

Molekularne podstawy rozwoju mięśni

Danuta Cieślak

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
Jastrzębiec

1. Wstęp

W hodowli zwierząt ras mięsnych dąży się do uzyskania osobników o jak najlepszej wydajności rzeźnej. Wydawałoby się, że pojawienie się zwierząt o wybitnym umięśnieniu będzie uwieńczeniem pracy hodowlanej. Wymieńmy w tym miejscu chociażby bydło Chalorais, Belgijskie biało-niebieskie (BBN), świnię Pietrain, Belgijska Landrace, owce Chalorais i Rambouillet. Rasy te zawdzięczają swoją wysoką wartość użytkową albo hipertrofii (powiększenie średnicy włókna mięśniowego), albo hiperplazji (zwiększenie liczby włókien mięśniowych). Niestety, jak się okazało, korzystnym zmianom w umięśnieniu towarzyszą też inne zjawiska, czyniąc problem bardziej skomplikowany, niżby sobie życzyli hodowcy. W artykule tym zamierzamy przybliżyć genetyczne podłoże miogenezy i przedstawić obecny stan wiedzy na temat hipertrofii i hiperplazji mięśniowej (patrz też tab.1).

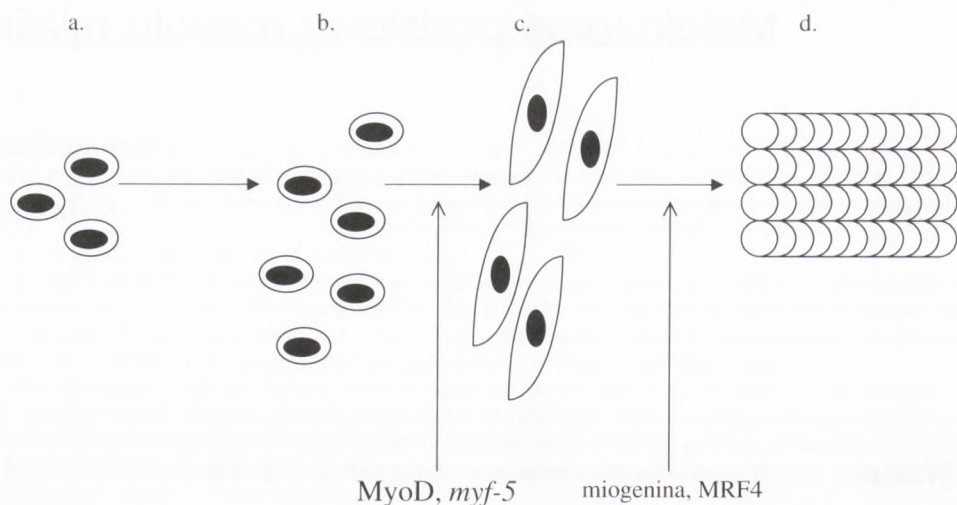
2. Rozwój włókien mięśniowych (miogeneza)

Mięśnie to narządy kurczliwe, pełniące funkcje ruchowe. Stanowią kompleks różnych typów komórek. Wśród nich dominują miocyty, składające się z włókienek mięśniowych i komórek satelitarnych. Towarzyszą im m.in. adipocyty międzymięśniowe, fibroblasty, komórki endotelium i neurocyty. Liczba włókienek mięśniowych w momencie urodzenia determinuje przyszłą zdolność mięśnia do rozrostu (1). W procesie miogenezy można wyodrębnić następujące etapy (rys. 1):

1) wyróżnicowanie się z mezodermy zarodkowej linii pierwotnych komórek mięśniowych (mioblastów). Komórki pierwotne dzielą się wielokrotnie mitotycznie, zanim przekształcą się w mioblasty;

2) migracja mioblastów do odpowiednich części ciała zarodka;

3) proliferacja mioblastów i komórek towarzyszących tkance mięśniowej. Pierwsze mioblasty dają początek wielojądrowym włókienkom, stanowiącym rusztowanie dla przyszłego mięśnia. Około 80% mięśni szkieletowych świni



Rys. 1. Schemat powstawania włókien mięśniowych. Pierwotne komórki mezodermy zarodkowej (a) dzielą się wielokrotnie mitotycznie (b), aż w końcu przekształcają się w mioblasty (c). Ten etap rozwoju kontrolowany jest przez *MyoD* i *myf-5*. Mioblasty ulegają następnie fuzji w wielojądrowe włókna mięśniowe (d) przy udziale miogeniny i *MRF4*. Utworzenie włókien mięśniowych jest jednoznaczne z nieodwracalnym przejściem do fazy G_0 cyklu komórkowego. W tym momencie rozpoczyna się transkrypcja wielu genów specyficznych dla tkanki mięśniowej.

pochodzi z późniejszych mioblastów, skupiających się wokół tego rusztowania (2);

4) końcowe różnicowanie (fuzja mioblastów), ekspresja i organizacja specyficznych produktów genowych, aktywnych tylko w dojrzałych komórkach mięśniowych;

5) utrzymanie stanu zróżnicowania włókien mięśniowych i ich modyfikacje w zależności od wieku i zmian fizjologicznych (1).

Zdeterminowana w rozwoju zarodkowym liczba włókien mięśniowych, utrzymuje się na stałym poziomie przez całe życie osobnika. Przyrost masy mięśniowej u zwierząt z hipertrofią wynika z postnatalnego zwiększenia przekroju poszczególnych włókien mięśniowych. Natomiast hiperplazja wynika ze zwiększenia liczby włókien mięśniowych w trakcie rozwoju prenatalnego. Dlatego manifestuje się ona już u noworodków.

3. Hiperplazja

Zaznaczono już, że liczba włókien mięśniowych jest zdeterminowana w rozwoju płodowym, a wystąpienie wyraźnie większej ich liczby nazywamy hiperplazją, lub bardziej zwyczajowo — podwójnym umięśnieniem. Wskutek hiperplazji masa tkanki mięśniowej u bydła może ulec nawet 20% zwiększeniu

(3). Poza niewatpliwymi korzyściami (zwiększenie masy mięśniowej, mięso chude, kruche), zjawisko to jest jednakże przyczyną trudnych porodów, wynikających ze znacznej wielkości płodów.

W badaniach przeprowadzonych na myszach dowiedziono, że brak pewnego białka z rodziny czynników wzrostowych TGF β (białko to nazwano później miostatyną), skutkuje zwiększeniem masy tkanki mięśniowej, w której normalnie białko to jest produkowane (4). Mutacja w genie miostatyny u bydła wywołuje podobny skutek i jest bezpośrednią przyczyną hiperplazji u tego gatunku (3). U bydła jednakże zidentyfikowano pięć różnych mutacji w tym genie. Na przykład podwójne umięśnienie u BBN i Asturiana wynika z delecji jedenastu par zasad w genie miogeniny i dziedziczy się recesywnie. Hiperplazja u bydła Piedmontese jest skutkiem podstawienia G na A w pozycji 938 tegoż genu. Dla rasy Charolais charakterystyczna jest tranzycja C na T w pozycji 610. Hiperplazja bydła Maine-Anjou jest natomiast efektem heterogeniczności allelicznej, tj. stwierdza się u tej rasy równoległe występowanie kilku mutacji. Zagadką pozostaje determinacja hiperplazji u bydła Limousin i Blonde d'Aquitaine. Przypuszcza się, że w tym przypadku mamy do czynienia z jeszcze inną, nie zidentyfikowaną dotąd mutacją w genie miostatyny lub też w zupełnie innym genie (5).

4. Hipertrofia

Hipertrofia to powiększenie średnicy włókien mięśniowych. Manifestuje się ona w późniejszych etapach życia osobnika, np. u owiec dopiero w kilka tygodni po porodzie (6). Płody nie osiągają zatem ponadprzeciętnych rozmiarów tak jak u bydła. Dlatego problem trudnych porodów w tym przypadku nie istnieje. Owce z hipertrofią odznaczają się ok. 32,3% wyższą masą mięśniową i 7,8% mniejszym otluszczeniem niż osobniki normalne (7). Tymczasem świnię wskutek hipertrofii zyskują na masie o 2-3% więcej (8), a ich tusza jest ponad 2,5% chudsza niż normalnie (9).

Za wystąpienie hipertrofii u owiec odpowiedzialna jest dominująca mutacja w genie *callipyge* (z grec. *calli* — piękny, *pyge* — pośladek), zlokalizowanym na chromosomie 18 pary (7). Ciekawy jest sposób dziedziczenia tej mutacji. Jeśli allel dominujący (CLPG) pochodzi od matki, to umięśnienie potomstwa nie wykazuje cech hipertrofii. Jedynie ojcowskie pochodzenie tego genu gwarantuje ponadprzeciętne umięśnienie. Również homozygotyczne potomstwo CLPG/CLPG jest fenotypowo normalne. Oznacza to, że matczyzny allel CLPG dominuje nad swoim ojcowskim odpowiednikiem (6).

Zjawisko hipertrofii nie ominęło też koni. W populacji Quarter Horse pojawił się swego czasu reproduktor o wyjątkowo silnej muskulaturze, wynikającej z hipertrofii. Ponieważ od koni tej rasy wymaga się znacznej siły i prędkości, reproduktor ten pozostawił po sobie liczne potomstwo, utrwalając tę cechę w populacji (10).

5. Zaburzenia fizjologiczne w hipertrofii

Wkrótce okazało się, że selekcja koni Quarter na cechę wybitnego umięśnienia, jak i świń na chude mięso, dużą szynkę i oko poledwicy, niebacznie stała się przyczyną rozpowszechnienia pewnej miopatii, objawiającej się gwałtownymi skurczami mięśni i ataksją (konie), obniżeniem odporności na stres, sztywnością mięśni szkieletowych i gorączką (świnie). Syndrom ten u koni zwany jest okresowym paraliżem wywołanym hiperkalemią (*hyperkalemic periodic paralysis* — HPP), a u świń znany jest jako gorączka złośliwa (*malignant hyperthermia* — MH). Oba schorzenia wywołane są mutacją w genach odpowiedzialnych za gospodarkę jonową mięśnia (HPP — gen kanału sodowego, MH — gen kanału wapniowego). W rezultacie po uboju świń dotkniętych gorączką złośliwą, uzyskuje się mięso blade, miękkie i wodniste (tzw. syndrom PSE).

W 1953 r. po raz pierwszy opisano niekorzystny związek pomiędzy hipertrofią mięśniową a miopatiami i wskazano na konieczność eliminacji genu odpowiedzialnego za MH z populacji świń. Jednakże jego ściśle powiązanie z cechą wybitnej mięsności, jak i recesywne dziedziczenie, czynią to zadanie wyjątkowo niewdzięczne. Trudno też znaleźć odpowiedź na pytanie, od której rasy świń wywodzi się ta mutacja (8).

Związek pomiędzy hipertrofią i chudością mięśni a syndromem MH (jak i HPP) znajduje swoje fizjologiczne uzasadnienie. Otóż, zaburzenia regulacji jonowej we włóknach mięśniowych są przyczyną ich spontanicznych napięć. Utrzymanie mięśnia w tym stanie wymaga dużej ilości energii, czerpanej z glikogenu, uwalnianego na drodze glikoneogenezy z mięśniowych depozytów tłuszczowych, które z tego też powodu nigdy nie są duże. Ciągłe napięcie mięśniowe powoduje też wzrost grubości poszczególnych włókien mięśniowych (8,10). Zakłada się również istnienie ścisłego sprzężenia pomiędzy genem hipertermii złośliwej a genami kształtującymi jakość tuszy. Istotnie, stwierdzono już takie sprzężenie z genami apolipoproteiny E (APOE), lipazy hormonozależnej (LIPE) i czynnika wzrostowego TGF β -1, których wpływ na jakość tkanki mięśniowej jest niezaprzeczalny (8,11).

TABELA 1
PRZEGLĄD GATUNKÓW Z WYBITNYM UMIEŚNIENIEM

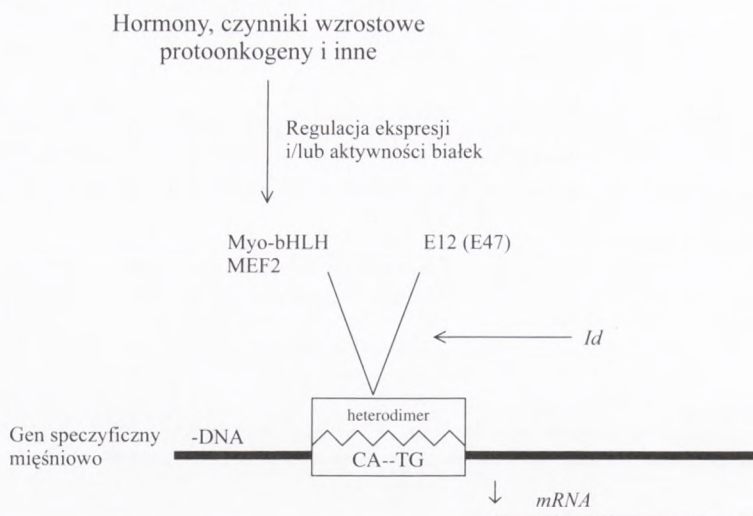
Gatunek	Rasa (przykładowo)	Wybitne umięśnienie wskutek	Stwierdzone przyczyny	Dziedziczenie
bydło	Asturiana, BBN, Maine-Anjou	hiperplazji	co najmniej 5 różnych mutacji w genie miostatyny: delecja 11 par zasad tranzycja G→A w pozycji 938 delecja 7 pz/insertcja 10 pz w pozycji 419 tranzycja C→T w pozycji 610 transwersja G→T w pozycji 676	recesywne, poligeniczne [?]
świnie	Belgijska, Landrace, Pietrain	hipertrofii	nie w pełni wyjaśnione, związek z mutacją w genie kanału wapniowego, inne geny odpowiedzialne za jakość tuszy (TGFβ, APOE, LIPE)	recesywne
owce	Dorset, Rambouillet, Chalorais	hipertrofii	mutacja w genie <i>callipyge</i>	dominujące, imprinting
konie	Quarter Horse	hipertrofii	nie w pełni wyjaśnione, związek z mutacją w genie kanału sodowego	dominujące

6. Genetyczna kontrola miogenezy

Grupę białek regulacyjnych, które wiążą się z DNA zapoczątkowując transkrypcję genu, nazywamy czynnikami transkrypcyjnymi. Nad inicjacją i prawidłowym przebiegiem miogenezy czuwa grupa białek zaliczanych do mięśniowo specyficznych czynników transkrypcyjnych (*muscular regulatory factors* — MRF), zwanych czynnikami myo-bHLH (lub rodzina MyoD1) (12). Białka tej rodziny kodowane są przez cztery geny: *myf-3* (zwany też *myoD*), miogeninę (*myf-4*), *myf-5* i MRF4 (herkulina, *myf-6*). Wykazano, że każdy z nich jest w stanie indukować miogenezę po transfekcji do linii komórek niemięśniowych *in vitro* (13,14). Wspólną cechą ich produktów białkowych są: domena zasadowa wiążąca DNA i przyległy do niej motyw HLH — helisa-pętla-helisa (ang. *helix-loop-helix*). Struktura ta określana jest wspólnym skrótem bHLH (15).

Wiadomo, że aby aktywność miogenna białek myo-bHLH mogła zaistnieć, potrzebne jest współdziałanie ze strony innej rodziny — MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*). Ich wzajemna asocjacja warunkuje zapoczątkowanie miogenezy w komórkach linii mięśniowej (14,16).

Tak „pobudzone” czynniki transkrypcyjne myo-bHLH łączą się następnie za pośrednictwem swoich domen bHLH z białkami E (E12, E47). Te heterodimery wiążą się z kolei z sekwencją CA--TG (E-box) obecną w rejonie enhancerowym genów specyficznych mięśniowo, tym samym aktywując je (1,14,17) (rys. 2). E-box znaleziono również w sekwencjach regulacyjnych



Rys. 2. Schemat aktywacji genu specyficznego mięśniowo przez białka myo-bHLH.

samej miogeniny i MRF4, co wskazuje, że geny te mogą podlegać mechanizmom autoregulacji (18).

Na dalszych etapach miogenezy aktywność białek myo-bHLH regulowana jest produktami genu *Id* (*inhibitor of differentiator*), który wiąże się z nimi, jak i z białkami E12 i E47, w heterodimery. Ten typ heterodimerów nie potrafi jednakże wiązać się z sekwencją regulatorową DNA. Powinowactwo białka *Id* do E12 i E47 jest ok. 5 razy wyższe niż do białek myo-bHLH (11).

6.1. Rola genów kodujących białka myo-bHLH w miogenezie

Czas aktywacji poszczególnych genów tej rodziny w rozwoju zarodkowym nie jest jednakowy (17). U zarodków myszy stwierdzono następującą kolejność aktywacji: *myf-5*, następnie miogenina, MyoD, a najpóźniej w rozwoju prenatalnym ulega ekspresji MRF4. Za specyficzność działania poszczególnych białek myo-bHLH odpowiada prawdopodobnie swoista sekwencja znajdująca się poza regionem bHLH, w sekwencji promotorowej tych genów (18,19).

W najnowszych badaniach wykazano, że produkty genu *myf-5* początkowo przeważają w części grzbietowej (okołokręgowej i międzyżebrowej) zarodka i są wystarczające dla prawidłowego rozwoju mięśni tych okolic (15). Warto jednak zaznaczyć, że myszy pozbawione *myf-5* mają mocno niedorozwinięte żebra (18,19). Tymczasem gen MyoD determinuje umięśnienie części brzuszno-bocznej (brzuch i kończyny) zarodka (15). Zinaktywowanie genu *myf-5* lub MyoD u myszy nie powoduje widocznych zmian w rozwoju mięśni. Dopiero jednoczesny brak produktów obu tych genów uniemożliwia wykształcenie mioblastów (16,18).

Miogenina jest jedynym białkiem z rodziny myo-bHLH znajdującym we wszystkich dotąd zbadanych komórkach linii mięśniowej (13). Odpowiada ona za fuzję mioblastów we włókna mięśniowe. Brak miogeniny powoduje w efekcie wykształcenie zaledwie niewielkiej liczby małych włókien mięśniowych, przy normalnej liczbie mioblastów (13,16,18). Niedobory tego białka nie mogą być zrównoważone zwiększeniem poziomu pozostałych białek rodziny myo-bHLH (13), a wręcz pociągają za sobą czterokrotny spadek poziomu MRF4. Poziom MyoD pozostaje normalny (19).

Sytuacja odwrotna, tj. inaktywacja genu MRF4 wywołuje natomiast ok. pięciokrotny wzrost poziomu miogeniny w komórkach mięśniowych. Mięśnie wykształcają się normalnie, co wskazuje, że miogenina może kompensować brak MRF4 (18). Te obserwacje wskazują, że dla utworzenia i/lub zachowania mioblastów szkieletowych niezbędna jest obecność białek *myf-5* i MyoD, natomiast miogenina i MRF4 odpowiadają za przekształcenie mioblastów we włókienka mięśniowe (15,18). Dodatkowo genowi MRF4 przypisuje się istotną rolę w fuzji komórek satelitarnych z włóknami mięśniowymi podczas rozrostu hipertroficznego mięśnia (1).

Według ostatnich hipotez historia genów MRF przedstawia się następująco: praprzodkiem rodziny jest *myf-5*, z którego wskutek duplikacji wyewoluował MRF4. Z kolei duplikacja MRF4 z jednoczesną translokacją na inny chromosom zaowocowała powstaniem miogeniny. Podobnie MyoD jest wynikiem duplikacji MRF4 i translokacji na jeszcze inny chromosom (15).

7. Inne czynniki istotne dla miogenezy

Rozwój tkanki mięśniowej jest efektem współdziałania wielu różnych genów i czynników fizjologicznych. Ponieważ głównym genem w procesie miogenezy, jak się wydaje jest miogenina, przypuszczalnie zmienność genetyczna w tym właśnie genie odpowiada za różnicę w ilości wykształconych mioblastów i włókien mięśniowych (20). Nie można jednak zapominać, że na każdym etapie proliferacji i różnicowania mioblastów, ekspresja i aktywność czynników MRF jest kontrolowana przez wiele innych genów, hormonów, protoonkogenów i czynników wzrostowych (1). Mogą one ograniczyć ich działanie uniemożliwiając heterodimeryzację białek myo-bHLH, wiązanie heterodimerów z DNA i/lub aktywację transkrypcji (21). Gruntowne ich poznanie na poziomie molekularnym i fizjologicznym może w przyszłości ułatwić ocenę i właściwy wybór zwierząt do selekcji.

Literatura

1. Te Pas M. F. W., Visscher A. H., (1994), *J. Anim. Breed. Genet.*, 111, 404-412.
2. Swatland H. J., (1992), *Pork Quality: Genetic and Metabolic Factors*, Eds. Puolanne E., Demeyer D. J., C. A. B. International, UK, 115-139.
3. Grobet L., Martin L. J. R., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménéssier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M., (1997), *Nature Genetics*, 17, 71-74.

4. McPherron A. C., Lawler A. M., Lee S. J., (1997), *Nature*, 387, 83-90.
5. Grobet L., Poncelet D., Royo L. J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux Ch., Ménéssier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M., (1998), *Mammalian Genome*, 9, 210-213.
6. Cockett N. E., Berghams S., Beckers M. C., Shay T. L., Jackson S. P., Snowden G. D., Georges M., (1997), *Animal Biotechnology*, 8(1), 23-30.
7. Koohmaraie M., Shackelford S. D., Wheeler T. L., Lonergan S. M., Doumit M. E., (1995), *J. Anim. Sci.* 73, 3596-3607.
8. Mac Lennan D. H., Phillips M. S., (1992), *Science*, 256, 789-794.
9. Whittenmore C. T., (1987), *Pig carcass quality*, in: *Elements of pig science*, Longman Handbooks in Agriculture, Longman Group UK Limited, 49-74.
10. Naylor J. M., (1994), *J. Anim. Vet. Med. Association*, 204, 6, 926-928.
11. Vögeli P., Bolt R., Fries R., Stranzinger G., (1994), *Animal Genetics*, 25, Suppl. 1, 59-66.
12. Chu C., Cogswell J., Kohtz D. S., (1997), *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 6, (Feb.7), 3145-3148.
13. Briley G. P., Reecy J. M., Bidwell C. A., (1995), *An. Biotech.*, 6 (2), 79-92.
14. Black B. L., Molkentin J. D., Olson E. N., (1998), *Molecular and Cellular Biology*, vol. 18, 1, 69-77.
15. Kablar B., Krastel K., Ying Ch., Asakura A., Tapscott S. J., Rudnicki M. A., (1997), *Development*, 124 (23), 4729-4738.
16. Gerber A. N., Klesert T. R., Bergstrom D. A., Tapscott S. J., (1997), *Genes and Development*, 11, 436-450.
17. Weintraub H., Davis R., Tapscott S., Thayer M., Krause M., Benezra R., Blackwell T. K., Turner D., Rupp R., Hollenberg S., Zhuang Y., Lasassar A., (1991), *Science*, 251, 761-766.
18. Wang Y., Jaenisch R., (1997), *Development*, 124 (13), 2507-2513.
19. Hasty P., Bradley A., Morris J., Edmondson D., Venuti J., Olson E., Klein W., (1993), *Nature*, 364, 501-506.
20. Soumillion A., Erkens Jo H. F., Lenstra J. A., Rettenberger G., te Pas M. F. W., (1997), *Mammalian Genome*, 8, 564-568.
21. Lenormand J. L., Benayoun B., Guillier M., Vandromme M., Leibovitch M. P., Leibovitch S. A., (1997), *Molecular and Cellular Biology*, 584-593.

Molecular aspects of muscle development

Summary

An exceptional muscle development in some meat-producing animals is due to the increase in the number of muscle fibers (hyperplasia) or increase in their individual diameter (hypertrophy). The genetic mechanism of the former is well known. It results from mutation in the myostatin gene. The determination of muscular hypertrophy is poorly understood. In pigs this phenomenon is associated with muscular hypermetabolism and contraction induced by stress.

Muscle development is controlled by genes called muscular regulatory factors. Four genes belong to this family: myogenin, *myf-3*, *myf-5* and MRF4. While *myf-3* and *myf-5* are responsible for establishment and maintenance of skeletal myoblasts, myogenin and MRF4 control differentiation of myoblasts into myotubes. Their activity is influenced by other genes and physiological factors. Understanding of the mechanisms involved in myogenesis would provide a useful tool for controlling meat production in farm animals.

Key words:

hypertrophy, hyperplasia, myogenesis, muscle development, muscle regulatory factors.

Adres do korespondencji:

Danuta Cieślak, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.