

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Producción Animal



**COMPORTAMIENTO “IN VITRO” DE
ALELOS RECOMBINANTES DEL GEN DE
LA MIOSTATINA PARA SU APLICACIÓN
EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Cristina Fernández del Nacimiento

Bajo la dirección de la Doctora:

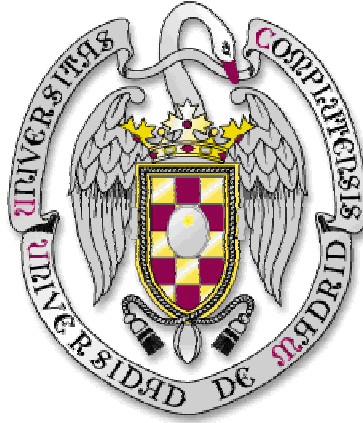
Susana Dunner Boxberger

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2677-1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria



**COMPORTAMIENTO "IN VITRO" DE
ALELOS RECOMBINANTES DEL GEN DE
LA MIOSTATINA PARA SU APLICACIÓN
EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

TESIS DOCTORAL

CRISTINA FERNÁNDEZ DEL NACIMIENTO

MADRID 2004

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

**COMPORTAMIENTO “IN VITRO” DE ALELOS
RECOMBINANTES DEL GEN DE LA
MIOSTATINA PARA SU APLICACIÓN EN
PRODUCCIÓN ANIMAL**

Memoria presentada por Cristina Fernández del Nacimiento para optar al grado de Doctor, realizada en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y dirigida por la Dra. Susana Dunner Boxberger

I. ÍNDICE GENERAL	1
II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	4
III. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	7
IV. RESUMEN/ABSTRACT	8
V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	10
A. Estado actual del conocimiento sobre la miostatina y relación con el fenotipo hipertrófico	10
A.1. Raza bovina Asturiana de los Valles y fenotipo hipertrófico muscular	10
A.2. Base genética de la hipertrofia muscular	13
A.3. Características de la miostatina	15
A.4. Regulación de la bioactividad en la familia de los TGFβ	17
A.5. Función y regulación de la miostatina	22
A.5.1. Diferenciación miogénica y formación del músculo esquelético	24
A.5.2. La miostatina durante la embriogénesis	26
A.5.3. La miostatina durante el período adulto	27
A.5.3.1. Pérdida de masa muscular	28
A.5.3.2. Lesión y regeneración muscular	29
A.5.3.3. Expectativas terapéuticas	31
A.5.4. Papel de la miostatina en el ciclo celular	32
B. Antecedentes de estrategias de transgénesis	36
B.1. Mutagénesis dirigida	37
B.2. Mutagénesis condicional	42
B.2.1. Expresión inducible	45
C. Mutaciones dominantes-negativas	47
C.1. TGFβs y miostatina	48
VI. JUSTIFICACIÓN	49
A. Miostatina activable condicionalmente	49
B. Miostatina dominante-negativa	50
VII. OBJETIVOS	51
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	52
A. Evaluación en células ES de un sistema de activación condicional de la miostatina	52
A.1. Diseño de un sistema "Mstn OFF to ON". Justificación	52
A.2. Antecedentes	52
A.2.1. Secuenciación y caracterización del gen de la miostatina a partir de clones genómicos de ratón y bovino en un vector lambda	52
A.3. Ingeniería genética de la miostatina para transgénesis por recombinación homóloga: creación de una construcción "Mstn OFF to ON"	55
A.3.1. Modificación del plásmido pNEB193 por mutagénesis dirigida	55
A.3.2. Clonado del gen de ratón fragmentado en pPonc1 y adición de genes de resistencia	58
A.3.2.1. Preparación del inserto genómico de ratón	59
A.3.2.2. Adaptadores utilizados en el clonado	59
A.3.2.3. Clonado de los fragmentos I, II y III en pPonc1	61
A.3.2.4. Modificación del fragmento III en pPonc3a: adición de los cassettes de expresión eucariota HSV-TK y Neomicin-transferasa (Neo ^R) flanqueado de dos loxP en 3' del exón III	62
A.3.3. Mutagénesis del tercer fragmento en pGEM [®] -11Zf(+) y ensamblaje en pPonc3j	63
A.3.3.1. Subclonado del fragmento NotI-XhoI de pPonc3j en pGEM [®] -11Zf(+) y mutagénesis de un loxP	63
A.3.3.2. Ligado de adaptadores y ensamblaje en pPonc3j	64
A.3.4. Unión final de todos los fragmentos	65
A.3.5. Comprobación por digestión y secuenciación	67
A.4. Ensayos preliminares	68
A.4.1. Ensayo con Cre-recombinasa purificada	68
A.4.2. Ensayo en bacterias MM294	73
A.5. Creación de una línea estable de células ES murinas "Mstn OFF to ON"	74
A.5.1. Establecimiento de una línea de células ES con la construcción pPonc123aak	74
A.5.1.1. Manipulación celular	74

A.5.1.1.1. Descripción de los protocolos de cultivo seguidos en células <i>feeder</i> (MEF)	74
A.5.1.1.2. Descripción de los protocolos de cultivos seguidos en células ES	75
A.5.1.2. Transfección de pPonc123aak en células ES	76
A.5.1.2.1. Selecciones positiva y negativa	76
A.5.1.2.2. Repicado de colonias ES	77
A.5.1.2.3. Congelación de placas réplica de ES	77
A.5.1.2.4. Extracción de ADN	77
A.5.1.2.5. Identificación por PCR de los recombinantes homólogos	77
A.5.1.2.6. Análisis por PCR de la integridad de la zona recombinada	77
A.5.1.2.7. Secuenciación de las regiones <i>lox</i> de los recombinantes homólogos	79
A.5.1.2.8. Verificación por Southern blot de los recombinantes homólogos	79
A.5.2. Eliminación del cassette de selección Neo ^r por recombinación mediante Cre	80
A.6. Agregación de un clon Neo ^s para la generación de quimeras	82
A.7. Ensayo de la eficacia de la inversión en células ES	83
A.7.1. Electroporación con pMC-Cre	83
A.7.2. Comprobación del clon 3c6E por PCR y secuenciación	83
A.8. Test de eficiencia en la acción del vector de expresión pMC-Cre	83
A.8.1. Creación de dos líneas estables pSVlacZT	84
A.8.2. Transfección transitoria de los clones/pSVlacZT con pMC-Cre	87
B. Evaluación de distintos alelos de la miostatina potencialmente dominante-negativos. Ensayos de interacción	87
B.1. <i>Pull-down</i>	87
B.1.1. Generación de las construcciones de <i>pull-down</i>	89
B.1.1.1. pRSET-A/mstn salvaje	91
B.1.1.2. pSG5PL/alelos mutados	91
B.1.2. Obtención de la proteína de fusión His-miostatina	95
B.1.3. Inmovilización de la proteína de fusión His-miostatina a una resina de agarosa	96
B.1.4. Expresión de las distintas construcciones en un lisado de reticulocitos	96
B.1.5. Ensayo de interacción (<i>pull-down</i>)	97
B.2. Ensayo de doble-híbrido en células mamíferas	97
B.2.1. Generación de las construcciones de doble híbrido	98
B.2.2. Transfección celular	100
IX. RESULTADOS	102
A. Evaluación en células ES de un sistema de activación condicional de la miostatina	102
A.1. Construcción de pPonc123aak	102
A.1.1. Secuenciación del <i>lox</i> mutagenizado en pGEMSTN3	102
A.1.2. Confirmación por PCR y digestión del ensamblado final de fragmentos (pPonc123aak)	102
A.1.3. Verificación del ensamblado de pPonc123aak por secuenciación	104
A.2. Ensayos preliminares	105
A.2.1. Ensayo con Cre-recombinasa purificada	105
A.2.2. Ensayo en bacterias MM294-Cre	106
A.3. Creación de una línea estable de células ES murinas “Mstn OFF to ON”	108
A.3.1. Establecimiento de una línea ES con la construcción pPonc123aak	108
A.3.2. Eliminación del cassette de selección Neo ^R por recombinación mediante Cre	109
A.4. Agregación del clon 3c6E a mórulas FVB	112
A.5. Ensayo de la eficacia de inversión en células ES	112
A.6. Test de eficiencia de la acción del vector de expresión pMC-Cre	113
A.6.1. Creación de dos líneas estables pSVlacZT	114
A.6.2. Transfección transitoria de los clones pSVlacZT con pMC-Cre	115
B. Evaluación de distintos alelos de la miostatina potencialmente dominantes-negativos. Ensayos de interacción	119
B.1. <i>Pull-down</i>	119
B.1.1. Construcciones de <i>pull-down</i>	119
B.1.2. Obtención de la proteína de fusión His-miostatina	120
B.1.3. Inmovilización de la proteína de fusión His-miostatina a una resina de agarosa	121
B.1.4. Expresión de las distintas construcciones en un lisado de reticulocitos	122

B.1.5. Ensayo de interacción	123
B.2. Ensayo de doble híbrido en células mamíferas	124
X. DISCUSIÓN	126
A. Evaluación en células ES de un sistema de activación condicional de la miostatina	126
A.1. Construcción de pPonc123aak	126
A.2. Ensayos preliminares	127
A.3. Creación de una línea estable de células ES "Mstn OFF to ON"	128
A.3.1. Establecimiento de una línea de células ES con la construcción pPonc123aak	128
A.3.2. Eliminación del cassette de selección Neo ^R por recombinación mediante Cre	129
A.4. Ensayo de la eficacia de la inversión en células ES	131
A.5. Evaluación de la eficiencia de la acción del vector de expresión pMC-Cre	132
A.6. Evaluación de las posibles causas de ausencia de recombinación en la línea "Mstn OFF to ON" ..	133
B. Evaluación de distintos alelos de la miostatina potencialmente dominantes-negativos	136
B.1. Construcción de una serie de alelos de la miostatina potencialmente dominantes negativos	136
B.2. Evaluación de la capacidad de interacción de distintos alelos de la miostatina potencialmente dominantes negativos	137
B.2.1. <i>Pull-down</i>	137
B.2.2. Ensayo de doble-híbrido en células mamíferas	139
B.2.3. Evaluación de los resultados obtenidos del <i>pull-down</i> y el sistema de doble híbrido	140
XI. CONCLUSIONES	142
XII. BIBLIOGRAFÍA	143
XIII. APÉNDICE DE CONSTRUCCIONES	162
XIV. APÉNDICE DE MARCADORES	166
XV. APÉNDICE DE REACTIVOS	167

Índice de figuras y tablas

Figuras

Figura 1: Raza Asturiana de los Valles	11
Figura 2: Estructura de la miostatina de ratón	17
Figura 3: Activación del complejo latente TGF β	20
Figura 4: Vía de señalización Miostatina-SMAD	22
Figura 5: Modelo del papel de la miostatina en el crecimiento muscular (según Thomas <i>et al.</i> (2000) y Langley <i>et al.</i> (2002))	34
Figura 6: Morfología de células ES	38
Figura 7: Estrategia de recombinación homóloga	40
Figura 8: Generación de quimeras trasmisoras en su línea germinal de una mutación dirigida	41
Figura 9: Estructura de la región <i>loxP</i>	43
Figura 10: Productos de la recombinación intra e intermolecular mediada por Cre.....	44
Figura 11: Secuencia de los <i>lox</i> mutantes <i>lox66</i> y <i>lox71</i>	53
Figura 12: Reacciones de integración e inversión utilizando <i>lox</i> mutados.....	53
Figura 13: Representación esquemática de la estrategia “Mstn OFF to ON”	54
Figura 14: Footprint filogenético de las secuencias bovina y murina del gen de la miostatina	55
Figura 15: Principio de mutagénesis dirigida.....	57
Figura 16: Tamaños de fragmento del inserto de ratón escindido con <i>Sall</i> tras digestión con <i>BssSI</i> y <i>Bsal</i> ..	59
Figura 17: Secuencia y características de los adaptadores “clásicos” (A) y con <i>loxP</i> o mutantes (B) utilizados	61
Figura 18: Representación esquemática de los plásmidos resultantes de la inserción de cada uno de los fragmentos de ratón I, II y III en pPonc1	62
Figura 19: Representación esquemática del plásmido pPonc3j.....	63
Figura 20: Representación esquemática del plásmido pGEMSTN3R66	64
Figura 21: Etapa de ligado de los adaptadores C y 6 al fragmento mutagenizado.....	64
Figura 22: Representación esquemática del plásmido pPonc3k	65
Figura 23: Esquemática de la unión de los fragmentos I y II dando lugar a pPonc12aa.....	66
Figura 24: Representación esquemática de los cebadores utilizados en la secuenciación de pPonc123aak	67
Figura 25: Construcción final pPonc123aak.....	68
Figura 26: Representación esquemática de pPonc123aak y pPonc123bbj.....	69
Figura 27: Representación esquemática de pPonc123-Neo ^S y pPonc2b3j-Neo ^S	71
Figura 28: Representación esquemática de los cebadores utilizados para la identificación de los plásmidos recombinantes	72
Figura 29: Estrategia de PCR para la detección de recombinantes homólogos	78
Figura 30: Representación esquemática de la posición de los cebadores utilizados para verificación de la integridad del transgén.....	78
Figura 31: Estrategia de Southern blot para la verificación de recombinantes homólogos.....	79
Figura 32: Representación esquemática de las distintas configuraciones posibles tras la actuación transitoria de la Cre-recombinasa	82
Figura 33: Representación esquemática de la disposición de los cebadores utilizados en la comprobación del clon 3c6E	84
Figura 34: Representación esquemática de pSVlacZT	85
Figura 35: Estrategia de Southern blot para la verificación de la integridad de la construcción pSVlacZT ...	87
Figura 36: Esquema de las mutaciones introducidas en la construcción ProteolyticSite	92
Figura 37: Esquema de los pasos seguidos en la realización de una PCR solapante (overlapping)	92
Figura 38: Esquema de las mutaciones introducidas en la construcción Stop	93
Figura 39: Esquema de la construcción C340	95
Figura 40: Esquema del funcionamiento del sistema de doble híbrido.....	98
Figura 41: Electroferograma de pGEMST3R66	102
Figura 42: Esquema de las PCRs utilizadas para la confirmación de pPonc123aak.....	103

<u>Figura 43:</u> Confirmación del ensamblado de pPonc123aak por PCR.....	103
<u>Figura 44:</u> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de pPonc123 aak.....	104
<u>Figura 45:</u> Electroferogramas de las secuencias de los <i>lox</i> mutados de pPonc123aak.....	104
<u>Figura 46:</u> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos tratados con Cre.....	106
<u>Figura 47:</u> Patrón diferencial de bandas en agarosa de las tres construcciones transformadas en MM294-Cre.....	107
<u>Figura 48:</u> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR identificativos de los recombinantes homólogos obtenidos.....	108
<u>Figura 49:</u> Electroforesis de las PCRs realizadas sobre los 9 posibles recombinantes homólogos, utilizando los propios adaptadores como cebadores.....	108
<u>Figura 50:</u> Imagen del Southern blot realizado con las 9 colonias positivas resultantes de la PCR-Long Range.....	109
<u>Figura 51:</u> PCR diagnóstica de la delección del cassette Neo ^R	110
<u>Figura 52:</u> Esquema de las distintas posibilidades de recombinación intercromatídica.....	111
<u>Figura 53:</u> Confirmación de la disposición del exón III.....	112
<u>Figura 54:</u> Secuencias de los <i>lox66</i> (A) y <i>lox71</i> (B) de 3c6E.....	113
<u>Figura 55:</u> PCRs de cuantificación del número de copias integradas de pSVlacZT.....	114
<u>Figura 56:</u> Southern blot de los clones en los que se ha integrado la construcción pSVlacZT.....	115
<u>Figura 57:</u> PCR diagnóstica de la recombinación Cre/ <i>lox</i> en las líneas pSVlacZT.....	116
<u>Figura 58:</u> Electroforesis de los productos de PCR de evaluación de la acción de la recombinasa en los alelos de miostatina floxados.....	117
<u>Figura 59:</u> Electroforesis de la PCR MM64/12UP realizada sobre los 188 clones de la línea 2.4 (3c6E) replicados individualmente.....	118
<u>Figura 60:</u> Electroferograma de pRSET/mstn.....	119
<u>Figura 61:</u> Electroferograma de pSG5PL/ProtSite.....	119
<u>Figura 62:</u> Electroferograma de pSG5PL/Stop.....	120
<u>Figura 63:</u> Electroferograma de pSG5PL/C340.....	120
<u>Figura 64:</u> Expresión de la proteína de fusión His-mstn.....	121
<u>Figura 65:</u> Inmovilización de la proteína de fusión miostatina-His a una resina de agarosa.....	122
<u>Figura 66:</u> Expresión en un lisado de reticulocitos de las distintas construcciones estudiadas.....	123
<u>Figura 67:</u> Interacción entre la miostatina-His y las distintas construcciones estudiadas.....	123
<u>Figura 68:</u> Interacción entre la miostatina salvaje y las distintas construcciones estudiadas en un sistema de doble híbrido en células CHO-K1.....	124
<u>Figura 69:</u> Comparación de la actividad de β -galactosidasa.....	125

Tablas

<u>Tabla I:</u> Cebadores y enzimas de restricción utilizados en la mutagénesis dirigida.....	58
<u>Tabla II:</u> Secuencia de los cebadores utilizados en las verificaciones por PCR o secuenciación de las distintas construcciones.....	59
<u>Tabla III:</u> Cebadores y enzimas de restricción utilizados en la mutagénesis dirigida (Chameleon TM) del <i>loxP</i> de pGEMSTN3.....	63
<u>Tabla IV:</u> Parejas de cebadores utilizados en el testado de la orientación del fragmento de 2'8 kb.....	65
<u>Tabla V:</u> Parejas de cebadores utilizados en la verificación de pPonc123aak.....	66
<u>Tabla VI:</u> Tamaños esperados de fragmento tras digestión de pPonc123aak.....	67
<u>Tabla VII:</u> Parejas de cebadores utilizados en la identificación de las reacciones recombinantes.....	72
<u>Tabla VIII:</u> Secuencia de los cebadores utilizados en el testado por PCR.....	72
<u>Tabla IX:</u> Tamaños esperados de fragmento tras digestión de pPonc123-Neo ^S y pPonc2b3j-Neo ^S con <i>EcoRI</i>	73
<u>Tabla X:</u> Cebadores utilizados en la verificación por PCR y en la creación de la sonda C1.....	80
<u>Tabla XI:</u> Secuencia de los cebadores utilizados en el testado por PCR y en la secuenciación del clon 3c6E.....	84

<u>Tabla XII</u> : Secuencia de los cebadores utilizados para evaluación por PCR del plásmido transfectado pSVlacZT y para la construcción de una sonda de Southern	85
<u>Tabla XIII</u> : Cebadores utilizados en las construcciones de <i>pull-down</i>	90
<u>Tabla XIV</u> : Cebadores utilizados en las construcciones de doble híbrido	99
<u>Tabla XV</u> : Cotransfecciones efectuadas en el ensayo de doble híbrido.....	101
<u>Tabla XVI</u> : Tamaños esperados de fragmento tras digestión de pPonc123aak.....	103
<u>Tabla XVII</u> : Porcentaje de clones recombinantes resultantes del tratamiento con Cre purificada	106
<u>Tabla XVIII</u> : Colonias resultantes de la transformación en MM294-Cre.....	107

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
 β -Gal - β -Galactosidasa
BHLH - basic Helix Loop Helix
cdk - ciclin dependent kinase
CHO - Chinese Hamster Ovary
cRACE - Rapid Amplification of cDNA Ends
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO - dimetil sulfóxido
dNTP - deoxinucleótido trifosfato
d.p.c. - días postcoito
EC - Embryonic Carcinoma
ES - Embryonic Stem
FBS - Fetal Bovine Serum
GDF - Growth and Differentiation Factor
HPRT - Hipoxantine-Phospho-ribosil Transferase
HSV-tk - Herpes Simplex Virus thimidine kinase
IPTG - Isopropil-tio-galactósido
kb - kilobase
kDa - kilodalton
LAP - Latency Associated Peptide
LB - medio Luria Bertani
LIF - Leukemia Inhibitory Factor
LTBP - Latent TGF β Binding Protein
MEF - Mouse Embryonic Fibroblasts
 μ g - microgramo
MHC - Myosin Heavy Chain
 μ l - microlitro
mM - milimolar
MRF - Myogenic Regulatory Factor
Mstn - Miostatina
NBT - nitro blue tetrazolium
ng - nanogramo
Ni-NTA - níquel-ácido nitriloacético
pb - par de bases
PBS - Phosphate-Buffered Saline
PCR - Polimerase Chain Reaction
pmol - picomol
Rb - Retinoblastoma
rpm - revoluciones por minuto
RT - Reverse Transcriptase
TGF β - Transforming Growth Factor β
TK - Thimidine-Kinase
V - voltio
X-Gal - X-5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN-ABSTRACT

RESUMEN

La miostatina es un miembro de la familia de los Factores de Crecimiento y Transformación (TGF β) responsable de la inhibición del desarrollo de la masa muscular. El ganado bovino con mutaciones inactivantes en la miostatina presenta un considerable aumento de su masa muscular conocido como hipertrofia muscular o cularidad. Este incremento muscular está acompañado de una disminución igualmente considerable de la cantidad de grasa que se traduce en un claro incremento del valor económico de sus canales.

El aumento del conocimiento de la estructura y función de la miostatina ha puesto en marcha el desarrollo de metodologías destinadas a manipular su funcionamiento o evitar los efectos indeseados asociados al fenotipo culón.

En la primera línea de investigación seguida en esta tesis se ha planteado crear un sistema que permita estudiar la reversibilidad del fenotipo hipertrófico a fenotipo normal. Para ello se ha realizado la construcción de un sistema "Mstn OFF to ON". En este sistema el tercer exón de la miostatina está en posición invertida pero es susceptible de volver a la posición permanentemente activa mediante el sistema Cre/lox, utilizando una variante de lox mutados. Este sistema se ha probado *in vitro* y en un sistema bacteriano, en los que se ha demostrado su capacidad de pasar de una configuración inactiva a una activa, manteniéndose además en este último estado. Por el contrario, cuando se realizó una integración estable por recombinación homóloga en células ES murinas, no se consiguió revertir a la configuración activa, probablemente debido a la utilización de un promotor demasiado débil para que la expresión de la Cre-recombinasa resultara adecuada ante los lox mutados utilizados. Aunque esta línea de investigación se ha interrumpido en este punto, estos resultados apuntan hacia la posibilidad de utilizar vectores de Cre más aptos para lograr la recombinación esperada entre lox mutados.

La segunda línea de estudio de esta tesis ha consistido en la creación y evaluación de distintos alelos de la miostatina potencialmente dominantes negativos. El fenotipo culón típico sólo se presenta en estado de homocigosis; por ello es indudable el interés zootécnico de obtener terneros heterocigotos culones en cruces industriales, así como la posible aplicación postnatal de estos alelos para eliminar los efectos perinatales asociados al fenotipo culón. Así, se han planteado tres alelos dominantes negativos potencialmente capaces de anular la función de la miostatina salvaje en su presencia. Estas tres variantes se han diseñado de modo que se impida su unión al receptor específico de membrana por impedimento estérico. Dado que esta estrategia de dominancia negativa depende básicamente de la capacidad de dimerización entre monómeros salvajes y monómeros mutantes se han realizado dos ensayos de interacción para confirmar que la unión entre monómeros no se ha visto alterada. Estos ensayos confirmaron que las tres variantes dominantes negativas diseñadas son perfectamente capaces de formar dímeros con los monómeros salvajes, y además, que esta unión no es significativamente diferente de la unión existente entre dos monómeros salvajes. Por lo tanto, los alelos diseñados cumplen el primer requisito imprescindible en una estrategia de dominancia negativa.

ABSTRACT

Myostatin is a member of the Transforming Growth Factor β (TGF β) family responsible for inhibition of muscular mass development. Cattle with mutations that inactivate myostatin exhibit a remarkable increase in skeletal muscle mass called muscle hypertrophy or double muscling. This muscle mass increase is accompanied by an equally remarkable decrease in carcass fat which leads to a clear increase of its economical value.

Increased knowledge of myostatin structure and function has triggered the development of methodologies to manipulate its function or circumvent negative effects associated to double-muscling phenotype.

The first research block of this thesis deals with the creation of a system which allows the study of hypertrophied phenotype to normal phenotype reversibility. For this purpose, the construction of a "Mstn OFF to ON" has been performed. In this system the third myostatin exon is in an inverted position but is susceptible of turning into a permanently active position with the help of Cre/lox system and a mutated lox variant. This system has been assayed both *in vitro* and in a bacterial system, where it has shown the ability to go from an inactive to an active configuration, keeping on the latter state. However, when it was permanently established by homologous recombination in murine ES cells, it was impossible to invert it to the active configuration, probably due to the use of a promoter too weak for achieving a proper Cre-recombinase expression when interacting with the chosen mutated lox. Although this research has been interrupted in this point, these results hint the possibility to use more suitable Cre vectors to get the awaited recombination between mutated lox.

The second research block of this thesis has consisted of the creation and testing of different potentially dominant negative myostatin alleles. The characteristic double-muscling phenotype is only exhibited in homozygosis; this makes comprehensible the great agricultural interest for producing double-muscling heterozygous calves and for the potential post-natal application of these alleles to avoid the calving difficulties associated to the double-muscling. So, three dominant negative alleles have been created, potentially able to invalidate the function of wild myostatin in its presence. These three variants have been designed so as to prevent the binding to the specific membrane receptor by steric hindrance. As this dominant negative strategy depends completely on the ability of mutant monomers to dimerize with wild monomers, two interaction assays have been performed to confirm that binding between monomers has not been altered. These assays confirmed that the three dominant negative designed variants are perfectly able to interact with wild monomers, and furthermore, there is no significant difference with the interaction between two wild type monomers. So, the designed alleles fulfil the first essential requirement in a dominant negative strategy.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA MIOSTATINA Y RELACIÓN CON EL FENOTIPO HIPERTRÓFICO

A.1. Raza bovina Asturiana de los Valles y fenotipo hipertrófico muscular

La Asturiana de los Valles, Carreñana o Asturiana Occidental, es una raza bovina autóctona española de aptitud carnífera, gran rusticidad, mansedumbre y buenas cualidades maternas que se explota en condiciones extensivas en la zona suroccidental de la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias, en el norte de España.

Estos animales presentan un buen rendimiento en sus canales, con un alto contenido de músculo (75'5%), poca grasa (entre un 6 y un 7'7%) y una relación músculo:hueso (4'3) comparable a la de las razas europeas de reconocida aptitud cárnica (Vallejo *et al.*, 1992). En España, un estudio comparativo junto a otras seis razas españolas, sitúa a la carne de Asturiana como la mejor valorada por el consumidor (Santolaria *et al.*, 1997).

De censos muy elevados en el siglo XIX, la introducción de razas europeas más especializadas marcó un descenso progresivo y generalizado en su número de efectivos durante todo el siglo XX en un rápido proceso de absorción. Sin embargo, a partir de los años 80 comenzó un tímido repunte en el número de individuos de la raza censados, tendencia que se fue confirmando poco a poco hasta hacerse muy evidente, de manera que hoy día se puede afirmar que la raza está en clara expansión no sólo en cuanto a número de efectivos, sino también en un sentido geográfico, ampliando su zona tradicional de distribución del suroccidente asturiano hacia el norte de la provincia de León, hacia Galicia y hacia Cantabria. El censo actual se estima en unas 44.000 reproductoras (www.invac.org/aseava/aseava.html).

La característica principal de la raza Asturiana de los Valles es la presencia de una variedad musculosa que constituye una expresión morfo-funcional derivada del fenómeno de la *cularidad*, propiedad que en genética bovina se define como una característica hereditaria de la especie, consistente en el desarrollo exagerado del sistema muscular, que confiere a los animales apariencia externa de cierta duplicidad corporal (figura 1).

Su aspecto musculoso se describe ya desde principios de siglo (Naredo y Bajo, 1916), característica que ofrece gran interés para la producción de carne, por lo que se perpetúa y expande a nivel general de la especie. Por otra parte, desde el punto de vista teórico-experimental, su naturaleza genética permite programas selectivos que mantengan y perfeccionen las ventajas y reduzcan o supriman los inconvenientes (Sánchez Belda, 1984).

El aumento del interés de los ganaderos por las cualidades económicas de la Asturiana de los Valles hizo que en los años 40 comenzaran a utilizarse en Asturias toros culones como sementales (Sopeña y Blanco, 1970) y llevó en 1967 a la producción de 40.000 terneros culones a partir del uso de inseminación artificial (López de Torre y Hernández, 1982).

El fenotipo culón o hipertrófico en las razas españolas no es exclusivo de la raza Asturiana de los Valles, se encuentra además en la Rubia Gallega y muy esporádicamente en la Asturiana de Montaña y en la Pirenaica; también se presenta en varias razas europeas (Blanco Azul Belga, Charolesa, Piamontesa, Limusina...), siendo en las razas Blanco Azul Belga y Piamontesa donde se observa la mayor incidencia del carácter (Arthur, 1995).



Figura 1: Raza Asturiana de los Valles. Individuo culón que muestra el típico desarrollo de la hipertrofia muscular.

Todas estas razas poseen una serie de características macroscópicas comunes (Vissac, 1972): el desarrollo hipertrófico muscular generalizado, que se traduce igualmente en un gradiente de hipertrofia antero-posterior a nivel del tronco y proximal-distal a nivel de las extremidades. Esto conlleva una desproporción entre las dimensiones del canal pélvico y el volumen del feto, lo que dificulta los partos de los animales culones. Otra característica es la reducción del tamaño de los órganos internos, además aparece un retraso neto de la madurez sexual y una disminución de la aptitud maternal en las hembras (Vissac, 1972; Ménissier, 1982a).

Estas desventajas están atenuadas en Asturiana de los Valles, donde a pesar de que las dificultades al parto son mayores cuando una vaca fenotípicamente normal pare un ternero culón, sin embargo, las vacas culonas no presentan más dificultad al parto que las normales (Cañón *et al.*, 1996). De hecho, se observan cerca de un 90% de partos fáciles y sólo un 2'5% de cesáreas (Cañón *et al.*, 1996; www.invac.org/aseava/aseava.html). Además, esta raza es conocida por sus buenas cualidades maternales, frente a otras razas portadoras del carácter culón (Ménissier, 1982b).

En cuanto a la naturaleza de la hipertrofia, se observa que los músculos de estos animales presentan un mayor número de fibras, siendo este fenotipo realmente una hiperplasia más que una hipertrofia (Hanset *et al.*, 1982). También en fetos culones se ha observado un mayor número de fibras musculares con respecto a los fetos normales (Dumont, 1982). Dicha hiperplasia afecta particularmente a la proporción de fibras blancas tipo IIb (o fibras rápidas de metabolismo glicolítico), frente a las rojas tipo I (o fibras lentas oxidativas). Las fibras rápidas tipo IIb se caracterizan por su menor contenido en mioglobina, lo que confiere a esta carne su característico color rosa pálido (Vissac, 1972; Sañudo *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2001).

Otra característica de la hipertrofia es el menor porcentaje de grasa de sus canales debido a que sus depósitos de grasa son más pequeños siendo esto resultado de una reducción del volumen de las células lipídicas más que de una disminución en el número de células (Bailey *et al.*, 1982). Así, en Asturiana de los Valles se ha observado, al estudiar un corte del músculo *Longissimus dorsi*, un 1'32% de grasa intramuscular, el menor porcentaje medido entre otras seis razas españolas evaluadas. Además, esta carne destacó por su elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados, lo que le aporta ventajas adicionales dada la repercusión de estos componentes en determinados problemas de la salud humana (Sañudo *et al.*, 1999).

Por otro lado, estos animales presentan un bajo contenido en colágeno, como se desprende de su bajo contenido en hidroxiprolina, un buen indicador de la cantidad de colágeno en el músculo (Boccard, 1982). En la raza Charolesa se han observado valores de contenido total de colágeno intramuscular en individuos culones de hasta la mitad de los medidos en los animales control, siendo éste además un colágeno menos maduro, con menor proporción de uniones aminoácidas termoestables, lo que origina una trama conjuntiva menos densa, característica relacionada con la mayor ternera de la carne (Bailey *et al.*, 1982). De hecho, la raza Asturiana presenta una baja resistencia al corte en estudios con carne madurada a los siete días (Sañudo *et al.*, 1999), y en las comparaciones entre individuos culones homocigotos e individuos heterocigotos se ha observado que la ternera es significativamente mayor en los individuos homocigotos (Sañudo *et al.*, 1998).

En cuanto a las características de las canales de los individuos culones de Asturiana de los Valles hay que destacar que estos animales poseen un rendimiento del 63'4% (frente a un 57'6% de los animales normales) y unos porcentajes de músculo, hueso y grasa del 82'7, 14'4 y 2'7% respectivamente, que determinan una relación músculo:hueso de 5'8 (frente a unos valores respectivos del 75'5, 17'7 y 6'6% en los individuos normales) (Vallejo *et al.*, 1992). Todo esto hace de los individuos culones de esta raza aptos competidores frente a otras razas cárnicas europeas.

Estas razones motivan que en la raza Asturiana de los Valles exista una clara tendencia hacia la selección de dicho carácter dado que los individuos con hipertrofia muscular presentan un incremento de entre el 30 y el 45% en valor carnicero (Cañón *et al.*, 1996), correspondiendo la mayor parte de tal incremento al *Longissimus dorsi* y músculos de la pierna, es decir, a las zonas productoras de carne de superior categoría (Sopeña y Blanco, 1970).

A.2. Base genética de la hipertrofia muscular

El carácter hereditario del fenotipo hipertrófico muscular característico de la raza bovina Asturiana de los Valles está establecido desde principios del siglo XX, tanto en la propia raza Asturiana (Lavín, 1964; Sopeña y Blanco, 1970), como en otras razas europeas (Ménissier, 1982b) y se ha seleccionado a favor durante varios años gracias al empleo masivo de la inseminación artificial y a la amplia demanda de los ganaderos de sementales portadores del carácter (Sánchez, 1984).

Este fenotipo es macroscópicamente muy semejante al observado en la raza Blanco Azul Belga, aunque ligeramente menos pronunciado. Estos animales también poseen menos hueso, menos grasa y un 20% más de músculo que la media, acompañado de una disminución en la masa de otros órganos internos (Hanset *et al.*, 1982).

Hanset & Michaux (1985a y b) se basaron en análisis de segregación obtenidos a partir tanto de datos experimentales como de poblaciones abiertas de Blanca Azul Belga en los que se utilizaban medidas de muscularidad cuantitativamente objetivas (peso total de músculo, concentración plasmática de creatinina, concentración eritrocítica de creatina...), para postular la existencia de un gen mayor autosómico (al que definieron como *mh* -muscular hypertrophy-) responsable de la determinación genética de la hipertrofia muscular. Dicho gen se comportaría como un gen parcialmente recesivo ya que se observa cierto efecto cuando hay una sola copia del alelo, aunque el fenotipo típico hipermusculado requiere la presencia de ambos alelos.

Dicha hipótesis fue confirmada mediante análisis de ligamiento por Charlier *et al.* (1995) al posicionar el locus *mh* a 3'1 cM del microsatélite TGLA44 en el extremo centromérico del cromosoma 2 bovino.

Mediante análisis de ligamiento, Dunner *et al.* (1997) demostraron que el locus *mh* responsable de la hipertrofia muscular en la raza Blanca Azul Belga lo era también en Asturiana de los Valles, sugiriendo una homogeneidad genética de dicho carácter en ambas razas.

En 1997, Mc Pherron *et al.* identificaron en ratón, mediante PCR degenerativa, un nuevo miembro de la superfamilia de los TGF β : GDF-8 (Growth/Differentiation Factor-8). Esta proteína se expresaba en músculo esquelético embrionario y adulto, y los ratones homocigotos para la mutación nula en dicho gen (ratones "knock-out") presentaban un evidente aumento en la masa muscular, resultado de una combinación de hiperplasia e hipertrofia de las células musculares; se observó además que los músculos de los ratones knock-out pesaban de dos a tres veces más que los de los homocigotos normales.

Dada la especificidad tisular de expresión y el fenotipo del ratón knock-out, dicha proteína pasó a denominarse miostatina.

La semejanza fenotípica entre el ratón knock-out para la miostatina y el ganado bovino con hipertrofia muscular permitió a Grobet *et al.* (1997) demostrar la identidad entre el gen de la miostatina y el gen *mh* utilizando dicho gen como candidato posicional.

La comparación de la secuencia de ambos genes (de ratón y bovino) mostró una equivalencia del 89'1% sobre 1128 nucleótidos en la secuencia codificante, y una identidad del 92'5% sobre un solapamiento de 375 aminoácidos.

La secuencia nucleotídica del alelo *mh* bovino resultó ser idéntica a la del alelo salvaje, excepto en una deleción de 11 pb entre los nucleótidos 821 y 831 (contando a partir del codon de iniciación). Esta deleción en el marco de lectura, aparecida tras el primer residuo de cisteína del dominio C-terminal, interrumpe drásticamente la secuencia aminoacídica y conlleva la aparición prematura de un codon "stop" 14 aminoácidos tras la deleción. De este modo, esta mutación elimina virtualmente la parte bioactiva de la molécula.

Grobet *et al.* (1997) encontraron una correspondencia total entre fenotipo y genotipo para todo el pedigrí al genotipar la población experimental utilizada en el mapeo posicional del gen *mh* (Charlier *et al.*, 1995): todos los machos culones de Blanco Azul Belga resultaron homocigotos para la deleción y todas las hembras resultaron heterocigotas; igualmente encontraron los dos alelos normales en los individuos testados de dos razas lecheras (Frisona y Jersey), y paralelamente encontraron la deleción en homocigosis en todos los individuos hipertróficos testados de Blanco Azul Belga y Asturiana de los Valles, demostrando la homogeneidad alélica de ambas razas.

Tras la determinación de la secuencia codificante en otras razas bovinas europeas portadoras del carácter culón (Grobet *et al.*, 1998; Cappuccio *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2001), dicha homogeneidad alélica se demostró no ser compartida con otras razas (Maine-Anjou, Charolesa, Piamontesa, Marchigiana...) al caracterizarse una serie de mutaciones de distinta naturaleza (deleciones, transiciones o transversiones) que interrumpirían la función de la proteína originando el fenotipo *mh*.

En ratones también se describió una mutación natural (compact, "Cmpt) que ocasionaba una hiper muscularidad patente (Szabó *et al.*, 1998), y que resultó deberse a una deleción de 12 pb en la región N-terminal de la miostatina, lo que acarrea la pérdida de 4 aminoácidos distorsionando la estructura tridimensional de la zona e interfiriendo probablemente con el plegamiento y la regulación de la proteína.

Por otro lado, los fenotipos de los individuos hipertróficos del ganado bovino y de ratón no son idénticos: en el ganado bovino culón, además de un aumento de la masa muscular, hay una disminución del peso de la piel, tejidos adiposo y óseo, tracto alimentario y la mayoría de los órganos internos. En los ratones knock-out también se observa una disminución de los depósitos de grasa (McPherro & Lee, 2002) aunque en las regiones del hueso donde se inserta el músculo se ha observado un aumento de la masa ósea (Hamrick *et al.*, 2002). Además, la elevada musculatura del ganado culón es resultado básicamente de una hiperplasia de las fibras musculares, mientras que en los ratones knock-out se observa tanto una hipertrofia como una hiperplasia (Hanset *et al.*, 1982; McPherron *et al.*, 1997). Estas diferencias entre el fenotipo bovino y el de ratón podrían ser atribuibles a genes adicionales seleccionados a favor durante los cruces de las razas bovinas culonas (Kambadur *et al.*, 1997).

La expresión de la miostatina se ha detectado desde los 9'5 d.p.c. (Mc Pherron *et al.*, 1997) en ratón, desde los 15 d.p.c. en bovino normal y a partir de los 50 d.p.c. (no hay datos anteriores) en bovino hipertrófico (Kambadur *et al.*, 1997). Este ARNm se ha

detectado como un producto de 2'9 kb (tamaño coherente con la secuencia transcrita) en el estado adulto de animales tanto hipertróficos como normales, lo que afianza la idea de que las anomalías se producen a nivel proteico y no a nivel del ARNm. Además, Sharma *et al.* (1999) sólo detectaron la presencia de la proteína mediante Western blot en tejido muscular esquelético y cardíaco de animales normales, mientras que en músculo esquelético de animales hipertróficos no se obtuvo ninguna señal.

El aislamiento del gen y la proteína y la evidencia definitiva de la relación entre miostatina mutante y fenotipo culón ha tenido un efecto más amplio que el de la simple caracterización del origen de la hiperplasia muscular: además ha permitido abandonar la selección subjetiva de individuos por simple observación física, para genotiparlos directamente y diferenciar los individuos con una copia de la miostatina disfuncional de los individuos homocigotos para dicho carácter (Arnold *et al.*, 2001).

A.3. Características de la miostatina

La miostatina es un miembro de la superfamilia de los TGF β (Transforming Growth Factor β), denominada así originalmente por la capacidad de los primeros miembros descritos en dicho grupo de producir fenotipos transformantes en cierto cultivos celulares, y por su papel en la regulación de la proliferación de distintas líneas celulares. Esta superfamilia comprende varias proteínas multifuncionales de señalización célula-célula cuyo papel es esencial en la regulación de procesos de diferenciación celular durante el desarrollo embrionario y en la homeostasis tisular, habiéndose observado su capacidad de inhibición del crecimiento y transformación celulares (Hsuan, 1989; McPherron & Lee, 1996). En concreto, la miostatina es un GDF (Growth/Differentiation Factor), que son factores de crecimiento y diferenciación esenciales en la regulación del destino y comportamiento de distintos tejidos durante la embriogénesis. McPherron *et al.* (1997) no ubican a esta proteína en ninguna de las subfamilias conocidas y sólo la relacionan con Vgr-1 (BMP-6), en cuanto a su mayor homología aminoacídica entre la primera cisteína conservada y el final de la cadena C-terminal (45%); Massagué (1998) la clasifica en un grupo de miembros intermedios en cuanto a la homología de su secuencia activa, junto a GDF-9, Nodal y Dorsalina; sin embargo, estas moléculas carecen de alguna de las 9 cisteínas del patrón característico de la miostatina. Finalmente, el TGF β más semejante en estructura primaria a la miostatina es el GDF-11 o BMP-11 (Gamer *et al.*, 1999; McPherron *et al.*, 1999; Nakashima *et al.*, 1999), factor descubierto posteriormente a la miostatina y que se expresa en embrión en el tejido nervioso dorsal, en las extremidades y la cola, y en el adulto en la pulpa dental y cerebro. Con este factor existe una identidad aminoacídica en su región C-terminal del 90%.

El gen de la miostatina de ratón se compone de tres exones de 500, 374 y 1829 pb respectivamente. Se detectan un punto de inicio de la transcripción y dos de poliadenilación, observándose el ARNm más largo como el más abundante entre el ARN total extraído de músculo (Royo, 2002). En total, el gen posee una longitud, entre la primera y última base transcritas, de 6438 pb para el punto de poliadenilación más alejado, y el transcrito predicho sería de 2703 pb, con lo que el ARNm resultante oscilaría

alrededor de las 2'9 kb estimadas por McPherron *et al.* (1997). En bovino, en cambio, según los autores aparece un solo sitio de inicio de la transcripción (Jeanplong *et al.*, 2001) o dos (Royo, 2002) y en cuanto a la región 3' no traducida, se observan tres sitios distintos de poliadenilación (Jeanplong *et al.*, 2001; Royo, 2002). En humano, Gonzalez-Cadavid *et al.* (1998) también describen un gen con tres exones y dos intrones, y con tres sitios putativos de inicio de la transcripción que daría lugar a un ARNm de 3'1 kb.

La región situada inmediatamente en 5' del exón I, con un alto grado de conservación en su secuencia entre bovino y ratón, hace pensar que se trata de la región promotora, lo que se confirmó al identificarse en dicha región las secuencias correspondientes a una TATA-box y una CAAT-box conservadas entre la secuencia bovina y de ratón (Royo, 2002).

En esta zona 5' no transcrita, Ferrell *et al.*, (1999) utilizaron la base de datos TRANSFAC (Heinemeyer *et al.* 1999) para localizar en la especie humana un punto (en el nucleótido -185) de unión a MyoD, un regulador transcripcional implicado en la determinación de las células musculares. También Spiller *et al.* (2002) observaron la existencia de una secuencia de unión a factores de transcripción bHLH en el promotor de bovino, demostrando su capacidad de unión a MyoD *in vivo* e *in vitro*. Por su parte Ma *et al.* (2001) localizaron en la misma región dos elementos de unión a factores MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2), factores de transcripción implicados en el desarrollo de la miogénesis. Estos mismos autores también encontraron cinco secuencias correspondientes a elementos de respuesta a glucocorticoides, demostrando de hecho el incremento de la expresión de miostatina provocado por la dexametasona en un cultivo celular.

El gen de la miostatina da lugar a una pre-pro-proteína de 375 aminoácidos en bovino, pollo y humano, y 376 en ratón y rata (McPherron & Lee, 1997). En especies de peces como el besugo o el pez gato, esta proteína llega a los 385 y 389 aminoácidos respectivamente (Kocabas *et al.*, 2002).

Esta proteína comparte varias características en su estructura primaria con otros miembros de los TGF β , y particularmente con TGF β -1, de lo que puede suponerse una estructura y un procesamiento semejantes: posee una secuencia hidrofóbica en el extremo de la región aminoterminal que actúa como señal de secreción, y una secuencia de procesamiento proteolítico (RSRR) tras la cual se digeriría la proteína con ayuda de una endoproteasa, dando lugar a un dominio carboxi-terminal biológicamente activo y unido no covalentemente al dominio aminoterminal o péptido latente (LAP: latency-associated peptide). La figura 2 representa la estructura de la proteína.

El método desarrollado por Nielsen *et al.* (1997) predice una secuencia de 24 residuos en ratón que actuaría como péptido señal. El fragmento activo carboxi-terminal resultante de la escisión del péptido señal y la posterior proteólisis del péptido latente posee 109 aminoácidos. Esta región activa es idéntica en humano, ratón, rata y cerdo, y contiene sólo dos aminoácidos de diferencia con la misma región en bovino (McPherron & Lee, 1997).

La región bioactiva se expresa a partir del tercer exón y se caracteriza por tener 9 residuos de cisteína dispuestos según un patrón conservado y característico, e involucrados probablemente en la creación de puentes disulfuro intramoleculares (por similitud con TGF- β 1 se formarían entre las cisteínas C6-C16, C15-C74, C43-C106 y

C47-C108) e intermoleculares (C73-C73') que permiten, como en otros miembros de los TGF β , la formación de homodímeros, que es la forma bajo la cual la miostatina tiene actividad biológica (Hinck *et al.*, 1996; McPherron *et al.*, 1997). Finalmente, la miostatina de ratón posee un punto (dos en bovino) de N-glicosilación potencial en el péptido latente (Asn 72) (Royo, 2002).

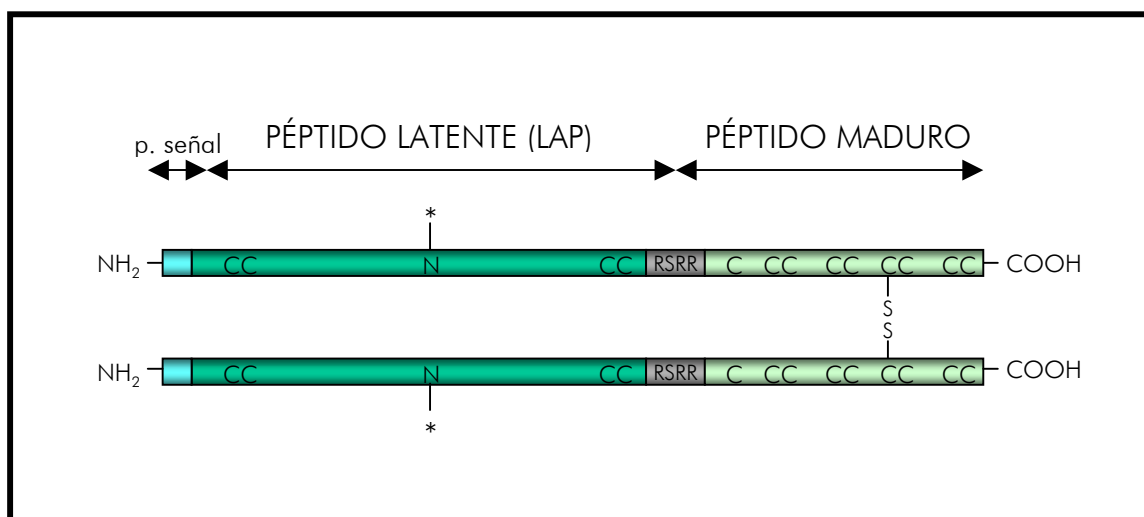


Figura 2: Estructura de la miostatina de ratón. Representación esquemática de la miostatina deducida a partir de la de TGF β -1 en la que se observan las tres regiones en las que se divide la proteína. El asterisco representa el hipotético residuo glicosilado. Las "C" corresponden a los residuos de cisteína y "RSRR" a la diana de proteólisis.

A.4. Regulación de la bioactividad en la familia de los TGF β

El control de la bioactividad en la familia de los TGF β comienza en el propio retículo endoplásmico donde el péptido señal es eliminado, la pro-proteína se glicosila en un residuo de asparagina del dominio del péptido latente y luego establece dímeros por medio de un puente disulfuro entre las dos cisteínas conservadas en la sexta posición de la región C-terminal. Esta pro-proteína modificada pasa al aparato de Golgi donde es procesada por una endoproteasa (furina en el caso de TGF β -1 -Dubois *et al.*, 1995- y también en el caso de la miostatina - Jin *et al.*, 2004-), dando lugar a un dominio activo (el dímero carboxi-terminal) y a un precursor N-terminal remanente: el péptido latente. Dicho péptido latente permanece unido al dominio activo no covalentemente evitando la unión del TGF β a su receptor (Piek *et al.*, 1999).

El trabajo realizado por Zhu *et al.* (2000) muestra la importancia de la regulación ejercida en este punto específicamente en la miostatina. Este equipo creó una miostatina

dominante-negativa mutagenizando su diana de proteólisis de manera que el dominio carboxi-terminal (péptido maduro) no pudiera separarse del dominio amino-terminal. Este alelo coexistía en la célula con el alelo normal de la miostatina. De este modo, los dímeros de miostatina que llevaban al menos un monómero dominante-negativo no podían unirse al receptor y por tanto, no podían ejercer su función. Como consecuencia de esto, en los ratones transgénicos para este alelo sin diana de proteólisis se produjo un notable incremento de la masa muscular debido a una hipertrofia de las fibras musculares. Por otro lado, Huet *et al.* (2001) demostraron que en cultivos de mioblastos tratados con HIMPs (inhibidores de metaloproteasas) no se llevaba a cabo la proteólisis de la miostatina y se producía un aumento en la fusión de mioblastos, provocando una hipertrofia de los miotubos. Ambos resultados señalan que la proteólisis de la miostatina para liberar el péptido activo es vital para su correcta función.

En el aparato de Golgi, el péptido latente interactúa covalentemente por medio de un puente disulfuro con las proteínas latentes de unión a los TGF β (LTBPs: latent TGF β binding proteins) formando complejos de gran tamaño. A estos complejos (formados por la parte carboxi-terminal bioactiva, unida no covalentemente al péptido latente, unido a su vez a las LTBPs) se les llama también complejos TGF β latentes y son mucho más estables que la molécula bioactiva de los TGF β . Las LTBPs son glicoproteínas con un dominio estructural muy semejante al de las fibrillinas (constituyentes principales de las microfibrillas del tejido conectivo) cuya función es la de potenciar la secreción y estabilidad de los complejos TGF β -LAP, asegurar el correcto plegamiento de los TGF β y dirigir el complejo latente hacia la matriz extracelular de ciertas células y tejidos para su almacenamiento o hacia la superficie celular donde tiene lugar la activación (Taipale *et al.*, 1996; Piek *et al.*, 1999). Entre las funciones principales de la asociación entre factores de crecimiento y las fibras de la matriz extracelular se encuentra la de disminuir la pérdida de información mediante la creación de "gradientes" dirigidos en la propia matriz extracelular, y la de mantener una cierta "memoria" de transmisión de señales; pero probablemente la función más importante sea la de permitir el almacenamiento de grandes cantidades de moléculas señaladoras bajo una forma fácilmente activable, permitiendo la señalización extracelular en ausencia de nueva síntesis proteica (Gleizes *et al.*, 1997; Taipale & Keski-Oja, 1997).

Nicholas *et al.* (2002) encontraron una proteína, Titin-cap o teletonina, que parece regular la secreción de la miostatina en este punto: su unión a la miostatina tras el procesamiento proteolítico (en el aparato de Golgi o en el citoplasma) provoca la inhibición de la secreción de la miostatina al espacio extracelular, probablemente por inhibición de la formación del complejo latente, lo que en un cultivo de mioblastos que sobreexpresaban T-cap, se traducía en un significativo aumento de la tasa de proliferación.

Otra proteína que probablemente ejerza una regulación en la secreción de la miostatina es la hSGT (human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein), una proteína con funciones de chaperona involucrada en el plegamiento proteico. Wang *et al.* (2003) demostraron que se unía a la miostatina mediante el péptido señal de ésta, lo que les hizo sugerir que hSGT podría estar relacionada en la regulación de la secreción y activación de la miostatina.

En relación a este punto, diversos estudios han dado lugar a un posible modelo de regulación de la actividad de la miostatina, en el que tras su procesamiento proteolítico, el dímero carboxi-terminal se mantiene en forma de complejo latente con su péptido amino-terminal y quizá otras proteínas. Diversas publicaciones proponen diferentes proteínas como probables responsables de mantener este estado de latencia: la folistatina, que se une al dímero carboxi-terminal inhibiendo su capacidad de unión al receptor (Lee & McPherron, 2001); FLRG -folistatin related gene-, una proteína relacionada con la folistatina que Hill *et al.* (2002) demuestran que se une al complejo latente de la miostatina en el suero de ratón y de la especie humana provocando una inhibición de la miostatina; o GASP-1 (growth and differentiation factor-associated serum protein-1), proteína inhibidora de la miostatina que también se une tanto al dominio carboxi-terminal, como al amino-terminal (Hill *et al.*, 2003).

Una vez secretados, el control de la actividad de los factores de crecimiento en la superficie celular se divide en dos mecanismos bioquímicos distintos pero interconectados: la liberación de la matriz extracelular y la activación del complejo latente. La liberación supone una disociación del factor de crecimiento de sus puntos de unión a la matriz extracelular, provocando la formación de un "pool" soluble del factor; esta disociación se produce por múltiples proteinasas de la familia de las serín-proteasas como la plasmina, quimasa de mastocitos o la elastasa leucocitaria. Esta proteólisis supone el truncamiento de las LTBP_s, lo que a su vez expone nuevas regiones del LAP, que pasaría a estar disponible para unirse a la superficie celular mediante la unión del péptido latente a receptores manosa-6-fosfato, parece que como medio para concentrar los complejos TGF β latentes en una zona donde serán proteolizados. El complejo latente TGF β liberado estaría aún bajo forma inactiva, y su activación en TGF β biológicamente activo consiste en la liberación del dímero carboxi-terminal gracias a proteasas como la plasmina o la catepsina y otras proteinasas, que digieren el péptido latente (Dennis & Rifkin, 1991; Gleizes *et al.*, 1997; Piek *et al.*, 1999). Wolfman *et al.* (2003) descubrieron que sólo cuando el fragmento aminoterminal (péptido latente) de la miostatina era digerido (por proteinasas de la familia BMP1-TLD) en el residuo Asp76, el dímero activo de la miostatina abandonaba el estado latente pudiendo entonces realizar su función normalmente. La activación del complejo latente se representa en la figura 3.

Una vez que el péptido activo se ha liberado, se produce su unión con los receptores de TGF β específicos. Los miembros de la superfamilia de los TGF β dirigen su señal desde el espacio extracelular hacia el núcleo a través de una familia de receptores transmembrana de tipo serín/treonín-quinasas. Estos receptores son glicoproteínas con un dominio extracelular rico en cisteínas, un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio intracelular con actividad serín/treonín-quinasa. Se dividen principalmente en dos subfamilias: los receptores tipo II (a los que se unirían los TGF β) y los receptores tipo I (que continúan la señal hacia el núcleo). También existen unos receptores tipo III, aunque no aparecen en todos los tipos celulares en los que se observa la presencia de receptores tipo II y I) y cuya función sería la de presentar el TGF β ante el receptor tipo II (Datto *et al.*, 1996). En el caso particular de la miostatina, Lee y McPherron (2001) demostraron que los receptores de activina tipo II (particularmente los de tipo IIB) están involucrados en la señalización de la miostatina: *in vitro*, la unión de la miostatina a los receptores de activina tipo II era específica y saturable, y los ratones transgénicos con una elevada

expresión en músculo de una forma dominante-negativa del receptor de activina tipo II mostraban un claro aumento de la masa muscular. Además demostraron que el propéptido de la miostatina inhibía la unión del péptido bioactivo al receptor de activina tipo II bloqueando su acción inhibitoria en el crecimiento muscular *in vivo*, lo que prueba la función de latencia o inhibición del propéptido en el mecanismo de acción de la miostatina.

La unión del TGF β a su receptor de membrana tipo II, induce la formación de un complejo con el receptor tipo I. Dada la naturaleza dimérica de los ligandos, cada monómero contactará probablemente con un receptor tipo I y un receptor tipo II, generando así un complejo de receptor heterotetramérico. La formación de este complejo conduce rápidamente a la fosforilación del receptor tipo I, catalizada por el dominio quinasa del receptor tipo II (Massagué, 1998).

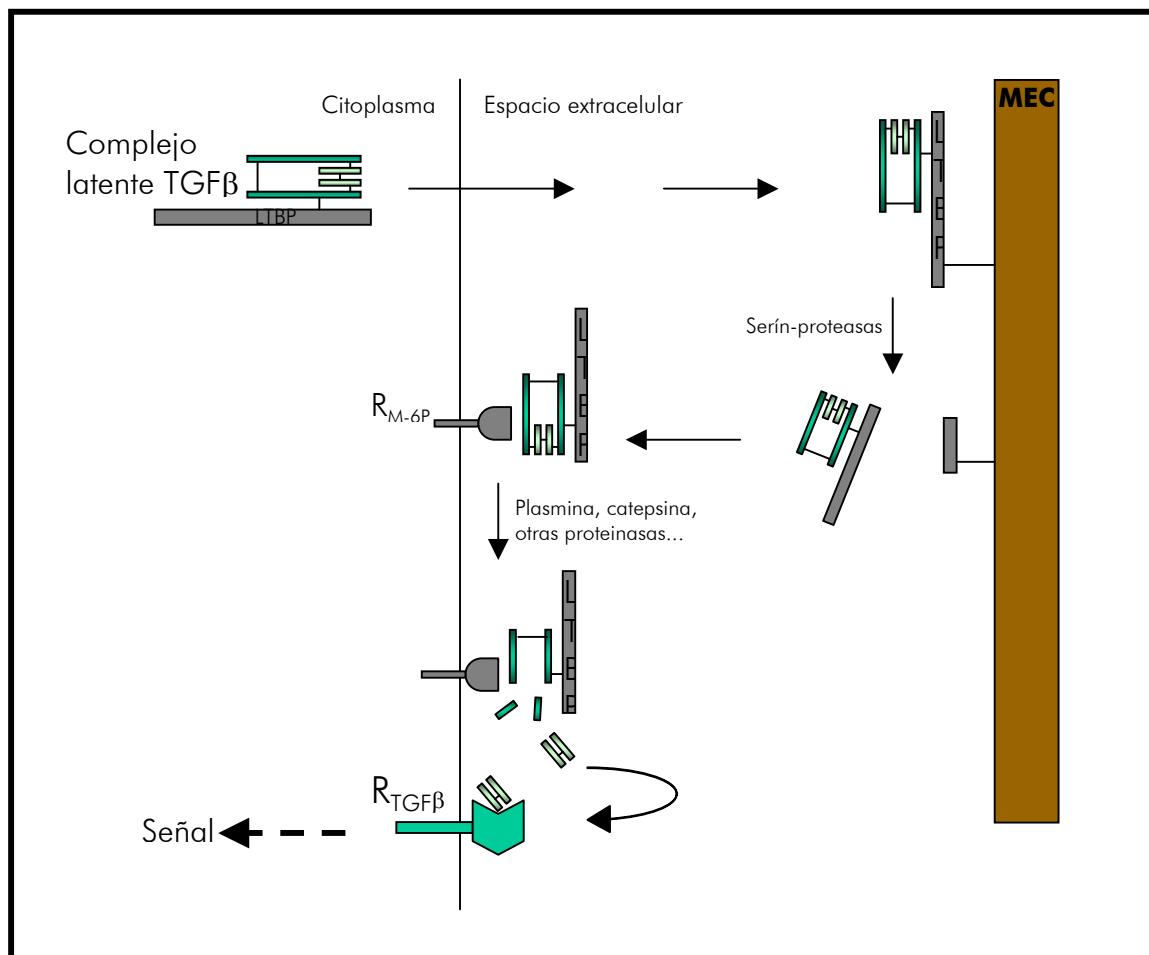


Figura 3: Activación del complejo latente TGF β . Una vez secretado al espacio extracelular, el complejo latente se asocia a la matriz extracelular de la que se libera por proteólisis. Tras esta liberación se produce la unión del péptido latente a receptores manosa-6-fosfato de la superficie celular, donde se produce la activación del complejo latente a través de proteasas como la plasmina o la catepsina, que digieren el LAP liberando así el

dímero carboxi-terminal activo. MEC: matriz extracelular. R_{M-6P}: receptor manosa-6-fosfato. R_{TGFβ}: receptor Ser/Thr-kinasa para TGFβs. Las barras en verde claro representan el dímero carboxi-terminal, las barras en verde oscuro el péptido latente (LAP) y el LTBP (Latent TGFβ binding protein) está representado por una barra gris.

Las proteínas de la familia de factores de transcripción SMAD son los primeros sustratos de los receptores tipo I. Este receptor se encarga de la fosforilación de proteínas SMAD específicas en una cadena que acabará en el núcleo, donde tiene lugar el efecto final de los TGFβ. Las SMADs son proteínas citoplasmáticas con un dominio carboxi-terminal y un dominio amino-terminal altamente conservados y separados por una región de unión de secuencia y longitud variables; en estado basal se asocian en homo-oligómeros y permanecen en estado inactivo hasta que son serín-fosforiladas en su dominio carboxi-terminal. La primera proteína que el receptor tipo I fosforila es una SMAD regulada por receptor (o R-Smad; en vertebrados se han descrito las Smads 2 y 3, reconocidas por los receptores de TGFβ, activinas y nodal, y Smads 1, 5 y 8, que son reconocidas por los receptores de BMPs y GDFs), permitiéndole entonces asociarse a una co-SMAD (Smad-4 en vertebrados) en el citoplasma, y trasladándose este complejo al núcleo donde actúan activando la transcripción de diversos genes con o sin la colaboración de moléculas de unión al ADN (Massagué, 1998; Massagué & Chen, 2000). Bogdanovich *et al.* (2002) observaron que las células C2C12 tratadas con anticuerpos antimiostatina presentaban una disminución en sus niveles de Smad-2 y 3 fosforilados, lo que aporta una evidencia de que estas proteínas se encuentran en la vía de señalización de la miostatina. Más tarde, Rebbapragada *et al.* (2003) caracterizaron la vía de transducción de la señal de la miostatina demostrando (como Lee y McPherron, 2001) que la miostatina se une al receptor Ser/Thr-kinasa tipo II ActRIIB, el cual interactúa con los receptores tipo I Alk4 o Alk5 para inducir la fosforilación de Smad2/Smad3 y activar así la vía de señalización de la miostatina. La representación de la vía de señalización de la miostatina, según estos datos y por analogía con el resto de TGFβs, se esquematiza en la figura 4.

La respuesta celular a un factor TGFβ puede estar determinada no sólo por los receptores y las isoformas de proteínas SMADs presentes en la célula, sino también por el repertorio disponible de las moléculas de asociación al ADN. Además esta respuesta estará regulada por moduladores de la unión del ligando, actividad del receptor, actividad de las SMADs o la localización nuclear (Massagué, 1998).

Por su parte, Artaza *et al.* (2002) observaron la localización de la miostatina predominantemente en el núcleo de miotubos sugiriendo que esta proteína pudiera tener un papel en la regulación de la transcripción de genes implicados en la replicación y/o diferenciación de las células musculares. También observaron que a concentraciones altas la miostatina se transfería al citoplasma desde donde se secretaría al medio. En cambio, Kirk *et al.* (2000) sólo encontraron miostatina en el citoplasma de las fibras musculares de rata.

Finalmente, se ha observado que la miostatina también circula en el torrente sanguíneo en forma latente (González-Cadavid *et al.*, 1998; Zimmers *et al.*, 2002) lo que supone una evidencia de la regulación endocrina ejercida por esta proteína.

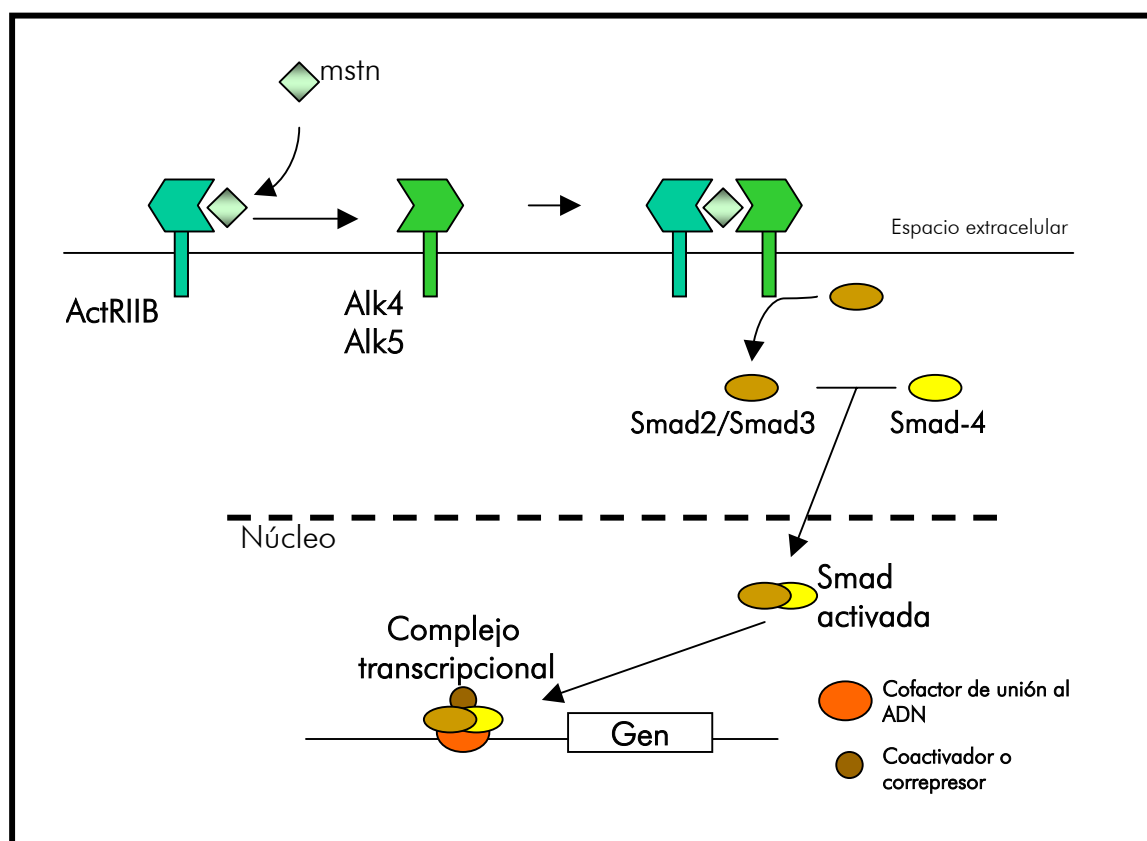


Figura 4: Vía de señalización Miostatina-SMAD. Tras la unión de la miostatina al receptor tipo II ActRIIB se produce la unión con el receptor tipo I (Alk4 o Alk5). Este receptor fosforila a una R-Smad (Smad2/Smad3), tras lo cual se asocia a una co-Smad (Smad-4) y este complejo se traslada al núcleo donde actúa activando la transcripción de los genes diana. Las moléculas de miostatina y los receptores se representan en forma monomérica para mayor claridad.

A.5. Función y regulación de la miostatina

Tras el clonado de la secuencia del ADNc de la miostatina en varias especies (humana, bovina, ovina, pollo...) y el posterior alineamiento de sus secuencias aminoacídicas, McPherron y Lee (1997) observaron un alto grado de conservación en esta proteína: las secuencias de ratón, rata, humano, cerdo, pollo y pavo eran idénticas al 100% en su región C-terminal, y las mismas regiones en la miostatina bovina, ovina y de babuino contenía sólo entre uno y tres aminoácidos de diferencia; en zebrafish observaban mayor divergencia, obteniéndose un 88% de semejanza en esta región. Este alto porcentaje de conservación en la secuencia de la miostatina entre distintas especies sugiere una función biológica altamente conservada en el reino animal.

La expresión de la miostatina se ha confirmado en una amplia diversidad de tejidos, variable según las especies y con distinta intensidad según el tejido. McPherron *et al.*,

(1997) observaron un cierto nivel de expresión de la miostatina en tejido adiposo de ratón. En cultivos de adipocitos Kim *et al.* (2000) y Zimmers *et al.* (2002) observaron que la miostatina provocaba una inhibición de la diferenciación de estas células; aunque esto parece estar en contra de la observación realizada en los ratones knock-out para la miostatina, en los que la adipogénesis y la formación de depósitos de grasa se ven significativamente reducidos (Lin *et al.*, 2002; McPherron & Lee, 2002), esto último probablemente sea debido a un efecto indirecto a largo término producido por el aumento de la masa muscular y su demanda metabólica asociada (Zimmers *et al.*, 2002). Posteriormente se apreció expresión de miostatina en glándula mamaria de cerdos (Ji *et al.*, 1998) y en músculo cardíaco de ratón y oveja (Sharma *et al.*, 1999). Cho *et al.* (2002) observaron la expresión de esta proteína en hueso de ratón en los días posteriores a su fractura, habiéndose observado además que los ratones knock-out para la miostatina poseen un incremento de la masa ósea de húmero, fémur y vértebras lumbares lo que hace pensar que la miostatina posea un papel en la diferenciación de los osteoblastos (Hamrick *et al.*, 2002; Hamrick, 2003; Hamrick *et al.*, 2003). También se ha observado la expresión de esta proteína en vertebrados inferiores, en concreto en la trucha de río, donde Roberts y Goetz (2001) identificaron dos isoformas expresadas en distintos tejidos, una de ellas principalmente en músculo esquelético y cerebro, y la otra en tejido ovárico. Este fenómeno aparece igualmente en varias otras especies de teleósteos (Maccatrozzo *et al.*, 2001), observándose incluso en muchos otros tejidos según el estado de desarrollo (Kocabas *et al.*, 2002; Radaelli *et al.*, 2003).

Pero su expresión más notable se produce esencialmente a nivel del músculo esquelético o sus precursores desde el estado embrionario hasta el adulto (McPherron *et al.*, 1997), encontrándose además, diferentes niveles de expresión entre músculos distintos. Así, Carlson *et al.* (1999) y Wehling *et al.* (2000) observaron una alta correlación entre músculos con mayor porcentaje de fibras tipo IIb o glicolíticas y mayor expresión de miostatina. Kirk *et al.* (2000) observaron por su parte la presencia de miostatina en el citoplasma de fibras tipo IIb y no en las tipo I, aunque en el músculo lesionado sí constataron la expresión en ambos tipo de fibra. Por el contrario, Sakuma *et al.* (2000) observaron una expresión de la miostatina mayoritaria en las fibras tipo I frente a las tipo II.

Y es en este tejido donde la miostatina aparece como un regulador negativo del crecimiento muscular tanto en ganado bovino como en ratón, dado que la ausencia de su funcionamiento normal provoca la aparición de músculos de mayor tamaño (McPherron *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1997). Por tanto, cualquier mutación que disminuya la cantidad de actividad de la miostatina en un período crítico del desarrollo, podrá acarrear un aumento en la masa muscular.

Además, se ha observado que la sobreexpresión sistémica de la miostatina en ratones adultos provoca una gran disminución de la masa de los tejidos muscular y adiposo análoga a la observada en síndromes humanos de caquexia (Zimmers *et al.*, 2002). Reisz-Porszasz *et al.* (2003) también observaron una disminución de la masa muscular, número y diámetro de las fibras musculares en ratones transgénicos en los que se había producido una sobreexpresión de la miostatina (aunque en este caso, sólo observaron una disminución del contenido muscular en los ratones transgénicos machos). Estas

evidencias prueban la regulación negativa que ejerce la miostatina en la proliferación de las células musculares.

A.5.1. Diferenciación miogénica y formación del músculo esquelético

El músculo esquelético en los vertebrados deriva de células precursoras mesodérmicas de los somitos, que son bloques segmentados que se forman en una progresión rostrocaudal a partir del mesodermo paraxial, y que a su vez se forma a cada lado del tubo neural. La región dorsal de los somitos (o dermomiótomo) da lugar por un lado al dermatomo (que dará lugar a la dermis) en su zona media y por otro al miótomo (que dará lugar al músculo esquelético diferenciado) en su zona dorsal. Se ha observado la presencia de factores secretados por la notocorda y el tubo neural (Shh -sonic hedgehog- y familia Wnt), que actuarían sobre el dermomiótomo iniciando la miogénesis (Molkentin & Olson, 1996; Cossu & Borello, 1999).

Del miótomo, un grupo de células migra hacia las yemas precoces de las extremidades, donde darán lugar a la musculatura apendicular o de las extremidades; estas células se llaman mioblastos, son células mononucleadas y están determinadas hacia la miogénesis pero no están aún diferenciadas. Otro grupo de mioblastos del miótomo dará lugar a la musculatura axial o del tronco (Molkentin & Olson, 1996).

Los mioblastos adquieren un compromiso celular exclusivamente hacia la línea muscular y son capaces de una diferenciación posterior en respuesta a señales apropiadas, como los factores de transcripción de la familia bHLH (basic helix-loop-helix), que son conocidos como Myf-5, MyoD, miogenina y MRF4 (cuyas funciones son parcialmente redundantes) y los MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor-2) (Walsh and Perlman, 1997).

Una vez que los mioblastos alcanzan su destino definitivo, en ellos comienza la expresión de los factores de transcripción bHLH (Myf-5 y MyoD), inducida por las proteínas Wnt y Shh secretadas desde el tubo neural y la notocorda (Molkentin and Olson, 1996; Yun & Wold, 1996).

Durante la fase de proliferación de los mioblastos, previa a la fase de diferenciación, los factores Myf-5 y MyoD permanecen reprimidos por la acción de Id, una proteína HLH que se une a distintos bHLH necesarios para la asociación entre MyoD y el ADN (Emerson, 1993). En la determinación hacia la diferenciación miogénica, los mioblastos entran en una fase de retirada del ciclo celular G_0/G_1 en la que MyoD y/o Myf-5 se reactivan y actúan marcando la determinación de estas células y tras ello, activando la expresión de la miogenina, que está involucrada en la diferenciación de los mioblastos; por último aparecería MRF4, probablemente envuelta en la maduración de los miotubos; igualmente, aparecen los MEF-2 (tipos a-d), que amplifican la acción de los bHLH. Esto marca la entrada irreversible en la etapa de diferenciación (Yun & Wold, 1996).

En este estadio, las células miogenina-positivas son aún capaces de sintetizar ADN *de novo*. Entonces se induce la expresión del inhibidor de kinasas ciclín-dependientes, p21, que actúa vía un complejo cdk (cyclin-dependent kinase) manteniendo el estado desfosforilado de Rb (retinoblastoma protein). Esta proteína en estado hipofosforilado se

mantiene unida a factores de transcripción tipo E2F necesarios para la transcripción de genes implicados en la activación de la fase S, inhibiendo así la progresión del ciclo celular. Además E2F está también implicado en la apoptosis celular, inhibiéndose ésta en las células p21 positivas y regulándose de esta forma el número final de células (Molkentin & Olson, 1996; Walsh & Perlman, 1997).

A partir de ahí se produce una diferenciación hacia el fenotipo muscular propiamente dicho, con expresión de proteínas específicas implicadas en la contracción muscular, como MHC (myosin heavy chain), actina, troponina... Finalmente, las células se fusionan formando miofibras multinucleadas, que se denominan fibras musculares. Estas fibras están rodeadas de una membrana celular o sarcolema, constituida por una membrana plasmática y una cubierta externa formada por una fina capa de material polisacárido y colágeno (Walsh & Perlman, 1997).

La generación de nuevas fibras musculares transcurre en dos períodos de tiempo: las fibras primarias sólo se forman durante los primeros estadios de la miogénesis y una vez que termina su producción se observa una nueva generación de fibras que utiliza la superficie de las fibras primarias como armazón sobre el cual fusionarse formando las fibras secundarias. Ambos tipos de fibra continúan creciendo y aumentando su número nuclear por fusión celular hasta bien entrado el período postnatal. El aumento en el número de fibras producido al aumentar de tamaño el individuo se produce principalmente por un aumento en el número de fibras secundarias alrededor de una misma fibra primaria (Wigmore & Dunglison, 1998).

A su vez, tanto las fibras primarias como las secundarias pueden diferenciarse en fibras de contracción lenta y fibras de contracción rápida. Las fibras de contracción lenta (o tipo I) se denominan también fibras rojas por su elevada concentración de mioglobina, poseen un metabolismo oxidativo y una alta resistencia a la fatiga. Las fibras rápidas se dividen en tipo IIa (o intermedias) y tipo IIb; las tipo IIa tienen una concentración alta de mioglobina y funcionan tanto con metabolismo oxidativo como glicolítico, mientras que las tipo IIb se denominan fibras blancas debido a su bajo contenido en mioglobina y poseen un metabolismo anaerobio glicolítico con baja resistencia a la fatiga (Wigmore & Dunglison, 1998).

Las fibras musculares se agrupan en número elevado formando fascículos, que se ven a simple vista en el músculo fresco; los fascículos se asocian a su vez de distintas maneras formando los diferentes tipos de músculos. Cada fibra muscular aislada, cada fascículo y cada músculo en su conjunto están revestidos por tejido conjuntivo, que contiene numerosas fibrillas finas de colágeno, responsable del grado de terneza de la carne (Bailey *et al.*, 1982).

Dado que las células musculares maduras han perdido su capacidad de división, en el músculo esquelético adulto persisten algunos miofiblastos en forma de células satélite en estrecho contacto con las miofibras maduras que, en caso de lesión muscular, vuelven a entrar en actividad proliferativa en respuesta a factores de crecimiento, y su progenie se fusiona a su vez formando nuevas fibras musculares (Bischoff, 1986).

En la especie bovina, al contrario de lo que ocurre en otras especies, la musculatura presenta un avanzado estado de diferenciación en el momento del nacimiento, demostrando que la fase fetal es un período importante en el desarrollo muscular. En un

estudio realizado sobre mioblastos de fetos de bovino normales y mioblastos de animales culones (Picard *et al.*, 1998; Duris *et al.*, 1999) se observó que la fase de proliferación de los mioblastos de fetos culones comenzaba antes que en los cultivos normales y era más intensa, lo que acarrearía un mayor número final de células. Por el contrario, se observaba un retraso en la fusión de mioblastos y en la síntesis de las proteínas musculares; además se daba un retraso en la expresión de MHC, lo que se traducía en un retraso general de la fase de diferenciación con respecto al control, aunque se hacía mucho menos marcado hacia el final de la gestación.

A.5.2. La miostatina durante la embriogénesis

La miostatina parece tener un papel regulador clave durante la embriogénesis ya que su expresión se ha detectado desde fases muy tempranas (9'5 d.p.c. en ratones -McPherron *et al.*, 1997- y 15 d.p.c. en bovino -Kambadur *et al.*, 1997-) y además es en este período cuando se han encontrado mayores niveles de expresión, comparado con el período postnatal, tanto en bovino (Kambadur *et al.*, 1997; Bass *et al.*, 1999), como en pollo (Kocamis *et al.*, 1999) y porcino (Ji *et al.*, 1998).

Además, los picos de mayor expresión coinciden con el momento de desarrollo de las fibras primarias ya establecidas y el comienzo de la formación de las fibras secundarias, en el que las miofibras primarias se establecen a partir de la diferenciación y fusión de los mioblastos tempranos, formando un armazón alrededor del cual se desarrollan las miofibras secundarias, más pequeñas que las primarias (Bass *et al.*, 1999; Oldham *et al.*, 2001).

Un ejemplo de la regulación ejercida por la miostatina durante el período embrionario es el de los cerdos con síndrome de bajo peso al nacimiento; estos animales se caracterizan por una hipoplasia muscular resultante de una disminución en el número de miofibras secundarias (Handel & Stickland, 1987) lo que conlleva una marcada reducción del peso corporal (animales con un peso al nacimiento de 1 kg o menos del 65% del peso de la camada control más grande -Powell & Aberle, 1980-). Por su parte, Ji *et al.* (1998) observaron en estos animales un nivel de miostatina al nacimiento un 65% superior al control. Este aumento de miostatina en animales con hipoplasia apunta hacia un papel de la miostatina como inhibidor de la proliferación de mioblastos durante el proceso embrionario.

Por otro lado, los niveles de ARNm de miostatina son más elevados en el músculo tanto fetal como adulto de ganado bovino con hipertrofia muscular, comparado con el músculo de individuos normales (Oldham *et al.*, 2001; Berry *et al.*, 2002). Estos últimos autores encontraron además en la raza Piamontesa un aumento del precursor de la miostatina y una disminución de los niveles de la proteína madura en el músculo. Esto sugiere un componente de retroregulación ausente en los animales hipertróficos. Este mecanismo de retroregulación en los animales normales, en presencia de la miostatina funcional, activaría unos mecanismos desconocidos que podrían ser iniciados por la misma miostatina mediante una regulación intracelular autocrina/paracrina, o incluso mediante la regulación endocrina de algún factor de crecimiento estimulado por la propia

miostatina, para mantener unos niveles constantes de proteína. Cualquiera que sea el mecanismo seguido, en los animales en los que no hay miostatina funcional el resultado final será la elevación de los niveles de ARNm con el fin de intentar paliar la falta de la proteína.

Oldham *et al.* (2001) observaron igualmente que el patrón de expresión de MyoD, un factor de transcripción esencial en el proceso de miodiferenciación, coincidía con el de la miostatina tanto en fetos hipertróficos como en fetos normales, indicando un papel coordinado de ambos factores en la diferenciación terminal y/o fusión de mioblastos. Estos autores proponen la regulación de la expresión de MyoD durante la diferenciación terminal de los mioblastos primarios y secundarios como uno de los papeles reguladores de la miostatina en el desarrollo normal del músculo; y por otro lado, en condiciones de deficiencia de miostatina sería posible que la elevada expresión de MyoD promoviera el aumento de la formación de fibras musculares durante la miogénesis fetal.

Crosier *et al.* (2002) realizaron una observación interesante a nivel productivo sobre la expresión de la miostatina durante este período: los embriones de ganado vacuno producidos *in vitro* tienen un peso y un ratio de fibras secundarias frente a primarias mayores que los de embriones producidos *in vivo*; al mismo tiempo se observa un nivel de expresión del ARNm de la miostatina menor en los embriones producidos *in vitro*.

A.5.3. La miostatina durante el período adulto

La miostatina también se expresa en el músculo esquelético del adulto, como demuestran los trabajos de McPherron *et al.* (1997), González-Cadavid *et al.* (1998), Kambadur *et al.* (1997), lo que sugiere que la miostatina no sólo ejerce una regulación durante el estado prenatal, sino que esta regulación se perpetúa luego en el estado adulto.

Por otro lado, existen multitud de evidencias de la modificación de la expresión de la miostatina en el músculo completamente diferenciado en respuesta (o como desencadenante) a distintas alteraciones de la fisiología muscular, aunque su papel en el músculo adulto continúa sin estar demasiado claro.

En todo caso, parece que la miostatina sigue ejerciendo algún tipo de regulación durante toda la vida, ya que se ha observado que su concentración en el músculo de personas de edad (que poseen una disminución de su masa muscular) sigue siendo la misma que en personas jóvenes (Welle *et al.*, 2002; Kawada *et al.*, 2001).

Por otro lado, la constatación de que la expresión de la miostatina continúa en el período adulto unido a la observación del aumento de la masa muscular en los animales carentes de miostatina funcional, ha planteado el interrogante de la relación que puede existir en el hombre entre posibles polimorfismos en este gen y desarrollo de masa y fuerza musculares. Con este objetivo, se han realizado diversos estudios en la especie humana con el fin de averiguar si existe una relación entre genotipo en la miostatina y fuerza o respuesta al entrenamiento muscular, aunque los resultados observados por el momento parecen poco concluyentes (Ferrell *et al.*, 1999; Ivey *et al.*, 2000; Seibert *et al.*, 2001).

A.5.3.1. Pérdida de masa muscular

Una de las situaciones en las que se han estudiado las alteraciones en la expresión de la miostatina ha sido en los casos de pérdida de masa muscular, bien por causas patológicas (como en el caso de SIDA), bien por causas inducidas mecánicamente (experimentos de atrofia muscular debida a la falta de uso de las extremidades o por permanencia en condiciones de ingravidez).

La primera evidencia de estas alteraciones en la expresión de la miostatina humana en adulto la proporcionaron González-Cadavid *et al.* (1998) al observar en músculo y plasma de individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana un aumento de la concentración de la proteína por comparación a los niveles de individuos sanos; este aumento era aun más notable en individuos que habían desarrollado el síndrome del SIDA y que presentaban una clara pérdida de masa muscular.

En experimentos de atrofia muscular en ratones producida por descarga del peso de las extremidades posteriores Carlson *et al.* (1999) observaron un aumento de la expresión de ARNm de la miostatina, que antecedía a una pérdida gradual de la masa muscular. Sin embargo, observaron que el mayor aumento no se daba en los músculos más atrofiados (músculos con mayor porcentaje de fibras lentas), sino que este aumento se producía preferencialmente en los músculos con mayor porcentaje de fibras tipo IIb o glicolíticas (en los que también la expresión era mayor en condiciones normales).

Wehling *et al.* (2000) también detectaron un aumento en la expresión de la miostatina (tanto a nivel del ARNm como de la proteína) paralela a una disminución de la masa muscular en experimentos de descarga muscular de las extremidades posteriores. Además observaron que tras unos días de recuperación de la carga muscular la expresión volvía a sus niveles normales.

Lalani *et al.* (2000) observaron igualmente un aumento de miostatina al comparar los niveles del transcrito y de la propia proteína en ratas sometidas a condiciones de ingravidez en el espacio con los de ratas mantenidas en tierra: los niveles de miostatina aumentaban tras 17 días de condiciones de ingravidez, aunque volvían a la normalidad tras la reaclimatación de los músculos a la gravedad terrestre.

En pacientes con atrofia muscular crónica asociada a períodos prolongados de reposo se observó mediante RT-PCR un aumento en la expresión de la miostatina (Zachwieja *et al.*, 1999; Reardon *et al.*, 2001), así como en personas de edad avanzada con síntomas de sarcopenia (Schulte *et al.*, 2001; Yarasheski *et al.*, 2002) aunque estos resultados no coinciden con los observados por Kawada *et al.* (2001) y Welle *et al.* (2002) que no encuentran una diferencia de expresión entre individuos de diferente edad. Jeanplong *et al.* (2003) también observaron un pico en los niveles de miostatina en corderos sometidos a ayuno prolongado, que volvía a los niveles normales una vez recuperada la alimentación normal. Este aumento en los niveles de miostatina también se observó asociado a la pérdida de masa muscular inducida por glucocorticoides exógenos (Lang *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003).

En todas estas situaciones el comportamiento de la expresión de la miostatina fue semejante: una disminución de la masa muscular era acompañada por un aumento de la

expresión de la miostatina en mayor o menor medida (a su vez se darían diferencias según la naturaleza –aguda o crónica- del estímulo). De alguna manera la miostatina actuaría en estos casos como un controlador de la generación de células musculares ya que en los ratones knock-out para este gen no parece inducirse la miogénesis cuando son sometidos a descarga del peso de las extremidades y la pérdida de masa muscular en estos animales resulta mucho mayor que en los individuos normales (McMahon *et al.*, 2003).

A.5.3.2. Lesión y regeneración muscular

Sin embargo, cuando se estudiaron casos de regeneración muscular los resultados obtenidos por distintos autores no fueron tan compatibles entre ellos, probablemente debido a la complejidad del proceso de regeneración muscular. Tras una lesión muscular, en la región dañada se produce un proceso de degeneración: inflamación, infiltración de neutrófilos y fagocitosis de las células necróticas; este proceso es seguido por la activación de las células satélite, que existen en el músculo esquelético en un estado de quiescencia y que una vez activadas, proliferan y migran a la zona lesionada donde se fusionan y maduran formando fibras musculares esqueléticas.

Sakuma *et al.* (2000) estudiaron las respuestas adaptativas de la miostatina ante condiciones de regeneración muscular en ratones. Cuando indujeron la regeneración tras inserción de bupivacaína, un anestésico que causa mionecrosis seguida de regeneración, observaron una marcada reducción de la proteína, que volvía a sus niveles control tras 28 días de post-operatorio. Los autores argumentan los resultados observados atribuyendo a la miostatina un papel inhibitorio de la hiperplasia muscular, lo que acarrearía una neoformación de fibras durante el proceso de la regeneración.

Kirk *et al.* (2000) observaron en ratas que mientras que en condiciones normales sólo se detectaba la presencia de miostatina en el citoplasma de fibras tipo IIb y no en las tipo I, en el músculo lesionado por inyección de notexina la miostatina aparecía en ambos tipos de fibra, indicando que durante la lesión muscular existe una regulación alterada fibro-específica de la expresión de la miostatina. En el mismo experimento también observaron un aumento de esta proteína tanto en las fibras necrosadas durante la fase de lesión como en las fibras en regeneración, seguido de un marcado descenso coincidente con la formación de nuevas fibras. Este aumento de la expresión de la miostatina en fibras necrosadas, que además aparece en fibras tipo I sólo en caso de lesión, les hizo sugerir un papel quimioattractor de fagocitos y células inflamatorias. La posterior disminución durante la regeneración les hizo atribuir a la miostatina un papel inhibitorio de la proliferación de células satélite, fomentándose la regeneración muscular vía el descenso de la miostatina.

Por su parte, Yamanouchi *et al.* (2000) recurrieron también a la bupivacaína para observar la expresión del ARNm de la miostatina en el músculo en regeneración de ratas dos días después del tratamiento. Estos autores observaron un aumento de los niveles de miostatina en el área en fase de regeneración, lo que les llevó a argumentar que la miostatina tendría un papel inhibitorio de la proliferación y/o diferenciación de las células

satélite, pero cuyo objetivo en último término sería la regulación del tamaño final del músculo en regeneración (hipótesis "chalone", barajada por Lee & McPherron -1999- para el caso de la miostatina, y que sugiere que el tamaño de los tejidos de un individuo estarán controlados independientemente por la actividad de "chalones" específicas, o proteínas producidas por un tejido determinado y que actúan sobre el propio tejido inhibiendo su crecimiento; de modo que la idea general es que la concentración de una "chalone" específica sería el reflejo inverso de la masa total del tejido en el que se produce).

Sharma *et al.* (1999) también descubrieron (como Kirk *et al.* (2000) y Yamanouchi *et al.* (2000)) un sustancial incremento de la miostatina en células lesionadas, pero en este caso en cardiomiocitos próximos al área necrótica infartada tras inducción de un infarto de miocardio en el corazón de ovejas.

Otro grupo que observó un aumento en los niveles de miostatina tras lesión fue el de Lang *et al.* (2001), que recogieron un incremento de hasta cuatro veces la concentración normal en el músculo de fibras tipo II tras lesión térmica. Este aumento, que no se observaba en las fibras tipo I, se acompañaba de una disminución del contenido proteico de los músculos afectados. Además, su estudio les llevó a sugerir que este aumento de miostatina estaba ocasionado por un aumento de los niveles de glucocorticoides circulantes.

Otra evidencia de que la miostatina puede tener un papel en la regeneración muscular proviene de la observación de su expresión en el músculo con desórdenes degenerativos, como la distrofia. En ratones *mdx*, que carecen de distrofina, y en ratones *gsg^{-/-}*, que carecen de γ -sarcoglicano, se produce un significativo grado de regeneración muscular tras ciclos repetitivos de degeneración; en estos ratones *mdx* y *gsg^{-/-}*, la expresión de la miostatina es significativamente menor comparada con los ratones normales, probablemente debido a una regulación negativa que permite la regeneración de las células musculares (Zhu *et al.*, 2000; Tseng *et al.*, 2002).

Estos resultados sugieren que el papel de la miostatina en el músculo esquelético en el estado adulto podría ser el de inhibidor de la proliferación de las células satélite, que son mioblastos unidos a las fibras musculares que conservan la capacidad de reproducirse en caso de lesión muscular (Cornelison *et al.* (2000); Kirk *et al.*, 2000; Yamanouchi *et al.*, 2000; Sharma *et al.* (2001)). Además, Carlson *et al.* (1999) ya sugirieron que la mayor expresión de miostatina observada en fibras IIb podría ser un mecanismo de *feedback* que inhibiría la proliferación de células satélite, evitando con ello el aumento del tamaño de la fibra. Posteriormente, McCroskery *et al.* (2003) utilizaron cultivos y técnicas de marcaje de células satélite *in vivo* para mostrar que la miostatina bloquea en efecto la activación de las células satélite manteniéndolas en estado de quiescencia y además regula negativamente la auto-renovación de las mismas.

Este papel inhibidor de la proliferación de las células musculares también parece ser el responsable del aumento de los niveles de miostatina observado durante la hipertrofia acaecida por sobrecarga muscular (Sakuma *et al.*, 2000). En el músculo hipertrofiado mecánicamente se produce un engrosamiento de las fibras musculares existentes pero sin que se produzca formación de otras nuevas, de modo que la miostatina sería la responsable de mantener ese número inicial de fibras.

A.5.3.3. Expectativas terapéuticas

Grobet *et al.* (2003) recurrieron a un estudio de mutagénesis dirigida en ratones basado en el sistema Cre-loxP, para demostrar que la pérdida post-natal de la función de la miostatina en el músculo estriado conlleva la aparición de una hipertrofia muscular generalizada de la misma magnitud que la observada para el ratón *knock-out* constitutivo (McPherron *et al.*, 1997). Este resultado indica que la miostatina no sólo actúa durante la embriogénesis, sino que también lo hace en períodos posteriores del desarrollo.

Planteada la posibilidad de alterar la expresión de la miostatina durante el estado adulto, existen varias líneas de investigación que se han dirigido hacia la búsqueda de inhibidores de la miostatina que ofrezcan un beneficio terapéutico frente a diversas enfermedades musculares degenerativas como la distrofia de Duchenne, la sarcopenia o la caquexia que aqueja a determinados pacientes de cáncer. El grupo de Bogdanovich *et al.* (2002) utilizó anticuerpos antimioestatina inyectados intraperitonealmente en ratones *mdx* (ratones que carecen de distrofina), lo que condujo a una notable mejoría funcional del fenotipo distrófico. Estas observaciones se vieron confirmadas por los resultados de Wagner *et al.* (2002), que demostraron que los ratones dobles homocigotos para la ausencia de distrofina (y por tanto con un fenotipo distrófico) y para la ausencia de miostatina presentaban mayor masa muscular, mayor fuerza y menor remplazamiento de tejido muscular por tejido fibroso y adiposo que los ratones *mdx* (sólo homocigotos para la ausencia de distrofina). Whittemore *et al.* (2003) también utilizaron anticuerpos para bloquear la miostatina en este caso en ratones normales, observando un aumento apreciable de su masa muscular.

La inhibición de la miostatina también parece presentar una utilidad terapéutica en el tratamiento o la prevención de desórdenes metabólicos como la obesidad o la diabetes tipo II, como muestran los resultados de McPherron y Lee (2002). En este estudio obtuvieron por cruzamiento ratones *A^y* o *Lep^{ob/ob}* (mutaciones para dos modelos genéticos de obesidad) y *mstn^{-/-}*, observando que la ausencia de miostatina conllevaba una supresión parcial de la acumulación de grasa y del metabolismo anormal de la glucosa.

También existe una línea de investigación terapéutica de tumores de tipo rhabdomyosarcoma, en los que la diferenciación de las células musculares está inhibida por un aumento de la concentración de miostatina que inhibe a su vez al factor de transcripción MyoD (Ricaud *et al.*, 2003). Estos autores comprobaron en cultivos de células de rhabdomyosarcoma que la inhibición de la miostatina (bien mediante miostatina antisentido, bien mediante folistatina - un inhibidor de la miostatina, Lee & McPherron, 2001- o bien mediante anticuerpos antimioestatina) potenciaba la diferenciación miogénica restableciendo el ciclo celular normal. Por su parte, Langley *et al.* (2004) proponen, en cambio, la utilización de la miostatina como agente citostático, esto es, como un inhibidor de la proliferación de este tipo de células de rhabdomyosarcoma.

Por último cabe destacar que los logros obtenidos con inhibidores de la miostatina en animales de laboratorio abren vías para la aplicación zootécnica de estos conocimientos con el objetivo de mejorar el índice de conversión en especies ganaderas (Sillence, 2004).

A.5.4. Papel de la miostatina en el ciclo celular

Como se ha visto en el punto A.5.1. de formación del músculo esquelético, paralelamente a la inducción de los genes músculo-específicos se produce la retirada permanente del ciclo celular de los mioblastos en proliferación para diferenciarse en miotubos.

Uno de los principales efectos de los TGF β es su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, y de hecho, existen multitud de evidencias del papel inhibitorio de los TGF β en la progresión del ciclo celular a través de su acción sobre inhibidores de kinasas ciclín-dependientes (Datto *et al.*, 1996).

Asimismo, los datos vistos anteriormente en los que la expresión de la miostatina aumenta en caso de pérdida muscular (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998; Carlson *et al.*, 1999; Wehling *et al.*, 2000; Lalani *et al.*, 2000) y el hecho de que la ausencia de miostatina conlleva una hipertrofia muscular (McPherron *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.* 1997) sugieren que el producto del gen de la miostatina debe ser un inhibidor del crecimiento muscular.

Los efectos directos de esta proteína sobre el crecimiento del músculo esquelético han sido estudiados por cuatro grupos independientes: Thomas *et al.* (2000), Taylor *et al.*, (2001), Ríos *et al.*, (2001) y Joulia *et al.* (2003).

Thomas *et al.* (2000) estudiaron el efecto de la adición de miostatina recombinante en el medio de cultivos de mioblastos, utilizando para ello cultivos de mioblastos de bovino normal e hipertrófico junto a cultivos de células C2C12 de ratón (Yaffe & Saxel, 1977), un sistema ampliamente utilizado en estudios del efecto de factores de crecimiento en la síntesis proteica, replicación o apoptosis muscular. En los tres tipos de cultivo detectaron una inhibición del crecimiento de los mioblastos en una relación dependiente de la dosis y del tiempo de contacto con la proteína. Asimismo, el tratamiento con miostatina inhibía la formación de miotubos y su posterior diferenciación.

Taylor *et al.*, (2001), Ríos *et al.*, (2001)(2002) y Joulia *et al.* (2003) observaron igualmente una inhibición de la proliferación de los mioblastos al transfectar células C2C12 con vectores de expresión de la miostatina.

Todos estos datos indican que la miostatina provoca una regulación negativa de la masa muscular actuando sobre los mioblastos. Esto ya se había sugerido previamente mediante experimentos indirectos en los que se observó una menor proliferación de mioblastos L6 de rata en medio suplementado con suero obtenido de fetos normales de bovino, en comparación con los mioblastos cultivados en suero de fetos culones (Gerrard & Judge, 1993).

Taylor *et al.* (2001) observaron más concretamente una disminución en la síntesis de ADN y de proteínas más llamativa en miotubos que en mioblastos, debida a la transfección con el vector de expresión de miostatina. Además observaron que la inhibición del crecimiento por dicho tratamiento era apenas perceptible en células CHO (Chinese Hamster Ovary), lo que indicaba una clara especificidad de la miostatina por el tejido muscular.

Por otro lado, tanto Thomas *et al.* (2000) como Taylor *et al.* (2001) apreciaron una reversibilidad del efecto inhibitorio de la miostatina al retirar el tratamiento y detectar tras ello una continuación del patrón de crecimiento celular.

En cuanto a su papel en la apoptosis celular, ninguno de los dos últimos autores mencionados observaron efecto alguno de la adición de miostatina sobre la muerte celular. En cambio, Ríos *et al.* (2001), Ríos *et al.* (2002) y Joulia *et al.* (2003) detectaron una inhibición de la apoptosis en miocitos transfectados con el vector de expresión de miostatina, atribuyendo esta diferencia de resultados con respecto a los autores anteriores a las distintas condiciones de cultivo utilizadas (condiciones de diferenciación en lugar de proliferación), e interpretando esta inhibición de la apoptosis en miocitos como parte de un complejo nivel de regulación de la masa muscular en el que la supervivencia de los miocitos y la salida del ciclo celular son sucesos coordinados en el tiempo durante la diferenciación miogénica.

Thomas *et al.* (2000) establecieron una conexión entre la retirada del ciclo celular de los mioblastos y la diferenciación posterior a través de la regulación de las Cdks, una familia de enzimas que catalizan reacciones requeridas para las transiciones en el ciclo celular.

La progresión a través de la primera fase (G_1) y la iniciación de la síntesis de ADN (fase S) durante el ciclo de división celular en los mamíferos está regulado cooperativamente por varias clases de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdks), entre las que se encuentra cyclin-E-Cdk2, y cuyas actividades están restringidas a su vez por los Cdks-inhibidores (CKIs), entre los que se encuentra p21.

Está ampliamente aceptado que los complejos ciclín-cdk son necesarios durante la fase G_1 del ciclo para fosforilar el producto del gen del retinoblastoma, Rb. La proteína Rb hipofosforilada se une a factores de transcripción como E2F-DP1 necesarios para la activación de la transcripción de genes implicados en la fase S e impidiendo con ello que la célula entre en esta fase. Así, parece que la fosforilación de Rb por G_1 -Cdks libera estos factores de transcripción de la fase S, permitiendo el paso a través de este punto de restricción. E inversamente, la acumulación de la forma hipofosforilada de Rb, mediada por inactivación de G_1 -Cdk, bien por aumento de los niveles de CKIs y/o por disminución de la concentración de Cdks, conlleva una parada del ciclo celular en G_1 .

La inhibición del crecimiento de los mioblastos por suplementación con miostatina parece estar específicamente regulada a través de p21 dado que los niveles de este inhibidor aumentaban tras el tratamiento. Además, este aumento de p21 se correspondía con una ligera disminución de la concentración de Cdk2 y de su actividad.

Por otro lado se observaba una disminución en la fosforilación de Rb. Por ello, estos autores propusieron a la miostatina como causante de la detención en G_1 del crecimiento de los mioblastos por hipofosforilación de Rb, vía inactivación de ciclín-E-Cdk2 por p21. A partir de esto propusieron un modelo del papel de la miostatina en la regulación de la proliferación mioblástica representado en la figura 5.

Resumiendo, estos resultados sugieren que en respuesta a la miostatina aumenta la expresión de p21, inhibiendo la actividad de la ciclín-E-Cdk2, lo que ocasiona la hipofosforilación de la proteína Rb y la detención del ciclo en G_1 interrumpiéndose su transición a la fase S. El aumento en el número de fibras musculares en las razas bovinas

colonas y en el ratón knock-out será entonces el resultado de una desregulación de la proliferación de mioblastos por imposibilidad de detener el ciclo en la fase G_1 .

En células de rhabdomiosarcoma, Langley *et al.* (2004) también observaron que la miostatina provocaba una parada del ciclo celular en fase G_1 dependiente de la inhibición de la ciclín-E-Cdk2 y, en este caso, independiente del aumento de p21 y la hipofosforilación de Rb.

Además de ser un inhibidor de la proliferación de mioblastos, Langley *et al.* (2002) observaron que la miostatina se comportaba como un inhibidor de la diferenciación miogénica. En sus experimentos demostraron que la miostatina en cultivos de mioblastos en condiciones de diferenciación disminuía los niveles de MyoD (factor específico de la diferenciación muscular), vía activación de Smad3 (que se une a MyoD impidiendo la formación del complejo activo MyoD-E) incapacitando a los mioblastos para diferenciarse en miotubos (figura 5).

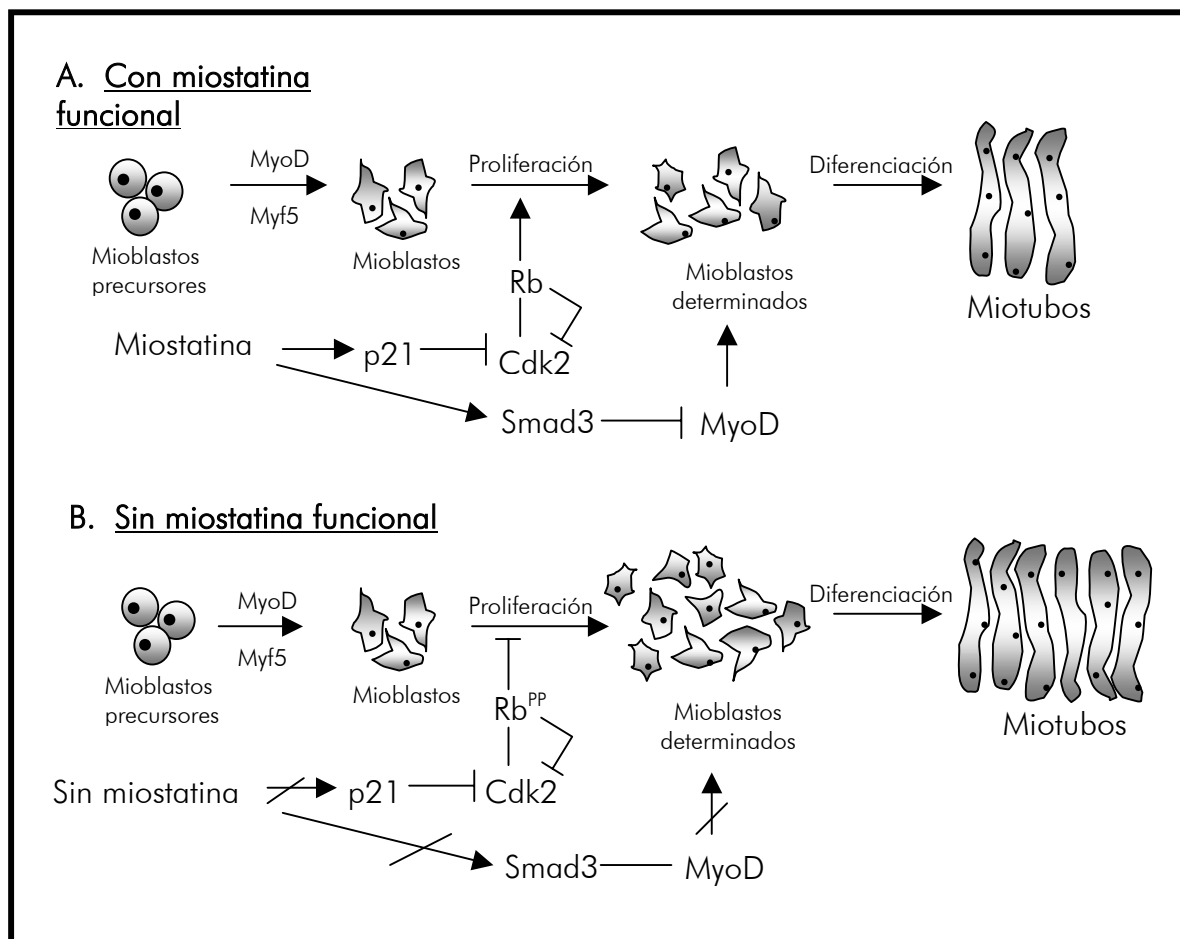


Figura 5: Modelo del papel de la miostatina en el crecimiento muscular (según Thomas *et al.* (2000) y Langley *et al.* (2002)). Durante la embriogénesis muscular, Myf5 y MyoD conducen a las células hacia el estado de miogénesis. La proliferación de los mioblastos está regulada por la miostatina vía la regulación positiva de

p21 y la inactivación de la actividad Cdk, lo que conlleva la hipofosforilación de Rb y la interrupción del ciclo celular. Por otro lado, y en respuesta a una señal de diferenciación, MyoD alcanza la funcionalidad completa, lo que acarrea que los mioblastos determinados se fusionen en miotubos multinucleados. La miostatina regula este proceso inhibiendo la expresión de MyoD vía Smad3.

Ríos *et al.* (2002) apuntaron también el papel inhibitorio de la miostatina en el proceso de diferenciación miogénica, al observar que una sobreexpresión de miostatina en cultivos de mioblastos disminuía los niveles de los factores musculares de transcripción MyoD y miogenina. A la misma conclusión llegaron McCroskery *et al.* (2003) al comprobar que en mioblastos carentes de miostatina los niveles de MyoD permanecían elevados durante varias horas más que en mioblastos salvajes.

También se ha observado una relación entre el aumento de los niveles de miostatina e inhibición de la diferenciación de las células musculares en líneas celulares de rhabdomyosarcoma (RD y Rh30) que se caracterizan por su incapacidad para completar la diferenciación miogénica (Ricaud *et al.*, 2003). Esta inhibición de la diferenciación se explica en parte porque la miostatina inhibe la actividad de MyoD y con ello la transcripción de toda una serie de genes musculares. Además, estos autores comprobaron que la inhibición de la miostatina restablecía la actividad de MyoD potenciando la diferenciación de las células de rhabdomyosarcoma.

Los experimentos de Spiller *et al.* (2002) sugieren que la miostatina estaría regulada a su vez por el factor de transcripción MyoD, que actuaría promoviendo la determinación de los mioblastos en el ciclo celular vía regulación de la expresión de la propia miostatina. Esto indica que la regulación de la miostatina y de MyoD está estrechamente interconectada influyendo ambas proteínas en los niveles de la otra.

A medida que aumenta el número de publicaciones sobre la miostatina van apareciendo otros factores que actúan regulando su expresión, como es el caso de la hormona de crecimiento (GH) que, tanto en individuos adultos como en miotubos de C2C12, provoca una disminución de los niveles del transcrito y de la propia miostatina (Liu *et al.*, 2003).

B. ANTECEDENTES DE ESTRATEGIAS DE TRANSGÉNESIS

Una de las vías más importantes para conocer la función *in vivo* de un gen pasa por su análisis mediante mutación, esto es, la activación o modificación de un gen por mutagénesis y el estudio de sus consecuencias en el organismo mutante.

Hace ya tiempo que los genetistas han reconocido el interés del estudio de las mutaciones que, gracias al fenotipo que ocasionan, permiten esclarecer la función de los genes involucrados. Sin embargo, en los organismos complejos como el del ratón, un modelo ampliamente utilizado en el estudio de los mamíferos, las mutaciones obtenidas se han limitado durante mucho tiempo a las localizadas al azar en laboratorio y que concernían esencialmente a modificaciones visibles del fenotipo (color de capa, morfología, comportamiento, etc.); en particular, de esta manera se han podido observar muy pocas mutaciones involucradas en defectos del desarrollo.

Es por ello que durante las últimas dos décadas se ha desarrollado todo un esfuerzo destinado a crear de manera deliberada y controlada modificaciones genéticas en cultivos celulares e incluso en organismos vivos.

La obtención de ratones portadores de modificaciones genéticas programadas ha revolucionado literalmente el estudio de casi la totalidad de aspectos de la biología de este animal y de sus distintos sistemas.

B.1. Mutagénesis dirigida

En la creación de modelos de ratón transgénicos, existen dos métodos que son los más comúnmente utilizados. El primero (microinyección nuclear) consiste en la inyección del ADN clonado en uno de los dos pronúcleos del óvulo recién fecundado. El animal transgénico nacido de esta operación es portador de entre una y varias decenas de copias del transgen, integrado al azar y en tándem en disposición "cabeza-cola". Este método permite que el gen pueda expresarse de manera específica situando el gen integrado bajo la influencia de un promotor concreto; sin embargo, presenta la desventaja de que no hay control sobre el número de copias ni el lugar de inserción.

El segundo método (mutagénesis dirigida) sí permite ejercer un control sobre el número de copias y el lugar de inserción, y recurre a la utilización de células madre embrionarias o células *ES* (embryonic stem cells) (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981) y a la capacidad de ADNs exógenos de insertarse en el genoma por recombinación homóloga.

La técnica de mutagénesis dirigida sobre la célula ha supuesto un impresionante adelanto en el análisis de la función génica, lo que ha ocasionado que un elevado número de autores se haya decantado por este método para encauzar su estudio experimental (Brandon *et al.*, 1995a; Brandon *et al.*, 1995b; Brandon *et al.*, 1995c). Desde la creación de los primeros ratones transgénicos mediante esta estrategia esta técnica apenas ha sufrido variaciones metodológicas (Thompson *et al.*, 1989).

La principal característica de las células *ES*, derivadas directamente del cultivo de blastocistos de ratón, es su totipotencia, esto es, cuando son introducidas en un embrión en los primeros estadios, poseen la propiedad de participar en la formación de todos sus tejidos, incluyendo la línea germinal. El individuo resultante de esta manipulación es una quimera cuyos tejidos están constituidos por una proporción más o menos elevada de las células *ES* y por las células del embrión receptor. El cruce sucesivo de estas quimeras dará lugar a una cepa de ratones homocigotos para el patrimonio genético de las células *ES*.

La característica de totipotencialidad es vital para la creación de una línea transmisora y de ahí la importancia del aislamiento de este tipo de células en un estadio que mantenga su carácter pluripotente. Los dos métodos conocidos de aislamiento de líneas de células madre embrionarias se basan en la manipulación del embrión en los primeros estadios tras la implantación.

Históricamente, la primera técnica descrita consistía en la implantación de embriones tempranos en zonas ectópicas, dando lugar a tumores malignos y transplantables llamados teratocarcinomas. Las células madre aisladas a partir de estos teratocarcinomas se denominan EC (células de carcinoma embrionarias) y se han utilizado ampliamente en el desarrollo de ratones adultos en combinación con blastocistos; sin embargo, una gran cantidad de estas líneas son cariotípicamente anómalas, por lo que su uso se ve limitado para manipulación genética (Jami & Ritz, 1974; Robertson, 1991).

En 1981, dos laboratorios independientes describieron el aislamiento directo de líneas de células madre pluripotentes a partir de embriones normales (Martin, 1981; Evans & Kaufman, 1981). Estos equipos cultivaron, sobre una monocapa de células *feeder* (células nutritivas o alimentadoras), la masa celular interna (ICM) de un blastocisto disgregada para evitar su diferenciación; tras su proliferación seleccionaron las colonias celulares formadas que exhibían una morfología uniforme de células madre, para obtener así una población pluripotente estable.

Estas células, denominadas a partir de entonces células *ES*, presentan una serie de ventajas sobre las células EC derivadas de tumores: además de su mayor capacidad de recolonización al ser implantadas en un blastocisto, la mayoría de estas líneas celulares dan lugar a individuos que presentan un cariotipo euploide, algo que no siempre ocurre en animales derivados de células EC. Además, estas células pueden mantenerse indefinidamente *in vitro* en un estado indiferenciado, induciéndose su diferenciación simplemente por alteración de las condiciones de crecimiento (Robertson, 1986). En la figura 6 se muestra una imagen típica de un cultivo de células *ES* sobre una capa de células *feeder*.

Otra de las ventajas de las líneas *ES* derivadas de embriones es que se pueden aislar de manera rutinaria líneas XY (frente a las líneas EC, que son mayoritariamente XO). La ventaja de esto es que los machos poseen una mayor capacidad reproductiva, de modo que en los cruces de quimeras será más fácil detectar la línea germinal derivada de células *ES*, aunque esté en baja frecuencia. El uso generalizado de líneas *ES* de tipo XY conlleva también un efecto en el sexo de las quimeras obtenidas. Así, la implantación de células XY en embriones obtenidos al azar produce combinaciones apropiadas (XY → XY) o inapropiadas (XY → XX) del genotipo sexual. Mientras que las combinaciones XY → XY dan lugar a machos sin problemas, las uniones XY → XX pueden afectar al desarrollo

sexual del futuro embrión, que dependerá del número relativo y la posición de las células cultivadas en el embrión receptor (Robertson, 1986).

La demostración de la transmisión en la línea germinal de las células *ES* cultivadas la ofrecieron en 1984 Bradley *et al.* cuando tras el cruce de las quimeras obtenidas observaron un alto porcentaje de descendientes portadores del carácter *agutí* transmitido con las células *ES*. Con este estudio confirmaron el alto potencial colonizador de las células *ES* al ser microinyectadas en un blastocisto aceptor. También confirmaron la desviación del ratio sexual obtenido hacia un mayor porcentaje de quimeras macho obtenidas al utilizar células *ES* de cariotipo XY.

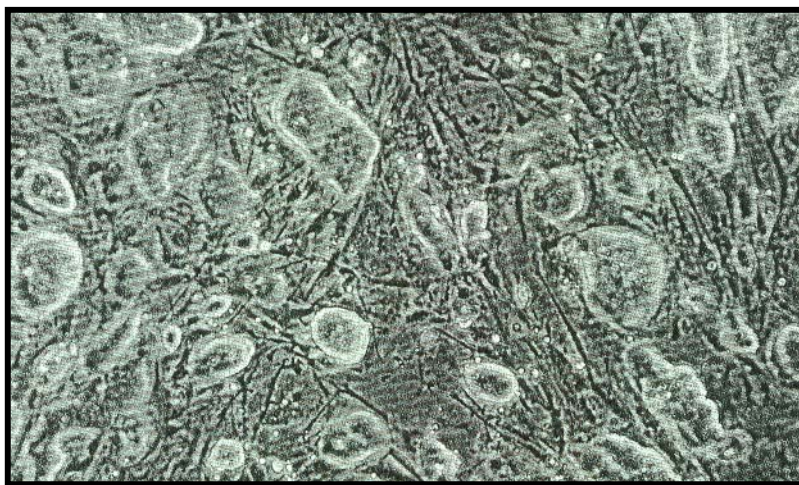


Figura 6: Morfología de células ES. Colonias de células madre embrionarias indiferenciadas creciendo sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón.

Además de su totipotencialidad, la principal característica de las células *ES* es su capacidad de ser manipuladas genéticamente *in vitro* y mantener su carácter colonizador de la línea germinal. Esto quedó demostrado tras los trabajos de Robertson *et al.* (1986) y Gossler *et al.* (1986) en los que manipularon respectivamente, células *ES* por integración al azar mediante vectores retrovirales o plásmidos con genes de resistencia. La detección de dichos genes integrados también en el genoma de la descendencia de las quimeras obtenidas demostró la transmisión germinal estable del patrimonio genético de las células *ES*.

La posibilidad de modificar puntos específicos del genoma por mutagénesis dirigida hace aún más interesante esta metodología de transgénesis orientada hacia la generación de ratones de un genotipo específico deseado.

El equipo de Capecchi (Folger *et al.*, 1982) demostró que las células somáticas mamíferas poseen la maquinaria enzimática necesaria para permitir una eficiente recombinación homóloga entre moléculas de ADN exógenas cointroducidas en dichas células.

Posteriormente Smithies *et al.* (1985) demostraron la posibilidad de efectuar una recombinación homóloga entre un ADN exógeno y un gen en el cromosoma en un cultivo de células mamíferas (células carcinómicas EJ) permitiendo la inserción estable de una secuencia definida de ADN. En la misma línea se encuentra el trabajo de Thomas *et al.* (1986), en el que consiguieron reparar una mutación en el gen de resistencia a la neomicina de una línea celular previamente transfectada con una versión mutada de dicho gen. Con estos experimentos este equipo demostró además la influencia del porcentaje de homología entre el gen y el ADN exógeno en la frecuencia de recombinación homóloga.

Estos estudios supusieron un preámbulo para los primeros experimentos de recombinación homóloga en células ES, realizados independientemente por Doetschman *et al.* (1987) y Thomas & Capecchi (1987). Quedaban así sentadas las bases de la mutagénesis dirigida *in vivo* al confirmarse la capacidad del genoma de las células ES de ser alterado mediante recombinación homóloga, contribuyéndose con esto a la generación de ratones de cualquier genotipo específico.

Por otro lado, Johnson *et al.* (1989) demostraron la ausencia de correlación entre la mayor o menor expresión de un gen y su frecuencia de recombinación homóloga con un ADN exógeno dado. De este modo, el espectro de posibilidades de transgénesis abarcaría potencialmente la totalidad del genoma.

Teniendo en cuenta que la recombinación homóloga de un ADN foráneo con el ADN genómico es un evento poco frecuente en comparación con su integración al azar, la principal ventaja de la utilización de células ES para la creación de ratones transgénicos, reside en el hecho de que se pueden seleccionar y verificar mutaciones introducidas en las células, escogiendo así las células que pasarán a formar parte de los tejidos del nuevo ratón.

Una importante aportación a la posibilidad de selección en cultivo de las células ES genéticamente modificadas, fue la realizada por Mansour *et al.* (1988). Su estrategia, conocida como de selección positiva-negativa, consiste en la incorporación al vector de mutagénesis de un cassette de selección positiva (generalmente de resistencia a la neomicina) en algún punto de la zona de homología con el que se seleccionan las células que han incorporado el vector en algún punto de su genoma. Y en esta estrategia también se incorporan uno o dos cassettes de selección negativa (generalmente HSV-tk, -Herpes simplex virus thymidine kinase-) en los extremos de la zona de homología y que seleccionan contra las células que han integrado el vector al azar. El gen de resistencia a la neomicina, además de actuar como selector positivo, suele tener la función de interrumpir un exón o alguna otra zona del segmento del gen clonado, con objeto de inactivar la función del gen estudiado. El gen HSV-tk, por su parte, es excluido durante la recombinación homóloga porque representa una discontinuidad en el vector entre la zona de homología y la de no homología con respecto a la secuencia endógena diana. Por tanto, las células en las que se produzca recombinación homóloga serán Neo^R y HSV-tk⁻. Y paralelamente, las células en las que se haya producido una integración al azar serán Neo^R y HSV-tk⁺, dado que la mayoría de inserciones al azar de ADN exógeno linearizado en el genoma se producen a través de sus extremos. Por lo tanto, seleccionando con neomicina y ganciclovir (el ganciclovir es un análogo de nucleósido utilizado como bloqueador de la propagación viral debido a la citotoxicidad provocada en el

hospedador cuando es metabolizado específicamente por la timidín-kinasa viral -Oliver *et al.*, 1985-) en el medio de cultivo, el resultado neto será un enriquecimiento de la población de células que contienen la mutación deseada. Este método permite trabajar con genes que no sean seleccionables *per se* en cultivo, como es el caso de la inmensa mayoría (frente a las primeras experiencias - Doetschman *et al.*, 1987; Thomas & Capecchi, 1987 -, en las que se escogió, precisamente por su carácter seleccionable, el gen de la hipoxantina-fosforribosil transferasa -HPRT- para su sustitución por recombinación homóloga). Este equipo calculaba un enriquecimiento de unas 2000 veces mediante este método, pero trabajos más recientes demuestran que éste puede ser bastante mayor (Torres & Kühn, 1997). En la figura 7 se representa una estrategia típica de recombinación homóloga, con un gen de selección positiva y otro de selección negativa.

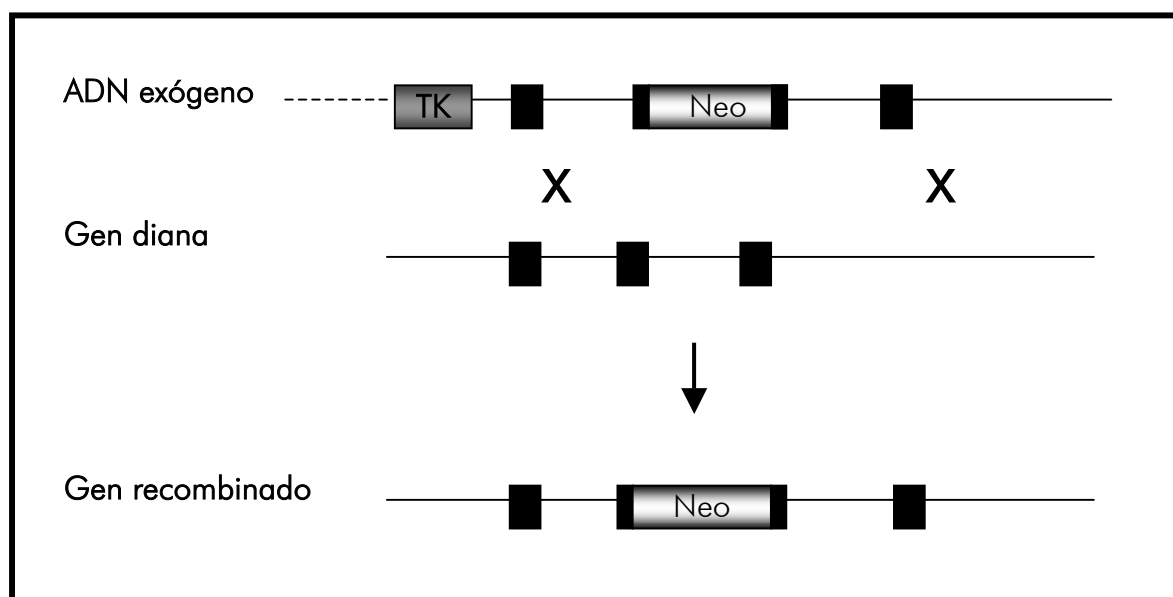


Figura 7: Estrategia de recombinación homóloga. En esta estrategia se utiliza la selección positiva (Neo) y negativa (TK) para seleccionar las células con la mutación deseada; además, el gen de neo-resistencia se utiliza para interrumpir la secuencia de un exón. Los bloques negros representan los exones y la línea discontinua, la región no homóloga.

Con todas estas herramientas puestas a punto, no se tardó en llevar a cabo una estrategia de mutagénesis dirigida mediante la creación de quimeras transmisoras a partir de células *ES* manipuladas por recombinación homóloga. El primer ejemplo vino de la mano de Frohman *et al.* (1989) y Thompson *et al.* (1989), que aprovecharon la posibilidad de seleccionar en cultivo directamente las células portadoras de un gen HPRT funcionalmente activo, para demostrar la corrección mediante mutagénesis dirigida de una línea de ratones funcionalmente inactiva para HPRT. Posteriormente apareció toda una serie de trabajos (Schwartzberg *et al.*, 1989; Zijlstra *et al.*, 1989; DeChiara *et al.*,

1990; Koller *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1990) en los que el gen a mutagenizar en el cromosoma no era fenotípicamente seleccionable, por lo que las células que fueran recombinantes homólogas tuvieron que ser seleccionadas en cultivo mediante selección positiva simple o selección positiva-negativa; posteriormente estas células dieron lugar a la creación de quimeras portadoras del carácter previamente seleccionado. El esquema de esta estrategia se representa en la figura 8.

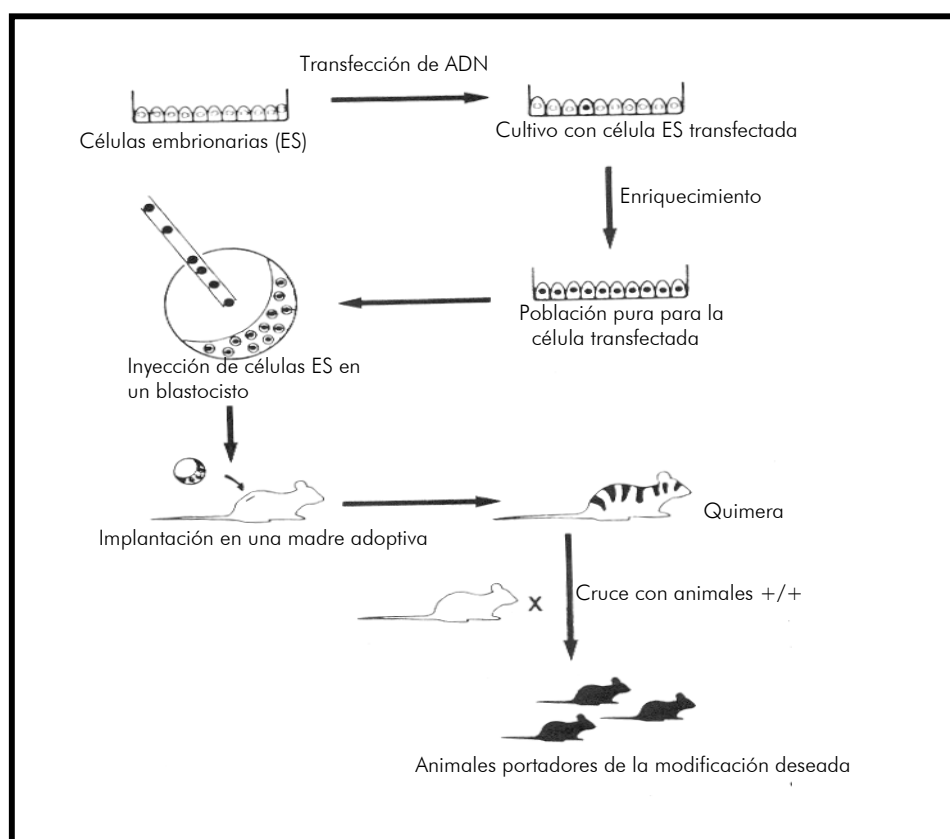


Figura 8: Generación de quimeras transmisoras en su línea germinal de una mutación dirigida. Tras la inserción de la mutación en una línea de células madre embrionarias, éstas son microinyectadas en un blastocisto. El blastocisto se transfiere quirúrgicamente al útero de una madre pseudogestante continuándose su desarrollo hasta el nacimiento. En el ejemplo las células ES derivan de un ratón homocigoto para la capa negra y el blastocisto es homocigoto para la capa albina. Las quimeras están compuestas de células de los dos genotipos y por tanto su capa lleva partes de ambos colores. Los ratones de capa negra descendientes del cruce de las quimeras con ratones albinos, serán portadores de la mutación que se habrá transmitido en la línea germinal.

Desde entonces la lista de trabajos que aprovechan esta estrategia para el estudio de un gen en particular no ha hecho más que agrandarse, contándose con cientos de líneas de ratones para los que se han creado distintos tipos de mutaciones dirigidas (<http://tbase.jax.org/>).

Las mutaciones dirigidas realizadas sobre líneas ES pueden ser de distintos tipos. Una de las estrategias más frecuentes es la de inactivación de la función del gen por simple interrupción de uno de sus exones (generalmente con un gen de resistencia, como Neo, para utilizarlo al mismo tiempo como medio de selección); estas mutaciones se denominan mutaciones nulas y los ratones portadores se llaman “knock-out” (KO) (Koller *et al.*, 1990; Thomas & Capecchi, 1990; McPherron *et al.*, 1997).

Una variante de este tipo son los “knock-in”, en los que se introduce en fase con el promotor y el codon ATG del gen diana, un ADNc de interés, que puede ser un gen informativo (p.ej. β -galactosidasa; Li *et al.*, 1997), o un gen con una expresión espacial o temporal diferente (Wang & Jaenisch, 1997).

Las mutaciones también pueden consistir en pequeñas sustituciones, inserciones o deleciones de uno o unos pocos aminoácidos, denominándose entonces mutaciones sutiles.

B.2. Mutagénesis condicional

Ya se ha indicado el interés en el análisis funcional del genoma de la creación programada de ratones portadores de diferentes modificaciones genéticas. Sin embargo, esas situaciones en las que los ratones son portadores de la mutación en todas sus células tienen también sus limitaciones, principalmente por dos razones: 1) en el caso en que la mutación en homocigosis sea letal para el embrión (un caso extremo sería cuando entrañase la muerte celular) sería imposible estudiar la función eventual del gen más allá del momento de la muerte del embrión; 2) un gen puede tener un perfil de expresión muy amplio en distintos momentos de la ontogenia y en distintos tipos celulares por lo que su invalidación implicaría un fenotipo complejo que afectaría a múltiples tejidos. Para simplificar el análisis, sería entonces útil poder crear ratones portadores de la mutación solamente en uno u otro tejido.

Para intentar rebasar estas limitaciones de la mutagénesis dirigida *in vivo*, distintos equipos han investigado durante los últimos años para poner a punto estrategias que permitan la existencia condicional de una mutación en el animal en desarrollo o en el adulto. Estas estrategias se basan en la utilización de una serie de recombinasas capaces de actuar sobre un par de secuencias específicas de ADN originando reacciones muy específicas de inserción, deleción, inversión o translocación según el punto y la orientación relativa de las secuencias diana.

Existen tres recombinasas, pertenecientes todas ellas a la familia λ de integrasas, utilizadas principalmente en la manipulación del ADN.

La recombinasa Cre, de 38 kDa, está codificada por el bacteriófago P1. Durante el ciclo lisogénico de *E. coli* P1 existe en forma de plásmido de una sola copia; en esta molécula se encuentra el gen de Cre además de un sitio *loxP* de 34 pb, reconocido por esta recombinasa. Su función durante el ciclo viral es la circularización de P1 al entrar en el hospedador, y también evitar la formación de dímeros del fago durante su replicación (Abremski & Hoess, 1984).

La recombinasa FLP, de 43 kDa, está codificada por el plásmido circular 2 μ de *Saccharomyces cerevisiae*; este plásmido posee dos dianas de 34 pb (FRT) reconocidas por la recombinasa y situados en posición inversa. La recombinación entre ambos FRTs resulta en la inversión de una mitad del plásmido con respecto a la otra, lo que proporciona un mecanismo para la producción de múltiples copias del plásmido a partir de un solo origen de replicación alternando la dirección de la migración de la horquilla de replicación (Andrews *et al.*, 1985; Kilby *et al.*, 1993). La eficacia de FLP es, en principio, menor a la de Cre debido a que funciona preferiblemente a 30°C, aunque en los últimos años se le han introducido mutaciones que han mejorado notablemente su eficacia (Buchholz *et al.*, 1998).

La tercera recombinasa, R, está codificada por el plásmido pSR1 de *Zygosaccharomyces rouxii*, donde lleva a cabo un papel similar al de FLP. Esta recombinasa solo se ha utilizado en levaduras y plantas (Onouchi *et al.*, 1991; Kilby *et al.*, 1993).

La recombinasa más utilizada y para la que existe más documentación es la Cre (*causes recombination*), que reconoce y provoca una recombinación dirigida entre dos secuencias *loxP* (*locus of crossover (x) in P1*) de 34 pb. La secuencia *loxP* consiste en dos repeticiones invertidas de 13 pb cada una y separadas por una secuencia no palindrómica de 8 pb, que dicta la orientación de la secuencia completa. La secuencia de *loxP* se representa en la figura 9. Cuando dos sitios *loxP* se encuentran a cada lado de un segmento de ADN se dice que dicho segmento está “floxado” (Torres & Kühn, 1997). La estequiometría del complejo Cre-*lox* es de dos moléculas Cre por sitio *lox* (Mack *et al.*, 1992) y la distancia mínima entre dos *loxP* para que recombinen ha de ser de 82 pb (Hoess *et al.*, 1985).

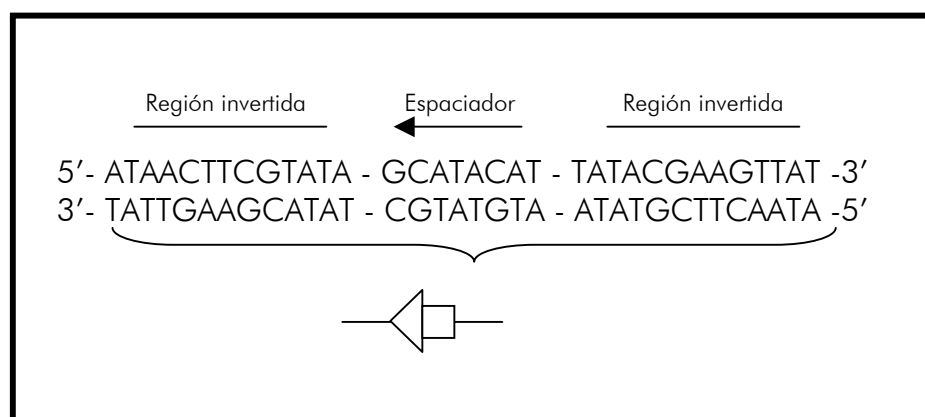


Figura 9: Estructura de la región *loxP*. El esquema muestra las dos regiones invertidas de 13 pb y la región espaciadora intermedia de 8 pb. Dicha región define la orientación del *loxP*, representado como se muestra en la zona inferior.

Una característica importante de esta reacción es que no requiere cofactores o proteínas accesorias para la recombinación (Abremski & Hoess, 1984). Esto hace del sistema Cre-*loxP* una herramienta especialmente útil en ingeniería genética y que se ha utilizado con

éxito tanto en cultivos de células mamíferas, como en bacterias, plantas y ratones (Kilby *et al.*, 1993).

Cuando dos sitios *loxP* están situados en la misma orientación en una molécula lineal de ADN la recombinación intramolecular mediada por Cre resultará en la escisión de la secuencia floxada en forma de molécula circular, dejando un sitio *loxP* en cada uno de los productos de reacción (figura 10a). La reacción inversa, una recombinación intermolecular entre una molécula circular de ADN y una lineal, cada una portadora de un *loxP*, supondrá la integración de la molécula circular en la molécula lineal. Por otro lado, una recombinación intermolecular entre dos moléculas lineales, cada una con un *loxP*, resultará en el intercambio recíproco de las regiones flanqueantes de los *loxP* (fig. 10b). Si los dos *loxP* están en posición opuesta, la región floxada se invertirá tras la recombinación (fig. 10c).

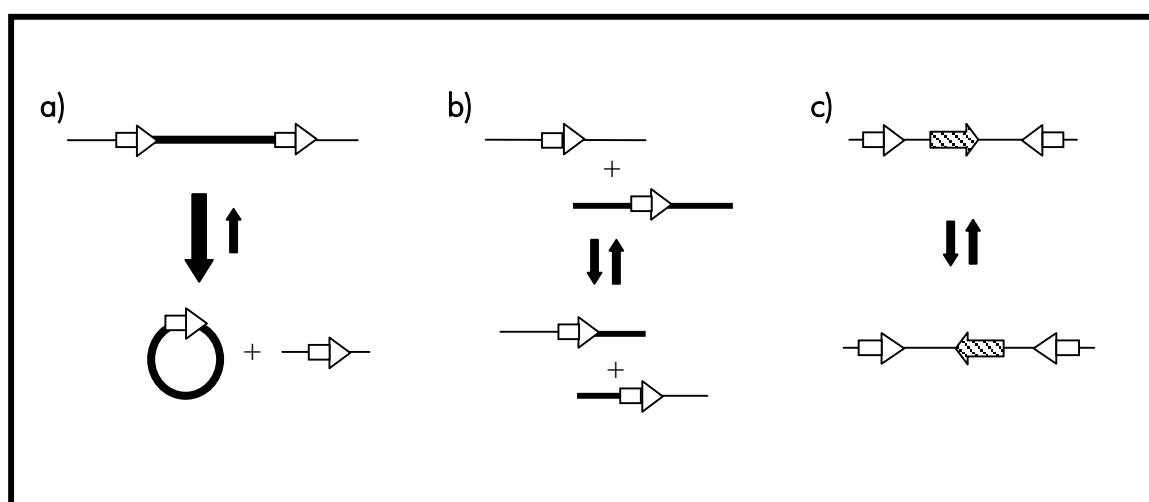


Figura 10: Productos de la recombinación intra e intermolecular mediada por Cre. a) Reacción de delección de la región entre dos *loxP*, b) Reacción de translocación, c) Reacción de inversión.

Uno de los objetivos más evidentes para el uso del sistema *Cre-loxP* es el de la eliminación del marcador de selección floxada: una vez que los recombinantes homólogos han sido identificados en un experimento diseñado para modificar, pero no anular, la función del gen se hace necesario evitar posibles interferencias del gen de selección (y sus propios elementos de regulación) en la función y/o regulación genética.

Consecuentemente, una vez el marcador de selección ha sido eliminado, permanece un *loxP* en el genoma. Para evitar posibles interferencias de este elemento *loxP* con la función del gen estudiado normalmente es suficiente con evitar situar dicho *loxP* en zonas de control como son las regiones promotoras o *enhancers* o cerca de las zonas de *splicing* de los intrones.

Uno de los primeros trabajos en células mamíferas fue el realizado por Sauer y Henderson (1988), en el que transfectaron células de ratón en cuyo genoma habían integrado previamente el gen Cre, con plásmidos portadores de dos secuencias *loxP* en orientación directa. Al observar la delección del fragmento definido entre los dos *loxP*, demostraron la capacidad de Cre de actuar en un sistema de células mamíferas a pesar de su origen procariota.

Lakso *et al.* (1992) y Orban *et al.* (1992) demostraron por su parte la eficacia del sistema Cre-*lox in vivo*, utilizando dos cepas de ratones: una transgénica para la proteína Cre (codificada bajo dependencia de un promotor tejido-específico), y otra portadora de una integración al azar con dos sitios *loxP* en orientación directa. Ambos equipos observaron la delección de los fragmentos floxados en los tejidos diana de la descendencia del cruce de ambas líneas de ratón.

Un año más tarde, el equipo de Rajewsky dio un primer paso hacia la mutagénesis condicional dirigida, demostrando la actividad de un plásmido portador de Cre sobre dos sitios *loxP* integrados por recombinación homóloga en el genoma de células ES (Gu *et al.*, 1993). Tras estas primeras evidencias, este mismo grupo construyó el primer ratón knock-out condicional, en este caso un knock-out específico de células T, que sufría la delección del gen de la ADN-polimerasa β solamente en estas células y no en el resto de tejidos (Gu *et al.*, 1994). Posteriormente se ha utilizado esta misma técnica para crear multitud de ratones knock-out condicionales (DiSanto *et al.*, 1995; Hennet *et al.*, 1995; Tsien *et al.*, 1996b).

Desde entonces se han ido describiendo varias líneas de ratón capaces de expresar Cre en tejidos específicos como las células piramidales (promotor CamKII; Tsien *et al.*, 1996a), corazón (promotor α -myosin heavy chain; Agah *et al.*, 1997), músculo esquelético (promotor muscle-creatine kinase; Brüning *et al.*, 1998), glándula mamaria (promotor β -lactoglobulina; Selbert *et al.*, 1998), etc.

B.2.1. Expresión inducible

Además de espacialmente, la acción de la recombinasa Cre también puede ser controlada temporalmente, situándola bajo la acción de un promotor con un patrón temporal de expresión concreto. Por ejemplo, Grobet *et al.* (2003) diseñaron un ratón knock-out para el gen de la miostatina cuya delección del tercer exón se producía sólo postnatalmente al estar la Cre-recombinasa situada bajo la acción del promotor MCK (Lyons *et al.*, 1991; Donoviel *et al.*, 1996; Brüning *et al.*, 1998). Pero además, la expresión de la recombinasa puede ser controlada específicamente por el experimentador, de modo que puede elegirse el momento preciso para producir la recombinación. Este control puede ejercerse a nivel transcripcional o a nivel post-traduccional.

El control transcripcional puede realizarse mediante promotores inducibles que controlen la expresión de Cre, como el promotor Mx1, inducible por aplicación de interferón α o β (Kühn *et al.*, 1995). Otro tipo de inducción es la realizada mediante transactivadores, como es el caso del sistema Tet: la presencia (Tet-ON; Utomo *et al.*, 1999) o ausencia

(Tet-OFF; St-Onge *et al.*, 1996) de tetraciclina induce la expresión del transactivador, que sintetiza una molécula que es en última instancia la que activa la transcripción de Cre por unión a su promotor.

El control a nivel post-traducciona l de la actividad de Cre puede llevarse a cabo mediante una proteína de fusión entre la recombinasa y un dominio de unión a ligando (LBD, ligand binding domain) de receptores esteroideos. La fusión de Cre a LBDs mutados del receptor de estrógenos (Feil *et al.*, 1996), del receptor de progesterona (Kellendock *et al.*, 1996) o del receptor de glucocorticoides (Brocard *et al.*, 1998) da como resultado unas proteínas recombinasas quiméricas que son activadas por ligandos sintéticos en cultivo pero no por los ligandos naturales del LBD correspondiente. En ratón se han realizado recombinaciones condicionales utilizando ratones Cre activados por tamoxifeno (Cre-ER^T), observándose recombinaciones de hasta el 100% en las células de algunos de los tejidos de los animales dobles transgénicos (Feil *et al.*, 1996; Metzger & Chambon, 2001).

C. MUTACIONES DOMINANTES-NEGATIVAS

A veces, el estudio de la función de un gen inactivándolo en la propia línea germinal no es asequible por problemas experimentales, o puede suceder que los resultados sean de difícil interpretación debido a la existencia de otras moléculas análogas (Amaya *et al.*, 1991). Igualmente, los estudios basados en la sobreexpresión de un gen implicado en una cadena de reacciones, pueden resultar ambiguos a la hora de evaluar su función frente a otras proteínas implicadas en el mismo proceso (Chen *et al.* 1993).

Por ello, otra posibilidad de estudio de la funcionalidad de un gen consiste en producir una mutación en el gen estudiado que codifique para un producto capaz de inhibir la proteína del alelo salvaje, y por tanto causar la deficiencia en la célula de la función de esa proteína concreta.

A este tipo de mutaciones se las denomina mutaciones dominantes negativas: “dominantes” porque su fenotipo se manifiesta en presencia del gen salvaje, y “negativas” porque además de ser proteínas afuncionales *per se*, inactivan la función de la proteína salvaje (Herskowitz, 1987).

En general, las proteínas mutantes dominantes negativas mantienen intactos y funcionales una serie de dominios de la proteína salvaje, pero el resto de dominios está alterado o ausente, de modo que no son funcionales (Herskowitz, 1987).

Según esto, y a grandes rasgos, estas mutaciones pueden clasificarse en mutaciones en proteínas multinómicas dependientes de oligomerización para su activación, y mutaciones en proteínas monoméricas. En el primer grupo, la presencia en un multímero de una subunidad mutante con el dominio de unión intacto pero con el dominio catalítico alterado, puede anular la función del multímero completo. En el caso de las proteínas monoméricas, las mutaciones dominantes negativas pueden ocurrir cuando el sustrato es limitante: un mutante capaz de unirse al sustrato pero no de metabolizarlo, competirá con la proteína salvaje ocasionando el efecto de dominancia negativa (Herskowitz, 1987; Wilkie, 1994).

Este tipo de mutaciones puede producirse naturalmente actuando a distintos niveles como por ejemplo por alteración del dominio catalítico sin alterar su dominio de oligomerización (receptor P2X1, Oury *et al.*, 2000) o por aumento de la afinidad con un represor (receptor de la hormona tiroidea, Matsushita *et al.*, 2000).

Estas y otras estrategias se han utilizado para crear artificialmente mutaciones de tipo dominante negativo: en proteínas de la familia B-HLHZip, inhibiendo el dominio de unión al ADN (Krylov *et al.*, 1997); utilizando el fragmento carboxi-terminal como proteína inhibidora dominante negativa (Ile-tRNAsintetasa, Michaels *et al.*, 1996 o MCP-1, Egashira, 2003); o eliminando el dominio intracelular del receptor R-FGF (Amaya *et al.*, 1991).

C.1. TGFβs y miostatina

En la familia de los TGFβs son múltiples los ejemplos de proteínas dominantes negativas producidas con el objeto de anular la funcionalidad de una proteína: López *et al.* (1992) introdujeron distintas mutaciones en el dominio amino-terminal de TGFβ-1 provocando la inhibición de su secreción; Wittbrodt & Rosa (1994) estudiaron la procedencia de la activina en la formación del mesodermo inyectando dos variantes dominantes negativas de la activina en un embrión; Hawley *et al.* (1995) crearon versiones dominantes negativas de BMP-7, BMP-4 y activina mutagenizando su diana de proteólisis, la misma estrategia que usaron Osada & Wright (1999) en el factor Xnr.

Finalmente, existen evidencias de proteínas dominantes negativas para la propia miostatina. Zhu *et al.* (2000) generaron mediante microinyección pronuclear líneas de ratones transgénicos que expresaban la miostatina bajo la acción del promotor MCK y cuya diana de proteólisis se había mutagenizado; estas líneas transgénicas exhibían un aumento significativo de la masa muscular como resultado de una hipertrofia de las fibras musculares.

Por su parte Yang *et al.* (2001) y Lee & McPherron (2001) generaron líneas transgénicas de ratón por microinyección pronuclear del dominio amino-terminal de la miostatina bajo la acción del promotor MLC (Myosin Light Chain). Estas líneas mostraron un significativo fenotipo musculado con un aumento en su peso corporal y de las canales, resultado de una hipertrofia de las fibras musculares.

Por último, Nishi *et al.* (2002) obtuvieron ratones transgénicos cuya masa muscular media doblaba prácticamente la de los ratones control y que era producto de una hiperplasia sin hipertrofia en las fibras musculares. En este caso, introdujeron una versión de la miostatina con la mutación C313Y descrita en la raza Piedmontese (Kambadur *et al.*, 1997) bajo la acción del promotor CAG. Berry *et al.* (2002) también observaron el efecto inhibitorio competitivo de la mutación C313Y al añadir exógenamente a un cultivo de mioblastos esta miostatina mutante junto a la versión salvaje y observar un aumento de la proliferación celular según aumentaba la relación mstnC313Y: mstn salvaje.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

A. Miostatina activable condicionalmente

La mejora de la calidad y cantidad muscular del ganado bovino productor de carne ha supuesto un esfuerzo especial por parte de los ganaderos y también de la comunidad científica del sector.

El hecho de que las mutaciones que anulan la actividad de la miostatina en el ganado bovino den lugar a animales aún viables y fértiles y con una producción cárnica de elevada calidad muestra el potencial valor económico que podría obtenerse de la explotación de este genotipo. A pesar de ello, existe una serie de desventajas como los problemas de distocia asociados a la hipertrofia muscular, que sería deseable eliminar.

Pese al creciente número de publicaciones al respecto, aún se conoce poco sobre los mecanismos por los que la miostatina regula la masa muscular y dado que su utilización óptima requeriría un conocimiento detallado de su modo de acción, se persigue contribuir a una mejor comprensión de la biología molecular de esta proteína.

La constatación de que la miostatina se expresa tanto a lo largo de prácticamente todo el desarrollo embrionario, como durante el estado adulto, hace posible pensar en una estrategia de modulación dirigida condicionalmente sobre la actividad temporal de la miostatina.

De este modo, y con objeto de estudiar la versatilidad de la actividad temporalmente dirigida de la miostatina, se ha considerado la creación de una línea de ratón “Mstn OFF to ON” en la que podría activarse condicionalmente el gen de la miostatina inicialmente inactivo.

Este sistema permitiría un estudio sobre la capacidad de la miostatina de recuperar, en distintos momentos del desarrollo del embrión o en el adulto, su función previamente inexistente.

Este estudio se realiza de modo complementario a un trabajo previo desarrollado en otro equipo en el que se persigue el objetivo opuesto: una inactivación condicional, donde la estrategia realizada consiste en la creación de una línea de ratón knock-out condicional (Mstn ON to OFF) (Grobet *et al.*, 2003).

Con este estudio se pretenden crear las herramientas preliminares necesarias para obtener un aporte científico de orden fundamental en cuanto a lo que concierne a la expresión y a las posibilidades de regulación de la miostatina, profundizando en la capacidad de un fenotipo hipertrófico de revertir a un fenotipo normal. Además, este estudio pretende también una aportación a probables alternativas a la utilización zootécnica de variantes actuales de la miostatina en el ganado bovino. Así, por ejemplo, podría considerarse la posibilidad de regular la masa muscular del feto, y con ello atenuar los problemas de distocia, controlando el momento de activación de la miostatina.

B. Miostatina dominante-negativa

Como ya se ha mencionado, en los últimos años se ha dirigido un importante esfuerzo hacia la mejora de la calidad de carne de distintas especies ganaderas. La identificación de la miostatina ha permitido no sólo su aplicación a los programas de mejora, sino que además ha abierto una vía para buscar alternativas a los efectos menos deseables del fenotipo culón así como a mejoras terapéuticas dirigidas al ámbito de la salud humana.

El hecho de que la manifestación del fenotipo culón requiera de la presencia de dos copias afuncionales del gen, merma el valor económico de los individuos heterocigotos. Por ello, los alelos dominantes negativos de la miostatina tienen un indudable interés tanto en el caso de cruzamientos intrarraciales (en el caso de animales que se exploten por sus aptitudes carniceras -como la raza Asturiana de los Valles-), como en el caso de los cruzamientos industriales, destinados a aumentar el valor residual de los terneros de razas lecheras (como la raza Frisona) que no vayan a reposición.

Por otro lado, ya se ha visto que existen distintas líneas de investigación dirigidas al bloqueo de la miostatina con fines terapéuticos, esto unido a la observación de que la expresión de la miostatina se alarga durante todo el estado adulto, permite pensar que otra posible aplicación de estas construcciones dominantes negativas es su uso en el período postnatal, de modo que se eliminen los problemas asociados al parto bloqueándose la miostatina en los animales una vez nacidos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudio de la capacidad de un sistema condicionalmente activable ("Mstn OFF to ON") de bloquear la miostatina en orientación activa y su evaluación en sistemas *in vitro*, bacteriano y celular.
2. Evaluación de la capacidad de distintos alelos de la miostatina potencialmente dominantes negativos de interactuar con la miostatina salvaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE ACTIVACIÓN CONDICIONAL DE LA MIOSTATINA EN CÉLULAS ES

A.1. Diseño de un sistema “Mstn OFF to ON”. Justificación

Para el diseño de esta estrategia se ha escogido la propiedad del sistema Cre-lox de invertir las secuencias de ADN situadas entre dos lox en orientación inversa. De este modo, se han situado los lox a cada lado del exón 3 (que codifica para la región activa de la miostatina) previamente invertido, de manera que la expresión de esta secuencia dará lugar a una proteína no funcional. Sólo cuando la recombinasa Cre esté presente en el medio, la recombinación entre ambos lox devolverá al exón a su orientación original y la expresión del gen podrá dar lugar a una proteína normal. Teniendo en cuenta que ambos lox permanecerán en la configuración final del gen, se ha buscado situarlos en zonas descritas como de baja homología entre especies (ver apartado A.2.1.), que es un indicativo de la ausencia de una posible función reguladora o de splicing en esa región.

Esta estrategia ya ha sido utilizada con éxito en células mamíferas, como las células tk⁺ Rat2 (Kano *et al.*, 1998) y en células ES (Lam & Rajewsky, 1998; Zheng *et al.*, 1999; Kmita *et al.*, 2000) generándose inversiones de entre unas pocas kb hasta 30 cM. Estas células, tras la reacción de recombinación, han sido incluso utilizadas para la creación de ratones transgénicos perfectamente viables.

Igualmente, se han observado estas reacciones de inversión *in vivo*, bien mediante transfecciones transitorias en el cigoto con vectores de expresión Cre (Tanimoto *et al.*, 1999) o bien mediante el cruce de ratones portadores de la inversión con ratones Cre inductibles (Lam & Rajewsky, 1998). Estas experiencias evidencian la posibilidad de realizar inversiones *in vivo* sin problemas de pérdida cromosómica, frente a las observaciones de Lewandoski & Martin (1997) realizadas en embriones portadores de loxP en orientación inversa en su cromosoma Y.

Además, la eficacia observada por Lam & Rajewski (1998) de la reacción de inversión era semejante a la observada para la delección bajo las mismas condiciones.

El mecanismo de inversiones Cre-lox, al ser un evento intramolecular, presenta la característica de su reversibilidad, es decir, mientras Cre esté presente en el medio el segmento flojado puede recombinar en un continuo “flip-flop”, obteniéndose un promedio del 50% de cada configuración.

En la hipertrofia muscular se ha observado que un 50% de miostatina funcional origina un fenotipo mucho más cercano al normal que al culón. Como el objetivo último de esta investigación es el de obtener un mecanismo que permita observar el fenotipo resultante de la activación condicional de la miostatina, sería deseable poder contrastar situaciones de inactividad total con situaciones de actividad completa.

Para ello se ha recurrido a una estrategia que permita el bloqueo del segmento flojado en posición invertida, una vez que la Cre ha actuado una sola vez.

Esta estrategia se basa en el uso de *lox* mutados descritos por Albert *et al.* (1995). Estos *lox* consisten en una mutación de 5 pb en la región invertida de los extremos: *lox66* (región izquierda) y *lox71* (región derecha). Sus secuencias se representan en la figura 11.

Ambos tipos de *lox* son reconocidos por la Cre con una afinidad sólo algo menor que con los *loxP*, pero el producto de recombinación entre ambos cuando están en orientación inversa, da lugar a un doble mutante (*lox72*) difícilmente reconocido por la misma enzima. Esto provoca un desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia la configuración invertida. Este sistema también se ha utilizado para favorecer las reacciones de integración de una secuencia en el genoma, frente a su delección del mismo (Araki *et al.*, 1997). Ambas reacciones se representan en la figura 12.

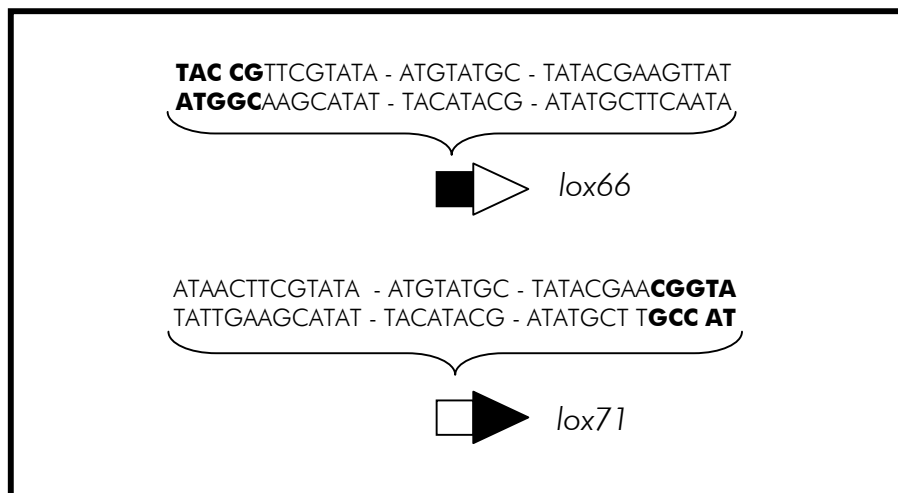


Figura 11: Secuencia de los *lox* mutantes *lox66* y *lox71*. En negrita se indica la región mutada en cada uno de ellos. En la parte inferior se muestra la representación esquemática de estos *lox*.

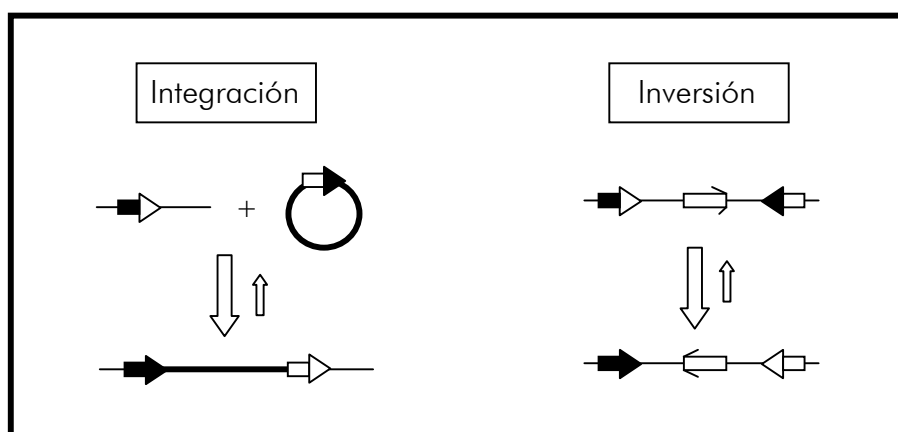


Figura 12: Reacciones de integración e inversión utilizando *lox* mutados. Los desplazamientos del equilibrio de la reacción vienen indicados por la flecha de mayor tamaño.

Albert *et al.* (1995) ya observaron, de hecho, que la reacción *in vitro* entre un *lox66* y un *lox71* situados en orientación inversa conservaba un 50% de la eficacia en comparación a la observada entre dos sitios *loxP*, y favoreciendo finalmente, en un factor de hasta 5 veces, la producción de la forma invertida, flanqueada de un *loxP* y un *lox* doble mutante.

Finalmente, la estrategia mencionada quedaría diseñada como se representa en la figura 13. Dado que el mecanismo permite que un alelo inactivo de la miostatina revierta en un alelo activo, se ha denominado a esta estrategia "Mstn OFF to ON".

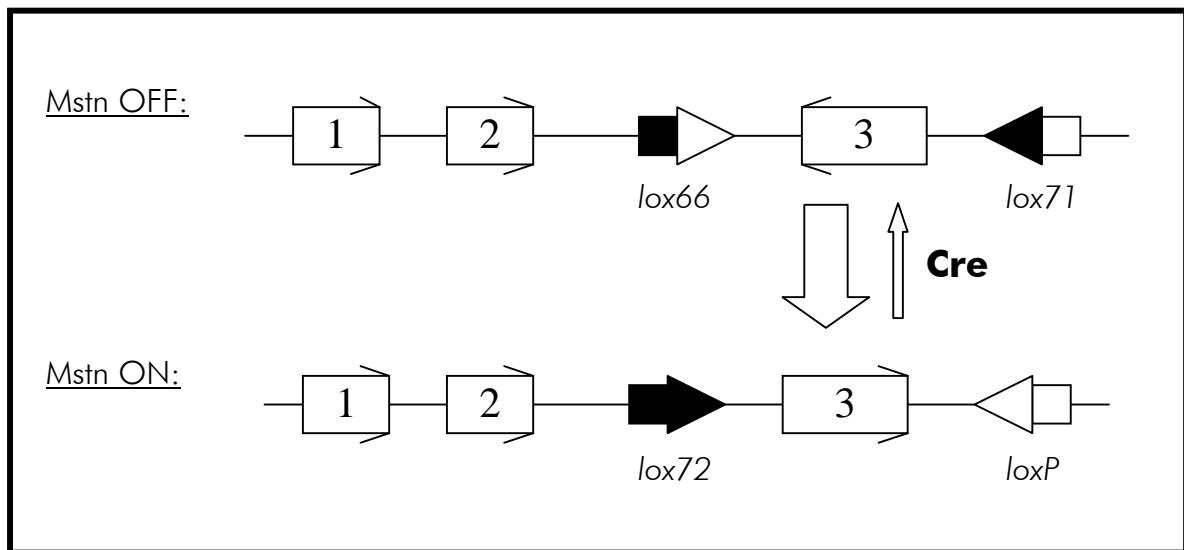


Figura 13: Representación esquemática de la estrategia "Mstn OFF to ON". El grosor de las flechas señala el desplazamiento de su equilibrio en presencia de Cre.

A.2. Antecedentes

A.2.1. Secuenciación y caracterización del gen de la miostatina a partir de clones genómicos de ratón y bovino en un vector lambda

Esta parte del trabajo se describe en detalle por Royo (2002). Resumiéndolo brevemente, se trabajó con dos clones, uno de ratón de 15,4 kb y otro bovino de 17,4 kb, aislados a partir de sendas librerías comerciales construidas en vectores de remplazamiento de tipo fago lambda. El aislamiento se efectuó por métodos convencionales con la ayuda de una sonda de cDNA de miostatina bovina marcada con P³² (Grobet *et al.* 1997). La librería de ratón procedía de tejido hepático de un macho de la línea C57BL/6N. Además de los tres exones del gen de la miostatina, cada uno de estos clones contenía más o menos 5 kb en 5' y 3'. Estos clones se secuenciaron completamente. La descripción de las extremidades del transcrito se realizó mediante cRACE (Maruyama *et al.*, 1995) y 3' RACE,

respectivamente. Los límites intrón-exón se determinaron mediante la comparación de la secuencia genómica y del cDNA identificadas previamente. La búsqueda de elementos reconocidos por factores de transcripción músculo-específicos se realizó con ayuda de un algoritmo de análisis de regresión logística (Wasserman & Fickett, 1998). Igualmente, se alinearon las secuencias de ratón y bovina, permitiendo la puesta en evidencia de regiones altamente conservadas, consideradas así funcionalmente importantes (“footprints filogenéticos”). A la inversa, las regiones con poco o ningún grado de homología y favorablemente situadas en función de los objetivos perseguidos, han sido elegidas para la introducción de elementos exógenos por ingeniería genética (figura 14). De hecho, ya se ha demostrado que los *loxP* flanqueantes del tercer exón de la miostatina en los puntos seleccionados no afectan a la funcionalidad del alelo de la miostatina (Grobet *et al.*, 2003).

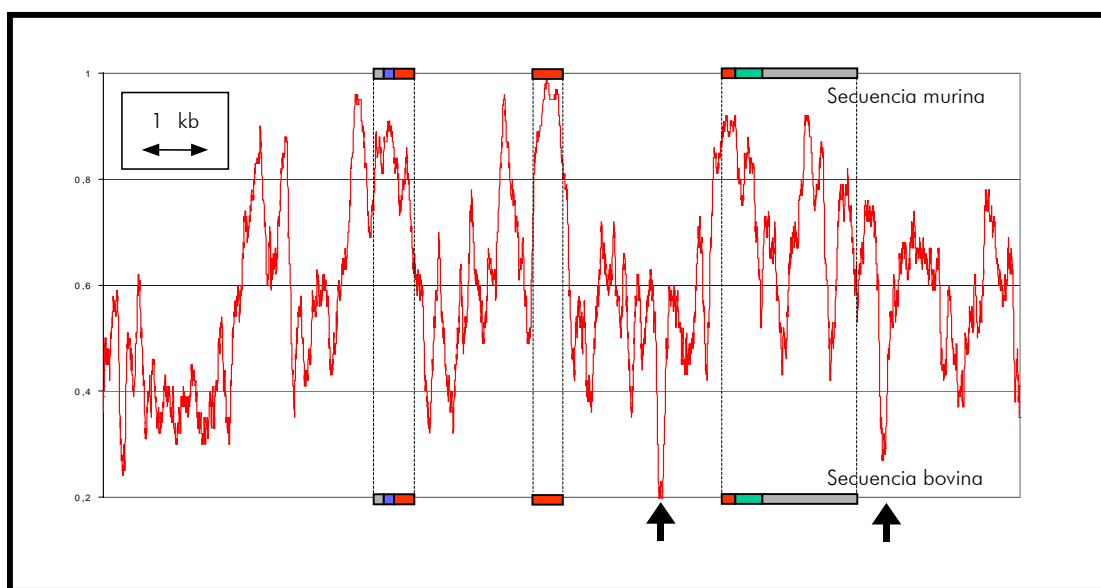


Figura 14: Footprint filogenético de las secuencias bovina y murina del gen de la miostatina. Se muestran las cantidades (en tanto por uno) de homología entre ambas secuencias. Las flechas señalan los puntos elegidos para la inserción de los elementos exógenos (sitios *lox* y gen de Neo-resistencia) necesarios para la ingeniería del gen.

A.3. Ingeniería genética de la miostatina para transgénesis por recombinación homóloga: creación de una construcción “Mstn OFF to ON”

A.3.1. Modificación del plásmido pNEB193 por mutagénesis dirigida

La ingeniería genética de la construcción, tal y como ha sido concebida, ha requerido la modificación de un plásmido derivado de pUC19 con el fin de suprimir ciertas dianas de

restricción y de añadir otras. El plásmido original (pNEB193, New England Biolabs) fue objeto de una doble digestión con *AatII* y *EcoRI* y posteriormente recircularizado tras la acción de la *Mung-bean* nucleasa; tras ello fue sometido a cinco reacciones de mutagénesis con ayuda del kit *Chameleon™ Double-Stranded, Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) dirigidas en cuatro experiencias paralelas, cada una de ellas con un objetivo diferente en el plásmido: (1) a nivel del polilinker: remplazamiento de una diana de restricción única *PacI*, por una diana *BssSI*, (2) en la región entre el gen β -lactamasa (resistencia a la ampicilina) y el ORI: adición de dianas *PacI* y *Swal*, (3) en la secuencia codificante de la β -lactamasa (nt 2390): eliminación de una diana *BssSI*, (4) en una región no codificante (nt 2697): eliminación de una segunda diana *BssSI*, (5) tentativa no concretizada de eliminación de una diana *BssSI* en el ORI (nt 1006). El plásmido final, pPonc1, se obtuvo por ensamblaje de los distintos fragmentos de restricción resultantes de los plásmidos modificados, y fue verificado mediante secuenciación.

El principio de actuación del kit de mutagénesis se expone en la figura 15. Dicho protocolo se extiende a lo largo de dos días; en el primero de ellos el plásmido diana de doble hebra se desnaturaliza por calor, lo que permite la hibridación simultánea de los dos cebadores a una de las dos hebras. Uno de los cebadores, el de selección, cambia una diana de restricción única y no esencial por una nueva secuencia de restricción. El otro cebador (de mutagénesis) codifica para una mutación específica en una secuencia definida del gen de interés inserto en el plásmido. Ambos cebadores amplifican a lo largo del plásmido utilizando una mezcla de nucleótidos y enzimas que contiene ADN-polimerasa T7 nativa y ADN-ligasa T4. La hebra recién creada de este modo contiene la mutación deseada pero careciendo ahora de la diana de restricción única. Por lo tanto, coexisten diversas poblaciones de plásmidos: aquellos que han incorporado la mutación y aquellos que no lo han hecho. En el siguiente paso se digiere todo el ADN plasmídico con la enzima correspondiente a la diana de restricción única presente en el plásmido parental no modificado. Los plásmidos parentales no modificados resultarán digeridos, mientras que los plásmidos modificados permanecerán circularizados; esto supone ya una selección a favor de los plásmidos modificados y circulares en la etapa de transformación. Como la eficacia de transformación de los plásmidos circulares es exponencialmente mayor que la de los plásmidos lineales, los mutantes se verán favorecidos. Este ADN plasmídico se transforma en una cepa de *E.coli mutS*, deficiente en su mecanismo de reparación (p.ej. células competentes *XLmutS*), y por tanto incapaz de distinguir la hebra original no modificada de la hebra con la mutación deseada. La cepa deficiente para *mutS* selecciona al azar una de estas hebras como "correcta" y amplifica la otra hebra de manera complementaria. Dado que la selección de la hebra correcta es al azar, la mitad de los plásmidos contendrán la mutación deseada y la otra mitad revertirán a la secuencia original. Esta cepa transformada puede sembrarse o, con objeto de aumentar el número de plásmidos mutantes presentes, (y como se ha procedido en estos experimentos) puede cultivarse en medio líquido durante toda la noche. Al día siguiente se aísla el ADN plasmídico y se vuelve a digerir con la enzima correspondiente al cebador de selección. El ADN resultante se vuelve a transformar, esta vez en células competentes Epicurian Coli^R XL1-Blue o cualquier otra cepa corriente de transformación. Los plásmidos obtenidos se analizan por secuenciación para confirmar sus mutaciones.

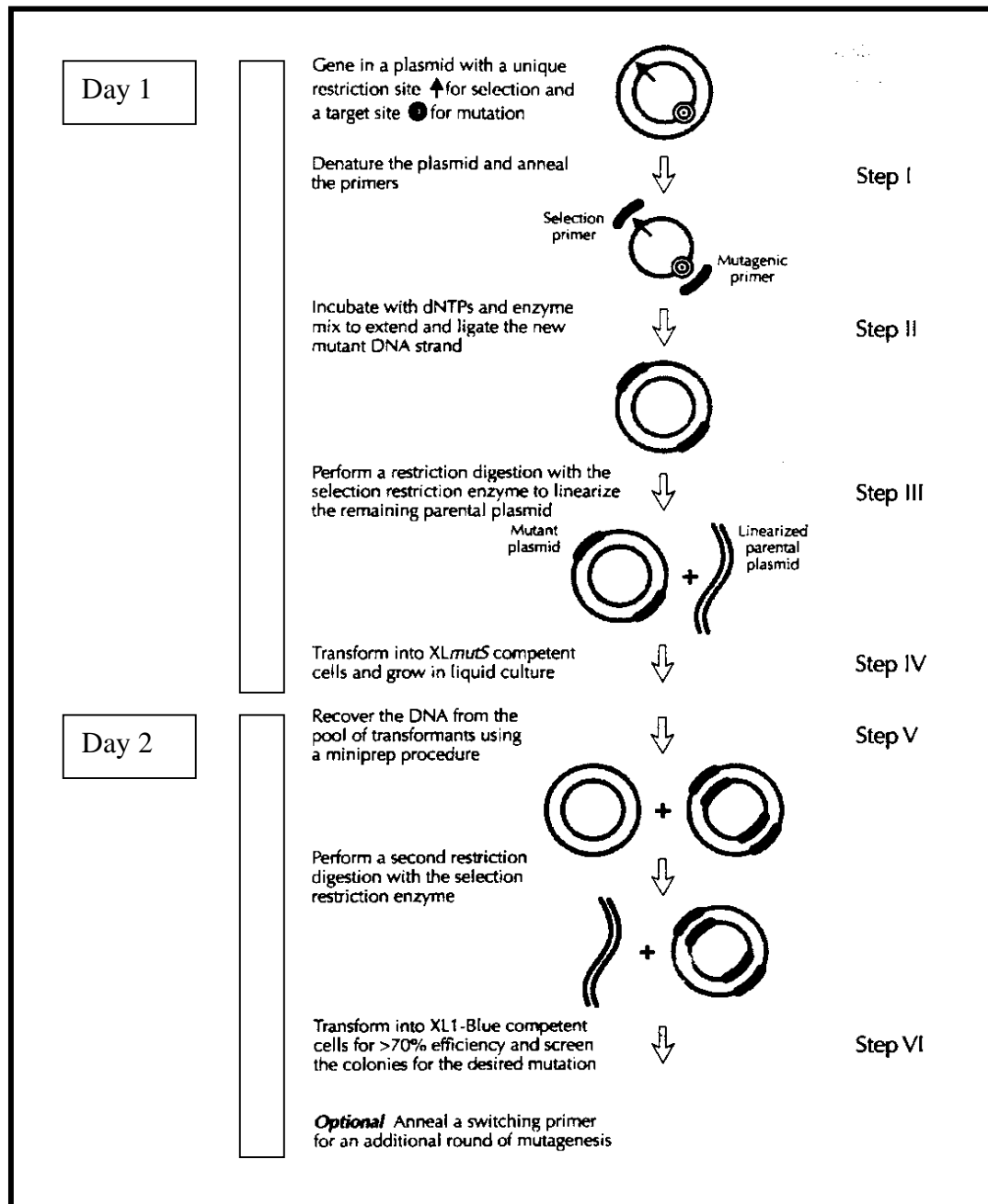


Figura 15: Principio de mutagénesis dirigida. Estrategia utilizada para modificar directamente el plásmido pNEB193 (*Chameleon™ Double-Stranded, Site-Directed Mutagenesis Kit*; Stratagene).

La tabla I muestra los cebadores y las enzimas de restricción utilizados en las etapas de mutación-selección de pNEB193.

Tabla I. Cebadores y enzimas de restricción utilizados en la mutagénesis dirigida

<u>Polilinker</u>	
<i>PacI</i> → <i>BssSI</i> :	pGGGCGCGCCGGATCCTCTCGTGAGTCTAGAGTCGACTG
Cebador de selección:	pCATCATTGGAAAACGCTCTTCGGGGCG
Selección:	<i>PacI</i>
<u>Entre β-lactamasa y ORI:</u>	
+ <i>PacI</i> + <i>Swal</i> :	pCCTTTTAAATTAATTAATTAATTTAAATCAATCTAAAG
Cebador de selección:	pCATCATTGGAAAACGCTCTTCGGGGCG
Selección:	<i>XmnI</i>
<u>Diana <i>BssSI</i> (nt 2697):</u>	
- <i>BssSI</i>	pCCTATAAAAATAGGCGTATCAGGAGGCCCTTTCGTC
Cebador de selección:	pCATCATTGGAAAACGCTCTTCGGGGCG
Selección:	<i>XmnI</i>
<u>Diana <i>BssSI</i> (nt 2390, β-lactamasa)</u>	
- <i>BssSI</i>	pGTTTCGATGTAACCCACGCGTGCACCCAACTGATC
Cebador de selección:	pCATCATTGGAAAACGCTCTTCGGGGCG
Selección:	<i>XmnI</i>
<u>Diana <i>BssSI</i> (nt 1006, ORI)</u>	
- <i>BssSI</i> :	pCCCCTGGAAGCTCCCTCCTGCGCTCTCCTGTTCCG
Cebador de selección:	pCATCATTGGAAAACGCTCTTCGGGGCG
Selección:	<i>XmnI</i>

A.3.2. Clonado del gen de ratón fragmentado en pPonc1 y adición de genes de resistencia

El clonado y la ingeniería genética del ADN genómico de ratón se efectuaron mediante métodos clásicos de digestión y ligado, sin recurrir a la PCR (Sambrook *et al.* 1989). Las enzimas utilizadas, tanto de restricción como la ligasa, son de New England Biolabs, excepto en las digestiones en que se menciona, y dichas reacciones, salvo en los casos especificados, son siempre durante toda la noche. Se utilizó en todos los casos un exceso de unidades de entre cinco y diez veces la cantidad necesaria. Las transformaciones convencionales se hicieron con células competentes *Max Efficiency^R DH5 α TM Competent Cells* (Life Technologies, GIBCO BRL), siguiendo los protocolos indicados. Los clones para verificación rápida por PCR se picaron y dejaron crecer durante toda la noche en 200 μ l de LB+Amp (ver Apéndice de Reactivos). Los cebadores para dichas verificaciones se muestran en la tabla II. Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron siguiendo los protocolos de Qiagen (*Plasmid Mini kit*) utilizando soluciones P1, P2 y P3 propias (ver Apéndice de Reactivos) y sustituyendo la filtración en columnas por una centrifugación a 13.000 rpm, 30' a 4°C; los productos se resuspendieron siempre en TE 1x. Las purificaciones en gel se realizaron utilizando agarosa FMC (Geaken GTG) y TAE 1x con ayuda del kit de purificación GeneClean (BIO101). Los marcadores de peso molecular utilizados en agarosa fueron 100 bp y 1 kb Smart-Ladder (Eurogentec) y 1 kbp Ladder (Biotools) (ver Apéndice de Marcadores). Las PCRs se realizaron con Taq y reactivos de Perkin Elmer; los deoxinucleótidos son de Amersham Pharmacia, Biotech Inc. Las secuenciaciones se realizaron con ayuda del *ABI Prism[®] BigDyeTM Terminator Cycle*

Sequencing Ready Reaction Kit en un secuenciador ABI 377 (Perkin Elmer) con el programa de análisis de secuencia versión 3.0. Los terminadores fluorescentes de la reacción se eliminaron mediante precipitación acetato-etanólica seguida de lavado en etanol 70% para evitar interferencias con la lectura de la electroforesis. Las construcciones intermedias utilizadas aparecen esquematizadas en el Apéndice de Construcciones.

Tabla II: Secuencia de los cebadores utilizados en las verificaciones por PCR o secuenciación de las distintas construcciones

rev 25	CACACAGGAAACAGCTATGACCATGA
24UP	GAGGAGGTATGAATGTCATTTC AAC
GDF8-19	AATGTATGTTTATATTTACCTGTT CATG
16DN	ATTTCA TTGTCGGTATGTTTCTCAG
MM64	TATACATACAGCCACTGTCATCATG
MM65	AATTGGCAGTGGTATATACTCCTAG
12UP	TGGGTGTGTCTGTACCTTGACTTC
NeoCas2	CATTCCAGGCCTGGGTGGAGAGGCT
MM67	GGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGAC
TK7	CTTGTTCCAAACTGGAACAACACTC
Seq24	CGACGTTGAAAACGACGGCCAGT
Cham-mut:	CGAATTCGTCGACCTCGAGCTACCG
Sou3'5'1	AATGTATTGTA CT CATAGCTAAATG
M13for-20	GTTGTA AAAACGACGGCCAGTG
12DN	CTACCTTCATCAGGTCAGGGATGTG

A.3.2.1. Preparación del inserto genómico de ratón

El clon genómico de ratón en el vector lambda se cultivó en fase líquida mediante protocolos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989) y se extrajo utilizando el kit Qiagen *lambda midi*. El inserto de 15'3 kb se aisló con *Sall* purificándose en gel de agarosa (GeneClean) y tras ello, fue digerido con *BssSI* y *Bsal* en cuatro fragmentos separados a su vez mediante gel de agarosa. Los tamaños de fragmento aparecen en la figura 16.

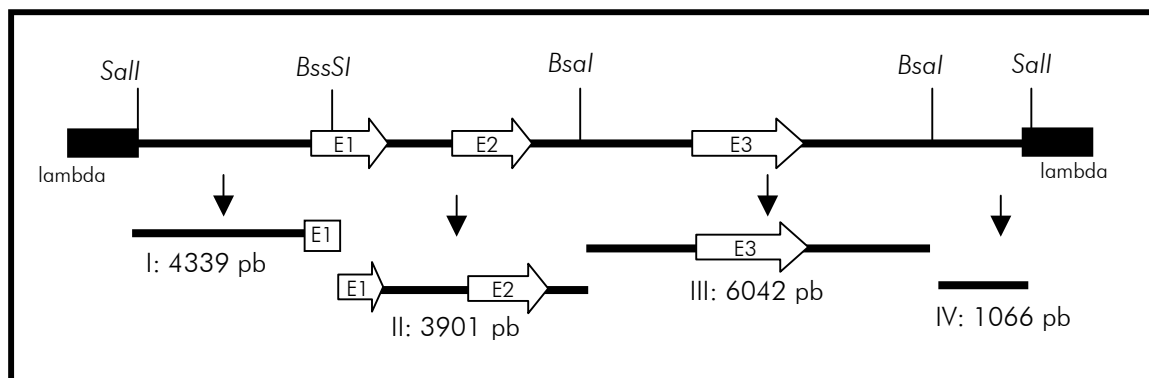


Figura 16: Tamaños de fragmento del inserto de ratón escindido con *Sall* tras digestión con *BssSI* y *Bsal*.

A partir de aquí nos referiremos como extremos 5' y 3' de los fragmentos para indicar la polaridad desde el exón 1 al exón 3. El fragmento *Bsal-Sall* en 3' (IV) de 1066 pb se descartó para posterior uso, mientras que los otros tres se clonaron separadamente para su manipulación en pPon1, como se describe a continuación.

A.3.2.2. Adaptadores utilizados en el clonado

Con el fin de permitir el ligado de extremidades no cohesivas, y también para introducir nuevas dianas de restricción o sitios *lox*, se generó una serie de adaptadores oligonucleotídicos. Para la hibridación de los dos fragmentos nucleotídicos que forman un adaptador se mezclaron 2 μ l (1mM) de cada oligonucleótido con 3 μ l de NaCl 5M y se llevó a un volumen final de 100 μ l con TE. La reacción se incubó durante 10' a 90°C y se dejó enfriar lentamente. La figura 17 muestra las secuencias y características de dichos adaptadores.

A) Adaptadores "clásicos"	
1	5'- TAGGGGTTGCGGCCGCTT GG - 3' 3'- CCAACGCCGGCGAACCGCGC - 5' <i>Bsal</i> * <i>NotI</i> <i>Ascl</i>
2	5'- CCAAGCGGCCGCAA - 3' 3'- TCGAGGTTGCGCCGGCGTTGATCC - 5' <i>SacI</i> <i>NotI</i> <i>Bsal</i>
3	5'- CTGACGAGACCC TATT CCTGG - 3' 3'- GCT CTGGGATAAGGACCGCGC - 5' <i>Bsal</i> <i>Ascl</i>
4	5' - TCGACGTCC TCGTGC TTGGCGCGCCC TGTCTC - 3' 3' - GCAGGAGCACGAACCGCGCGGGACAGAGTTAA - 5' <i>Sall</i> <i>BssSI</i> <i>Ascl</i> <i>ApoI</i>
5	5' - CGCGGACTGTCTCTGCT GTCT ATTCC TCAC - 3' 3' - CTGACAGAGACGACAGATAAGGAGTGTTAA - 5' <i>Ascl</i> * <i>ApoI</i>
6	5' - TCGATAGTCTT CTATT CCGT CTT CTCC TCGC - 3' 3' - ATCAGAAGATAAGGCAGAAGAGGAGCGCCGG - 5' <i>XhoI</i> * <i>NotI</i>

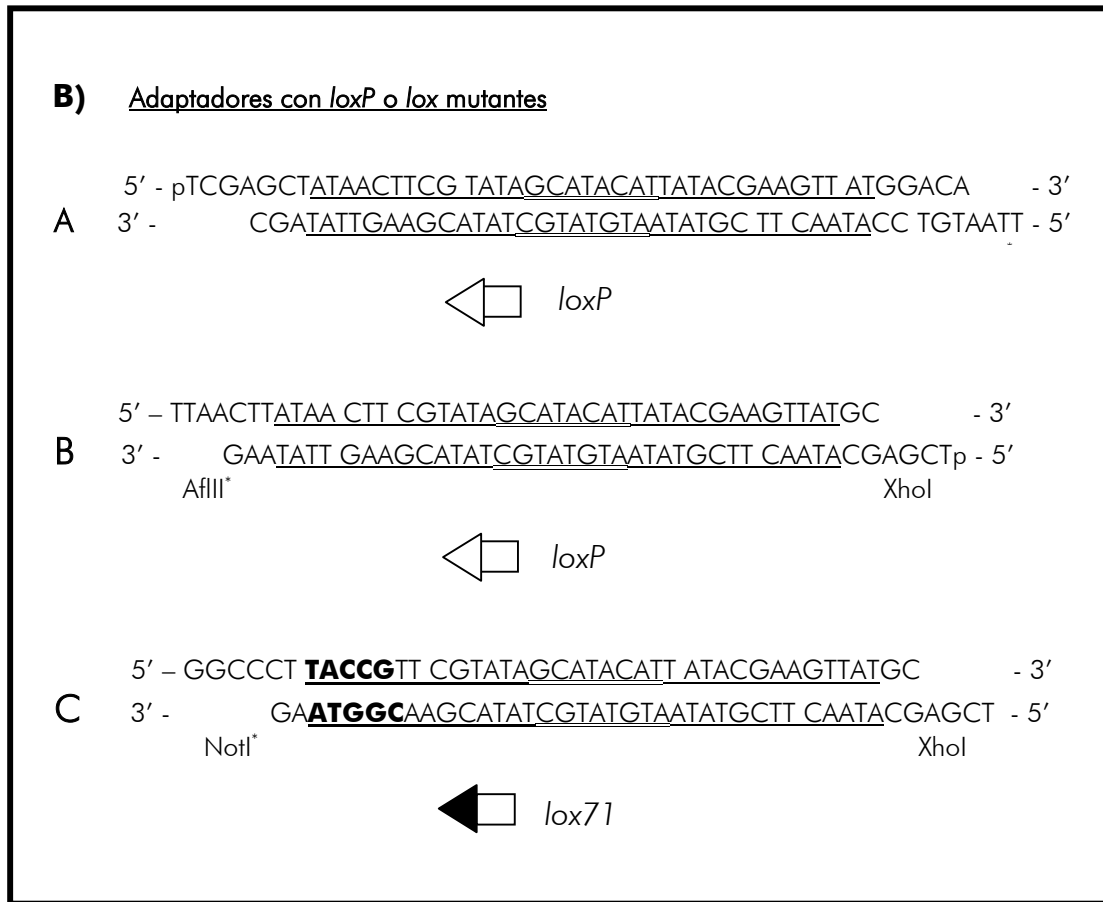


Figura 17: Secuencia y características de los adaptadores “clásicos” (A) y con *loxP* o mutantes (B) utilizados. Cada adaptador está formado por dos oligonucleótidos denominados respectivamente “N₁” y “N₂”. Los asteriscos indican las secuencias cohesivas que no restauran la diana de restricción. “p” indica la fosforilación del oligonucleótido. La región subrayada hace referencia a las secuencias completas de los *lox*, el doble subrayado muestra la región media de los *lox* y en negrita se indica la secuencia modificada.

A.3.2.3. Clonado de los fragmentos I, II y III en pPonc1

La forma linearizada del producto de digestión parcial de pPonc1 con *BssSI* (20 minutos, con posterior inactivación de la enzima), se digirió completamente con *Sall*. Tras separación en gel de agarosa, la banda de 2'7 kb se aisló y ligó al fragmento I (4339 pb) del gen, dando lugar a la construcción pPonc1a, esquematizada en la figura 18.

Los productos de linearización obtenidos por digestión parcial *BssSI* de pPonc1 fueron digeridos en su totalidad por *Ascl*. Tras separación en gel de agarosa, la banda de 2'7 kb se aisló y ligó al fragmento genómico II (3901 pb) con ayuda del adaptador 1 (figura 17), dando lugar a pPonc2a, representado en la figura 18.

Tras linearización de pPonc1 por doble digestión con *Ascl* y *Sacl*, el fragmento genómico III (6042 pb) se ligó al vector linearizado con ayuda de los adaptadores 2 y 3 (figura 17). El plásmido resultante, pPonc3a, se esquematiza en la figura 18.

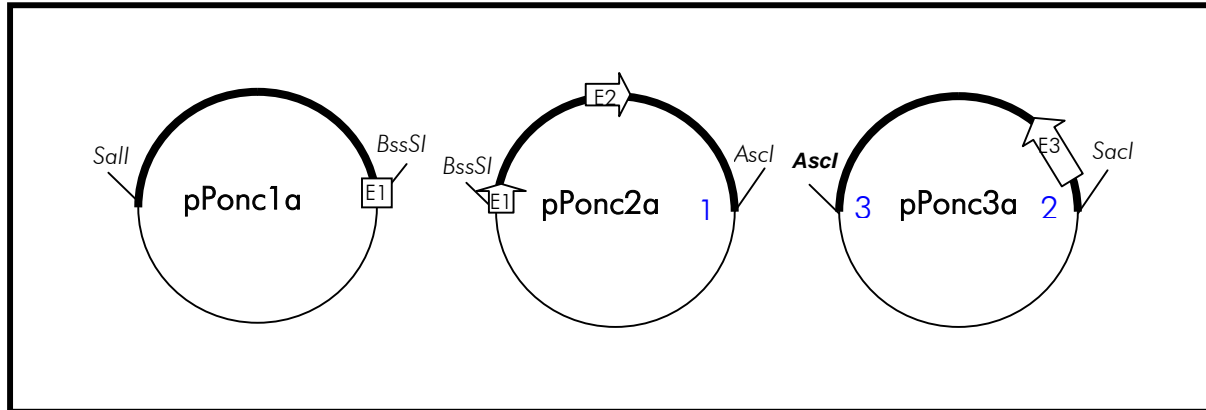


Figura 18: Representación esquemática de los plásmidos resultantes de la inserción de cada uno de los fragmentos de ratón I, II y III en pPonc1. Las dianas de restricción señaladas en negrita se refieren a las utilizadas en la etapa siguiente de manipulación. En azul se indican los adaptadores utilizados. Las líneas más gruesas representan el ADN clonado y la línea fina, el vector.

A.3.2.4. Modificación del fragmento III en pPonc3a: adición de los cassettes de expresión eucariota HSV-TK y Neomicin-transferasa (Neo^R) flanqueado de dos *loxP* en 3' del exón III

A partir del plásmido pcDNA3hsvTK (gentileza de F. Princen, Ulg, Lieja, Bélgica), se aisló un cassette de expresión eucariota HSV-TK contenido en un fragmento de restricción *ApoI*-*ApoI* de 2676 pb. Tras digestión de pPonc3a con *Ascl* y *Sall*, se ligaron dos adaptadores (4 y 5, figura 17) y el fragmento *ApoI*-*ApoI* a dicho plásmido linearizado.

El cassette de resistencia a la neomicina se incluye en un fragmento *Sall*-*XhoI* de 1146 pb contenido en el vector de expresión pMC1neoPolyA (Stratagene). Dicho cassette contiene un promotor TK independiente. El fragmento *Sall*-*XhoI* se insertó en la construcción anterior mediante los adaptadores de *loxP* A y B (ver figura 17). El plásmido resultante, pPonc3j, se muestra en la figura 19.

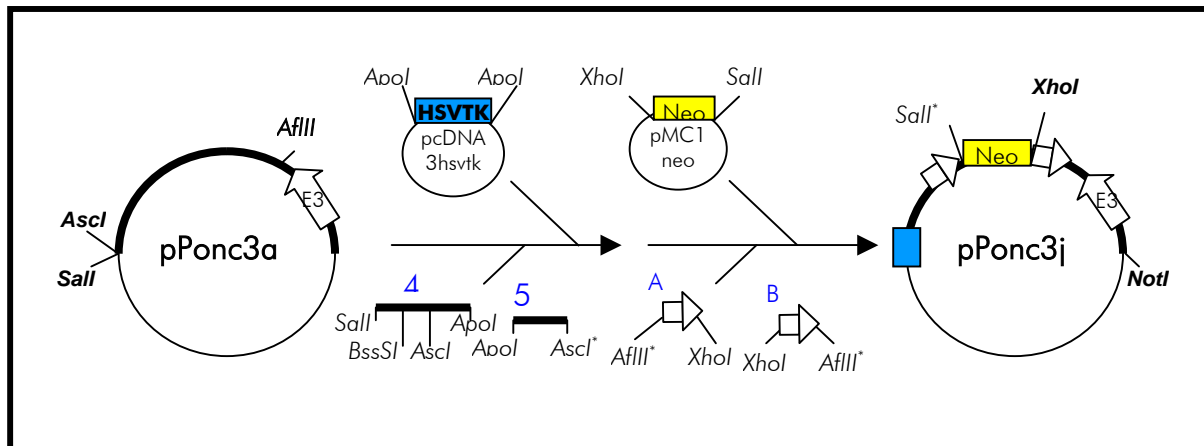


Figura 19: Representación esquemática del plásmido pPonc3j. Este plásmido es resultante de la inserción de los cassettes HSV-TK y de resistencia a la neomicina en pPonc3a. Las dianas de restricción señaladas en negrita se refieren a las utilizadas en la etapa siguiente de manipulación. En azul se indican los adaptadores utilizados.

A.3.3. Mutagénesis del tercer fragmento en pGEM[®]-11Zf(+) y ensamblaje en pPonc3j

A.3.3.1. Subclonado del fragmento NotI-XhoI de pPonc3j en pGEM[®]-11Zf(+) y mutagénesis de un loxP

El plásmido pPonc3j se digirió completamente con las enzimas *XhoI* y *NotI*, separándose en agarosa los fragmentos de 2'8 kb (fragmento a modificar, portador del tercer exón) y 9'3 kb (fragmento reservado para su posterior ensamblaje una vez mutagenizado el fragmento III). Por otra parte, el vector pGEM[®]-11Zf(+) (Promega) se digirió a su vez con *XhoI* y *NotI* y tras purificación en agarosa se ligó al fragmento de 2'8 kb. Este clonado permite la generación de un plásmido cuyo tamaño sea compatible con la mutagénesis dirigida (<10kb) (Chameleon[™], Stratagene). El plásmido resultante (pGEMSTN3), esquematizado en la figura 20 se utilizó para la conversión de un sitio *loxP* en un *lox66*.

El *loxP* contenido en pGEMSTN3 fue mutagenizado en un *lox* de tipo *lox66* (Albert *et al.*, 1995; Araki *et al.* 1997) por el procedimiento de mutagénesis dirigida ya visto (Chameleon[™], Stratagene) (figura 15). Los cebadores utilizados se muestran en la tabla III. El cebador Lox-Mutag presenta subrayadas las 5 bases que serán mutagenizadas.

Tabla III. Cebadores y enzimas de restricción utilizados en la mutagénesis dirigida (Chameleon[™]) del *loxP* de pGEMSTN3.

Cebador de mutagénesis (Lox-Mutag):	pCATACATTATACGAACGGTAGCTCGAGGTCGACGA
Cebador de selección (ScamutRev):	pGACTTGGTTGACGCGTCACCAGTCACAG
Selección:	<i>ScaI</i>

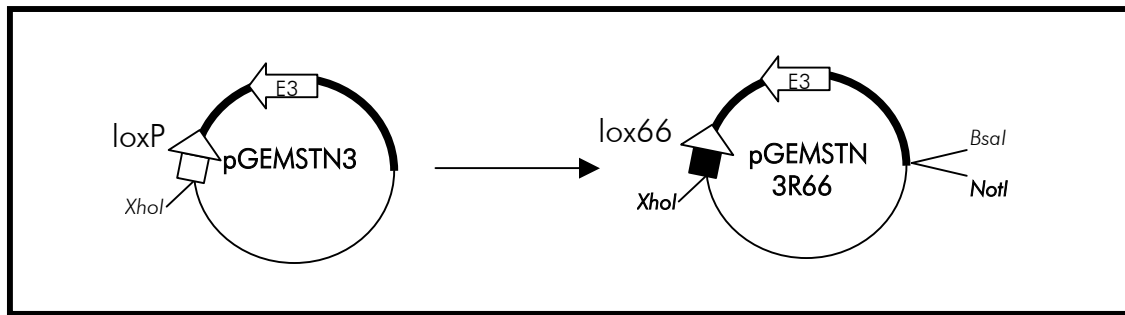


Figura 20: Representación esquemática del plásmido pGEMSTN3R66. Este plásmido deriva de pGEMSTN3 una vez mutagenizado.

La eficiencia de la mutagénesis se comprobó en el plásmido resultante, pGEMSTN3R66 (figura 20), por PCR, utilizando un cebador con la mutación introducida en 3', Cham-mut, (ver secuencia en tabla II), y posteriormente por secuenciación.

La reacción de PCR se realizó con unas condiciones de 2 mM de $MgCl_2$, 0'4 mM de dNTPs, 0'5 u. de Taq y 20 pmoles de cada uno de los cebadores Cham-mut y Sou3'5'1. De pGEMSTN3R66 se añadieron trazas y la PCR se realizó con una temperatura de hibridación de 55°C durante 30 ciclos.

La secuenciación se realizó con ayuda del *ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, siguiendo los protocolos descritos y utilizando 500 ng de plásmido y 5 pmoles de cebador. Los cebadores utilizados para la secuenciación (ver tabla II) fueron 12DN (en 3' del exón 3) y M13for-20 (en el vector pGEM®-11Zf(+)).

A.3.3.2. Ligado de adaptadores y unión en pPonc3j

El plásmido pGEMSTN3R66 se digirió completamente con *NotI*, *XhoI* y *PvuI* (la función de esta última enzima de restricción fue simplemente la de permitir una mejor diferenciación en el tamaño de bandas) y el fragmento *XhoI-NotI* de 2'8 kb fue purificado en gel de agarosa. Se realizó un ligado entre dicho fragmento de 2'8 kb y los adaptadores C y 6 (figura 17), el primero de los cuales incluye un *lox* de tipo *lox71* (Albert *et al.*, 1995; Araki *et al.* 1997). El producto de ligado se representa en la figura 21.

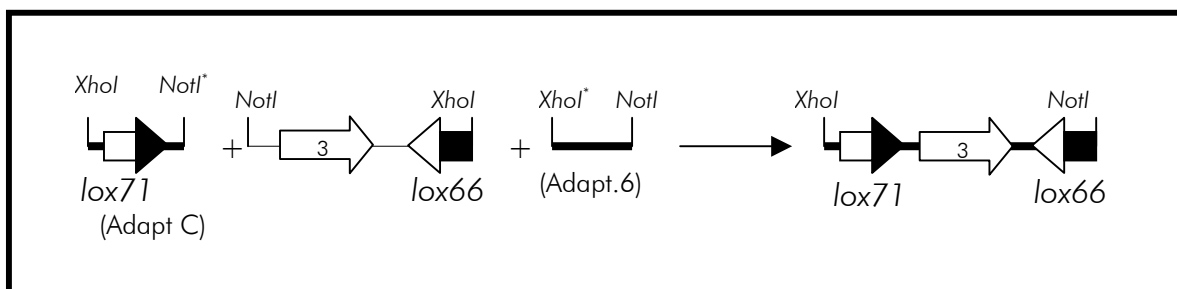


Figura 21: Etapa de ligado de los adaptadores C y 6 al fragmento mutagenizado.

Este fragmento, una vez ligado a los adaptadores, se purificó mediante GeneClean y se ligó al fragmento pPonc3j (9'3 kb), previamente linearizado por *XhoI* y *NotI* (ver A.3.2.4. y A.3.3.1). Al plásmido resultante de este ligado se le denominó pPonc3k. Para comprobar la orientación del fragmento y los adaptadores con respecto al vector, se realizó una PCR entre el exón 3 y el Neo-cassette en 96 de las colonias transformadas con los productos de ligado (12UP/NeoCas2). Con los positivos se realizó otra serie de PCRs con distintas parejas de cebadores (tabla IV) para comprobar la correcta orientación. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las descritas en el punto A.3.3.1. En la figura 22 se muestra la disposición final del plásmido resultante, pPonc3k, y de las parejas de cebadores utilizadas en la verificación de su disposición. Este plásmido lleva ahora el exón 3 en orientación inversa a la original.

Tabla IV. Parejas de cebadores utilizados en el testado de la orientación del fragmento de 2'8 kb

12UP/NeoCas2 (580pb)	Adap.C ₂ /NeoCas2 (165pb)
seq24/MM65 (410pb)	seq24/Adap.6 ₁ (83pb)
12UP/Adap.C ₁ (525pb)	Adap.6 ₂ /MM65 (365 pb)

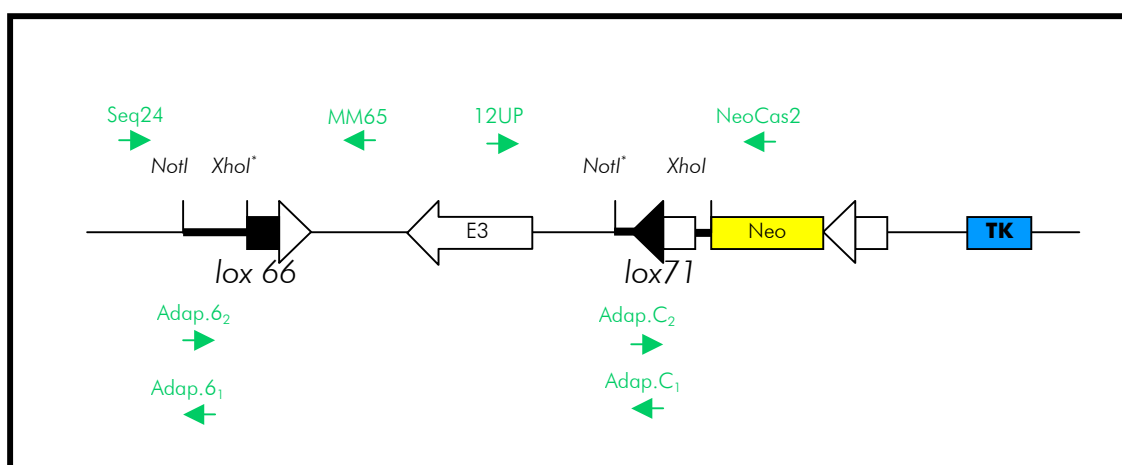


Figura 22: Representación esquemática del plásmido pPonc3k. Este plásmido resulta de invertir el exón 3 con respecto a su posición original. En verde se indican los cebadores utilizados en la comprobación de la disposición final. La línea gruesa representa los adaptadores utilizados.

A.3.4. Unión final de todos los fragmentos

El primer paso realizado fue el ensamblaje de los fragmentos I y II correspondientes a los plásmidos pPonc1a y pPonc2a, respectivamente. Para ello se digirió parcialmente (25 minutos, con posterior inactivación de la enzima) pPonc1a y completamente pPonc2a con *BssSI*; tras purificación acetato-etanólica se procedió a la digestión total de ambos con

Ascl. En gel de agarosa se separaron los fragmentos deseados de 7 kb (pPonc1a) y 3'9 kb (pPonc2a) y se purificaron con GeneClean. Seguidamente se realizaron reacciones de ligado que dieron lugar al plásmido pPonc12aa. En los clones transformados con el producto de ligado se utilizó la PCR para verificar la apropiada disposición del plásmido resultante, pPonc12aa. Las parejas de cebadores utilizadas fueron GDF8-19/16DN (530pb) y MM64/seq24 (190pb). En la figura 23 aparece su representación esquemática junto a los cebadores utilizados. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las descritas en el punto A.3.3.1.

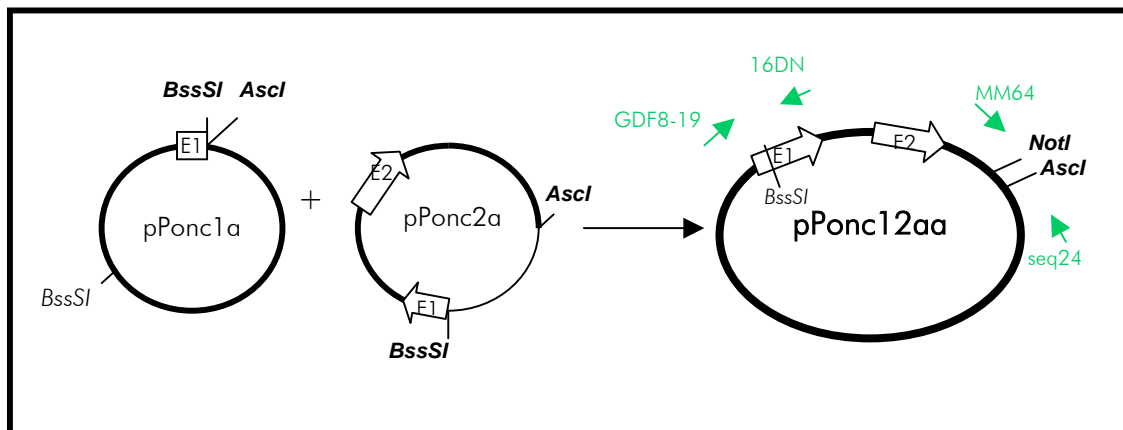


Figura 23: Esquemática de la unión de los fragmentos I y II dando lugar a pPonc12aa. En negrita se indican las enzimas utilizadas en la etapa siguiente de digestión. En verde se señalan los cebadores utilizados en la PCR de verificación.

El último paso consistió en la digestión completa tanto de pPonc12aa como de pPonc3k con *NotI*, precipitación acetato-etanólica y posterior digestión total con *Ascl*. Las bandas de ~11 kb (pPonc12aa) y ~ 10 kb (pPonc3k) se purificaron en agarosa con ayuda del kit GeneClean y se ligaron entre ellas.

El plásmido definitivo resultante, pPonc123aak, se verificó por PCR entre los distintos clones transformados con el producto anterior de ligado. En la tabla V se muestran los tamaños esperados de los productos de PCR. En la figura 24 aparece la disposición de los cebadores utilizados. Dicha PCR se realizó bajo las condiciones descritas en el punto A.3.3.1.

Tabla V. Parejas de cebadores utilizados en la verificación de pPonc123aak

GDF8-19/16DN (530 pb)
MM64/MM65 (490pb)
12UP/NeoCas2 (580pb)
TK7/seq24 (170pb)

A.3.5. Comprobación por digestión y secuenciación

La construcción final, pPonc123aak, se digirió completamente con una batería de enzimas para comprobar la correcta disposición de los distintos fragmentos. Estas enzimas fueron: *NotI/XhoI*, *EcoRI*, *BglIII*, *BamHI* y *HindIII*. La tabla VI muestra los tamaños esperados de fragmento.

Tabla VI: Tamaños esperados de fragmento tras digestión de pPonc123aak en pb

<i>NotI/XhoI</i> : 9908, 8204, 2904
<i>EcoRI</i> : 7017, 4280, 3484, 3204, 1242, 1119, 654
<i>BglIII</i> : 10494, 5973, 2159, 1041, 518, 517, 334
<i>BamHI</i> : 11897, 5017, 4122
<i>HindIII</i> : 9802, 4585, 3824, 2825

Por otro lado, se secuenciaron las zonas de ensamblado entre los distintos fragmentos y los *lox* mutantes en las mismas condiciones utilizadas en el apartado A.3.3.1. En la figura 24 se representan los cebadores utilizados (ver secuencia en tabla II). El resto de pPonc123aak no se secuenció una vez finalizada la construcción porque todas las regiones no introducidas *de novo* en este plásmido ya habían sido secuenciadas previamente en el vector lambda original (ver A.2.1.).

Tomando la región desde el *lox66* hasta el *loxP* en 3' del gen *Neo^R* como la nueva mutación a introducir en el genoma, la construcción recombinante exógena presenta un brazo largo de homología en 5' de 8240 pb (entre las dianas de restricción *Sall* y *NotI*) y un brazo corto de homología de 3240 pb en 3' (entre el *loxP* y el comienzo del cassette TK).

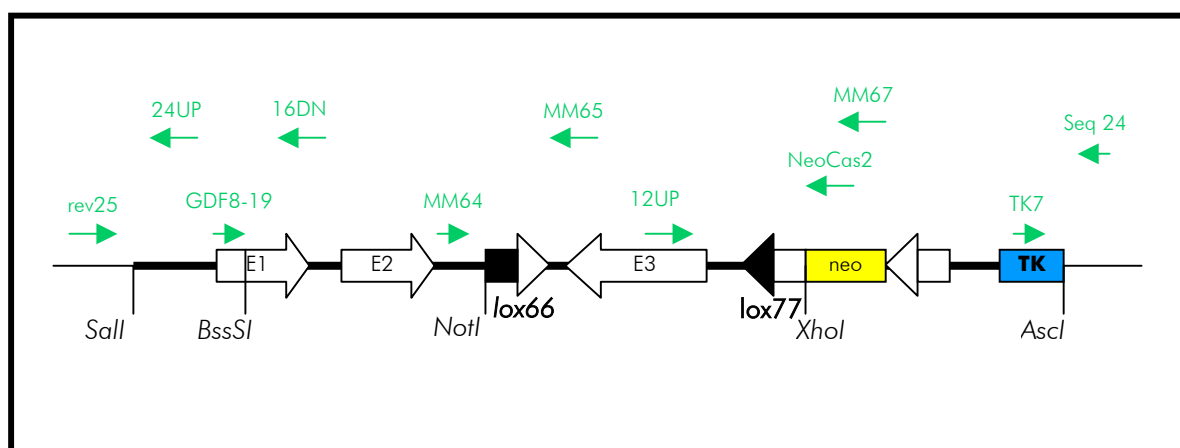


Figura 24: Representación esquemática de los cebadores utilizados en la secuenciación de pPonc123aak. La línea gruesa representa el ADN clonado, la línea fina representa el vector.

Una vez verificado el clon definitivo se procedió a producir una gran cantidad de plásmido purificado, necesario para las electroporaciones en células ES. Para ello, se cultivaron durante 16 horas 100 ml de LB+Amp con el clon elegido y se realizó una maxiprep con ayuda del kit *Qiafilter 500-Maxi* (Qiagen). Tras resuspensión del precipitado de ADN en TE, se cuantificó en gel de agarosa y por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm. Los 200 μ g obtenidos se congelaron hasta su posterior uso. En la figura 25 aparece la representación esquemática del plásmido final, pPonc123aak, con la disposición de los exones, sitios *lox* y genes de selección utilizados.

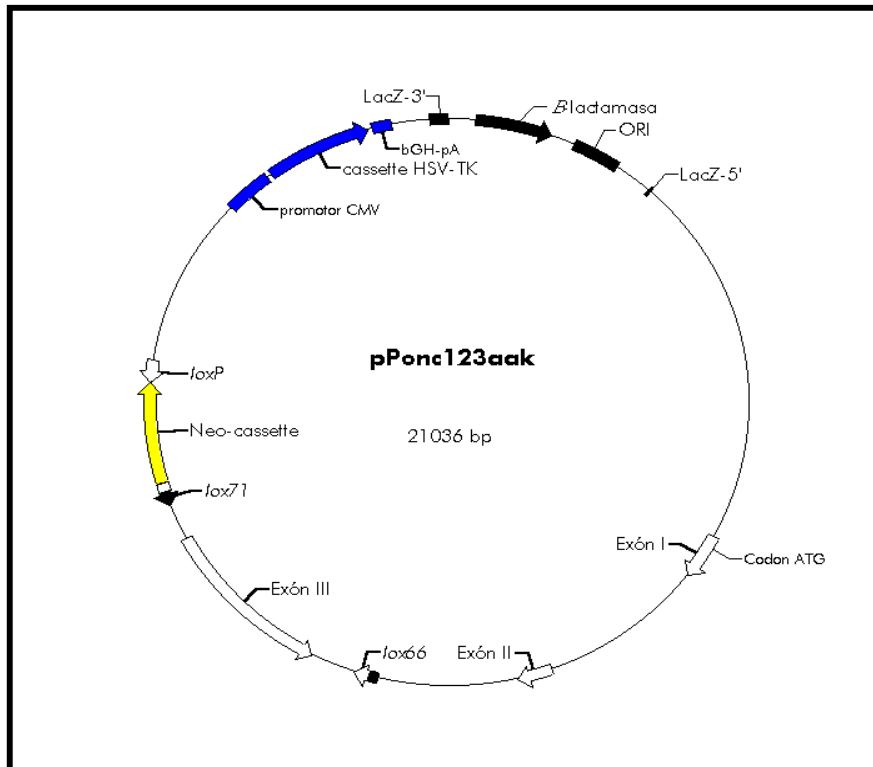


Figura 25: Construcción final pPonc123aak. Representación esquemática de la construcción definitiva destinada a la creación de una línea celular ES “Mstn OFF to ON”.

A.4. Ensayos preliminares

A.4.1. Ensayo con Cre-recombinasa purificada

Con objeto de evaluar la funcionalidad de los *lox* utilizados en la construcción, se procedió a la realización de un test *in vitro*, utilizando Cre-recombinasa purificada.

En un primer ensayo se utilizaron directamente los plásmidos pPonc123aak y, como control, pPonc123bbj (Grobet *et al.*, 2003), una construcción en la que el tercer exón de la miostatina se encuentra en orientación directa y flanqueado por dos sitios *loxP* (a su vez en orientación directa), y junto a un cassette de Neo-resistencia igualmente flanqueado

por dos *loxP* (ver figura 26). La construcción pPonc123bbj se eligió como control teniendo en cuenta que los *loxP* son los sitios naturalmente reconocidos por Cre, además de por la amplia documentación existente sobre la alta eficiencia de escisión de segmentos “floxados” por sitios *loxP* (Gu *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1995; Torres & Kühn, 1997).

El resultado de la recombinación en pPonc123aak será el de la inversión del exón 3, la delección del cassette Neo o ambas. Mientras que en el caso de pPonc123bbj se producirá la delección del exón 3, la del cassette Neo o ambas.

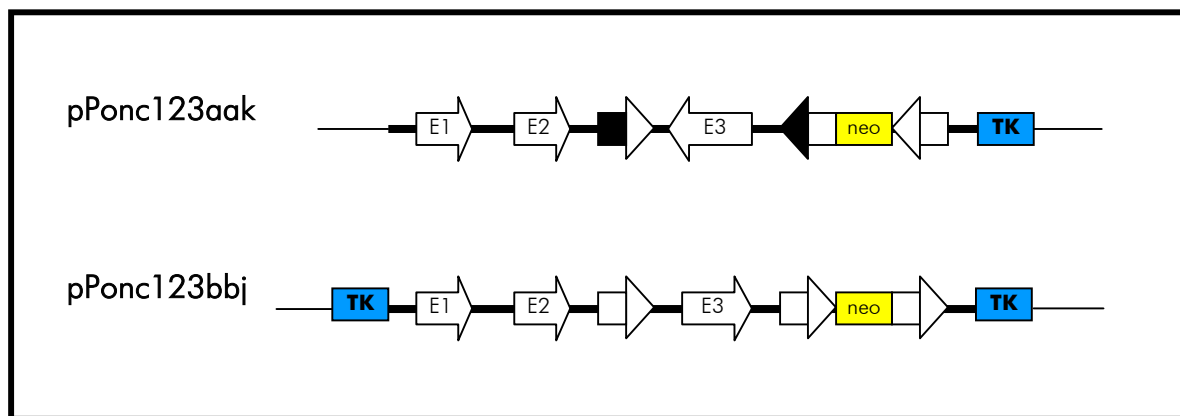


Figura 26: Representación esquemática de pPonc123aak y pPonc123bbj.
Comparación de las dos secuencias inicialmente sometidas a la acción de la Cre purificada.

Para ello se realizaron dos reacciones de recombinación paralelas utilizando la Cre-recombinasa purificada (Invitrogen) con ambas construcciones, según los protocolos especificados.

Reacción de recombinación por Cre

2 μ l buffer 10x

1 μ l Cre (50 ng)

100 ng plásmido

H₂O hasta 20 μ l

→ 37°C, 20' → Inactivación de la enzima: 65°C, 15'

Seguidamente se transformaron ambos productos de recombinación en células competentes DH5 α TM (GibcoBRL), sembrándose en placas de LB-agar con ampicilina. Se repicaron 48 colonias de cada uno de los experimentos y se cultivaron toda la noche en 1500 μ l de LB-ampicilina en placas de cultivo de 96 pocillos. Al día siguiente se realizaron las minipreps con los reactivos del kit Qiagen *mini* (QIAGEN) y se filtraron los restos celulares con ayuda de un filtro Millipore, tras precipitación en isopropanol se resuspendieron los precipitados de ADN en 50 μ l de TE 1x.

Se realizaron dos digestiones (con objeto de poder contrastar los resultados) con 15 μ l de dichas minipreps: una con *EcoRI* (Gibco) y otra con *BamHI* (Gibco); en el caso de pPonc123bbj se analizaron otras 48 colonias más digiriéndose una vez con *XmnI* y otra con *PstI* (Biolabs) y todos los productos de digestión se visualizaron en un gel de agarosa 1%.

El hecho de las frecuentes recombinaciones entre los dos cassettes TK de pPonc123bbj (ver figura 26), lo que disminuía fuertemente el número de clones aptos para recombinación específica por Cre, y el hecho de que tanto pPonc123aak como pPonc123bbj no tuvieran la conformación definitiva de *lox* que tendrían en las células ES (por la existencia del Neo-cassette y un tercer *lox* flanqueándolo) hizo replantear el ensayo utilizando construcciones que eliminaran estas desventajas.

En el caso de pPonc123aak se escogió simplemente una de las colonias de la experiencia anterior en la que se había escindido el cassette Neo y se purificó su ADN plasmídico mediante una midiprep con ayuda del kit *Qiagen Plasmid Midi* (QIAGEN). Dicha construcción se denominó pPonc123-Neo^S (figura 27).

En el caso de la construcción control, pPonc123bbj, hubo que recurrir a la digestión y ligado de distintos fragmentos según los métodos descritos en A.3.2. y a la eliminación del Neo-cassette con Cre-recombinasa.

Para ello en primer lugar se partió de los plásmidos previos a la construcción pPonc123bbj: se digirió tanto pPonc2b (construcción análoga a pPonc2a -ver figura 18- pero incluyendo también un *loxP* en 5' en el extremos *Ascl*) como pPonc 3j (ver esquema en figura 19) en una digestión doble con *NotI* y *Ascl*. La banda de 6'6 kb de pPonc2b y la de 10 kb de pPonc3j se purificaron en gel de agarosa mediante GeneClean y se ligaron entre ellas. El producto de ligado (pPonc2b3j) se transformó en células competentes DH5 α y se realizaron minipreps de las colonias transformadas sobre las que se efectuaron PCRs de testado para confirmar la correcta orientación de los fragmentos.

A partir de uno de estos plásmidos purificados de pPonc2b3j se realizó una reacción de recombinación con Cre-recombinasa (Invitrogen) con objeto de eliminar de este modo el Neo-cassette, pero al no obtenerse ningún recombinante entre 96 colonias transformadas con dicho producto de recombinación, se optó por un enriquecimiento de las colonias con Neo-delección mediante digestión en el Neo-cassette. Para ello se sometió a pPonc2b3j a recombinación con Cre-recombinasa y seguidamente se digirió durante 4 horas con *XhoI* (diana de restricción única en el Neo-cassette). Los plásmidos linealizados tienen una eficacia de transformación mucho menor que la de los circularizados, de modo que los plásmidos que recombinen entre los *lox* que flanquean el Neo-cassette habrán eliminado dicho cassette y con ello la diana *XhoI*; por lo tanto verán favorecida su transformación frente a los que no recombinen. El producto de digestión *XhoI* se transformó en células DH5 α y se realizaron minipreps de 96 colonias. Dichas minipreps se analizaron por PCR (12DN/17UP1) y digestión (*EcoRI*, *BamHI*) para confirmar la eliminación del Neo-cassette. Finalmente se aisló, purificó y cuantificó el ADN plasmídico de uno de los clones elegidos, denominándosele pPonc2b3j-Neo^S (figura 27).

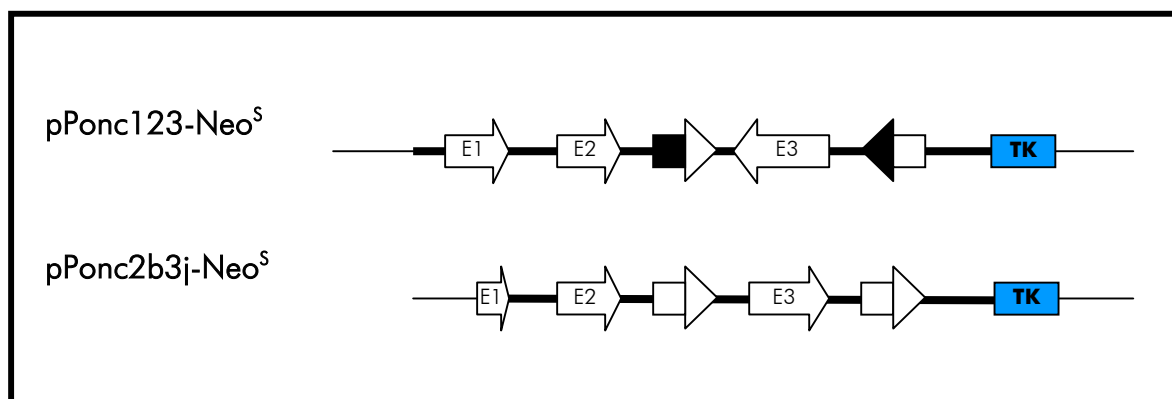


Figura 27: Representación esquemática de pPonc123-Neo^S y pPonc2b3j-Neo^S. Comparación de las dos construcciones sometidas a la acción de la Cre purificada.

Una vez obtenidas las dos nuevas construcciones con los cambios introducidos, ambos vectores se sometieron a recombinación mediante Cre, variándose la cantidad de enzima y de plásmido utilizados: (sólo las condiciones A y E - idénticas - son las recomendadas por el fabricante, C y F consisten en distintos aumentos de la cantidad de enzima, B y D se basan en las observaciones de Abremski & Hoess, 1984).

<u>Reacción Cre-A</u>	<u>Reacción Cre-B</u>	<u>Reacción Cre-C</u>
1 μ l Cre (50 ng)	0.5 μ l Cre (25 ng)	4 μ l Cre (200 ng)
2 μ l buffer 10x	2 μ l buffer 10x	2 μ l buffer 10x
5 μ l plásmido (100 ng)	10 μ l plásmido (200 ng)	5 μ l plásmido (100 ng)
12 μ l H ₂ O	7.5 μ l H ₂ O	9 μ l H ₂ O
<u>Reacción Cre-D</u>	<u>Reacción Cre-E</u>	<u>Reacción Cre-F</u>
1 μ l Cre (50 ng)	1 μ l Cre (100 ng)	7 μ l Cre (350 ng)
2 μ l buffer 10x	2 μ l buffer 10x	2 μ l buffer 10x
10 μ l plásmido (200 ng)	5 μ l plásmido (100 ng)	5 μ l plásmido (100 ng)
7 μ l H ₂ O	12 μ l H ₂ O	6 μ l H ₂ O

→ 37°C, 20' → inactivación de la enzima : 65°C, 15'

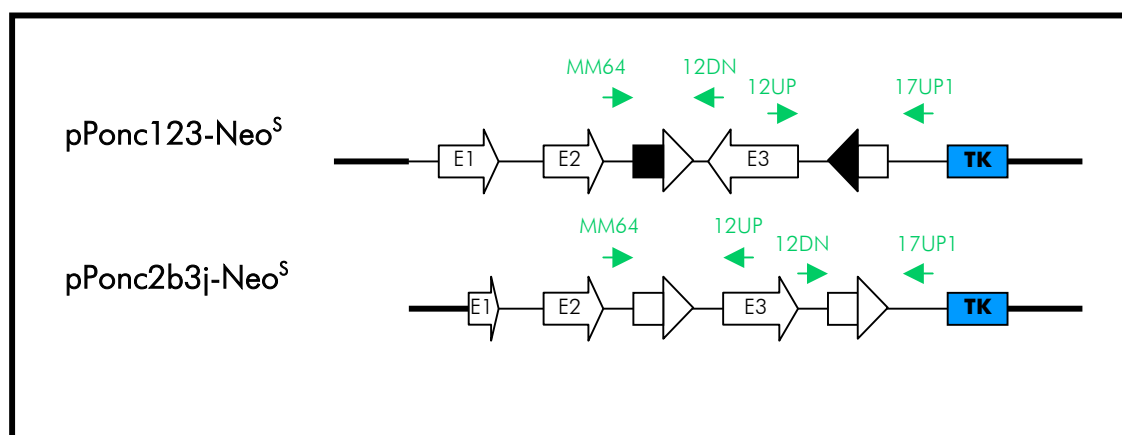
De estas reacciones de recombinación se realizaron sendas PCRs para observar *grosso modo* en el producto de reacción de la recombinasa una posible recombinación. Para ello se utilizaron 0.25 μ l de las reacciones de recombinación junto a las parejas de cebadores indicadas en la tabla VII y especificados en la tabla VIII y que se representan en la figura 28. Las condiciones de PCR fueron las mismas del punto A.3.3.1.

Tabla VII: Parejas de cebadores utilizados en la identificación de las reacciones recombinantes

<u>pPonc123-Neo^S</u>	<u>pPonc2b3j-Neo^S</u>
MM64/12UP	MM64/17UP1
12DN/17UP1	MM64/12UP
MM64/12DN	12DN/17UP1

Tabla VIII: Secuencia de los cebadores utilizados en el testado por PCR

12DN	CTACCTTCATCAGGTCAGGGATGTG
12UP	TGGGTGTGTCTGTCACCTTGACTTC
17UP1	TTTTGATGGATTTTATCATGTCAC
MM64	TATACATACAGCCACTGTCATCATG
MM65	AATTGGCAGTGGTATATACTCCTAG
TK5	CACCCAGGCTCCATACCGACGATC
Seq24	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT

**Figura 28: Representación esquemática de los cebadores utilizados para la identificación de los plásmidos recombinantes.**

Al no observarse productos de PCR específicos de recombinación en las reacciones B y D, se siguió adelante sólo con los productos de recombinación A, C, E y F.

Como en el caso anterior, los productos de recombinación de las cuatro reacciones seleccionadas se transformaron en células competentes DH5 α TM (GibcoBRL), sembrándose en placas de LB-agar con ampicilina. Se repicaron 96 colonias de cada uno de los experimentos y se cultivaron, tras lo cual se realizaron minipreps por el método antes descrito, que se resuspendieron a su vez en 50 μ l de TE.

Se realizaron digestiones de 15 μ l (~ 600 ng) de dichas minipreps, utilizando *EcoRI* (Gibco o Promega) en un volumen final de 30 μ l. Posteriormente los productos digeridos se resolvieron en un gel de agarosa al 1%. La tabla IX muestra los tamaños esperados de fragmento.

Tabla IX: Tamaños esperados de fragmento tras digestión de pPonc123-Neo^S y pPonc2b3j-Neo^S con EcoRI
<p>pPonc123-Neo^S : Original: 6'9, 4'3, 3'5, 3'2, 1'2, 0'6 kb Recombinante: 7'9, 3'5, 3'2, 3'2, 1'2, 0'6 kb</p>
<p>pPonc2b3j-Neo^S : Original: 8, 4'3, 3'2 kb Recombinante: 8'4, 4'3 kb</p>
<p>pPonc-inv: Original: 7'9, 3'5, 3'2, 3'2, 1'2, 0'6 kb Recombinante: 6'9, 4'3, 3'5, 3'2, 1'2, 0'6 kb</p>

A.4.2. Ensayo en bacterias MM294-Cre

Un segundo ensayo que permite la evaluación de la funcionalidad de los sitios *loxP* es el ofrecido por la cepa de *Escherichia coli* MM294-Cre (Buchholz *et al.*, 1996), en cuyo genoma se ha integrado el gen de la Cre-recombinasa. Esta funcionalidad se estudia por transformación del plásmido en la bacteria (gentileza de Francis Stewart, EMBL, Heidelberg, Alemania) previamente tratada para convertirla en una bacteria competente, posteriormente se aísla el plásmido y se digiere para visualizar en gel de agarosa los fragmentos resultantes.

Este ensayo se llevó a cabo utilizando el plásmido una vez desprovisto del gen Neo (pPonc123-Neo^S) y como control comparativo de la eficacia de recombinación entre *loxP* y *lox* mutantes, se recurrió al mismo pPonc2b3j-Neo^S utilizado en la experiencia anterior. Además, se utilizó un plásmido pPonc123-Neo^S una vez recombinado por la enzima Cre, y al que se denominó pPonc-inv; en este caso se trataba de evaluar el bloqueamiento del tercer exón una vez invertido.

Paralelamente, y como control de la ausencia de recombinación se utilizaron los tres mismos plásmidos (pPonc123-Neo^S, pPonc2b3j-Neo^S y pPonc-inv) transformados en cepas AG-1 (Stratagene) (sin Cre-recombinasa en su genoma).

La cepa MM294-Cre se hizo competente mediante el método descrito por Sambrook *et al.* (1989) y se transformaron por separado 100 μ l de células con 2 ng de cada uno de los tres plásmidos a evaluar, siguiendo el mismo protocolo utilizado para las células DH5 α competentes (Gibco). De cada transformación se repicaron varias colonias y se cultivaron en 3 ml de LB+Amp a 37°C durante toda la noche. Las extracciones plasmídicas se realizaron según el método descrito en el punto A.3.2.

Estas extracciones arrojaron un bajo rendimiento debido a la fuerza con que la enzima se unía al ADN y que terminaba arrastrando el plásmido durante su purificación; como el gen de Cre se encuentra bajo la influencia de un promotor termo-dependiente (λP_R) este problema fue solventado haciendo crecer los cultivos de las colonias repicadas a 30°C.

Con los plásmidos transformados en las cepas control AG-1 se procedió de la misma manera, con la salvedad de que en este caso no se dieron problemas de bajo rendimiento de extracción plasmídica y se pudo incubar a 37°C.

Una vez extraído el ADN plasmídico y resuspendido en 50 μ l de TE, se digirieron 35 μ l de plásmido con *Eco RI* (Roche). Los productos de la digestión se resolvieron en un gel de agarosa al 1%. El patrón de bandas obtenido se describe en la tabla IX (obsérvese que para el plásmido invertido, pPonc-inv, el patrón de bandas original es el correspondiente al de pPonc123-Neo^S recombinante y su patrón recombinante, es el correspondiente original de pPonc123-Neo^S).

A.5. Creación de una línea estable de células ES murinas “Mstn OFF to ON”

A.5.1. Establecimiento de una línea ES con la construcción pPonc123aak

Los protocolos utilizados para el cultivo de células *ES* y *EF*, recombinación homóloga en células *ES*, escisión del cassette de selección “floxado” y análisis de clones se corresponden en líneas generales a los descritos por Torres & Kühn (1997).

A.5.1.1. Manipulación celular

Las células *ES* requieren para su cultivo un medio que las mantenga en estado indiferenciado; esto se puede conseguir mediante cultivo en presencia de LIF (leukaemia inhibitory factor) que evita la diferenciación de las células *ES* (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988) o por cultivo en placas de células *feeder* mitomicinadas (mitóticamente inactivas). En general, se recurre al uso de células *feeder*, puesto que proveen a las células *ES* de factores que potencian la proliferación además de mantener el estado indiferenciado. En este estudio se han utilizado tanto células *feeder*, como LIF.

A.5.1.1.1. Descripción de los protocolos de cultivo seguidos en células feeder (EF)

Se escogieron cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón (*MEFs*) como línea *feeder* por su buena respuesta en cultivo de *ES* y por representar una fuente de células primarias potente, fiable y reproducible (Hogan *et al.*, 1994).

a) Preparación de células

Las células *EF* provienen de embriones de 13'5 *d.p.c.* a los que se retira la cabeza, el hígado y el corazón y tras dividirse en pequeños trozos se tripsinizan (1x trypsin/EDTA; GIBCO) durante 30' a 37°C. Tras lavado con PBS (GIBCO) y centrifugación (2000g, 5') las células se resuspenden en DMEM-EF (ver Apéndice de Reactivos) y se siembran en placas de 9 cm de diámetro (Cellstar^R, Greiner) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

b) Congelación de células

Las placas, una vez confluentes, se tripsinizan durante 5' y se centrifugan (2000g, 5') en 4 veces el volumen de tripsina utilizado. El pellet se resuspende en DMEM + 10% DMSO (Sigma) y se congela primero a -80°C al menos durante un día antes de almacenarlo en N_2 líquido.

c) Cultivo y división de células

Las alícuotas congeladas de células EF se descongelan inmediatamente a 37°C y se añaden directamente a un tubo con 10 ml de medio (DMEM-EF) a 37°C ; tras centrifugación se resuspenden en 8-10 ml de medio y se siembran. Normalmente, se alcanza la confluencia dos días después, y se resiembran (mediante tripsinización y centrifugación) con un ratio 1:4. Las células EF divididas más de cuatro veces (pasajes) se desechan. El medio de cultivo se renueva cada dos días.

d) Mitomycinación

El método elegido para la inactivación mitótica fue la mitomicinación. Para ello se lavaron las placas confluentes con PBS y se añadieron 5 ml de DMEM + mitomicina C (Sigma; ver Apéndice de Reactivos). Tras incubación a 37°C entre 2 y 6 horas, se lavaron las placas tres veces con PBS y se tripsinizaron durante 5', resemebrándose con DMEM-EF en un ratio de 1'4:1.

A.5.1.1.2. Descripción de los protocolos de cultivo seguidos en células ES

La construcción pPonc123aak, destinada a experimentar una recombinación homóloga en células ES, deriva de ADN genómico de ratón de la línea C57BL/6N (Hogan *et al.*, 1994).

Las líneas ES isogénicas de este origen se caracterizan por una relativa fragilidad y una reducida frecuencia de transmisión germinal (Torres & Kühn, 1997) por lo que la línea de células ES escogida fue la R1 (Nagy *et al.*, 1993), proveniente de la línea celular 129 s/j y cuyas propiedades de pluripotencia y alta transmisión germinal tras manipulación y cultivo prolongado están ampliamente documentadas (Wood *et al.*, 1993; Torres & Kühn, 1997; Bunting *et al.*, 1999).

Tras secuenciación de la región en R1 susceptible de recombinar con la construcción (esto es, la región entre el cassette Neo y el cassette TK en 3' - 3240 pb -) se ratificó la ausencia de diferencias a nivel de las secuencias destinadas a experimentar recombinación homóloga entre dichas líneas R1 y C57BL/6N.

a) Cultivo y manipulación de células ES

Las células R1 (cariotipo XY) provienen del laboratorio de Andras Nagy (Developmental Biology, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada) y se compraron en un pasaje p11.

Como ya se ha mencionado, las células *ES* se cultivaron sobre células *MEF* previamente mitomicinadas y en presencia de LIF (ver Apéndice de Reactivos).

Los protocolos de cultivo, división y congelación de *ES* son similares a los utilizados con células *EF*, con la salvedad del tipo de medio utilizado, DMEM-ES (ver Apéndice de Reactivos), la frecuencia de recambio del medio de cultivo (cada 24 horas) y el ratio de división de placas confluentes (1:10, normalmente alcanzan la confluencia cada dos o tres días).

A.5.1.2. Transfección de pPonc123aak en células ES

Antes de su electroporación, se linearizaron 80 µg del vector pPonc123aak mediante digestión con 100 unidades de *SwaI* (Biolabs), para la que existe una diana de restricción única en el vector, fuera de la secuencia del gen o los marcadores de selección. Tras extracción fenol/clorofórmica y cloroformo/isoamílica, se realizó una precipitación acetato/etanólica y lavado en etanol 70%; el pellet se resuspendió en TE 0'1x y se cuantificó en gel de agarosa.

El día de la electroporación se cambió el medio de cultivo a primera hora (pasaje del cultivo: 17). Para someterlas a electroporación, las células se tripsinizaron y una vez diluidas en DMEM-ES se realizó un conteo y se alicuotaron 10^7 en un tubo en el que se centrifugaron y lavaron en PBS; el pellet se resuspendió en 400 µl de buffer de electroporación 2x (ver Apéndice de Reactivos), a esto se añadieron 16 µg de pPonc123aak linearizado y H₂O (Sigma, for embryological use) hasta 800 µl. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (BioRad, Gene Pulser^R Cuvette) de 4 mm de distancia entre electrodos. Se electroporó a 240 V y 475 µF de capacitancia en un electroporador GenePulser (BioRad). Tras electroporación, se incubaron las células 5' a temperatura ambiente y se sembraron en un ratio 1:3 directamente en placas *EF* mitomicinadas.

Paralelamente se estableció una serie de controles: a) control de eficacia de transfección (placa con células electroporadas y en presencia de geneticina - G418 -), b) control de eficacia de la geneticina (placa no electroporada, en presencia de G418), c) controles de viabilidad (placa transfectada y placa no transfectada, en ausencia de G418).

A.5.1.2.1. Selecciones positiva y negativa

Dos días después de la electroporación comenzó la selección positiva (Neo^R) añadiéndose al medio de cultivo de las células G418 (Gibco BRL) a una concentración de 300 µg/ml y renovándose el medio diariamente.

Cinco días después de la electroporación comenzó la selección contra integrantes al azar (selección negativa apoyada por la presencia de un cassette timidín-kinasa, TK) (Mansour *et al.*, 1988). Al medio se añadió, además de la misma concentración de G418 de los días anteriores, ganciclovir a una concentración final 2µM (ver Apéndice de Reactivos). La

selección con ganciclovir se continuó durante seis días hasta ver el tapiz de células *feeder* completamente limpio de los restos de las células muertas.

A.5.1.2.2. Repicado de colonias ES

Nueve días después del comienzo de la selección con G418 se procedió al repicado de los clones supervivientes. En total se recogieron 326 colonias. Los clones repicados se depositaron directamente en pocillos con 50 μ l de tripsina y se incubaron a 37°C durante 10', se pipetearon varias veces para disgregar las colonias y se añadieron 50 μ l de DMEM-ES. Estos 100 μ l de volumen final se dividieron a su vez entre dos placas de 48 pocillos, una de ellas de células *EF* mitomicinadas, y la otra de gelatina (ver Apéndice de Reactivos) y a cada 50 μ l de células tripsinizadas se añadieron 400 μ l de DMEM-ES para diluir la concentración de tripsina (que puede alterar el estado de las células ES). Se incubaron las dos réplicas a 37°C hasta que las colonias adquirieron un tamaño adecuado (1000-4000 células/colonia) y se procedió a la congelación de la placa réplica de células *feeder* y a la extracción de ADN a partir de la réplica en gelatina.

A.5.1.2.3. Congelación de placas réplica de ES

Se lavaron dos veces los pocillos con PBS y tras tripsinización durante 15' se disgregaron las colonias por pipeteo. Se añadieron 400 μ l de medio de congelación (12'5% DMSO en DMEM-ES, lo que da una concentración final de DMSO del 10%) por pocillo y se guardaron en cajas isotérmicas a -80°C.

A.5.1.2.4. Extracción de ADN de clones ES a partir de placas de 48 pocillos

Una vez lavados los pocillos y retirado el PBS, se mantuvieron una noche a -80°C con objeto de romper las células. A partir de aquí el protocolo utilizado es el de Ramírez-Solís *et al.*, 1992. Al día siguiente se añadieron 50 μ l de tampón de lisis (ver Apéndice de Reactivos) y se incubaron a 55°C en atmósfera húmeda toda la noche. Al día siguiente se añadieron 100 μ l de una mezcla acetato-etanólica (100 μ l etanol frío+ 1'5 μ l NaCl 5M) y se dejaron 15-30' a temperatura ambiente. Se centrifugaron las placas a 2000 rpm 15' para precipitar el ADN y posteriormente se lavaron con etanol 70%. Tras eliminación del etanol 70% se dejaron secar y se resuspendió el ADN en 100 μ l de TE pH 8'0.

A.5.1.2.5. Identificación por PCR de los recombinantes homólogos

Como control positivo de PCR se construyó un plásmido, C36, por los métodos convencionales utilizados en la construcción de pPonc123aak, que incluía el tercer exón, el neo-cassette y en 3' el fragmento IV proveniente del clon genómico de ratón del fago λ (ver apartado A.3.2.1.). Su representación esquemática se muestra en la figura 29. Los cebadores utilizados fueron NeoCas3 (presente en la construcción recombinante pero no en el locus genómico endógeno) y MM79 (presente en el locus endógeno pero no en la construcción), que amplifican un fragmento de 4265 pb. Sus secuencias se describen en la tabla X. Para la realización de la PCR se utilizó una mezcla de polimerasas contenida

en el *Expand™ Long Template PCR System* (Roche Molecular Biochemicals), siguiendo los protocolos descritos y utilizando 4 μ l de ADN por cada 50 μ l de reacción. La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer Cetus, GeneAmp PCR System 9600.

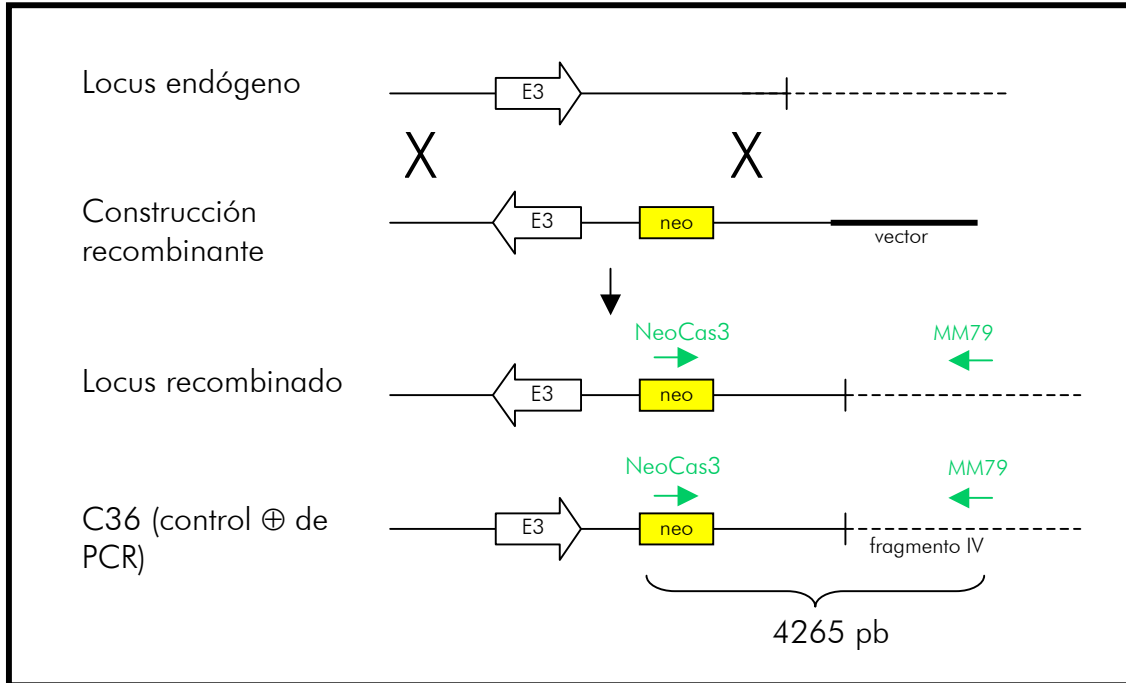


Figura 29: Estrategia de PCR para la detección de recombinantes homólogos.

La pareja de cebadores utilizados se indica en verde. La línea discontinua representa la zona 3' del gen no incluida en la construcción transgénica.

A.5.1.2.6. Análisis por PCR de la integridad de la zona recombinada

Para verificar la total integración de la construcción transgénica se amplificaron por PCR (55°C, 30 ciclos) las regiones de los *lox66* y *lox71* utilizando para ello los propios adaptadores como cebadores, como se representa en la figura 30.

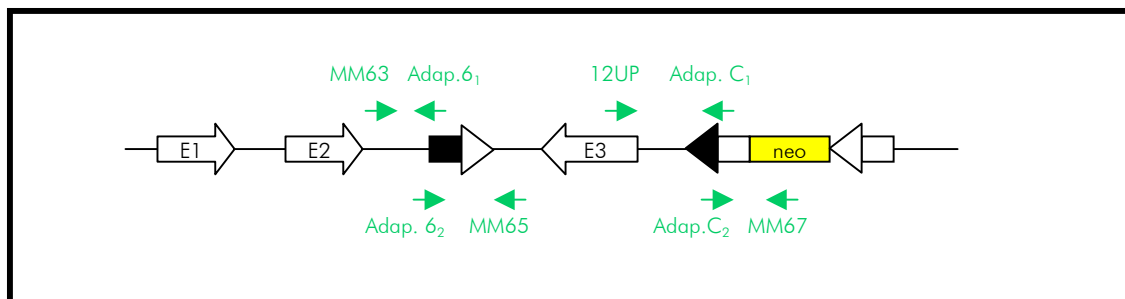


Figura 30: Representación esquemática de la posición de los cebadores utilizados para verificación de la integridad del transgén.

A.5.1.2.7. Secuenciación de las regiones *lox* de los recombinantes homólogos

Las regiones de los *lox66* y *lox71* se amplificaron por PCR utilizando las parejas de cebadores MM63/MM65 (*lox66*) y 12UP/MM67 (*lox71*), representadas en la figura anterior, y se purificaron (QIAquick PCR Purification Kit Protocol) para secuenciación con ayuda de un ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit en un secuenciador ABI 377 (Perkin Elmer), utilizando 50 ng de PCR purificada y 5 pmoles de cada uno de los cebadores.

A.5.1.2.8. Verificación por Southern blot de los recombinantes homólogos

Los 9 clones positivos en la PCR se analizaron por Southern blot para confirmar la recombinación homóloga y la ausencia de otras inserciones al azar. Para ello se escogió como enzima de restricción *Pst*I, que digiere en el cassette de resistencia a la neomicina y en la región 3' del gen no presente en la construcción transgénica. Como sonda se utilizó un fragmento de 1094 pb (C1) amplificado por PCR en la región 3' del gen que se incluye en la construcción. Los cebadores utilizados para la amplificación de esta sonda fueron MM68 y 22aUP, indicados en la tabla X. El producto amplificado se purificó mediante el sistema QIAquick PCR Purification Kit Protocol. Esta sonda hibrida con un fragmento de restricción de 4440 pb en el caso del alelo recombinante homólogo y 6177 pb en el caso del alelo salvaje, como muestra la figura 31.

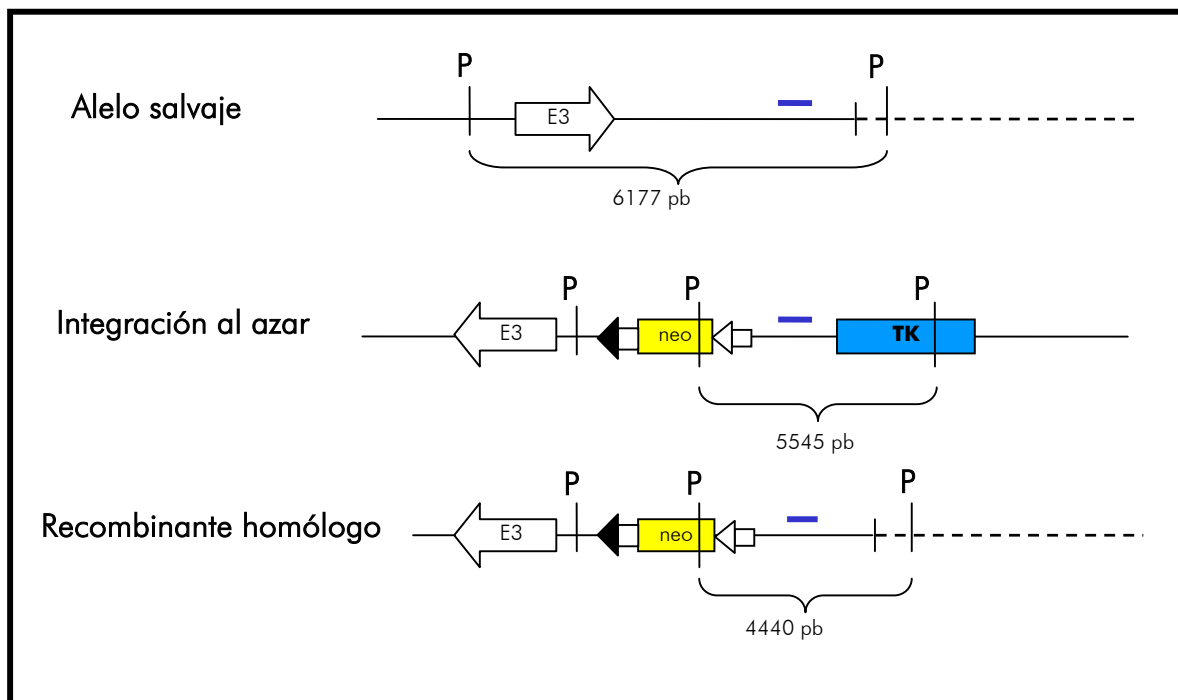


Figura 31: Estrategia de Southern blot para la verificación de recombinantes homólogos. La línea azul representa la sonda utilizada y P, las dianas de *Pst*I. La línea discontinua representa la zona 3' del gen endógena y no incluida en la construcción transgénica.

Tabla X: Cebadores utilizados en la verificación por PCR y en la creación de la sonda C1.

NeoCas3	GCTATGACTGGGCACAACAGACAATC
MM79	TGTAGGAGCAAATCAAGAGGAAGAGCAAC
MM68	AAATTGTGACATGATAAAAATCCATC
22aUP	CTTAATGTCCCTGGGAGCAGATCTG

Para la realización del Southern se digirieron 5 µg de ADN con 60 unidades de *Pst*I; como control positivo se utilizó una mezcla equimolar de ADN genómico de células ES R1 (sin transfectar) y ADN plasmídico de C36 (5 µg de R1 + 20 pg de C36). Ambas reacciones se dejaron a 37°C durante toda la noche.

Tras precipitación acetato-etanólica, y resuspensión en TE, los productos de digestión se cargaron en gel de agarosa (1%) y se dejaron migrar a 100 V hasta que las bandas de 4 y 6 kb se diferenciaron suficientemente una de otra. El gel se sumergió en HCl 0'25 M durante 15' para depurinación y seguidamente se desnaturizó en NaOH 0'4 M durante 20'. El ADN se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia, Biotech) mediante transferencia capilar en NaOH 0'4 M durante toda la noche. Al día siguiente se lavó en SSC 2x y se fijó a 80°C durante dos horas (Reed *et al.*, 1985).

La membrana se prehibridó a 65°C durante una hora en SDS 7%, Na₂HPO₄ pH 7'2 0'25 M. Paralelamente se marcaron 100 ng de la sonda C1 de 1094 pb con [α -³²P] dCTP (Amersham Pharmacia, Biotech), con la ayuda del kit *Random Primers DNA Labelling System* (Life Technologies). Tras purificación de la sonda en columna de Sephadex con TE, se desnaturizó a 100°C durante 5' y se hibridó a 65°C durante toda la noche (protocolo Zeta-Probe GT blotting membranes, BioRad).

Al día siguiente se lavó la membrana a 65°C dos veces en SDS 1%, 20 mM Na₂HPO₄, durante 30'; dos veces en SDS 0'1%, 20 mM Na₂HPO₄, durante 30' y finalmente dos veces en SDS 0'1%, SSC 1x durante 50'. La membrana se expuso durante 3 días a placas de autoradiografía (HiperfilmTMMP, Amersham Pharmacia Biotech) que se revelaron con un Hiperprocessor (Amersham).

A.5.2. Eliminación del cassette de selección Neo^r por recombinación mediante Cre

El cassette de resistencia a la neomicina, cuya utilidad fue la de seleccionar los clones de ES recombinantes homólogos, ha de eliminarse para el análisis de la inversión y antes de su implantación *in vivo*. Para ello se transfectaron transitoriamente los clones ES recombinantes homólogos con un vector de expresión Cre bajo la acción del promotor pMC1 y se seleccionaron los clones Neo-sensibles.

El primer paso fue el descongelado de los clones 3 y 8 seleccionados al azar entre los claramente positivos. Los protocolos de manipulación de células ES son los mismos que los utilizados en el apartado anterior (A.5.1.1. y A.5.1.2.).

Los clones, descongelados a partir de placas de 48 pocillos, se cultivaron y dividieron hasta alcanzar la confluencia en placas de 9 cm, y posteriormente (pase número 20) se electroporaron 10^7 células con 6 μg de vector pMC-Cre no linearizado (gentileza del Dr. Rajewsky, Institute for Genetics, Colonia, Alemania). Este vector contiene el promotor pMC1 y las regiones pA y enhancers de pMC1NeopA (Stratagene) y se caracteriza por poseer una señal de localización nuclear (Gu *et al.*, 1993).

Los clones transfectados se sembraron en placas mitomicinadas a una densidad de $5 \cdot 10^6$ células/placa y se dejaron crecer con medio normal MES (sin G418) durante 48 horas (una vez que el vector pMC-Cre ha tenido tiempo de expresar la recombinasa). Con este paso inicial de siembra se permite la expresión de Cre y se evita la heterogeneidad de colonias, de modo que cuando las células se resiembren posteriormente a baja densidad cada colonia estará originada por una sola célula que habrá o no sufrido una recombinación, pero que en todo caso dará lugar a una colonia homogénea.

Tras 48 horas, se tripsinizaron las placas y se resembraron a baja densidad ($2 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$ y 10^4 células/placa) en placas mitomicinadas. De este modo, las colonias resembradas procederán de una sola célula que será bien neo-resistente, bien neo-sensible.

Cuatro días después de la siembra a baja densidad se comenzó el repicado de células, que se resembraron a su vez en placas mitomicinadas de 96 pocillos, y por triplicado (para extracción de ADN, congelación y diagnóstico de Neo-sensibilidad). Al no tener la posibilidad de predecir ni la eficacia de transfección con el vector Cre, ni la proporción de clones con el tipo de delección deseada (ver más adelante en la figura 32 las distintas posibilidades), se optó por recoger un número elevado de clones a examinar. En total se repicaron 480 colonias del clon 3 y 432 del clon 8.

Una vez que las tres réplicas alcanzaron la confluencia se procedió al congelado de una de ellas, la extracción de ADN (PCR) de la segunda según los protocolos descritos (Ramírez-Solís *et al.*, 1992) y la selección Neo en la tercera.

En esta última réplica, se añadió al medio G418 a una concentración de $300 \mu\text{g/ml}$, renovándose el medio durante cinco días más. Tras este tiempo, se procedió a la identificación de los clones Neo-sensibles (Neo^S), entre los cuales se realizaron dos reacciones de PCR (12UP/17UP1 y 12DN/17UP1) para testar las distintas posibilidades de recombinación. La PCR se realizó a una temperatura de hibridación de 55°C durante 35 ciclos. En la figura 32 se representan dichas posibilidades y los cebadores utilizados. Aunque existen aún otras posibilidades, se representan aquellas en las que desaparece el Neo-cassette, siendo el primer paso del caso III el buscado en esta etapa.

Las dos PCRs deberían ser mutuamente excluyentes, ya que el tercer exón sólo puede encontrarse en una de las disposiciones si no ha habido contaminación de clones. Para la PCR 12DN/17UP1, el alelo salvaje se diferencia del recombinante invertido en 40 pb (aportadas por el adaptador con el *loxP*), de modo que en caso de producirse una inversión en el tercer exón, aparecerían dos bandas por PCR (250 y 290 pb).

Además del protocolo descrito de PCR se ensayaron diversos otros conjugando distintas concentraciones de MgCl_2 , cantidad de ADN y cebadores en posiciones próximas.

Además, se realizaron PCRs (MM64/12DN y MM64/12UP, ver figura 32) para descartar la posibilidad de una recombinación intercromatídica (Lewandowski & Martin, 1997) o de

una contaminación con clones salvajes, o de un error en el diagnóstico de neo-sensibilidad (12UP/MM67).

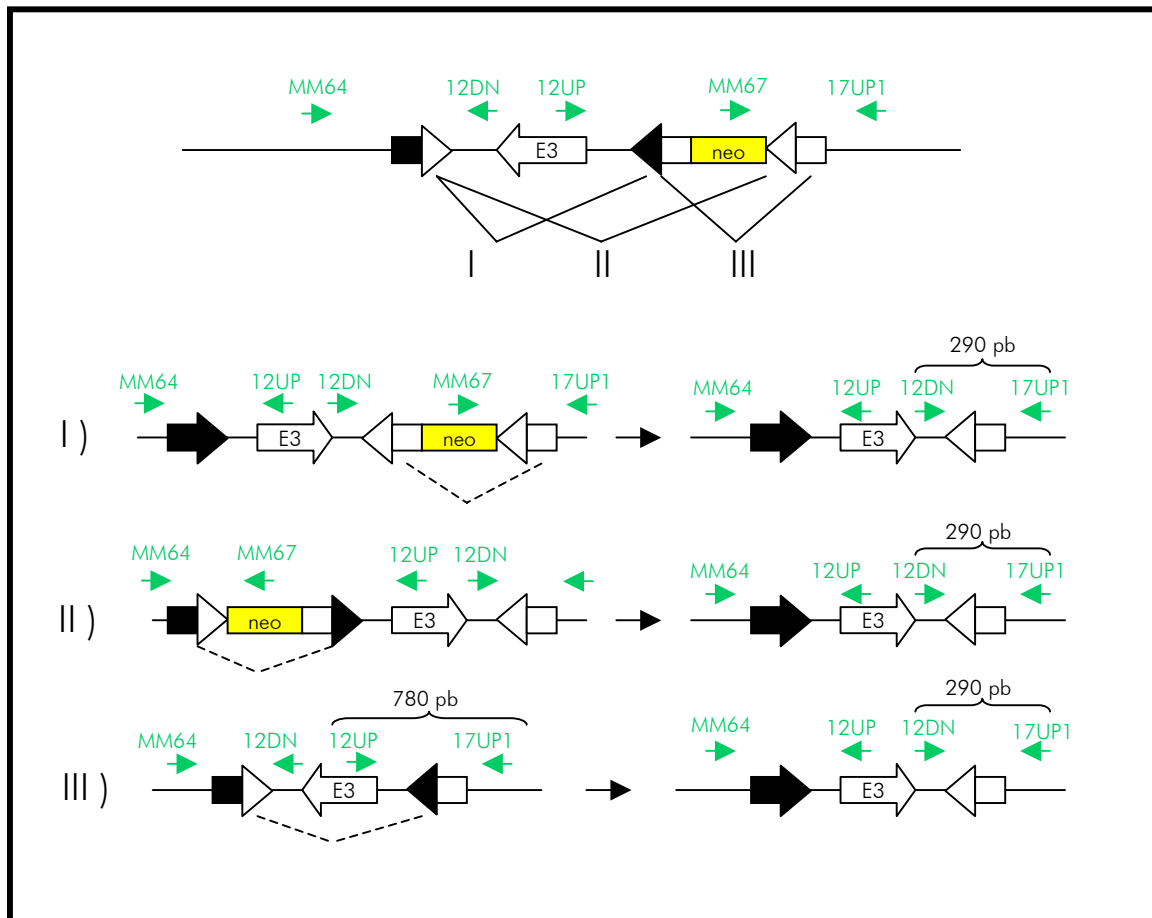


Figura 32: Representación esquemática de las distintas configuraciones posibles tras la actuación transitoria de la Cre-recombinasa. Además se representan los cebadores y productos de PCR diagnósticos.

A.6. Agregación de un clon Neo^s para la generación de quimeras

Se realizó una sesión de agregación con el clon Neo^s 3c6E siguiendo los protocolos de Torres & Kühn (1997) de agregación de células ES a mórulas.

Para la agregación se aislaron embriones en estado de mórula (2'5 d.p.c.) de hembras superovuladas de la línea FVB (línea de capa albina, lo que permite una fácil identificación de los animales quimeras resultantes de la agregación con células ES R1, que sólo son portadoras de alelos de color de capa oscuro). Tras eliminación de la zona pelúcida los embriones se colocaron individualmente en una pequeña concavidad realizada en las placas de cultivo, junto a los que se colocaron entre 12 y 20 células ES

del clon escogido (pasaje 25) previamente descongelado, dividido una vez tras alcanzar la confluencia y semitripsinizado. Estos agregados se cultivaron toda la noche a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y se implantaron en dos madres pseudogestantes al día siguiente (28 embriones/madre).

A.7. Ensayo de la eficacia de la inversión en células ES

Paralelamente a la sesión de agregación se procedió a un ensayo *ex vivo* en el clon de células ES con que se realizó la agregación con objeto de evaluar la eficacia de la inversión a nivel genómico.

A.7.1. Electroporación con pMC-Cre

Para ello se realizaron cuatro electroporaciones paralelas de 10⁷ células del clon 3c6E (pasaje 25) con 0, 5, 15 y 30 µg de pMC-Cre, respectivamente. Los clones electroporados se sembraron en dos placas cada uno. Tres días después de la electroporación los clones se resebraron a baja densidad (2000 células/placa 9 cm) y cuatro días después se repicaron 96 clones de cada electroporación de 5, 15 y 30 µg de pMC-Cre. Una vez alcanzada la confluencia se extrajo el ADN por los métodos ya descritos (apartado A.5.1.2.4.).

Paralelamente se realizó una extracción del ADN “en masa” (extracción fenol-clorofórmica, Sambrook *et al.* 1989) a partir de una de las dos placas en las que se sembró directamente tras la electroporación.

Se realizaron PCRs para los dos tipos de extracción (MM64/12UP entre los clones repicados individualmente, y 12DN/17UP1 en el ADN en masa) de las que deberían observarse dobles bandas: una menor para el alelo salvaje y otra mayor, debido a la existencia de un sitio *lox*, en el caso del alelo transgénico reinvertido (600 y 690 pb para MM64/12UP, y 250 y 290 pb para 12DN/17UP1).

A.7.2. Comprobación del clon 3c6E por PCR y secuenciación

Se realizaron PCRs de testado de la correcta disposición del transgén: con respecto a su integración en el gen (12UP/MM79) y ampliando el margen alrededor del lugar de inserción del cassette Neo (GDF8-15/17UP3).

Además, los dos *lox* mutados se amplificaron por PCR (MM63/MM65 para el *lox* 66, y GDF8-15/17UP1 para el *lox* 71) y las bandas resultantes se purificaron en gel de agarosa mediante GeneClean. Seguidamente se secuenciaron siguiendo los protocolos ya descritos. La disposición y secuencia de los cebadores utilizados se indican en la figura 33 y en la tabla XI respectivamente.

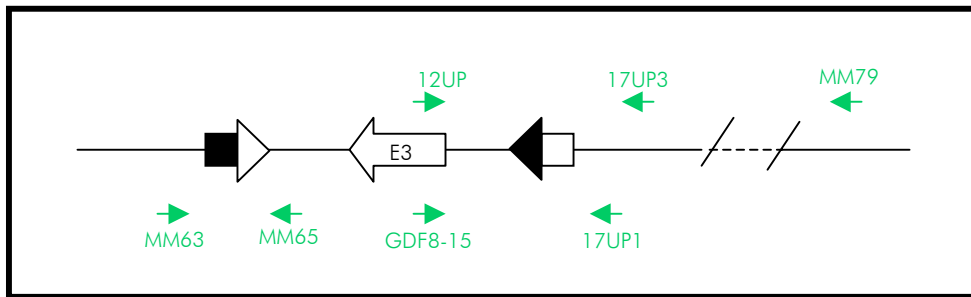


Figura 33: Representación esquemática de la disposición de los cebadores utilizados en la comprobación del clon 3c6E.

Tabla XI: Secuencia de los cebadores utilizados en el testado por PCR y en la secuenciación del clon 3c6E

12UP	TGGGTGTGTCTGTCACCTTGACTTC
17UP1	TTTTGATGGATTTTATCATGTCAC
MM63	GTGGTTAGTGTGATATTCCTTAGAG
MM65	AATTGGCAGTGGTATATACTCCTAG
GDF8-15	TCCCATCCAAAGGCTTCAAAATC
MM79	TGTAGGAGCAAAATCAAGAGGAAGAGCAAC
17UP3	GGACTCCACTCAAGGATGAAGGAAAGG

A.8. Test de eficiencia del vector de expresión pMC-Cre

A.8.1. Creación de dos líneas estables pSVlacZT

Con objeto de evaluar la eficacia de la transfección y recombinación del vector pMC-Cre en el clon 3c6E, se crearon dos líneas estables para un plásmido “*reporter*”. Dicho plásmido, pSVlacZT (gentileza del Dr. Rajewsky, Institute for Genetics, Colonia, Alemania), posee un promotor fuerte (SV40), el gen de la β -galactosidasa y, entre ambos, un gen de selección para la neomicina flanqueado por dos sitios *loxP* en la misma orientación (Torres & Kühn, 1997). De este modo, sólo si la Cre-recombinasa provoca la escisión del gen de la neomicina, la β -galactosidasa podrá expresarse gracias a la acción del promotor SV40 (ver figura 34).

Para poder comparar la eficacia de transfección, además de la línea a testar, 3c6E, se utilizó como control una línea “knock-out condicional” (KOC) (Grobet *et al.*, 2003), esto es, un clon de células ES cuyo tercer exón de la miostatina se encuentra flanqueado por dos sitios *loxP* en la misma orientación. Este clon proviene de la transfección con la construcción pPonc123bbj y posterior eliminación del cassette Neo (ver figura 26) y se eligió como control al igual que para el test *in vitro* (A.4.) por tener *loxP* reconocidos naturalmente por Cre y por su conocida eficacia de recombinación (Gu *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1995; Torres & Kühn, 1997).

Se electroporaron ambos clones según los protocolos descritos, utilizando 5 μg de pSVlacZT previamente linearizado por *XmnI* y purificado con el kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN). Dos días después se comenzó la Neo-selección con G418 a una concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Una semana después se recogieron 48 colonias 3c6E y 48 KOC Neo-resistentes, en dos réplicas, una de las cuales se congeló y la otra se utilizó para la extracción de ADN según los protocolos descritos (A.5.1.2.4.).

Como la inserción de pSVlacZT en el genoma se realiza al azar, en principio todos los clones Neo^R son válidos como líneas transfectadas estables; sin embargo, se analizó la integridad del inserto mediante PCR y Southern. Además se analizó el número de copias por genoma mediante PCR.

Una de las PCRs realizadas permitió analizar la integridad del gen β -galactosidasa, utilizando un cebador en el gen de la neomicina (NeoCas1) y otro en el último tramo de la secuencia del gen (BglIII-lacZ-3'), con ayuda del kit *ExpandTM Long Template PCR System* (Roche Molecular Biochemicals). Además se analizó la integridad del promotor utilizando un cebador en el vector (CH110-5') y otro en el gen Neo (MM67). La figura 34 representa la posición de dichos cebadores y en la tabla XII aparecen sus secuencias.

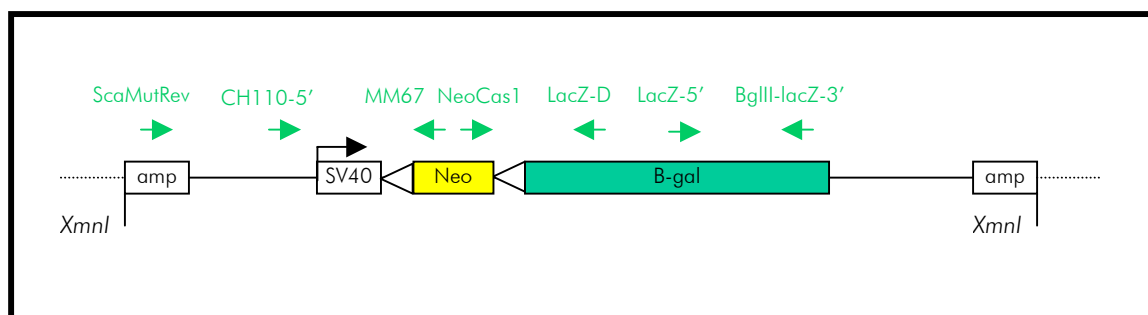


Figura 34: Representación esquemática de pSVlacZT. Se representa digerido por *XmnI*, tal y como se ha transfectado en las líneas celulares evaluadas. Se esquematiza la disposición de los cebadores utilizados en la evaluación por PCR de la integridad de la construcción pSVlacZT.

Tabla XII: Secuencia de los cebadores utilizados para evaluación por PCR del plásmido transfectado pSVlacZT y para la construcción de una sonda de Southern.

CH110-5'	AGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGG
MM67	GGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGAC
NeoCas1	GGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTAC
LacZ-D	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGG
BglIII-lacZ-3'	TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGG
lacZ-5'	GCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGC
22bDN	CAAGAGTTTTACAGAGATTAATAAG
1 st -sou-new	TCACTGCTGTCATCCCTCTGGACGTCG
LacZD	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGG

Al ser ésta una integración al azar, cabe la posibilidad de que se produzcan varias integraciones en tándem en el mismo punto; esto podría enmascarar los resultados de eficacia de recombinación, por competencia entre los *lox* de las construcciones transgénicas a testar ("Mstn OFF to ON" y "KOC") y un posible elevado número de cassettes Neo "floxados" de pSVlacZT en el mismo genoma. Para obtener una idea del número de copias de pSVlacZT por célula, se eligieron 12 clones positivos por línea celular para las PCRs anteriores y se sometieron a una PCR de cuantificación, tomando como control interno una banda de 730 pb en el primer exón de la miostatina (22bDN/1st-sou-new) (tablaXII) y comparándola con una banda en el gen de la β -galactosidasa (lacZ-5'/BglIII-lacZ-3') de 945 pb. Se realizó dicha PCR para 25, 30 y 35 ciclos a 55°C.

Para la realización del Southern se digirieron con *BglIII* y *PstI* 5 μ g de ADN de los 12 clones elegidos de cada línea y tras precipitación acetato-etanólica, se resolvieron los productos digeridos en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente este gel se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia, Biotech) según los protocolos descritos (ver A.5.1.2.8.). Como controles positivos se utilizaron 1 ng del plásmido pSVlacZT y 1 ng de la construcción pPonc123aak. La membrana se prehibridó a 65°C durante una hora en 7% SDS, 0'5M Na₂HPO₄ pH 7'2, 10mM EDTA . Paralelamente se marcaron 80ng de cada una de las sondas previamente purificadas por GeneClean: 22bDN/1st-sou-new (exón I de la miostatina) de 730 pb y lacZ-5'/BglIII-lacZ-3' (β -galactosidasa) de 945 pb, con [α -³²P] dCTP (Amersham Pharmacia, Biotech), con la ayuda del kit *Random Primers DNA Labelling System* (Life Technologies). Tras purificación de la sonda en columna de Sephadex con TE, se desnaturalizó a 100°C 5' y se hibridó a 65°C durante toda la noche. La razón de incluir una sonda en el exón I de la miostatina es la de tener una idea aproximada de la cantidad de copias integradas del gen de pSVlacZT por comparación a las del exón I de la miostatina.

Al día siguiente se lavó la membrana a 65°C dos veces en SDS 1%, 20 mM Na₂HPO₄ , durante 30' y una vez en SDS 0'1%, 20 mM Na₂HPO₄ , durante 30'. La membrana se expuso durante 3 días a placas de autorradiografía (HiperfilmTMMP, Amersham Pharmacia Biotech) que se revelaron con un Hiperprocessor, de Amersham. El esquema de los fragmentos resultantes de la digestión y la posición de las sondas se representa en la figura 35.

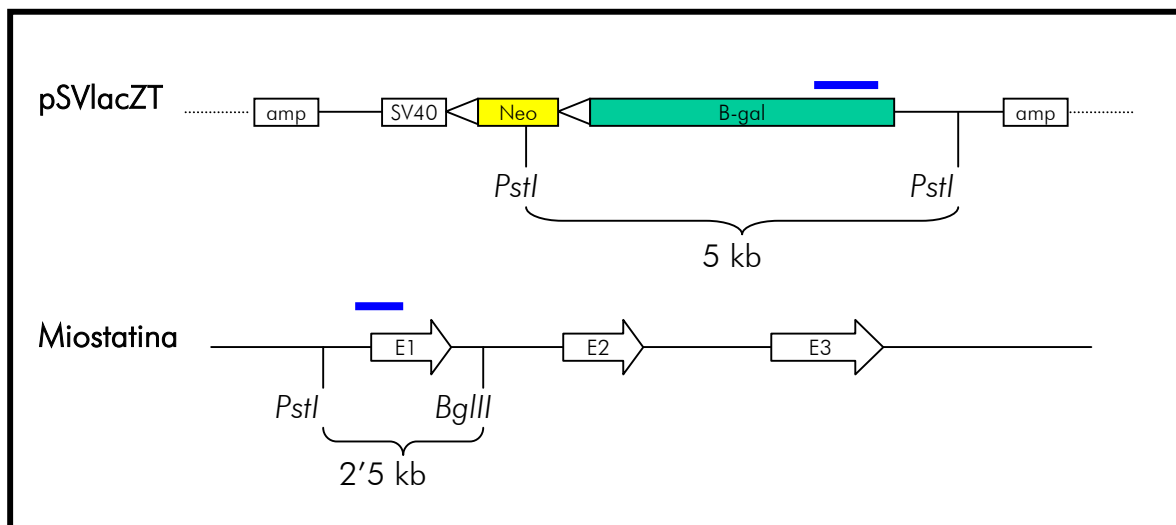


Figura 35: Estrategia de Southern blot para la verificación de la integridad de la construcción pSVlacZT. El fragmento superior representa el gen de la β -galactosidasa introducido con pSVlacZT, y el fragmento inferior representa el gen de la miostatina (en este caso se localizará por hibridación tanto el alelo normal como el transgénico). En azul se representan las sondas utilizadas.

A.8.2. Transfección transitoria de los clones pSVlacZT con pMC-Cre

Una vez verificada la integridad del gen de la β -galactosidasa y seleccionados los clones de ambas líneas con una sola copia del plásmido integrado, se procedió a su transfección transitoria con pMC-Cre con objeto de evaluar la eficacia de transfección y de recombinación del vector en la célula mediante la observación de las colonias coloreadas de azul tras exposición a X-Gal.

Para ello se electroporaron tres clones de la línea 3c6E (2.4, 4.3 y 6.1) y tres clones de la línea control KOC (1.7k, 2.3k y 6.6k) con 30 μ g de pMC-Cre. Dos días después se resembraron con un ratio de 1:10 en placas de 9 cm con 0'1% de gelatina (ver Apéndice de Reactivos) para realizar una extracción de ADN total (en masa); además se resembraron a baja densidad para repicado de células en placas de células EF mitomicinadas.

Una vez confluentes las placas gelatinizadas se procedió a la extracción del ADN total (ver A.5.1.2.4., adaptando las cantidades a placas de 9 cm), sobre el que se realizó una PCR para mostrar la escisión del cassette Neo perteneciente al transgén pSVlacZT, utilizando un cebador de cada lado de dicho cassette (CH110-5'/lacZ-D) (ver figura 34). Además, se realizó una PCR para observar las posibles recombinaciones llevadas a cabo por la Cre-recombinasa (delección del tercer exón en el caso de la línea KOC e inversión en la línea 3c6E). La pareja de cebadores utilizada en la línea 3c6E fue MM64/12UP y en la KOC, MM64/17UP1 (ver figura 28). Como controles positivos se utilizaron plásmidos a los que se había sometido *in vitro* a la acción de la Cre-recombinasa purificada (pPonc-*inv* y pPonc2b3j-Neo^S) y también la línea original KOC como control de la línea 3c6E.

Por otro lado, a partir de las placas sembradas a baja densidad, se repicaron 188 colonias del clon 2.4 (línea 3c6E) y 96 del clon 6.6K (línea KOC). El objetivo de analizar los clones individualmente era el de observar si había una correlación entre la escisión del cassette Neo y la delección o inversión del exón 3 en el cromosoma transgénico, además de afinar el screening si la reacción de recombinación fuera un evento poco frecuente. Se cultivaron por duplicado los clones individuales, reservando una copia para extracción de ADN sobre el que realizar las PCRs diagnósticas y otra para tinción X-Gal. Las PCRs realizadas fueron las mismas que para el ADN total (MM64/12UP para 3c6E y MM64/17UP1 para KOC, y CH110-5'/lacZ-D para ambas). La tinción de X-Gal se realizó según Torres & Kühn (1997). Para ello se lavaron las placas tres veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron otras tres veces con PBS y se añadió la solución de tinción X-Gal (ver Apéndice de Reactivos); seguidamente se incubaron toda la noche a 37°C en atmósfera de CO₂.

B. EVALUACIÓN DE DISTINTOS ALELOS DE LA MIOSTATINA POTENCIALMENTE DOMINANTES-NEGATIVOS. ENSAYOS DE INTERACCIÓN

La estrategia seguida para la generación de una serie de mutaciones dominantes negativas ha sido la de creación de unas variantes del alelo de la miostatina cuyos productos de traducción sean capaces de interactuar con la proteína salvaje formando dímeros que anulen su función. Al plantearse este diseño para su funcionamiento en animales heterocigotos, debemos prever la existencia equimolecular de los dos tipos de miostatina: la miostatina salvaje y la mutada. Si la interacción entre las distintas moléculas es al azar, esperaremos un 25% de dímeros de miostatina mutada, 50% de heterodímeros y un 25% de dímeros salvajes. Si suponemos que una cuarta parte de moléculas de miostatina activas (25% de dímeros salvajes) es insuficiente para aportar al individuo una conformación muscular normal, y que por tanto presentará un fenotipo hipertrófico, la utilización de este sistema para obtener individuos hipertróficos en un solo cruce con individuos normales está plenamente justificada.

Una de las características principales que han de cumplir las moléculas mutantes diseñadas para actuar como dominantes negativas es su capacidad de dimerizar con la miostatina salvaje dando lugar a un heterodímero potencialmente dominante negativo. Para ello, el objetivo de esta parte de la tesis ha sido la realización de dos experimentos de interacción proteica: un ensayo de *pull-down* y un estudio de doble híbrido en células mamíferas.

B.1. Pull-down

Este estudio se basa en la elevada selectividad y afinidad que presentan las matrices de cromatografía de afinidad de níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) por las biomoléculas portadoras de un "tag" o cola de residuos de histidina consecutivos. Esto conlleva por un lado la expresión de la miostatina salvaje fusionada a una pequeña secuencia amionocídica de 6 histidinas, y por otro, la unión de esta proteína de fusión a una resina compuesta de bolitas de agarosa-Ni²⁺ (Ni-NTA), para de esta forma inmovilizarla. Paralelamente, cada una de las miostatinas mutantes diseñadas, y de las que se quiere evaluar su capacidad de interacción con la miostatina salvaje, se genera mediante traducción *in vitro* en un lisado de reticulocitos, para luego procederse a la interacción de cada una de las proteínas mutantes con la salvaje y finalmente a la eliminación de las uniones no específicas mediante el ensayo de *pull-down* propiamente dicho.

B.1.1. Generación de las construcciones de pull-down

El ADN genómico utilizado proviene de hígado de ratones de la línea C57BL extraído mediante purificación fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). Todas las PCR de

generación de fragmentos se realizaron con Taq Gold (Perkin Elmer) y las PCR diagnósticas se realizaron con la ADN-polimerasa de Biotools. Las purificaciones de productos de PCR y de digestión se realizaron con el kit CONCERT (Gibco) y las purificaciones a partir de agarosa, con el kit GeneClean de BIO101 utilizando agarosa MB de Biotools. Las enzimas de restricción utilizadas son de Roche, así como la fosfatasa alcalina; la ligasa es una DNA-ligasa T4 Ready-To-Go (Amersham). Las transformaciones se realizaron utilizando células DH5 α competentes mediante el protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Las bacterias se cultivaron en LB (ver Apéndice de Reactivos) y las extracciones de ADN plasmídico se realizaron según el protocolo descrito en A.3.2., en los casos de minipreps diagnósticas, y con ayuda del kit de miniprep o midiprep de BIO101, en los casos de secuenciación y expresión de la proteína. Las secuenciaciones se realizaron con ayuda del kit *Big Dye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) en un secuenciador ABI 3100 Avant (Applied Biosystems). La eliminación de los terminadores fluorescentes de la reacción de secuenciación se realizó mediante una precipitación acetato-etanólica, seguida de un lavado en etanol 70%. Los marcadores de peso molecular utilizados aparecen descritos en el Apéndice de Marcadores. Los cebadores utilizados para PCR o secuenciación se describen en la tabla XIII.

Tabla XIII: Cebadores utilizados en las construcciones de *pull-down*. Las secuencias de las dianas de restricción (diagnósticas o de clonado) aparecen señaladas.

mstn1 BamHI.for	AGGTCCGGATCCGACTTTGGGCTTGACTGC
mstn1.rev	TTGGTGGATCCATGCCAACCATTCATCTATTC
mstn2.rev	GGAAGACCTTCCATGACTTGGG
OL2Stop.for	CCGCTGTGGGTGCTCATGGGCTTTGCATAAGCTTAGAAAT
mstn3.for	CAGTGGGGTACCCACCATGAGTGAGAGAGAAGAAAATG
OL2Prot.for	CAAGAGGGCCCCGATAGACTTTGGGCTTGACTGCGATGAG
OL1C340.rev	GCCATTAATAATATAGGTACCCAATGGGAGACATTTTTGTCCG
OL2C340.for	TGTCTCCCGGGAATATGCTATATTTAATGGCAAAGAACA
mstn5.for	CACCCACCCGGGCCACCATGGACTTTGGGCTTGAC
C340.for	CCCATTGGGTACCAAGCAAACCCAGAGGCTCAGCAGGGCCCTGCTAC
C340.rev	CATATCCCGGGAGACATTTTTGTCCGAGTGTAGCAGGGCCCTG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7.rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
PSmut.rev	CCCATATATTTTGTCTTTGCC
pSG5PL.rev	GAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG

A continuación se describe la estrategia utilizada para la generación de cada una de las distintas construcciones.

B.1.1.1. pRSET-A/mstn salvaje

Esta construcción es la destinada a expresar miostatina salvaje unida a una secuencia de histidinas mediante la cual puede unirse a una resina de agarosa.

El fragmento de miostatina salvaje se generó por PCR a partir de ADN genómico de ratón utilizando los cebadores *mstnBamHI.for/mstn1.rev*; las condiciones utilizadas fueron 94°C 10' seguido de 30 ciclos de 94°C 1', 56°C 1', 72°C 1', seguidos de un solo paso de extensión de 72°C durante 10'. Se utilizaron 100 ng de ADN, 2'5 mM MgCl₂, 1x buffer polimerasa, 400 μM dNTPs y μM de cada cebador. Este fragmento codifica para los 109 aminoácidos del péptido bioactivo de la miostatina.

Dicho fragmento (519 pb) se clonó, una vez digerido con *BamHI* y purificado, en el plásmido pRSET-A (Invitrogen), previamente digerido con *BamHI*, desfosforilado y purificado. Los clones positivos se seleccionaron mediante colony-PCR (PCR realizada directamente con la colonia bacteriana) utilizando la pareja de cebadores T7/*mstn1.rev*. Este vector de expresión, controlado por el promotor T7, incorpora en 3' un punto de unión a ribosoma, un ATG y una secuencia que codifica para 6 histidinas consecutivas, tras la cual se clona en fase el fragmento de la miostatina madura. La construcción final se verificó mediante secuenciación utilizando los cebadores T7 y T7.*rev*.

B.1.1.2. pSG5PL/alelos mutados

Las distintas miostatinas mutadas se clonaron en el vector de expresión eucariota pSG5PL (variante del plásmido comercial pSG5, de Stratagene, por modificación en su polilinker), que posee un promotor T7 en 3' y una secuencia de poliadenilación en 5'. Al no poseer secuencia de unión a ribosoma (secuencia Kozak) ni codon ATG, éstos fueron introducidos mediante los propios cebadores de PCR. La secuencia Kozak introducida fue CCACC (Kozak *et al.*, 1987).

a) pSG5PL/ProtSite

Introduciendo las 3 mutaciones que se detallan en la figura 36 se altera la pauta de lectura de tres de los cuatro aminoácidos de la diana de proteólisis (o *proteolytic site*), además de crearse una diana de restricción diagnóstica para la enzima *Apal*. De este modo la secuencia de la diana proteolítica pasa de RSRR a RAPI, que no coincide con la secuencia consenso de proteólisis en los TGFβ (RXRR).

Efecto esperado: la proteína mutante, al no poder perder todo el prodominio por digestión proteolítica, tendrá un tamaño muy superior (353 aminoácidos frente a 109) al de la miostatina normal activa. Los heterodímeros resultantes no podrán interactuar con los receptores de membrana por simple impedimento estérico.

Esta estrategia ya ha sido utilizada con éxito en miembros de la familia de los TGFβ (Hawley *et al.*, 1995) e incluso en la propia miostatina (Zhu *et al.*, 2000).

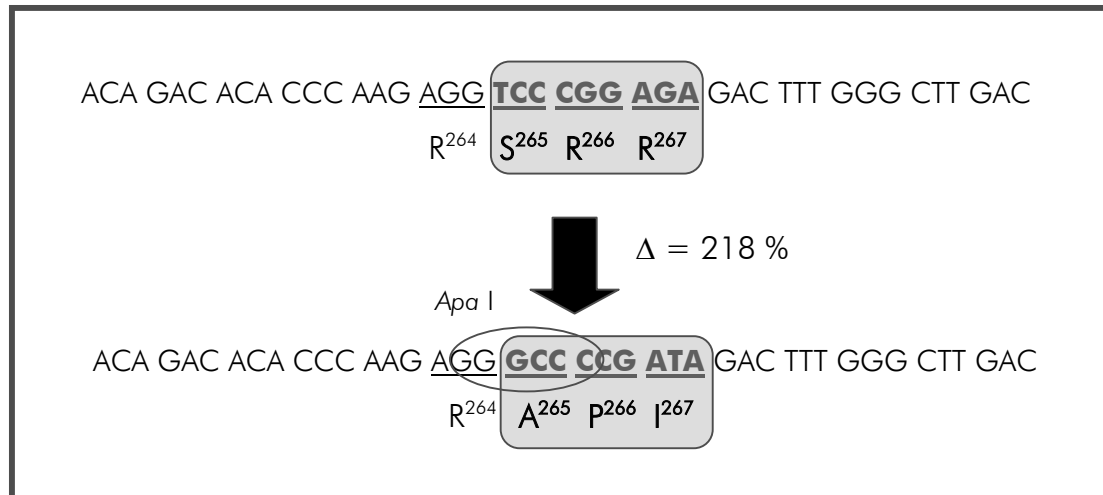


Figura 36: Esquema de las mutaciones introducidas en la construcción ProteolyticSite. Los cuatro aminoácidos subrayados constituyen la diana de proteolisis. Los aminoácidos mutagenizados aparecen enmarcados. El círculo señala la aparición de una diana de restricción diagnóstica.

Las mutaciones deseadas se han introducido mediante la técnica de mutagénesis dirigida por PCR solapante o de *overlapping* (Ho *et al.*, 1989) consistente en la generación de un fragmento de PCR que contiene la mutación gracias a uno de los cebadores utilizados, y que luego solapa con un segundo fragmento de PCR utilizando sólo los cebadores de los extremos, como se muestra en la figura 37. La PCR solapante produce al 50% fragmentos portadores de la mutación y fragmentos salvajes, que tras el clonado serán discriminados por digestión enzimática gracias a las nuevas dianas de restricción diagnósticas introducidas junto a las mutaciones dominante-negativas.

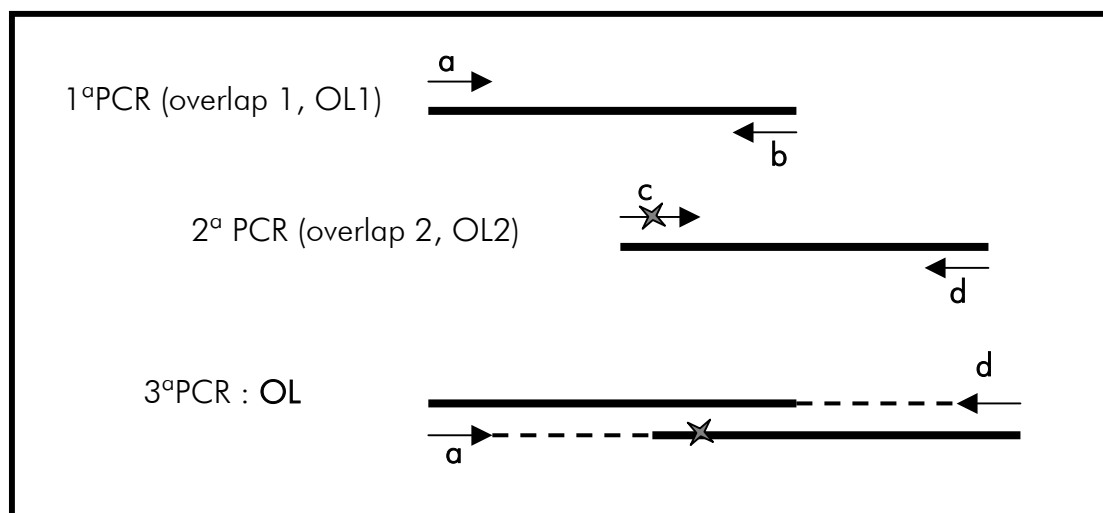


Figura 37: Esquema de los pasos seguidos en la realización de una PCR solapante (*overlapping*). El cebador c es el portador de la mutación a introducir. En la PCR final se utilizan como molde las PCR 1 y 2, y como cebadores a y d.

Para esta construcción en particular, el fragmento de PCR OL1 se generó a partir de ARN de ratón extraído del músculo pectoral con ayuda del *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). El ADNc correspondiente se generó con ayuda del Titan One-Tube RT-PCR System (Roche) utilizando los cebadores *mstn3.for* (introduce una secuencia Kozak y un ATG, eliminándose el péptido señal) y *mstn2.rev*. El fragmento OL2 se amplificó a partir de ADN genómico murino con los cebadores OL2Prot.for (introduce la mutación ProtSite y la diana de restricción diagnóstica *ApaI*) y *mstn1.rev*. El fragmento solapante OL, de 1257 pb, se amplificó con la pareja de cebadores *mstn3.for/mstn1.rev* con unas condiciones de PCR de 94°C 10' seguido de 30 ciclos de 94°C 1', 56°C 1', 72°C 1'30'', seguidos de un solo paso de extensión de 72°C durante 10'. Los fragmentos OL1 y OL2 se utilizaron en dilución 1:100, y el resto de condiciones son las mismas que las descritas en el punto B.1.1.1.

Tras digestión *KpnI/BamHI* y clonado en *pSG5PL/KpnI,BamHI*, se procedió a la discriminación de los clones positivos mediante digestión con *ApaI* de las minipreps de varios de los clones positivos para la colony-PCR T7/OL1C340.rev. El clon escogido finalmente se secuenció con los cebadores T7, Ex1.for, PSmut.rev, *mstn1.rev* y *pSG5PL.rev*.

b) *pSG5PL/Stop*

En esta construcción se han introducido 3 mutaciones puntuales en la región del gen que codifica para el extremo final de la proteína. En concreto, una de ellas cambia el codon de terminación (StopI) por un triptófano (W), mientras que las otras dos eliminan un segundo codon de terminación (StopII) y una valina transformándose en lisina y leucina y creando una diana de restricción diagnóstica para la enzima *HindIII*. El tercer codon Stop que aparece en la secuencia se mantiene para permitir la interrupción de la proteína. El esquema de las mutaciones introducidas aparece en la figura 38.

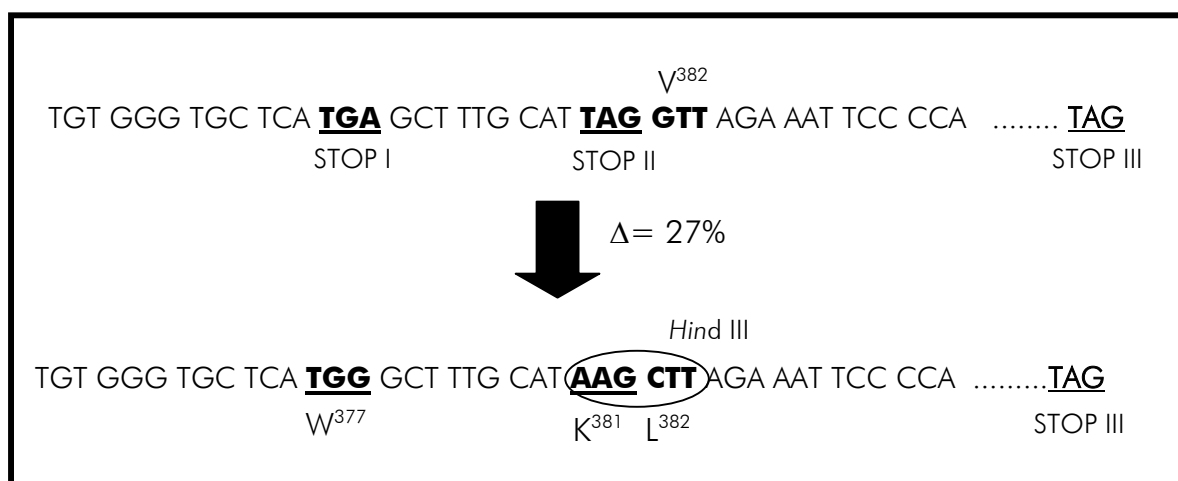


Figura 38: Esquema de las mutaciones introducidas en la construcción Stop.

Los aminoácidos modificados aparecen señalados en negrita y el círculo señala la aparición de una diana de restricción diagnóstica.

Efecto esperado: la miostatina mutante incrementa su tamaño de una forma más moderada que en la construcción anterior, por la adición de 29 aminoácidos en su extremo distal (que suponen un incremento del 27%). Esta proteína alterada ejercerá la dominancia negativa también por impedimento estérico, bien por medio de heterodímeros normal-mutante, bien por heterotrímeros. Esta última posibilidad, si bien bastante menos probable, se deriva de la presencia de una cisteína supernumeraria (que hemos llamado C¹⁰) en el fragmento añadido.

La mutagénesis de esta construcción se realizó igualmente mediante la técnica de *overlapping* descrita. Para esta construcción se partió íntegramente de ADN genómico. Las parejas de cebadores utilizadas en la generación de la construcción Stop fueron OL1 = mstn2.for (introduce Kozak y ATG)/mstn2.rev y OL2 = OL2Stop1.for (introduce las mutaciones Stop y la diana diagnóstica *HindIII*)/mstn1.rev. En la PCR solapante, de 527 pb, se utilizaron los cebadores mstn2.for/mstn1.rev con unas condiciones de PCR idénticas a las descritas para pSG5PL/ProtSite.

Los fragmentos solapantes se clonaron en pSG5PL previamente digerido con *KpnI* y *BamHI*, y tras una primera selección de clones mediante colony-PCR (T7/mstn1.rev), los positivos fueron posteriormente discriminados de los clones salvajes mediante digestión con *HindIII*. El clon resultante se secuenció utilizando los cebadores T7 y mstn1.rev.

c) pSG5PL/C340

En esta construcción se ha insertado un fragmento que codifica para 22 aminoácidos y que contiene en su interior una segunda cisteína intercatenaria (C³⁴⁰). Esta cisteína se ha insertado junto a sus aminoácidos adyacentes ya que se ha visto que el contexto de aminoácidos en el que se encuentra una cisteína dada influye en gran medida en la formación de puentes disulfuro (Muskal *et al.*, 1990). La cisteína 341 adyacente, responsable del puente intracatenario C²⁸²-C³⁴¹, se sustituye por un triptófano en el fragmento insertado.

Efecto esperado: el incremento de longitud de la proteína mutante es, al igual que en la construcción anterior, moderado (se ganan 22 aminoácidos, lo que supone un incremento del 20%). La dominancia negativa se ejercerá por los mismos mecanismos que en el caso de los Stops, si bien ahora resulta bastante más factible la formación de trímeros, pues se ha duplicado la misma secuencia responsable de la interacción entre monómeros (Farzan *et al.*, 1998; Peabody, 2003).

En este caso la mutagénesis se ha realizado por inserción de un fragmento de 55 pb mediante técnicas de digestión y ligado habituales. Los fragmentos generados a partir de ADN genómico fueron C1: mstn5.for (introduce Kozak y ATG)/OL1C340.rev, CC: C340.for/C340.rev y C2: OL2C340.for/mstn1.rev. Los 3 fragmentos de PCR se clonaron en el vector TOPO-TA (Invitrogen) siguiendo los protocolos especificados, tras lo cual el fragmento digerido C2/*XmaCI*,*BamHI* se subclonó en TOPO/CC, para posteriormente subclonar el fragmento C1/*AvaI*, *KpnI* en TOPO/CC+2C. Los clones positivos se seleccionaron mediante colony-PCR T7/pSG5PL.rev. La construcción resultante se muestra en la figura 39. Finalmente, se secuenció todo el fragmento insertado del clon positivo utilizando los cebadores T7, OL2Stop.for y mstn2.rev.

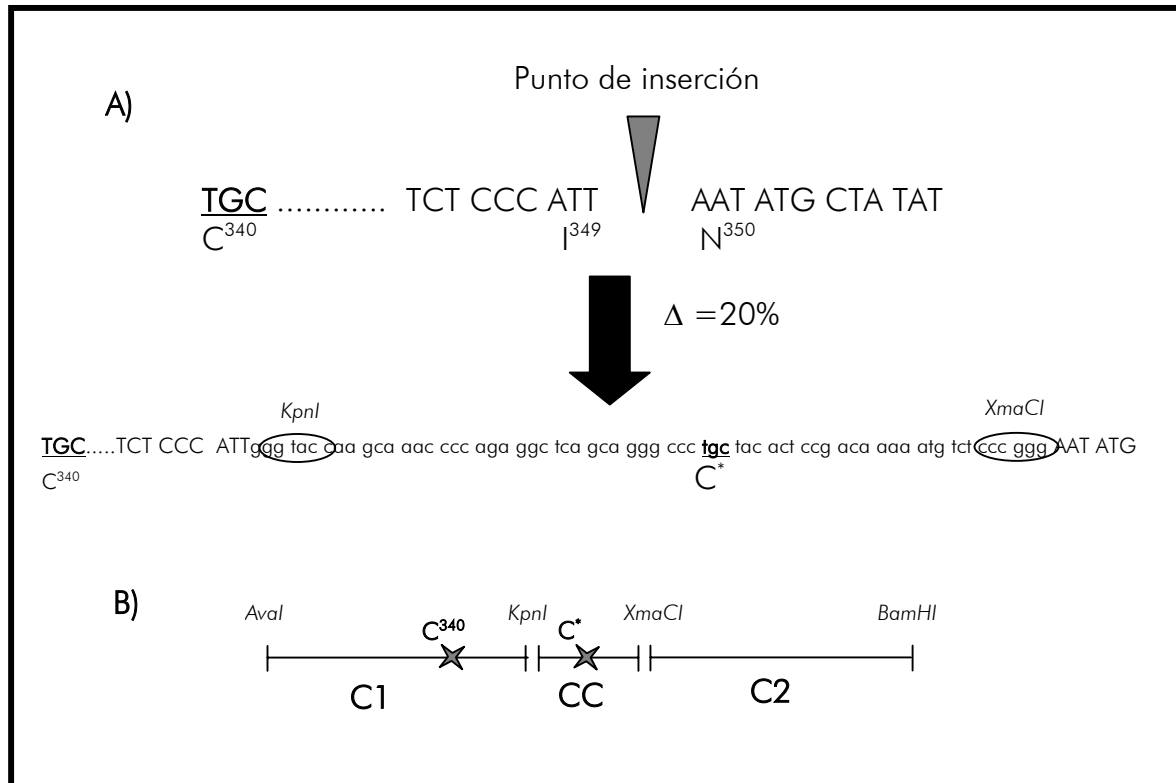


Figura 39: Esquema de la construcción C340. A) Esquema de la inserción del nuevo fragmento; C^* representa la segunda cisteína intercatenaria de la construcción, introducida con el nuevo fragmento integrado. B) Esquema del ligado de los 3 fragmentos para dar lugar a la construcción C340.

B.1.2. Obtención de la proteína de fusión His-miostatina

La cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLys (Novagen) se transformó con la construcción pRSET/mstn según los protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989) y seleccionando con cloramfenicol y ampicilina. Esta cepa permite la expresión de altos niveles de proteína clonada de forma controlada gracias a la presencia en su genoma de una copia del gen de la T7-RNapolimerasa bajo el control del promotor lacUV5, inducible por IPTG.

El cultivo de esta cepa transformada se indujo con IPTG a una concentración 1 mM incubando a 37°C en agitación constante durante 5 horas. Posteriormente se realizó un lisado celular en condiciones desnaturizantes (con urea) mediante el protocolo "Rapid screening of small expression cultures" del manual QIAexpressionist (QIAGEN) y sin utilizar columnas de purificación.

Para comprobar la expresión de la proteína de fusión His-miostatina se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE con distintas cantidades del lisado del cultivo transformado utilizando un gel al 14% al que se realizó una tinción de azul Coomassie (Gallagher, 1997).

Además se realizó una inmunodetección mediante Western blot siguiendo los protocolos descritos (Gallagher *et al.*, 1997). La electroforesis y la transferencia se realizaron en una cubeta Miniprotein II (BioRad) y el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Inmunoblot PVDF, BioRad). Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-His₆ (Roche) y como secundario, un anticuerpo anti-IgGmurino-fosfatasa alcalina (Novagen), revelándose mediante el sistema colorimétrico BCIP/NBT (Roche).

B.1.3. Inmovilización de la proteína de fusión His-miostatina a una resina de agarosa

Para el ensayo de interacción se procedió a obtener la proteína de fusión unida a una matriz gracias a la cual se realiza el *pull-down*. Para ello se siguió el protocolo especificado en el manual QIAexpressionist (QIAGEN) “*6xHis-tagged protein minipreps under denaturing conditions*”, utilizando agarosa Ni-NTA (QIAGEN) e interrumpiendo el protocolo antes de la elución final, para terminar con dos lavados más de la resina con PBS pH 7.4 (ver Apéndice de Reactivos) al que se añade el cóctel de inhibidores de proteasas Complete mini (Roche).

El resultado de la unión de la proteína His-miostatina a la resina de agarosa se verificó igualmente mediante Western blot, utilizando anticuerpos anti-histidina.

Por otro lado, se realizó un control negativo para confirmar la especificidad de la proteína de fusión unida a la resina en una interacción con otras proteínas y comprobar que la resina de agarosa por sí sola no es capaz de unirse a una molécula de miostatina (sin secuencia adyacente de histidinas) en un ensayo de interacción. Para ello se realizó una interacción entre la resina sin miostatina-His y la miostatina (Prot-Site) expresada en un lisado de reticulocitos, en el que se marcaron los productos obtenidos con Transcend™tRNA biotinilado (Promega) (ver condiciones de interacción en los siguientes apartados B.1.4. y B.1.5.). Esto se visualizó mediante Western blot utilizando Streptavidin-Fosfatasa Alcalina (Promega), cuya molécula de estreptavidina presenta una alta afinidad por la biotina unida a las proteínas expresadas en el sistema de reticulocitos, y revelando mediante el sistema colorimétrico NBT/BCIP (Roche).

B.1.4. Expresión de las distintas construcciones en un lisado de reticulocitos

Para este ensayo se escogió un lisado de reticulocitos de conejos por ser un sistema que proporciona un ambiente eucariota más próximo a las condiciones naturales de la miostatina que el ofrecido por un sistema bacteriano. Para ello se utilizó la versión radiactiva del kit “*TNT coupled reticulocyte lysate*” de Promega.

La reacción de traducción se realizó para las tres construcciones mutantes y para la construcción pRSET/mstn por separado siguiendo los protocolos descritos por Promega. Se utilizaron entre 300 y 500 ng de ADN y 1 µl de Redivue L-[³⁵S]metionina (Amersham)

por cada 25 μ l de reacción. Esta reacción se incubó a 30°C durante 2 horas. Estos mismos protocolos se realizaron también con pRSET/mstn.

Los productos de esta reacción se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 15% para ser revelado mediante autorradiografía, utilizando placas Biomax MR (Kodak), que se expusieron durante una semana.

B.1.5. Ensayo de interacción (pull-down)

La interacción se realizó mezclando 20 μ l de reacción de TNT de cada una de las 3 reacciones (ver B.1.4.) con 50 μ l de resina unida a miostatina-His (ver B.1.3.) y con 70 μ l de PBS con inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche). Esta mezcla se incubó a 4°C en rueda giratoria durante toda la noche, tras lo cual se lavó la resina dos veces con 100 μ l de PBS con inhibidores de proteasas para eliminar las uniones no específicas.

Finalmente se realizó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15% (Gallagher,1997) para visualizar los resultados de la interacción mediante autorradiografía del mismo modo que con los productos obtenidos en el lisado de reticulocitos. El paso de desnaturalización a 100°C previo a la carga en el gel libera los complejos de agarosa-Ni-NTA, y las condiciones reductoras utilizadas (con DTT) provocan la separación de los heterodímeros formados, de modo que en el gel sólo se observarán las proteínas en forma monomérica (marcadas radiactivamente) que hayan interactuado con el complejo Ni-NTA-mstn-His.

B.2. Ensayo de doble-híbrido en células mamíferas

Este ensayo persigue complementar los resultados del experimento de *pull-down*, ofreciendo un ambiente celular eucariota capaz de realizar modificaciones post-traduccionales responsables de las interacciones proteicas en células mamíferas.

El sistema de doble híbrido se basa en el hecho de que muchos factores de transcripción eucariotas se componen de dos dominios funcionales: un dominio de unión al ADN (BD, "binding domain") y un dominio de activación (AD, "activation domain"). El dominio BD reconoce una secuencia de ADN mientras que el dominio AD facilita la unión de la maquinaria de transcripción y ordena a la ARN-polimerasa II transcribir los genes apropiados en 3' de la región donde se ha unido BD. En los sistemas de doble híbrido los dominios BD y AD están físicamente separados uno del otro y se traducen como proteínas de fusión junto a las dos proteínas, X e Y, que se evalúan para su capacidad de interactuar (Fields & Song, 1989; Chien *et al.*, 1991).

En este ensayo se ha utilizado el *TOPO[®] Tools Mammalian Two-Hybrid kit* (Invitrogen), en el que el dominio GAL4-BD proviene de *Saccharomyces cerevisiae*, y el dominio VP16-AD, del virus herpes simplex. El gen que se transcribe cuando se produce la interacción es *lacZ*, que codifica para la β -galactosidasa y está contenido en el plásmido reporter. La expresión de *lacZ* está controlada por un promotor híbrido consistente en las secuencias

de activación 3' GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* (UAS) unido a la caja TATA del promotor mínimo E1b adenovirus. La región UAS consiste en 6 copias de una secuencia de 17 nucleótidos que constituyen el dominio de unión para el factor de transcripción GAL4 de levadura.

Cuando la proteína X interacciona con la proteína Y, el dominio de activación entra en proximidad con el dominio de unión al ADN, reconstituyendo la unidad de activación transcripcional y dando como resultado la expresión del gen reporter, como se esquematiza en la figura 40.

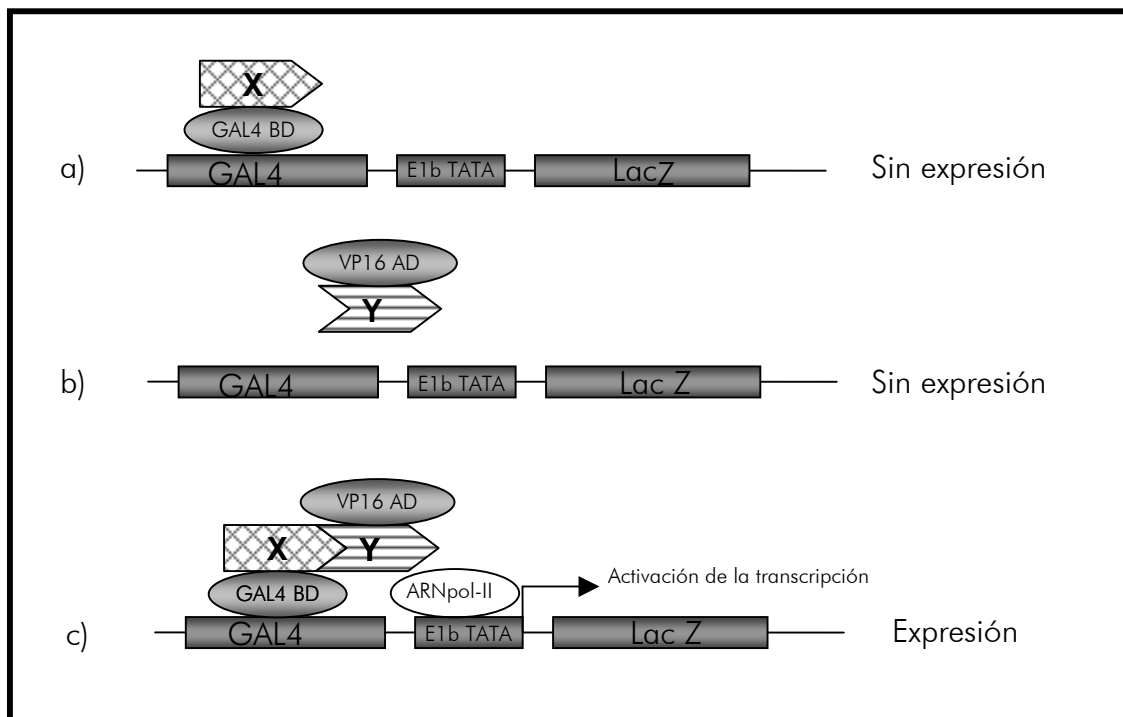


Figura 40: Esquema del funcionamiento del sistema de doble híbrido. a) La proteína de fusión GAL4-X puede unirse al ADN pero no activa la transcripción de lacZ. b) La proteína de fusión VP16-Y no puede activar la transcripción de lacZ por sí sola. c) La interacción de las proteínas X e Y provoca la activación de la transcripción de lacZ.

En el presente ensayo se crearon cinco proteínas de fusión: por un lado el dominio BD con la miostatina salvaje y por otro, el dominio AD con la miostatina salvaje y además con cada una de las tres miostatinas mutantes.

B.2.1. Generación de las construcciones de doble híbrido

El kit de Invitrogen utilizado permite la posibilidad de generar las proteínas de fusión mediante la tecnología TOPO[®] (ligando los productos de PCR modificados directamente

y amplificando el producto final en una sola reacción). Sin embargo, ante los repetidos intentos frustrados por amplificar el producto de PCR buscado, se decidió recurrir a técnicas habituales de digestión y ligado, utilizando productos de PCR amplificados a partir de los dominios AD, BD y secuencia poliA de los plásmidos control del kit de Invitrogen.

Los reactivos y metodología utilizados son los mismos que los del punto B.1.1. y los cebadores utilizados se describen en la tabla XIV. Todas las construcciones se purificaron con ayuda del kit *Gene Elute™ Plasmid Miniprep* (Sigma).

Tabla XIV: Cebadores utilizados en las construcciones de doble híbrido. Las secuencias de las dianas de restricción de clonado aparecen señaladas.

Eco5'.for	AGTGTGCTGGAATTCGCCCTTTATG
TOPO5'GAL4Bam.rev	TTCCGAGGATCCCAGTACAGTCAACTG
ADBamIlgT.rev	GGATCTGAGGATCCGATCCCCGGGAACTCCCCAC
msTOPO-Bam.for	AGGTCGGATCCGACTTTGGGCTTGAC
msTOPO-Not.rev	ACCTAAGCGGCCGCTCATGAGCACCC
PS5'Bam.for	CTAAATGGATCCAGTGAGAGAGAAGAAAATG
Stop3'Not.rev	AGCATAGCGGCCGCTACAGCCTGTGGTG
SV40pAp53Not.for	AAGCTTCGCGGCCGCTAATGATCATAATC
SV40pAPst.rev	GATATCTGCAGAATACGCCCTTACC
M13.rev	CAGGAAACAGCTATGAC
Ex1.for	GTACGACGTCCAGAGGGATGACAGC
Ex1.rev	GCTGTCATCCCTCTGGACGTCGTAC

a) BDmstn

El dominio BD se amplificó a partir del plásmido control pCR[®]2.1/p53 utilizando los cebadores Eco5'.for y TOPO5'GAL4Bam.rev. La miostatina se amplificó a partir de la construcción de *pull-down* pRSET/mstn utilizando los cebadores msTOPO-Bam.for y msTOPO-Not.rev. Finalmente, la secuencia de poliadenilación se amplificó a partir de pCR[®]2.1/p53 con la pareja de cebadores SV40pAp53Not.for/SV40pAPst.rev. Tras digestión y purificación de los 3 productos de PCR, los fragmentos de miostatina /*Bam*HI, *Not*I y poliA/*Not*I, *Pst*I se clonaron en pGEM[®]-3Zf(+) (Promega) digerido con *Bam*HI y *Pst*I. Posteriormente, esta construcción se digirió con *Eco*RI y *Bam*HI para insertar el fragmento BD/*Eco*, *Bam*. La construcción final se secuenció utilizando los cebadores Eco5'.for, TOPO5'GAL4Bam.rev, msTOPO-Bam.for, msTOPO-Not.rev y M13rev.

b) ADmstn

El dominio AD se amplificó a partir del plásmido control pCR[®]2.1/IgT utilizando los cebadores Eco5'.for y ADBamIlgT.rev. La miostatina y la secuencia de poliadenilación se amplificaron como en la construcción BDmstn. Tras digestión y purificación de los 3 productos de PCR, los fragmentos se clonaron en dos pasos como en el caso anterior. La

construcción final se secuenció utilizando los cebadores Eco5'.for, ADBamIgt.rev, msTOPO-Bam.for, msTOPO-Not.rev y M13rev.

c) ADProtSite

El dominio AD y la secuencia de poliadenilación se amplificaron como en la construcción ADmstn. La miostatina con la mutación ProtSite se amplificó a partir de pSG5PL/ProtSite (ver B.1.1.2.) utilizando los cebadores PS5'Bam.for/msTOPO-Not.rev. Tras digestión y purificación de los 3 productos de PCR, los fragmentos se clonaron en dos pasos como en los casos anteriores. La construcción final se secuenció utilizando los cebadores Eco5'.for, ADBamIgt.rev, MSTN3.for, Ex1.for, Ex1.rev, msTOPO-Bam.for, msTOPO-Not.rev y M13rev.

d) ADStop

El dominio AD y la secuencia de poliadenilación se amplificaron como en la construcción ADmstn. La miostatina con la mutación Stop se amplificó a partir de pSG5PL/Stop (ver B.1.1.2.) utilizando los cebadores msTOPO-Bam.for/Stop3'Not.rev. Tras digestión y purificación de los 3 productos de PCR, los fragmentos se clonaron en dos pasos como en los casos anteriores. La construcción final se secuenció utilizando los cebadores Eco5'.for, ADBamIgt.rev, msTOPO-Bam.for, Stop3'Not.rev y M13rev.

e) ADC340

El dominio AD y la secuencia de poliadenilación se amplificaron como en la construcción ADmstn. La miostatina con la mutación C340 se amplificó a partir de pSG5PL/C340 (ver B.1.1.2.) utilizando los cebadores msTOPO-Bam.for/msTOPO-Not.rev. Tras digestión y purificación de los 3 productos de PCR, los fragmentos se clonaron como en los casos anteriores. La construcción final se secuenció utilizando los cebadores Eco5'.for, ADBamIgt.rev, msTOPO-Bam.for, msTOPO-Not.rev y M13rev.

B.2.2. Transfección celular

La cepa elegida para la realización del ensayo fue la CHO-K1 (ACC 110, DSMZ), una línea de fibroblastos de ovario de hamster conocida por su fácil manipulación y transfección. Esta cepa se cultivó en medio Hams's F12 (Invitrogen) con 10% FBS (Invitrogen) y antibiótico-antimicótico (Invitrogen). Las células en crecimiento se mantuvieron en atmósfera húmeda a 37°C y 5% CO₂ y se dividieron en un ratio 1:7 cada 48 horas.

El día anterior a la transfección se sembraron 30.000 células en pocillos de placa de 96 (p⁹⁶) en medio de cultivo sin antibiótico. Como agente de transfección se utilizó Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Se transfectaron 150 ng de cada una de las construcciones AD y BD, más 120 ng del plásmido reporter pGAaL/lacZ por pocillo junto

a 0'5 μ l de Lipofectamine diluidos en Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Invitrogen). Junto a las reacciones evaluadas se realizaron un control positivo (pCR2.1/GAL4-VP16 + pGAL/lacZ), un control positivo de interacción (pCR2.1/LgT + pCR2.1/p53 + pGAL/lacZ) y un control negativo (pCR2.1/VP16-CP + pCR2.1/p53 + pGAL/lacZ), según las indicaciones del kit *Mammalian Two-Hybrid* de Invitrogen. Además se realizaron los controles de background de cada una de las interacciones evaluadas, transfectando las construcciones una a una junto a pGAL/lacZ. La tabla XV esquematiza las cotransfecciones efectuadas.

Tabla XV: Cotransfecciones efectuadas en el ensayo de doble híbrido.			
Control mstn/mstn	BDmstn	ADmstn	pGAL/lacZ
Mstn/ProtSite	BDmstn	ADProtSite	pGAL/lacZ
Mstn/Stop	BDmstn	ADStop	pGAL/lacZ
Mstn/C340	BDmstn	ADC340	pGAL/lacZ
Control Background 1	BDmstn	---	pGAL/lacZ
Control Background 2	---	ADmstn/PS/Stop/C340	pGAL/lacZ
Control positivo	pCR2.1/GAL4-VP16	---	pGAL/lacZ
Control positivo de interacción	pCR2.1/LgT	pCR2.1/p53	pGAL/lacZ
Control negativo	pCR2.1/VP16-CP	pCR2.1/p53	pGAL/lacZ

Siete horas después de la transfección se cambió el medio de transfección a medio de cultivo habitual sin antibiótico y se incubó durante 48 horas más. Finalmente se realizó una tinción de β -galactosidasa según el protocolo descrito en el punto A.8.2. para detectar la interacción proteica.

Posteriormente se realizó una cuantificación de los niveles de β -galactosidasa expresada en las células CHO-K1 para la miostatina salvaje, para cada una de las proteínas dominantes negativas y para un control negativo sin transfectar. Esta cuantificación se realizó con ayuda del kit *β -gal Assay* (Invitrogen) basado en la capacidad de la enzima β -galactosidasa de hidrolizar ONPG (orto-nitrofenil- β -galactopiranosido) a anión ONP produciendo un color amarillo brillante con un pico de absorbancia a 420 nm, fácilmente cuantificable en el espectro.

El ensayo se realizó para tres pocillos distintos, midiéndose a su vez tres volúmenes diferentes por pocillo (1, 5 y 10 μ l de lisado celular). Los resultados se estandarizaron para el número de células y se corrigieron sustrayendo el valor del control sin transfectar. Para cada una de las proteínas se calculó el valor promedio de las 9 medidas y su desviación estándar.

En el análisis estadístico se realizó un test t-Student para ver si había diferencias significativas entre cada una de las proteínas dominantes negativas y la proteína salvaje.

RESULTADOS

A. EVALUACIÓN EN CÉLULAS ES DE UN SISTEMA DE ACTIVACIÓN CONDICIONAL DE LA MIOSTATINA

A.1. Construcción de pPonc123aak

A.1.1. Secuenciación del *lox* mutagenizado en pGEMSTN3

El plásmido pGEMSTN3, portador del tercer exón y un *loxP*, se mutagenizó con objeto de convertir este *loxP* en un *lox66* (ver A.3.3. de Materiales y Métodos). Después del ensayo de mutagénesis en pGEMSTN3 se picaron y cultivaron 24 colonias bacterianas, de entre las que sólo 6 dieron positivo para la PCR de confirmación de la correcta mutagénesis (cham-mut/sou3'5'1). Tras secuenciación de estos 6 clones, se seleccionó uno de ellos para proseguir la construcción mediante ensamblado en pPonc3j. En la figura 41 se representa el fragmento del electroferograma de dicho clon (ahora denominado pGEMSTN3R66) en el que se aprecia la zona mutagenizada del *loxP* una vez convertido en *lox66*. El cebador utilizado en esta secuencia es el M13for-20 (tabla II).

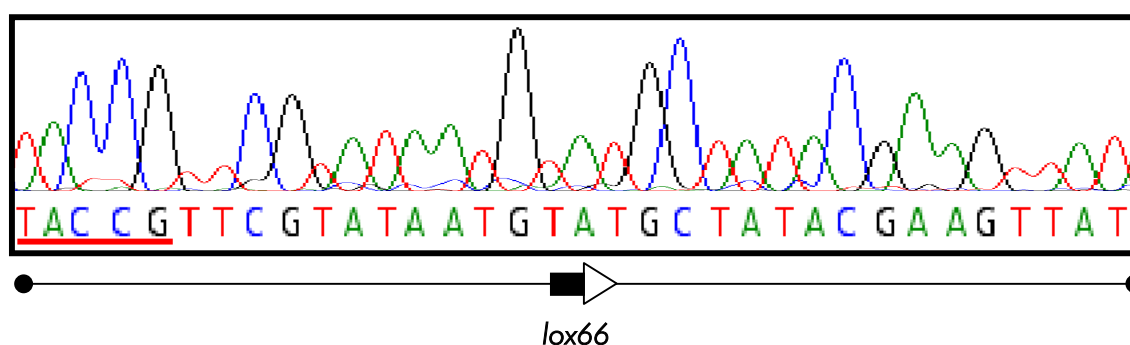


Figura 41: Electroferograma de pGEMSTN3R66. La zona mutagenizada del *lox66* se muestra subrayada en rojo.

A.1.2. Confirmación por PCR y digestión del ensamblado final de fragmentos (pPonc123aak)

El paso final en la construcción definitiva de pPonc123aak supuso la inserción de los exones I y II de la miostatina en pPonc3k, tras lo cual se verificó mediante PCR el correcto ensamblado de los distintos fragmentos. En las PCRs correspondientes a las zonas examinadas representadas en la figura 42, se observó en todos los casos el tamaño esperado de fragmento, como demuestran las electroforesis en agarosa de la figura 43.

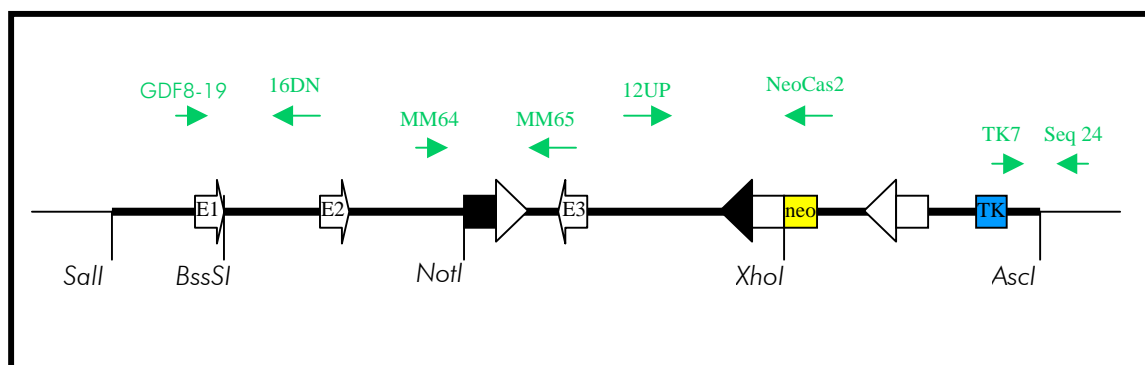


Figura 42: Esquema de las PCR utilizadas para la confirmación de pPonc123aak. Representación esquemática de la disposición de las parejas de cebadores utilizados en la verificación del correcto ensamblado de los fragmentos del plásmido pPonc123aak.

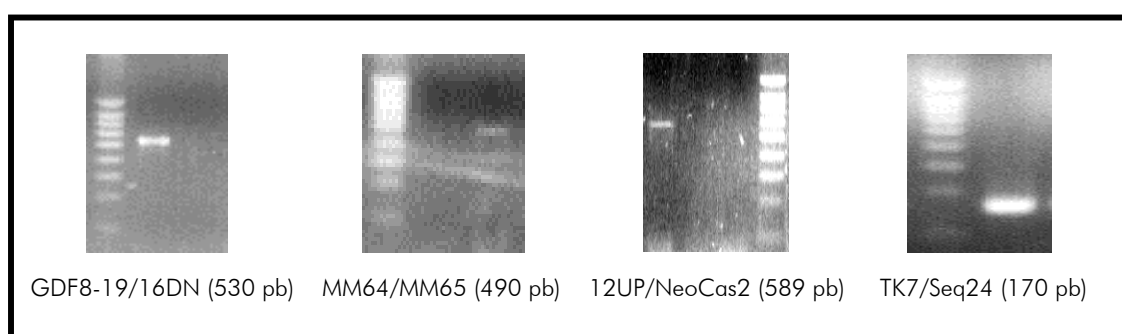


Figura 43: Confirmación del ensamblado de pPonc123aak por PCR. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en la verificación del correcto ensamblado de los fragmentos del plásmido pPonc123aak. Estas PCR están representadas en la figura 42. En todos los casos se utilizó el marcador molecular 100bp Smart-Ladder de Eurogentec (ver Apéndice de Marcadores).

Tras la verificación por PCR, se sometió a pPonc123aak a digestión con una serie de enzimas de restricción para confirmar la presencia de todos los fragmentos y la ausencia de duplicación. Los tamaños esperados de fragmento tras digestión aparecen en la tabla XVI. Dichos fragmentos concuerdan perfectamente con los aparecidos en la electroforesis de la figura 44.

Tabla XVI: Tamaños esperados de fragmento tras digestión de pPonc123aak (en pb).

<i>NotI/XhoI</i> : 9908, 8204, 2904
<i>EcoRI</i> : 7017, 4280, 3484, 3204, 1242, 1119, 654
<i>BglII</i> : 10494, 5973, 2159, 1041, 518, 517, 334
<i>BamHI</i> : 11897, 5017, 4122
<i>HindIII</i> : 9802, 4585, 3824, 2825

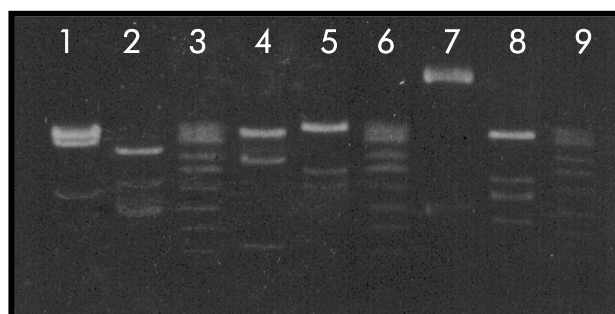


Figura 44: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de pPonc123 aak. Las columnas corresponden a las siguientes digestiones: 1) *NotI/XhoI*, 2) *EcoRI*, 3) 1 kb Smart-Ladder (Eurogentec) (ver Apéndice de Marcadores), 4) *BglIII*, 5) *BamHI*, 6) 1 kb Smart-Ladder, 7) No digerido, 8) *HindIII*, 9) 1 kb Smart-Ladder.

A.1.3. Verificación del ensamblado de pPonc123aak por secuenciación

Se secuenciaron distintas zonas de ensamblado entre los distintos fragmentos, correspondientes a las representadas en la figura 24, y que respondieron perfectamente a la secuencia esperada. En los cromatogramas de la figura 45 se muestran las secuencias de los *lox* mutados.

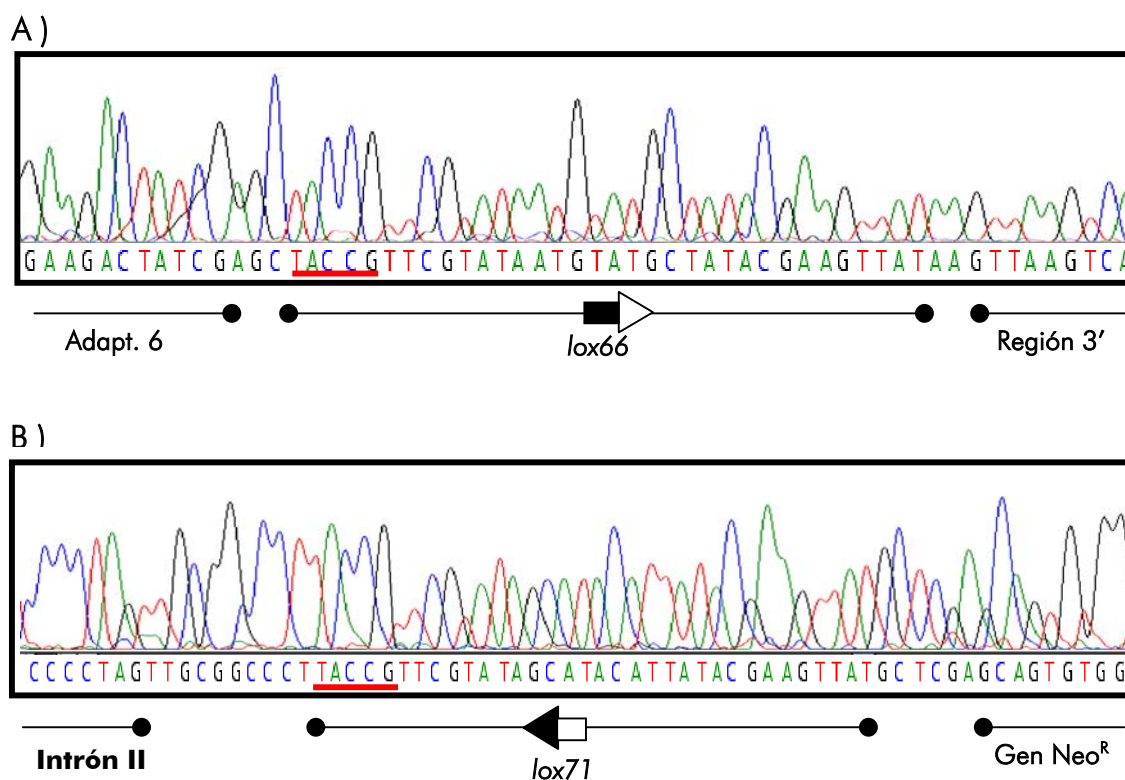


Figura 45: Electroferogramas de las secuencias de los *lox* mutados de pPonc123aak. A) *lox66* B) *lox71*. Los cebadores utilizados son MM64 (A) y 12UP (B).

A.2. Ensayos preliminares

A.2.1. Ensayo con Cre-recombinasa purificada

Una vez obtenida la construcción definitiva, pPonc123aak, ésta fue sometida, junto a un control de *loxP* (pPonc123bbj) a la acción de la enzima Cre-recombinasa purificada para observar la capacidad de recombinación de los *lox* mutantes en comparación con los *loxP* del plásmido control.

De las 48 colonias aisladas de la construcción pPonc123aak tratada con Cre-recombinasa y transformada en DH5 α , sólo se obtuvo suficiente ADN plasmídico para análisis por digestión en 45 casos. De entre ellos, 4 colonias resultaron haber realizado una inversión total (esto es, entre el *lox66* y el *loxP*), en 3 casos se produjo una delección Neo (entre *lox71* y *loxP*), en 2 colonias hubo una inversión total junto a una inversión del tercer exón (los tres *lox* actúan en la recombinación) y en 1 caso se dio una inversión del tercer exón (entre *lox66* y *lox71*). Esto supone un 22% de sucesos en los que se da algún tipo de recombinación (y actúa al menos uno de los *lox* mutados), de entre los cuales en un 2'2% de casos ocurre la inversión esperada.

En el caso de la construcción control pPonc123bbj se produjo, en un alto porcentaje de las 96 colonias aisladas (85%), una recombinación interna inesperada (no mediada por Cre) entre las dos secuencias TK de los extremos, lo que redujo considerablemente el número de colonias susceptibles de ser evaluadas. Por otro lado, las digestiones elegidas (*EcoRI*, *BamHI*, *XmnI* y *PstI*) no permitieron diferenciar con precisión los distintos tipos de recombinación posibles, aunque sí entre sucesos recombinantes y no recombinantes. En este caso se observó un 35% de colonias en las que se había producido algún tipo de recombinación (en este caso será siempre entre *loxP*).

El problema de las recombinaciones espontáneas en pPonc123bbj (por la existencia de un doble cassette TK), y el hecho de que en realidad ni pPonc123aak ni pPonc123bbj tuvieran la estructura planteada para su permanencia en la célula (al contener el gen de selección Neo flojado, que se deberá eliminar tras su integración en el cromosoma), hizo replantear el ensayo utilizando ambos plásmidos sin el gen Neo y en el caso de pPonc123bbj, sin uno de sus dos cassettes TK. De aquí surgieron pPonc123-Neo^S y pPonc2b3j- Neo^S (ver figura 27).

Los ensayos de recombinación utilizando Cre purificada sobre estas últimas construcciones (pPonc123-Neo^S y pPonc2b3j- Neo^S), al contrario que en la experiencia anterior, sólo ofrecieron eventos de recombinación cuando se aumentó la cantidad de enzima con respecto a la descrita en el protocolo del fabricante. De este modo, no se observó ninguna colonia recombinante para ninguna de las dos construcciones en las reacciones Cre-A y Cre-E (a pesar de que cuando se analizó por PCR el producto de recombinación total sí se detectó la existencia de recombinación) (ver A.4.1. en Materiales y Métodos); en cambio, se obtuvieron 2/96 (2'1%) recombinantes de pPonc123-Neo^S y 2/93 (2'2%) de pPonc2b3j- Neo^S en la reacción Cre-C, y 1/87 (1'1%) recombinantes de pPonc123-Neo^S y 0/93 (0%) de pPonc2b3j- Neo^S en la reacción Cre-F. Estos porcentajes se recogen en la tabla XVII. En la figura 46 se muestran ejemplos de los dos tipos de

patrón de restricción con *EcoRI* observados en ambas construcciones. A la derecha se muestran los tamaños esperados de fragmento para cada caso, con las bandas diagnósticas subrayadas.

Tabla XVII: Porcentaje de clones recombinantes resultantes del tratamiento con Cre purificada

	Cre-A	Cre-C	Cre-E	Cre-F
pPonc123-Neo ^S	0%	2'1%	0%	1'1%
pPonc2b3j-Neo ^S	0%	2'2%	0%	0%

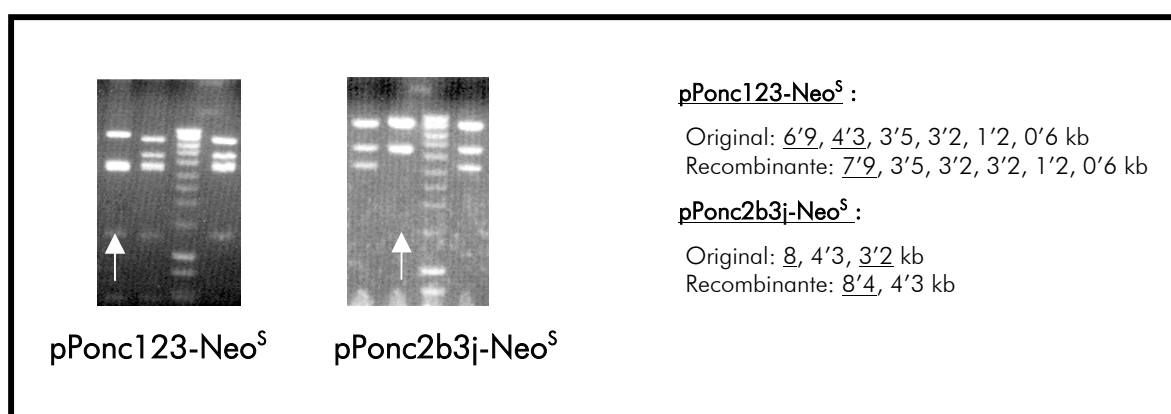


Figura 46: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos tratados con Cre. A la derecha se especifican los tamaños esperados. Las flechas indican los patrones de restricción de los plásmidos invertidos (pPonc123-Neo^S) o deletados (pPonc2b3j-Neo^S), frente a los patrones de plásmidos no recombinados.

Marcador (tercera calle): Smart-Ladder 1 kb (Eurogentec) (ver Apéndice de Marcadores).

Este ensayo muestra una susceptibilidad de recombinación entre *lox* mutantes semejante a la de los *loxP*, que es lo que se pretende demostrar para justificar el uso de estos *lox*. Pero al aportar porcentajes tan bajos de recombinación se optó por un segundo experimento más independiente de la accesibilidad de la recombinasa Cre en el medio.

A.2.2. Ensayo en bacterias MM294-Cre

Las dos construcciones evaluadas en el estudio anterior (pPonc123-Neo^S y pPonc2b3j-Neo^S) y la construcción resultante de invertir el tercer exón en pPonc123-Neo^S (pPonc-inv) se transformaron en la cepa de *E. coli*, MM294-Cre, para evaluar su capacidad de recombinación y de bloqueo. La figura 47 muestra los patrones de digestión de algunas colonias de MM294-Cre transformadas con cada una de las tres construcciones, comparados con los patrones control (el patrón de digestión completo se describe en la figura 46).

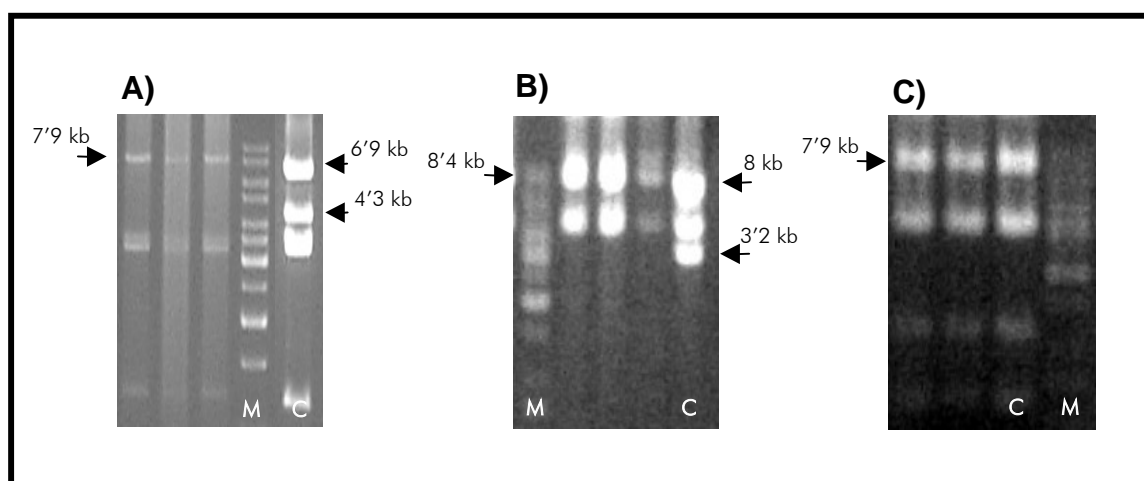


Figura 47 : Patrón diferencial de bandas en agarosa de las tres construcciones transformadas en MM294-Cre : A) pPonc123-Neo^S, B) pPonc2b3j-Neo^S, C) pPonc-inv. Las flechas señalan las bandas diagnósticas. M : marcador de 1 kb (Biotools) (ver Apéndice de Marcadores) ; C: control (la misma construcción transformada en una cepa AG-1 –sin Cre-).

El número de colonias resultantes de la transformación en MM294-Cre se especifica en la tabla XVIII para cada una de las construcciones utilizadas.

Tabla XVIII: Colonias resultantes de la transformación en MM294-Cre			
	pPonc123-Neo ^S	pPonc2b3j-Neo ^S	pPonc-inv
Recombinantes	30	24	1
No recombinantes	0	0	38
Totales	30	24	39
%	100% inversión	100% delección	97'4% bloqueo

Como se observa, el 100% de las colonias pPonc123-Neo^S resultaron invertidas en el tercer exón, e igualmente, con los plásmidos de pPonc2b3j-Neo^S se obtuvo un 100% de recombinaciones (en este caso delecciones). Finalmente, 38 de las 39 colonias examinadas de la construcción pPonc-inv (97'4%) permanecieron bloqueadas.

Y paralelamente, ninguna de las tres construcciones transformadas en AG-1 (sin Cre-recombinasa) dio lugar a una recombinación entre sus *lox*, lo que prueba que la recombinación entre sitios *lox* está condicionada a la existencia de la recombinasa en el medio.

Este resultado confirma la capacidad de la construcción pPonc123aak de invertir el tercer exón en presencia de Cre, permaneciendo tras ello bloqueado en esa posición aun en caso de continuar la recombinasa en el medio.

A.3. Creación de una línea estable de células ES murinas “Mstn OFF to ON”

A.3.1. Establecimiento de una línea ES con la construcción pPonc123aak

Una vez electroporadas las células ES-R1 y tras selección con G418 y ganciclovir, se procedió a la identificación de los recombinantes homólogos mediante PCR-LongRange (NeoCas3/MM79). La PCR realizada en 288 de las 326 colonias ES repicadas dio un resultado de 9 colonias positivas en las que se observaba claramente la banda de 4265 pb esperada, a la misma altura que el control positivo realizado utilizando el plásmido C36 (ver A.5.1.2.5. de Materiales y Métodos). La figura 48 muestra las bandas de las 9 colonias encontradas.

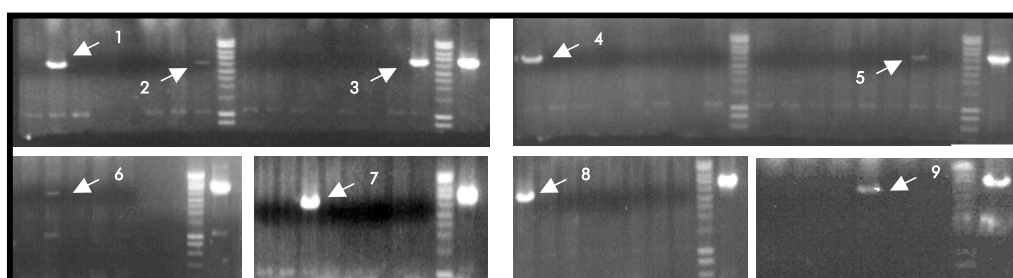


Figura 48: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR identificativos de los recombinantes homólogos obtenidos. Las flechas indican los nueve clones positivos para la PCR diagnóstica de la recombinación homóloga (NeoCas3/MM79, 4265 pb). A la derecha aparece en todos los casos el control positivo (C36). El marcador utilizado es el Smart-Ladder-1kb de Eurogentec (ver Apéndice de Marcadores).

Además, se confirmó la integridad de los *lox* mutados (*lox66* y *lox71*) de estos 9 clones mediante PCR y secuenciación. La figura 49 muestra las PCRs realizadas utilizando como cebadores los propios adaptadores (ver figura 30). Las secuencias de ambos *lox* coincidieron enteramente con las esperadas tanto en su contenido como en su orientación (no se muestran los datos).

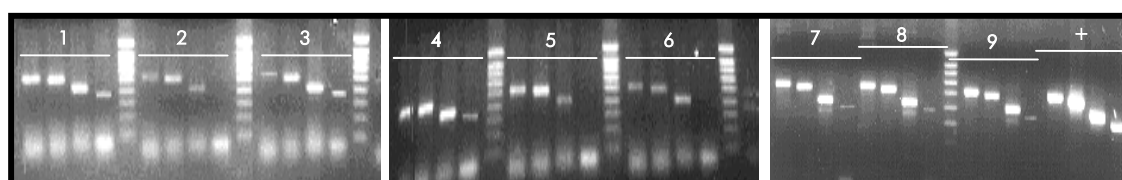


Figura 49: Electroforesis de las PCRs realizadas sobre los 9 posibles recombinantes homólogos, utilizando los propios adaptadores como cebadores. De izquierda a derecha estas PCRs son: 12UP/C₁ (527pb), C₂/MM67 (505pb), MM63/6₁ (414pb) y 6₂/MM65 (365 pb). “+” simboliza el control positivo (pPonc123aak). El marcador utilizado es el Smart-Ladder 100bp (Eurogentec) (ver Apéndice de Marcadores).

Una vez identificados estos 9 recombinantes homólogos se procedió a su confirmación mediante la realización de un Southern blot con dichas colonias. Este segundo examen es necesario puesto que los recombinantes homólogos identificados por PCR sólo se consideran putativos hasta su confirmación por Southern. El Southern blot debe demostrar que el suceso de recombinación se ha producido en el brazo corto y el brazo largo de homología, y que no se han producido duplicaciones durante la recombinación. Este Southern dejó ver que uno de los clones (nº 6) no presentaba la banda de la construcción transgénica (de 4440 pb), por lo que se consideró un falso positivo, y otro de los clones (nº 9) mostró varias bandas menores a la transgénica, haciendo pensar que se tratarían de diversas inserciones de la construcción en el cromosoma. La figura 50 muestra la imagen del Southern blot realizado.

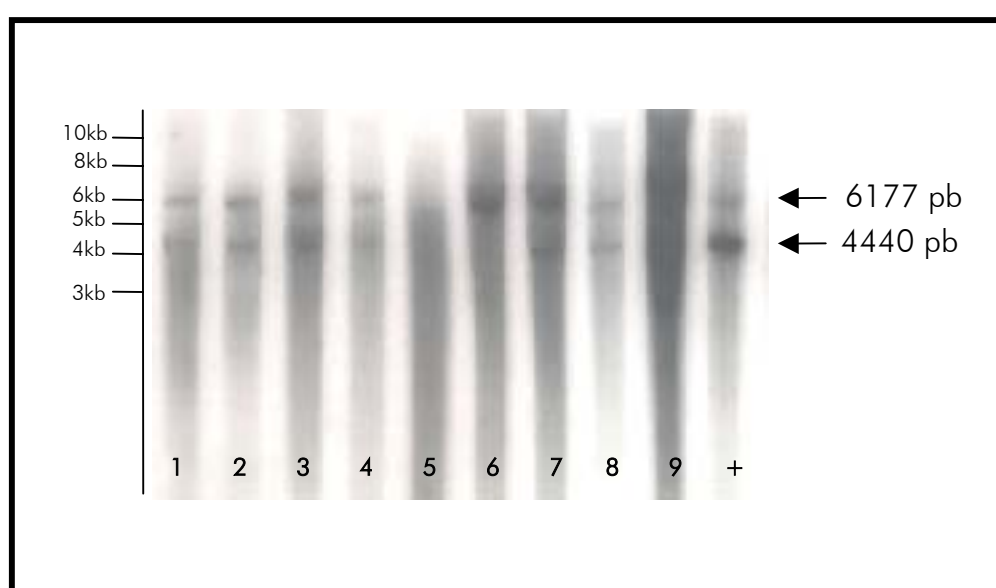


Figura 50: Southern blot realizado con las 9 colonias positivas resultantes de la PCR-Long Range. A la izquierda se representan los pesos moleculares y a la derecha el tamaño de las bandas correspondientes al alelo salvaje (6177 pb) y al alelo transgénico (4440 pb).

De este modo se consideraron como 6 los clones positivos obtenidos (para el clon 5 no se pudo obtener una mejor imagen), lo que supone un 2'1% de recombinantes homólogos entre los clones resultantes de la doble selección G418/ganciclovir.

A.3.2. Eliminación del cassette de selección Neo^R por recombinación mediante Cre

Para la eliminación del cassette Neo se recurrió a la transfección transitoria con el plásmido pMC-Cre. Para ello se escogieron al azar de entre los seis clones recombinantes homólogos positivos los clones 3 y 8 para su electroporación. Tras la electroporación con

este plásmido se repicaron 480 y 432 colonias de los clones 3 y 8 respectivamente, y tras el posterior cultivo en presencia de G418, se observaron unas proporciones de colonias Neo-sensibles del 7'6% (33/432) para el clon 3 y del 38'5% (157/407) para el clon 8.

Dada la neo-sensibilidad observada en esas colonias, las dos únicas posibles explicaciones serían la simple delección del cassette Neo o la delección del cassette junto a la inversión del exón III (ver figura 32). Las PCRs de testado de la escisión del cassette Neo (12UP/17UP1) o inversión del tercer exón (12DN/17UP1) (ver figura 32) se realizaron sobre las 33 únicas colonias Neo-sensibles del clon 3 y sobre 124 colonias del clon 8. Estas PCRs sólo arrojaron una colonia positiva (3c6E) para la escisión del Neo-cassette (banda de 780 pb, ver figura 51) y ninguna para la inversión del tercer exón (aparece sólo la banda de 250 pb -cromosoma no transgénico- y no la de 290 pb, que hubiera correspondido a la inversión en el cromosoma transgénico).

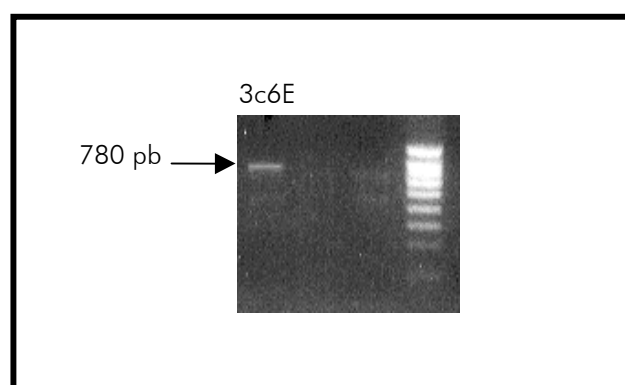


Figura 51: PCR diagnóstica de la delección del cassette Neo^R. Amplificación en gel de agarosa de la única colonia positiva para la delección del cassette de neo-resistencia. Marcador: Smart-Ladder 100bp (Eurogentec)(ver Apéndice de Marcadores).

En cuanto a la PCR flanqueante del *lox66* (MM64/12DN, banda de 240 pb), tanto las colonias Neo^S del clon 3 como las del clon 8 resultaron positivas, indicando la integridad de la orientación original de la construcción transgénica y la no reversión al genotipo salvaje. Por otro lado, la misma PCR para el exón III en posición directa (MM64/12UP) sólo dio como resultado una banda de 600 pb (la correspondiente al cromosoma no transgénico) y no la banda de 690 pb que correspondería a la inversión del tercer exón en el cromosoma transgénico. Otra PCR probada para descartar la posibilidad de que el cassette Neo siguiera presente a pesar de la Neo-sensibilidad observada *de visu*, fue 12UP/MM67 (presente este último cebador en el cassette Neo), pero esta PCR fue negativa para casi la totalidad de los clones Neo-sensibles, corroborando lo observado en el test de sensibilidad a G418.

El resultado de estas PCRs tomado en conjunto no resulta esclarecedor ya que no responde a ninguna de las hipotéticas posibilidades de recombinación (con excepción de 3c6E, que sería el caso de una delección de Neo sin inversión). De este modo, 12UP/17UP1 no registra más que un caso de delección del cassette Neo; y 12DN/17UP1 y MM64/12UP descartan la posibilidad de inversión del tercer exón, al tiempo que

descartan la posibilidad de una recombinación intercromatídica en fase G2 (Lewandoski & Martin, 1997), ya que si se diera este suceso por alguna de las tres vías esquematizadas en la figura 52 aparecerían PCRs positivas para alguna de estas dos combinaciones de cebadores.

Las recombinaciones intercromatídicas representadas en la figura 52 dan lugar en todos los casos a un cromosoma dicéntrico y otro acéntrico; el cromosoma acéntrico se pierde en la primera división celular, el cromosoma dicéntrico, aunque también se perderá en los siguientes ciclos de división, puede continuar varias divisiones más, de modo que durante las primeras divisiones celulares sólo debería detectarse el cromosoma portador de los centrómeros (Mills & Bradley, 2001).

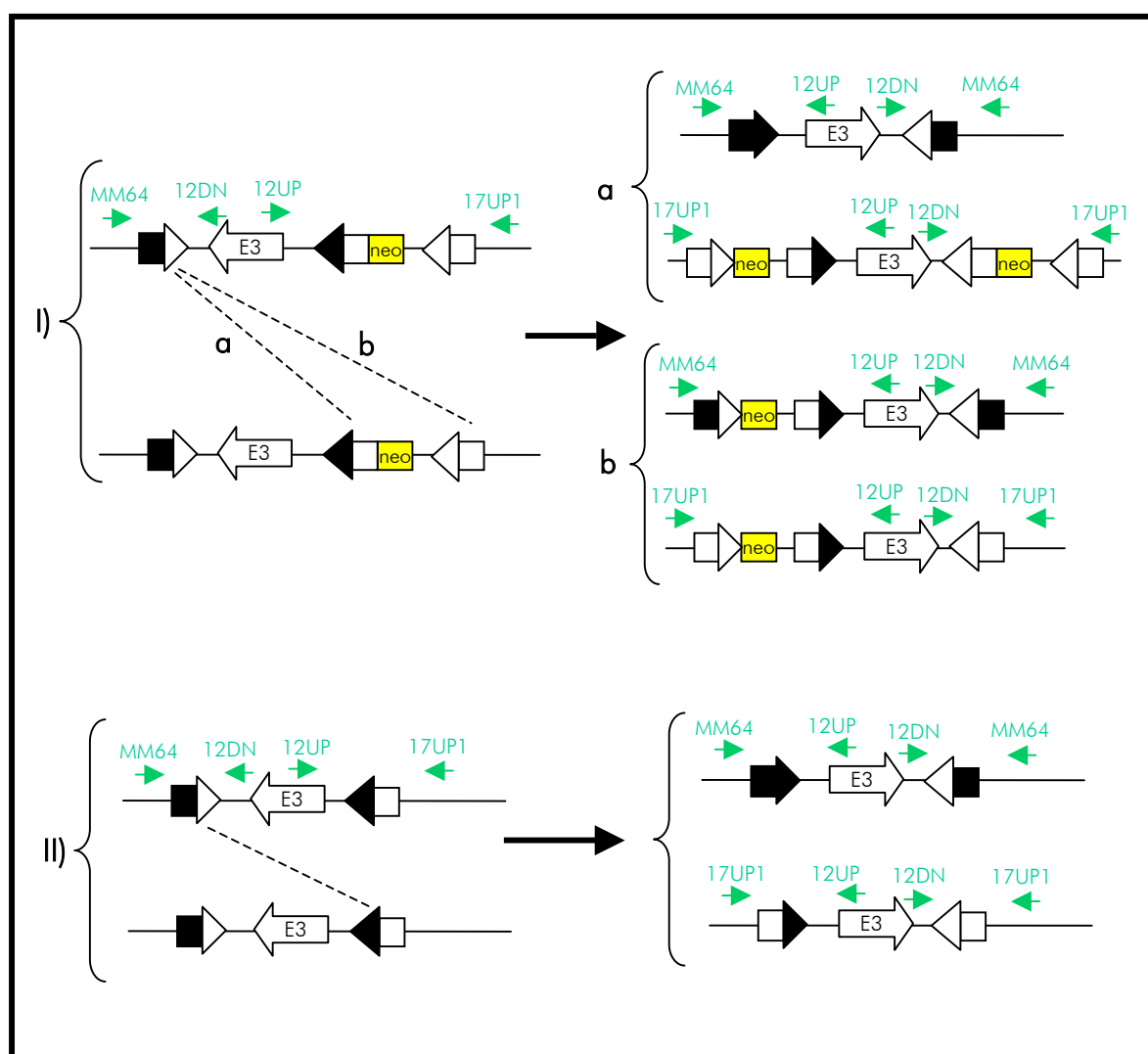


Figura 52: Esquema de las distintas posibilidades de recombinación intercromatídica: I) con el cassette Neo aún presente, II) tras delección de Neo. No se esquematiza la posición relativa del centrómero por desconocimiento de este dato.

A.4. Agregación del clon 3c6E a mórulas FVB

El resultado de las dos agregaciones llevadas a cabo sólo dio lugar al nacimiento de una cría viva (probablemente quimérica debido al color oscuro visible a través de las membranas palpebrales), que sólo sobrevivió cuatro días, de modo que no hubo posibilidad de cruzarla con objeto de obtener individuos homocigotos en los que pudiera estudiarse la inversión del tercer exón *in vivo*.

A.5. Ensayo de la eficacia de inversión en células ES

Con el único clon resultante de la eliminación del marcador de selección Neo, 3c6E, se ensayó la eficacia de inversión del tercer exón flojado, utilizando para ello el mismo plásmido pMC-Cre utilizado en la delección del gen Neo. Una vez electroporado 3c6E con este plásmido, se procedió al análisis del ADN tanto en células repicadas individualmente como en células extraídas en masa.

El resultado de las PCRs indicadoras de una inversión del tercer exón dio lugar a una sola banda (la correspondiente al cromosoma no manipulado), tanto en la extracción de ADN en masa (banda única de 250 pb, testada con 12DN/17UP1), como en las PCRs de los 96 clones repicados para cada una de las electroporaciones realizadas con 5, 15 y 30 µg de pMC-Cre (banda única de 600 pb, testada con MM64/12UP), indicando la ausencia de inversión del tercer exón.

Este resultado obligó a verificar, mediante PCR y secuenciación, la integridad del transgén en el clon 3c6E tras la delección del cassette Neo. La figura 53 muestra el resultado positivo de las distintas PCRs evaluadas (utilizando las parejas de cebadores 12UP/MM79 y GDF8-15/17UP3).

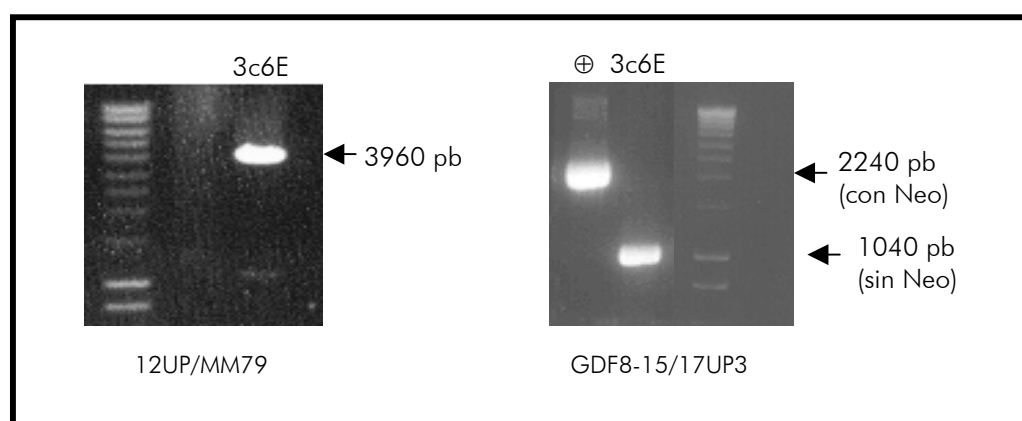


Figura 53: Confirmación de la disposición del exón III. Electroforesis en gel de agarosa en la que se muestran las PCRs realizadas sobre el clon 3c6E que confirman la correcta disposición del exón III en relación al resto del gen. « ⊕ » representa el control con el gen Neo aún inserto (pPonc123aak). El marcador utilizado es el Smart-Ladder 1 kb (Eurogentec) (ver Apéndice de Marcadores).

En los electroferogramas de la figura 54 se puede apreciar por un lado la integridad de la secuencia del *lox66* y por otro, la correcta delección del cassette Neo y la perfecta integridad del *lox71* remanente. La secuencia y disposición de los cebadores utilizados tanto en la PCR como en la secuenciación se describe en el apartado A.7.2. de Materiales y Métodos.

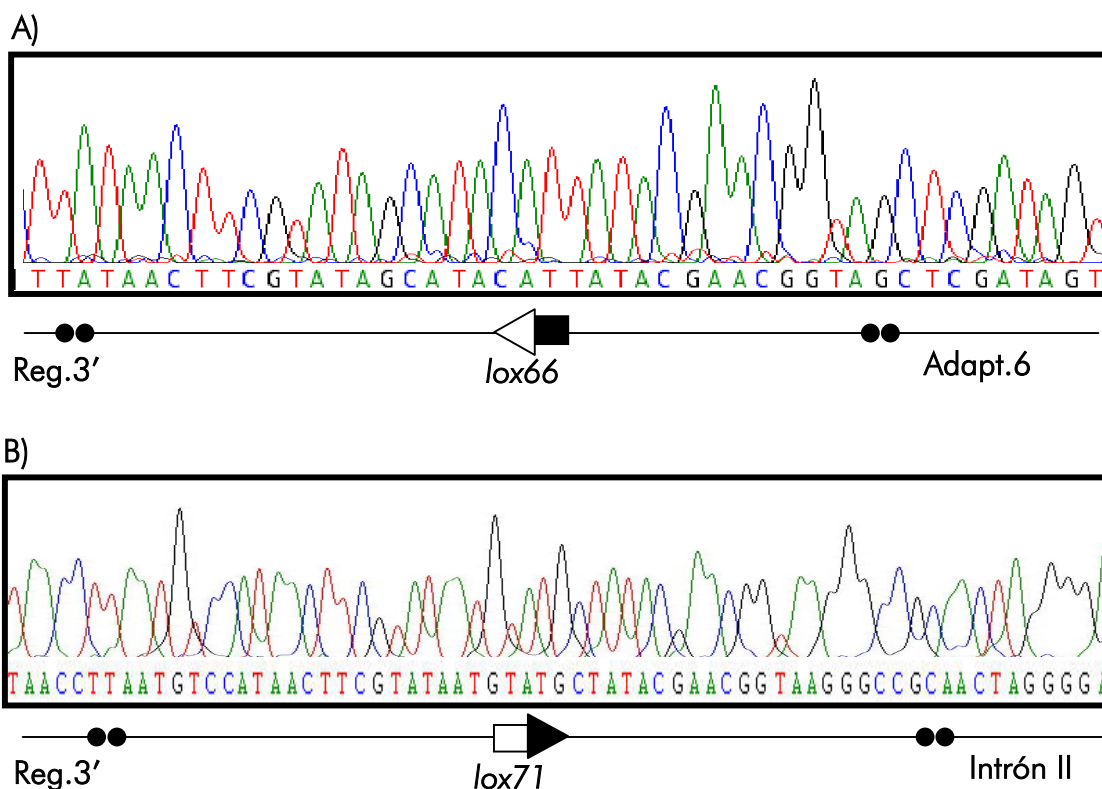


Figura 54: Secuencias de los *lox66* (A) y *lox71* (B) de 3c6E. En A) se observa la integridad del *lox66* y en B) se muestra la correcta recombinación producida entre el *lox71* y el *loxP* durante la delección del cassette Neo. Los cebadores utilizados en la secuenciación son MM65 (A) y 12UP (B).

A.6. Test de eficiencia de la acción del vector de expresión pMC-Cre

Con este ensayo se pretende evaluar la eficacia de transfección y recombinación del vector pMC-Cre en el clon 3c6E para descartar la posibilidad de que el plásmido presente algún problema para entrar en la célula o que haya perdido su funcionalidad. Para comprobarlo se utilizó una línea control portadora de dos *loxP*, el sustrato natural de la Cre-recombinasa.

A.6.1. Creación de dos líneas estables pSVlacZT

Para la creación de dos líneas estables pSVlacZT de los clones 3c6E y KOC, una vez electroporadas ambas líneas con el vector pSVlacZT y seleccionadas con G418, se procedió a la verificación de la integridad en el genoma celular del segmento de interés (entre el promotor SV40 y el extremo final del gen de la β -galactosidasa) y a la cuantificación del número de copias integradas en el genoma.

Las PCRs realizadas para confirmar la integridad del gen β -galactosidasa (NeoCas1/BglIII-lacZ-3') y del promotor SV40 (CH110-5'/MM67) arrojaron un total de 18 clones positivos para ambas PCR en la línea 3c6E, y de 13 en la línea KOC.

La razón de la cuantificación realizada del número de copias de pSVlacZT se debe a la preferencia por un clon que haya integrado una sola copia para poder comparar en una relación 1:1 con el gen de interés (gen de la miostatina "floxado"), ya que un exceso de copias de pSVlacZT podría atraer a la totalidad de la Cre-recombinasa hacia esas parejas de *lox* dejando sin recombinasa a la pareja de *lox* mutantes de la miostatina.

Para la PCR de cuantificación del número de copias de pSVlacZT (lacZ-5'/BglIIIlacZ-3'), se escogieron 12 clones de cada línea de entre los positivos en la PCR anterior. Este ensayo mostró, por comparación con las PCRs del control interno (22bDN/1st-sou-new), que todos los clones contenían una sola copia del gen de β -galactosidasa. En la figura 55 se muestran estas PCRs para 25, 30 y 35 ciclos.

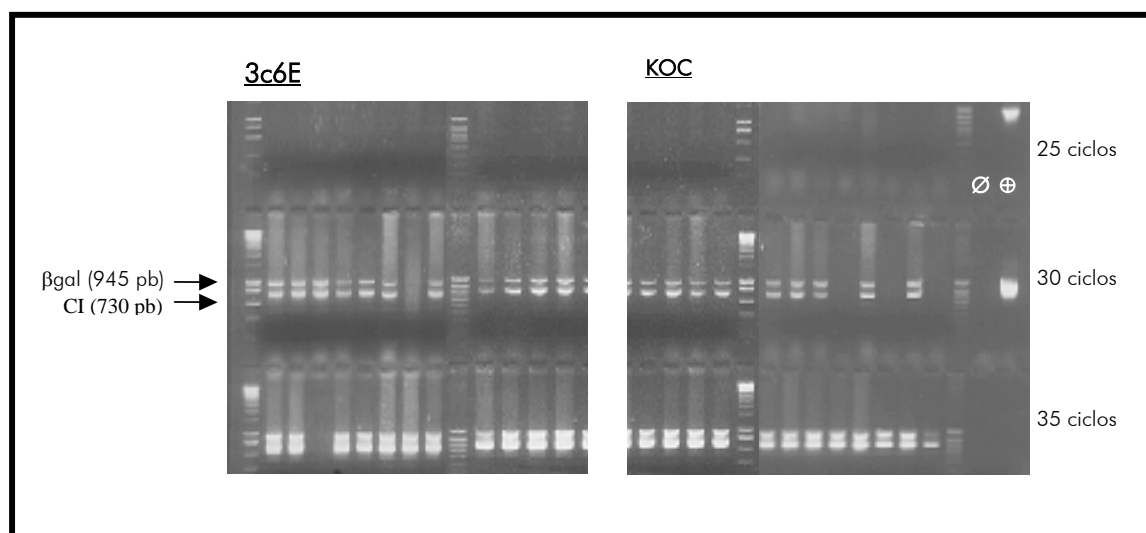


Figura 55: PCRs de cuantificación del número de copias integradas de pSVlacZT. Los marcadores utilizados en la electroforesis en gel de agarosa son Smart-Ladder (Eurogentec), de 1 kb (izquierda), y de 100 pb (derecha) (ver Apéndice de Marcadores). ⊕ simboliza el control positivo con pSVlacZT; "∅" simboliza el control negativo (H₂O). "βgal": alelo pSVlacZT (lacZ-5'/BglIII-lacZ-3'). "CI": control interno, exón I de la miostatina (22bDN/1st-sou-new).

Para la realización del Southern blot se escogieron los mismos 12 clones de cada línea del estudio anterior. De estos clones, 10 de la línea 3c6E y todos los de la línea KOC presentaron una banda de 2'5 kb correspondiente a los dos alelos (normal y transgénico) de la miostatina, y una banda superior, alrededor de las 5 kb, correspondiente a pSVlacZT (ver figura 56). Este Southern corroboró el resultado anterior en cuanto a la homogeneidad del número de copias de pSVlacZT. Con esto, se eligieron al azar para posterior electroporación con pMC-Cre sólo 3 clones de cada línea: 2.4, 4.3 y 6.1 de la línea 3c6E, y 1.7k, 2.3k y 6.6k de la línea KOC.

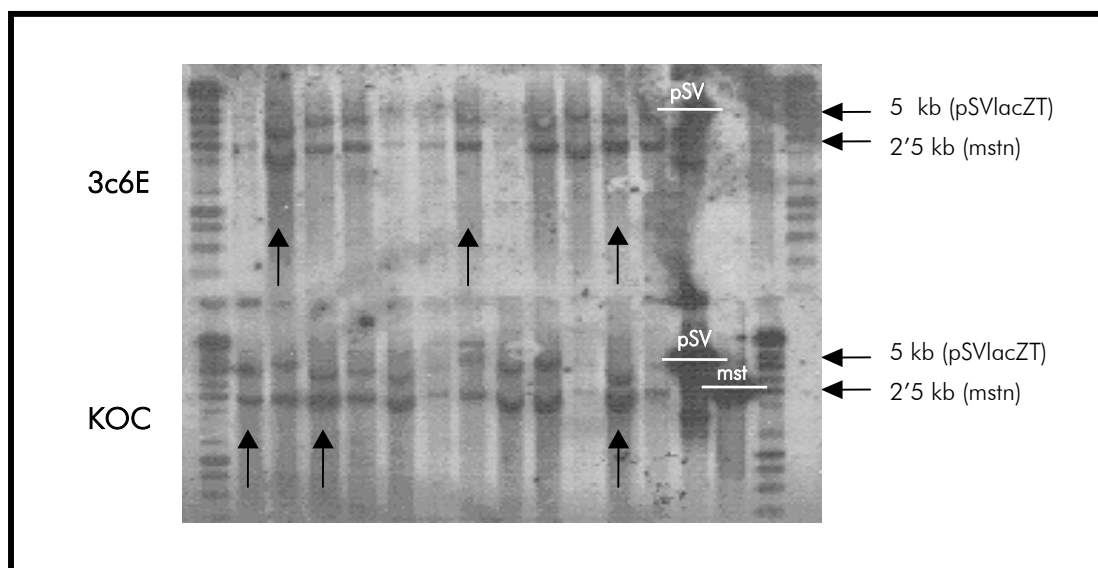


Figura 56: Southern blot de los clones en los que se ha integrado la construcción pSVlacZT. Las flechas señalan los clones seleccionados finalmente para electroporación con pMC-Cre. "pSV" es el control para el gen de la β -galactosidasa (pSVlacZT) y "mst", el control para el gen de la miostatina (pPonc123aak).

A.6.2. Transfección transitoria de los clones pSVlacZT con pMC-Cre

Tras electroporación con pMC-Cre de los tres clones seleccionados de cada una de las dos líneas, se procedió por un lado a la extracción de ADN para análisis por PCR, y por otro a tinción con X-Gal para observar la correcta recuperación del marco de lectura del gen de β -galactosidasa tras delección del cassette Neo.

La tinción con X-Gal apenas ofreció alguna colonia débilmente coloreada y poco homogénea entre los 96 clones de las seis líneas establecidas, por lo que se recurrió exclusivamente a la PCR para establecer la actividad de la recombinasa.

La primera PCR se realizó con el ADN total de una de las placas electroporadas de cada una de las seis líneas. Esta PCR dio como resultado para el análisis de la delección del cassette Neo del transgén de pSVlacZT (CH110-5'/lacZ-D) un fragmento de 400 pb en todos los casos, correspondiente al tamaño esperado para la escisión del cassette Neo. La misma PCR realizada con el plásmido pSVlacZT, sobre el que no ha actuado la Cre-

recombinasa, mostró una banda de 2 kb, correspondiente a la presencia del cassette Neo en dicho vector (ver figura 57).

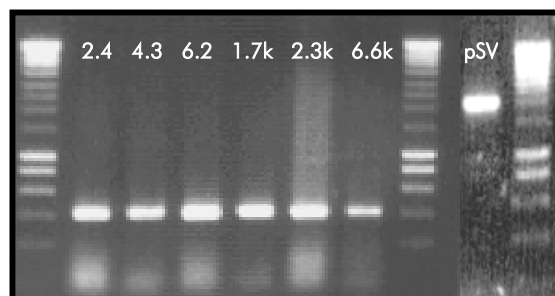


Figura 57: PCR diagnóstica de la recombinación Cre/lox en las líneas pSVlacZT. Electroforesis de los productos de la PCR CH110-5'/lacZ-D para el ADN total de las seis líneas electroporadas con pMC-Cre. A la derecha, un control utilizando el vector pSVlacZT sobre el que no ha actuado la recombinasa Cre (2 kb). El marcador utilizado es el 1 kb Smart-Ladder (Eurogentec) (ver Apéndice de Marcadores).

El hecho de que en ninguna de las seis líneas aparezca la banda de 2 kb en la PCR anterior (figura 57) no quiere necesariamente indicar que se ha producido la delección del cassette Neo de la construcción pSVlacZT en todas las células. La gran diferencia de tamaño entre las dos bandas (400 y 2000 pb) hace que la polimerasa se decante por la banda de menor tamaño, de ahí que sólo aparezca la banda de 400 pb. Este resultado indica, por tanto, que la transfección con el vector pMC-Cre no supone ningún problema en ninguna de las líneas y que en todos los clones transfectados se produce la entrada de pMC-Cre a la célula permaneciendo, además, funcional.

Para evaluar la acción de la recombinasa sobre las regiones transgénicas floxadas para la miostatina de las líneas 3c6E y KOC, se realizaron respectivamente las PCRs MM64/12UP y MM64/17UP1 a partir del ADN total extraído de las placas de 9 cm (ver A.8.2. de Materiales y Métodos). Mientras que en la línea control (KOC), la PCR dejó ver una banda a 400 pb (ver figura 58B), producto de una delección del exón III (la banda correspondiente a la presencia del exón sería de 3'2 kb), en la línea 3c6E sólo se observó la banda de 600 pb, correspondiente al alelo salvaje, y no a la banda de 690 pb que hubiera correspondido a la inversión del exón III (ver figura 58A). Obsérvese que la PCR MM64/12UP sobre ADN de la línea KOC original utilizada como control "K" (sin transfectar con pMC-Cre) da lugar a una doble banda de 600 pb (alelo salvaje) y 690 pb (por la inserción de un *loxP* en 5' del exón III). Por otro lado, se observa que en el control negativo de la línea KOC ("N", esto es, la línea KOC no electroporada con pMC-Cre) no aparece ninguna banda, aunque la banda esperada sería de 3'2 kb, probablemente porque la polimerasa utilizada (Taq Gold, Perkin Elmer) no es capaz de amplificar un fragmento de estas dimensiones. Por la misma razón, en los tres clones de la línea KOC aparece solamente la banda de 400 pb correspondiente a la delección del tercer exón y no la de 3'2 kb correspondiente al fragmento no deleccionado, a pesar de que normalmente no en todas las células se habrá producido la escisión.

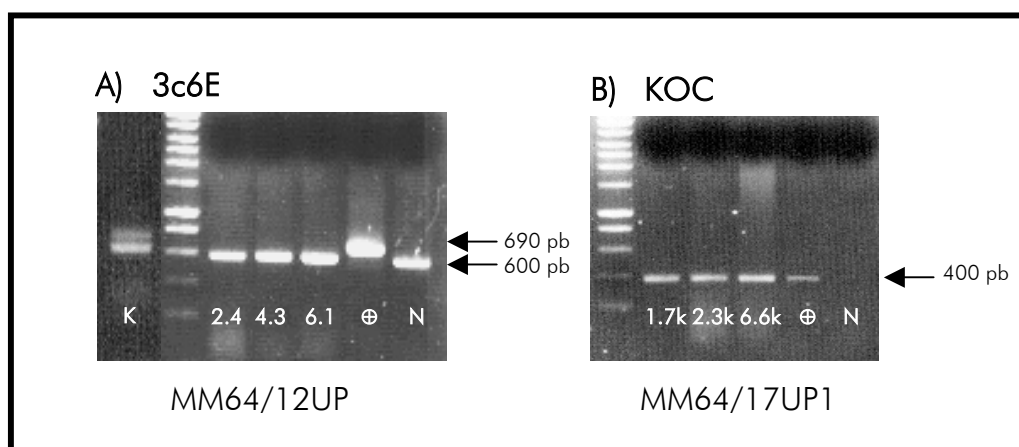


Figura 58: Electroforesis de los productos de PCR de evaluación de la acción de la recombinasa en los alelos de miostatina floxados. K: línea KOC original, sin transfectar con pMC-Cre. ⊕: control positivo (pPonc-inv, para 3c6E, y pPonc2b3j-Neo^S para KOC), N: control negativo (respectivamente 3c6E y KOC antes de electroporar con pMC-Cre). Marcador: 1 kb Smart-Ladder (Eurogentec).

Además de este resultado, que ya demuestra la ausencia de recombinación entre los *lox* mutados de la construcción pPonc123aak, se analizaron varios clones por separado con objeto de evaluar si la recombinación fuera un evento poco frecuente, y por tanto hubiera sido imperceptible en la PCR del ADN total. De este modo, se analizaron 188 clones de la línea 2.4 de 3c6E mediante PCR (MM64/12UP). En la figura 59 se muestran esas PCRs, donde se observa que en ningún caso aparece la doble banda (600 pb y 690 pb) esperada en el caso de una recombinación entre *lox* mutados para producir una inversión del tercer exón. En cambio, sí se detecta la banda de 400 pb en 125 de esos clones para la PCR CH110-5'/lacZ-D (no se muestran datos), lo que indica que el vector pMC-Cre se ha transfectado con éxito en esas colonias. Además, en la línea 6.6k de KOC se observaron 22 clones con la delección sobre los 96 examinados (no se muestran los datos), lo que indica igualmente que el vector pMC-Cre se ha transfectado en esos clones de la línea control.

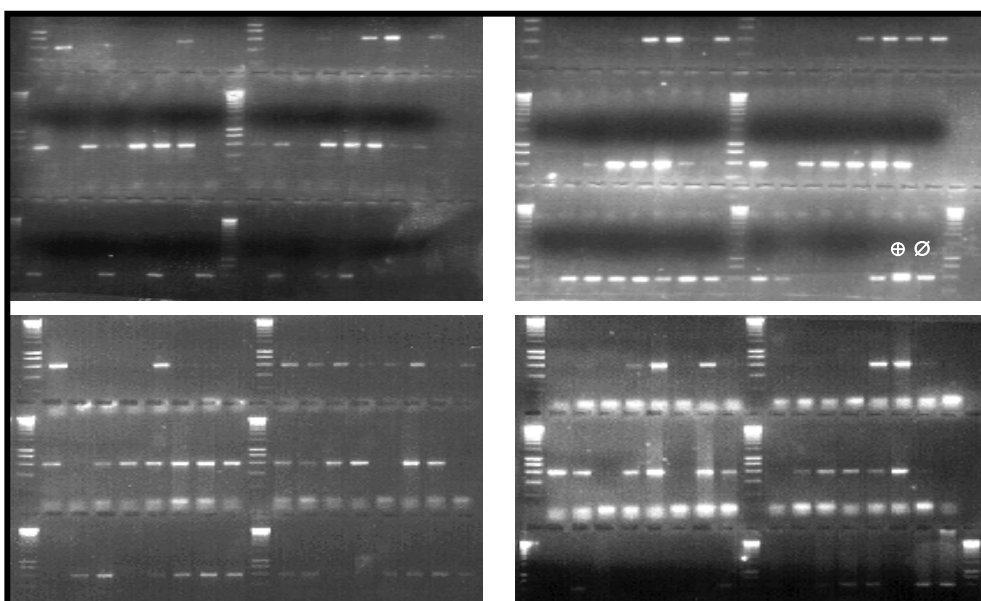


Figura 59: Electroforesis de la PCR MM64/12UP realizada sobre los 188 clones de la línea 2.4 (3c6E) repicados individualmente. ⊕: control positivo (ADN total de 6.6k, en el que se observa una doble banda:600+690pb), ∅: control negativo (2.4 antes de ser electroporado con Cre). Marcador: 1kb Smart-Ladder (Eurogentec) (ver Apéndice de Marcadores).

Este resultado implica que el vector portador del gen de la recombinasa, pMC-Cre, es perfectamente funcional, ya que permite la escisión del cassette Neo del transgén pSVlacZT y del exón III en la línea KOC. Pero no ha sido capaz de producir ninguna inversión del tercer exón en la línea 3c6E. Por lo tanto, de este ensayo se puede deducir que la recombinasa codificada por pMC-Cre ha resultado incapaz de actuar sobre los *lox* mutados que flanquean el tercer exón invertido de la línea 3c6E.

B. EVALUACIÓN DE DISTINTOS ALELOS DE LA MIOSTATINA POTENCIALMENTE DOMINANTES-NEGATIVOS. ENSAYOS DE INTERACCIÓN

B.1. Pull-down

B.1.1. Construcciones de pull-down

Para seleccionar el clon pRSET/mstn, de entre los clones positivos para la colony-PCR diagnóstica T7/mstn1.rev, se escogió uno para posterior secuenciación con T7 y T7.rev. La figura 60 muestra el electroferograma del clon seleccionado, en el que se aprecia el codon de inicio ATG en fase con la secuencia de histidinas y con la miostatina.

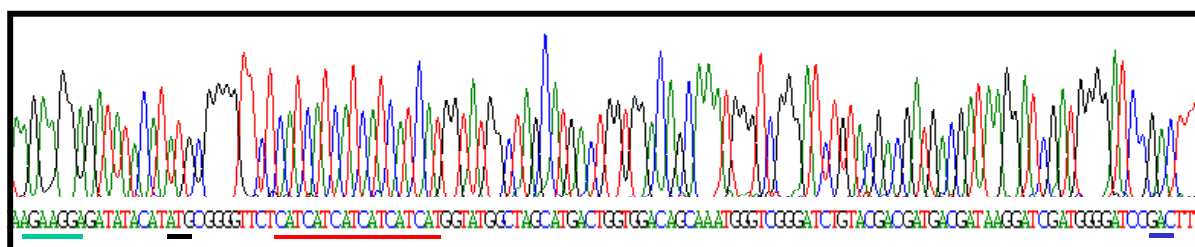


Figura 60: Electroferograma de pRSET/mstn. En él se aprecian el sitio de unión a ribosoma (línea verde), el codon de inicio (línea negra) en fase con la secuencia de histidinas (línea roja) y la secuencia de la miostatina (línea azul, primer codon de la miostatina). El cebador utilizado para la secuenciación es T7.

Los clones positivos para la colony-PCR de los clones pSG5PL/ProtSite pasaron por una segunda selección mediante digestión *ApaI*. El clon seleccionado como positivo se secuenció en toda la construcción para su verificación. La figura 61 muestra la zona correctamente mutagenizada de la diana de proteólisis.

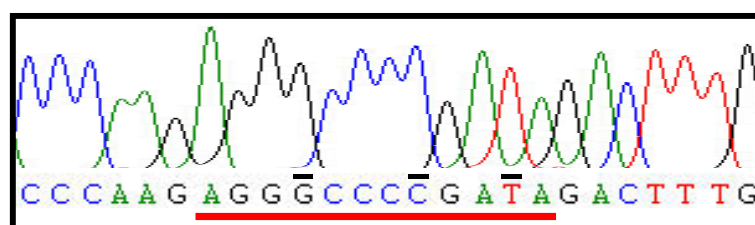


Figura 61: Electroferograma de pSG5PL/ProtSite. La línea roja señala los 4 aminoácidos de la diana de proteólisis y las líneas negras los 3 nucleótidos mutagenizados. El cebador utilizado en su secuenciación es Ex1.for.

De entre los clones pSG5PL/Stop positivos para la colony-PCR T7/mstn1.rev, se seleccionó uno tras digestión con *HindIII*. Este clon se secuenció completamente y la zona mutagenizada se muestra en la figura 62.

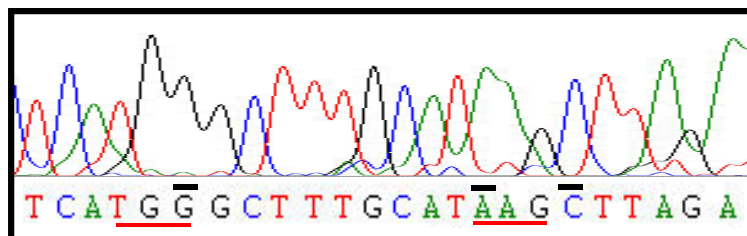


Figura 62: Electroferograma de pSG5PL/Stop. La línea roja señala los dos antiguos Stops y las líneas negras los tres nucleótidos mutagenizados. El cebador utilizado para la secuenciación es T7.

Los clones positivos pSG5PL/C340 se seleccionaron simplemente por colony-PCR (T7/pSG5PL.rev), tras lo cual se secuenció el clon escogido. La figura 63 muestra la zona insertada con la nueva cisteína intercatenaria.

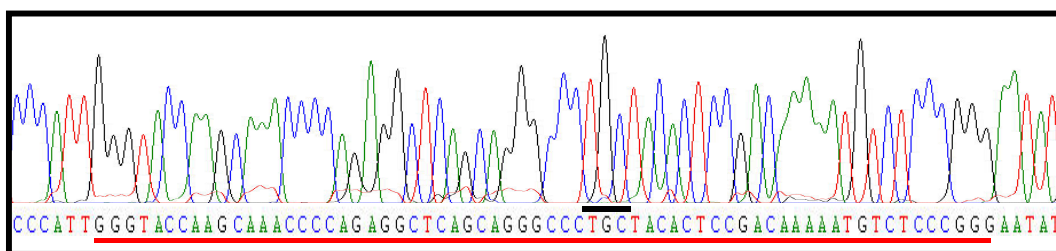


Figura 63: Electroferograma de pSG5PL/C340. Subrayada se muestra la región insertada con una nueva cisteína intercatenaria (línea negra). El cebador utilizado para la secuenciación es OL2Stop.for.

B.1.2. Obtención de la proteína de fusión His-miostatina

La inducción de la expresión en la cepa de *E. coli* transformada con pRSET/mstn arrojó un buen resultado en cantidad de expresión, visible con una simple tinción de azul de Coomassie (ver figura 64A). La banda de aproximadamente 16 kDa obtenida corresponde a la proteína de fusión resultante de la miostatina con la secuencia de histidinas y otro epítopo presente en el plásmido pRSET (total: 145 aminoácidos). Además, se realizó un Western blot correspondiente a este mismo gel (figura 64B), que corroboró la presencia de la proteína de fusión His-miostatina al ser captada inmunológicamente mediante anticuerpos anti-His. Obsérvese una banda más

tenueamente marcada alrededor de los 32 kDa, que correspondería al dímero de la miostatina de fusión. Los marcadores de peso molecular utilizados pueden consultarse en el apéndice de marcadores.

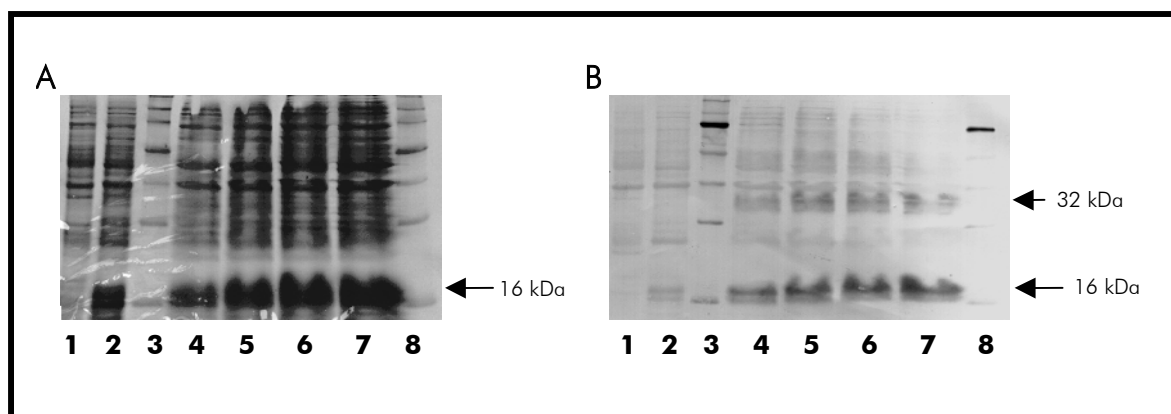


Figura 64: Expresión de la proteína de fusión His-mstn. A) Tinción con azul de Coomassie en un gel de poliacrilamida al 14%. B) Western blot del mismo gel. Calles: 1. BL21 no transformado (cultivo o/n). 2. Control inducido sin lisar. 3. y 8. Marcador de peso molecular de proteínas (Novagen). 4-7. Cantidades crecientes de lisado de BL21 inducido.

B.1.3. Inmovilización de la proteína de fusión His-miostatina a una resina de agarosa

La correcta inmovilización de la proteína de fusión miostatina-His a la resina de agarosa se verificó mediante Western blot. La calle 6 de la figura 65 muestra que la miostatina-His permanece correctamente unida a la resina Ni-NTA y no se pierde con los lavados (calles 2 y 3).

Además, se realizó un control negativo para confirmar la especificidad de la miostatina de fusión unida a la agarosa en una interacción. En este ensayo se realizó una interacción de la resina sin miostatina-His y la miostatina-ProtSite (en la que no existe una secuencia de histidinas) expresada en un lisado de reticulocitos, observándose que la miostatina no se pega inespecíficamente a la resina de agarosa (ver figura 65, calles 9 y 10), lo que confirma que la resina presenta una alta especificidad frente a las proteínas evaluadas y sólo interacciona con las proteínas en las que existe una secuencia de histidinas.

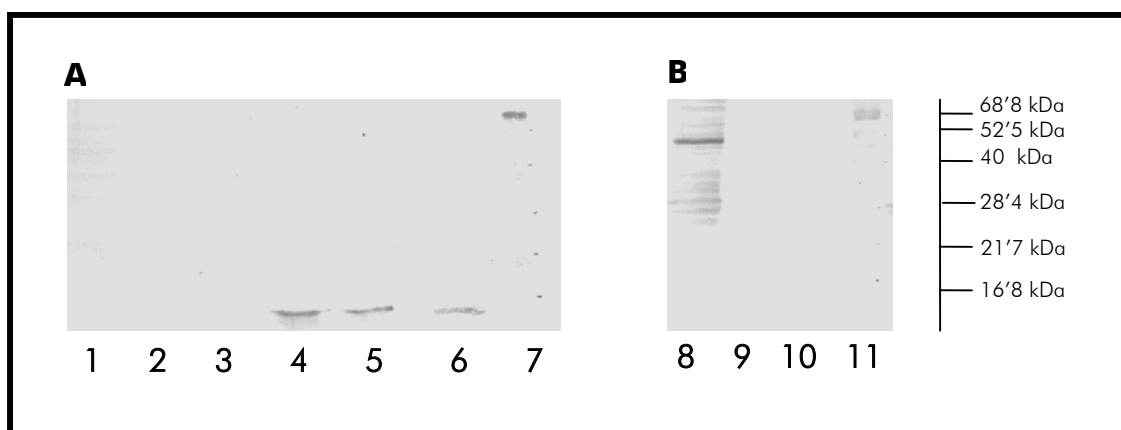


Figura 65: Inmovilización de la proteína de fusión miostatina-His a una resina de agarosa. A) Western blot del resultado de la unión de la resina de agarosa a la proteína de fusión obtenida del lisado de BL21 (realizado con anticuerpos anti-His): 1) sobrenadante de la inmovilización resina+miostatina-His, 2) y 3) Lavados de la inmovilización, 4) y 5) Eluidos de la inmovilización, 6) Producto de la inmovilización de la miostatina-His a la resina (sin eluir), 7) Marcador de Pm (Invitrogen) (ver Apéndice de Marcadores). B) Control de confirmación de la especificidad de unión de la miostatina a la resina de agarosa (realizado con Estreptavidina-Fosfatasa alcalina): 8) Expresión de ProtSite en un lisado de reticulocitos, 9) y 10) Interacción de la resina (sin miostatina) con ProtSite, 11) Marcador de Pm (Invitrogen).

B.1.4. Expresión de las distintas construcciones en un lisado de reticulocitos

Los productos de la expresión en el lisado de reticulocitos de conejo de las tres construcciones mutantes, así como de la miostatina-His, se visualizaron en geles de poliacrilamida al 15% que se expusieron a placas autorradiográficas. La expresión de las cuatro proteínas se confirmó en estos geles, como se observa en la figura 66. Las bandas coinciden con los tamaños esperados para cada una de ellas: 16 kDa para la miostatina-His (como se vio en los apartados anteriores), y aproximadamente 14 kDa para las construcciones Stop y C340. En cuanto a la construcción ProtSite, la suma de los dominios amino y carboxiterminal da lugar a una proteína de 354 aminoácidos, lo que debería originar una banda de aproximadamente 39 kDa (tomando como masa molecular media de un aminoácido 0.11 kDa); la banda observada, sin embargo, corresponde a unos 50 kDa (como también observaron McPherron *et al.* (1997) y Zhu *et al.* (2000)), lo que puede ser debido a la frecuencia en la miostatina de aminoácidos de mayor masa molecular. En el caso de la miostatina-His, se observa además una banda de aproximadamente 30 kDa, más intensa que la de 16 kDa, que podría ser el resultado de la dimerización de la proteína.

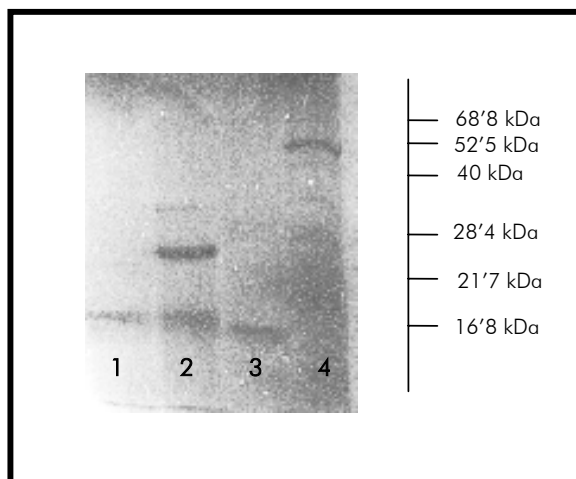


Figura 66: Expresión en un lisado de reticulocitos de las distintas construcciones estudiadas. 1) Stop, 2) Mstn-His, 3) C340, 4) ProtSite.

B.1.5. Ensayo de interacción

Los productos de la interacción de las 3 proteínas mutantes obtenidas de los reticulocitos de conejo con la proteína de fusión miostatina-His unida a la resina de agarosa, se visualizaron en geles de poliacrilamida como en el caso anterior. Como se aprecia en la figura 67 la interacción se produjo en los tres casos, lo que prueba la capacidad de estas variantes de la miostatina de interactuar con la miostatina salvaje en un sistema *in vitro*.

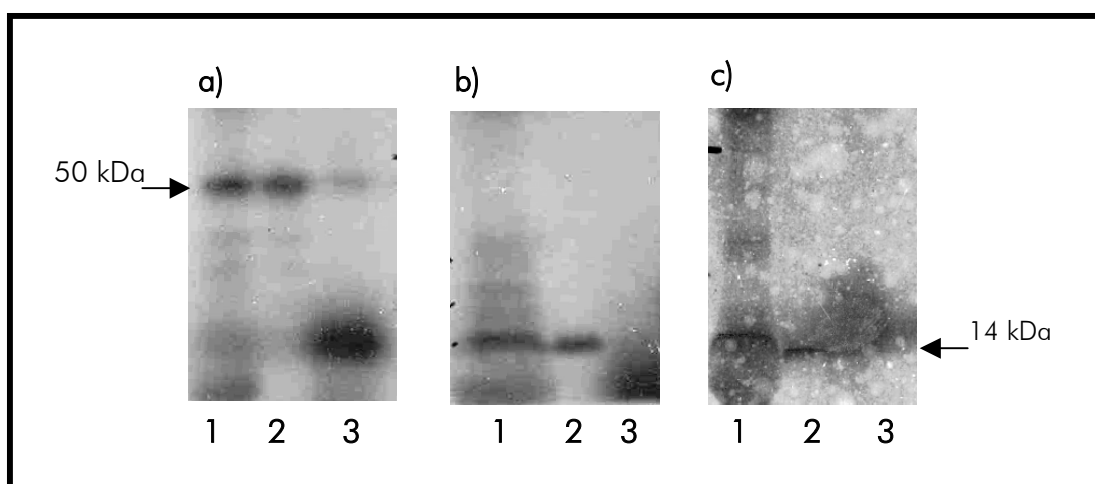


Figura 67: Interacción entre la miostatina-His y las distintas construcciones estudiadas: a) ProtSite, b) Stop, c) C340 (1: producto del lisado de reticulocitos, 2: interacción, 3: sobrenadante de la interacción).

B.2. Ensayo de doble híbrido en células mamíferas

La interacción entre las proteínas evaluadas se visualiza gracias a la coloración azulada que produce la expresión del gen de la β -galactosidasa al metabolizar el sustrato X-Gal cuando se activa la unidad de transcripción GAL4-VP16.

Como se observa en la figura 68, todas las construcciones mutantes dieron lugar a la interacción con la miostatina salvaje al ser cotransfectadas, junto al vector lacZ, en células CHO y tras realizar un ensayo de actividad con una tinción *in situ* para la β -galactosidasa. Asimismo, en los controles negativos transfectados sólo con cada una de las construcciones AD o BD por separado junto al vector pGal/lacZ, solamente se observa una coloración basal.

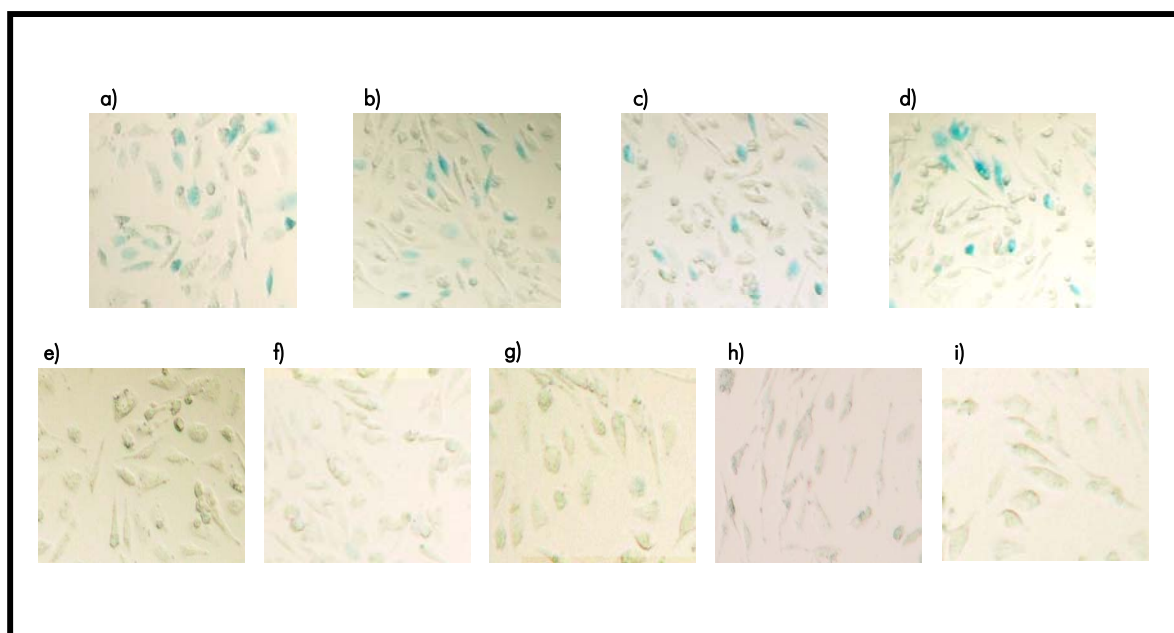


Figura 68: Interacción entre la miostatina salvaje y las distintas construcciones estudiadas en un sistema de doble híbrido en células CHO-K1: a) Miostatina salvaje, b) ProtSite, c) Stop, d) C340, e) Control negativo AD-mstn s., f) Control negativo BD-mstn s., g) Control negativo AD-ProtSite, h) Control negativo AD-Stop, i) Control negativo C340.

Posteriormente se realizó una cuantificación relativa de los niveles de β -galactosidasa expresada en las células CHO-K1, para comparar estos niveles entre las células transfectadas con miostatina salvaje y las células transfectadas con las tres variantes dominantes negativas. La figura 69 muestra los valores de absorbancia a 420 nm obtenidos por microlitro para cada una de las cuatro interacciones estudiadas.

Aunque a primera vista parece que las variantes C340 y Stop presentan una menor absorbancia comparadas con la miostatina control, el test t-Student demuestra que para ninguna de las tres variantes dominantes negativas (C340: $0'0102 \pm 0'0012$; ProtSite: $0'0125 \pm 0'0027$; Stop: $0'0107 \pm 0'0020$; $p > 0'8$) existen diferencias significativas con respecto al control de miostatina salvaje ($0'0117 \pm 0'0141$).

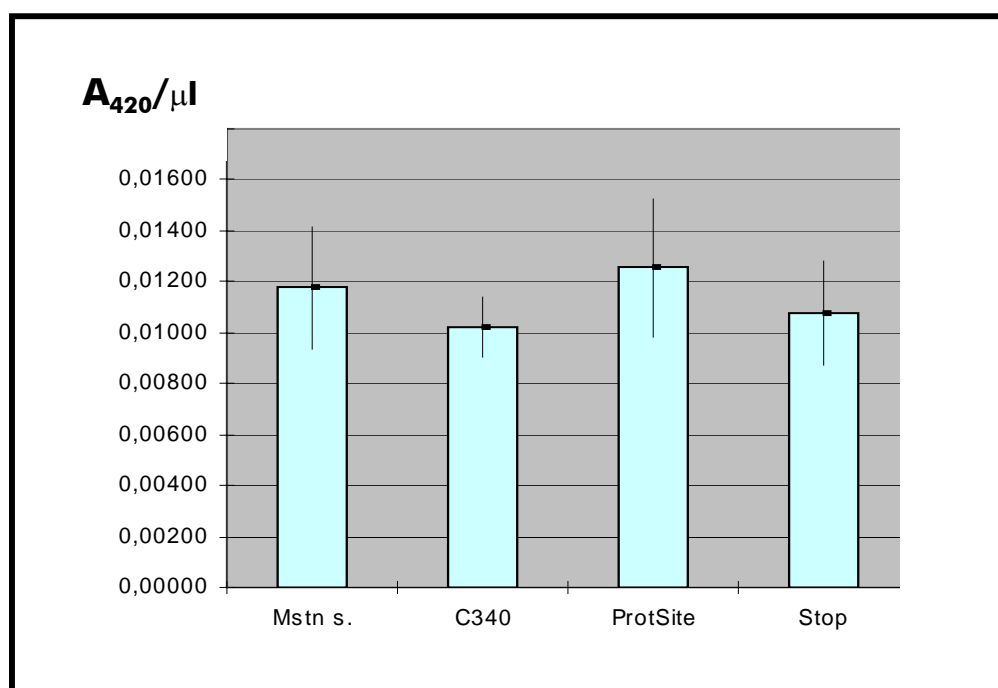


Figura 69: Comparación de la actividad de β -galactosidasa. Representación de la absorbancia obtenida para cada una de las proteínas evaluadas en un ensayo de β -galactosidasa.

DISCUSIÓN

A. EVALUACIÓN EN CÉLULAS ES DE UN SISTEMA DE ACTIVACIÓN CONDICIONAL DE LA MIOSTATINA

El sistema Cre/lox es una herramienta cada vez más utilizada en ingeniería genética en todo tipo de líneas celulares eucariotas. Se ha descrito un amplio rango de aplicaciones, desde translocaciones y deleciones cromosómicas de gran tamaño (Mills & Bradley, 2001), hasta expresión génica inducible (Metzger & Chambon, 2001) o integración localizada (Fukushige & Sauer, 1992), pasando por *knock-outs* condicionales y tejido-específicos (Rajewsky *et al.*, 1996; Selbert *et al.*, 1998) o la eliminación específica de marcadores de selección (Gu *et al.*, 1994; Grobet *et al.*, 2003). En todos los estudios mencionados se utilizó como sitio *lox* la secuencia del fago P1, el *loxP*, cuya eficacia de recombinación está ampliamente documentada. El problema de estos *loxP* en el planteamiento seguido para la creación de una línea "Mstn OFF to ON" (miostatina condicionalmente activable) es que los sitios *loxP* continúan siendo sustrato de la Cre-recombinasa mientras esta enzima permanezca en el medio, de modo que la posición con la inversión buscada sólo afectaría el 50% de las moléculas.

Esto se ha pretendido eludir utilizando *lox* mutados (Albert *et al.*, 1995) cuyo producto de recombinación sea difícilmente reconocible por la Cre-recombinasa de manera que tras la primera recombinación la nueva orientación permanezca bloqueada. El primer paso para la valoración de la eficacia de este sistema fue la construcción del plásmido pPonc123aak.

A.1. Construcción de pPonc123aak

La construcción definitiva pPonc123aak, una vez verificada por PCR, se secuenció en todas sus regiones introducidas *de novo* con respecto al clon lambda original (ver Materiales y Métodos A.2.1.). Esto supuso la secuenciación de los distintos *lox*, las zonas de inserción de los diferentes adaptadores y las zonas de ensamblado, resultando todas estas secuencias correctas. El resto de regiones del gen y los genes de selección introducidos (Neomicín-transferasa y Timidín-kinasa) no se secuenciaron ya que estas zonas se habían insertado mediante digestión y ligado convencionales sin recurrir a amplificación por PCR (las secuencias de ADN introducidas directamente mediante digestión y ligado y luego transformadas en una cepa bacteriana, al contrario que las amplificaciones mediante PCR, introducen mutaciones con una frecuencia especialmente baja ya que la maquinaria enzimática bacteriana de replicación del ADN es mucho más fiable que las enzimas polimerasas comerciales - Hamilton *et al.*, 2001; Goodman, 2002-).

Una cuestión derivada del hecho de no haberse realizado una secuenciación completa de la construcción definitiva pPonc123aak, es la necesidad de descartar la posibilidad de que se hubieran introducido varias copias de los fragmentos ligados en tándem por unión cabeza-cola. Esta posibilidad se descartó realizando varias digestiones de la construcción plasmídica con diferentes enzimas. Todos los patrones de bandas concordaron con los

tamaños de banda esperados que se habían deducido de la secuencia *in silico* de pPonc123aak (figura 44). Esto corrobora la correcta alineación de los distintos fragmentos que conforman la construcción plasmídica pPonc123aak.

A.2. Ensayos preliminares

Dada la escasa bibliografía existente del sistema Cre-lox con los *lox66* y *lox71* elegidos se optó por realizar una evaluación preliminar rápida de la funcionalidad de estos *lox* en el contexto del gen de la miostatina antes de realizar el estudio a nivel celular. Para ello se utilizó en un primer examen la enzima Cre purificada y en un ensayo posterior una cepa de *E. coli* capaz de expresar la recombinasa Cre.

El resultado del tratamiento de pPonc123aak con Cre purificada muestra que los 3 *lox* utilizados (tanto el *loxP* como los *lox66* y *lox71*) son perfectamente funcionales ya que todos ellos actúan en alguna de las recombinaciones producidas. De hecho, se producen todos los tipos de recombinación posibles utilizando 2 ó 3 *lox* simultáneamente, lo que indica que las distintas combinaciones entre cualesquiera de estos *lox* son viables.

Como era de esperar, la recombinación entre ambos *lox* mutados (66 y 71) se produjo con bastante menor frecuencia (2'2%) que entre el *loxP* y cualquiera de los *lox* mutados (20%). Araki *et al.* (1997a) encontraron una frecuencia de recombinación entre dos *loxP* muy semejante a la que había entre un *loxP* y un *lox66* o un *lox71*, y tanto estos autores como Albert *et al.* (1995) describieron la recombinación entre dos *loxP* como mucho más frecuente que la observada entre 2 *lox* mutados. En el estudio objeto de esta tesis en particular, la frecuencia de recombinación en el control utilizado con *loxP* (pPonc123bbj) fue de 35%.

Cuando se realizó el mismo ensayo con los mismo plásmidos una vez desposeídos del cassette Neo (pPonc123-Neo^S y pPonc2b3j-Neo^S) las construcciones parecieron volverse más resistentes a la acción de la Cre-recombinasa ya que sólo se produjeron recombinaciones cuando se aumentó la cantidad de esta enzima. Paradójicamente, el análisis por PCR del producto total de recombinación sí mostró recombinación con cantidades estándar de Cre, pero probablemente la frecuencia fuera tan baja que no se detectaron cuando se analizaron las colonias una a una. Además la frecuencia de recombinaciones disminuyó tanto en el caso de *lox66/lox71* como en caso de *loxP/loxP* con respecto a las primeras construcciones evaluadas (pPonc123aak y pPonc123bbj - figura 26-). Esto puede ser debido a la ausencia de un *loxP* en el caso de pPonc123-Neo^S, pero este razonamiento tiene menos sentido en el caso de pPonc2b3j-Neo^S. Probablemente el descenso de la frecuencia de recombinación de pPonc123-Neo^S y pPonc2b3j con respecto a pPonc123aak y pPonc123bbj se debiera a una disminución de la actividad de la enzima.

En todo caso este test muestra una frecuencia de inversión entre *lox* mutados (2'1% y 1'1% para cada una de las condiciones ensayadas -ver A.4.1. en Materiales y Métodos-) semejante a la frecuencia de delección entre *loxP* (2'2% y 0%). Este resultado da una idea del parecido en la eficacia de recombinación de ambos tipos de *lox*, pero al ser unos

porcentajes tan bajos para ser considerados significativos se optó por utilizar un segundo sistema basado en la cepa de *E.coli* MM294-Cre.

Esta cepa incorpora la enzima Cre-recombinasa en su genoma, y al seleccionarse sólo las colonias que han incorporado el plásmido estudiado se aumenta en gran medida la probabilidad de que el ADN portador de los sitios *lox* entre en contacto con la Cre-recombinasa.

En este ensayo se transformó la cepa MM294-Cre con las construcciones pPonc123-Neo^S, pPonc2b3j-Neo^S y pPonc-inv para luego examinar individualmente un número de colonias de cada transformación. De esta transformación se obtuvo un 100% de inversiones con la construcción de *lox66/lox71* (pPonc123-Neo^S), un 100% de deleciones con la construcción control de los *loxP* (pPonc2b3j-Neo^S) y se observó un 97'4% de colonias bloqueadas con el plásmido en posición invertida y con un *lox* doble mutante (pPonc-inv).

De este modo, por un lado queda probada la funcionalidad de los *lox66* y *lox71*, y por otro, su eficacia de recombinación asimilable a la de los *loxP*. Además, el hecho de que no se observen recombinaciones entre *lox* en ninguna de las tres construcciones cuando son transformadas en la cepa AG-1 (que no lleva unacopia de Cre en su genoma) demuestra que la recombinación entre estos *lox* está condicionada a la presencia de Cre en el medio. Por último, se observa que la capacidad del tercer exón de permanecer bloqueado en orientación activa una vez ha actuado la Cre-recombinasa, y aunque persista la enzima en el medio, es prácticamente total.

A.3. Creación de una línea estable de células ES "Mstn OFF to ON"

A.3.1. Establecimiento de una línea de células ES con la construcción pPonc123aak

La selección de las células ES recombinantes homólogas tras la electroporación con pPonc123aak se realizó con G418 y ganciclovir durante 11 días. Tras el repicado individual de colonias se realizó una PCR y un Southern blot para detectar los recombinantes homólogos eliminando los integrantes al azar.

La ventaja de una primera identificación de los recombinantes homólogos por PCR es que el número de clones que pueden analizarse fácilmente es mucho mayor que la identificación por Southern blot. Sin embargo, los clones identificados por PCR como recombinantes homólogos no se consideran definitivos hasta haber sido confirmados mediante Southern blot ya que la existencia de falsos positivos es bastante habitual y más o menos frecuente según las condiciones de PCR utilizadas (Torres & Kühn, 1997). La disposición de las dianas para la enzima de restricción diagnóstica elegida y de la sonda de hibridación utilizadas en el análisis de Southern blot permite diferenciar perfectamente los tamaños de las bandas correspondientes a las distintas posibilidades que puedan presentarse: no integración (alelo salvaje), integración al azar o integración por

recombinación homóloga (ver figura 31). De este modo se puede asegurar que los clones confirmados mediante Southern han sufrido recombinación tanto en su brazo corto como en su brazo largo de homología, y que no se han dado procesos de inserción de varias copias en tándem.

Estos ensayos dieron lugar a 6 clones positivos sobre los 288 examinados, lo que supone un 2'1% de clones recombinantes homólogos de entre los clones Neo^R/Ganc^R analizados. Este resultado indica una menor frecuencia de recombinación homóloga que la observada en otros experimentos de mutagénesis dirigida: 5% para el gen int-2 y 79% para el gen hprt (Mansour *et al.*, 1988), 5-10% para los genes c-fos, adipina y aP2 (Johnson *et al.*, 1989) y 10% para el propio gen de la miostatina (McPherron *et al.*, 1997). Al margen de la posibilidad de obtener un número de falsos positivos más o menos elevado según lo estricto de las condiciones de las técnicas de rastreo utilizadas, estas diferencias no parecen tener una explicación clara. Algunos autores aluden a la localización cromosómica o a las diferencias de expresión del gen en particular (Mansour *et al.*, 1988), aunque otros no encuentran esa correlación en sus experimentos (Johnson *et al.*, 1989). Las diferencias en la frecuencia de recombinación homóloga en el caso de la miostatina entre este estudio y el de McPherron *et al.* (1997), y teniendo en cuenta que los parámetros de localización cromosómica y de expresión son los mismos, pueden deberse al hecho de que estos autores utilizaran un vector de mutagénesis dirigida con un doble cassette TK (uno en cada extremo de la construcción), lo que puede hacer disminuir sensiblemente el número de integrantes al azar.

A.3.2. Eliminación del cassette de selección Neo^R por recombinación mediante Cre

Una de las ventajas de utilizar el sistema Cre/lox conjuntamente con la estrategia de mutagénesis dirigida es la posibilidad de eliminar el gen de selección flojado una vez que se han identificado los clones recombinantes homólogos.

Esto es de vital importancia en el estudio de la regulación génica para evitar la influencia del gen de selección, y sus propios elementos reguladores, en la regulación del gen de interés (Fiering *et al.*, 1995). Por ello, se ha expresado la recombinasa Cre bajo la acción del promotor pMC1 de manera transitoria en dos de los clones recombinantes homólogos; esta expresión es transitoria para evitar la acción de la recombinasa "ad libitum" ya que se pretende obtener un clon cuyo cassette de resistencia a la neomicina haya sido escindido, pero que no haya efectuado la inversión del tercer exón.

Para encontrar un clon con la conformación deseada se repicaron 912 colonias (480 del clon 3 y 432 del clon 8). La razón de este elevado número es, por un lado, porque la eficacia de transfección es bastante variable y poco controlable, y por otro, porque en este caso ya no existe una selección fenotípica, como se dio en el caso de la recombinación homóloga, donde la doble selección Neo/TK enriquece el número de clones a estudiar 2000 veces (Mansour *et al.*, 1988).

La expresión transitoria del vector pMC-Cre dio lugar a unos porcentajes de colonias neo-sensibles de 7'6% en el caso del clon 3 y del 38'5% en el caso del clon 8. Estas

diferencias de neo-sensibilidad se deben probablemente a una distinta eficacia de transfección del plásmido pMC-Cre (Torres & Kühn, 1997). En todo caso, estos porcentajes abarcan la proporción de colonias neo-sensibles encontradas por Grobet (26%) (comunicación personal) en la delección del gen neomicín-transferasa utilizando *loxP* convencionales.

Las orientaciones génicas que se pueden esperar en estos clones sensibles al tratamiento con neomicina son dos: la simple delección del cassette Neo (conservando el exón 3 en su posición invertida) o la delección del cassette Neo junto a la inversión del tercer exón (que pasará a estar en orientación "ON" y bloqueado -ver figura 32-).

Las dos pruebas de PCR realizadas con ánimo de distinguir estas dos posibilidades se eligieron de manera que fueran mutuamente excluyentes. De este modo, los clones positivos para la simple delección del cassette Neo presentarían una banda de 780 pb para la combinación 12UP/17UP1 y sólo una banda de 250 pb (correspondiente al cromosoma no transgénico) para el sistema 12DN/17UP1; y los clones en los que se hubiese producido una delección del cassette Neo al mismo tiempo que la inversión del tercer exón, no presentarían ninguna banda en el sistema 12UP/17UP1, y mostrarían una banda de 290 pb en el sistema de PCR 12DN/17UP1 (además de la banda de 250pb correspondiente al cromosoma no manipulado -ver apartado A.3.2. de Resultados-).

El resultado de estas PCR fue inesperado, ya que sólo uno de los 157 clones examinados respondió a alguna de las dos PCR realizadas. En este clon (3c6E) se confirmó la delección del cassette Neo (sin inversión del exón 3) de modo que resultó adecuado para la continuación de este estudio (figura 51).

Pero dado que los resultados de este ensayo de recombinación transitoria pueden dar una idea de la eficiencia del sistema "Mstn OFF to ON" de revertir a la orientación activa, se intentó descifrar la situación del resto de clones examinados.

Por ello se procedió a descartar la posibilidad de un fallo en el diagnóstico *de visu* de la neo-sensibilidad celular realizando una PCR entre el gen de la miostatina y el cassette de neo-resistencia (12UP/MM67). Esto se planteó bajo la suposición de que las condiciones de PCR utilizadas para detectar la escisión del cassette Neo (12UP/17UP1) podrían no ser las óptimas en el caso de que el cassette siguiera aún presente (1'9 kb en lugar de 780 pb). Este resultado fue negativo para casi la totalidad de los clones, corroborándose lo observado en el test de sensibilidad a G418.

Otra posibilidad barajada fue la de una reversión al genotipo salvaje, por lo que se realizó una PCR flanqueando el *lox66* (MM64/12DN). Esta PCR mostró que todas las colonias examinadas presentaban la banda de 240 pb diagnóstica de la existencia de esta región transgénica.

La tercera posibilidad que se planteó fue la probabilidad de que se hubiera producido una recombinación intercromatídica en fase G2. Lewandoski & Martin (1997) describieron la pérdida de un cromosoma en ratones cuando éste era portador de dos *loxP* dispuestos en orientación inversa y se cruzaba esta línea de ratones con otra portadora de la Cre-recombinasa. Esta pérdida cromosómica se producía por un intercambio desigual entre cromátidas hermanas (esto es, entre *lox* dispuestos en orientación inversa uno respecto al otro en distintas cromátidas hermanas, como se

representa en la figura 52). Este intercambio da lugar a un cromosoma dicéntrico que se queda con todo el material proximal con respecto al punto de intercambio y a un cromosoma acéntrico que se queda con todo el material distal con respecto al centrómero. Durante la división celular, el cromosoma acéntrico se pierde; el cromosoma dicéntrico puede permanecer en la placa ecuatorial metafásica y perderse; puede someterse a una tensión entre los ejes de los polos y romperse en cuyo caso los fragmentos cromosómicos se perderán eventualmente porque cada uno carece de un telómero; o puede que sea atraído a uno de los dos polos y se herede en una de las células hijas, con lo cual, en el siguiente ciclo mitótico estará otra vez sujeto a una de estas tres posibilidades. De este modo, al margen de su destino inmediato, el cromosoma dicéntrico se perderá eventualmente.

Suponiendo que el cromosoma dicéntrico siga perpetuándose en la célula a través de las consecutivas divisiones celulares, y dado que se ha confirmado por PCR la existencia de un cromosoma transgénico, se buscó identificar las nuevas configuraciones derivadas de una posible recombinación intercromatídica esquematizada en la figura 52.

Pero la combinación de las distintas PCR realizadas para diagnosticar esta posibilidad de recombinación (MM64/12UP, 12DN/MM64, 17UP1/12UP, 12DN/17UP1) no dio un resultado positivo que explicara un caso de recombinación intercromatídica para ninguno de los clones.

Por lo tanto, no ha conseguido explicarse utilizando métodos relativamente rápidos y sencillos, la configuración de todos los clones neo-sensibles obtenidos tras la transfección transitoria con el vector pMC-Cre (con la excepción de 3c6E). Grobet *et al.* (2003 y comunicación personal) tampoco obtuvieron un resultado clarificador para la mayoría de sus clones neo-sensibles. En su caso, de los 240 clones neo-sensibles detectados obtuvieron 5 clones que habían sufrido una recombinación tipo II (escisión simple del cassette Neo) y 16 que sufrieron una recombinación tipo I (escisión del cassette Neo y el exón 3 juntos). Para el resto de clones no encontraron una explicación del tipo de recombinación que podrían haber sufrido.

A.4. Ensayo de la eficacia de la inversión en células ES

Una vez obtenida una línea ES estable con la construcción “Mstn OFF to ON” se procedió a ensayar su capacidad para realizar la inversión del tercer exón y adoptar una orientación activa (“ON”) y bloqueada. Para ello se volvió a recurrir a la expresión transitoria de la recombinasa Cre electroporando el clon 3c6E de la línea ES “Mstn OFF to ON” con distintas cantidades de pMC-Cre.

Las PCR resultantes del diagnóstico de inversión, tanto en el ADN total como en los 288 clones repicados individualmente (3 placas de 96 colonias, para las tres condiciones de electroporación estudiadas), indicaron que no se produjo ningún suceso de inversión con ninguna de las cantidades del plásmido pMC-Cre ensayadas.

En este punto se planteó confirmar la integridad del transgén tras la delección del cassette Neo para descartar la posibilidad de una recombinación mediada por Cre incorrecta que no hubiera restaurado adecuadamente el *lox66* en 5' del exón 3.

Tanto las PCR realizadas (entre el transgén y la región del gen exógena a éste) como la secuenciación de la región alrededor del *lox66* confirmaron que la delección del cassette Neo se produjo correctamente y que la secuencia del *lox66* era la esperada.

A.5. Evaluación de la eficiencia de la acción del vector de expresión pMC-Cre

Dada la ausencia de inversión de la construcción génica "Mstn OFF to ON" del clon 3c6E, se planteó examinar la eficiencia de transfección y de reconocimiento de las secuencias *lox* y posterior recombinación enzimática del vector pMC-Cre. Para ello se realizó un estudio comparativo utilizando como control un vector pSVlacZT, portador de dos *loxP*. Este vector se integró al azar en la línea 3c6E y en una línea control KOC (con *loxP* flanqueando el tercer exón de la miostatina, que se encuentra en posición directa).

De todos los clones positivos por PCR para la integración de pSVlacZT, se procuraron escoger los que tuvieran el menor número posible de copias ya que se pretendía evitar la competencia de los *lox* de la construcción "Mstn OFF to ON" y los de pSVlacZT por la Cre-recombinasa. Para obtener una idea del número de copias integradas de pSVlacZT se realizó una PCR de cuantificación usando como control interno un fragmento amplificado a partir del primer exón de la miostatina (para el que existen 2 copias). Este tipo de PCR no está considerada como una medida muy exacta de la auténtica cantidad de ADN molde ya que es difícil determinar el momento en que la reacción entra en fase de meseta y deja de replicarse exponencialmente (Ginzinger, 2002), pero como simplemente se pretende obtener una idea aproximada del número de inserciones de pSVlacZT se contó con este resultado. Observando los resultados para 30 ciclos de PCR (para 35 ya parece estar en fase de saturación), todos los clones parecen tener el mismo número de copias de pSVlacZT por comparación a las del exón I de la miostatina, considerándose que variarían entre 1 ó 2 copias de pSVlacZT por genoma. Sumándose a esto, los resultados del Southern, además de confirmar la integración del vector pSVlacZT, confirman lo observado en la PCR de cuantificación: el número de copias pSVlacZT y del exón I es similar lo que significa que el número de plásmidos de pSVlacZT podría variar entre una y dos copias por genoma. Esto significa que todos los clones son válidos para este ensayo, aunque los seleccionados se eligieron entre los que parecían dar una señal en la PCR cuantitativa y en el Southern más baja para pSVlacZT que para el exón I de la miostatina.

Las líneas elegidas se transfectaron con pMC-Cre para comprobar la eficacia de transfección de este vector y su eficacia de recombinación comparando *loxP* (líneas KOC) con *lox* mutados (líneas 3c6E).

Las PCRs realizadas sobre ADN total extraído de placas en las que no se han repicado los clones individualmente muestran que en las 3 líneas 3c6E y las 3 de KOC se ha

producido la transfección de pMC-Cre puesto que en todas aparece la banda diagnóstica de la delección del cassette Neo de la construcción pSVlacZT (figura 57). Esos mismos ADNs demuestran que sólo se ha producido la delección de la miostatina en las líneas KOC, mientras que la inversión del tercer exón no aparece en las líneas 3c6E (figura 58).

El análisis de los clones individuales corrobora este resultado mostrando que en ninguno de los clones 3c6E se observa la inversión esperada del exón III de la miostatina (paralelamente, en la línea KOC examinada aparecen 22 clones con la delección del tercer exón de entre los 96 examinados).

En cuanto a la ausencia de coloración de la tinción X-Gal, no se posee ningún indicio de cuál haya podido ser la razón para que no se produjera la expresión del gen de la β -galactosidasa. El vector pSVlacZT no comercializado (gentileza del Dr. Rajewsky) no se secuenció, ni tampoco una vez que se hubo integrado en el genoma de las líneas 3c6E y KOC, de modo que no puede descartarse la posibilidad de que alguna mutación en este gen o en su promotor impidiera su correcta expresión.

A.6. Evaluación de las posibles causas de ausencia de recombinación en la línea "Mstn OFF to ON"

Esta ausencia de recombinación entre los *lox 66* y *71* en las células ES no corresponde a lo observado en los experimentos preliminares realizados *in vitro* y en bacterias. Las posibles causas deben buscarse por lo tanto, en el nuevo ambiente genómico en el que se ha situado la construcción "Mstn OFF to ON" o en la propia Cre-recombinasa disponible en el medio.

Así, la ausencia de recombinación entre los *lox 66* y *71* en las células ES puede deberse a varias razones: 1) inaccesibilidad o ineficiencia de la enzima Cre-recombinasa en ciertas regiones cromosómicas (en relación a la estructura de la cromatina, a la tasa de transcripción o a la metilación del ADN), 2) por una cantidad escasa de Cre en el medio o, 3) por una baja eficacia del promotor bajo cuyo efecto se encuentra la recombinasa (Torres & Kühn, 1997).

La región cromosómica en la que se encuentra el gen de la miostatina, y concretamente los puntos en los que se han insertado los *lox*, no parecen ser una zona poco accesible a la Cre-recombinasa ya que Grobet *et al.* (2003) obtuvieron ratones en los que se había escindido el tercer exón mediante recombinación por Cre entre 2 *loxP* situados en la misma posición en la que se encuentran los *lox71* y *lox66* de la línea "Mstn OFF to ON".

En cuanto a la cantidad de vector de expresión de Cre, no es probable que resultara escasa ya que el rango de concentraciones utilizado en este estudio (entre 5 y 30 $\mu\text{g}/10^7$ células - Albert *et al.*, 1995-) entra dentro del rango generalmente utilizado para este vector: 1-3 μg (Gu *et al.*, 1994), 5 μg (Grobet *et al.*, 2003), 5-30 μg (Torres & Kühn, 1997), 30 μg (Gu *et al.*, 1993). Tampoco es probable que se produjera un acúmulo de la enzima excesivo que pudiera resultar tóxico ya que no se ha descrito ningún efecto indeseado sobre la capacidad de recombinación de Cre para las cantidades de enzima utilizadas en este ensayo.

El último punto por analizar es la posibilidad de una baja eficacia del promotor utilizado en el vector pMC-Cre: el promotor pMC1 (promotor timidín-kinasa del virus herpes simplex). En la actualidad sólo se conocen siete publicaciones en las que se hayan utilizado los *lox66* y *lox71*, bien por sus propiedades de bloqueo, bien por su especificidad frente a otros tipos de *lox*.

De entre estas publicaciones, el único estudio realizado en células vegetales (Albert *et al.*, 1995) recurre a una Cre-recombinasa regulada por el promotor 35S (promotor del virus del mosaico de la coliflor), que es un promotor altamente utilizado en ingeniería de plantas transgénicas debido a su elevada actividad (Benfey & Chua, 1990; Ho *et al.*, 1999).

Otras cinco publicaciones, realizadas en cultivos de células animales, sitúan el gen de Cre bajo la acción del promotor β -actina (Langer *et al.*, 2002) o de un promotor β -actina modificado, CAG (Araki *et al.*, 1997a; Araki *et al.*, 1999; Araki *et al.*, 2002) o del promotor PGK (Zhang & Lutz, 2002). Estos promotores son conocidos como promotores fuertes y ubicuos, ampliamente utilizados en ingeniería genética (Sugiyama *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 2001). Finalmente, Oberdoerffer *et al.* (2003) consiguen la recombinación entre *lox66* y *lox71* *in vivo* utilizando cepas de ratón en las que Cre se encuentra bajo la acción de un promotor inducible (ratones Mx-Cre) o tejido específico (ratones CD4-Cre). Ambas cepas transgénicas y sus correspondientes promotores han sido utilizadas con éxito en distintos experimentos de recombinación Cre/*lox* *in vivo* (Kühn *et al.*, 1995; Wolfer *et al.*, 2001).

En concreto, existe un estudio comparativo de la eficacia de recombinación entre 2 *loxP* utilizando la Cre-recombinasa bajo la acción de distintos promotores (Araki *et al.*, 1997b). Este ensayo, realizado en células ES en condiciones transitorias, demuestra que la mayor eficacia se obtiene utilizando el promotor CAG (15-26% de recombinación), seguido por los promotores hRF-1 α (9-13%), mPGK (4-9%) y en último lugar, el promotor pMC1 (<0'3%).

Esto demuestra que, aunque la Cre-recombinasa bajo la acción del promotor pMC1 se ha utilizado en infinidad de experimentos (Thomas & Capecchi, 1987; Gu *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1994; Lam & Rajewsky, 1998; Grobet *et al.*, 2003), este promotor presenta una actividad bastante baja comparado con otros promotores.

Esta actividad del vector pMC-Cre resulta suficiente en los estudios en los que se ha empleado para dar lugar a una recombinación entre *loxP*; pero la recombinación entre *lox* mutados requiere de unos niveles de Cre mayores que los requeridos entre *loxP* (Albert *et al.*, 1995), de modo que es posible que la eficacia del promotor pMC1 en la recombinación entre *lox66* y *lox71* sea insuficiente.

Esto explicaría que al menos se hubiera encontrado un clon neo-sensible en la línea "Mstn OFF to ON", en el que se hubiera producido la delección del Neo-cassette por recombinación *lox71/loxP*, ya que esta recombinación es sólo ligeramente más difícil que la recombinación *loxP/loxP* (Araki *et al.*, 1997a).

En cuanto a la elevada tasa de recombinación observada en las células de *E.coli* MM294-Cre, hay que tener en cuenta que la eficacia de recombinación ha sido tan alta debido en primer lugar a que el promotor utilizado es diferente (λP_R) y por otro lado a que

los *lox66* y *lox71* de pPonc123-Neo^S están mucho más accesibles en ese sistema que integrados en el genoma de una célula ES.

Por todo esto, se ha considerado la baja actividad del promotor utilizado en el vector de expresión de la Cre-recombinasa como la explicación más plausible para el hecho de que no se haya producido la recombinación entre los *lox66* y *lox71* de la línea "Mstn OFF to ON" de las células ES.

Esto no convierte esta estrategia en desechable, ya que son múltiples los autores (amén de los que de hecho han utilizado este sistema de *lox* mutados en células ES) que hacen mención de los *lox66* y *lox71* mutados sugiriendo su uso en este u otro tipo de estrategias de bloqueo de la inversión de un fragmento de ADN (Babinet & Cohen-Tannoudji, 2000; Lam & Rajewsky, 1998; Torres & Kühn, 1997; Zheng *et al.*, 1999). Este resultado más bien apunta hacia la realización en un ensayo en el que se utilice un promotor más fuerte, como el promotor CAG, para dirigir la expresión de la Cre-recombinasa.

B. EVALUACIÓN DE DISTINTOS ALELOS DE LA MIOSTATINA POTENCIALMENTE DOMINANTES-NEGATIVOS

B.1. Construcción de una serie de alelos de la miostatina potencialmente dominantes negativos

El objetivo de esta línea de estudio ha sido la creación de una serie de alelos de la miostatina portadores de mutaciones no funcionales y que sean capaces de bloquear la acción de la miostatina salvaje. Para ello se ha perseguido mantener la integridad estructural del monómero de miostatina evitando al mismo tiempo la interacción con su receptor.

Para conseguir esto último, se ha recurrido en los tres casos de variantes diseñadas, al bloqueo por impedimento estérico ocasionado por la desestabilización que ocurre cuando se produce una repulsión entre átomos dispuestos demasiado cerca unos de otros. De este modo se espera que el aumento del volumen de los heterodímeros formados impida la interacción bien con el receptor tipo II, bien con el receptor tipo I, impidiéndose la formación del complejo heterotetramérico de receptores necesario para la transmisión de la señal (Heldin *et al.*, 1997). De hecho, otros autores (Brunner *et al.*, 1992) mencionan la posibilidad de que distintas mutaciones producidas en miembros de los TGF β provoquen incapacidad para unirse a su receptor específico. Incluso en la miostatina, Berry *et al.* (2002) sugieren que la eliminación de una de las cisteínas responsables de la formación de puentes intracatenarios sea la causante de la ausencia de función de la proteína por incapacidad para unirse a su receptor, ya que la eliminación de esta cisteína probablemente altere la estructura tridimensional de la miostatina.

Así, la construcción Stop incrementa la longitud de la cadena polipeptídica en 29 aminoácidos (un 27% de su longitud). Pero además, este aumento se produce en el extremo carboxiterminal del fragmento, precisamente la región en la que en otros miembros de la familia TGF β se encuentra el dominio de unión al receptor tipo II (Qian *et al.*, 1996) con lo que se espera que la modificación de las regiones flanqueantes haya alterado este dominio lo suficiente como para inhibir la unión a este receptor. Es interesante la observación de que la miostatina, como la mayoría de los TGF β , presenta una secuencia conservada CXCX en su extremo carboxi-terminal, que desaparece con este elongamiento realizado en la cadena polipeptídica. En zebrafish se ha observado que una mutación en el codon Stop de BMP2 (un miembro de los TGF β) que alarga en seis aminoácidos el extremo carboxi-terminal produce un fenotipo dominante negativo (Kishimoto *et al.*, 1997).

En el caso de la construcción ProtSite, la mutagénesis de la diana de proteólisis es una estrategia a la que se ha recurrido en multitud de ocasiones para conseguir proteínas dominantes negativas tanto en miembros de los TGF β s como entre otras proteínas (Schlesinger *et al.*, 1993; Hawley *et al.*, 1995; Osada & Wright, 1999). Estos estudios

demonstraron que podía inhibirse la función de la proteína salvaje cuando se introducían en la célula estas variantes incapacitadas para liberar el dominio activo.

Por otro lado, aunque el mecanismo por el que se espera que se produzca el efecto dominante negativo en la variante ProtSite sea el impedimento estérico mencionado para interaccionar con el receptor, cabe mencionar que Lopez *et al.* (1992) observaron que cuando mutagenizaban la diana de proteólisis de TGF β -1 se inhibía su secreción en un cultivo celular. Por tanto, es posible que en este caso el efecto inhibitorio del ProtSite se produzca incluso antes de ser secretado al espacio extracelular.

Y en cuanto a la construcción C340, la introducción de una nueva cisteína intercatenaria en el interior de la molécula de la miostatina madura supone por un lado un incremento de 22 aminoácidos, lo que ya aumenta en un 20% la longitud del péptido y con ello las posibilidades de que no se produzca la unión al receptor por impedimento estérico. Pero además, la introducción de nuevas cisteínas en una proteína con el propósito de aumentar el número de puentes disulfuro establecidos con otros monómeros (Farzan *et al.*, 1998; Peabody, 2003) permite la posibilidad de que esta construcción C340 conduzca a la formación de heterotrímeros generados por la unión con otras moléculas de miostatina salvaje. Para fomentar que esta nueva cisteína, al igual que la cisteína 340 natural, establezca puentes disulfuro con otros monómeros, se ha introducido en el mismo contexto aminoacídico que la anterior, lo que aumenta la probabilidad de que se comporte igualmente como una cisteína intercatenaria (Muskal *et al.*, 1990).

B.2. Evaluación de la capacidad de interacción de distintos alelos de la miostatina potencialmente dominantes negativos

Ya se ha comentado que la eficiencia de una estrategia de dominancia negativa se basa en primer lugar en la capacidad de los monómeros dominantes negativos de interaccionar con los monómeros salvajes, en el caso de la miostatina formando heterodímeros. Por ello en este estudio se han planteado dos ensayos para valorar la capacidad de interacción entre dos proteínas. Uno de ellos es un ensayo *in vitro* de *pull-down* y el otro, un ensayo en cultivo de células mamíferas de doble-híbrido.

B.2.1. Pull-down

El ensayo de *pull-down* es un estudio ampliamente utilizado para la detección de interacción entre proteínas (Ogawa *et al.*, 1998; Tachedjian *et al.*, 2000; Nicholas *et al.*, 2002), que proporciona una idea bastante fiable de la capacidad de hibridación entre proteínas.

Para la realización de este ensayo el primer paso fue la expresión de la miostatina salvaje unida a una secuencia de 6 histidinas. Esta proteína se expresó en una cepa inducible de

E. coli, BL21 (DE3)pLys, y como se observa en la figura 64, se obtuvo un alto grado de expresión. En el western blot correspondiente (figura 64B) se observa que además de la banda del monómero de miostatina-His (16 kDa), aparece una banda algo más nítida con un tamaño de 32 kDa, que sería la correspondiente al dímero de la miostatina de fusión.

Posteriormente se procedió a la inmovilización de esta proteína de fusión miostatina-His en una resina de agarosa. La figura 65 muestra que la miostatina-His está correctamente unida a la resina (calle 6) y que no se desprende nada de la proteína de fusión en los lavados (calles 2 y 3). Además se realizó un control para confirmar que la miostatina no es capaz de pegarse inespecíficamente a esta resina. Este control se realizó con la variante ProtSite (que no contiene una secuencia de histidinas) expresada en un lisado de reticulocitos. El western blot de la figura 65 (calles 9 y 10) muestra que tras incubación de la resina de agarosa (sin miostatina-His pegada) con la miostatina ProtSite no se produce ninguna interacción inespecífica entre la proteína y la resina.

El siguiente paso fue la expresión de las tres variantes mutadas de la miostatina en un lisado de reticulocitos. Como se observa en la figura 66, tanto la miostatina salvaje insertada en pRSET, como las variantes Stop y C340 se expresan correctamente coincidiendo con los tamaños esperados. En cambio ProtSite da lugar a una banda de unos 50 kDa aunque el tamaño esperado correspondiente a los 354 aminoácidos de su secuencia sería de unos 39 kDa. Otros autores (McPherron *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2000) también obtienen este resultado para la pre-pro-proteína, lo que puede deberse a una disposición particular de plegamiento que haga que la proteína migre más despacio de lo que migraría si estuviese completamente desplegada, o bien, por una mayor frecuencia de aminoácidos de alto peso molecular en su secuencia. Por otro lado, en este western se observa que las bandas de la miostatina salvaje, Stop y C340 son mucho más débiles que la banda correspondiente a la de ProtSite. Esto se debe a la diferencia de tamaño de estas proteínas y al correspondiente número de metioninas marcadas que pueden incorporarse a cada una de ellas durante el proceso de traducción.

Otra observación que puede extraerse de este mismo western blot es la banda correspondiente al dímero de la miostatina salvaje, de unos 32 kDa. Por el contrario, en ninguna de las calles correspondientes a las proteínas mutantes aparece una banda que pudiera corresponder a una dimerización de la proteína mutante consigo misma, lo que podría interpretarse como una incapacidad para formar homodímeros mutantes. Esto incrementaría la capacidad dominante negativa de estas variantes de la miostatina ya que al no poder interactuar entre ellas, todo el acervo de proteínas dominantes negativas en el medio estaría disponible para unirse a la miostatina salvaje endógena bloqueándola.

En todo caso, esta hipótesis debería ser contrastada en ensayos posteriores ya que el gel SDS-PAGE se ha realizado en condiciones reductoras por lo que en principio sólo deberían aparecer las bandas correspondientes a las proteínas monoméricas. Pero al haberse observado tan marcadamente la banda correspondiente al dímero de miostatina salvaje, cabe pensar que las condiciones utilizadas no son lo suficientemente reductoras para separar ambos dímeros o que la miostatina presenta una resistencia especial a la rotura de sus puentes disulfuro (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2000 y Wehling *et al.*, 2000 ya mencionan la dificultad para romper las uniones que mantienen

enlazados a los monómeros maduros de la miostatina, incluso en condiciones fuertemente reductoras) y que por ello la miostatina salvaje aparece tanto en forma de dímero como de monómero (tal y como ocurre tanto en el western blot de la figura 64 B, como en la figura 66). Todo esto lleva a plantear que aunque no pueda descartarse que en condiciones nativas las proteínas dominantes negativas pudieran dimerizar entre sí, esta unión sería menos fuerte que la ejercida entre dos monómeros de miostatina salvaje. De modo que esto hipotéticamente elevaría la capacidad de acción de estas moléculas dominantes negativas.

El último y definitivo paso en el ensayo de *pull-down* fue la interacción entre la miostatina-His inmovilizada en la resina de agarosa y cada una de las tres proteínas dominantes negativas. Este ensayo demostró la capacidad de unión entre la miostatina salvaje y cada una de las variantes dominantes negativas, como se observa en la figura 67, donde las tres proteínas presentan una banda intensa después de haber estado sometidas a interacción y posteriores lavados con la miostatina salvaje.

B.2.2. Ensayo de doble-híbrido en células mamíferas

Este ensayo, frente al de *pull-down*, presenta la característica de realizarse completamente en el interior celular, lo que confiere a las proteínas la posibilidad de realizar las modificaciones post-traduccionales habituales adoptando su conformación estructural nativa (Fagan et al., 1994; Feng & Derynck, 2001). Este ensayo también se utiliza habitualmente en estudios de interacción proteica sustituyendo cada vez más al ensayo de doble-híbrido en levaduras y suele complementarse con estudios como el de *pull-down* para confirmar la interacción observada (Nicholas et al., 2002; Ghosh et al., 2000).

Las imágenes de la figura 68 muestran que las tres proteínas dominantes negativas (además de la miostatina salvaje control) han sido capaces de dimerizar con la miostatina salvaje, formando así una unidad de activación transcripcional capaz de unirse a la región promotora del gen *lacZ* y activar su expresión. Esta expresión se visualiza por adición al medio de X-Gal, sustrato de la β -galactosidasa, que produce la coloración azul que puede observarse en las imágenes.

Asimismo, se observa que todos los controles negativos (cotransformaciones de cada una de las construcciones AD o BD por separado junto al vector *lacZ*) presentan apenas una coloración basal, indicando que ninguna de estas construcciones posee por ella sola actividad transcripcional independiente y que la unión de la miostatina salvaje a la miostatina dominante-negativa es específica.

El examen cuantitativo de la actividad de la β -galactosidasa en la interacción de las cuatro proteínas con la miostatina salvaje mostró que no existen diferencias significativas entre ninguna de las tres variantes dominantes negativas y la miostatina salvaje. Esto supone que la capacidad de dimerización entre miostatina mutante y miostatina salvaje es semejante a la existente entre dos monómeros de miostatina salvaje.

Este mismo examen también muestra que parece haber una tendencia (aunque no significativa) a una dimerización un poco menor en el caso de las miostatinas C340 y Stop, que podría ser debida precisamente a la elongación introducida en la cadena de aminoácidos resultando en una cierta perturbación de la conformación espacial de la nueva proteína. Del mismo modo, la miostatina ProtSite parece ofrecer unas condiciones de dimerización más parecidas a la de la propia miostatina salvaje, tal vez debido a que la zona carboxi-terminal (por la que se establece el puente disulfuro con la miostatina salvaje) en esta variante proteica no está alterada. En todo caso, la principal conclusión obtenida de este ensayo es que no existen diferencias significativas entre los grados de interacción miostatina-DN/miostatina-salvaje y miostatinas salvajes entre sí.

B.2.3. Evaluación de los resultados obtenidos del pull-down y el sistema de doble híbrido

Los resultados de los ensayos anteriores aportan una prueba fehaciente de la capacidad de dimerización entre las moléculas diseñadas y la miostatina salvaje, indicando que las mutaciones introducidas no interfieren en las regiones encargadas de la dimerización.

Así, por ejemplo, se confirma que el fragmento introducido en la construcción C340 no interrumpe la secuencia del dominio de dimerización y que la nueva cisteína no interfiere en la composición de los puentes disulfuro ni establece nuevas combinaciones de interacción entre las distintas cisteínas de la cadena. Lo que no permiten demostrar ni el ensayo de *pull-down* ni el de doble híbrido es si esta nueva cisteína 340 es efectivamente capaz de establecer puentes disulfuro con otras moléculas de miostatina (salvajes o mutantes) ya que en el caso de haberse formado heterotrímeros entre las proteínas de fusión del ensayo de doble híbrido el sistema no permite discernir entre un complejo en el que hubiera más de un dominio de activación o de unión al ADN y otro en el que sólo hubiese uno de cada uno de estos dos dominios. En cuanto al ensayo *pull-down*, el monómero C340 una vez unido a la miostatina salvaje unida a su vez a la resina de agarosa podría interaccionar o bien con otras miostatinas salvajes que ya estuvieran unidas a la resina, o bien con otros monómeros C340 libres en el medio. En ambos casos las condiciones reductoras utilizadas en los geles SDS-PAGE teóricamente romperían esos puentes disulfuro.

En el caso del monómero de miostatina Stop, también se demuestra que el alargamiento en la cadena polipeptídica y la aparición de una décima cisteína en esta zona elongada no suponen ninguna interferencia con la región de dimerización ni con el establecimiento de los puentes disulfuro ya formados.

En cuanto a la construcción ProtSite, el hecho de que el dominio bioactivo del extremo carboxiterminal se hubiera mantenido idéntico, ya hacía pensar que el proceso de dimerización con la proteína salvaje no se vería interferido. Además, este resultado viene a confirmar el efecto dominante negativo observado por Zhu *et al.* (2000) en ratones transgénicos para una construcción de la miostatina análoga a ProtSite, cuya diana de proteólisis había sido mutagenizada con objeto de impedir la liberación del dominio carboxiterminal y la consecuente maduración de la proteína. Estos ratones integraban en

su genoma varias copias de esta construcción mutante, además de las dos copias endógenas de la miostatina salvaje, y presentaban un aumento significativo de su masa muscular como resultado de un incremento del tamaño de las fibras musculares. La demostración de la formación de heterodímeros entre la miostatina salvaje y el mutante ProtSite confirma que el fenotipo observado por este equipo se debe a un efecto de dominancia negativa mediado por unión del monómero mutante al monómero salvaje.

En resumen, tanto el ensayo de *pull-down* como el de doble híbrido llevan a la conclusión de que las moléculas de miostatina dominantes negativas diseñadas son perfectamente capaces de interactuar con las moléculas de miostatina salvaje, por lo que queda comprobado el requisito previo e indispensable para el uso de una estrategia de dominancia negativa.

Estos resultados preliminares permiten la continuación del estudio para valorar la actividad dominante negativa de estas moléculas evaluando su capacidad para fomentar la proliferación de mioblastos en cultivo comparándolos con mioblastos control.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El gen de la miostatina es capaz de revertir condicionalmente a la configuración activa en un sistema "Mstn OFF to ON" mediante el uso de *lox* mutados tanto *in vitro* como en un sistema bacteriano.
2. El promotor pMC1 de Cre, efectivo en la recombinación entre *loxP*, ha resultado ineficiente para revertir condicionalmente el sistema "Mstn OFF to ON" en un cultivo de células ES.
3. Las variantes de la miostatina C340, PS y Stop presentan una capacidad de dimerización con la proteína salvaje análoga a la existente entre monómeros salvajes. Con ello se demuestra el primer requisito indispensable que han de cumplir las moléculas mutantes potencialmente dominantes negativas.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- ABREMSKI, K., HOESS, R. 1984. "Bacteriophage P1 site-specific recombination". *J. Biol. Chem.* **259**: 1509-14.
- AGAH, R., FRENKEL, P.A., FRENCH, B.A. MICHAEL, L.H., OVERBEEK, P.A., SCHNEIDER, M.D. 1997. "Gene recombination in postmitotic cells" *J. Clin. Invest.* **100**: 169-179.
- ALBERT, H., DALE E.C., LEE, E., OW, D.W. 1995. "Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome". *Plant J.* **7**: 649-659.
- AMAYA, E., MUSCI, T.J., KIRSCHNER, M.W. 1991. "Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos". *Cell* **66**: 257- 270.
- ANDREWS, B.J., PROTEAU, G.A., BEATTY, L.G., SADOWSKY, P.D. 1985. "The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences". *Cell* **4**: 795-803.
- ARAKI, K., ARAKI, M., YAMAMURA, K. 1997a. "Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells". *Nucleic Acids Res.* **25**: 868-872.
- ARAKI, K., IMAIZUMI, T., OKUYAMA, K., OIKE, Y., YAMAMURA, K. 1997b. "Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters". *J. Biochem (Tokyo)* **122**: 977- 982.
- ARAKI, K., IMAIZUMI, T., SEKIMOTO, T., YOSHINOBU, K., YOSHIMUTA, J., AKIZUKI, M., ARAKI, M., YAMAMURA, K. 1999. "Exchangeable gene trap using the Cre/mutated lox system". *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **45**: 737- 750.
- ARNOLD, H., DELLA-FERA, M.A., BAILE, C.A. 2001. "Review of myostatin history, physiology and applications". *LifeXY* **1**: 1014-1022.
- ARTAZA, J.N., BHASIN, S., MALLIDIS, C., TAYLOR, W., MA, K., GONZALEZ-CADAVID, N.F. 2002. "Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells". *J. Cell Physiol.* **190**:170-179.
- ARTHUR, P.F. "Double muscling in cattle: a review". 1995. *Aust. J. Agric. Res.* **46**:1493-1515.
- BASS, J., OLDHAM, J., SHARMA, M., KAMBADUR, R. 1999. "Growth factors controlling muscle development". *Domestic Animal Endocrinology* **17**: 191-197.
- BABINET, C., COHEN-TANNOUDJI, M. 2000. "Vingt ans d'interventions délibérées sur le genome de la souris". *Médecine/Sciences2000.* **16**: 31- 42.
- BAILEY, A.J., ENSER, M.B., DRANSFIELD, E., RESTALL, D.J., AVERY N.C. 1982. "Muscle and adipose tissue from normal and double muscled cattle: collagen types, muscle fibre diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties". In *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, vol.16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Ménissier, Martinus Nijhoff, pp 178-202.

-
- BENFEY, P.N., CHUA, N.-H. 1990. "The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants". *Science* **250**: 959- 966.
- BERRY, C., THOMAS, M., LANGLEY, B., SHARMA, M., KAMBADUR, R. 2002. "Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**: C135-C141.
- BISCHOFF, R. 1986. "Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture". *Dev. Biol.* **115**: 129-139.
- BOCCARD, R. 1982. "Relationship between muscle hypertrophy and the composition of skeletal muscles". In *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, vol.16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Ménissier, Martinus Nijhoff, pp 148-161.
- BOGDANOVICH, S., KRAG, T.O., BARTON, E.R., MORRIS, L.D., WHITTEMORE, L.A., AHIMA, R.S., KHURANA, T.S. 2002. "Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade". *Nature* **420**: 418-421.
- BRADLEY, A., EVANS, M., KAUFMAN, M.H., ROBERTSON, E. 1984. "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines". *Nature* **309**: 255-256.
- BRANDON, E.P., IDZERDA, R.L., MCKNIGHT, G.S. 1995a. "Targeting the mouse genome: a compendium of knockouts (part I)". *Curr. Biol.* **5**: 625-634. 1625-1634.
- BRANDON, E.P., IDZERDA, R.L., MCKNIGHT, G.S. 1995b. "Targeting the mouse genome: a compendium of knockouts (part II)". *Curr. Biol.* **5**: 758-765. 1758-1765.
- BRANDON, E.P., IDZERDA, R.L., MCKNIGHT, G.S. 1995c. "Targeting the mouse genome: a compendium of knockouts (part III)". *Curr. Biol.* **5**: 873-881. 1873-1881.
- BROCARD, J., FEIL, R., CHAMBON, P., METZGER, D. 1998. "A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor". *Nucleic Acids Res.* **26**: 4086-4090.
- BRÜNING, J.C., MICHAEL, M.D., WINNAY, J.N., HAYASHI, T., HÖRSCH, D., ACCILI, D., GOODYEAR, L.J., KAHN, CR. 1998. "A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance". *Mol. Cell* **2**: 559-569.
- BRUNNER, A.M., LIOUBIN, M.N., MARQUARDT, H., MALACKO, A.R., WANG, W.C., SHAPIRO, R.A., NEUBAUER, M., COOK, J., MADISEN, L., PURCHIO, A.F. 1992. "Site-directed mutagenesis of glycosylation sites in the transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) and TGF beta 2 (414) precursors and of cysteine residues within mature TGF beta 1: effects on secretion and bioactivity". *Mol. Endocrinol.* **6**: 1691-1700.
- BUCHHOLZ, F., ANGRAND, P.-O., STEWART, A.F. 1996. "A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs". *Nucleic Acids Res.* **15**: 3118-3119.
- BUCHHOLZ, F., ANGRAND, P.-O., STEWART, A.F. 1998. "Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis" *Nat. Biotechnol.* **16**: 657-662.

- BUNTING, M., BERNSTEIN, K.E., GREER, J.M., CAPECCHI, M., THOMAS, K.R. 1999. "Targeting genes for self-excision in the germ line". *Genes, Dev.* **13**: 1524-1528.
- CAÑÓN, J., GUTIÉRREZ, J.P., DUNNER, S., GARCÍA-ATANCE, P., GOYACHE, F., VILLA, A. Y ALONSO, L. 1996. "Principales aspectos del programa de mejora genética de la raza Asturiana de los Valles". *ITEA* **92A** n° 3: 75-91.
- CAPPUCIO, 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.
- CARLSON, C.J., BOOTH, F.W., GORDON, S. 1999. "Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading". *Am. J. Physiol.* **277**: R601-R606.
- CHARLIER, C., COPPIETERS, W., FARNIR, F., GROBET, L., LEROY, P.L., MICHAUX, C., MNI, M. SCHWERS, A., VANMANSHOVEN, P., HANSET, R., GEORGES, M. 1995. "The *mh* gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2". *Mamm. Genome* **6**: 788-792.
- CHEN, R-H., EBNER, R., DERYNCK, R. 1993. "Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF β activities". *Science* **260**: 1335- 1338.
- CHIEN, C.T., BARTEL, P.L., STERNGLANZ, R., FIELD, S. 1991. "The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9578-9582.
- CHO, T.J., GERSTENFELD, L.C., EINHORN, T.A. 2002. "Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing". *J. Bone Miner. Res.* **17**: 513-520.
- CORNELISON, D.D.W., OLWIN, B.B., RUDNICKI, M.A., WOLD, B.J. 2000. "MyoD^{-/-} satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient". *Dev. Biology* **224**: 122-137.
- COSSU, G., BORELLO, U. 1999. "Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals". *EMBO J.* **18**: 6867-6872.
- CROSIER, A.E., FARIN, C.E., RODRIGUEZ, K.F., BLONDIN, P., ALEXANDER, J.E., FARIN, P.W. 2002. "Development of skeletal muscle and expression of candidate genes in bovine fetuses from embryos produced in vivo or in vitro". *Biol. Reprod.* **67**: 401-408.
- DATTO, M.B., BASSING, C.H., XIAO-FAN, W. 1996. "The TGF β receptors and signaling pathways". In *Growth factors and cytokines in health and disease*. Ed. Jai Press Inc., Greenwich, Connecticut, pp 395-432.
- DECHIARA, T.M., EFSTRATIADIS, A., ROBERTSON, E.J. 1990. "A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting". *Nature* **345**: 78-80.
- DENNIS, P.A., RIFKIN, D.B. 1991. "Cellular activation of latent transforming growth factor β requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 580-581.

- DISANTO, J.P., MÜLLER, W., GUY-GRAND, D., FISCHER, A., RAJEWSKY, K. 1995. "Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin-2 receptor gamma chain". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 377-381.
- DOETSCHMAN, T., GREGG, R.G., MAEDA, N., HOOPER, M.L., MELTON, D.W., THOMPSON, S., SMITHIES, O. 1987. "Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells". *Nature* **330**: 576-578.
- DONOVIEL, D.B., SHIELD, M.A., BUSKIN, J.N., HAUGEN, H.S., CLEGG, C.H., HAUSCHKA, S.D. 1996. "Analysis of muscle creatine kinase gene regulatory elements in skeletal and cardiac muscles of transgenic mice". *Mol. Cell Biol.* **16**: 1649-1658.
- DUBOIS, C.M., LAPRISE, M.H., BLANCHETTE, F., GENTRY, L.E., LEDUC, R. 1995. "Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase". *J. Biol. Chem.* **270**: 10618-10624.
- DUMONT, B.L. 1982. "Carcass composition and muscle structure in hypertrophied animals". In *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, vol.16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Ménissier, Martinus Nijhoff, pp 111-133.
- DUNNER, S., CHARLIER, C., FARNIR, F., BROUWERS, B., CANON, J., GEORGES, M. 1997. "Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: double-muscling in the Asturiana de los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed". *Mamm. Genome* **8**: 430-435.
- DURIS, M.P., RENAND, G., PICARD, B. 1999. "Genetic variability of foetal bovine myoblasts in primary culture". *Histochem. J.* **12**: 753-760.
- EGASHIRA, K. 2003. "Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1". *Hypertension* **41**: 834-841.
- EMERSON, C.P. 1993. "Skeletal myogenesis: genetics and embryology to the fore". *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**: 265-274.
- EVANS, M.J., KAUFMAN, M.H. 1981. "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos". *Nature* **292**: 154-156.
- FAGAN R, FLINT KJ, JONES N. 1994. "Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein". *Cell* **78**:799-811.
- FARZAN, M., CHOE, H., DESJARDINS, E., SUN, Y., KUHN, J., CAO, J., ARCHAMBAULT, D., KOLCHINSKY, P., KOCH, M., WYATT, R., SODROSKI, J. 1998. "Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain". *J. Virol.* **72**: 7620-7625.
- FIELDS, S., SONG, O. 1989. "A novel genetic system to detect protein-protein interactions". *Nature* **340**: 245-246.
- FEIL, R., BROCARD, J., MASCREZ, B., LEMEURE, M., METZGER, D., CHAMBON, P. 1996. "Ligand-activated site-specific recombination in mice". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10887-10890.

- FENG, X.-H.; DERYNCK, R. 2001. Mammalian two-hybrid assays. Analyzing protein-protein interactions in transforming growth factor- β signaling pathway. In *Methods of Molecular Biology*; MacDonald, P.N., Ed.; Humana Press Inc., Totowa, NJ,; 177: 221-239.
- FERRELL, R.E., CONTE, V., LAWRENCE, E.C., ROTH, S.M., HAGBERG, J.M., HURLEY, B.F. 1999. "Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes". *Genomics* **62**: 203-207.
- FIERING, S., EPNER, E., ROBINSON, K., ZHUANG, Y., TELLING, A., HU, M., MARTIN, D.I., ENVER, T., LEY, T.J., GROUDINE, M. 1995. "Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus". *Genes Dev.* **9**: 2203- 2213.
- FOLGER, K.R., WONG, E.A., WAHL, G., CAPECCHI, M.R. 1982. "Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules". *Mol. Cell. Biol.* **2** : 1372-1387.
- FROHMAN, M.A., MARTIN, G.R. 1989. "Cut, paste, and save: new approaches to altering specific genes in mice". *Cell* **56**: 145-147.
- FUKUSHIGE, S., SAUER, B. 1992. "Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7905- 7909.
- GALLAGHER, S. 1997. "Analysis of proteins. Unit 10.2A". *Current Protocols in Molecular Biology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- GALLAGHER, S., WINSTON, S.E., FULLER, S.A., HURRELL, J.G.R. 1997. "Analysis of proteins. Unit 10.8". *Current Protocols in Molecular Biology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- GAMER, L.W., WOLFMAN, N.M., CELESTE, A.J., HATTERSLEY, G., HEWICK, R., ROSEN, V. 1999. "A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos". *Dev. Biol.* **208**: 222-232.
- GERRARD, D.E., JUDGE, M.D. 1993. "Induction of myoblast proliferation in L6 myoblast cultures by fetal serum of double-muscle and normal cattle". *J. Anim. Sci.* **71**: 1464-1470.
- GHOSH, A.K., MAJUMDER, M., STEELE, R., YACIUK, P., CHRIVIA, J., RAY, R., RAY, R. B. 2000. "Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP". *J. Biol. Chem.* **275**:7184- 7188.
- GIL, M., SERRA, X., GISPERT, M., OLIVER, M.A., SAÑUDO, C., PANEA, P., OLLETA, J.L., CAMPO, M., OLIVÁN, M., OSORO, K., GARCÍA-CACHÁN, M.D., CRUZ-SAGREDO, R., IZQUIERDO, M., ESPEJO, M., MARTÍN, M., PIEDRAFITA, J. 2001. "The effect of breed-production systems on the myosin heavy chain 1, the biochemical characteristics and the colour variables of *longissimus thoracis* from seven Spanish beef cattle breeds". *Meat Science* **58**: 181-188.
- GINZINGER, D.G. 2002. "Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream" *Exp. Hematology* **30**: 503- 512.

-
- GLEIZES, P.E., MUNGER, J.S., NUNES, I., HARPEL, J.G., MAZZIERI, R., NOGUERA, I., RIFKIN, D.B. 1997. "TGF β latency: biological significance and mechanisms of activation". *Stem Cells* **15**: 190-197.
- GONZÁLEZ-CADAVID, N.F., TAYLOR, W.E., YARASHESKI, K., SINHA-HIKIM, I., MA, K., EZZAT, S., SHEN, R., LALANI, R., ASA, S., MAMITA, M., NAIR, G., ARVER, S., BHASIN, S. 1998. "Organization of the human myostatin gene expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14938-14943.
- GOODMAN, M.F. 2002. "Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes" *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 17- 50.
- GOSSLER, A., DOETSCHMAN, T., KORN, R., SERFLING, E., KEMLER, R. 1986. "Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9065-9069.
- GROBET, L., ROYO, L., PONCELET, D., PIROTTIN, D., BROUWERS, B., RIQUET, J., SCHOEBERLAIN, A., DUNNER, S., MÉNISSIER, F., MASABANDA, J., FRIES, R., HANSET, R., GEORGES, M. 1997. "A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling 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.
- GROBET, L., PIROTTIN, D., FARNIR, F., PONCELET, D., ROYO, L.J., BROUWERS, B., CHRISTIANS, E., DESCHMECHT, D., COIGNOUL, F., KAHN, R., GEORGES, M. 2003. "Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene". *Genesis* **35**: 227- 238.
- GU, H., ZOU, Y.R. AND RAJEWSKY, K. 1993. "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting". *Cell* **73**: 1155-1164.
- GU, H., MARTH, J.D., ORBAN, P.C., MOSSMANN, H. AND RAJEWSKY, K. 1994. "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting". *Science* **265**: 103-106.
- HAMILTON, S.C., FARCHAUS, J.W., DAVIS, M.C. 2001. "DNA polymerases as engines for biotechnology". *BioTechniques* **31**: 370-383.
- HAMRICK, M.W., MCPHERRON, A.C., LOVEJOY, C.O. 2002. "Bone mineral content and density in the humerus of adult myostatin-deficient mice". *Calcif. Tissue Intl.* **71**: 63-68.
- HAMRICK, M.W. 2003. "Increased bone mineral density in the femora of GDF8 knockout mice". *Anat. Rec.* **272 A**: 388-391.
- HAMRICK, MW., PENNINGTON, C., BYRON, C.D. 2003. "Bone architecture and disc degeneration in the lumbar spine of mice lacking GDF-8 (myostatin)". *J. Orthop. Res.* **21**: 1025-1032.
- HANDEL, S.E., STICKLAND, N.C. 1987. "Muscle cellularity and birth weight". *Anim. Prod.* **44**: 311-317.

- HANSET, R., MICHAUX, C., DESSY-DOIZE, C., BURTONBOY, G. 1982. "Studies on the 7th rib in double muscled and conventional cattle". In Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, vol.16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Ménissier, Martinus Nijhoff, pp 341-349.
- HANSET, R., MICHAUX, C. 1985a. "On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. 1/Experimental data". *Génétique Sélection Evolution* **17**: 359-368.
- HANSET, R., MICHAUX, C. 1985b. "On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. 2/Population data". *Génétique Sélection Evolution* **17**: 369-386.
- HAWLEY, S.H., WUNNENBERG-STAPLETON, K., HASHIMOTO, C., LAURENT, M.N., WATABE, T., BLUMBERG, B.W., CHO, K.W. 1995. "Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction". *Genes Dev.* **9**: 2923-2935.
- HEINEMEYER, T., CHEN, X., KARAS, H., KEL, A.E., LIEBICH, I., MEINHARDT, T., REUTER, I., SCHACHERER, F., WINGENDER, E. 1999. "Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulator molecular mechanisms". *Nucleic Acids Res.* **27**: 318-322.
- HELDIN, C.-H., MIYAZONO, K., TEN DIJKE, P. 1997. "TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins". *Nature* **390**: 465-471.
- HENNET, T., HAGEN, F.K., TABAK, L.A., MARTH, J.D. 1995. "T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination". *Proc. Natl. Acad. USA* **92**: 12070-12074.
- HERSKOWITZ, I. 1987. "Functional inactivation of genes by dominant negative mutations". *Nature* **329**: 219- 222.
- HILL, J.J., DAVIES, M.V., PEARSON, A.A., WANG, J.H., HEWICK, R.M., WOLFMAN, N.M., QIU, Y. 2002. "The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum". *J. Biol. Chem.* **277**: 40735- 40741.
- HILL, J.J., QIU, Y., HEWICK, R.M., WOLFMAN, N.M. 2003. "Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains". *Mol. Endocrinol.* **17**:1144-1154.
- HINCK, A.P., ARCHER, S.J., QIAN, S.W., ROBERTS, A.B, SPORN, M.B., WEATHERBEE, J.A., TSANG, M.L., LUCAS, R., ZHANG, B.L., WENKER, J., TORCHIA, D.A. 1996. "Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2". *Biochemistry* **35**: 8517-8534.
- 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.
- HO, M.-W., RYAN, A., CUMMINS, J. 1999. "Cauliflower mosaic viral promoter – A recipe for disaster?". *Micr. Ecol. Health Disease* **11**: 194- 197.
- HOESS, R., WIERZBICKI, A., ABREMSKI, K. 1985. "Formation of small circular DNA molecules via an *in vitro* site-specific recombination system". *Gene* **40**: 325-329.

- HOGAN, B., BEDDINGTON, R., CONSTANTINI, F., LACY, E. 1994. "Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. USA.
- HSUAN, J.J. 1989. "Transforming growth factors β ". *British Medical Bulletin* **45**: 425-437.
- HUET, C., LI, Z.-F., LIU, H.-Z., BLACK, R.A., GALLIANO, M.-F., ENGVALL, E. 2001. "Skeletal muscle cell hypertrophy induced by inhibitors of metalloproteases; myostatin as a potential mediator". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**: C1624- C1634.
- IVEY, F.M., ROTH, S.M., FERRELL, R.E., TRACY, B.L., LEMMER, J.T., HURBULT, D.E., MARTEL, G.F., SIEGEL, E.L., FOZARD, J.L., JEFFREY METTER, E., FLEG, J.L., HURLEY, B. 2000. "Effects of age, gender and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training". *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **11**: M641-M648.
- JAMI, J., RITZ, E. 1974. "Multipotentiality of single cells of transplantable teratocarcinomas derived from mouse embryo grafts". *J. Natl. Cancer Inst.* **52**: 1547-1552.
- JEANPLONG, F., SHARMA, M., SOMERS, W. G., BASS, J.J., KAMBADUR, R. 2001. "Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene". *Mol. Cell. Biochemistry* **220**: 31-37.
- JEANPLONG, F., BASS, J.J., SMITH, H.K., KIRK, S.P., KAMBADUR, R., SHARMA, M., OLDHAM, J.M. 2003. "Prolonged underfeeding of sheep increases myostatin and myogenic regulatory factor Myf-5 in skeletal muscle while IGF-I and myogenin are repressed". *J. Endocrinol.* **176**: 425- 437.
- JI, S., LOSINSKI, R.L., CORNELIUS, S.G., FRANK, G.R., WILLIS, G.M., GERRARD, D.E., DEPREUX, F.F., SPURLOCK, M.E. 1998. "Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation". *Am. J. Physiol.* **275**: R1265- R1273.
- JIN, H.J., DUNN, M.A., BORTHAKUR, D., KIM, Y.S. 2004. "Refolding and purification of unprocessed porcine myostatin expressed in *Escherichia coli*". *Protein Expr. Purif.* **35**: 1-10.
- JOHNSON, R.S., SHENG, M., GREENBERG, M.E., KOLODNER, R.D., PAPAIOANNOU, V.E., SPIEGELMAN, B.M. 1989. "Targeting of nonexpressed genes in embryonic stem cells via homologous recombination". *Science* **245**: 1234-1236.
- JOULIA, D., BERNARDI, H., GARANDEL, V., RABENOEIANA, F., VERNUS, B., CABELLO, G. 2003. "Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin". *Exp. Cell Res.* **286**: 263-275.
- KAMBADUR, R., SHARMA, M., SMITH, T., BASS, J. 1997. "Mutations in myostatin (GDF8) in Double-Muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle". *Genome Res.* **7**: 910-915.
- KANO, M., IGARASHI, H., SAITO, I., MASUDA, M. 1998. "Cre-loxP-mediated DNA flip-flop in mammalian cells leading to alternate expression of retrovirally transduced genes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**: 806-11.
- KAWADA, S., TACHI, C., ISHII, N. 2001. "Content and localization of myostatin in mouse skeletal muscles during aging, mechanical unloading and reloading". *J. Muscle Res. Cell Motil.* **22**: 627-633.

-
- KELLENDONK, C., TRONCHE, F., MONAGHAN, A.-P., ANGRAND, P.-O., STEWART, F., SCHÜTZ, G. 1996. "Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486". *Nucleic Acids Res.* **24**: 1404-1411.
- KILBY, N.J., SNAITH, M.R., MURRAY, J.A.H. 1993. "Site-specific recombinases: tools for genome engineering". *Trends Genet.* **9**: 413-421.
- KIM, H.S., LIANG, L., DEAN, R.G., HAUSMAN, D.B., HARTZELL, D.L., BAILE, C.A. 2001. "Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**: 902-906.
- KIRK, S., OLDHAM, J., KAMBADUR, R., SHARMA, M., DOBBIE, P., BASS, J. 2000. "Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration". *J. Cell Physiol.* **184**: 356-363.
- KISHIMOTO, Y., LEE, K.H., ZON, L., HAMMERSCHMIDT, M., SCHULTE-MERKER, S. 1997. "The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning". *Development* **124**: 4457-4466.
- KMITA, M., KONDO, T., DUBOULE, D. 2000. "Targeted inversion of a polar silencer within the HoxD complex re-allocates domains of enhancer sharing". *Nat. Genet.* **26**: 451-454.
- KOCABAS, A.M., KUCUKTAS, H., DUNHAM, R.A., LIU, Z. 2002. "Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)". *Biochim. Biophys. Acta.* **1575**: 99-107.
- KOCAMIS, H., KIRKPATRICK-KELLER, D.C., RICHTER, J., KILLEFER, J. 1999. "The ontogeny of myostatin, follistatin and activin-B expression during chicken embryonic development". *Growth, Development and Aging* **63**: 143-150.
- KOLLER, B.H., MARRACK, P., KAPPLER, J.W., SMITHIES, O. 1990. "Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells". *Science* **248**: 1227-1230.
- KOZAK, M. 1987. "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs". *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125- 8148.
- KRYLOV, D., KASAI, K., ECHLIN, D.,R., TAPAROWSKY, E.J., ARNHEITER, H., VINSON, C. 1997. "A general method to design dominant negatives to B-HLHZip proteins that abolish DNA binding". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12274-12279.
- KÜHN, R., SCHWENK, F., AGUET, M., RAJEWSKY, K. 1995. "Inducible gene targeting in mice". *Science* **269**: 1427-1429.
- LAKSO, M., SAUER, B., MOSINGER, B. JR., LEE, E.J., MANNING, R.W., YU, S.-H., MULDER, K.L., WESTPHAL, H. 1992. "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6232-6236.
- LALANI, R., BHASIN, S., BYHOWER, F., TARNUZZER, R., GRANT, M., SHEN, R., ASA, S., EZZAT, S., GONZÁLEZ-CADAVID, N.F. 2000. "Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight". *J. Endocrinol.* **167**: 417- 428.

-
- LAM, K.-P., RAJEWSKY, K. 1998. "Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre-induced change in B cell antigen receptor specificity *in vivo*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 13171-13175.
 - LANG, C.H., SILVIS, C., NYSTROM, G., FROST, R.A. 2001. "Regulation of myostatin by glucocorticoids after thermal injury". FASEB J. **15**:1807-1809.
 - LANGER, S.J., GHAFoori, A.P., BYRD, M., LEINWAND, L. 2002. "A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites". Nucleic Acids. Res. **30**: 3067- 3077.
 - LANGLEY, B., THOMAS, M., BISHOP, A., SHARMA, M., GILMOUR, S., KAMBADUR, R. 2002. "Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression". J. Biol. Chem. **277**: 49831-49840.
 - LANGLEY, B., THOMAS, M., MCFARLANE, C., GILMOUR, S., SHARMA, M., KAMBADUR, R. 2004. "Myostatin inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation through an Rb-independent pathway". Oncogene **23**: 524-534.
 - LAVÍN, S. 1964. "La raza Asturiana de los Valles como productora de carne". Noticias Neosan **122**: 61-87.
 - LEE, S.J., MCPHERRON A.C. 1999. " Myostatin and the control of skeletal muscle mass". Curr. Opin. Genet. Dev. **9**: 604-607
 - LEE, S.J., MCPHERRON A.C. 2001. "Regulation of myostatin activity and muscle growth". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **16**: 9306-9311.
 - LEWADOSKI, M., MARTIN, G.R. 1997. "Cre-mediated chromosome loss in mice". Nat. Genetics **17**: 223-225.
 - LI, Z., MERICKSKAY, M., AGBULUT, O., BUTLER-BROWNE, G., CARLSSON, L., THORNELL, L.E., BABINET, C., PAULIN, D. 1997. "Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle". J. Cell Biol. **139**: 129-144.
 - LIN, J., ARNOLD, H.B., DELLA-FERA, M.A., AAZAIN, M.J., HARTZELL, D.L., BAILE, C.A. 2002. "Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis". Biochem. Biophys. Res. Commun. **291**: 701-706.
 - LYONS, G.E., MUHLEBACH, S., MOSER, A., MASOOD, R., PATERSON, B.M., BUCKINGHAM, M.E., PERRIARD, J.C. 1991. "Developmental regulation of creatine kinase gene expression by myogenic factors in embryonic mouse and chick skeletal muscle". Development. **113**:1017-1029.
 - LOPEZ, A.R., COOK, J., DEININGER, P.L., DERYNCK, R. 1992. "Dominant negative mutants of transforming growth factor-beta 1 inhibit the secretion of different transforming growth factor-beta isoforms". Mol. Cell Biol. **12**: 1674-1679.
 - LÓPEZ DE TORRE, G., HERNÁNDEZ, J.B. 1982. "Double muscled carácter in Spanish breeds of cattle". In Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, vol.16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Ménissier, Martinus Nijhoff, pp 471-479.

- MA, K., MALLIDIS, C., ARTAZA, J., TAYLOR, W., GONZALEZ-CADAVID, N., BHASIN, S. 2001. "Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**: E1128-E1136.
- MA, K., MALLIDIS, C., BHASIN, S., MAHABADI, V., ARTAZA, J., GÓZALES-CADAVID, N., ARIAS, J., SALEHIAN, B. 2003. "Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expresión". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**: E363-E371.
- MACCATROZZO, L., BARGELLONI, L., CARDAZZO, B., RIZZO, G., PATARNELLO, T. 2001. "A novel second myostatin gene is present in teleost fish". *FEBS Letters* **509**: 36-40.
- MACK, A., SAUER, B., ABREMSKI, K., HOESS, R. 1992. "Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site". *Nucleic Acids Res.* **20**: 4451-4455.
- MANSOUR, S.L., THOMAS, K.R., CAPECCHI, M.R. 1988. "Disruption of the proto-oncogen *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes". *Nature* **336**: 348-352.
- MARTIN, G.R. 1981. "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 7634-7638.
- MARUYAMA, I.N., RAKOV, T.L., MARUYAMA, H.I. 1995. "cRACE: a simple method for identification of the 5' ends of mRNAs". *Nucleic Acids Research*, **23**: 3796-3797.
- MASSAGUÉ, J. 1998. "TGF- β Signal Transduction". *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 753-791.
- MASSAGUÉ, J., CHEN, Y-G. 2000. "Controlling TGF β signaling". *Genes Dev.* **14**: 627-644.
- MATSUSHITA, A., MISAWA, H., ANDOH, S., NATSUME, H., NISHIYAMA, K., SASAKI, S., NAKAMURA, H. 2000. "Very strong correlation between dominant negative activities of mutant thyroid hormone receptors and their binding avidity for corepressor SMRT". *J. Endocrinol.* **167**: 493-503.
- MCCROSKERY, S., THOMAS, M., MAXWELL, L., SHARMA, M., KAMBADUR, R. 2003. "Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal" *J. Cell Biol.* **162**: 1135-1147.
- MCMAHON, C.D., POPOVIC, L., OLDHAM, J.M., JEANPLONG, F., SMITH, H.K., KAMBADUR, R., SHARMA, M., MAXWELL, L., BASS, J.J. 2003. "Myostatin deficient (*Mstn*^{-/-}) mice lose more skeletal muscle mass than wild-type controls during hind limb suspension". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**: E82-E87.
- MCPHERRON, A.C., LAWLER, A.M., LEE, S.-J. 1997. "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF β superfamily member". *Nature* **387**: 83-90.
- MCPHERRON, A.C., LAWLER, A.M., LEE, S.-J. 1999. "Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11". *Nature Genetics* **22**: 260-264.

-
- MCPHERRON, A.C., LEE, S.-J. 1996. "The transforming growth factor β superfamily". In Growth factors and cytokines in health and disease. Ed. Jai Press Inc., Greenwich, Connecticut, pp 357-394.
- MCPHERRON, A.C., LEE, S.-J. 1997. "Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 12457-12461.
- MCPHERRON, A.C., LEE, S.J. 2002. "Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice". J. Clin. Invest. **109**: 595-601.
- MÉNISSIER, F. 1982a. "General survey of the effect of double muscling on cattle performance". In Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, vol.16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Méniissier, Martinus Nijhoff, pp 23-53.
- MÉNISSIER, F. 1982b. "Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle". In Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, vol.16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Méniissier, Martinus Nijhoff, pp 387-428.
- METZGER, D., CHAMBON, P. 2001. "Site- and time-specific gene targeting in the mouse". Methods **24**: 71- 80.
- MICHAELS, J.-E., SCHIMMEL, P., SHIBA, K., MILLER, W.T. 1996. "Dominant negative inhibition by fragments of a monomeric enzyme". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14452-14455.
- MILLS, A.A., BRADLEY, A. 2001. "From mouse to man: generating megabase chromosome rearrangements". Trend Genet. **17**: 331-339.
- MIRANDA, M.E., CAÑÓN, J., MÉNISSIER, F., HANSET, R., WILLIAMS, J., DUNNER, S. 2001. "Identificación de los diferentes haplotipos del gen de la miostatina en razas bovinas europeas". ITEA. IX Jornadas sobre Producción Animal. Nº 22-Tomo I, pp 39-41.
- MIRANDA, M.E., DUNNER, S., AMIGUES, Y., BOSCHER, M.Y., BURGEOS-BOSSAERT, F., CAÑÓN, J., CORTÉS, O., GEORGES, M., GROBET, L., HANSET, R., MAUGRION, P., MÉNISSIER, F. 2000. "SNP screening at the MSTN gene level in European cattle breeds". Conference Abstract Book. 27th Int. Conference on Animal Genetics. ISAG. Pg. 93, DO61.
- MOLKENTIN, J.D., OLSON, E.N. 1996. "Defining the regulatory networks for muscle development". Curr. Opin. Genet. Dev. **6**: 445-453.
- MUSKAL, S.M., HOLBROOK, S.R., KIM, S.H. 1990. "Prediction of the disulfide-bonding state of cysteine in proteins". Protein Eng. **3**: 667-672.
- NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW-NEWERLY, W., RODER, J.C. 1993. "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**: 8424- 8428.
- NAKASHIMA, M., TOYONO, T., AKAMINE, A., JOYNER, A. 1999. "Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGF β superfamily during mouse embryogenesis". Mech. Development **80**: 185-189.

- NAREDO, M., BAJO, F. 1916. "El ganado bovino de Asturias. Memorias premiadas en el concurso de 1916 por la Asociación General de Ganaderos". Imprenta Alemana, Madrid (España), p.15.
- NICHOLAS, G., THOMAS, M., LANGLEY, B., SOMERS, W., PATEL, K., KEMP, C.F., SHARMA, M. KAMBADUR, R. 2002. "Titin-cap associates with, and regulates secretion of, myostatin". *J. Cell. Physiol.* **193**: 120-131.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. 1997. "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". *Prot. Engineering* **10**: 1-6.
- NISHI, M., YASUE, A., NISHIMATU, S., NOHNO, T., YAMAOKA, T., ITAKURA, M., MORIYAMA, K., OHUCHI, H., NOJI, S. 2002. "A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**: 247-251.
- OBERDOERFFER, P., OTIPOBY, K.L., MARUYAMA, M., RAJEWSKY, K. 2003. "Unidirectional Cre-mediated genetic inversion in mice using the *loxP* pair *lox66/lox71*". *Nucleic Acids Res.* **31**: e140.
- OGAWA, S., INOUE, S., ORIMO, A., HOSOI, T., OUCHI, Y., MURAMATSU, M. 1998. "Cross-inhibition of both estrogen receptor α and β pathways by each dominant negative mutant". *FEBS Letters* **423**: 129-132.
- OLDHAM, J.M., MARTYN, J.A.K., SHARMA, M., JEANPLONG, F., KAMBADUR, R., BASS, J.J. 2001. "Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscléd than normal cattle fetuses". *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **280**: R1488-R1493.
- OLIVER, S., BUBLEY, G., CRUMPACKER, C. 1985. "Inhibition of HSV-transformed murine cells by nucleoside analogs, 2'-NDG and 2'-nor-cGMP: mechanisms of inhibition and reversal by exogenous nucleosides". *Virology* **145**: 84-93.
- ONOUCHI, H., YOKOI, K., MACHIDA, C., MATSUZAKI, H., OSHIMA, Y., MATSUOKA, K., NAKAMURA, K., MACHIDA, Y. 1991. "Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells". *Nucleic Acids Res.* **23**: 6373-6378.
- ORBAN, P.C., CHUI, D., MARTH, J.D. 1992. "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6861-6865.
- OSADA, S.-I., WRIGHT, C.V.E. 1999. "Xenopus nodal-related signaling is essential for mesendodermal patterning during early embryogenesis". *Development* **126**: 3229-3240.
- OURY, C., TOTH-ZSAMBOKI, E., VAN GEET, C., THYS, C., WEI, L., NILIUS, B., VERMYLEN, J., HOYLAERTS, M.F. 2000. "A natural dominant negative P2X1 receptor due to deletion of a single amino acid residue". *J. Biol. Chem.* **275**: 22611-22614.
- PEABODY, D.S. 2003. "A Viral Platform for Chemical Modification and Multivalent Display". *J. Nanobiotechnology.* **1**: 5.
- PICCARD, B., DEPREEUX, F., GEAY, Y. 1998. "Muscle differentiation of normal and double-muscléd bovine foetal myoblasts in primary culture". *Basic Appl. Myol.* **8**: 197- 203.

-
- PIEK, E., HELDIN, C.-H., TEN DIJKE, P. 1999. "Specificity, diversity and regulation in TGF- β superfamily signaling". *FASEB J.* **13**: 2105-2124.
- POWELL, S.E., ABERLE, E.D. 1980. "Effects of birth weight on growth and carcass composition of swine". *J. Anim. Sci.* **50**: 860-868.
- QIAN, S.W., BURMESTER, J.K., TSANG, M.L., WEATHERBEE, J.A., HINCK, A.P., OHLSEN, D.J., SPORN, M.B., ROBERTS, A.B. 1996. "Binding affinity of transforming growth factor-beta for its type II receptor is determined by the C-terminal region of the molecule". *J. Biol. Chem.* **271**: 30656-30662.
- RADAELLI, G., ROWLERSON, A., MASCARELLO, F., PATRUNO, M., FUNKENSTEIN, B. 2003. "Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study". *Cell Tissue Res.* **311**:239-250.
- RAJEWSKY, K., GU, H., KÜHN, R., BETZ, U.A.K., MÜLLER, W., ROES, J., SCHWENK, F. 1996. "Conditional gene targeting" *J. Clin. Invest.* **98**: 600- 603.
- RAMÍREZ-SOLÍS, R., RIVERA-PÉREZ, J., WALLACE, J.D., WIMS, M., ZHENG, H., BRADLEY, A. 1992. "Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples". *Anal. Biochem.* **201**: 331-335.
- REARDON, K.A., DAVIS, J., KAPSA, R.M., CHOONG, P. BYRNE, E. 2001. "Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy". *Muscle Nerve* **24**: 893-899.
- REBBAPRAGADA, A., BENCHABANE, H., WRANA, J.L., CELESTE, A.J., ATTISANO, L. 2003. "Myostatin signals through a transforming growth factor β -like signaling pathway to block adipogenesis". *Mol. Cel. Biol.* **23**: 7230- 7242.
- REED, K.C., MANN, D.A. 1985. "Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes". *Nucleic Acids Res.* **13**: 7207-7221.
- REISZ-PORSZASZ, S., BHASIN, S., ARTAZA, J.N., SHEN, R., SINHA-HIKIM, I., HOGUE, A., FIELDER, T.J., GONZALEZ-CADAVID, N.F. 2003. "Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**: E876- E888.
- RICAUD, S., VERNUS, B., DUCLOS, M., BERNARDI, H., RITVOS, O., CARNAC, G., BONNIEU, A. 2003. "Inhibition of autocrine secretion of myostatin enhances terminal differentiation in human rhabdomyosarcoma cells". *Oncogene* **22**: 8221-8232.
- RÍOS, R., CARNEIRO, I., ARCE, V.M., DEVESA, J. 2001. "Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**: 561-566.
- RÍOS, R., CARNEIRO, I., ARCE, V.M., DEVESA, J. 2002. "Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C993-C999.
- ROBERTS, S.B., GOETZ, F.W. 2001. "Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms". *FEBS Letters* **491**: 212-216.
- ROBERTSON, E.J. 1986. "Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line". *Trends Genet.* **2**: 9-13.

-
- ROBERTSON, E., BRADLEY, A., KUEHN, M., EVANS, M. 1986. "Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector". *Nature* **323**: 445-448.
- ROBERTSON, E.J. 1991. "Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line". *Biol. Reprod.* **44**: 238-245.
- ROYO MARTÍN, L.J. 2002. "Secuenciación y análisis del gen de la miostatina bovina". Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- SAKUMA, K., WATANABE, K., SANO, M., URAMOTO, I., TOTSUKA T. 2000. "Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles". *Biochim. Biophys. Acta.* **1497**: 77-88.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. "Molecular cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. USA.
- SÁNCHEZ BELDA, A. 1984. "Razas bovinas españolas". Publicaciones de extensión agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. P. 233
- SANTOLARIA, P., SAÑUDO, C., ALBERTÍ, P. Y CAMPO, M.M. 1997. "Estudio de la calidad organoléptica de la carne de añejo de siete razas españolas mediante una prueba de consumidores". *ITEA.* **93**: 89-97.
- SAÑUDO, C., CAMPO, M.M., PANEA, B., ALBERTÍ, P., DUNNER, S., GARCÍA-AGATANCE, P., SANTOLARIA, P., ROCHE, E., OSORO, K., OLIVÁS, M., GARCÍA, J., NOVAL, G. 1998. "Influence of double muscled condition on sensory beef meta quality at different ageing times". 44th ICoMST. **B132**: 760-761.
- SAÑUDO, C., ALBERTÍ, P., FRANCO, J., OLLETA, J.L., CAMPO, M.M., PANEA, B., LAHOZ, F., JAIME, J., PARDOS, J.J. Y TENA, R. 1999. "Calidad instrumental de la carne de siete razas bovinas españolas". *Eurocarne* **73**: 37-54.
- SCHLESINGER, M.J., LONDON, S.D., RYAN, C. 1993. "An in-frame insertion into the Sindbis virus 6K gene leads to defective proteolytic processing of the virus glycoproteins, a trans-dominant negative inhibition of normal virus formation, and interference in virus shut off of host-cell protein synthesis. *Virology.* **193**: 424-432.
- SCHULTE, J.N., YARASHESKI, K.E. 2001. "Effects of resistance training on the rate of muscle protein synthesis in frail elderly people". *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab. Suppl.* S111-S118.
- SCHWARTZBERG, P.L., GOFF, S.P., ROBERTSON, E.J. 1989. "Germ-line transmission of a *c-abl* mutation produced by targeted gene disruption in ES cells". *Science* **246**: 799-803.
- SEIBERT, M.J., XUE, Q.L., FRIED, L.P., WALSTON, J.D. 2001. "Polymorphic variation in the human myostatin (GDF-8) gene and association with strength measures in the Women's Health and Aging Study II cohort". *J. Am. Geriatr. Soc.* **8**: 1093-1096.
- SELBERT, S., BENTLEY, D.J., MELTON, D.W., RANNIE, D., LOURENCO, P., WATSON, C.J., CLARKE, A.R. 1998. "Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland". *Transgenic Res.* **7**: 387-396.

-
- SHARMA, M., KAMBADUR, R., MATTHEWS, K.G., SOMERS, W.G., DEVLIN, G.P., CONAGLEN, J.V., FOWKE, P.J., BASS J.J. 1999. "Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct". *J. Cell Physiol.* **180**: 1-9.
- SHARMA, M., LANGLEY, B., BASS, J., KAMBADUR, R. 2001. "Myostatin in muscle growth and repair". *Exerc. Sport Sci. Rev.* **29**: 155-158.
- SILLENCE, M.N. 2004. "Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock". *Vet. J.* **167**: 242-257.
- SMITH, A.G., HEATH, J.K., DONALDSON, D.D., WONG, G.G., MOREAU, J., STAHL, M., ROGERS, D. 1988. "Inhibition of pluripotential embryonic stem cells differentiation by purified polypeptides". *Nature* **336**: 688-690.
- SMITHIES, O., GREGG, R.G., BOGGS, S.S., KORALEWSKI, M.A. AND KUCHERLAPATI, R.S. 1985. "Insertion of DNA sequences into the chromosomal β -globin locus by homologous recombination". *Nature* **317**: 230-234.
- SOPEÑA, A., BLANCO, M.A. 1970. "El carácter "culón" en el ganado vacuno". *Zootecnia* **19**: 489-499.
- SPILLER, M.P., KAMBADUR, R., JEANPLONG, F., THOMAS, M., MARTYN, J.K., BASS, J.J., SHARMA, M. 2002. "The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD". *Mol. Cell Biol.* **22**:7066-7082.
- ST-ONGE, L., FURTH, P.A., GRUSS, P. 1996. "Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter". *Nucleic Acids Res.* **24**: 3875-3877.
- SUGIYAMA, H., NIWA, H., MAKINO, K., KAKUNAGA, T. 1988. "Strong transcriptional promoter in the 5' upstream region of the human beta-actin gene". *Gene* **65**:135-139.
- 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". *Mamm. Genome* **9**: 671-672.
- TACHEDJIAN, G., ARONSON, H.E., GOFF, S.P. 2000. "Analysis of mutations and suppressors affecting interactions between the subunits of the HIV type 1 reverse transcriptase". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**: 6334-6339.
- TAIPALE, J., KESKI-OJA, J. 1997. "Growth factors in the extracellular matrix". *FASEB J.* **11**: 51-59.
- TAIPALE, J., SAHARINEN, J., HEDMAN, K., KESKI-OJA, J. 1996. "Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils". *J. Histochem. Cytochem.* **44**: 875-889.
- TANIMOTO, K., LIU, Q., BUNGERT, J., ENGEL, J.D. 1999. "Effects of altered gene order or orientation of the locus control region on human β -globin gene expression in mice". *Nature* **398**: 344-347.

-
- 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, K.R., CAPECCHI, M.R. 1987. "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells". *Cell* **51**: 503-512.
- THOMAS, K.R., CAPECCHI, M.R. 1990. "Targeted disruption of the murine *int-1* proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development". *Nature* **346**: 847-850.
- THOMAS, K.R., FOLGER, K.R. AND CAPECCHI, M.R. 1986. "High Frequency Targeting of Genes to Specific Sites in the Mammalian Genome". *Cell* **44**: 419-428.
- 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.
- THOMPSON, S., CLARKE, A.R., POW, A.M. 1989. "Germ line Transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells". *Cell* **56**: 313- 321.
- TORRES, R.M., KÜHN, R. 1997. "Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting". Oxford University Press.
- TSENG, B.S., ZHAO, P., PATTISON, J.S., GORDON, S.E., GRANCHELLI, J.A., MADSEN, R.W., FOLK, L.C., HOFFMAN, E.P., BOOTH, F.W. 2002. "Regenerated mdx mouse skeletal muscle shows differential mRNA expression". *J. Appl. Physiol.* **93**: 537-545.
- TSIEN, J.Z., CHEN, D.F., GERBER, D., TOM, C., MERCER, D.J., ANDERSON, M., MAYFORD, M., KANDEL, E.R., TONEWAGA, S. 1996a. "Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain". *Cell* **87**: 1317-1326.
- TSIEN, J.Z., HUERTA, P.T., TONEGAWA, S. 1996b. "The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory". *Cell* **87**: 1327- 1338.
- UTOMO, A.R.H., NIKITIN, A.Y., LEE, W.-H. 1999. "Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice". *Nat. Biotechnol.* **17**: 1091-1096.
- VALLEJO, M., GUTIÉRREZ, J.P., CIMA, M., CAÑÓN, J., ALONSO, L., REVUELTA, J.R. Y GOYACHE, F. 1992. "Características de las canales de las razas bovinas asturianas. III.-Valoración cuantitativa y predicción de la composición tisular de canales en la raza Asturiana de los Valles". *Arch. Zootec.* **42**: 29-40.
- VISSAC, B. 1972. "L'hypertrophie musculaire d'origine génétique ou caractère culard". *Ann. Génét. Sél. Anim.* **4**: 87-97.
- WAGNER, K. R., MCPHERRON, A.C., WINIK, N., LEE, S.J. 2002. "Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice". *Ann. Neurol.* **52**: 832-836.
- WALSH, K., PERLMAN, H. 1997. "Cell cycle exit upon myogenic differentiation". *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 597-602.

-
- WANG, H., ZHANG, Q., ZHU, D. 2003. "hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**: 877-883.
 - WANG, Y., JAENISCH, R. 1997. "Myogenin can substitute for Myf5 in promoting myogenesis but less efficiently". *Development* **124**: 2507-2513.
 - WASSERMAN, W.W., FICKET, J.W. 1998. "Identification of regulatory regions which confer muscle-specific gene expression". *J. Mol. Biol.* **278**: 167-181.
 - WEHLING, M., CAI, B., TIDBALL, J.G. 2000. "Modulation of myostatin expression during modified muscle use". *FASEB J.* **14**: 103-110.
 - WELLE, S., BHATT, K., THORNTON, C. 2002. "Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men". *Exp. Gerontol.* **37**: 833-839.
 - WHITTEMORE, L-A., SONG, K., LI, X., AGHAJANIAN, J., DAVIES, M., GIRGENRATH, S., HILL, J.J., JALENAK, M., KELLEY, P., KNIGHT, A., MAYLOR, R., O'HARA, D., PEARSON, A., QUAZI, A., RYERSON, S., TAN, X-Y., TOMKINSON, K.N., VEDMAN, G.M., WIDOM, A., WRIGHT, J.F., WUDYKA, S., ZHAO, L., WOLFMAN, N.M. 2003. "Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**: 965-971.
 - WIGMORE, P.M., DUNGLISON, G.F. 1998. "The generation of fiber diversity during myogenesis". *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 117-125.
 - WILKIE, A.O. 1994. "The molecular basis of genetic dominance". *J. Med. Genet.* **31**: 89-98.
 - WILLIAMS, R.L., HILTON, D.J., PEASE, S., WILSON, T.A., STEWART, C.L., GEARING, D.P., WAGNER, E.F., METCALF, D., NICOLA, N.A., GOUGH, N.M. 1988. "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells". *Nature* **336**: 688-690.
 - WITTBRODT, J., ROSA, F.M. 1994. "Disruption of mesoderm and axis formation in fish by ectopic expression of activin variants: the role of maternal activin". *Genes Dev.* **8**: 1448-1462.
 - WOLFER, A., BAKKER, T., WILSON, A., NICOLAS, M., IOANNIDIS, V., LITTMAN, D.R., LEE, P.P., WILSON, C.B., HELD, W., MACDONALD, H.R. ET AL. 2001. "Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development". *Nature Immunol.* **2**: 235- 241.
 - WOLFMAN, N.M., MCPHERRON, A.C., PAPPANO, W.N., DAVIES, M.V., SONG, K., TOMKINSON, K.N., WRIGHT, J.F., ZHAO, L., SEBALD, S.M., GREENSPAN, D.S., LEE, S.-J. 2003. "Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 15842- 15846.
 - WOOD, S.A., ALLEN, N.D., ROSSANT, J., AUERBACH, A., NAGY, A. 1993. "Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras". *Nature* **365**: 87-89.

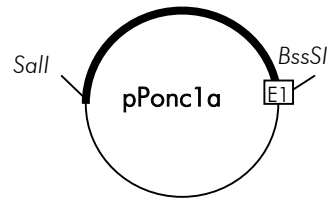
-
- XU, Z.L., MIZUGUCHI, H., ISHII-WATABE, A., UCHIDA, E., MAYUMI, T., HAYAKAWA, T. 2001. "Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors". *Gene*. **272**:149-156.
- YAFFE, D., SAXEL, O. 1977. "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle". *Nature* **270**: 725-727.
- YAMANOUCI, K., SOETA, C., NAITO, K., TOJO, H. 2000. "Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**: 510-516.
- YANG, J., RATOVITSKI, T., BRADY, J.P., SOLOMON, M.B., WELLES, K.D., WALL, R.J. 2001. "Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice". *Mol. Reprod. Develop.* **60**: 351-361.
- YARASHESKI, K.E., BHASIN, S., SINHA-HIKIM, I., PAK-LODUCA, J., GONZALEZ-CADAVID, N.F. 2002. "Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting". *J. Nutr. Health Aging*. **6**: 343-348.
- YUN, K., WOLD, B. 1996. "Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context". *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 877-889.
- ZACHWIEJA, J.J., SMITH, S.R., SINHA-HIKIM, I., GONZALEZ-CADAVID N, BHASIN S. 1999. "Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration". *J. Gravit. Physiol.* **6**: 11-15.
- ZHANG, Z., LUTZ, B. 2002. "Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein". *Nucleic Acids Res.* **30**: e90.
- ZHENG, B., SAGE, M., CAI, W.-W., THOMPSON, D.M., TAVSANLI, B.C., CHEAH, Y.-C., BRADLEY, A. 1999. "Engineering a mouse balancer chromosome". *Nat. genet.* **22**: 375-378.
- ZHU, X., HADZAY, M., WEHLING, M., TIDBALL, J.G., MCNALLY, E.M. 2000. "Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle". *FEBS Letters* **474**: 71-75.
- ZIJLSTRA, M., LI, E., SAJJADI, F., SUBRAMANI, S., JAENISCH, R. 1989. "Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells". *Nature* **342**: 435-438.
- ZIMMERS, T.A., DAVIES, M.V., KONIARIS, L.G., HAYNES, P., ESQUELA, A.F., TOMKINSON, K.N., MCPHERRON, A.C., WOLFMAN, N.M., LEE, S.J. 2002. "Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin". *Science* **296**:1486-1488.

APÉNDICE DE CONSTRUCCIONES

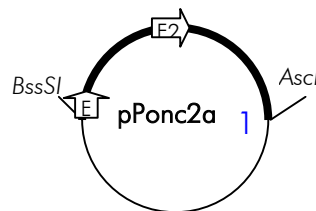
Apéndice de construcciones

A. Construcciones utilizadas en la evaluación de un sistema de activación condicional de la miostatina en células ES

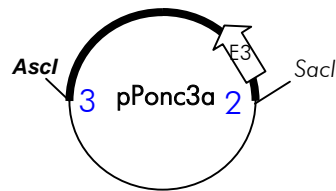
- **pPonc1a**: lleva inserto en pPonc1 el fragmento de 4339 pb resultante de la digestión *Sall*, *BssSI* del clon genómico de ratón en lambda.



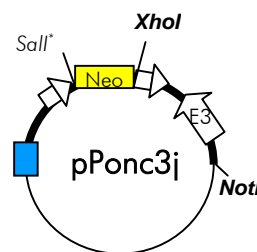
- **pPonc2a**: lleva inserto en pPonc1 el fragmento de 3901 pb resultante de la digestión *BssSI*, *Ascl* del clon genómico de ratón en lambda.



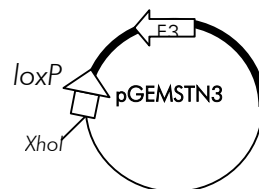
- **pPonc3a**: lleva inserto en pPonc1 el fragmento de 6042 pb resultante de la digestión *Ascl*, *Sacl* del clon genómico de ratón en lambda.



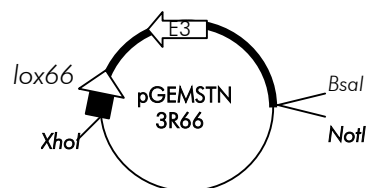
- **pPonc3j**: resultado de insertar los genes de resistencia HSV-TK y neomicín-transferasa (flanqueado por dos *loxP*) en pPonc3a.



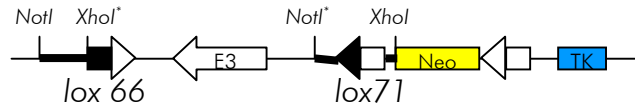
- **pGEMSTN3**: resultado de subclonar el fragmento *NotI-XhoI* de pPonc3j en pGEM[®]-11Zf(+).



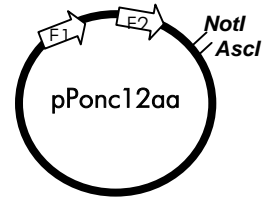
- **pGEMSTN3R66**: resultado de mutagenizar el *loxP* de pGEMSTN3 en *lox 66*.



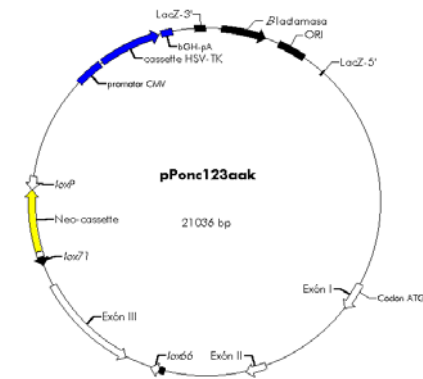
- **pPonc3k**: resultado de invertir el exón 3 en pPonc3j con ayuda de los adaptadores C y 6.



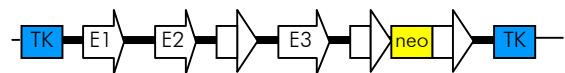
- **pPonc12aa**: resultado de ensamblar el fragmento portador de parte del exón 1 y el exón 2 (de pPonc2a) en pPonc1a.



- **pPonc123aak**: construcción definitiva utilizada en la creación de una línea "Mstn OFF to ON".



- **pPonc123bbj**: construcción control análoga a pPonc123aak pero con loxP en lugar de lox mutantes y un doble cassette TK.



- **pPonc123-Neo^S**: construcción resultado de escindir el cassette Neo de pPonc123aak.



- **pPonc2b3j-Neo^S**: construcción resultado de escindir el cassette Neo de pPonc123bbj y eliminar uno de los 2 cassettes TK.

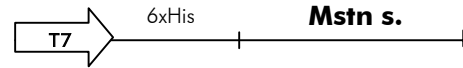


- **pSVlacZT**: construcción utilizada para comparar la eficacia del vector pMC-Cre.

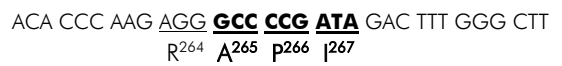


B. Construcciones utilizadas en la evaluación de la capacidad de interacción de distintos alelos de la miostatina potencialmente dominantes-negativos

- **pRSET/mstn s.**: construcción destinada a expresar miostatina salvaje unida a una secuencia de histidinas mediante la cual puede unirse a una resina de agarosa para su purificación.



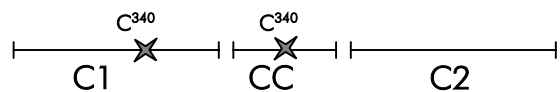
- **pSG5PL/ProtSite**: construcción destinada a expresar una variante de la miostatina en la que se han mutagenizado 3 de los 4 aminoácidos de la diana de proteólisis.



- **pSG5PL/Stop**: construcción destinada a expresar una variante de la miostatina en la que se han mutagenizado dos de los codones Stop.



- **pSG5PL/C340**: construcción destinada a expresar una variante de la miostatina en la que se ha introducido un fragmento de 66pb con una segunda cisteína intercatenaria.



- **BDmstn**: construcción destinada a expresar una miostatina salvaje de fusión en 3' del dominio de unión al ADN GAL4.



- **ADmstn**: construcción destinada a expresar una miostatina salvaje de fusión en 3' del dominio de activación VP16.



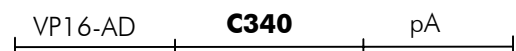
- **ADProtSite**: construcción destinada a expresar una miostatina-ProtSite de fusión en 3' del dominio de activación VP16.



- **ADStop**: construcción destinada a expresar una miostatina-Stop de fusión en 3' del dominio de activación VP16.



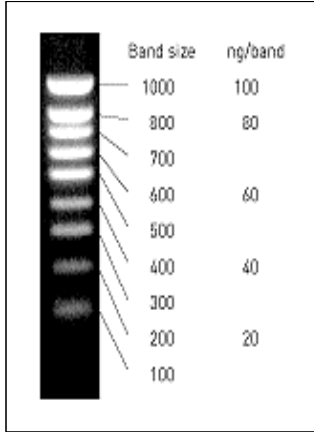
- **ADC340**: construcción destinada a expresar una miostatina-C340 de fusión en 3' del dominio de activación VP16.



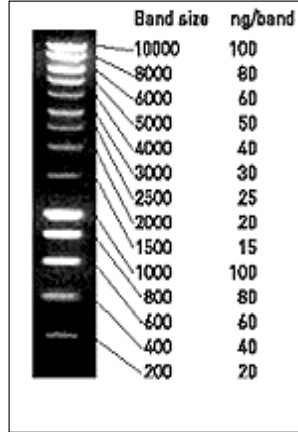
APÉNDICE DE MARCADORES

Marcadores de ADN

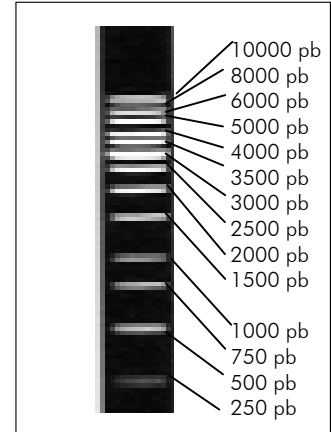
**100 bp-Smart Ladder
(Eurogentec)**



**1 kb-Smart Ladder
(Eurogentec)**

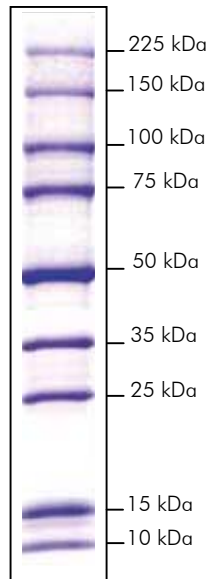


**1 kbp Ladder
(Biotools)**

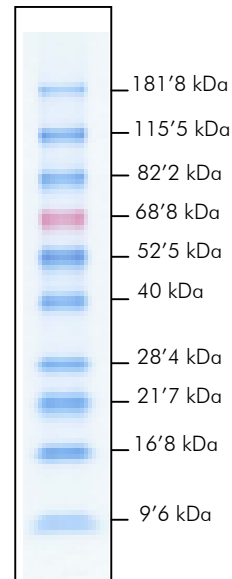


Marcadores de proteínas

**Perfect Protein Marker, 10-225 kDa
(Novagen)**



**BenchMark™ Prestained Protein
Ladder (Invitrogen)**



APÉNDICE DE REACTIVOS

Apéndice de reactivos**Acrilamida (SDS-PAGE)****Separating gel (14%):**

7 ml acrilamida 30%/ bisacrilamida 0'8%
 3'75 ml tampón TrisCl/SDS pH8'8 (1'5M Tris-Cl, 0'4% SDS)
 4'25 ml H₂O
 50 µl amonio persulfato 10%
 10 µl TEMED

Stacking gel:

0'65 ml acrilamida 30%/bisacrilamida 0'8%
 1'25 ml tampón TrisCl/SDS pH6'8 (0'5M Tris-Cl, 0'4% SDS)
 3'05 ml H₂O
 25 µl amonio persulfato 10%
 5 µl TEMED

Preparar fresco en el momento

DMEM-EF

DMEM (high glucose without sodium pyruvate; Gibco BRL)
 10% FBS (suero fetal bovino; Gibco BRL)
 1% piruvato sódico (Gibco BRL 100x)
 1% penicilina/estreptomicina (Gibco BRL 100x)
 Conservar a 4°C

DMEM-ES

DMEM (high glucose without sodium pyruvate; Gibco BRL)
 15% FBS (suero fetal bovino; Multicell, Wisent Inc.)
 1% piruvato sódico (Gibco BRL 100x)
 1% aminoácidos no esenciales (Gibco BRL 100x)
 1% penicilina/estreptomicina (Gibco BRL 100x)
 1% β-mercaptoetanol 10mM (dilución: 7 ml PBS+ 5 µl β-mercaptoetanol)
 0'01% LIF (Gibco) ó 0'4% LIF sobrenadante (ver más abajo)
 Conservar a 4°C

Ganciclovir (Cymevene^R, Roche)

Disolver 4'3 mg de ganciclovir en 80 µl de H₂O (0'2 M) → diluir 100x en DMEM-ES y filtrar (2 mM). Añadir al medio en una concentración final de 2 µM
 Preparar fresco cada día

Gelatina (Sigma, type A, from porcine skin)

Dilución madre en PBS al 1% , autoclavar. Se diluye al 0'1% como sustituto de las células feeder (se recubre la superficie del pocillo y se retira por aspiración tras 30' de reposo a temperatura ambiente).

LB+Amp (1l)

10g bactotripton

5g levadura

10g NaCl

→ pH 7 → autoclave → + 100µg ampicilina/ml

Conservar a 4°C una vez añadida la ampicilina

LB-agar

15g agar/l LB → autoclave → + 100µg ampicilina/ml

Conservar a 4°C una vez añadida la ampicilina

LIF

- Comercial: ESGRO™, Gibco. Concentración en cultivo: 0'01%

- Sobrenadante de cultivos: por transfección transitoria de células COS (fibroblastos de mono) con un plásmido de expresión (cedido por Catherine Ledent; Service Prof. Vassart, ULB) portador del gen de LIF; el sobrenadante se recoge dos días después de la electroporación, se filtra y se conserva a -80°C. Concentración en cultivo: 0'4%.

Conservar a -20°C

Mitomicina C (Sigma)

Añadir 2 ml de PBS estéril por alícuota (concentración final: 1 mg/ml)

Almacenar a -20°C. Utilizar en dilución 1:100.

P1 (tampón de resuspensión, miniprep)

10 mM EDTA

50 mM Tris-HCl, pH 8'0

100 µg/ml Rnasa A

Conservar a 4°C una vez añadida la RNasa A

P2 (tampón de lisis, miniprep)

200 mM NaOH

1% SDS

Conservar a temperatura ambiente

P3 (tampón de neutralización, miniprep)

3 M acetato potásico, llevar a pH 5'5 con ácido acético glacial

Conservar a 4°C

PBS

8g NaCl

0'2g KCl

1'44g Na₂HPO₄

0'24g KH₂PO₄

Llevar a 1 l con agua destilada y a pH 7'4

Solución de desteñido (geles Coomassie)

7% ácido acético

20% metanol

Conservar a temperatura ambiente

Solución de tinción azul de Coomassie

0'025% azul de Coomassie G-250

20% ácido acético

Conservar a temperatura ambiente

Solución de tinción X-Gal5 mM $K_3(Fe^{III}(CN)_6)$ 5 mM $K_4(Fe^{II}(CN)_6)$ 2 mM $MgCl_2$ 1 mg/ml X-Gal (5-bromo-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido)

Preparar fresco justo antes de la reacción de tinción

SSC 1x

0'15M NaCl

0'015M sodio citrato

Conservar a temperatura ambiente

TAE 1x

40 mM Tris-acetato

1mM EDTA pH 8'0

Conservar a temperatura ambiente

Tampón de carga SDS 2x (proteínas)

25 ml TrisCl/SDS pH6'8 (0'5M Tris-Cl, 0'4% SDS)

20 ml glycerol

4 g SDS

3'1 g DTT

1 mg azul de bromofenol

Llevar a 100 ml

Conservar a $-20^{\circ}C$ **Tampón de electroforesis de proteínas 5x**

0'125M Tris

0'96M glicina

0'5% SDS

Conservar a $4^{\circ}C$ **Tampón de electroporación 2x**

40 mM HEPES (Gibco BRL), pH 7

274 mM NaCl

10 mM KCl

1'4 mM Na_2HPO_4

12 mM glucosa
0'2 mM 2-β-mercaptoetanol (Sigma)
H₂O (Sigma, for embryological use)
Preparar fresco el día de la electroporación

Tampón de lisis (extracción de ADN de clones ES)

10 mM Tris-HCl, pH 7'5
10 mM EDTA
10 mM NaCl
→ autoclavar → + 0'5% sarkosil
Conservar a temperatura ambiente y añadir 100 µg/ml de proteinasa K (Roche) antes de usar

Tampón de lisis B desnaturalizante (extracción de proteínas)

100mM NaH₂PO₄
10mM TrisCl
8M urea
Ajustar a pH 8'0 con NaOH
Conservar a temperatura ambiente

Tampón de transferencia de proteínas

3'03 g TrisCl
14'4 g glicina
150 ml metanol
Llevar a un litro (añadir el metanol antes de usar)

TE1x

10 mM TrisHCl pH 7'5
1 mM EDTA pH 8'0
Conservar a temperatura ambiente