

Expression and organization of sarcomeric constituents during muscle cell differentiation

Citation for published version (APA):

Schaart, G. (1994). *Expression and organization of sarcomeric constituents during muscle cell differentiation*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1994

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

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

During myofibrillogenesis *in vivo* as well as *in vitro* different muscle-specific proteins are expressed at different stages of development. In the first part of this thesis (chapters 1 - 4) *in vivo* and *in vitro* myofibrillogenesis and differentiation are studied using immunofluorescence and immunoblotting assays. For *in vivo* developmental studies early postimplantation mouse embryos are used. The expression pattern of desmin and titin is studied in these mouse embryos during different stages of development (8.0 - 9.5 days of development) in the heart-anlage and the myotomes. Surprisingly, titin is found in the heart rudiment at 8.25 days (Theiler stage 12) in a punctate pattern even before desmin is expressed in the cardiomyoblasts. During further development of the heart at 8.5 days (Theiler stage 13) titin filaments are formed and at 9.0 days (Theiler stage 14) titin cross-striation is detected before desmin cross-striation can be observed. At 9.5 days (Theiler stage 14) also desmin cross-striation was seen in the heart muscle cells. One conclusion from this mouse embryo study is that titin is an earlier marker for cross-striated muscle differentiation than desmin.

To further examine the expression patterns of muscle-specific proteins, *in vitro* hamster muscle cells (BHK21/C13; chapter 2) and human skeletal muscle cells (chapter 3) are studied at several stages of differentiation. In undifferentiated BHK-21/C13 cells and human skeletal myoblasts desmin is detected in a filamentous pattern. None of the specific sarcomeric proteins such as titin, nebulin, sarcomeric myosin, or the tropomyosins can be detected in these undifferentiated cells. Both cell types are induced to differentiate by changing the culture medium from a high nutrition medium to a low nutrition medium. The BHK-21/C13 cells then differentiate from a polygonal phenotype to a more elongated form. The human skeletal muscle cells form myotubes during this *in vitro* differentiation process. Early in the differentiation process of both cell types, first the typical punctated titin expression pattern is seen before other sarcomeric proteins can be detected. Later, in elongated BHK-21/C13 cells and in matured skeletal muscle myotubes, titin is observed in a cross-striated pattern, again before other proteins assembled into a striated pattern. Confirmatory results are obtained from immunoblotting assays and by two-dimensional gel electrophoresis studies. The expression of titin during *in vitro* myofibrillogenesis confirms the results found in the *in vivo* model: titin is one of the first myofibrillar proteins expressed in differentiating muscle cells. Furthermore, the sequential stages of assembly of this protein show that titin is of great importance for arranging other sarcomeric proteins.

In chapter 4 the first characterization of cardiotin is described. The distribution pattern of cardiotin, a structural component of the myocardium, is compared to that of other sarcomeric constituents and the sarcoplasmic reticulum in several species and tissues. Cardiotin is localized between the myofibrils of the cardiomyocytes, perpendicularly to the typical cross-striations, for example observed with antibodies to titin and desmin. This localization of cardiotin suggests a possible link with the sarcoplasmic reticulum. In immunoblotting assays cardiotin is detected at a molecular weight of approximately 300 kDa and is classified as a giant muscle protein like titin and nebulin. Cardiotin seems to be expressed late in the progress of muscle cell differentiation, in fact only (several months) after birth.

In the second part of this thesis (chapters 5 - 7) the expression patterns of truncated hamster desmin and vimentin in transgenic mice are described. The functional role of desmin and vimentin intermediate filaments in the context of (muscle) tissue differentiation is examined by expression of various intermediate filament gene constructs and the disruption of endogenous desmin and vimentin networks in transgenic mice. The vimentin-desmin hybrid gene constructs pVVim2 (chapter 5) and pVDes (chapter 6) are expressed in all vimentin-containing cells of transgenic mice. This results in hybrid intermediate filament formation, but has no effect on normal

differentiation or development of the mice. The gene constructs encoding a carboxy-terminally deleted mutant desmin subunit driven by the desmin or the vimentin promoter, pDDV and pVDV respectively (chapter 7), also cause no detectable developmental, morphological, and functional abnormalities, although disruption of desmin and vimentin filaments is seen in part of the cells in the tissues. In contrast to the expression levels of constructs pVVim2 and pVDes, the pVDV construct is expressed in a small percentage of vimentin-containing cells, and surprisingly also in a small percentage of cross-striated muscle cells. The pDDV construct is only detected in a small percentage of striated muscle cells but not in smooth muscle cells. In conclusion, several truncated mutant desmin subunits cause disruption of intermediate filament networks in mesenchymal tissues, while no functional, developmental, and morphological abnormalities in the animals are detected.

SAMENVATTING

Tijdens de spierontwikkeling worden, zowel *in vivo* als *in vitro*, verschillende spier-specifieke eiwitten op verschillende momenten van dit ontwikkelingsproces aangeschakeld. In het eerste gedeelte van dit proefschrift (hoofdstukken 1 - 4) worden de spierontwikkeling en spierdifferentiatie *in vivo* en *in vitro*, beschreven aan de hand van de expressie van spierspecifieke componenten met behulp van immunofluorescentie- en immunoblottingexperimenten.

Voor de *in vivo* experimenten zijn muize-embryo's van verschillende leeftijden (8,0 - 9,5 dagen) bestudeerd. Hierbij is gekeken naar het expressiepatroon van met name desmine en titine in het zich ontwikkelende embryonale hart en in de myotomen. Het is opvallend, dat in het rudimentaire hart (dag 8,25) titine in de vorm van kleine aggregaten voorkomt, nog voordat desmine kan worden gedetecteerd. In een later stadium van de ontwikkeling van het embryonale hart (dag 8,5) vormt titine filamenten in de cardiomyocyten en op dag 9,0 wordt voor het eerst titine-dwarsstreping waargenomen. Dwarsstreping van desmine wordt voor het eerst op dag 9,5 in het embryonale muizehart gevonden. In de myotomen wordt een identieke volgorde van expressiepatronen van deze eiwitten waargenomen. Uit deze studie kan gekonkludeerd worden dat in het muize-embryo titine een vroegere marker voor dwarsgestreepte spierceldifferentiatie is dan desmine, hetgeen eerder beschreven is.

In gekweekte hamster spiercellen (BHK21/C13; hoofdstuk 2) en gekweekte humane skeletspiercellen (hoofdstuk 3) is gekeken naar het expressiepatroon van spierspecifieke eiwitten vóór, tijdens en na het induceren van differentiatie. In ongedifferentieerde BHK21/C13 cellen en humane skeletspiercellen wordt desmine waargenomen in een filamenteuze vorm. Er worden geen andere sarcomeer-specifieke eiwitten, zoals titine, nebuline, sarcomeer specifiek myosine of tropomyosines gevonden in deze cellen. Beide celtypen kunnen *in vitro* worden geïnduceerd tot differentiatie door het voedingsrijke kweekmedium waarin deze cellen normaal prolifereren te vervangen door een voedselarm medium. Na deze 'medium-switch', differentiëren de polygonale BHK21/C13 cellen tot een geëlongeerd fenotype. De humane skeletspiercellen fuseren *in vitro* tot myotubes. Tijdens de eerste fase van differentiatie vertonen beide celtypen een gepuncteerd titine patroon, dat eerder dan andere sarcomeer-specifieke eiwitten tot expressie komt. Gedurende het differentiatieproces wordt titine-dwarsstreping waargenomen nog voordat andere spierspecifieke eiwitten in een dergelijk patroon voorkomen. Deze volgorde van aanmaak van verschillende eiwitcomponenten tijdens het differentiatieproces wordt eveneens gevonden met behulp van immunoblotting- en tweedimensionale gelelektroforese technieken. Het expressiepatroon van titine tijdens de spierontwikkeling *in vitro*, is te vergelijken met de resultaten die gevonden worden in het muize-embryo model (hoofdstuk 1): titine is het eerste eiwit dat zijn plaats vindt in de zich vormende sarcomeren en het lijkt van belang te zijn voor de assemblage en rangschikking van andere sarcomeer-specifieke eiwitten, zoals actine, myosine, tropomyosine en desmine.

In hoofdstuk 4 wordt de karakterisatie van cardiotine beschreven, een nieuwe structurele eiwitcomponent in het myocard. De cardiotine-distributie in het hart wordt vergeleken met die van andere dwarsgestreepte spierspecifieke eiwitten en met de structuur van het sarcoplasmatisch reticulum, in zowel verschillende weefsels als in verschillende species. Cardiotine is gelokaliseerd tussen de myofibrillen van de cardiomyocyt, loodrecht op de zo karakteristieke dwarsstreping die wordt gezien met antisera gericht tegen bijvoorbeeld titine of desmine. De lokalisatie van cardiotine wijst op een mogelijk verband met het sarcoplasmatisch reticulum. Cardiotine heeft op een SDS-polyacrylamide gel een molekulgewicht van ongeveer 300 kDa en wordt, evenals titine en nebuline, beschouwd als één van de zeer grote structurele spiereiwitten. Cardiotine komt laat tot expressie, namelijk pas (enkele maanden) na de geboorte.

In het tweede gedeelte van dit proefschrift (hoofdstukken 5-7), wordt het expressie-

patroon van gemuteerd desmine en vimentine in transgene muizen beschreven. Door verschillende gemuteerde desmine-vimentine hybriden transgeen in muizen tot expressie te laten komen vindt een verstoring van endogene desmine en vimentine filamenten plaats. Hierdoor kan de functie van deze filamenten tijdens de ontwikkeling en differentiatie van (spier-)weefsel worden bestudeerd.

Desmine-vimentine konstrukten geplaatst onder controle van de vimentine promotor, komen tot expressie in alle vimentine bevattende cellen. Dergelijke mutante hybriden onder controle van de desmine promotor worden uitsluitend waargenomen in een klein percentage dwarsgestreepte spiercellen en niet in gladde spiercellen. Deze konstrukten, zowel onder controle van de vimentine promotor als de desmine promotor, hadden echter geen waarneembaar (negatief) effect op het ontwikkelings- en differentiatieproces van de muizen. Konkluderend kan gezegd worden, dat door het tot expressie brengen van verscheidene gemuteerde desmine-vimentine hybriden, verstoring van intermediaire filament-netwerken in cellen van mesenchymale origine veroorzaakt kan worden zonder dat in deze cellen of weefsels funktionele of morfologische afwijkingen kunnen worden waargenomen.