

# Cell biological aspects of muscle cell differentiation

## Citation for published version (APA):

van der Loop, F. T. L. (1996). *Cell biological aspects of muscle cell differentiation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19960229fl>

## Document status and date:

Published: 01/01/1996

## DOI:

[10.26481/dis.19960229fl](https://doi.org/10.26481/dis.19960229fl)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# 8

## General summary.

---

Muscle cell differentiation has been studied in skeletal, cardiac and smooth muscle cells in a broad spectrum of species and tissues, both in *in vitro* and in *in vivo* systems. The investigations described in this thesis have focussed on structural proteins that may function as markers for particular stages of differentiation. In striated muscle cells the high molecular weight protein titin is supposed to play a key role in the organization of the sarcomere. The first part of this thesis deals with the role of titin in the organization of the sarcomere (chapters 2 & 3). Chapter 2 describes the onset of titin expression during myogenesis in mammalian cell lines of different origin. The unfolding of the titin molecule and its integration into the sarcomere during *in vitro* muscle cell differentiation was studied in more detail (chapter 3). Subsequently, the expression and the intracellular reorganization of this giant protein in relation to other sarcomeric constituents, intermediate filaments (IF) and desmosomal proteins was studied in rabbit embryos (chapters 4 & 5). In the last two chapters (6 & 7) the novel smooth muscle specific protein *smoothelin* is presented. The cytoskeletal expression of this constituent, which is exclusively expressed in fully differentiated smooth muscle cells (SMC), is studied both in normal and in pathological types of SMC.

### ***In vitro* myogenesis of skeletal muscle cells.**

Myogenic cell lines have been used as models to unravel the molecular aspects of sarcomere formation in striated muscle cells. By focussing on the supramolecular structure of titin, the general mechanism that underlies the organizational changes during differentiation was studied.

Chapter 2 describes the process of sarcomere formation in three established myogenic cell lines as monitored by the occurrence and (re)organization of titin, desmin, vimentin, myosin and actin. It was demonstrated that titin is present in an early stage of differentiation and is reorganized from a punctate pattern, via stress fiber-associated aggregates, into a cross-striated pattern. In differentiating muscle cell cultures a certain delay was observed between the redistribution of titin on the one hand, and of desmin, actin and myosin on the other hand. This occurs in a typical, differentiation state dependent fashion, and suggests a leading role for titin by forming the scaffold for sarcomere formation. In addition, primary cultures of rat myocard cells were used to monitor the effect of "dedifferentiation" on the structure of sarcomeres. The sequence of events characteristic for the assembly process of cytoskeletal and sarcomeric structures observed during differentiation, was reversed during this process of dedifferentiation.

Control of differentiation of cultured human skeletal muscle cells allowed the monitoring of the dynamic process of titin assembly and its integration into the sarcomeres by antibodies to four titin epitopes. These epitopes are clearly distinguishable on the extended titin molecule as seen in matured muscle cells. In postmitotic mononuclear myoblasts, the investigated titin epitopes were clearly separate but clustered, indicating a folded organization of the molecule. During elongation and fusion of the cells, these titin epitope signals associated with stress fiber-like structures (SFLS) and diverged, finally reaching their position at either the Z-line, the A-I junction or the A-band, as indicated by epitope-specific cross-striations. In chapter 3 we propose a model for this process, in which the large titin molecule is unfolded and guided by stress fiber-like structures. These SFLS direct the amino-terminus of the molecule towards the Z-line and the carboxy-terminus towards the M-line of the sarcomere. While this process of unfolding of the titin molecule progresses, other A-band or Z-line components start to migrate to their specific positions in the nascent sarcomere. The human skeletal muscle cell line appears to be a good model system to study sarcomere formation in more detail, especially since monoclonal antibodies against titin-epitopes closer to the M-line or to the Z-line are now becoming available. Also, reagents recognizing M-line associated proteins, like C-protein or H-protein, are being prepared to study their association with titin.

### ***In vivo* cardiomyogenesis.**

The expression and intracellular (re)distribution of structural muscle proteins was studied during embryonic rabbit heart development. Monoclonal antibodies against titin, myosin, tropomyosin and actin, the intermediate filament proteins (IFP) desmin, keratin and vimentin, and the desmosome-associated proteins desmoplakins 1&2 were used to study sarcomere formation. Here too, titin is the first specific indicator of embryonic rabbit heart development. Upon differentiation titin reorganizes from dot-like aggregates into a cross-striated

pattern via a transiently filamentous distribution. It has been demonstrated that the organization of tropomyosin, desmin, myosin and actin into striated patterns are preceded by titin striation. Keratin and vimentin are initially distributed in cytoplasmic filaments, but are gradually lost during progression of cardiogenesis. Comparison of these results with studies on mouse, chick and rat revealed that the sequence of expression of muscle-specific and IFP during cardiomyogenesis is species-specific, and that expression and organization of these constituents show temporal variations for the different regions of the developing heart (chapter 4).

The role of the transient expression of certain IFP in rabbit myocardium differentiation was investigated with emphasis on the interaction of keratin filaments with desmoplakin clusters. During development of the myocardium, desmoplakin clusters gradually rearrange from an apicolateral- into an intercalated disc localization in later stages. In the developing myocardium of the rabbit heart, the keratin filaments are gradually lost via dot-like aggregates which colocalize with desmoplakin-positive clusters. These observations suggest a role for keratins in the developmental rearrangement of cell-junctions. The reorganization of desmin, an intercalated disc-associated component in the adult myocardium, and titin does not seem to be related to the desmosome rearrangement (chapter 5).

### **Smooth muscle cell differentiation.**

Knowledge about differentiation processes in SMC is limited as compared to striated muscle cells. This is partly due to the lack of stage specific marker proteins. A novel cytoskeletal protein, designated "*smoothelin*", has been shown to be exclusively expressed in highly differentiated ("contractile") visceral and vascular smooth muscle cells. Smoothelin was not detected in myofibroblasts, myoepithelial, skeletal or cardiac muscle cells. This protein may, therefore, be helpful in the elucidation of the final differentiation steps in SMC. Chapters 6 & 7 of this thesis describe the characterization and a series of observations using this novel marker protein. A human smooth muscle cDNA library was screened with a monoclonal antibody to smoothelin, and a full size cDNA was selected. In situ hybridization with this cDNA probe demonstrated that human smoothelin is encoded by a single copy gene which is located on chromosome 22. Immunohistochemical assays, Western blotting and Northern blotting revealed that smoothelin was highly conserved throughout evolution. Cell fractionation studies of colon smooth muscle showed that the protein is retained in the cytoskeletal fraction of this tissue, while confocal scanning laser microscopy suggested that smoothelin is organized as filaments that do not colocalize with desmin, vimentin or actin filaments. Transfection studies of the human cDNA in COS7 cells produced a protein of the correct size which assembled into a filamentous network. Protein sequence analysis revealed that smoothelin does not belong to one of the classes of presently known structural proteins.

Furthermore, smoothelin contains a domain of 56 amino acid residues showing about 40% homology with a sequence bordering the actin binding domains of dystrophin,  $\beta$ -spectrin and  $\alpha$ -actinin (chapter 6). Smoothelin transcription was almost instantly halted when smooth muscle cells were removed from their natural environment, indicating that its expression is limited to highly differentiated, contractile smooth muscle cells.

The presence of smoothelin in vascular SMC was investigated in more detail. It was found that smoothelin expression was strongly related to the contractile properties of the blood vessel in which the SMC occur. Elastic arteries do, in general, contain only few smoothelin positive SMC. When muscular arteries were investigated it became obvious that the frequency of smoothelin expressing SMC increased with the contractile labour to be generated by the blood vessel wall. Smoothelin was not detected in capillaries and pericytic venules, nor in the SMC of veins. When arteriosclerotic lesions were screened for the presence of smoothelin, positive cells were detected mostly at the luminal surface of advanced lesions. This indicates that fully differentiated cells of smooth muscle origin are present in these lesions, suggesting that these plaques are not longer expanding. Thus, in addition to its value as a marker protein for the final differentiation step of "normal" SMC, smoothelin may be valuable in the diagnostic characterization of "pathological" SMC.

---

# 9

## Samenvatting.

---

Spierceldifferentiatie werd bestudeerd in skelet-, hart- en gladde spiercellen, waarbij een breed spectrum aan humane- en dierlijke weefsels werd gebruikt. Studies werden zowel verricht *in vitro* (in gekweekte cellen) als *in vivo* (in levende organismen). Strukturele eiwitten dienden daarbij als "markers", of indicators, voor bepaalde "differentiatie-" of ontwikkelingsstadia. Skelet- en hartspiercellen vormen samen de groep van "dwarsgestreepte" spieren, waarin microscopisch een groot aantal, achter en naast elkaar gerangschikte structuren zichtbaar zijn: de sarcomeren. Deze sarcomeren vormen de contractiele eenheden binnen deze cellen. De structuur van deze sarcomeren wordt uitgebreid besproken in hoofdstuk 1.

Titine, een eiwit met een zeer hoog molekulgewicht, wordt verondersteld een sleutelrol te vervullen in de organisatie van de sarcomeren. De fase van aanschakeling van de titine-synthese tijdens de ontwikkeling van jonge tot volwassen spiercel, de myogenese, wordt beschreven voor een aantal cellijnen (hoofdstuk 2). Het ontvouwen van het titine-molekuul en de integratie van dit eiwit in de sarcomeer tijdens *in vitro* spierceldifferentiatie werd in detail bestudeerd (hoofdstuk 3). De expressie en de intracellulaire organisatie van dit eiwit in relatie met andere sarcomeercomponenten, zoals intermediaire filamenten en desmosomale eiwitten, werd bestudeerd in konijn-embryo's (hoofdstuk 4 & 5). Tenslotte wordt smootheline, een nieuw, gladde spier specifiek eiwit, gepresenteerd. Met behulp van celbiologische- en molekulair biologische technieken werd dit eiwit, dat alleen voorkomt in volledig gedifferentieerde gladde spiercellen, gekarakteriseerd als een onderdeel van het cytoskelet (hoofdstuk 6). Daarnaast werd de aanwezigheid van smootheline bestudeerd in de gladde spiercellen van zowel normale als aangedane bloedvaten (hoofdstuk 7).

### **De rol van titine tijdens de *in vitro* myogenese van skeletspiercellen.**

De verschillende fasen in de opbouw van sarcomeren tijdens spiercel-differentiatie werd bestudeerd aan de hand van de structuurverandering van titine, waarbij spiercellijnen als modelsysteem werden gebruikt. In hoofdstuk 2 wordt het proces van sarcomeervorming in drie bekende, veelvuldig gebruikte myogene cellijnen beschreven, waarbij met name de aanschakeling en de (re-)organisatie van titine, desmine, vimentine, myosine en actine werd gevolgd. Titine bleek al aanwezig in een vroeg stadium van de spierceldifferentiatie. In jonge spiercellen, de zogenaamde myoblasten, wordt titine aangetroffen in aggregaten, die onder het microscoop zichtbaar zijn als 'punten'. Deze aggregaten gaan stapsgewijs, via een tijdelijke associatie met stress-fibers, over in een langgerekte structuur die na immunocytochemie resulteert in een 'dwarsgestreept' patroon. Tijdens het differentiatie-proces vindt er dus een (re-)organisatie van dit eiwit plaats. In gekweekte, differentiërende spiercellen blijkt het ontstaan van een dwars-gestreept titine-patroon vooraf te gaan aan de dwarsstreping van desmine, actine en myosine. Dit vormt een sterke aanwijzing voor de leidende rol van titine tijdens de sarcomeervorming. Waarschijnlijk fungeert titine als de "kapstok" waaraan de overige sarcomeercomponenten worden opgehangen.

Opmerkelijk was dat rattehartspiercellen, die volledig gedifferentieerd zijn, een soort dedifferentiatie ondergaan nadat ze in kweek zijn gebracht. De hierboven beschreven volgorde van karakteristieke fasen tijdens de organisatie van titine blijkt in deze cellen omgekeerd te zijn. De volgorde waarin de overige cytoskelet- en sarcomeer-structuren tijdens dedifferentiatie verdwijnen blijkt ook omgekeerd te zijn aan de volgorde waarin ze tijdens de differentiatie opkomen.

De methode waarbij gekweekte humane skeletspiercellen gecontroleerd differentiëren bood de mogelijkheid om het verloop van het proces van titine-aanmaak en -integratie in de sarcomeren gedetailleerd te bestuderen. Hierbij werd gebruik gemaakt van antilichamen tegen vier titine-epitopen die duidelijk gescheiden liggen op het uitgestrekte molekuul. In jonge spiercellen liggen deze titine-epitopen duidelijk van elkaar gescheiden, maar wel in elkaars omgeving. De scherp afgebakende, puntvormige fluorescentie-signalen wijzen er op dat de titine-molekulen waarschijnlijk in bundels parallel naast elkaar liggen. De localisatie van de epitooop-specifieke signalen duidt erop dat deze bundels titine-molekulen in gevouwen vorm aanwezig zijn in de cel. Tijdens elongatie en fusie van de cellen gaan deze titine-bundels een interactie aan met stress-fibers, die de titine epitopen naar hun uiteindelijke posities in de Z-lijn, de A-I overgang, of de A-band brengen. De stress-fibers dirigeren het amino-terminale deel van het molekuul naar de Z-lijn en het carboxy-terminale deel naar de M-lijn van de sarcomeer. Een model dat de rol van stress-fibers bij de ontvouwing van het grote titine-molekuul beschrijft, wordt voorgesteld in hoofdstuk 3. Tijdens het proces van titine-ontvouwing migreren andere A-band- en Z-lijn-componenten in de richting van hun specifieke posities in de sarcomeer.

De humane skeletspiercellijn lijkt een goed modelsysteem voor gedetailleerde

studies naar sarcomeervorming, omdat de intracellulaire processen die plaatsvinden gemakkelijk te bestuderen zijn en er grote overeenkomsten bestaan tussen de processen die plaatsvinden in spierweefsel en de gebeurtenissen die in deze cellijn worden waargenomen. Combinaties van monoclonale antilichamen die specifiek zijn gericht tegen titine-epitopen dicht bij de M- of de Z-lijn met antilichamen die andere M- of Z-lijn geassocieerde eiwitten herkennen, bieden de mogelijkheid om de vorming van interacties tussen van titine en andere spiereiwitten in detail te bestuderen.

### **Strukturele eiwitten als markers voor *in vivo* cardiomyogenese.**

Monoclonale antilichamen gericht tegen titine, myosine, tropomyosine en actine, tegen de intermediaire filament-eiwitten desmine, keratine en vimentine en tegen de desmosoom-geassocieerde eiwitten desmoplakine 1 en 2 werden gebruikt om sarcomeervorming tijdens de embryonale hartontwikkeling (de cardiogenese) in het konijn te bestuderen. Titine blijkt ook hier weer de eerste specifieke marker voor de (hart)spierontwikkeling te zijn. Tijdens differentiatie van myoblast naar functionele hartspiercel verandert de titine-organisatie van aggregaten, via een filamenteuze tussenfase, in bundels van parallelle, uitgestrekte titine-molekulen die een halve sarcomeer overspannen. Pas nadat deze structuur is aangelegd nemen andere eiwitten, zoals tropomyosine, desmine, myosine en actine, hun uiteindelijke positie binnen de sarcomeer in. Dit resulteert dan na immunokleuring in het bekende dwarsgestreepte patroon voor deze eiwitten. In de jonge hartspiercellen zijn keratine en vimentine aanwezig in filamenteuze vorm, met name in de vroege stadia. Deze filamenten verdwijnen fase-gewijs tijdens de cardiogenese. Vergelijking van deze resultaten bij het konijn met studies bij de muis, de kip en de rat toonde aan dat de volgorde van de expressie deze eiwitten tijdens de cardiogenese kleine verschillen kan vertonen. Ook bleek dat de mate van expressie en de organisatie van deze componenten op bepaalde tijdstippen tijdens de cardiogenese verschillend is voor de verschillende regio's van het hart (hoofdstuk 4).

De rol van bepaalde cytoskeletaire eiwitten die slechts gedurende een korte periode tijdens de ontwikkeling van het myocard tot expressie komen, werd onderzocht aan de hand van de interactie van keratine-filamenten met desmoplakine 1 & 2. Desmoplakines maken deel uit van desmosomen, structuren voor de communicatie tussen cellen, die zich op de verbindingsplaatsen tussen hartspiercellen, de "intercalaire schijven", bevinden. Tijdens de ontwikkeling van het myocard verschuiven desmoplakine-clusters, die zich in eerste instantie in het cytoplasma van de cel bevinden, naar de intercalaire schijven. De keratine-filamenten verdwijnen uit het zich ontwikkelende myocard via een tussenstadium van aggregatie. Zowel de keratine-filamenten (in de vroege stadia) als de keratine-aggregaten (in een later stadium) colocaliseren met de desmoplakine-clusters, hetgeen suggereert dat de keratine-filamenten een rol spelen bij de positionering van desmoplakines en de vorming van cel/cel-contactplaatsen



tijdens de ontwikkeling van het myocard. De reorganisatie van titine en desmine lijkt niet direkt gerelateerd aan de herrangschikking van de desmosomen.

### **Smootheline, een marker voor gladde spiercel differentiatie.**

De kennis over de differentiatieprocessen van gladde spiercellen is beperkt in vergelijking tot hetgeen bekend is omtrent dwarsgestreepte spiercellen. Dit wordt mede veroorzaakt door een gebrek aan stadiumafhankelijke marker-eiwitten. Van een niet eerder beschreven eiwit, door ons "smootheline" genoemd, werd aangetoond dat het alleen tot expressie komt in uitgedifferentieerde ("contractiele") viscerale en vasculaire gladde spiercellen. Smootheline werd niet gevonden in myofibroblasten, myoepitheliale cellen, skelet- of hartspiercellen. Dit eiwit zou een goede marker kunnen zijn bij onderzoek naar de laatste differentiatiefase in gladde spiercellen. De hoofdstukken 6 en 7 van dit proefschrift beschrijven de karakterisatie van smootheline en een serie observaties waaruit het belang van dit eiwit als marker blijkt.

Een humane cDNA bank van gladde spier werd gescreend met een monoclonaal antilichaam tegen smootheline, en het complete cDNA coderend voor dit eiwit werd geselecteerd. *In situ*-hybridisatie met dit cDNA toonde aan dat smootheline wordt gecodeerd door één enkel, zogenaamd single copy, gen op chromosoom 22. Met behulp van immunohistochemische kleuringen, Western- en Northernblotting werd aangetoond dat smootheline sterk geconserveerd is tijdens de evolutie. Uit celfractionerings-studies, waarbij gebruik gemaakt werd van colon gladde spier, is gebleken dat smootheline deel uit maakt van de cytoskeletaire fractie van dit weefsel. Confocale scanning laser microscopie suggereerde dat smootheline is georganiseerd in filamenten die niet colocaliseren met desmine-, vimentine-, of actine-filamenten. Transfectie-studies, waarbij humaan smootheline cDNA in COS7 cellen tot expressie werd gebracht, gaven een filamenteus netwerk in het cytoplasma te zien, dat werd gevormd door een eiwit met het juiste molekulgewicht. cDNA-sequentie-analyse liet zien dat smootheline niet behoort tot één van de klassen van de tot nu toe bekende structurele eiwitten. Smootheline bevat echter wel een domein van 56 aminozuren met een homologie van ongeveer 40% met een sequentie die grenst aan de actine-bindende domeinen van dystrophine,  $\beta$ -spectrine en  $\alpha$ -actinine (hoofdstuk 6). De transcriptie van smootheline werd vrijwel onmiddellijk gestopt wanneer cellen uit hun natuurlijke omgeving werden gehaald en in kweek werden gebracht, waarschijnlijk door de verandering van de omgeving van de cel en het ontbreken van omgevingsfactoren afkomstig van omliggend weefsel of uit het bloed. Het ontbreken van smootheline in gekweekte cellen geeft ook aan dat de expressie alleen voorkomt in gedifferentieerde, contractiele gladde spiercellen.

In een studie naar de aanwezigheid van smootheline in vasculaire gladde spiercellen bleek dat de expressie van het eiwit sterk gerelateerd was aan de mate van contractiliteit van het bloedvat-type waarin de gladde spiercellen aanwezig waren. Elastische arteriën (zoals de aorta) bevatten, in het algemeen, slechts een

klein aantal smootheline-positieve gladde spiercellen. Bij de bestudering van musculaire arteriën bleek dat het percentage van het aantal spiercellen dat smootheline tot expressie brengt toeneemt met de contractiele arbeid die de wand van het bloedvat moet leveren. Smootheline werd niet gevonden in capillairen, pericytische venules of de gladde spiercellen van venen. Tijdens het onderzoek naar het voorkomen van smootheline in arteriosclerotische vaatwandbeschadigingen ("aderverkalkingen") bleek dat positieve cellen meestal werden gevonden in het luminale deel van vergevorderde beschadigingen. Dit geeft aan dat volledig gedifferentieerde, van gladde spier afkomstige cellen aanwezig zijn in deze beschadigde locaties, hetgeen suggereert dat deze verkalkingen ("arteriosclerotische plaques") niet meer expanderen. Mogelijk heeft smootheline naast z'n waarde als markereiwit voor de laatste fase van differentiatie van normale gladde spiercellen dus ook waarde bij de diagnostische karakterisatie van gladde spiercellen in afwijkende, pathologische weefsels.