattenherz cDNA-Bibliothek isoliert und sequenziert. Die erhaltenen partiellen Sequenzen von Rattenmyomesin wurden dann mit den bereits vorhandenen Sequenzen von Hühnermyomesin verglichen. Dabei zeigte sich, dass das 3'-Ende der codierenden Sequenz des Myomesins im Rattenherz grosse Homologie zum entsprechenden Teil der Skelettmuskel-spezifischen Myomesinsequenz aufweist. Northern Blot Hybridisierungen zeigten ausserdem, dass sowohl im Skelettmuskel als auch im Herz von Ratten nur ein Myomesintranskript existiert, welches eine Länge von 5.5 kb hat. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass im Skelettmuskel und im Herz von Ratten dieselbe Myomesinisoform vorhanden ist und keine zweite Isoform existiert.

Die von den cDNAs abgeleitete Aminosäuresequenz von Myomesin zeigt eine modulare Domänenstruktur, bestehend aus fünf Fibronectin Typ III (Klasse I Motiv) und sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Klasse II Motiv), sowie je einer Domäne ohne Homologie zu bekannten Domärentypen an beiden Enden. Aufgrund der Klasse I und II Motive gehört Myomesin zu der stetig wachsenden Immunglobulin-Superfamilie.

Expression der kompletten codierenden Sequenz von Hühnermyomesin in kultivierten, neonatalen Rattenherzzellen, sowie die Expression verschiedener Deletionsmutanten desselben Myomesins, zeigten, dass das erste Klasse II Motiv von besonderer Bedeutung ist. Diese Immunglobulin-Domäne scheint für die M-Banden-Lokalisierung von Myomesin verantwortlich zu sein.

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werden helfen, die Myofibrille besser zu verstehen. Daraus wächst hoffentlich ein umfassendes Verständnis für die Entstehung, Struktur und Funktion von Skelett- und Herzmuskel, das die Heilung von schweren Muskelerkrankungen ermöglichen wird.