ITEA (2000), Vol. 96A N.° 3, 191-198

LA HIPERTROFIA MUSCULAR HEREDITARIA: GÉNESIS DE ALELOS DOMINANTES NEGATIVOS DE LA MIOSTATINA (GDF-8) MURINA

A. Barroso, L.J. Royo, J. Cañón, S. Dunner

Laboratorio de Genética, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, España

RESUMEN

La miostatina es un inhibidor extracelular del desarrollo muscular. Pertenece a la familia de factores de crecimiento TGF-β, y con ellos comparte una serie de características estructurales y funcionales. Basándonos en estas características diseñamos unas construcciones génicas con la intención de crear una serie de alelos dominantes negativos de la miostatina murina, como modelo para la obtención, en un futuro, de terneros que manifiesten la hipertrofia muscular en primera generación por cruzamiento de cualquier hembra con un macho modificado portador del alelo dominante negativo.

Palabras clave: TGF-β, Miostatina, Hipertrofia muscular, Gen dominante negativo.

SUMMARY

Myostatin is an extracellular negative regulator of muscle growth. It is a member of the growth factor family TGF-β, having similar structural and functional characteristics. Based on these structural and functional characteristics we have designed several gene constructions in order to create a series of dominant negative alleles of murine myostatin. Our aim is to obtain double-muscled calves in the first generation by mating a modified sire carrying a dominant negative allele with non-modified cows.

Key words: TGF-β, Myostatin, Muscular hypertrophy, Dominant negative gene.

Introducción

Bases moleculares de la Hipertrofia Muscular Hereditaria

La Hipertrofia Muscular (HM) Hereditaria es un síndrome descrito en las especies murina y bovina (donde también es conocido como "doble grupa" o "cularidad") que provoca, como característica más sobresaliente, un incremento generalizado de la masa muscular del animal (figura 1). A nivel macroscópico, se advierte además una reducción muy marcada del tamaño de los órganos, así como un descenso moderado en el índice de transformación.

A nivel microscópico o histológico, el tejido muscular de estos animales se caracteriza



(a) (b)

Figura 1. (a) Toro culón de la raza Asturiana de los Valles. (b) Ratón hipertrófico –a la derecha–
Figure 1. (a) A fullblood Asturiana de los Valles double-muscled bull. (b) Hypertrophic mouse –rigth–

por un incremento en el número, que no en el tamaño, de las fibras musculares, fenómeno conocido como *hiperplasia muscular* (hipertrofia, por tanto, es inexacto). Esta mayor densidad de músculo se compensa con descensos concomitantes en los tejidos conjuntivo y, sobre todo, graso.

En el ganado bovino, este fenómeno ha sido descrito en diversas razas europeas, tanto belgas (Blanco Azul) como italianas (Piamontesa, Marchigiana), francesas (Charolés, Limousine) o españolas (Asturiana de los Valles, Pirenaica).

El esfuerzo investigador de los últimos cuatro años ha permitido descubrir el gen responsable de la HM, el gen de la miostatina (MSTN) o GDF-8 (*Growth and Differentiation Factor* - 8) (McPherron *et al.*, 1997), que está constituido por tres exones y dos intrones (figura 2). La proteína que codifica, encuadrada en la superfamilia de los TGFβs (*Transforming Growth Factors*), actúa como regulador extracelular negativo del crecimiento muscular (Lee & McPherron, 1999). Está demostrado que las mutaciones que dan lugar a una MSTN inactiva –como la *deleción11* bovina (mutación n.º 5 de la figura 2) (Grobet *et al.*, 1997) o la *Cmpt* murina (Szabó *et al.*, 1998)– son responsables del crecimiento muscular exagerado que caracteriza este síndrome.

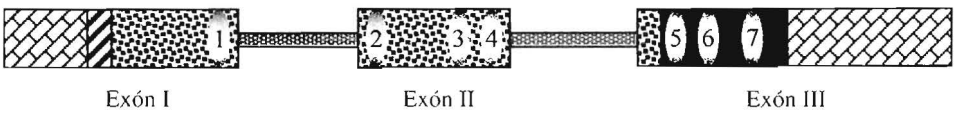


Figura 2. Estructura del gen de la MSTN murino y bovino. Se numeran las mutaciones bovinas naturales (1: F94L; 2: nt419 (del7-ins10); 3: Q204X; 4: E226X; 5: nt821(del11); 6: E291X; 7: C313Y). 5' y 3'-UTRs (UnTranslated Regions) Péptido señal Prodominio Intrones I y II Péptido bioactivo
Figure 2. Structure of murine and bovine MSTN gene. Naturally occurring mutations in bovine are numbered

En la raza bovina Asturiana de los Valles, las canales culonas, con una mayor proporción de carne de primera, alcanzan un precio de mercado muy superior al de las normales. Por ello, es muy interesante intentar conseguir culones en primera generación como resultado del cruce entre un animal culón y uno normal. O, lo que es lo mismo, culones heterocigotos, útiles tanto en el caso de cruzamientos intrarraciales, en razas de carne (como la Asturiana de los Valles); como en el caso de cruzamientos industriales, destinados a aumentar el valor residual de los terneros de razas lecheras (como la Frisona) que no vayan a reposición.

Sin embargo, todas las mutaciones descritas hasta el momento en la MSTN bovina (2-7 en la figura 2) son recesivas, por lo que sólo los homocigotos mutantes manifiestan hipertrofia muscular. Por consiguiente, la consecución de un animal culón en heterocigosis implica la génesis de un alelo dominante negativo, de tal forma que los heterodímeros MSTN normal-MSTN mutante puedan expresarse en el fenotipo. El hecho de que existan un buen número de ejemplos de alelos dominantes negativos naturales en la ruta metabólica del TGFβ1 (WIESER *et al.*, 1993, 1995), así como la dominancia parcial en machos que exhibe la mutación *Cmpt* de la MSTN murina (SZABÓ *et al.*, 1998), refuerzan la hipótesis sobre la viabilidad de alelos dominantes negativos de la miostatina murina y bovina.

Metodología

Estrategias de modificación génica

La génesis de alelos dominantes negativos "artificiales" de la MSTN conlleva definir las mutaciones a producir en la proteína y poner en marcha una estrategia de modificación génica. Esta, a su vez, presupone conocer la estructura del gen, disponer de unos modelos celular y animal asequibles y, finalmente, desentrañar el mecanismo de acción de la proteína a alterar.

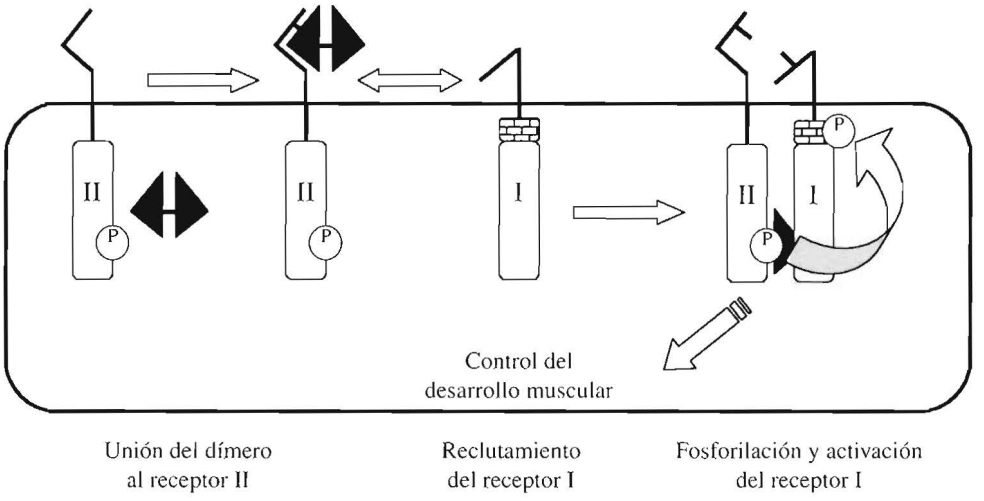


Figura 3. Mecanismo de acción del dímero de miostatina
Figure 3. Initiation of signalling by the myostatin dimer

La estructura del gen está enteramente resuelta desde el clonado y secuenciación del de las especies bovina y murina, fruto de una colaboración con el grupo del Dr. Georges de la Universidad de Lieja (ROYO *et al.*, manuscrito en preparación). Existen asimismo líneas comerciales de ratones y de mioblastos murinos para llevar a cabo los pertinentes análisis funcionales de los dominantes negativos (pues la elevada prolificidad, el reducido intervalo entre partos y su bajo coste hacen del ratón el modelo animal idóneo para este tipo de experimentos). Finalmente, por analogía con TGFβ1, se tiene una visión global bastante certera sobre el modo de acción de la miostatina sobre el tejido muscular (figura 3).

Las diferentes estrategias de modificación génica se pueden dividir con arreglo a tres grandes criterios que se complementan mutuamente (cuadro 1).

Independientemente del tipo de estrategia adoptado, que se detallará más adelante, es necesario aislar o sintetizar in vitro entre 5.000 y 10.000 pares de bases (pb) del gen, dentro de las cuales van incluidas las mutaciones que nos interesa provocar, y clonarlas en un plásmido: el conjunto se conoce como construcción génica. El objetivo final es sustituir la copia normal del gen de la MSTN del genoma de las células por la modificada, fenómeno conocido como Recombinación Homóloga (RH).

Construcciones dominantes negativas de la miostatina murina

En este trabajo, se han diseñado cuatro construcciones dominantes negativas de la miostatina murina, combinando las estrategias de los apartados A.2, B.1 y C.1 de la cla-

Cuadro 1

A. Funcionalidad del gen
A.1. Estrategias *Knock-**Out***: se inactiva completamente el gen bajo estudio eliminando físicamente una parte fundamental del mismo. Esta estrategia no permite obtener dominantes negativos de miostatina, pues queremos que el gen modificado produzca una proteína completa, si bien afuncional, que secuestre la proteína normal y ejerza de esa manera la dominancia negativa. A.2. Estrategias *Knock-**In***: se introducen pequeños cambios en el gen, que nos permiten modular su expresión y/o el mecanismo de acción de la proteína que codifica. Este abordaje sí nos permite obtener proteínas dominantes negativas.
B. Control de la expresión génica
B.1. *Constitutiva:* no se modifica el control endógeno de la expresión del gen. B.2. *Condicional:* se añaden elementos exógenos al gen, que nos permiten controlar a voluntad su expresión de una forma cuantitativa, temporal o espacial.
C. Fase de síntesis
C.1. Técnicas de *Gene Targeting*: se actúa directamente sobre el ADN genómico. C.2. Técnicas *Antisense*: inciden sobre el ARN mensajero. C.3. Mutaciones dominantes negativas: actúan sobre la proteína.

sificación general antes mencionada. Cada una de ellas ha sido sintetizada de dos formas: como *Knock-In* (para ser integrada de forma estable por RH) y como construcción de interacción (para ser expresada en un sistema eucariota de transcripción-traducción).

Resultados y discusión

Mutagénesis dirigida por PCR

Los *Knock-In* se han sintetizado simultaneando técnicas de *Long*-PCR (BARNES, 1994; CHENG *et al.*, 1994) con técnicas de mutagénesis dirigida por *overlap*-PCR (Ho *et al.*, 1989) (figura 4). De esta manera, se han amplificado unos 8.000 pb del gen de la MSTN con una serie de mutaciones (cuadro 1) que inciden, respectivamente, en:

- Las cisteínas (C^1 y C^2) de interacción con los receptores de membrana: construcción de las Cisteínas.
- La diana de proteolisis o *Proteolytic Site* que separa el prodominio del péptido bioactivo: construcción del *Proteolytic Site*.
- El codón STOP de la proteína: construcción de los STOPs.
- La cisteína que forma el puente intercatenario entre dos monómeros de MSTN: construcción de la Cisteína Intercatenaria.

Las construcciones de interacción se han sintetizado siguiendo un procedimiento de overlap-PCR análogo al de los Knock-In (PCR 2-PCR 3 de la figura 4). En estos casos, sin embargo, sólo es necesario generar la secuencia codificante del gen, de pequeño tamaño (cuadro 3), por lo que se han llevado a cabo por PCR clásica.

Knock-In constitutivos

El objetivo final de las construcciones diseñadas es modular la función, que no la expresión, de la MSTN endógena alterando

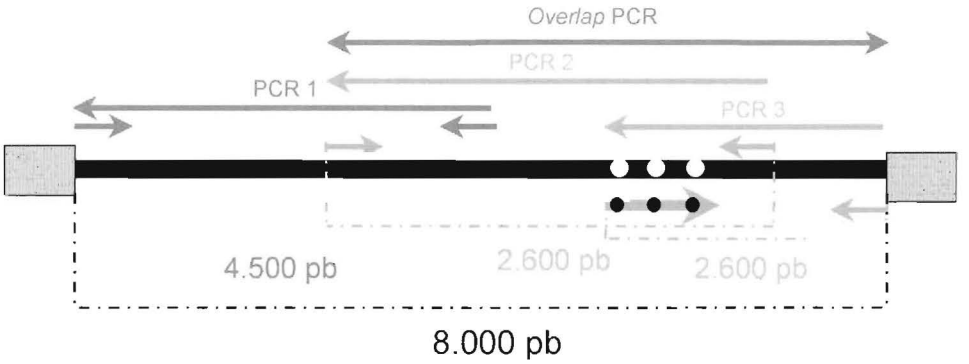


Figura 4. Estrategia molecular común de los cuatro *Knock-In* de la MSTN murina. PCR 3 es específica de cada construcción. Las regiones solapantes entre PCR 1-PCR2 y PCR 2-PCR 3 permiten empalmar unas con otras. ⊟ Extremos del plásmido ■ Secuencia clonada del gen de la MSTN ● Mutaciones introducidas con el *primer forward* de cada PCR 3

Figure 4. Common molecular strategy to generate the murine MSTN Knock-Ins. PCR 3 is specific for each construction (see table 1). Overlappping regions among PCR 1-PCR 2 and PCR 2-PCR 3 make ligation possible

la interacción de la proteína con el receptor de membrana con unas pocas mutaciones en sitios muy precisos (cuadro 2), que no alteran la estructura terciaria de los monómeros mutantes. No se elimina, pues, parte del gen, por lo que hablamos de *Knock-In*, ni se introducen promotores exógenos para el control de la expresión, por lo que se trata de estrategias constitutivas; se incide, finalmente, directamente sobre el ADN genómico, por lo que se ubican dentro de las técnicas de *Gene Targeting*.

Todas las construcciones se han clonado en *pBluescript* [Stratagene] y crecido en bacterias *AG1* [Stratagene] en dos partes: la región común (PCR 1) y las regiones overlap (PCR 2 + PCR 3) específicas de cada construcción, ambas de unos 4.500 pb (cuadro 2). Combinando la primera con cada una de las otras, se han generado los *Knock-In* completos. Resta tan sólo subclonar la construcción completa en un plásmido de Gene *Targeting* para completar la génesis de los *Knock-In* dominantes negativos.

Construcciones de interacción

El objetivo de esta serie de construcciones es proporcionar una idea del grado de afinidad de cada una de las miostatinas mutantes por la molécula normal, como paso previo a los arduos experimentos de *Gene Targeting*. Para ello, se ha clonado la región codificante de cada uno de los *Knock-In* anteriores (cuadro 3) en un plásmido de expresión eucariota, que nos permitirá sintetizar *in vitro* las miostatinas normal y mutante en un lisado de células de mamífero.

En concreto, la región codificante de la miostatina normal ha sido generada por PCR convencional y clonada en *pET-15b* [Novagen]. Este plásmido de expresión permite sintetizar una MSTN con una pequeña "etiqueta" (*tag*) de histidinas, para la que existen anticuerpos comerciales específicos [Pharmacia] que hacen posible su detección inmunológica.

Cuadro 2
Tamaños de los productos de *Long*-PCR de los *Knock-In* murinos
Table 2
Sizes of the murine Knock-In Long-PCR-Amplified products

Construcción	Aminoácidos mutados	Enzima[1]	PCR 1	PCR 2	PCR 3	Total
Cisteínas	C → V; C → Y	*Aat*II			2663 pb	
Proteolytic Site	S → A; R → P; R → I	*Apa*I	4566 pb[2]	2685 pb[3]	2691 pb	7978
STOPs	STOP → W	*Hind*III			2364 pb	
C^{340}	Inserción de 22 aminoácidos	*Apa*I		2057 pb	2434 pb	8033[4]

(1) Estas enzimas sirven para diagnosticar de una forma sencilla si las mutaciones han sido o no incorporadas.
(2) La PCR 1 y la PCR 2 solapan en 1068 pb.
(3) La PCR 2 y la PCR 3 solapan, respectivamente, en 868, 896 y 569 pb en las tres primeras construcciones.
(4) El tamaño final es ligeramente superior por la inserción de 66 pb (22 aminoácidos).

Cuadro 3
Tamaños de los productos de *Overlap*-PCR de las construcciones de interacción de murinas
Table 3
Overlap-PCR sizes of the murine interaction constructs

Construcción	PCR 1[5]	PCR 2	Total
Cisteínas	395 pb	492 pb	527 pb
Proteolytic Site	1115 pb[6]	523 pb	1247 pb
STOPs	395 pb	196 pb	527 pb
Cisteína Intercatenaria	272 pb	266 pb	593 pb

(5) La PCR 1 y la PCR 2 solapan, respectivamente, en 360, 391 y 64 pb en las tres primeras construcciones.
(6) Producto generado por RT-PCR para abarcar la secuencia completa del prodominio (ver figura 2).

Cada una de las regiones codificantes de las miostatinas se han generado por *overlap*-PCR (fusión de las PCR 1 y 2 del cuadro 3), introduciendo las mismas mutaciones de los *Knock-In* (cuadro 2), y se han clonado en el plásmido de expresión *pSG5* [Stratagene]. Los análisis de interacción se harán combinando dos a dos cada una de las construcciones mutantes con la MSTN normal en un sistema TNT de transcripción-traducción [Promega].

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por ASTURGEN S.L.

Bibliografía

BARNES W.M., 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from l bacteriophage templates. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91, 2216-2220.

CAPPUCCIO I., MARCHITELLI C., SERRACCHIOLI A., NARDONE A., FILIPPINI F., AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A., 1998. A G-T transversion introduces a STOP codon at the mh locus in hypertrophic Marchigiana beef subjects. Animal Genetics, 29 (Suppl. 1), 51.

CHENG S., FOCKLER C., BARNES W.M., HIGUCHI R., 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91, 5695-5699.

GROBET L., PONCELET D, ROYO L.J., BROUWERS B., PIROTIIN D., MICHAUX C., MÉNISSIER F., ZANOTTI M., DUNNER S., GEORGES M., 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. Mammalian Genome, 9, 210-213.

GROBET L., ROYO L.J., PONCELET D., PIROTIIN D., BROUWERS B., RIQUET J., SCHOEBERLEIN A., DUNNER S., MÉNISSIER F., MASSABANDA J., FRIES R., GEORGES M., 1997. A deletion in the myostatin gene causes double-muscling in cattle. Nature Genetics, 17, 71-74.

HO S.N., HUNT H.D., HORTON R.M., PULLEN J.K., PEASE L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene, 77, 51-59.

LEE S.J., MCPHERRRON A.C., 1999. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. Current Opinion in Genetics and Development, 9, 604-607.

McPherrron A.C., Lawler A.M., Lee S.J., 1997. Regulation of the skeletal muscle mass in mice by a new TGFb superfamily member. Nature, 387, 83-90.

Szabó G., Dallmann G., Müller G., Patthy L., Soller M., Varga L., 1998. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. Mammalian Genome, 9, 671-672.

Wieser R., Attisano L., Wrana J.L., Massagué J., 1993. Signaling activity of transforming growth factor b type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic regions. Molecular and Cellular Biology, 13, 7239-7247.

Wieser R., Wrana J.L., Massagué J., 1995. GS domain mutations that constituvely activate TbR-I, the downstream signaling component in the TGFb receptor complex. EMBO Journal, 14, 2199-2108.

Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F., Massagué J., 1994. Mechanism of activation of the TGF-b receptor. Nature, 370, 341-347.