

Dissertation ETH No. 16781

**Myomesin family members –  
implications for the M-band function**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZURICH

for the degree of  
Doctor of sciences ETH Zurich  
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by  
Roman Schönauer  
Dipl. Natw. ETH

born April 10<sup>th</sup> 1978

citizen of Kirchberg, BE

accepted with the recommendation of  
Prof. Dr. U. Boutellier, examiner  
Prof. Dr. J.-C. Perriard, co-examiner  
Dr. I. Agarkova, co-examiner

Zurich, 2006

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Das Sarkomer ist die Struktureinheit des quergestreiften Muskels, eine hoch organisierte Maschine der Natur, die chemische Energie in mechanische Kraft umwandelt. Es besteht aus einer regelmäßigen Anordnung von Filamenten der kontraktilen Proteine Aktin und Myosin, die in der Z-Scheibe bzw. in der M-Bande vernetzt sind. Das riesige Protein Titin bildet ein elastisches Filamentsystem, das sich von der Z-Scheibe bis zur M-Bande erstreckt, und hat eine wichtige Funktion in der Entwicklung und Aufrechterhaltung des quergestreiften Muskels. Während die Struktur und Funktion der Z-Scheibe und Titinfilamente intensiv analysiert worden sind, ist bisher relativ wenig über die M-Bande und seine Bestandteile bekannt. Diese Arbeit versucht jene Lücke zu schliessen, indem sie die Funktion und die Expression der Mitglieder der Myomesinfamilie, der strukturellen Bestandteile der M-Bande, untersucht.

Die M-Bande, als bedeutender Teil des Zytoskeletts im Sarkomer, ist ein komplexes Proteinnetzwerk, welches das Gitter der dicken Filamente im Sarkomer während der Kontraktion stabilisiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass die konstitutive Komponente der M-Bande in Vertebraten, Myomesin, antiparallele Dimere bilden kann, welche die benachbarten dicken Filamente quervernetzen dürften. Folglich scheint dessen primäre Funktion die Aufrechterhaltung der perfekten Ausrichtung der Myosinfilamente im Sarkomer zu sein. Myomesin ist in allen Typen der quergestreiften Muskulatur exprimiert und besteht aus Immunoglobulin (Ig) und Fibronectin Typ III (Fn) Domänen, aber mehrere Muskeltypen exprimieren die EH-Myomesin Isoform, die durch den Einschluss des einzigartigen EH-Segmentes von etwa 100 Aminosäuren in der Mitte des Moleküls generiert wird.

In dieser Arbeit charakterisieren wir Myomesin auf biophysikalische Art und Weise mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie. Das Rasterkraftmikroskop identifiziert den „mechanischen Fingerabdruck“ der Module, die das Myomesin-Molekül aufbauen. Das Ziehen von homomeren Polyproteinen, konstruiert aus Ig und Fn Domänen von humanem Myomesin, produziert typische Sägezahn-Muster in der Kraft-Ausdehnungskurve, und die Domänen falten leicht zurück nach der Relaxation. Das EH-Segment zeigt keinen Entfaltungs-Peak und ist charakterisiert als entropische Feder. Zusätzlich erscheint es als Lücke innerhalb des Moleküls auf den TEM Bildern, was darauf hinweist, dass es die Konformation einer zufälligen Windung hat ähnlich der PEVK Domäne von Titin. CD Spektroskopie Messungen unterstützen dieses Resultat, indem sie eine

mehrheitlich ungefaltete Konformation des EH-Segmentes zeigen. Dies legt nahe, dass Myomesin eine molekulare Feder ist, deren Elastizität durch alternatives Spleissen moduliert werden kann, während die Ig und Fn Domänen durch sequentielles Entfalten beim Einwirken von extremen Dehnungskräften als reversible „Stossdämpfer“ funktionieren dürften.

Zusätzlich wird das Fasertyp-spezifische Expressionsmuster der EH-Myomesin-Isoform im Skelettmuskel der Maus und dessen Korrelation mit M-Protein untersucht. Dabei zeigt sich, dass EH-Myomesin in allen Typ I Fasern und in einem Teil der Typ IIA Fasern während der postnatalen Entwicklung des Skelettmuskels aufreguliert wird. Im Weiteren kann ein komplementäres Expressionsmuster von EH-myomesin und M-protein in histologischen Querschnitten von Mäusehinterbeinen gezeigt werden: Alle M-Banden in schnellen Fasern enthalten M-Protein, während die M-Banden in langsamen Fasern einen signifikanten Anteil an EH-Myomesin enthalten, welches vorher nur im embryonalen Herzen nachgewiesen werden konnte.

Durch die Verwendung von vergleichender Sequenzanalyse haben wir ein neues Gen identifiziert, welches nahe verwandt ist sowohl mit M-Protein als auch Myomesin und welches die gleiche Intron-Exon und Domänenanordnung hat. Wir zeigen, dass dieses neue Mitglied der Myomesinfamilie (Myomesin 3) in verschiedenen Typen der quergestreiften Muskulatur differentiell exprimiert wird, am stärksten in Skelettmuskel von Neugeborenen und in adulten langsam kontrahierenden Muskeln wie Soleus und Diaphragma. Mit Hilfe von Immunhistochemie und konfokaler Mikroskopie beweisen wir, dass Myomesin 3 eine neue Proteinkomponente der sarkomerischen M-Bande ist. Zusätzlich zeigen neonatale Rattenkardiomyozyten, transfektiert mit Konstrukten, welche N-terminale Fragmente von Myomesin 3 kodieren, M-Banden Lokalisierung. Die Expression von Myomesin 3 im Skelettmuskel ist Fasertyp-spezifisch, wobei es in den IIA Fasern der Maus am stärksten exprimiert ist. Interessanterweise ist Myomesin 3 im Mäuseherzen unter normalen Umständen nicht detektierbar, aber im adulten Herzen des Menschen kann es nachgewiesen werden. Im Weiteren können die Expressionslevel der verschiedenen Komponenten der M-Bande wie EH-Myomesin oder Myomesin 3 im Falle von dilatierter Herzmuskelschwäche erhöht sein.

Wir schliessen aus obigen Resultaten, dass jeder Muskel charakterisiert ist durch eine spezifische Zusammensetzung von Proteinen der M-Bande, welche sich an verschiedene physiologische Bedürfnisse in verschiedenen Muskeltypen und Spezies anpassen kann.

### 3 SUMMARY

The sarcomere is the structural unit of striated muscle, a highly organized natural apparatus that converts chemical energy into mechanical force. It consists of regular arrays of filaments of the contractile proteins actin and myosin that are crosslinked in the Z-disk and M-band, respectively. The giant protein titin forms an elastic filament system, stretching from the Z-disk to the M-band, and has an important function in development and maintenance of striated muscle. Whereas the structure and function of the Z-disk and titin filaments have been intensively studied, relatively little is known about the M-band and its components. This study tries to close this gap by investigating the function and expression of the myomesin family members, the structural components of the M-band.

The M-band, as a prominent part of the sarcomeric cytoskeleton, is a complex protein network which is believed to stabilize the thick filament lattice in the sarcomere during contraction. It was shown recently that the constitutive vertebrate M-band component myomesin can form antiparallel dimers, which might cross-link the neighboring thick filaments. Consequently, its primary function may be the maintenance of the perfect alignment of the myosin filaments in the sarcomere. Myomesin is expressed in all types of striated muscle and consists of immunoglobulin-like (Ig) and fibronectin type III (Fn) domains, while several muscle types express the EH-myomesin splice isoform, generated by the inclusion of the unique EH-segment of about 100 amino acid residues (aa) in the center of the molecule.

In this study, we biophysically characterize myomesin by using atomic force microscopy (AFM), transmission electron microscopy (TEM) and circular dichroism (CD) spectroscopy. The AFM identifies the “mechanical fingerprints” of the modules constituting the myomesin molecule. Stretching of homomeric polyproteins, constructed of Ig and Fn domains of human myomesin, produces a typical saw-tooth pattern in the force-extension curve and the domains readily refold after relaxation. The EH-segment displays no unfolding peak and is characterized as an entropic spring. In addition, it appears as a gap in the molecule in TEM pictures, indicating a random coil conformation similar to the PEVK region of titin. CD spectroscopy measurements support this result, demonstrating a mostly non-folded conformation for the EH-segment. This suggests that myomesin is a molecular spring, whose elasticity can be modulated by alternative splicing, whereas the Ig and Fn domains might

function as reversible “shock absorbers” by sequential unfolding in the case of extreme stretching forces.

In addition, the fiber-type dependent expression pattern of the EH-myomesin isoform in mouse skeletal muscle and its correlation with M-protein is analyzed, revealing an upregulation of EH-myomesin in all type I and in part of the type IIA fibers during postnatal skeletal muscle development. Furthermore, a complementary expression pattern of EH-myomesin and M-protein can be shown in histological cross-sections of mouse hind limbs: All M-bands in fast fibers contain M-protein while M-bands in slow fibers contain a significant proportion of the EH-myomesin isoform, previously detected only in embryonic heart muscle.

Using comparative sequence analysis we have identified a novel gene, which is closely related to both M-protein and myomesin and shares the same intron-exon and domain arrangement. We show that the new member of the myomesin family (myomesin 3) is differentially expressed in various kinds of striated muscle with the highest level in newborn skeletal and adult slow muscles, like soleus and diaphragm. Using immuno-histochemistry and confocal microscopy we prove that myomesin 3 is a novel protein component of the sarcomeric M-band. Transfections of neonatal rat cardiomyocytes with constructs encoding N-terminal fragments of myomesin 3 show M-band localization as well. The expression of myomesin 3 in skeletal muscle is fiber-type specific with the highest expression level in IIA fibers of mouse. Interestingly, myomesin 3 is absent from the mouse heart under normal conditions, but can be detected in the adult human heart. Besides, the expression level of different M-band components such as EH-myomesin or myomesin 3 can be increased in the case of dilated cardiomyopathy.

We conclude that each muscle type is characterized by its unique M-band protein composition, which is adapted to divergent physiological needs in different muscles and species.