



UPPSALA  
UNIVERSITET

# Myostatin: en modulator av skelettmuskelsyntes

Ken Andersson

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2009  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

## Sammandrag

Muskelminskning och svaghet är en vanligt nedärvd och förvärvad sjukdom som är relaterad till muskeldystrofi, cachexia och åldersbunden muskelminskning. Eftersom det inte finns någon erkänd generell behandling för att öka muskelvolym eller styrka är forskning inom ämnet väldigt populärt och önskvärt. Myostatin (*mstn*), tidigare känt som *GDF-8* är ett utsöndrande protein, som tillhör superfamiljen Transforming Growth Factor – beta (TGF- $\beta$ ) vars jobb är att inhibera muskel differentiering och tillväxt. *Mstn* syntetiseras i muskelvävnad där koncentrationen av Myostatin i skelettmuskler medför lägre syntesfrekvens, vilket inhiberar muskelfibernas tillväxt (hypertrofi) och celledning (hyperplasi). Inhiberingen sker då Myostatin binder till typ en II receptor, som har sin ligandidentifierande del extracellulärt medan den fosforylerande delen ligger intracellulärt bundet via en polypeptidkedja. Vid aktivering av den fosforylerande delen av receptorn sker en rad transfosforyleringseffeker till olika Smad proteiner i cytoplasman, som slutligen träder in i kärnan där komplexet aktiverar/inhiberar transkriptionen. Genen, som kodar för Myostatin har funnits till en hög grad konserverad i de flesta vertebrater som hittills har undersökts. Kliniska prövningar har visat att en *mstn* noll-mus (*mstn*<sup>-/-</sup>) får 76 % fler muskelfibrer, där varje enskilt fiber är 177 % större. Detta gör att noll-musen har nästan dubbelt så mycket muskelmassa jämfört med sin motsvarande vildtyp (*mstn*<sup>+/+</sup>). Det är även bevisat att koncentrationen av Myostatin har stor betydelse för muskelsyntes då en (*mstn*<sup>+/-</sup>) mus har en motsvarande muskelmassa på 150 % av en vildtyp. Muskelsyntes är ett väldigt komplext system, som vi fortfarande har väldigt lite kunskap om efter mer än 100 år av forskning. Dess signaleringssystem, som inkluderar Myostatin vet man ännu mindre om, vilket medför att forskning kan vara svår genomförd men kunskapen man erhåller är väldigt belönande.

## Introduktion

Pågående studier på muskelsyntes i vertebrater har bidragit till upptäckten av *myostatin* (*mstn*), en negativ regulator av skelettmuskelmassa. Genom degenerativ PCR (Telenius *et al.* 1992; Rudnicki *et al.* 1993) från korresponderande regioner i andra liknande familjer lyckades McPherron och medarbetare att kлона fram sekvensen för *GDF-8* (Rudnicki *et al.* 1993; McPherron *et al.* 1997), som senare kom att officiellt kallas för *myostatin*. För att bestämma den biologiska funktionen av Myostatin skapade McPherron en *myostatin* noll-mus (*mstn*<sup>-/-</sup>) via knockout experiment. *Myostatin* noll-möss var betydligt större än vildtypen och uppvisade en stor och omfattande ökning av skelettmuskelmassa. Individuella muskler i en noll-mus kan bli upp till 2-3 gånger så stora, som motsvarande vildtyp, både hyperplastisk och hypertrofiskt. Noll-musen kom senare att benämnas till mighty mouse i referens till den tecknade serien med samma namn.

Proteinet Myostatin är en medlem i superfamiljen TGF- $\beta$  då dess sekvens och signalsystemspåverkan liknar dem hos resterande familjemedlemmar. Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) är en stor superfamilj, som delar en förvånansvärt konserverad aminosyresekvens hos alla hittills undersökta vertebrater (Cate *et al.* 1986). Familjenamnet kommer från dess första medlem TGF- $\beta$ 1, som först beskrevs av Assoian (1983). TGF- $\beta$  superfamiljen inkluderar TGF- $\beta$  familjen, Aktivin familjen, Inhibin familjen, ben morfogenes proteiner (BMPs) och en rad andra familjer, som är betydelsefulla reglerare i vertebrater. Först 1987 klargjordes konceptet att TGF var en prototypisk superfamilj för en rad olika viktiga cellbiologiska funktioner som cell differentiering och tillväxt samt profilering (både negativt och positivt) (Sporn *et al.* 1987). Utöver dessa specialiserade funktioner står familjen även för mer allmänna funktioner så som morfogenes, embryogenes samt kontrollering av endokrina funktioner. Då TGF- $\beta$  superfamiljen är så pass stor och kontrollerar en sådan mängd olika funktioner är regleringen också väldigt sammanhangsbunden och miljömässigt beroende. Koncentrationsfaktorn har väldigt stor betydelse, lik som hur growth factor signaleringen sker i cellen, parakrint eller autokrint (Ruscetti *et al.* 2005). Detta har medfört att studier som har utförts *in vitro* inte alltid haft motsvarande resultat *in vivo*.

Familjens strukturella prototyp protein TGF- $\beta$ 1 (Cheifetz *et al.* 1987) är tvådelat och består dels av en aktiv yta med 112 aminosyror. Den aktiva ytan är syntetiserad med en prekursor (pro-region) C-terminal på 361 aminosyror (Dubois *et al.* 1995). Pro-regionen kodar för en hydrofobisk signalsekvens som translokerar polypeptiden genom det endoplasmatiska nätverket (Derynck *et al.* 1985). Den utsöndrade aminosyrekedjan binder sedan till en identisk analog via disulfidbryggor och därefter spjälkas den 390 aminosyror långa prekursor regionen från den aktiva regionen. Den spjälkade pro-regionen binder runt om den nybildade homo/hetero-dimeren och bidrar till att molekylerna är latent. För att aktivera molekylerna krävs att det bildade komplexet demonteras och endast de aktiva homo/hetero-dimererna finns fritt utanför cellen. Den utsöndrande prekursor-strukturen delas av alla polypeptider i superfamiljen TGF- $\beta$  förutom TGF- $\beta$ 4, som saknar en urskiljbar hydrofobisk signalsekvens. Den slutliga komplexbildande fasen, trots att den är väldigt konserverad mellan familjer, skiljer sig då man tror att pro-regionen i vissa fall bidrar till veckning av den aktiva regionen under syntesfasen (Dubois *et al.* 1995; Card *et al.* 2005).

Growth differentiation factor är en subfamilj av proteiner som tillhör TGF- $\beta$  superfamiljen. Flertalet av dessa medlemmar har blivit identifierade och betecknade som *GDF1 – GDF 15*, alla förutom *GDF8*, som numera officiellt heter *myostatin*. Alla proteiner i denna underfamilj har en avgörande roll under utvecklingen och organbildningen där de ger positionsinformation för cellinjer hos både vertebrater och evertebrater (Lawrence 1985).

En skelettmuskels (Strimmig muskulatur) funktion är mycket enkel, den måste kontrahera. Detta sker genom att myosinhuvudet från myosinfilamenten i en sarkomer drar sig närmare det schavottliknande aktinet, vilket medför att sarkomeren kontraherar. En muskelfiber består av ett flertal sarkomerer. Muskelfibern bildas när myoblastceller, från embryoutvecklingsfasen, fuserar med varandra och skapar en avlång cylindrisk cell med många kärnor, som sträcker sig från 2-150mm. Muskelfibrerna är sammanbundna av bindväven perimysium, som bildar knippen kallat muskelfascior. Dessa knippen är omgivna av bindvävshinna epimysium bildar tillsammans en skelettmuskel (Cooper *et al.* 2007).

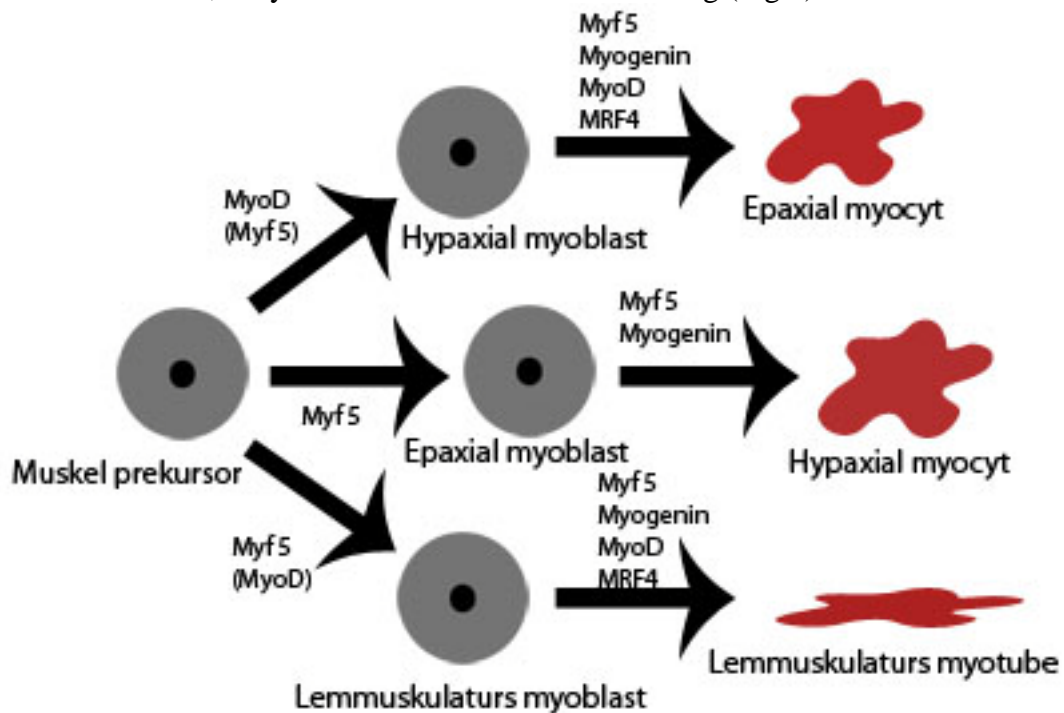
### **Embryonell skelettmuskelsyntes**

För att kunna syntetisera en skelettmuskel krävs en mängd olika proteiner och eftersom själva syntesen mestadels sker på embryonell nivå har forskare haft stora problem med att undersöka dess signalering och regulatoriska bana. Vertebrat skelettmuskler är ursprungligen från en multi-funktionell mesodermal cell, som ligger dorsalt, i närheten av där ryggraden kommer att skapas i embryot (Langman *et al.* 1968). Dessa celler kallas somitceller och uppkommer under segmentering, som en sfärisk kondensering av mesodermet på båda sidorna av de dorsala nervtuberna. Under utvecklingen av embryot uppdelas somiten i 2 olika delar, dermamyotom och skleretom. Dermamyotom utvecklas från den dorsal-laterala delen av somiten, dessa delar upp sig senare under tillväxten till dermatom och myotom. Myotomcellerna är källan för all tillverkning av muskler då de agerar som prekursorceller till myocyten, en muskelcell. En segmenterande somit i ett utvecklande embryo kan ge upphov till mellan 30 och 100 migratoriska perkursorceller. Beroende på var myotomet migrerar ger det upphov till olika anatomiska distinkta regioner av skelettmuskulatur (Langman *et al.* 1968). Pararyggradsmuskulatur (epaxial) härstammar från den dorsala delen av migrerande myotom medan lem och magmuskulatur (hypaxial) uppkommer ur den ventrala migreringen (Christ *et al.* 1995; Tajbakhsh *et al.* 2000). Det distinkta embryonella ursprunget av epaxial och hypaxial muskulatur har gett forskare en antydning att dessa grupperingar av muskulatur kan formas via olikartad myogenisk signaleringshärstamning. I ett utvecklande embryo kan man se primära myofiber utvecklas tidigt under dräktigheten följt av sekundära myofiber, som tillkommer senare. I det slutliga skedet av muskelsyntesen uppstår satellitceller, stamceller hos muskler, efter ungefärligen 5 dagar (Pannese 1969).

De myogeniska regulatoriska faktorerna (MRF) är en grupp av basic helix-loop-helix (bHLH) transkriptionsfaktorer. MRF beskrivs normalt biologiskt som ett paradigm eftersom dess signalering kontrollerar en hel cell-härstamning (Bain *et al.* 1994). Upptäckten av familjen år 1987 (Davis *et al.* 1987) var en viktig händelse för att fastställa den molekylära basen för en vertebratcells proliferering (celldelning som resulterar i ökad population av celler) och specialisering. I vertebrater består MRF familjen av 4 primära proteiner, MyoD, Myf-5, Myogenin och MRF4. Immunohistokemisk detektion av dessa 4 proteiner under somitformation avslöjar att myotomen är indelad i två undergrupper, Myf-5-beroende och MyoD-beroende. I en pre-lemskapande somit startar Myf-5-beroende programmet när Myf-5 proteinet framträder i dorsala-anterior cellerna av somiten innan formationen av myotom i embryot. *myogenin* är uttryckt 2-4 h efter att Myf-5 har framträtt, och efter 12h uttrycks *MRF4*. MyoD-beroende programmet inleds när MyoD proteinet framträder i cellerna ventralt i somiten, som sedan utlöser en ventral kaskad av MyoD proteiner (Weintraub *et al.* 1991). Efter viss mognad av embryot har alla myocyter i myotomen uttryckt Myogenin proteiner, medan MRF4 proteinet är uttryckt i en mindre mängd celler, främst i de dorsala domänerna. I början av det embryonella stadiet verkar det som om uttrycket av Myf-5 och MyoD är ömsesidigt exklusivt uttryckt. Dock i senare stadium är de båda uttryckta tillsammans. Dessa

resultat tyder på ett troligt scenario där *myf-5* och *myoD* uttryckande underdomäner av mytomet formar den ursprungliga härstamningen av celler, som ger upphov till ryggmuskulatur eller bål och lemmuskulatur (Kablar *et al.* 2000).

Myoblastcellers cellinjer uttrycker *myf-5* och/eller *myoD* mRNA före och efter cell differentiering, medan *myogenin* mRNA först uttrycks efter ett flertal dagar efter fusionen av cellerna. Detta tyder på att man kan indela MRF i två basala funktionella grupper, *myf-5* och *myoD* som primära faktorer, uttryckta före och efter differentiering. *myogenin* och *MRF 4* som sekundära faktorer, uttryckt under och efter differentiering (Fig.1).



Figur 1. Signaleringsmodell för myogenes i de epaxiala, hypaxiala och limbiska prekursorerna. Modellen härstammar från ett flertal MRF knockout försök (Rhodes *et al.* 1989; Nabeshima *et al.* 1993; Rudnicki *et al.* 1993) och anses idag vara en fungerande, dock basal modell för differentiering av muskelceller. Figuren är rekonstruerad från (Yun *et al.* 1996).

En mutant *myoD*<sup>-/-</sup> mus är både livsduglig, fertil och visar inga stora abnormaliteter i skelettmuskler (Rudnicki *et al.* 1993). Northern blot analys av skelettmuskulaturen indikerar att inga koncentrationsändringar av *MRF4* eller *myogenin*s mRNA har skett. I jämförelse med *myoD*<sup>+/-</sup> och en *myoD*<sup>-/-</sup> mus kunde man även se att koncentrationerna av *myoD* mRNA var halverade (*myoD*<sup>+/-</sup>), samt icke mätbar (*myoD*<sup>-/-</sup>) i jämförelse med en vildtyps skelettmuskler. Nuclease S1 analys med exon 1 sond (Greene *et al.* 2001) avslöjar att en låg koncentration av *myf-5* mRNA i neonatala vildtyps-möss, som ökar 1.8 gånger i en *myoD*<sup>+/-</sup> mutant och 3.5 gånger i en *myoD*<sup>-/-</sup> mus. Dessa resultat föreslår att *myf-5* uttrycks normalt och undertrycks av *myoD*. Denna reglering verkar även vara koncentrationsberoende då en heterozygot mutant visar en intermediär koncentration av *myf-5* mRNA i jämförelse med vildtypen och *myoD*<sup>-/-</sup> mutant (Kablar *et al.* 2000).

Likväl som *MyoD*<sup>-/-</sup> mutant utfördes en utförlig histologisk och northern blot analys av en nyfödd *myf-5*<sup>-/-</sup> mutant vilket inte visade några abnormaliteter hos skelettmuskulaturen. Dessa

möss dog dock kort efter födsel då svåra bröstabnormaliteter hindrade musens respiration. Myf-5 är inte uttryckt i celler, som ger upphov till bröstorgansmuskulatur vilket indikerar att bröstabnormaliteten är en indirekt konsekvens av mutation i *myf-5*. I *myf-5<sup>-/-</sup>* mutant möss är muskelutvecklingen uppskjuten tills *myoD* blir uppregerad i utvecklingen av embryot. Detta indikerar att *de novo* inducerad *myf-5* och *myoD* transkription sker oberoende av varandra (Rudnicki *et al.* 1993).

Eftersom den höga koncentrationen av *myf-5* mRNA i *myoD<sup>-/-</sup>* mutanter, samt den försenade starten av muskelspecifikt genuttryck i möss som saknar Myf-5, ger anledning till att tro att *myf-5* och *myoD* är funktionella substitut till varandra i muskelutveckling. För att testa denna hypotes korsades *myf-5<sup>+/-</sup>* med *myoD<sup>-/-</sup>* som gav avkomman *myf-5<sup>-/-</sup> myoD<sup>-/-</sup>*. Denna avkomma förlöstes via kejsarsnitt och verkade till en början vara vid liv med en nyans av rosa. De var komplett orörliga och ändrade snabbt färg till en mer blålik färg (cyanotisk) på grund av syreminskning. En nyfödd *myf-5<sup>-/-</sup> myoD<sup>-/-</sup>* mutant saknar helt skelettmuskulatur i hela kroppen, utrymmet där muskulaturen normalt ska sitta innehöll antingen en formlös löst sammansatt bindväv eller expanderade delar av fettaktig bindvävnad. De andra organen lunga, hjärta, lever, mag- och tarmkanal såg histologiskt helt normala ut. Immunohistokemisk färgning med en antikropp, som reagerar på glatt och strimmig-muskulatur  $\alpha$ -aktin visade på en obefintlig mängd av myocyter och myofibrer. Färgning med antikroppar riktade mot desmin (ett intermediärt filament i sarkomeren) visade att inga myoblaster var närvarande i utrymmet. Dessa data stödjer teorin att *myf-5* och *myoD* har som funktion att agera som myogeniska determinerings faktorer under embryogenesen. Det påvisar dock inte en uteslutande signalerande roll för *myf-5* och *myoD* under och efter differentiering av myotomerna (Rudnicki *et al.* 1993; Pownall *et al.* 2002).

Epaxiala- och hypaxial muskulatur misstänker forskare har ett distinkt ursprung, vilket föreslår att de kan vara formade av olika myogeniska härstamningar. Som exempel, Epaxial muskulatur är formad av myogeniska prekursorer som är härledda från den dorsal-mediala delen av somitens myotom som först uttrycker *myf-5*. Hypaxial muskulatur är formad via myogeniska prekursorer, som uppkommer från den ventral-laterala portionen av somitens myotom och uttrycker först *myoD*. Dessa data tyder på att *myf-5* och *myoD* har unika roller i utvecklingen av epaxial och hypaxial muskulatur (Kablar *et al.* 2000).

### Satellitceller

Satellit celler, stamceller från post-syntetiserade skelettmuskler uppkommer kring dag 5 och är postulerade att komma från en annan myogenisk härstamning än annan muskulatur. Satellitceller uppehåller sig närmast sarcolemman (muskelfibers cellmembran) och bas membranet. Denna stabila klass av stamceller är normalt vilande och är aktiverade i respons på stress inducering så som viktlyftning eller annan sorts trauma, exempelvis skador. Vid aktivering påbörjar satellitcellerna en prolifering och dess avkomma, som kallas Myogenic precursor cell (mpc), fuserar med den skadade eller nyskapade fibern och regenererar muskeln. Sådan överproliferering genererar en avkomma av celler, som fortfarande är odifferentierad vilket då återskapar vilande satellitceller (Rudnicki *et al.* 2008).

Relativt lite är känt om de reglerande mekanismerna för vilande, aktivering och prolifering av satellitceller. Aktivering av satellitceller sker när en satellit går över det basala lamina och träder in i S-fas, detta kan vara inducerat av ett stort antal olika stimuli så som skador, denervation och träning. Följdelaktigen verkar det som att signaleringen genom olikartade mekanismer kan leda till aktivering av satellitcellerna, vilket gör det väldigt problematiskt *in vivo* (Cooper *et al.* 2007).

Analys av genuttryck med användandet av Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) på individuell satellitcellnivå från en kultur av intakta muskelfibrer med granskning på aktivering bekräftar att de vilande satellitcellerna inte uttrycker några mätbara mängder MRF proteiner, men däremot uttrycker tyrosin kinas c-met receptorer. Dessa experiment visade även att aktiverade satellitceller först uttrycker antingen *myf-5* eller *myoD*, som sedan följs av ett dubbeluttryck av både *myf-5* och *myoD* (Cooper *et al.* 1999). Efter påbörjad proliferering är det tydligt att myogenin och *MRF4* är uttryckta i början av cellens differentieringsstadium.

Analys från möss, som saknar MyoD stödjer kraftigt uppfattningen om att *myoD* spelar en tidig och viktig roll i satellitcellens funktioner under skelettmuskelregeneration. *myoD*<sup>-/-</sup> möss korsade med *mdx* möss, en muskel dystrofisk musmodell, gjorde att avkomman fick en högre andel av den muskeldystrofiska egenskapen. *Mdx* är karakteriserat av reducerad muskelhypertrofi och ökad muskelsjukdom (myopati), som leder till en ökad mortalitet i tidig ålder. Vid inducerad skada på skelettmuskel i en *myoD*<sup>-/-</sup> mus så var muskelregenereringen kraftigt nedsatt samt att mängden prekursorer härledda från satellitceller minskade markant och verkade inte påbörja proliferering (Cooper *et al.* 1999).

### En översikt av *myostatin*

Att förstå muskelutveckling är avgörande för att skapa nyskapande regenerativa terapier för muskelsjukdomar och behandla muskelskador. Omfattande forskning har utförts för att erhålla den nuvarande informationen vi har om somitogenes och myogenes. *myostatin*, som är en medlem i TGF- $\beta$  superfamiljen har fått forskare väldigt intresserade då proteinet visade sig vara en väldigt viktig regulator av skelettmuskelsyntes och reparation samt andra metaboliska aspekter. Blockering av signalmolekylen visade sig vara ett kraftfullt verktyg för omåttligt snabb muskeltillväxt (McPherron *et al.* 1997), samt förbättrande struktur och prestation i en dystrofisk skelettmuskel (Bogdanovich *et al.* 2002). *Myostatin* har visat sig uttryckas främst i skelettmuskelvävnad (McPherron *et al.* 1997) men även tack vare mer specifika RT-PCR tekniker har man kunnat påvisa närvaron av mRNA molekyler i både hjärta, fettvävnad och andra organ (Roberts *et al.* 2003). Detta öppnar upp för en rad olika teorier kring global metabolisk reglering som fortfarande är obesvarade.

### Djurmodeller som ligger till grund för en förklaring av *Myostatins* funktioner

*Myostatin* noll-möss uppvisar en ökad kroppsvikt på ungefärligen 30% 2-5 månader från födsel, nästan hela viktökningen i de homozygota mössen består av muskelmassa. I jämförelse med vildtypen så kan de individuella musklerna öka ändå upp till 262%, då i detta fall i *pectoralis major* (bröstmuskeln). Tillökning av muskler beror inte bara på en ökning av storleken (hypertrofi) utan även på en ökad mängd muskelfibrer (hyperplasi) där musen hade upp till 82% fler muskelfibrer. När *myostatin* noll-mössen blev undersökta vid högre ålder (9 månader) fortsatte de att uppvisa kraftigt ökad skelettmuskelmassa, kroppsvikten hade dock normaliserats i jämförelse med vildtypen (McPherron *et al.* 2002). Normaliseringen av kroppsvikt trots ökad muskelmassa visade sig bero på underskott av kroppsfettslagring. Vidare så utfördes ett experiment där *myostatin* noll-möss med två andra musmodeller bärande på gener kodande för obesitas, som visade att *myostatin* hämmar kroppsfett ackumulering även på genetiskt överviktiga möss (McPherron *et al.* 2002).

Muskelutveckling anses ske under två olika faser. Dels under det embryo- och fosterstadiet där muskler växer gradvis genom tillväxt av antal fiber, medan efter födsel så sker muskeltillväxten till största del genom expanderande av redan existerande muskelfibrer. De

inhibitoriska effekterna av Myostatin på en post-natal muskeltillväxt har blivit analyserat genom att användning av Cre-lox systemets villkorliga Knock-Out (KO) procedur, som medför att *myostatingenen* blir inaktiverad specifikt i strimmiga muskler efter födseln (Grobet *et al.* 2003). Detta var utfört genom att utveckla en muslinje, som hade två loxP siter på varje sida av exon 3 (som kodar för den aktiva delen av myostatin). Mössen, som innehöll loxP strängen blev sedan korsade med en annan linje innehållandes Cre rekombinase under kontroll av muskel kreatin kinase promotorn. Denna promotor medför att Cre inte aktiveras förrän dag 2 efter födsel, när promotorn initieras rekombineras loxP siter, som raderar exon 3 i *myostatingenen*. Lösningen att använda sig av kreatin kinas promotorn medför att *myostatin* endast knockas ut i skelettmusklerna. Post-natal radering av *myostatin* visade sig ge en ökning i muskelmassa på 77% (*pectoralis major*), där den bakomliggande mekanismen var beroende på vilken typ av muskel som undersöktes histologiskt. *Tibialis anterior* muskeln expanderade endast med hypertrofi, medan storleksökningen i *gastrocnemius/plantaris* var både genom hypertrofi (71%) likväl som hyperplasi (29%)(Grobet *et al.* 2003).

Zhu et al(2000) använde sig av en annorlunda genetisk lösning, i deras experiment överuttryckte de en dominant negativ form av *Myostatin* (utan möjligheter till klyvning i aktiv yta). För att differentiera muskelceller från andra celler användes en kreatin kinas promotorn för det dominanta Myostatinet. Histologiska undersökningar visade att muskelmassan hade ökat med 35% uteslutande från fiber hypertrofi. Dessa resultat antyder att en mogen muskelcell uttrycker *myostatin* och att Myostatin begränsar muskeltillväxt hypertrofiskt under post-natalt liv.

För att studera effekten av överuttryck av *myostatin* på muskelutveckling klonade Zimmers et al. (2002) den kodade regionen av *myostatin* in till en eukaryot uttryckningsvektor, som transfekterades in till en kinesisk hamsterovarie (CHO)cellinje. Cellinjen injicerades sedan in i låren på möss som saknade brässen, en körtel som ansvarar för immunförsvaret och medför att musen inte avvisar främmande celler vilket medför att injektionen kontinuerligt uttryckte och utsöndrades av det rekombinerade *myostatinet*. Trots det väldigt lokala överuttrycket av *myostatin* kunde man se en global effekt över hela musen, som minskade 30 % i kroppsvikt inom 16 dagar efter injektionen. Histologisk undersökning visade att muskelminskningen stod för 30-50 % av den totala viktminskningen hos musen medan resterande viktminskning var beroende på minskning i andra vävnader samt total avsaknad av vit fettvävnad. Reduktionen i muskelmassa var på grund av en minskning i fiberstorlek. Kroppsmassaförlusten till följd av *myostatin* överuttryck visade inte ha någon effekt på musens kaloriintag och var därför ingen följd av anorexia utan liknande mer utmärgling på grund utav undernäring (kakexi).

Reisz-Porszasz et al. (2003) utförde en specifik överuttryckning av Myostatin i skelettmuskler genom att placera en *myostatin* transgen under kontroll av muskelns egen kreatin kinas promotorn, följdelaktigen uttrycktes och utsöndrades därför *myostatin* endast i utvecklade muskelceller. Överuttrycket gav en viktreduktion på 20-25% i varje individuell skelettmuskel inom 42 dagar av post-natalt liv, denna reduktion var också uteslutet från reduktion i fiberstorlek. *myostatins* överuttryck visade sig även ha inverkan på reduktion av hjärtmuskulaturen, som minskade med 17% till skillnad från överuttryck via CHO injektion (Zimmers *et al.* 2002), dessutom påvisades en ökning av vit fettvävnad. Detta föreslår att Myostatin antingen träder in i cirkulationen för att agera på fettvävnad eller att den inducerar sekretionen av sekundära fettbildande signalmolekyler. Muskelförlust och den ökande fettbildningen var endast funnen hos hanarna och var avsaknad totalt hos honorna.



Överdriven muskelutveckling eller ”muskeldubbling” i boskapsdjur har varit dokumenterat i över 100 år (Kambadur *et al.* 1997) Belgian Blue och Piedmontese är två av de mest vanliga exemplen på framavlade boskapsdjur, som påvisar muskeldubbling och är båda belönade med priser för deras kött kvalitet och förstås kvantitet (Wheeler *et al.* 2001). Ett flertal forskargrupper har identifierat mutationer i *myostatingenen* i båda dessa boskapsorter och så här i efterhand tillkommer det allt fler djur där man har upptäckt muskeldubblingsgenen i (Grobet *et al.* 1997; McPherron *et al.* 1997). Belgian Blues har en radering på 11-nukleotider i exon 3, vilket orsakar en ändring i läsramen för polymeraset och genen blir obrukbar. Piedmonteses exon 3 innehåller punktmutation i en nukleotid, som innebär att aminosyran cystein byts ut mot tyrosin i den aktiva proteindelen av Myostatin. Kartläggning och segregeringsanalyser av *myostatingenen* på nötkreaturs kromosom 2 har fastställt att *myostatin* är en autosomalt recessivt ärvd gen (Smith *et al.* 1997). Wegner *et al.* (2000) utförde en detaljerad studie om utvecklingen i *semitendinosus* en del av hamstringsmuskeln hos Belgian Blue. Storleksökning i denna muskel hos nötkreaturen sker uteslutande genom fiberhypertrofi. Ökningen av muskelfiberantal var uppenbar vid födseln men stagnerade och slutade helt att öka i senare stadium.

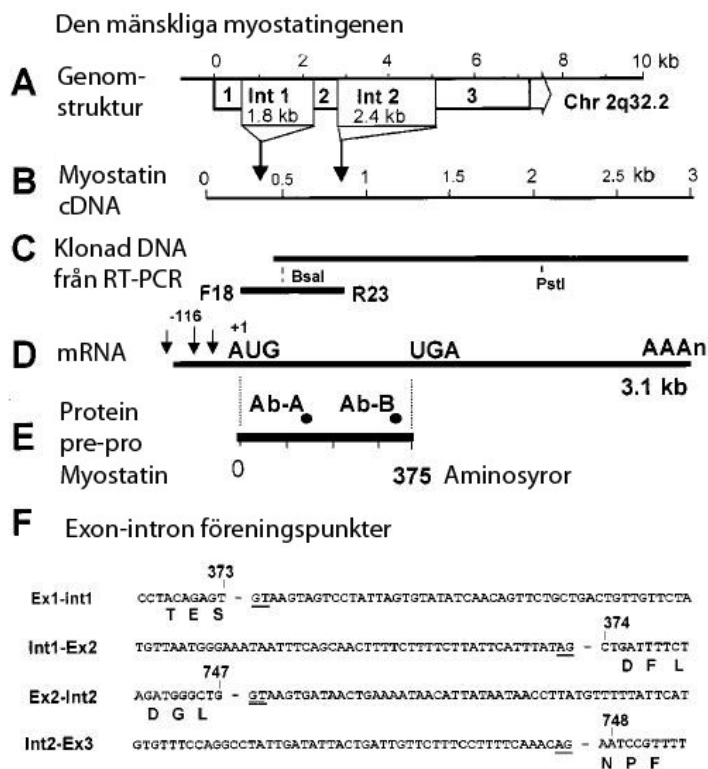
För att testa om en ”muskeldubbling” fenotyp från boskap skulle kunna upprepas i en mus framställdes en transgen mus, som kontinuerligt överuttryckte *myostatin* med exakt samma missense mutation som Piedmontese har. Det visade sig att muskelmassan ökade uteslutande från fiberantal och inte alls av fiberhypertrofi. I jämförelse med *myostatin* noll-musen som McPherron *et al.* skapade som växte både via hypertrofi likväl som hyperplasi antyder detta att olika *myostatin* noll-möss genererar olika fenotyper, vilket indikerar att genen kan vara fenotypiskt heterogen (Nishi *et al.* 2002).

Det är fortfarande oklart om överdriven muskelmassa, som skapas genom förlust av Myostatin funktioner faktiskt förbättrar muskelprestation. Boskapsdjur med underhålliga koncentrationer av Myostatin har svåra problem med att hålla kroppstemperaturregleringen eftersom dess stora muskler medför i en abnorm värmeproduktion. Kroppsövningar för en dubbel musklings nötkreatur resulterar i laktacidosis vilket föreslår en reducerad aerobisk metabolisk aktivitet hos muskeln (Holmes *et al.* 1973). Vid påtvingad kroppsträning av boskapen kan man väldigt tidigt se stark utmattning, akut rhabdomyolysis och en stark tillväxt av serum innehållande Kreatin kinas, som kan komma upp i koncentrationer 41.000 U/l i de värsta fallen (Holmes *et al.* 1973).

Myostatin underhålliga boskapsdjur uppvisar en minskad reproduktiv fitness, som troligtvis orsakas av en kombination av faktorer. Nötkreaturen har mycket svårare att bära foster än vanliga kreatur, tjurarna utvecklar en sjukdom, som bidrar till bristfällig funktion i könskörtlarna (hypogonadism) (Casas *et al.* 2004). Att föda en kalv med överdriven muskulatur är väldigt svårt, dels för kalvens storlek men även på grund av att kvigan har ett deformerat *pelvis* från den kraftiga muskulaturen som sitter runt om benen. Vid jämförelse av muskelstyrka mellan en lågkoncentrations Myostatin boskapsdjur och ett vanlig nötkreatur kan ingen signifikant skillnad ses. Däremot finns det ett flertal forskargrupper, som visar på att injicering av Myostatin ökar musens styrka och storlek i ett långsiktigt perspektiv (Haidet *et al.* 2008). Studier på Myostatin underhålliga människor har även påvisat ökad styrka och storlek (Schuelke *et al.* 2004).

## Molekylär genbeskrivning av Myostatin

Mstn är en 375-aminosyror lång polypeptid, som är väldigt konserverad hos vertebrater och produceras huvudsakligen i muskelvävnad. Av direkt analogi till TGF- $\beta$  familjen och andra indirekta bevis postuleras det att Mstn klyvs post-transkriptionellt inne i muskeln till en N-terminus propeptid och en aktiv C-terminal på 110-aminosyror (se TGF- $\beta$ 1). Det var 1997, som McPherron hittade denna sekvens med hjälp av degenerativ PCR. Tack vare sin homologi till andra familjemedlemmar i TGF- $\beta$  (McPherron *et al.* 1997). Gonzalez-Cadavid *et al.* (1998) lyckades klona *myostatin* cDNA från mänskligt DNA. De visade att *myostatin* består av 2 introner och 3 exoner positionerad 2q32.2 i kromosomen. Genen är relativt liten med en sammanlagd storlek på 7,7-kb, efter transkription sker en post-transkriptionell protein modifiering, vilket aktiverar proteinet MSTN som kan uppmätas till en storlek på 26-kDa (fig.2). Gonzalez visade också att Exon 3 är väldigt viktig och kodar för propeptiden, som hjälper polypeptiden ut ur det endoplasmatiska nätverket. Sekvensering visade även att inga introner finns 5' uppströms från initierings kodonet i DNA;t, vilket stämmer väl med andra proteiner från transforming growth factor familjen. Undersökningar med Northern, Western och Immunohistokemiska färgningar utfördes på mänsklig vävnad, som visade *myostatin* mRNA uttryck i skelettmuskler hos människan, *in vivo* immunokemisk färgning visade även homologi med musens protein då experimentet kunde utföras med samma antikropp, som musens. Jämförelse mellan den mänskliga aminosyresekvensen med den från musen visar att på en 90 % sekvenslikhet och likheten ökar till 100 % sekvensidentitet om man jämför cDNA mellan de två arterna(Gonzalez-Cadavid *et al.* 1998).



Figur 2 Den mänskliga *myostatin* genen från position 2q32.2 i kromosomen. Figuren innehåller: A.) Den genomiska strukturen av *myostatin* på 7.8kb, intron 1 på 1.8kb samt intron 2 2,4. B.) Erhållet cDNA från experimentet visar på att utan introner är genen ungefärligen 3,1kb. C.) Det klonade DNA som experimentet frambringade, F18-R23 är en analog för en oligo vid experimentet. Est är en akronym för Expressed sequence tag. D.) Det mRNA som transkriptionellt framställts från cDNA, pretranslationella regioner är synliga. E.) Pre-proteinet Myostatin framställt från start till stopkodon innehållande 375 aminosyror. F.) Bioinformatisk beskrivning av exon-intron föreningspunkter. Bilden är redigerad från (Gonzalez-Cadavid *et al.* 1998)

### **Intra/extra-cellulär signalering av Myostatin**

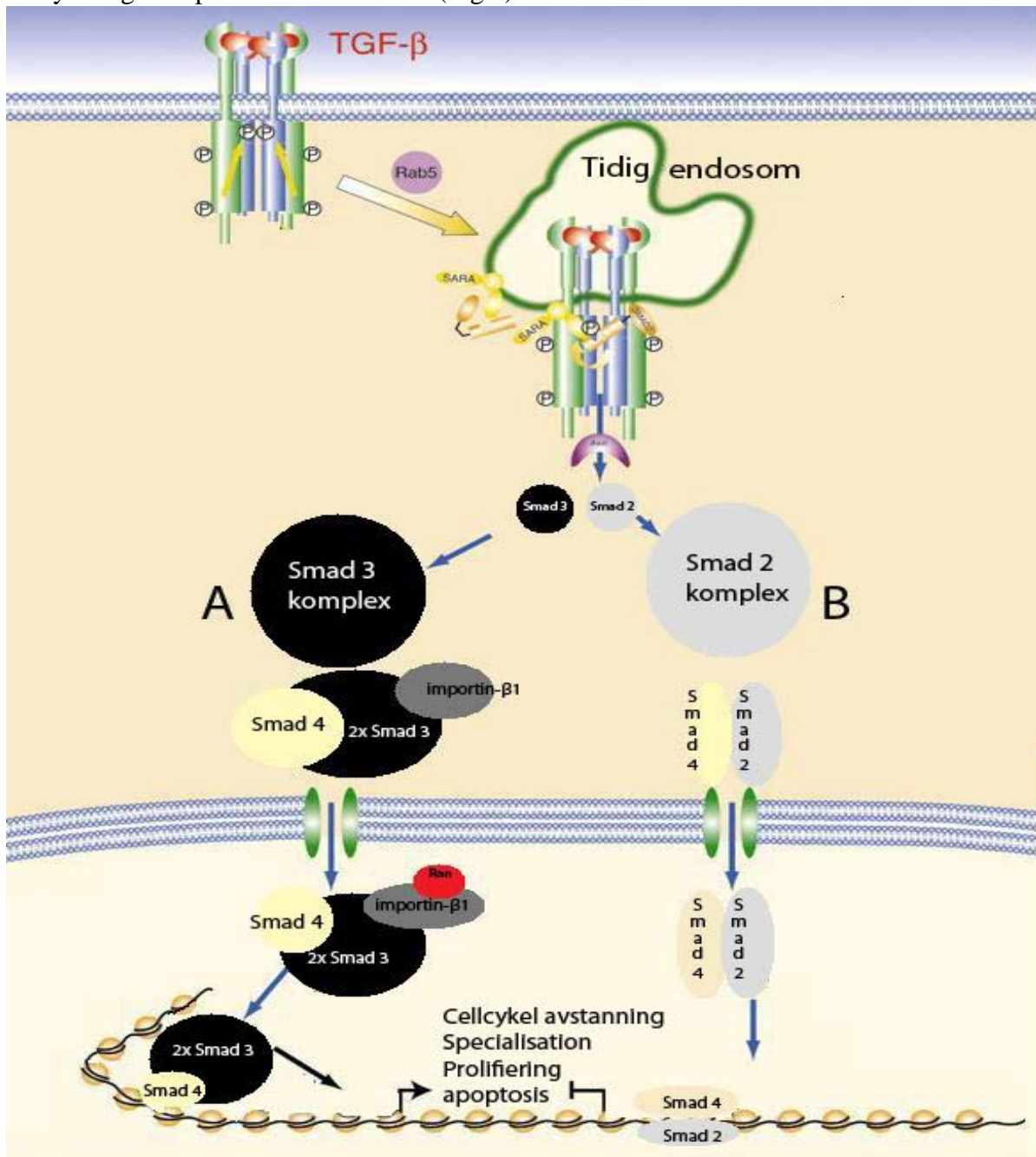
Som alla TGF- $\beta$  familjemedlemmar är Myostatin syntetiserat i en prekursorform, som är proteolytisk kluven för att tillverka en aktiv ligand. Den aktiva liganden är sedan sekurerad ut till blodplasman endokrint, som en latent molekyl. Aktivering av molekylen på molekylär nivå *in vivo* är fortfarande inte fullständigt fastställd, *in vitro* studier har dock visat att vid avlägsnande av kolhydratstrukturen blir komplexet en aktiv signaleringsmolekyl, vad som reglerar detta *in vivo* är inte fastlagt(Miyazono *et al.* 1989).

Signaleringen inleds när den aktiva liganden binder extracellulärt till ett komplex av transmembran receptorer bestående av två distinkta transmembranproteiner kallade typ I och typ II serin/threonin kinas receptorer. Den konstituerande aktivitet typ II receptorn rekryterar och aktiverar en lämplig typ I receptor genom fosforylering av dess konserverade juxtamembranregion kallat Gly-Ser domän, som inleder en montering av två typ I och två typ II receptorer(Penton *et al.* 1994; Liu *et al.* 1995; Yamashita *et al.* 1995). Beroende på vilken typ av receptorkomplex, som bildas fosforyleras och aktiveras specifika intracellulära receptorreglerade Smadproteiner (R-Smads). Forskare har identifierat att det är typ I receptortransmembranproteinet i komplexet, som designerar vilken typ av Smadprotein, som fosforyleras. Det har identifierats 5 molekylärt olika typ II receptorer och 7st fosforylerande typ I receptorer i däggdjur(Munir *et al.* 2004). När den aktiva liganden binder till receptorkomplexet påbörjas en rotation av den cytoplasmiska kinas domänen till en katalytiskt fördelaktig orientering. Med hjälp av proteinet Rab5 bildar receptorkomplexet en tidig endosom i cytoplasman, som medför att Typ II receptorn fosforylerar serinet i typ I receptorn beroende på vilken typ av ligand, som bundit och skapat komplexet aktiveras en viss Smadfosforyleringskaskad.

I cytoplasman finns det 5 receptorreglerade Smadproteiner: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 och Smad8. Dessa R-Smads grupperas oftast in i två olika intracellulära mekanismer. Smad2 och Smad3 är medlade av TGF- $\beta$  familjens aktiviner, nodaler och GDFs, till exempel Myostatin(Goumans *et al.* 2002). Smad1, Smad5 och Smad8 är dock medlade av andra familjemedlemmar från TGF- $\beta$  så som BMPs och AMH, det har likafullt visats att Myostatin kan agera, som en antagonistisk ligand till receptorerna genom att konkurrera med BMP7 om att binda typ II receptorn därav inhibera differentiering av cellen(Rebbapragada *et al.* 2003). Bindandet av R-Smad till typ I receptorn är förmedlad av zink dubbelfingrad domän innehållandes två proteiner Sara, ett molekylärt ankare för Smad vid receptoraktivering, och HGS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) som involveras i signaleringen.

Sara proteinet är närvarande i receptorkomplexet redan vid den tidiga endosombubblan där den likt ett ankare rekryterar och binder fast R-Smad, Sara sanktionerar bindandet av R-Smad till typ I receptorns L45 region (Runyan *et al.* 2005). Sara veckar R-Smad så att dess serin del på C-terminalen möter den katalytiska regionen på typ I receptorn. Typ I receptorn fosforylerar sedan serinedelen på R-Smad, som inducerar en konfirmationsändring i MH2 domänen i R-Smad vilket dissocierar komplexet och Smadproteinet startar en fosforyleringskaskad(Souchelnytskyi *et al.* 2001). Efter dissociation binder R-Smad tillsammans med andra Smadproteiner bildandes en homooligomerisering då SmadS C-terminal fosfoseriner känner igen den konfirmationsändrade MH2 domänen av R-Smad. Detta komplex dissocierar och bildar en heterooligomerisering med common-partner-Smad (Co-Smad eller också kallat Smad4). Smad4 bildar två olika komplex med de båda R-Smad, Smad3 bildar heterotrimer med två Smad3 monomerer och heterodimer med en Smad2 monomer(Dennler *et al.* 1998; Makkar *et al.* 2009).

Fosforylerat Smad3 associerar sedan med Importin- $\beta$ 1 protein, som hjälper till att importera komplexet till kärnan. Under transportprocessen binder Ran GTPase till importin- $\beta$ 1- Smad3 komplexet och katalyserar transporten. Smad2 och andra sidan misslyckas med att binda importiner till sig på grund av en annorlunda MH1 domän och är därför självständigt utan katalysering transporterat in till kärnan (Fig.3).



Figur 3. Den intracellulära signaleringsmekanismen för en GDF ligand. Liganden binder extracellulärt till receptorproteinkomplexet som består av två typ I och två typ II transmembraniska receptorproteiner. Komplexet bildar en endosome med hjälp av Rab proteinet. Typ I receptorerna erhåller två proteiner Sara och HGS som likt ankare förankrar Smad3 och Smad2 i komplexet medan en konformationsändring sker i båda dess MH2 domäner. Konformationsändringen medför att de båda Smaden dissocierar och bildar homooligomerer med andra Smad. A.) Smad3 binder till sig ett Smad4 protein och importin- $\beta$ 1 som katalyserar transporten in till nucleus. Väl inne i kärnan så binder Smad3komplexet till SBE ytan via MH1 domänen. B.) Då Smad2 har en trankonfigurering i sin MH1 domän så medför det att bindningen till Smad4 komplexet är en homodimer samt att ingen importin kan binda vilket medför att Smad-2-4 komplexet måste transporteras genom membranet självständigt utan katalyserande effekter. Figuren är rekonstruerad från (Moustakas 2002)

När komplexet Smad3-Smad4 väl är inne i kärnan binder de till DNA sekvenser kallade Smad-bindings elements (SBE) via ett strukturelement i MH1 domänen på proteinerna (Yingling *et al.* 1997; Dennler *et al.* 1998). Eftersom Smad2-Smad4 komplexet har en annorlunda MH1 domän saknar det komplexet förmågan att binda till SBE och binder istället till en annan sekvens med interaktionen via Smad4. SMADkomplexen binder inte nödvändigtvis exklusivt till DNA i kärnan utan kan även agera som andra transkriptions faktorer. Tack vare dess MH 1 och 2 domäner så kan Smad bilda komplex med co-aktivatorer och co-repressorer, som antingen uppregerar eller nedreglerar celltillväxt, differentiering och apoptos(Moustakas 2002).

Satellitceller, som är musklernas egna stamceller har visats vara post-natalt signalerade av Myostatin. MyoD och Myf-5 som är signaler för en initiering av proliferering av satellitcellen och har visats vara kontrollerade av det aktiverande signalproteinet Pax-7. Pax-7 och andra sidan inhiberas av Myostatin, vilket gör Myostatin till en trolig signalkandidat som huvudregulator av hela reparationskomplexet. McFarlane *et al.* (2008) har utfört forskning, som visar att inducering av Myostatin hämmar profilering av satellitceller och vid inducerat trauma på musklerna blir regenerationen kraftigt försämrad. De kunde dock tyvärr inte bekräfta vilken typ av mekanism, som Myostatin reglerar satellitcellstillväxt och post-natal myogenes.

### Reglering av Myostatin

Hur *myostatin* regleras vet man i dagens läge väldigt lite om. Det finns ett flertal undersökningar från olika däggdjur, som med användandet av immunohistokemisk färgning har mätt att olikartade fysiska stimuli medför en koncentrationsändring av Myostatinproteinet(Ijiri *et al.* 2009; Wilborn *et al.* 2009). Dessa globala mätningar speglar dock inte den molekylära regleringen, och i dagen läge finns det inga positiva experiment, som speglar en molekylär reglering. Småskaliga experiment har dock skapat teorier, som har genererat en möjligtvis partiell förklaring till den bakomliggande regleraren. Clop, Marcq *et al.* (2006) har utfört ett experiment på Texel får med en abnorm muskulatur beroende på en G till A nukleotidövergång i 3' otranslerade region (3' ÚTR) av mRNA, vilket medförde en fästpunkt för miRNA (miR1 och miR206) och således en blockering av transkription.

MicroRNA (miRNA) har relativt nyligen upptäckts, som en stor klass av små icke-kodande enkelsträngade RNAs som är ungefärligen 20~22 nukleotider långa (Lee *et al.* 1993). miRNA är en negativ regulator av genuttryckt genom translationshämmning och mRNA degradering. För att inhibera proteinprodukten binder miRNA till sitt homologa mRNA med nästan perfekt basparsmatchning. Cellen ser detta som ett dubbelsträngat RNA och att klyver produkten så att ingen proteinsyntetisering sker.

Eftersom vi i dagens läge vet väldigt lite om miRNA reglering kan detta vara en grundläggande förklaring till varför vi inte kan förklara *myostatin* reglering. Ett experiment, som stödjer denna teori kommer från Drummonds grupp (2009), som publicerade ett experiment om hur essentiella aminosyror ökar koncentrationen av miRNA vilket troligvis skulle inhibera *myostatinsyntesen*. Ingen undersökning utfördes dock om dessa miRNA är post-transkriptionella reglerare till tillväxtfaktorer i muskeln, vilket medför att det inte behöver stödja en teori om miRNA reglering utan erkänner endast en ökning in koncentration.

## Molekyler med inhiberingseffekt av MSTN

Forskning kring molekyler med inhiberingseffekt på MSTN är väldigt åtråvärd då molekylen i sig skulle kunna vara en potentiell framtida medicin mot muskeldegenerering. För att inhibera en effekt av ett genuttryck så finns det två sätt att gå tillväga, som båda har fördelar och nackdelar.

Follistatin (fst) är ett protein som har egenskapen att komplexbinda till en rad olika TGF- $\beta$  proteiner. Proteinet binder som en antagonist till de olika familjemedlemmarna beroende på vilken typ av struktur follistatin har tidigare veckats i. Forskare har visat att fst 288 samt fst 315 kan förknippas antagonistiskt med myostatin. Dess effekt är att binda i myostatin som bidrar till en ökad degradering av myostatin-follistatin komplexet. Cash et al. (2009) Har visat kristallstruktur på myostatin-follistatin 288 (fst288) binder med en dimer som blockerar de 4 aktiva bindytorna hos myostatinmolekylen och lämnar myostatin funktionsoduglig.

Andra försök med att inhibera Mstn har också utförts genom att skapa en mRNA analog som binder likt miRNA och ökar degraderingshastigheten, real time PCR visade på att proteinkodande mRNA fanns i 33% av koncentration i jämförelse med vildtypen. Experimentet injicerades post-natalt och visade på en 45% ökad kroppsvikt i testdjuret. Histokemiska analyser i ett tvärsnitt av muskeln demonstrerade en muskelfiberstorlek, som motsvarade det dubbla mot kontrolldjuret (Lee et al. 2009).

Man har även visat försök att den resterande pro-regionen av Myostatin vid spjälkning kan vara antagonistisk till den biologiska funktionen av den aktiva liganden och fungera som en feed-back inhibering, där höga koncentrationer av pro-regionen i transgena möss har resulterat i en ökad muskelmassa (Thies et al. 2001; Yang et al. 2001). Man vet dock tyvärr inte mekanismen bakom detta och kommer att utföra vidare studier på det i framtiden.

## Diskussion

Myostatin eller GDF8 har visats av ett flertal forskare att ha egenskapen att hämma differentiering och proliferering av myoblastceller samt satellitceller. Detta ger till följd att utslagning av Myostatin ger en översyntes av funktionell muskelvävnad. Efter mer än 100 års forskning kring myogenes vet vi fortfarande väldigt lite om hur mekanismen för själva syntesen av muskulatur går till. Några grundläggande mekaniska steg kring proliferering och differentiering har vi kunskapen om men initieringssignalering och sarkomerbildning måste utforskas vidare då vi just nu endast har vaga teorier om dem. Den intra/extra cellulära post-natala signaleringen av myostatin är också ett väldigt outforskat ämne, som kommer att kräva år av forskning för att kunna skaffa en djup förståelse. Kort sagt vet vi väldigt lite om allting kring molekylär muskulatur. Det finns mängder av information, som vi idag inte kan utforska med de molekylära verktyg, som vi använder oss av idag. Myogenesi är helt enkelt för komplext. Förhoppningsvis inom åren så kommer det att tillkomma något verktyg som gör det lättare att lokalisera och identifiera mekanismer kontinuerligt *in vivo* utan att behöva döda värdjuret och kolla på fenotyper och kristallstrukturer.

*Myostatin* är helt klart ett hett forskningsämne som ökar exponentiellt i takt med åren. Jämförande träffsökningar från 2004-2009 har visat på en 10-faldig ökning av antalet publikationer på pubnet. Denna storhet är dock inte oberättigad när man inser vilken kraft denna gen faktiskt innehar. Forskare talar om en potentiell kur för alla muskeldegenerativa sjukdomar så som HIV och Duchenne muscular dystrophy. Detta kan troligtvis också vara helt möjligt om man injicerar olikartade inhibitorer intramuskulärt som sedan antingen agerar kompetitivt med typ I/II receptorerna för Myostatin eller genom att komplexbinda och

däriigenom göra Myostatin prestationslösa. Visserligen så kan det också utföra någon typ av knockout försök på människan genom att antingen aktivera en miRNA analog till *myostatin* eller genom att helt rekombinera bort en essentiell del av proteinet men det är inte att rekommendera då vi fortfarande inte vet några nackdelar med att göra detta. Genterapi skulle kunna vara ett kontroversiellt verktyg för detta ändamål, dock så ser jag ingen fördel med detta då man faktiskt har kunskapen om vilken gen som är defekt i genetiska muskeldegenerativa sjukdomar och kan då istället för att knocka ut *myostatin* istället kurerade den genetiska sjukdomen via rekombination av en "frisk" gen. Applikationerna av en gen som ökar muskelsyntesen blir närmast oändliga när det kommer till medicinering och detta ökar endast då en utslagning av *myostatingenen* också ger egenskapen att inhibera lagring av vit fettvävnad (McPherron *et al.* 1997). Detta kan potentiellt fungera även som en medicin mot fetma då experiment på knockout möss visade en 70 % fettvävnadsminskning i jämförelse med vildtyps musen (McPherron *et al.* 2002). Det skulle även kunna ges som ett drastiskt botemedel mot typ 2 diabetes då större mängd muskler skulle medföra en markant lägre känslighet för insulin vilket skulle skona lever och andra organ i kroppen.

Om GMO någon gång kommer att tillåtas i slaktdjur finns en gigantisk potential om man genmodifierar så att djuren blir Myostatinunderhaltiga. McPherron (1997) *myostatin* noll-mus visade en markant ökad muskelmassa (262 %) trots att de matades jämbördigt i förhållande till kroppsvikt. Detta medför att om slakt kreatur skulle inneha en *myostatin* genmodifiering så skulle vi få mer kött per kilo per tillsatts näring till slaktdjuret. Alltså en effektivisering, som är väldigt åtråvärd. Köttet skulle dessutom inte innehålla någon fettvävnad alls och vara allmänt nyttigare vid konsumtion.

Men att undanröja denna gen kan inte vara endast till fördel. Den är ju faktiskt framkommen ur evolution och har selekterats i århundraden för så det måste finnas någon negativ aspekt med att växa i muskelmassa. Man kan helt klart se den negativa aspekten för dubbelmusklade nötkreatur då det saknar fitness jämfört med sina artfränder på grund av flertalet sexuella missgynnande faktorer så som problematiseringar vid kalvfödning och minskad spermaproduktion i könsgonader hos tjurar. Om detta beror på *myostatin* underuttryckningen eller på den faktiskt framavlingen, som dessa djur har genomgått är fortfarande oklart, men inga fitnessförluster har rapporterats i experiment på KO-möss. Det finns f.n. inte någon omfattande forskning kring Myostatins negativa aspekter men logiken säger att utökad proliferering i sådan utsträckning, som Myostatin faktiskt inducerar kan inte vara bra ur ett cancerogent perspektiv. All typ av proliferering breddar risken för cancerceller att uppstå, men likväl känns det som ett otroligt scenario att våra stamfäder selekterade från ett cancerogent perspektiv när medelåldern var troligtvis aldrig så hög att det skulle kunna bilda selekterande tumörer, så det måste finnas någon mer negativ aspekt. Vad den kan vara är dock oklart.

I Tyskland pågår det forskning kring en pojke som har bevisats ha en *myostatin* mutation som medför ett uttryckt av defekta Myostatinproteiner genom en mutation i exon3. Pojken visade sig ha dubbla recessivt nedärvda felaktiga *myostatingener* på kromosomerna, som resulterade i en knock-out (Schuelke *et al.* 2004). Under de 4,5 år som rapporter sträcker sig så har varken modern eller forskare rapporterat någon negativ aspekt med den abnormala muskulaturen som pojken innehar. Till fördel har man däremot sett att pojken har kraft nog att redan som 4 åring att lyfta två 3kilos hantlar på rak arm. Detta tyder helt klart på att mutationen har gett en funktionell muskulatur som gör pojken starkare. Eftersom pojken fortfarande är vid så låg ålder så har ingen påbyggande forskning utförts då det är oetiskt att utsätta en sådan ung individ för långvariga och troligtvis plågsamma undersökningar.

Detta höjer frågan om sportslighet om någon som denna pojke erhåller en sådan markant genetisk fördel. Vad kommer att stoppa honom från att kunna dominera hela tyngdlyftningsgrenen bara för att Myostatinproteinet som han tillverkar är defekt. World Anti-Doping Agency (WADA) är grundad med en tanke på att alla människor ska tävla på lika villkor, utan stärkande droger. Det hela är ett väldigt kontroversiellt ämne, men om pojken har med fördel egenskapen att påöka sin muskulatur med 200 % i jämförelse med andra tävlande så kan det ju inte vara jämt. Framtiden enligt WADA är oviss och en mängd diskussioner pågår om mutationer kan anses som en naturlig fördel eller om de ska helt utesluta sådant ur framtida sporter.

Idrotten ser väldigt oroligt på framtidens dopingpreparat, gendoping via genterapi är på framfart och än så länge finns det inget bra sätt att urskilja en gendopad person mot en vanlig. Man kan förstå frestelsen som en idrottsutövare utsätts för när presenterade fakta visar på att ett par virusinjektioner med noll-*myostatin* kommer att kunna öka muskelmassan med 200 % på bara ett par månader utan att någon extra träning. I dagens läge finns redan Myostatinblockerare för muskelbyggare att inhandla, dess effekt är dock klagjord att det inte fungerar. Själva blockeraren är en kapsel som intas oralt vilket i sig medför komplikationer då den effektiva substansen inte tål magsyran. Trots att det nu inte finns något framställt dopingpreparat så är själva tanken att företagen utnyttjar det mänskliga sinnet för genvägar genom att introducera en hittills okänd substans intill kroppen väldigt motbjudande.

## Tack till

Ett stort tack till Joakim Bergström för en ypperlig hjälp med förfining av språket och värdefulla kommentarer. Min medstudent Halgord Abdulla Hassan ska också ha ett stort tack för viktiga kommentarer. Jag vill även tacka min handledare Lage Cerenius för den stora hjälp som han har stått för.



## Referenser

- Assoian, R. K., A. Komoriya, et al. 1983. "Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization." *Journal of Biological Chemistry* **258**: 7155-60.
- Bain, G., E. C. Maandag, et al. 1994. "E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements." *Cell* **79**: 885-92.
- Bogdanovich, S., T. O. Krag, et al. 2002. "Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade." *Nature* **420**: 418-21.
- Card, P. B., P. J. Erbel, et al. 2005. "Structural basis of ARNT PAS-B dimerization: use of a common beta-sheet interface for hetero- and homodimerization." *Journal of Molecular Biology* **353**: 664-77.
- Casas, E., G. L. Bennett, et al. 2004. "Association of myostatin on early calf mortality, growth, and carcass composition traits in crossbred cattle." *Journal of Animal Science* **82**: 2913-8.
- Cash, J. N., C. A. Rejon, et al. 2009. "The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding." *EMBO Journal* **28**: 2662-76.
- Cate, R. L., R. J. Mattaliano, et al. 1986. "Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells." *Cell* **45**: 685-98.
- Cheifetz, S., J. A. Weatherbee, et al. 1987. "The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors." *Cell* **48**: 409-15.
- Christ, B. and C. P. Ordahl 1995. "Early stages of chick somite development." *Anatomy and Embryology (Berlin)* **191**: 381-96.
- Clop, A., F. Marcq, et al. 2006. "A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep." *Nature Genetics* **38**: 813-8.
- Cooper, M. and R. Hausman (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland, Sinauer associates, inc.
- Cooper, R. N., S. Tajbakhsh, et al. 1999. "In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle." *Journal of Cell Science* **112 ( Pt 17)**: 2895-901.
- Davis, R. L., H. Weintraub, et al. 1987. "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts." *Cell* **51**: 987-1000.
- Dennler, S., S. Itoh, et al. 1998. "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene." *EMBO Journal* **17**: 3091-100.
- Derynck, R., J. A. Jarrett, et al. 1985. "Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells." *Nature* **316**: 701-5.
- Drummond, M. J., E. L. Glynn, et al. 2009. "Essential Amino Acids Increase MicroRNA-499, -208b, and -23a and Downregulate Myostatin and Myocyte Enhancer Factor 2C mRNA Expression in Human Skeletal Muscle." *Journal of Nutrition*.
- Dubois, C. M., M. H. Laprise, et al. 1995. "Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase." *Journal of Biological Chemistry* **270**: 10618-24.
- Gonzalez-Cadavid, N. F., W. E. Taylor, et al. 1998. "Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14938-43.
- Goumans, M. J., G. Valdimarsdottir, et al. 2002. "Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors." *EMBO Journal* **21**: 1743-53.

- Greene, J. M. and K. Struhl 2001. "S1 analysis of messenger RNA using single-stranded DNA probes." *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 4**: Unit4 6.
- Grobet, L., L. J. Martin, et al. 1997. "A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle." *Nature Genetics* **17**: 71-4.
- Grobet, L., D. Pirottin, et al. 2003. "Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene." *Genesis* **35**: 227-38.
- Haidet, A. M., L. Rizo, et al. 2008. "Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 4318-22.
- Holmes, J. H., C. R. Ashmore, et al. 1973. "Effects of stress on cattle with hereditary muscular hypertrophy." *Journal of Animal Science* **36**: 684-94.
- Ijiri, D., M. Miura, et al. 2009. "Increased mass of slow-type skeletal muscles and depressed myostatin gene expression in cold-tolerant chicks." *Zoological Science* **26**: 277-83.
- Kablar, B. and M. A. Rudnicki 2000. "Skeletal muscle development in the mouse embryo." *Histology and Histopathology* **15**: 649-56.
- Kambadur, R., M. Sharma, et al. 1997. "Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle." *Genome Research* **7**: 910-6.
- Langman, J. and G. R. Nelson 1968. "A radioautographic study of the development of the somite in the chick embryo." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **19**: 217-26.
- Lawrence, D. A. 1985. "Transforming growth factors--an overview." *Biologie Cellulaire* **53**: 93-8.
- Lee, C. Y., S. Y. Hu, et al. 2009. "Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **387**: 766-71.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. 1993. "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**: 843-54.
- Liu, F., F. Ventura, et al. 1995. "Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs." *Molecular and Cellular Biology* **15**: 3479-86.
- Makkar, P., R. P. Metpally, et al. 2009. "Modeling and analysis of MH1 domain of Smads and their interaction with promoter DNA sequence motif." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **27**: 803-12.
- McFarlane, C., A. Hennebry, et al. 2008. "Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal." *Experimental Cell Research* **314**: 317-29.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler, et al. 1997. "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member." *Nature* **387**: 83-90.
- McPherron, A. C. and S. J. Lee 1997. "Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 12457-61.
- McPherron, A. C. and S. J. Lee 2002. "Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice." *Journal of Clinical Investigation* **109**: 595-601.
- Miyazono, K. and C. H. Heldin 1989. "Role for carbohydrate structures in TGF-beta 1 latency." *Nature* **338**: 158-60.
- Moustakas, A. 2002. "Smad signalling network." *Journal of Cell Science* **115**: 3355-6.
- Munir, S., G. Xu, et al. 2004. "Nodal and ALK7 inhibit proliferation and induce apoptosis in human trophoblast cells." *J Biol Chem* **279**: 31277-86.
- Nabeshima, Y., K. Hanaoka, et al. 1993. "Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect." *Nature* **364**: 532-5.

- Nishi, M., A. Yasue, et al. 2002. "A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**: 247-51.
- Pannese, E. 1969. "Electron microscopical study on the development of the satellite cell sheath in spinal ganglia." *Journal of Comparative Neurology* **135**: 381-422.
- Penton, A., Y. Chen, et al. 1994. "Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor." *Cell* **78**: 239-50.
- Pownall, M. E., M. K. Gustafsson, et al. 2002. "Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **18**: 747-83.
- Rebbapragada, A., H. Benchabane, et al. 2003. "Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis." *Molecular and Cellular Biology* **23**: 7230-42.
- Reisz-Porszasz, S., S. Bhasin, et al. 2003. "Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin." *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **285**: E876-88.
- Rhodes, S. J. and S. F. Konieczny 1989. "Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family." *Genes and Development* **3**: 2050-61.
- Roberts, S. B. and F. W. Goetz 2003. "Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout." *Molecular and Cellular Endocrinology* **210**: 9-20.
- Rudnicki, M. A., F. Le Grand, et al. 2008. "The molecular regulation of muscle stem cell function." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **73**: 323-31.
- Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, et al. 1993. "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." *Cell* **75**: 1351-9.
- Runyan, C. E., H. W. Schnaper, et al. 2005. "The role of internalization in transforming growth factor beta1-induced Smad2 association with Smad anchor for receptor activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells." *Journal of Biological Chemistry* **280**: 8300-8.
- Ruscetti, F. W., S. Akel, et al. 2005. "Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context." *Oncogene* **24**: 5751-63.
- Schuelke, M., K. R. Wagner, et al. 2004. "Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child." *New England Journal of Medicine* **350**: 2682-8.
- Smith, T. P., N. L. Lopez-Corrales, et al. 1997. "Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus." *Mammalian Genome* **8**: 742-4.
- Souchelnytskyi, S., L. Ronnstrand, et al. 2001. "Phosphorylation of Smad signaling proteins by receptor serine/threonine kinases." *Methods in Molecular Biology* **124**: 107-20.
- Sporn, M. B., A. B. Roberts, et al. 1987. "Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta." *Journal of Cell Biology* **105**: 1039-45.
- Tajbakhsh, S. and M. Buckingham 2000. "The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations." *Current Topics in Developmental Biology* **48**: 225-68.
- Telenius, H., N. P. Carter, et al. 1992. "Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer." *Genomics* **13**: 718-25.
- Thies, R. S., T. Chen, et al. 2001. "GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding." *Growth Factors* **18**: 251-9.
- Wegner, J., E. Albrecht, et al. 2000. "Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle." *Journal of Animal Science* **78**: 1485-96.
- Weintraub, H., R. Davis, et al. 1991. "The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage." *Science* **251**: 761-6.

- Wheeler, T. L., S. D. Shackelford, et al. 2001. "The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris." *Journal of Animal Science* **79**: 3069-74.
- Wilborn, C. D., L. W. Taylor, et al. 2009. "Effects of different intensities of resistance exercise on regulators of myogenesis." *J Strength Cond Res* **23**: 2179-87.
- Yamashita, H., P. ten Dijke, et al. 1995. "Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects." *Journal of Cell Biology* **130**: 217-26.
- Yang, J., T. Ratovitski, et al. 2001. "Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice." *Molecular Reproduction and Development* **60**: 351-61.
- Yingling, J. M., M. B. Datto, et al. 1997. "Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein." *Mol Cell Biol* **17**: 7019-28.
- Yun, K. and B. Wold 1996. "Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context." *Current Opinion in Cell Biology* **8**: 877-89.
- Zhu, X., M. Hadhazy, et al. 2000. "Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle." *FEBS Letters* **474**: 71-5.
- Zimmers, T. A., M. V. Davies, et al. 2002. "Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin." *Science* **296**: 1486-8.