LA MIOSTATINA COMO PROTEÍNA DOMINANTE NEGATIVA: SU INTERACCIÓN *IN VITRO* MEDIANTE LA ESTRATEGIA DE *PULLDOWN*.

Fernández, C., Delgui, L., Cañón, J., Dunner, S.
Laboratorio de Genética Molecular, Dpto. Producción animal, Facultad de Veterinaria, UCM, 28040 Madrid, España

INTRODUCCIÓN

La hipertrofia muscular (HM) es un carácter descrito en las especies murina y bovina (donde también es conocido como *cularidad*) que provoca, como característica más sobresaliente, un incremento generalizado de la masa muscular del animal. El origen de la hipertrofia muscular se encuentra en la miostatina, proteína perteneciente a la familia de los TGFβs (McPherron *et al.*, 1997) que actúa como regulador negativo del crecimiento muscular (Thomas *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001), siendo algunas mutaciones en el gen (como la deleción 11 bovina –Grobet *et al.*, 1997) responsables del crecimiento característico de la hipertrofia muscular. De forma análoga a otros TGFβs, la miostatina actúa en forma de dímeros unidos entre sí por un puente disulfuro intercatenario. La unión del dímero a su receptor específico de membrana desencadena la cascada de reacciones intra-celulares por medio de las cuales se controla el desarrollo del tejido muscular. Cuando esa interacción no se produce, el crecimiento muscular se descompensa y aparece el fenotipo hipertrófico.
En la especie bovina, todas las mutaciones de la miostatina descritas hasta el momento (Cappuccio *et al.*, 1998; Grobet *et al.*, 1998) son recesivas (lo que quiere decir que sólo los animales homocigotos mutantes muestran el carácter) de tal forma que la obtención de un 100% de descendencia hipertrófica sólo se puede conseguir cruzando dos animales con hipertrofia muscular entre sí. Dada la importancia económica de estos animales, con una proporción superior de carne de primera, merced a un despiece carnicero especial y al elevado precio de cotización que alcanzan en el mercado, resulta muy interesante intentar conseguir 'heterocigotos culones" en primera generación como resultado del cruce entre un animal hipertrófico y uno normal. Esto tiene un indudable interés en el caso de cruzamientos industriales tanto de razas de aptitud carnicera, como de razas lecheras.
Aprovechando la propiedad de los TGFβs, que actúan como dímeros, se ha desarrollado una estrategia dirigida a generar moléculas de miostatina dominante negativa (permitiendo la producción de heterocigotos "culones"). Se han propuesto tres mutaciones capaces de generar moléculas de miostatina potencialmente dominantes negativas (Barroso *et al.*, 2000):
1) Diana de proteolisis (PS): se mutagenizan tres de los cuatro aminoácidos que conforman la diana de proteolisis, cuya rotura daría lugar a la liberación del péptido bioactivo. Esto evita la unión de los heterodímeros al receptor de membrana por simple impedimento estérico, al seguir unidos el péptido bioactivo y el péptido latente.
2) Codon Stop (STOP): la sustitución de los dos primeros codones Stop por un triptófano y una lisina alarga la proteína en un 27%. De esta manera se pretende evitar la unión de los heterodímeros al receptor, por impedimento estérico.
3) C340: la introducción de un fragmento de 22 aminoácidos que contiene en su interior una segunda cisteína de interacción intercatenaria (C^{340}) incrementa tanto la longitud del monómero como la probabilidad de formación de trímeros, y por lo tanto,

la probabilidad de un impedimento estérico de unión al receptor de membrana aumenta.
Como paso previo a la experimentación en células madre embrionarias se ha llevado a cabo la realización de un ensayo *in vitro* (*pull-down*) que proporciona una idea del grado de interacción de cada una de las moléculas mutantes con la molécula normal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se generaron tres construcciones diferentes para cada una de las mutaciones propuestas, en las que la mutagénesis de la zona de interés se realizó mediante la técnica de *overlapping* (Ho *et al.*, 1989) basada en la PCR, excepto en el caso de la construcción C340, donde la inserción del fragmento adicional se llevó a cabo mediante técnicas de restricción y ligado convencionales.
Los fragmentos, precedidos por un codon de inicio ATG y una secuencia Kozak, se insertaron en un plásmido de expresión bajo la acción del promotor T7 (pSG5, Stratagene). Por otro lado, una copia de la región bioactiva de la miostatina salvaje se introdujo en un vector de expresión procariota, controlado por el promotor T7 y que incorpora en 5' un ATG, una secuencia Kozak y un *tag* de 6 histidinas (pRSET, Invitrogen). La producción de moléculas de miostatina salvaje unidas al *tag* de histidinas, se llevó a cabo transformando una cepa de *E. coli*, inducible bajo IPTG (BL21(DE3)pLysS, Novagen), y la miostatina de fusión presente en el lisado de este cultivo se inmovilizó, mediante las histidinas adyacentes, a una resina de Ni^{2+} (Agarosa-NiNTA, Quiagen) siguiendo los protocolos descritos por el fabricante.
La traducción de las tres construcciones de las moléculas dominantes se llevó a cabo en el sistema de reticulocitos de conejo "TNT Coupled Reticulocyte Lysate System" (Promega), que proporciona un ambiente celular eucariota adecuado; las proteínas producidas se marcaron con ^{35}S-Met (Pharmacia). El proceso de interacción entre la miostatina salvaje de fusión y cada una de las proteínas mutantes se realizó a 4°C durante dos horas en continua rotación, seguido de dos lavados en PBS para eliminar toda proteína que no hubiera interaccionado con el complejo miostatina salvaje-resina. Tras la recuperación de la resina por centrifugación, se sometió cada una de las tres interacciones a una electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Los geles se expusieron a placas de autorradiografía y finalmente se revelaron.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la expresión de las distintas construcciones mutantes en el sistema de reticulocitos, y su interacción con la miostatina salvaje de fusión, se muestran en la figura 1.
Como se puede observar, el lisado de reticulocitos muestra una banda cercana a 15 KDa para las construcciones STOP y C340, a la altura esperada para proteínas de 138 y 131 aminoácidos respectivamente y para la construcción PS aparece una banda de alrededor de 45 KDa, como corresponde a una proteína de 375 aminoácidos.
En cuanto a los resultados de interacción, en las tres construcciones aparecen las mismas bandas después de la interacción con la resina y posteriores lavados, lo que demuestra la capacidad de las tres proteínas mutantes de interaccionar con la miostatina salvaje.

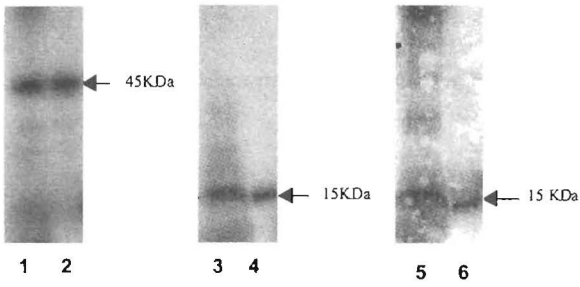


Fig 1.: **1.** PS (reticulocitos); **2.** PS (resultado de la interacción); **3.** STOP (reticulocitos); **4.** STOP (interacción); **5.** C340 (reticulocitos); **6.** C340 (interacción).

Este resultado aporta una primera evidencia de la capacidad de las tres proteínas mutantes descritas de formar heterodímeros con la miostatina salvaje, requerimiento imprescindible en una estrategia de dominancia negativa, y permite iniciar el siguiente paso consistente en un ensayo del comportamiento de moléculas mutantes de miostatina en cultivos de mioblastos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PROFIT nº FIT-010000-2001-29.

BIBLIOGRAFÍA

Barroso, A., Royo, L., Cañon, J., Dunner, S., 2000. "La hipertrofia muscular hereditaria: génesis de alelos dominantes negativos de la miostatina (GDF-8) murina". *ITEA*, 96: 191-198.

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 hypertrophyc Marchigiana beef subjects". *Animal Genetics* **29** (Suppl. 1): 51.

Grobet, L., Royo, L., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riqquet, J., Schoeberlain, A., Dunner, S., Ménissier, F., Masabanda, J., Fries, R., Hanset, R. & Georges, M. 1997. "A deletion in the bovine myostatine gene causes the double-muscled phenotype in cattle". *Nat. Genetics* **17**: 71-74.

Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L., Brouwers, B., Pirottin, 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". *Mamm. Genome* **9**: 210-213.

Ho, S., Hunt, H., Horton, R., Pullen, J. & Pease, L 1989. "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction". *Gene* **77**: 51-59.

McPherron, A.C., Lawler, A.M. & Lee, S.-J. 1997. "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGFβ superfamily member". Nature **387**: 83-90.

Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Kull, F.C. & Gonzalez-Cadavid, N. 2001. "Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**: E221- E228.

Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J. & Kambadur, R. 2000. "Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation". *J. Biol. Chem.* **275**: 40235-40243.