



Kandidaatintutkielma

Myostatiini

Jere Hukkanen

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2019

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet	3
Myostatiini	5
Myostatiinin synteesi	5
Myostatiinin rakenne	6
Myostatiinisignalointi aktiivireseptorien kautta	8
Autoregulaatio Smad7 kautta	8
Myostatiini ja lihasmassan säätely	9
AKT/mTOR-signalointi ja lihaskasvu	9
Myostatiini ja AKT/mTOR-signalointi	10
Myostatiini ja AKT/FOXO-välitteinen proteiinien hajotus	12
Myostatiini ja satelliittisolujen sekä myoblastien aktivaatio	13
Sydänlihas ja myostatiini	16
Mutaatiot myostatiinigeenissä	16
Myostatiinin manipulointi ja myostatiini-inhibiittorit	18
Myostatiinipropeptidi	18
Follistatiini	18
Dekoriini	19
Myostatiinirokote	20
Voimaharjoittelu ja myostatiini	20
Ravintoaineiden vaikutus myostatiiniin	23
Kreatiinisupplementaatio	23
D-vitamiinisupplementaatio	23
Epikatekiinit	24
Androgeenien vaikutus myostatiinisignalointiin	25
Kasvuhormonin vaikutus myostatiinisignalointiin	25
Yhteenvedo ja pohdintaa	25
Kirjallisuusviitteet	28

Käytetyt lyhenteet

ActIIA -Activin receptor II A

ActIIB – Activin receptor II B

AKT – Protein kinase B

ALK 4 – Activin receptor Like Kinase 4

ALK 5 – Activin receptor Like Kinase 5

ATG-4B – Cysteine protease 4B

bHLH – basic Helix-Loop-Helix

CK – Creatine Kinase

Cdk – Cyclin dependent kinase

bHLH – basic Helix Loop Helix

BMP – Bone Morphogenetic Protein

E2_{14k} – ubiquitin-conjugating Enzyme 14 k

FLRG – Follistatin Related Gene

FoxO - Forkhead box O

FST - Follistatiini

GABARAPL1 - GABA type A Receptor Associated Protein Like 1

GASP-1 - Growth differentiation associated Serum Protein

GDF-8 - Growth Differentiation Factor 8

GDF-11 – Growth Differentiation Factor 11

GRP – Green Fluorescent Protein

GTP – Guanosine Triphosphate

GSK3 β – Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

IGF-1 – Insulin Like Growth Factor 1

IRS-1 – Insulin Receptor Substrate 1

LC3- Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

MAFbx – F-box only protein 32

MEF2 – Myocyte Enhancer Factor 2

mLST8 - mammalian lethal with SEC13 protein 8

MRF4 – Muscle Regulatory Factor 4

mTOR – mechanistic Target Of Rapamycin

mTORC - mechanistic Target Of Rapamycin Complex

MuRF-1 – Muscle Ring Finger 1

MYF5 – Myogenic Factor 5
MyoD – Myoblast Determination protein
Nedd4 - neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
NF-kB – Nuclear Factor kappa B
Pax3 – Paired box gene 3
PDK1 – Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PGC-1 α - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PIP2 - Phosphatidylinositol(3,4,5)-bisphosphate
PIP3 – Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate
PI3K – Phosphatidylinositol 3-Kinase
p21= p21^{cip1} – Cdk interacting protein
p27^{kip1}= Kinase inhibitory protein
p70s6k – Ribosomal protein s6 kinase
Raptor – Regulatory-associated protein of mTOR
Rheb – RAS homolog enriched in brain
R-Smad - Receptor-regulated Smad
Smad – Small worm phenotype + mothers against decapentaplegic
TAC – Transverse Aortic Constriction
TGF- β – Transforming Growth Factor β
TLD – Tolloid
TSC – Tuberous Sclerosis protein
ULK-2 – Unc-51-Like Kinase 2
4E-BP = PHAS-1 – Eukaryotic translation initiation factor 4E Binding Protein

Myostatiini

Myostatiini, joka tunnetaan myös nimellä GDF-8 (Growth Differentiation Factor 8), on voimakas luurankolihasten kasvun negatiivinen säätelijä. Myostatiinin inhibointi, kuten myös myostatiinigeenin inaktivointi aiheuttaa hypertrofiaa luurankolihaksissa, kun taas yliekspression tai systeemisen annostelun tiedetään aiheuttavan atrofiaa. Myostatiini on konservoitunut useilla nisäkkäillä ja sen toimintaa heikentävien mutaatioiden tiedetään ilmentyvän yllihaksikkaana fenotyypinä ainakin hiirillä, ihmisillä, koirilla, lampailta ja naudoilla (Rodriguez *et al.* 2014). Ihmisillä tunnetaan yli 130 erilaista missense-mutaatiota myostatiinigeenissä (Cotton *et al.* 2018). Mutaatioiden myostatiinigeenissä tiedetään ilmenevän myös vähäisempänä rasvakudoksena verrattuna eläimiin, joilla myostatiini toimii normaalisti (Kambadur *et al.* 1997, McPherron *et al.* 2002, Rebbapragada *et al.* 2003, Schuelke *et al.*, 2004). Erilaisista myostatiiniantagonisteista toivotaan saatavan hoitomuotoja esimerkiksi Duschennen lihasdystrofiaan, lihasvaurioiden korjaamiseen, sarkopeniaan, sekä sydämen vajaatoiminnan aiheuttamaan lihaskatoon (Li *et al.* 2007, Heineke *et al.* 2010, Gutierrez-Salmean *et al.* 2014, Iskenderian *et al.* 2018).

Myostatiinin synteesi

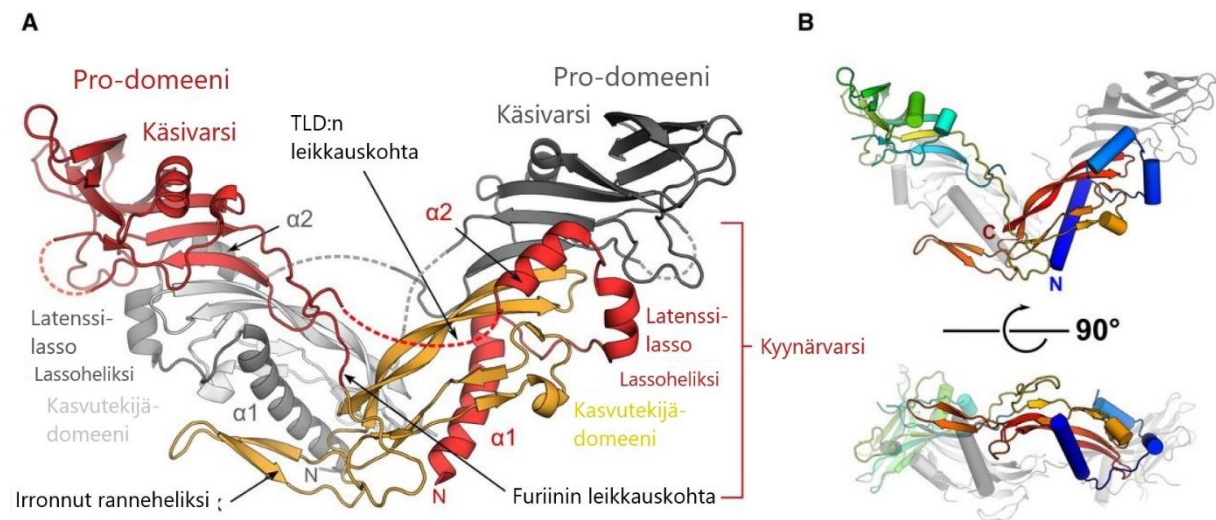
Myostatiinin synteesi tapahtuu pääasiassa luurankolihaksissa (Ji *et al.* 1998). Sitä ekspressoidaan vähäisissä määrin myös rasvakudoksessa ja sydänlihaksessa (Tingqing *et al.* 2009, Heineke *et al.* 2010).

Myostatiini kuuluu TGF- β (Transforming Growth Factor) -proteiiniperheeseen. Kuten muutkin TGF- β perheen proteiinit, se syntetisoidaan inaktiivisena esiasteena, joka saadaan aktiiviseen muotoon vaiheittain proteolyttisesti leikkaamalla. Pro-myostatiini sisältää N-terminaalisen signaalipeptidin, leikattavan pro-domeenin, sekä C-terminaalisen kasvutekijä-domeenin. Pro-myostatiini muodostaa 84,5kDa:n suuruisen dimeerin, jonka alayksiköt ovat sitoutuneet kovalenttisesti kasvutekijädomeenien välisen konservoituneen rikkisillan kautta. Ensin furiinin kaltaiset pro-proteiinikonvertaasit leikkaavat kovalenttisesti sitoutuneet pro-domeenit, jolloin syntyy 83,4kDa:n suuruisen kompleksin. Muodostuneessa kompleksissa myostatiini on nyt ei-kovalenttisesti assosioitunut leikattuihin pro-domeeneihinsa. Ensimmäinen pro-domeenien leikkaaminen voi tapahtua joko erityksen yhteydessä, tai ekstrasellulaarisesti. Mikäli erity-

tapahuu täysin leikkaamattomana kompleksina, pro-myostatiini kiinnittyy ekstrasellulaarisen matriksin sisältämiin heparaanisulfaatti-proteoglykaaneihin ja TGF- β :a sitoviin proteiineihin pro-domeeniensa kautta (Cotton *et al.* 2018).

Aktiivisen muotonsa myostatiini saavuttaa vasta toisen proteolyttisen käsittelyn jälkeen, kun BMP1/TLD-perheen metalloproteaasit leikkaavat prodomeenin (Cotton *et al.* 2018). Kahdesta kohtaa leikattu pro-domeeni kykenee nyt dissosioitumaan, jättäen jäljelle 25kDa:n homodimeerin, jota yhdistää c-terminaalinen disulfidisisidos (Elkina *et al.* 2011). Aktiivinen myostatiini kykenee muodostamaan heterotetrameerisen kompleksin, joka sisältää tyypin II aktiiviinireseptoreista joko ActIIA- tai ActIIB-reseptorin, sekä tyypin I reseptoreista joko ALK4- tai ALK5-reseptorin (Rebbapragada *et al.* 2003).

Myostatiinin rakenne



Kuva 1. Pro-myostatiinikompleksin rakenne. (Lainattu ja muokattu lähteestä: Cotton *et al.* 2018).

Pro-myostatiinidimeerin kolmeulotteinen rakenne muistuttaa V-kirjainta ja sen alayksiköiden domeenit ovat osittain limittyneet (domain-swapping). Vastaavan kaltainen rakenne tiedetään olevan TGF- β -proteiiniperheen jäsenistä sekä pro-aktiiviini-A:lla että pro-BMP-9:llä. Rakenne poikkeaa TGF- β -1:n rakenteesta, mikä mahdollistaa myöskin TGF- β -1:lle tyypillisestä integriini-välitteisestä mekaanisesta aktivaatiosta poikkeavan vaiheittaisen ja säädellyn aktivaatioprosessin BMP1/TLD-metalloproteaasien toimesta. Pro-myostatiinin alhainen bioaktiivisuus verrattuna kypsään muotoon johtuu useasta erillisestä vuorovaikutuksesta,

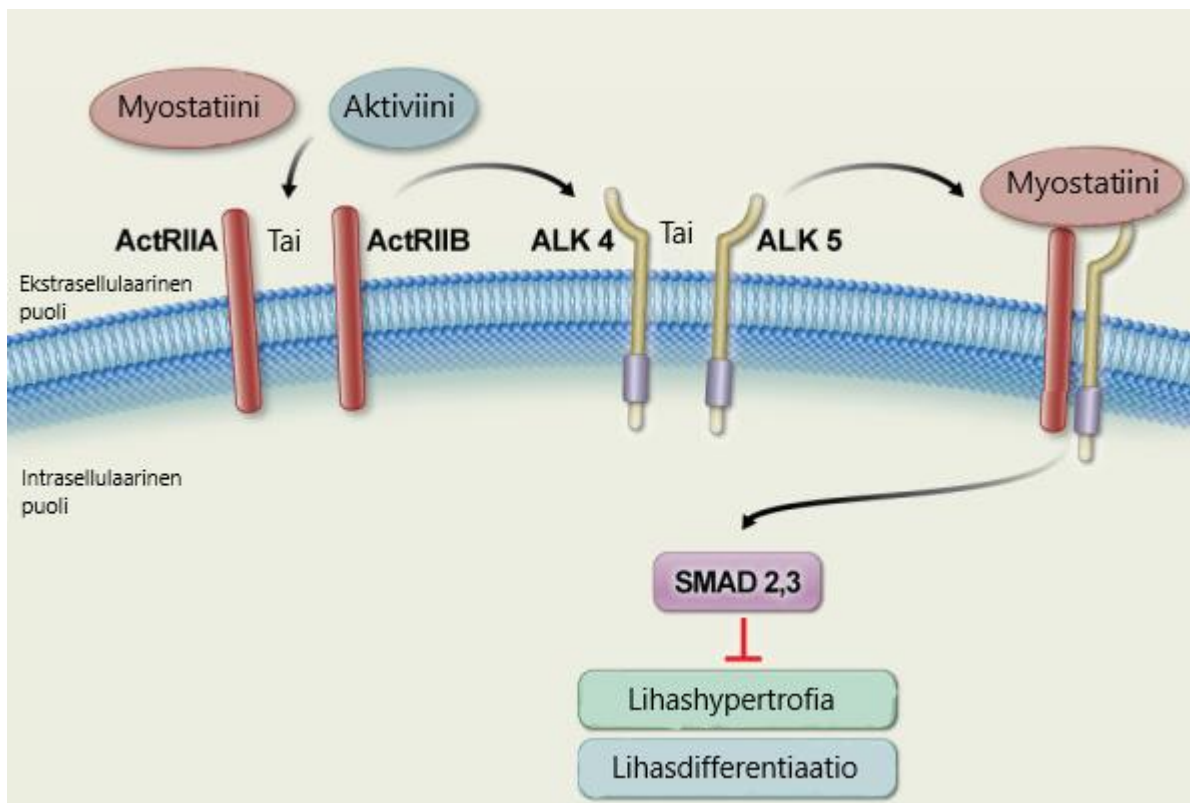
joiden summana kasvutekijädomeenin ja pro-domeenin välinen ei-kovalenttinen vuorovaikutus voimistuu. Sidos on riittävän voimakas estämään reseptorivuorovaikutuksen, sekä myostatiinin antagonistimolekyylien, kuten follistatiinin sitoutumisen kompleksiin pro-domeenin sijaan. Tämä poikkeaa aktiviini-A:n ja BMP-9:n esiasteista, joilla on yhtä suuri signaaliaktiivisuus verrattuna niiden kypsiin muotoihin, johtuen heikosta pro- ja kasvutekijädomeenien välisestä vuorovaikutuksesta. Pro-TGF- β -1-kompleksin inaktiivisuus puolestaan johtuu pro-domeenien välisestä disulfidi-sidoksesta, mikä estää kasvutekijädomeenien reseptorivuorovaikutuksen ilman mekaanista tai proteolyyttistä aktivaatiota. Pro-myostatiinilta tällaiseen sidokseen tarvittavat kysteiniitähteet puuttuvat (Cotton *et al.* 2018).

Myostatiinin kasvutekijä-domeenit koostuvat TGF- β -perheen jäsenille tyypillisesti neljästä antiparalleelisesta β -nauhasta eli sormista ja kysteiniinisolmusta, jotka muodostavat identtiset hydrofobiset kaarevat pinnat eli kämmenet. Kämmenet ovat yhteydessä toisiinsa ranneheliksin välisen disulfidididoksen kautta, joka muodostuu molempien monomeerien 339. kysteiniin välille. Ranneheliksit ja niitä edeltävät alueet muodostavat oletetusti epitoopin tyyppin I aktiviinireseptoreille. Röntgenkristallografian perusteella pro-peptidin ollessa sitoutuneena myostatiiniin, ranneheliksi näyttäisi liikkuvan pois paikoiltaan ja assosioituvan pro-peptidin alfa-heliksiin (Cotton *et al.* 2018).

Myostatiini-propeptidi koostuu käsivarresta, kyynärvarresta sekä kyynärvarressa sijaitsevasta latenssilassosta. Käsivarrella tarkoitetaan c-terminaalista globulaarista domeenia. Kyynärvarrella tarkoitetaan käsivartta edeltävää alfa-heliksi-1-silmukka-alfaheliksi-2-rakennetta. Latenssilassolla tarkoitetaan kyynärvarresta ulkonevaa lassorakennetta, joka sisältää lyhyen alfa-heliksi-rakenteen, eli niin sanotun lassoheliksin. Tämä erottaa rakenteen TGF- β -1:n ja aktiviini A:n propeptidien vastaavasta. Alfa-heliksi-1 estää kasvutekijädomeenin reseptorivuorovaikutuksen sitoutumalla sen hydrofobiseen kämmenosaan. Latenssilasso muodostaa propeptidin ja kasvutekijädomeenin välisen rajapinnan jäämällä kasvutekijädomeenin beta-nauhojen sisään. Alfaheliksi-2 puolestaan estää vuorovaikutuksen tyyppin II aktiviinireseptorin kanssa, sitoutumalla sille spesifiseen epitooppiin (Cotton *et al.* 2018).

Myostatiinisignalointi aktiviinireseptorien kautta

Kypsä myostatiini kykenee sitoutumaan tyyppin II aktiviinireseptoreihin, ActIIA:han ja ActIIB:hen, joista ActIIB:hen suuremmalla affiniteetillä. Myostatiinin sitoutuminen tyyppin II reseptoriin saa aikaan kompleksoitumisen sopivan tyyppin I aktiviinireseptorin kanssa, mistä seuraa tyyppin I reseptorin fosforyloituminen. Muodostuva signaali riippuu sitoutuneen tyyppin I reseptorin alatyypistä. Reseptorin eri alatyypit kykenevät edelleen fosforyloimaan eri Smad-proteiineja. Myostatiinin tapauksessa aktivoituvat reseptorit ovat tyyppiä ALK4 ja ALK5, jotka aktivoivat Smad2:ta ja Smad3:a. Nämä fosforyloidut reseptorisäädellyt Smad-proteiinit eli R-Smad-proteiinit muodostavat Smad4:n kanssa R-Smad/Smad4-komplekseja, jotka kuljetetaan tumaan, missä ne osallistuvat transkription säätelyyn (Rebbapragada *et al.* 2003).



Kuva 2. Myostatiinin signalointi aktiviinireseptoreiden ja Smad-proteiinien kautta. Myostatiinin tai aktiviinin sitoutuminen tyyppin II reseptoriin rekrytoi kompleksin tyyppin I reseptoreista joko ALK4:n tai ALK5:n. Tästä seuraa Smad-proteiinien aktivaatio ja kuljetus tumaan, minkä seurauksena hypertrofia ja lihaksen erilaistumiseen johtavia reaktioita inhiboidaan. (Lainattu ja muokattu lähteestä: Lee & Glass 2011).

Autoregulaatio Smad7 kautta

Myostatiini itsesäätelää ekspressiotaan Smad7-proteiinin kautta. Smad7:n tiedetään inhiboivan TGF- β -signalointia estämällä Smad2:n ja Smad3:n toiminnan. Smad7 liittyy stabiilisti TGF- β -kompleksiin, kuitenkin tulematta fosforyloiduksi ja näin ollen estää Smad2:n ja Smad3:n fosforylaation (Nakao *et al.* 1997).

Myostatiinikäsittely indusoi Smad7:n ekspression myoblasteissa, muttei Smad6:n, joka myöskin toimii TGF- β -signaloinnin inhibiittorina. Myostatiini-negatiivissa myoblasteissa puolestaan Smad7:n ekspressio on vähäisempää. Lisäksi tiedetään, että Smad3:n puute vähentää Smad7-promoottorin aktiivisuutta (Forbes *et al.* 2006).

Myostatiini ja lihassmassan säätely

AKT/mTOR-signalointi ja lihaskasvu

Lihassmassa riippuu proteiinisynteesin ja proteiinien hajotuksen välisestä suhteesta (Glass 2005). IRS-1:n kautta välittyvää hypertrofiaa kontrolloi kolme PI3K/AKT signaaliketjun alahaaraa. AKT/mTOR- ja AKT/GSK3 β -reitit kontrolloivat proteiinisynteesiä ja AKT/FOXO-reitti proteiinien hajotusta (Rommel *et al.* 2001, Glass 2005). Näistä hypertrofian kannalta olennaisin näistä lienee AKT/mTOR-reitti, sillä sen estäminen geneettisesti estää hypertrofian (Bodine *et al.* 2001). AKT/mTOR signaloinnissa mTOR toimii osana mTORC1-kompleksia yhdessä Raptor- ja mLST8-alayksiköiden kanssa. mTORC1-kompleksi kykenee lisäämään translaatiota, ribosomien biogeneesiä ja transkriptiota, sekä estämään autofagiaa (Wullschleger *et al.* 2006).

Signalikaskadin alussa IGF-1:n sitoutuminen insuliini/IGF-reseptoriin ekstrasellulaarisella puolella johtaa sytosolin puoleisten tyrosiinitähteiden fosforyloitumisen, mikä taas saa aikaan tyrosiinikinaasiaktiivisuuden IRS-1:tä kohtaan. Fosforyloitu IRS-1 edelleen aktivoi PI3K:n, joka fosforyloi PIP2:n PIP3:ksi. PIP3 aktivoi PDK1:n, joka vuorostaan aktivoi AKT:n (Coppes & White 2012). Aktivoitunut AKT inhiboi TSC2:n fosforyloimalla sen ja näin estää TSC1-TSC2 kompleksin toiminnan. TSC1 ja TSC2 inhiboivat mTORC1:n aktivoitumista ja näin ollen niiden inhiboiminen johtaa lisääntyneeseen mTORC1-aktiivisuuteen. mTORC1:n aktivoituminen tapahtuu Rheb-välitteisesti. Rheb on pienikokoinen GTPaasi joka sitoutuu mTOR:n kinaasidomeeniin. Kun GTP on sitoutuneena Rheb:iin, Rheb aiheuttaa konformaation

muutoksen mTORC1:ssä, mikä johtaa sen aktivaatioon. GTP:n puuttuessa Rheb puolestaan inhiboi mTORC1:ia. TSC2 toimii GTP:aasia aktivoivana proteiinina pieniä GTPaaseja, kuten Rhebiä kohtaan, mistä johtuu TSC2:n mTOR:ia inhiboiva vaikutus. Aktiivinen mTORC1 fosforyloi translaatiotekijöitä p70s6k ja PHAS-1/4E-BP, mikä johtaa kiihtyneeseen proteiinisynteesiin (Bodine *et al.* 2001, Wullschleger *et al.* 2006).

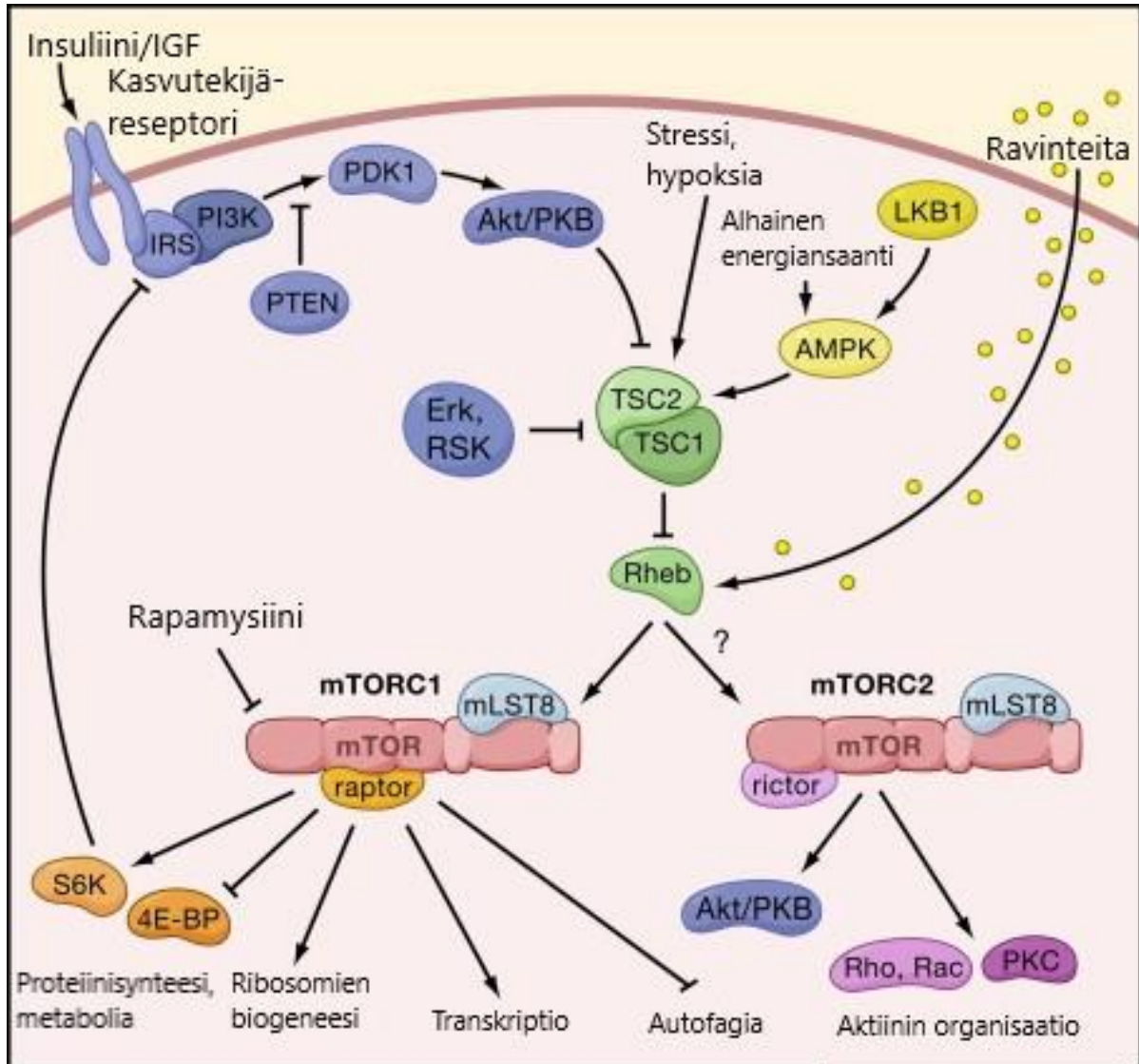
Myostatiini ja AKT/mTOR-signalointi

Myostatiinin anti-hypertrofinen vaikutus välittyy osittain AKT/mTOR-inhibition kautta. AKT:n ekspressio 2,8-kertaistui myostatiini-knockout-hiirien nelipäisissä reisilihaksissa verrattuna villityypin hiirien vastaavaan Morissette *et al.* (2009) mukaan. Samaan aikaan AKT:n fosforylaatio nelinkertaistui, sekä AKT-mRNA:n ekspressio kaksinkertaistui. Myostatiinin yliekspressio puolestaan vähensi AKT:n fosforylaatiota sekä kinaasiaktiivisuutta *in vitro* C2C12-lihassoluviljelmässä. Erilaistuneita C2C12 lihassäikeitä infektoitiin adenovirusvektoreilla, jotka ekspressoivat vihreää fluoresoivaa proteiinia (GFP), myostatiinia, AKT:tä tai myostatiini-propeptidiä, joka toimii myostatiini-inhibiittorina. Tulosten mukaan myostatiinin yliekspressio kykeni estämään IGF-1:n indusoiman AKT:n fosforylaation. Myostatiini-propeptidin yliekspressio puolestaan 3,6-kertaisti AKT:n fosforylaation verrattuna GFP:hen. Vastaavat vaikutukset nähtiin myös AKT:n kinaasiaktiivisuudessa. Vaikutukset AKT:n aktiivisuuteen korreloivat myös lihassäikeiden halkaisijan kanssa (Morissette *et al.* 2009).

Myostatiini-knockout-hiirillä PI3K-signalointiin, insuliini/IGF-signalointiin, hiilihydraattimetaboliaan ja apoptoosin säätelyyn liittyvien geenien ekspressio, sekä translaatio on voimakkaampaa, kuin villityypin hiirillä. Samaan aikaan kaanoniseen Wnt:hen, kalsiumsignalointiin ja sytokiinireseptori-sytokiini-vuorovaikutuksiin liittyvien geenien ekspressio ja translaatio on vähäisempää (Chelh *et al.* 2009).

Myostatiinin yliekspressio rottien tibialis-lihaksessa säätelee negatiivisesti AKT/mTOR-signaalikaskadiin kuuluvien proteiinien aktiivisuutta alhaisemman fosforylaatioasteen perusteella. Samalla kuitenkin atrofiaa indusoivien ubikitiiniligaasien, kuten atrogiini-1-, MuRF-1-, and Nedd4-proteiinien aktiivisuudet säilyivät muuttumattomina, kuin myös atrogiinin transkriptionaalisen säätelijän FOXO1:n aktiivisuus sekä ekspressio. Näin ollen

vaikuttaa siltä, että myostatiinin atrofinen vaikutus välittyy enemmän AKT/mTOR-säätelyn kautta, eikä niinkään ubiquitiini-proteasomi-reitin kautta (Amirouche *et al.* 2009).



Kuva 3. Yhteenveto IGF/PI3K/AKT/mTOR-signaloinnista. Insuliini tai IGF-1 saa aikaan PI3K/AKT-aktivaation, jolloin TSC1-TSC2-kompleksin muodostuminen estyy. Tästä seuraa Rheb:n aktivaatio. Rheb puolestaan aktivoi mTORC1-kompleksin, mikä johtaa lisääntyneeseen proteiinisynteesiin, ribosomien biogeneesiin, lisääntyneeseen transkriptioon ja vähentyneeseen autofagiaan. Ravintoaineet kykenevät myös aktivoimaan mTORC-1-kompleksia aktivoimalla suoraan Rheb:iä. Hypoksia ja alhainen energiansaanti puolestaan johtaa TSC1-TSC2-kompleksin muodostumiseen, minkä seurauksena mTOR-signalointi vähenee. (Muokattu ja suomennettu lähteestä: Wullschleger *et al.* 2006).

Myostatiini ja AKT/FOXO-välitteinen proteiinien hajotus

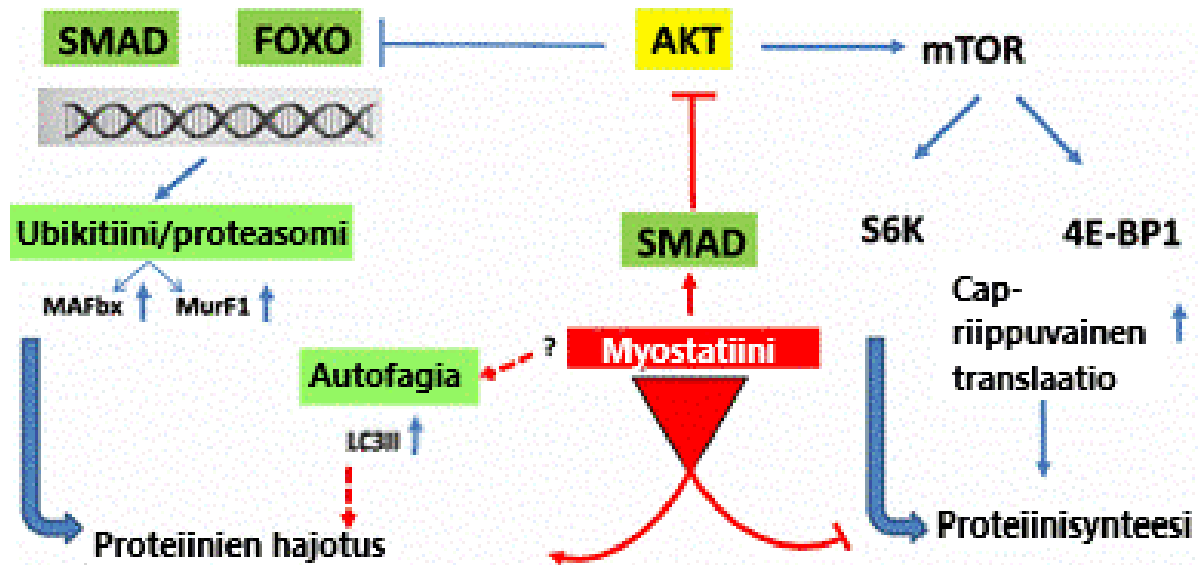
FOXO-transkriptiotekijät ovat olennaisessa osassa proteiinin hajotuksessa, sillä ne kontrolloivat autofagia-lysosomi- ja ubikitiini-proteasomi-reittejä (Rodriguez *et al.* 2014). IGF-1/PI3K/AKT-aktiivisuuden lasku johtaa FOXO-transkriptiotekijöiden defosforylaatioon ja aktivaatioon (McFarlane *et al.* 2006). FOXO-proteiinit toimivat transkriptiotekijöinä atrogiini-1-, MuRF-1- ja MAFbx- ubikitiiniligaaseille luurankolihasessa, joten kohonnut FOXO-aktiivisuus johtaa ubikitinaatioon ja proteiinien hajotukseen proteasomeissa (McFarlane *et al.* 2006, Bodine & Baehr 2014). FOXO3 aktivaatio saa aikaan autofagiaa indusoivien geenien, kuten LC3:n aktivaation (Mammucari *et al.* 2007). Näin ollen AKT:n aktiivisuuden lasku kykenee stimuloimaan myös lysosomaalista proteiinien hajotusta.

Näyttö myostatiinin yhteydestä proteolyyttisiin signaalireitteihin näyttäisi olevan ristiriitaista. Amirouche *et al.* (2009) rotilla suorittaman tutkimuksen mukaan myostatiinin yliekspression aiheuttama atrofia ei välity ubikitinaatio-proteasomireitin kautta ubikitiiniligaasien ja FOXO1:n muuttumattomaan aktiivisuuden sekä FOXO1:n muuttumattoman ekspression perusteella. Myöskään Taylor *et al.* (2001) eivät C2C12 soluviljelmällä suorittamissaan kokeissa löytäneet merkkejä myostatiinin yliekspression aiheuttamasta proteiinien hajotuksesta.

Sen sijaan McFarlane *et al.* (2006) mukaan myostatiini kykenee aktivoimaan FOXO1-signaalireittiä, mikä johtaa atrofiaa indusoivien geenien aktivaatioon *in vitro* ja *in vivo*. Tutkimuksen mukaan myostatiini kykeni estämään AKT:n fosforylaatiota, mikä näkyi FOXO1:n aktiivisen eli de-fosforyloidun:n muodon lisääntymisenä. Kohonnut FOXO1 aktiivisuus johti myös kohonneisiin ubikitiini-liitännäisten geenien; atrogiini-1, MuRF-1 ja E214k -aktiivisuuteen. Tutkimuksen mukaan myostatiinin indusoima lihaskato tapahtui NF-kB:stä riippumattomalla mekanismilla, sillä myostatiini kykeni nostamaan atrogiini-1:n pitoisuutta 110% *in vitro*, huolimatta NF-kB:n aktiivisuuden estämisestä NF-kB-spesifisen inhibiittorin yliekspressiolla.

Mendas *et al.* (2011) osoittivat tutkimuksessaan, että myostatiini-knock-out-hiirien lihaksissa atrogiini-1:n pitoisuus, sekä geenin ekspressio on vähäisempää verrattuna villityypin hiiriin. Myöskin myosiinin raskaan ketjun ubikitinaatioaste oli pienempi knock-out-hiirillä verrattuna villityyppiin.

Lee *et al.* (2011) mukaan myostatiini kykenee stimuloimaan autofagiaa lisäämällä LC3-II:n ekspressiota in vitro. Myostatiinikäsittelyn vaikutuksesta myös autofagosomien lukumäärä, sekä autofagialiitännäisten geenien ATG-4B, ULK-2 ja GABARAPL1 ekspressio kasvoi merkittävästi.

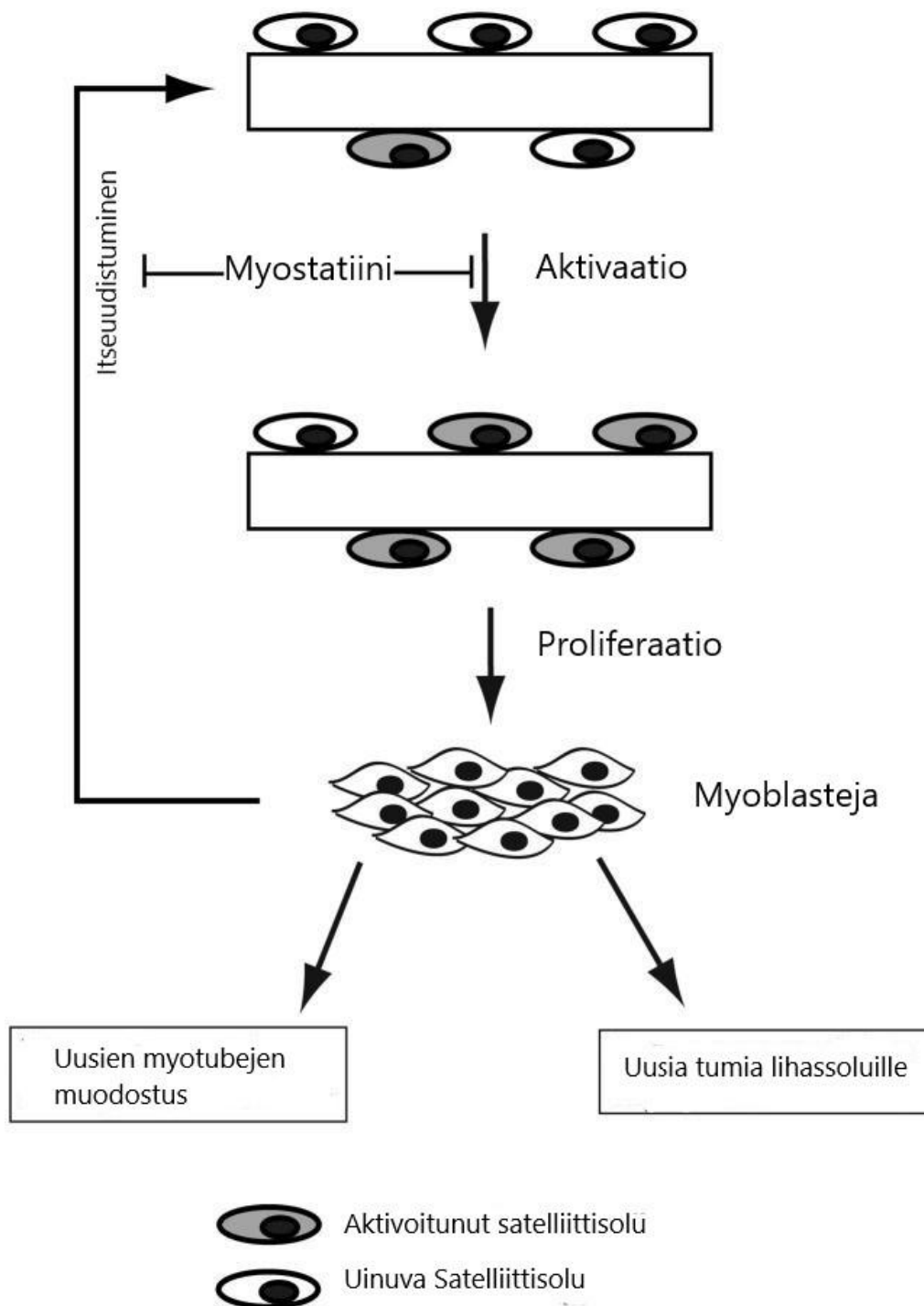


Kuva 4. Yhteenveto myostatiinin vaikutuksista AKT:n välittämiin anabolisiin ja katabolisiin signalireitteihin. Myostatiini vaimentaa AKT-signalointia Smad-välitteisesti. Tämän seurauksena mTOR-signalointi vähenee, mikä johtaa alhaisempaan proteiinisynteesiin. Vastaavasti FOXO-aktiivisuus ainakin teoriassa nousee, mikä johtaa lisääntyneeseen proteiinien hajotukseen. (Muokattu ja suomennettu lähteestä: Rodriguez *et al.* 2014).

Myostatiini ja satelliittisolujen sekä myoblastien aktivaatio

Satelliittisolut ovat lihaksen kantasoluja, jotka osallistuvat syntymän jälkeiseen lihaksen kasvuun ja korjaukseen. Satelliittisolut ovat normaalisti ”uinuvia” eli ne ovat pysähtyneinä solusyklin G1-vaiheeseen. Uinuvat satelliittisolut kykenevät aktivoitumaan lihasvaurion seurauksena. Aktivoinnin seurauksena satelliittisolujen solusykli käynnistyy ja ne alkavat ekspressoimaan myogeenisiä säätelytekijöitä ja erilaistuvat myoblasteiksi. Myoblastit puolestaan voivat erilaistua uudeksi lihassoluksi tai fuusioitua kypsiin lihassoluihin. Uinuvien satelliittisolujen määrä säilyy vakiona, koska ne jakautuvat niin sanotulla self-renewal-mekanismilla, missä osa syntyneistä myoblasteista muuttuu takaisin satelliittisoluiksi (McCroskery *et al.* 2003).

McCroskery *et al.* (2003) mukaan myostatiini on voimakas satelliittisolujen aktivaation negatiivinen säätelijä. Tutkimuksessa myostatiini-knock-out-hiirillä satelliittisolujen aktivaatio ja määrä oli suurempaa verrattuna villityypin hiiriin. Lisäksi myostatiinin lisääminen lihassoluviljelmään inhiboi satelliittisolujen aktivaatiota. Myostatiinin vaikutuksesta myoblastien p21:n pitoisuus lisääntyi ja Cdk2:n aktiivisuus sekä pitoisuus laski *in vitro*. p21 on solusyklin pidättäjä, joka saa solut pysähtymään G1-vaiheeseen inhiboimalla Cdk:n toimintaa. Tämän mekanismin avulla myostatiini kykenee siis estämään siirtymistä solusyklin G1-vaiheesta S-vaiheeseen. Lisäksi havaittiin, että myostatiini-knock-out-hiirten lihaksissa oli enemmän satelliittisoluja suhteessa lihassolujen pituuteen. Solujen lisääntynyt määrä johtui kohonneesta itseuudistumisesta ja viivästyneestä myogeeniinin ekspressiosta knock-out-hiirien lihaksissa.



Kuva 5. Myostatiinin vaikutus satelliittisolujen aktivaatioon ja itseuudistumiseen. Myostatiini säätelee negatiivisesti sekä satelliittisolujen aktivaatiota, että itseuudistumisprosessia. Tämän seurauksena sekä satelliittisolujen määrä, että aktivoitumisaste laskevat. (Suomennettu ja muokattu lähteestä: McCroskery *et al.* 2003).

Ríos *et al.* (2002) mukaan myostatiini-cDNA:n yliekspressio C2C12-soluissa estää myoblastien erilaistumista vähentämällä MyoD- ja myogeeniiproteiinien mRNA:n määrää, sekä kreatiinikinaasin (CK) aktiivisuutta. bHLH-perheen transkriptiotekijöiden, MyoD:n ja

MYF5:n ekspressio nisäkkäiden sikiönkehityksen aikana saa aikaan pluripotenttien mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumisen kohti myogeenistä solulinjaa. Tämän seurauksena bHLH-proteiiniperheen jäsenet myogeniini ja MRF4 saavat aikaan erilaistumisprosessin, jonka seurauksena myosyytit fuusioituvat osaksi monitumaisia lihassoluja ja alkavat ekspressoimaan lihasspesifisiä proteiineja. Koska myostatiinin ekspressio sikiönkehityksen aikana on rajoittunut lihakseen, Ríos et al. (2002) mukaan myostatiini todennäköisesti säätelee myogeenistä erilaistumista autokriinisen mekanismin kautta.

Myös McFarlane *et al.* (2006) tulokset myostatiinin vaikutuksesta MyoD:n ekspressioon ovat samansuuntaisia *in vitro* ja *in vivo*. Tutkimuksessa hiirten MyoD:n ekspressio väheni 84 % niihin ruiskutettiin myostatiinia yliekspressoivia kiinanhamsterin munasarjan soluja. Tulokset viittaavat voimakkaasti siihen, että MyoD:n ekspression vähentyminen johtui vähentyneestä pax3-transkriptiotekijän ekspressiosta sekä aktiivisuudesta. Pax3:n ekspressio väheni 50 % *in vitro* ja 30 % *in vivo* myostatiinikäsittelyn seurauksena. Vastaavasti pax3:n promoottoriaktiivisuus laski 75 % *in vitro*.

Sydänlihas ja myostatiini

Sydänlihas kykenee vaikuttamaan luurankoli hasten massaan erittämällä myostatiinia verenkiertoon Heineke *et al.* (2010) mukaan. Tutkimuksessa havaittiin, että sydänspesifinen myostatiinigeenin deletio kykeni estämään sydämen vajaatoiminnan indusoiman luurankoli hasten atrofian hiirillä. Sydänlihaksen vajaatoimintaan johtava kohonneen paineen aiheuttama hypertrofia saatiin aikaan TAC-menetelmällä (Transverse Aortic Constriction). Vastaavasti myostatiinin yliekspressio sydänlihaksessa aiheutti atrofiaa luurankoli haksissa, verenkierron myostatiinipitoisuuden noustessa 3-4-kertaiseksi verrattuna villityypin hiiriin. Sydänlihasspesifinen myostatiinin deletio ei vaikuttanut itse sydänlihaksen kokoon. Tutkimuksessa havaittiin myostatiinispesifisen vasta-aineen (JA-16) kykenevän estämään sydämen vajaatoiminnan aiheuttamaa luurankoli hasten atrofian mitattuna *Gastrocnemius*- ja *Quadriceps*-lihaksista. Myostatiinin estämisellä ei kuitenkaan ollut positiivista vaikutusta sydänlihaksen toimintaan. Kuolleisuus oli 4,3 prosenttiyksikköä alhaisempi myostatiinivasta-ainetta saaneilla hiirillä.

Mutaatiot myostatiinigeenissä

Myostatiinin toimintaa heikentävien mutaatioiden tiedetään ilmentyvän ylilihaksikkaana fenotyyppinä useilla nisäkäslajeilla (Rodriguez *et al.* 2014). Esimerkiksi *Belgian Blue*-karjarotu tunnetaan silmiinpistävän suuresta lihasmassastaan. Rodun suuri lihasmassa johtuu yhdentoista emäsparin deleetiosta myostatiinigeenin koodaavalla alueella. Mutaatio saa aikaan 275., 276. ja 277. aminohappotähteiden deleetion, sekä frameshiftin 274. aminohappotähteen jälkeen. Frameshiftin johdosta stop-kodoni sijoittuu 287. aminohappotähteen jälkeen, mikä aiheuttaa deleetion myostatiinin konservoituneimmalle alueelle. Rodulle ominainen lihaksikkuus on osittain resessiivinen ominaisuus, sillä heterotsygoottisenakin se saa aikaan lihasmassan kasvua, mutta vasta homotsygoottisena se saa aikaan lihasmassan kaksinkertaistumisen. *Belgian Bluen* tapauksessa lisääntynyt lihasmassa on seurausta lihassyiden hyperplasiasta, eikä lihassyiden hypertrofiasta. Lihaksikkuutensa lisäksi rodulle on tyypillistä alhainen rasva-, luu-, sisäelin- sekä ruuansulatuskanavan massa (Kambadur *et al.* 1997).

Belgian Blue-rodun lisäksi myös *Piedmontese*-nauta tunnetaan suuresta lihasmassastaan, joka on noin 20 % keskivertonautaa suurempi. Lisäksi rotu omaa pienemmän rasva- sekä luumassan. *Piedmontesen* tapauksessa myostatiinigeeni ekspressoidaan täysimittaisena. Geenin koodaavan alueen kodonissa 941 on kuitenkin G-A siirtymä, joka aiheuttaa kysteiini 314:n korvautumisen tyrosiinillä. Mutaatio todennäköisesti vaikuttaa negatiivisesti myostatiinin toimintaan, sillä kyseinen kysteiinitähde on konservoitunut TGF- β - ja inhibiini- β -proteiiniperheissä. *Piedmontese*-naudoilla tämä mutaatio esiintyy homotsygoottisena (Kambadur *et al.* 1997).

Vinttikoirien ryhmään kuuluvaa whippet-rotua on perinteisesti käytetty koirajuoksukilpailuissa. Whippetit ovat tyypillisesti hoikkarakenteisia, pitkäkaulaisia ja pienipäisiä. Kuitenkin, välillä syntyy niin sanottuja bully-whippettejä jotka ovat rakenteeltaan huomattavan lihaksikkaita. Ylilihaksikkaan fenotyyppin taustalta löytyy tässäkin tapauksessa homotsygoottinen mutaatio myostatiinigeenissä. Emäsparien 939 ja 940 deleetio geenin proteiinia koodaavalla alueella synnyttää stop-kodonin konservoituneen 313. kysteiinin tilalle. Sen seurauksena 375:n aminohapon proteiinista jää puuttumaan 63 aminohappoa ja proteiini menettää normaalin toimintakykynsä. Myös mutaation suhteen heterotsygoottisen whippetit ovat villityyppiä lihaksikkaampia, sekä huomattavasti nopeampia ja pärjäävät näin ollen villityyppiä paremmin juoksukilpailuissa (Mosher *et al.* 2007).

Mutaatiot myostatiinigeenissä ilmenevät lihaksikkuutena ja vähäisenä rasvakudoksena myös ihmisellä. Schuelke *et al.* (2004) tekemässä tapaustutkimuksessa selvitettiin geneettistä mekanismia poikkeuksellisen lihaksikkaan ihmislapsen tapauksessa. Poikkeuksellinen

lihassmassa oli jo syntymän hetkellä nähtävissä huomattavan suurista reisilihaksista. Tämän lisäksi hänelle kehittyi stimulaatioriippuvainen myoklonus syntymänsä jälkeen, mikä kuitenkin hiljalleen loppui kahden kuukauden kuluessa. 4,5 vuoden iässä ultraäänitutkimuksen perusteella potilaan nelipäisen reisilihaksen poikkipinta-ala oli 7,2 keskihajontaa suurempi kuin saman ikäisten ja sukupuolisten verrokkien keskiarvo. Ihon alaisen rasvakerroksen paksuus puolestaan oli 2,88 keskihajontaa ohuempi kuin verrokkiryhmällä. Reisiluun paksuus sekä lihaskudoksen rakenne olivat normaaleja. Tutkimuksen perusteella potilaan seerumista ei löydy lainkaan myostatiinia. Kyseiseltä potilaalta ei kuitenkaan löydy mutaatiota geenin proteiinia koodaavalta alueelta, vaan taustalla on silmukointikohtamutaatio, jonka seurauksena suurin osa mRNA:sta silmukoidaan virheellisesti. Tämän lisäksi ihmisillä tunnettiin 134 erilaista missense-mutaatiota myostatiinia koodaavassa geenissä vuoteen 2017 mennessä (Cotton *et al.* 2018).

Myostatiinin manipulointi ja myostatiini-inhibiittorit

Myostatiinipropeptidi

Myostatiinin toimintaa voidaan pyrkiä estämään erilaisten inhibiittoreiden avulla. Yksi mahdollisuus on käyttää myostatiinin propeptidiä. Propeptidi toimii myostatiinin sisäsyntyisenä inhibiittorina sitoutumalla siihen muodostaen latentin kompleksin ja näin ollen estämällä sitoutumisen ActII-reseptoriin (Cotton *et al.* 2018). Propeptidin yliekspressiolla on näin ollen mahdollista pienentää myostatiinin biosaatavuutta ja myostatiinisignalointia (Li *et al.* 2010). Myostatiini saavuttaa aktiivisen muotonsa, kun BMP-1/TLD-perheen metalloproteasit leikkaavat propeptidin ja vapauttavat kypsän myostatiinin (Cotton *et al.* 2018). Li *et al.* (2010) käyttivät tutkimuksessaan propeptidiä, jossa BMP-1/TLD:n leikkauskohtiin on kohdistettu pistemutaatio, mikä estää proteaasiaktiivisuuden propeptidiä kohtaan. Tutkimuksen mukaan näin modifioitu propeptidi on huomattavasti tehokkaampi myostatiini-inhibiittori kuin villityypin propeptidi *in vitro*, inkubaatioajan ollessa riittävän pitkä. Modifioidun propeptidin injektoiminen neonataalisiin hiiren poikasiin myös ilmeni voimakkaana lihaskasvuna. Injektiot antaminen 11 ja 18 päivän iässä sai aikaan 13,5 %-24,8 % lihassmassan lisäyksen 25-57 päivän ikään mennessä.

Follistatiini

Follistatiini (FST) on sisäsyntyinen glykoproteiini, joka kykenee sitoutumaan myostatiiniin ja näin ollen estämään myostatiinisignaloinnin. Lisäksi se kykenee sitoutumaan aktiviineihin, GDF-11:een sekä joihinkin BMP-proteiineihin (Thompson *et al.* 2005, Bernard *et al.* 2009; Castonguay *et al.* 2019). Follistatiinigeenistä saadaan vaihtoehtoisella silmukoinnilla 344 tai 317 aminohapon pituiset esiasteet, joista post-translationalisesti muokkaamalla saadaan 315 tai 288 aminohappoa käsittävät FST315 ja FST288 (Castonguay *et al.* 2019).

FST-288-Fc:n, jossa ihmisen FST-288 oli fuusioitu ihmisen IgG-Fc-domeenin kanssa, injektointi hiiren *gastrocnemius*-lihakseen kykenee indusoimaan voimakasta hypertrofiaa kohdelihaksessa, muttei sen ympärillä. Vaikutus on annosriippuvainen. FST-288-Fc:n systeeminen annostelu ei vaikuta lihasmassaan, koska verenkierrossa se kokee nopean proteolyysin, jonka lopputuotteet eivät kykene sitoutumaan ligandiin (Castonguay *et al.* 2019). Follistatiinifuusioproteiinin vaikutukset ovat samanlaisia myös ihmisillä. ACE-083, jossa modifioitu ihmisen follistatiini on fuusioitu ihmisen IgG:hen kykeni kasvattamaan *tibialis anterior*- ja *rectus femoris*-lihasten tilavuutta 14,5 % ja 8,9 % (Glasser *et al.*, 2018).

Follistatiinin vaikutus lihasmassaan ei kuitenkaan välity pelkästään myostatiini-inhibitiion kautta. Follistatiinin yliekspressio myostatiini-knock-out-hiirillä saa aikaan noin nelinkertaisen lihasmassan, kun pelkkä myostatiinin poistaminen kaksinkertaistaa sen (Se-Jin 2007).

Dekoriini

Dekoriini on pienikokoinen leusiinirikas proteiiniglykaani joka kykenee säätelemään myostatiinin sekä TGF- β :n aktiivisuutta sitoutumalla niihin ja näin ollen pienentäen niiden biosaatavuutta. Dekoriini koostuu ydinproteiinista sekä dermatani/kondroitiinisulfaattiketjusta, joka on kiinnittynyt N-terminaaliseen seriiniin. Se on metalloproteiini ja tarvitsee riittävän Zn⁺⁺-konsentraation saavuttaakseen inhibitorisen vaikutuksensa. Dekoriini osallistuu kollageenifibrillien muodostukseen ja kollageenisäikeiden stabilointiin, sekä solujen kasvun säätelyyn solukalvon reseptoreiden välityksellä ja sitoutumalla kasvutekijöihin rajoittaen niiden biosaatavuutta. Dermataani/kondroitiinisulfaattiketjun poistaminen ei vaikuta sen aktiivisuuteen, vaan se sitoutuu myostatiiniin ydinproteiininsa avulla. Myös kollageeniin sitoutuneena dekoriini kykenee inhiboimaan myostatiinin biosaatavuutta (Miura *et al.* 2006).

Li *et al.* (2007) mukaan myoblastien transfektoiminen dekoriinia koodaavalla plasmidilla kiihdyttää merkittävästi solujen erilaistumista ja lihassäikeiden muodostumista sekä lisää syntyneiden lihassäikeiden kokoa. Transfektion seurauksena follistatiinin, PGC-1 α :n, p21:n ja myogeenisten geenien kuten MyoD:n Myf5:n, Myf6:n ja myogeniinin ekspressio lisääntyy, kun samaan aikaan myostatiinin ekspressio pienenee. Tämä on linjassa Rios *et al.* (2012) tulosten kanssa, joiden mukaan myostatiinin yliekspressio vastaavasti vähentää MyoD:n, myogeniinin ja Myf5:n ekspressiota, näin ollen estäen myoblastien erilaistumista.

Kiihtyneen myogeneesin ohella dekoriini inhiboi lihaskudosten fibroosia, mistä on hyötyä lihaksen toimintakyvyn palautumisen kannalta, kun toivutaan lihasvauriosta. Dekoriinin fibroosia estävä vaikutus välittyy pääasiassa TGF- β -inhibition kautta (Li *et al.* 2007).

Myostatiinirokote

Myostatiinin biosaatavuutta on mahdollista manipuloida myös provosoimalla immuunipuolustus tuottamaan kehon omalle myostatiinille spesifisiä vasta-aineita. Zhang *et al.* (2011) mukaan tämä on mahdollista injektoitavan tai oraalisin rokotteen avulla, jossa lämpötapettu *S. cerevisiae* toimii antigeenien kuljettimena. Tutkimuksen mukaan perinteisellä injektoitavalla rokotteella oli oraalista versiota suurempi vaikutus hiirien kehonpainoon (Zhang *et al.*, 2011).

Tang *et al.* (2007) puolestaan rokottivat tutkimuksessaan BALB/c-hiiriä plasmidi-DNA-rokotteella, jossa tetanustoksiinin epitooppia koodaava sekvenssi oli fuusioitu kypsän myostatiinin N-terminaalia koodaavaan sekvenssiin. Rokotuksen seurauksena hiirten *quadriceps*-lihasten massa kasvoi 31,4 % ja *gastrocnemius*-lihasten massa 13,9 % verrattuna kontrolliryhmään. Samalla koe-eläinten otevoima kasvoi 36,5 %. Myös lihasten poikkipinta-ala kasvoi ilman että lihassolujen lukumäärä kasvoi. Toisin sanoen lihasmassan lisääntyminen johtui hypertrofiasta eikä hyperplasiasta.

Voimaharjoittelu ja myostatiini

Akuutti voimaharjoittelu laskee plasman myostatiinikonsentraatiota, yksilöiden välisen vaihtelun ollessa suurta Walker *et al.* (2004) mukaan. Tutkimuksen mukaan konsentraation

lasku oli keskimäärin 20%, kun alimmillaan se oli 5,9 % ja korkeimmillaan 56,9 %. Tutkimuksen koehenkilöt olivat iältään 18-45 vuotiaita miehiä ja heillä oli kokemusta voimaharjoittelusta, muttei tutkimusta edeltäneen 6kk ajalta. Määrittämissä käytetyt vasta-aineet kykenivät sitoutumaan kypsään myostatiiniin suurella affiniteetillä, sekä myostatiini-proopeptidi-kompleksiin pienemmällä affiniteetillä, joten tulos ei koske pelkästään aktiivista myostatiinia.

Harjoituksen vaikutus myostatiinin ekspressioon näyttäisi riippuvan henkilön iästä sekä sukupuolesta. Kim *et al.* (2005) mukaan voimaharjoittelu vähensi reisilihasten myostatiini-mRNA:n ekspressiota nuorilla (20-30 vuotiaat) miehillä ja naisilla sekä vanhoilla (60-75 vuotiaat) miehillä, muttei vanhoilla naisilla. Tämä voisi selittää huonon lihaskasvuvasteen voimaharjoitteluun ikääntyneillä naisilla. Koehenkilöillä ei ollut aiempaa kokemusta alaraajoihin kohdistuvasta voimaharjoittelusta.

Willoughby (2004) mukaan pitkäkestoinen (12 viikkoa) voimaharjoittelujakso kuitenkin lisäsi myostatiini-mRNA:ta ja seerumin myostatiinia (32 % ja 53 %), sekä FLRG:tä (Follistatin Related Gene) (127%), kortisolia, glukokortikoidi reseptoria ja myofibrillaarista proteiinia 6. ja 12. viikolla mitattuna. Samalla ActIIB-reseptorin ekspressio vähentyi 18 %. Myostatiinin ekspression lisääntymisestä huolimatta koehenkilöiden reisien lihassmassa, lihasvolyymi, myofibrillaarinen proteiini sekä lihasvoima lisääntyivät huomattavasti (järjestyksessä 28 %, 19 %, 67 % ja 41 %). FLRG inhiboi myostatiinia sitoutumalla siihen ja estämällä kiinnittymisen ActIIB-reseptoriin. Merkittävä lihassmassan ja -voiman lisäys lisääntyneestä myostatiinin ekspressiosta huolimatta voisi täten selittyä samanaikaisesti lisääntyneellä FLRG:n, sekä vähentyneellä ActIIB:n ekspressiolla.

Kuitenkin Kim *et al.* (2007) mukaan erot myostatiinin ekspressiossa eivät selitä yksilöiden välisiä eroja voimaharjoittelun aiheuttamassa lihaskasvuvasteessa. Tutkimuksen koehenkilöt (yhteensä 66) olivat 20-75 vuotiaita miehiä ja naisia, joilla ei ollut aiempaa kokemusta voimaharjoittelusta kuluneen viiden vuoden ajalta. Koehenkilöt luokiteltiin kolmeen ryhmään *Vastus Lateralis*-lihaksen keskimääräisen poikkipinta-alan kasvun mukaan. Harjoitusjakso sisälsi reidenojennuksia, jalkakyykkyjä sekä jalkaprässiä kolmena päivänä viikossa 16 viikon ajan. Lihasbiopsiat ja verinäytteet otettiin ennen harjoitusjaksoa, 24 tuntia ensimmäisen harjoituksen jälkeen, sekä 24 tuntia viimeisen harjoituksen jälkeen. Lihasnäytteistä analysoitiin myostatiini-, sykliini D1-, p21^{cip1}- ja p27^{kip1}-mRNA:iden ja latentin myostatiini-proopeptidi-kompleksin sekä myostatiini-proopeptidin pitoisuudet. Verinäytteistä puolestaan analysoitiin

aktiivisen myostatiinin konsentraatio. mRNA-analyysissä käytettiin 18s-ribosomaalista RNA:ta sisäisenä standardina. Yksilöiden väliset erot sekä lihaskasvussa, että myostatiinikompleksin ja aktiivisen myostatiinin konsentraatioissa olivat suuria. Erot myostatiinin konsentraatioissa eivät kuitenkaan selittäneet eroja lihaskasvuvasteissa. Tutkimuksen mukaan myostatiini-mRNA:n määrä laski 16 viikon jakson aikana, kun samaan aikaan aktiivisen myostatiinin ja propeptidin pitoisuudet säilyivät muuttumattomina ja latentin kompleksin pitoisuus kasvoi. Heinemeier (2007) mukaan tämä ristiriita voi selittyä 18S-ribosomaalisen RNA:n käytöstä sisäisenä standardina. Harjoittelu kykenee lisäämään ribosomaalisen RNA:n pitoisuutta merkittävästi. Tämän takia mRNA-pitoisuus voi näennäisesti vähentyä, kun sitä verrataan ribosomaalisen RNA:han. Samaan aikaan myostatiinisynteesin taso voi säilyä ennallaan tai lisääntyä johtuen tehostuneesta translaatiosta. Kim *et al.* (2007) tutkimuksessa havaittiin myös kokonais-RNA-pitoisuudessa 40 % nousu harjoitusjakson jälkeen, sekä parhaan hypertrofiavasteen omanneilla yksilöillä myös akuutisti heti ensimmäisen harjoituksen jälkeen (26 %). Heinemeier (2007) mukaan 18S- ja 28S-RNA:t muodostavat noin 80 % solujen kokonais RNA:sta, jolloin suuri kokonais-RNA:n nousu johtuu todennäköisesti nimenomaan ribosomaalisen-RNA:n kasvusta.

Yksittäisen vastusharjoittelukerran vaikutus myostatiini-mRNA:n ekspressioon riippuu voimaharjoittelutaustasta Hulmi *et al.* (2007) mukaan. Tulosten mukaan myostatiini-mRNA:n akuutti väheneminen voimaharjoittelujaksoa seuranneen harjoituksen jälkeen myös korreloi voimakkaasti voimaharjoittelujakson aikana saavutetun lihaskasvun kanssa. Tutkimukseen sisältyi 21 viikon mittainen valvottu voimaharjoittelujakso, jota ennen ja jonka jälkeen suoritettiin standardoitu vastusharjoitussessio molemmille jaloille jalkaprässissä. Koehenkilöt olivat 50-77 vuotiaita miehiä, joilla ei ollut voimaharjoittelutaustaa. Voimaharjoittelujaksoa ennen suoritettuna yksittäinen vastusharjoittelusessio ei vähentänyt myostatiini-mRNA:ta, kun taas harjoitusjakson jälkeen suoritettuna myostatiini-mRNA oli vähentynyt huomattavasti (48 %) mitattuna 48 tuntia harjoittelusessiosta. Muutos oli kääntäen verrannollinen koko kehon lihasmassan muutokseen, sekä *vastus lateralis*- ja *intermedius*-lihasten paksuuteen. 21 viikon voimaharjoittelujakson jälkeen yksittäisen harjoituksen aiheuttama muutos myostatiini-mRNA:ssa oli kääntäen verrannollinen harjoitustaa edeltäneeseen arvoon sekä voimaharjoittelujakson aiheuttamaan muutokseen basaali-arvoissa. Viikko voimaharjoittelujakson jälkeen mitattuna myostatiini-mRNA nousi merkittävästi (57 %). Yksittäinen harjoituskerta vähensi myös ActIIB-mRNA:ta sekä ennen, että jälkeen voimaharjoittelujakson. Vaikutus oli suurempi ennen harjoitusjaksoa (42 %), kuin sen jälkeen

(29 %) mitattuna 48 tuntia yksittäisen harjoittelusession jälkeen. Vaikuttaisi siis siltä, että pitkäaikainen voimaharjoittelu lisää myostatiinin transkriptiota, kun taas akuutisti yksittäisen harjoituksen jälkeen myostatiinin transkriptio vähenee. Tutkimuksessa analysoitiin myös vastaavasti mahdolliset FLRG-, P27^{kip}-, MyoD-, ja myogeniini-mRNA:n pitoisuuden muutokset, joista FLRG:n ja P27^{kip}:n pitoisuudet säilyivät muuttumattomina. MyoD-mRNA:n pitoisuus puolestaan kasvoi vastusharjoituksen vaikutuksesta sekä ennen 21viikon voimaharjoittelujaksoa, että sen jälkeen. MyoD:n harjoittelun jälkeinen keskimääräinen ekspressio oli korkeampaa ennen voimaharjoittelujaksoa, kuin sen jälkeen. Myostatiini-mRNA:n muutos voimaharjoittelujakson aikana korreloi kääntäen MyoD-mRNA:n muutoksen kanssa. Myogeniini-mRNA:n pitoisuus nousi akuutisti yksittäisen vastusharjoituksen jälkeen, ennen ja jälkeen voimaharjoittelujakson, sekä oli selvästi koholla viikko voimaharjoittelujakson jälkeen (103%).

Ravintoaineiden vaikutus myostatiiniin

Kreatiinisupplementaatio

Saremi *et al.* (2010) mukaan oraallinen kreatiinisupplementaatio yhdistettynä voimaharjoitteluun laskee akuutisti seerumin myostatiinikonsentraatiota enemmän, kuin voimaharjoittelu yksinään. Kreatiini + voimaharjoittelu -ryhmässä myostatiini konsentraation lasku oli 17 %, kun plasebo + voimaharjoittelu -ryhmässä se oli 7 %. Tutkimuksen koehenkilöt olivat nuoria miehiä, keskimäärin 23,42 vuotta, (\pm 2,2 vuotta). Verinäytteet kerättiin koehenkilöiltä 48 tuntia harjoituksen jälkeen. Verinäytteistä määritettiin myostatiini- sekä GASP-1-konsentraatiot. Tulosten mukaan kreatiinisupplementaatio yhdistettynä voimaharjoitteluun ei nostanut seerumin GASP-1-konsentraatiota enempää, kuin voimaharjoittelu itsessään. GASP-1 on proteiini, joka kykenee sitoutumaan myostatiiniin, sekä GDF-11:ta ja näin ollen estämään niiden sitoutumista reseptoreihinsa (Lee & Lee 2013).

D-vitamiinisupplementaatio

D-vitamiinin tiedetään nostavan tyypin IIa nopeiden lihassolujen lukumäärää. D-vitamiinin puutoksen puolestaan tiedetään aiheuttavan tyypin IIa lihassolujen atrofiaa. D-vitamiinin

puutoksesta kärsivillä nuorilla miehillä tehdyn tutkimuksen mukaan D-vitamiinisupplementaatio lisäsi tyypin IIa solujen osuutta ja lisäsi lihasvoimaa (Koundourakis *et al.* 2016).

D-vitamiinin aktiivinen muoto 1,25-dihydroxivitamiini-D laskee C2C12-solujen myostatiinin ekspressiota ja samalla nostaa follistatiinikonsentraatiota Garcia *et al.* (2011) mukaan. Tutkimuksessa analysoitiin myostatiini-mRNA:n sekä myostatiinin konsentraatiot 4 ja 7 päivän inkubaatioajan jälkeen. Myostatiini-mRNA konsentraatio väheni 2,5- ja 10-kertaisesti kontrolleihin verrattuna, myostatiinikonsentraation muutoksen ollessa suhteessa samansuuntainen. Immunosytokemiallisen analyysin perusteella myostatiini väheni 5,5-kertaisesti kontrollinäytteisiin verrattuna ja oli lokalisoitunut pääasiassa sytoplasmaan. Follistatiini-mRNA-konsentraatio nousi 4 päivän inkubaatioajalla 2,5-kertaiseksi ja proteiinikonsentraatio 7 päivän inkubaatioajalla 4,5-kertaiseksi.

Epikatekiinit

Gutierrez-Salmean *et al.* (2014) mukaan muun muassa kaakao-pavussa esiintyvä (-)-epikatekiini kykenee laskemaan lihasten myostatiinipitoisuutta, nostamaan follistatiinipitoisuutta, sekä vaikuttamaan myogeenisiin transkriptiotekijöihin. Sekä vanhoilla (26kk), että nuorilla (6kk) epikatekiinin oraalinen annostelu vähensi lihaslysaatin myostatiinikonsentraatiota. Vanhoilla hiirillä lasku oli 21 %, kun nuorilla se oli 15 %. Samalla lihaksen follistatiinipitoisuus nousi vanhoilla hiirillä 51 %, nuorten hiirien tapauksessa nousun ollessa vähäisempi. Myös transkriptiotekijöiden MYF5, MEF2, MyoD ja myogeniinin pitoisuus nousi epikatekiini-supplementaation seurauksena hiirten luurankolihasissa. MEF2 nousi vanhoilla hiirillä 19 % ja 10 % nuorilla. Vastaavasti MyF5 nousi vanhoilla 15 % ja nuorilla 12 % sekä myogeniini 21 % ja 16 %. MyoD:n pitoisuus nousi 19 % vanhoilla hiirillä. Ihmisillä epikatekiinin oraalinen annostelu 25mg kahdesti päivässä annosteltuna lisäsi molempien käsien puristusvoimaa 7 %. Samaan aikaan plasman follistatiini/myostatiini-suhde nousi 49,2 %. Tutkimuksessa havaittiin myös seerumin follistatiinin, MyoD:n ja myogeniinin voimakas lasku ikääntymisen myötä (järjestyksessä: 30 %, 41 %, 47%), sekä myostatiinin ja vanhuusliitännäisen β -galaktosidaasin samanaikainen voimakas lisääntyminen (järjestyksessä: 28 %, 48 %). Tutkimus oli luonteeltaan alustava. Koehenkilöiden määrä oli vähäinen, vain 6 henkilöä, eikä tutkimuksessa ollut plasebokontrollia.

Mafi, *et al.* (2019) mukaan (-)-epikatekiinisupplementaatio yhdistettynä voimaharjoitteluun nosti plasman follistatiinipitoisuutta ja follistatiini/myostatiini suhdetta enemmän kuin voimaharjoittelu yksinään. Vaikutus oli tilastollisesti merkittävä myös pelkällä

epikatekiinisupplementaatiolla. Myostatiini konsentraation lasku itsessään ei tutkimuksessa saavuttanut tilastollista merkittävyyttä. Myöskään parannukset kehonkoostumuksissa, lihasvoimassa ja fyysisessä suorituskävyssä eivät saavuttaneet tilastollista merkittävyyttä epikatekiini ja epikatekiini + voimaharjoittelu -ryhmillä verrattuna plasebo ja plasebo + voimaharjoitteluryhmiin. Tutkimukseen osallistui 68 koehenkilöä ja se oli luonteeltaan kaksoissokkotutkimus.

Androgeenien vaikutus myostatiinisignointiin

Androgeenit kykenevät estämään omaa anabolista vaikutustaan lisäämällä myostatiinin ekspressiota suoraan transkriptionaalisella tasolla Dubois et al. (2014) mukaan. Tutkimuksessa käytettiin hiiriä, joilla androgeenireseptoria koodaava geeni oli tehty toimimattomaksi satelliittisoluisissa. Knock-out-hiirillä myostatiinin ekspressio putosi kuudesosaan verrattuna villityypin hiiriin. Samalla raajojen yhteenlaskettu otevoima putosi 7 % ja *levator ani*-lihaksen massa putosi 52 %. *Soleus*-lihaksessa tyyppin I lihassolujen määrä kasvoi 10 %, kun taas tyyppin II solujen määrä laski 10 %.

Kasvuhormonin vaikutus myostatiinisignointiin

Liu *et al.* (2003) mukaan kasvuhormonipistokset vähentävät huomattavasti myostatiinin ekspressiota hypopituitarismia sairastavilla aikuisilla. Tutkimuksessa saavutettiin 31 % lasku myostatiini-mRNA:n ekspressiossa kasvuhormonin päiväannoksen ollessa 5µg/kg. Samalla potilaiden rasvaton massa kasvoi ja maksimaalinen hapenottokyky paranivat. Kasvuhormonin negatiivinen vaikutus myoblastien myostatiinin ekspressioon havaittiin myös *in vitro*. Kasvuhormonireseptorin salpaaminen vastaavasti lisäsi myoblastien myostatiinin ekspressiota *in vitro*.

Yhteenveto ja pohdintaa

Myostatiini on tärkeä lihaskasvun negatiivinen säätelijä ja sen toimintaa heikentävät mutaatiot ilmenevät yllihaksikkaana fenotyyppinä useilla nisäkäslajeilla. (Rodriguez *et al.* 2014). Myostatiini syntetisoidaan inaktiivisena esiasteena, josta se saadaan vaiheittain proteolyttisesti käsittelemällä aktiiviseen muotoonsa. Myostatiini voidaan erittää solusta joko

täysin käsittelemättömänä, tai niin että se on läpikäynyt ensimmäisen proteolyyttisen käsittelyn. Käsittelemätön kompleksi sitoutuu lihaksen ekstrasellulaariseen matriksiin. Käsitelty kompleksi puolestaan siirtyy verenkiertoon, missä se kohtaa toisen proteolyyttisen käsittelyn. Tämän seurauksena kypsä myostatiini kykenee dissosioitumaan pro-peptidistään ja näin ollen aktivoitumaan (Cotton *et al.* 2018).

Anti-hypertrofisen ja anabolisen vaikutuksensa myostatiini välittää tyypin II aktiiviinireseptorin kautta. Sitoutumisen seurauksena syntyy tyypin II ja tyypin I reseptorien muodostama kompleksi, joka fosforyloi Smad2- ja Smad2-transkriptiotekijöitä, minkä seurauksena anabolialla indusoiva AKT/mTOR-signalointi vaimenee (Rebbapragada *et al.* 2003, Amirouche *et al.* 2009, Chelh *et al.* 2009, Morissette *et al.* 2009). Vastaavasti AKT/FOXO-välitteiset kataboliset reitit mahdollisesti voimistuvat (McFarlene *et al.* 2006, Mendias *et al.* 2011). Toisaalta Taylor *et al.* (2001) ja Amirouche *et al.* (2009) eivät löytäneet merkkejä myostatiinin kyvystä lisätä proteiinien hajotusta. Myostatiinin aiheuttama AKT:n aktiivisuuden lasku ja siihen liittyvä lihaskasvu näyttävät joka tapauksessa varmoilta.

Myöskin myostatiinin itsesäätely tapahtuu Smad-välitteisesti. Kohonnut Smad2:n ja Smad3:n ekspressio johtaa lisääntyneeseen Smad7:n ekspressioon (Forbes *et al.* 2006). Smad7 puolestaan estää reseptorikompleksin toiminnan, jolloin Smad2:n ja Smad3:n aktiivisuus laskee (Nakao *et al.* 1997, Forbes *et al.* 2006). Smad7 voisi olla yksi mahdollinen kohde, kun etsitään mahdollisia kohteita myostatiinisignaloinnin vaimentamiseen ja edelleen hoitomuotoja sairauksiin.

Myostatiinin lihaskasvua estävä vaikutus johtuu osittain myös sen kyvystä estää satelliittisolujen aktivaatiota, sekä itseuudistumisprosessia. Tämä vaikutus johtuu kohonneen p21-pitoisuuden seurauksena vähentyneestä cdk-aktiivisuudesta, mikä saa solut pysähtymään solusyklin G1-vaiheeseen (Rios *et al.* 2002, McCroskery *et al.* 2003, McFarlene *et al.* 2006). Tulokset ovat linjassa Li *et al.* (2007) dekoriinin yliekspressiolla tapahtuvaa myostatiinin inhibiointia koskevien tulosten kanssa. Niiden mukaan inhibition kautta lisääntynyt myogeenisten geenien ja follistatiinin ekspressio oli yhteydessä kasvaneeseen lihasmassaan.

Lisäksi sydänlihas kykenee erittämänsä myostatiinin avulla säätelemään luurankolihasmassaa sydämen vajaatoiminnan yhteydessä (Heineke *et al.* 2010). Tämä herättää kysymyksen, sydänlihaksen kunnon merkityksestä lihasmassan säilymiseen ja kasvatukseen myöskin sydämen vajaatoimintaa sairastamattomilla ihmisillä.

Myostatiinin toimintaa on mahdollista manipuloida erilaisten inhibiittoreiden avulla. Inhibiittoria voidaan joko injektoida suoraan lihakseen, tai geneettisesti muokkaamalla aiheuttaa inhibiittorin yliekspressio. Yksi mahdollisuus on injektoida myostatiini-inhibiittorina toimivaa follistatiinia lihakseen tai aiheuttaa sen yliekspressio geenivektorin avulla (Miura *et al.* 2006, Se-Jin 2007, Glasser *et al.* 2018, Castonguay *et al.* 2019). Dekoriinin yliekspressio plasmidivektorin avulla niin ikään aiheuttaa luurankolihasen kasvua myostatiini-inhibiition kautta (Li *et al.* 2007). Immuunipuolustus on myöskin mahdollista provosoida muodostamaan vasta-aineita kehon omaa myostatiinia vastaan joko injektoitavan, tai oraalisen rokotteen avulla (Tang *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2011). Toimivan ihmiskäyttöön sopivan inhibiintimenetelmän löytyminen voisi merkitä hoitomuotoa lihasrappeumaa aiheuttaviin ja siitä johtuviin sairauksiin. Menetelmän olisi kuitenkin hyvä olla vain lihaskudokseen vaikuttava, sekä toteutettavissa syntymän jälkeen. Tällaisten hoitomuotojen voinee olettaa kiinnostavan myös dopingkäytössä esimerkiksi kilpaurheilijoita tai jopa tavallisia kuntourheilijoita. Tästä syystä hoitomuotojen kehittyminen vaatii dopingtestaajilta mahdollisesti uusien testausmenetelmien kehittelyä, sekä mahdollisten eettisten kysymysten pohdintaa.

Myostatiinin määrään voidaan vaikuttaa myöskin voimaharjoittelun avulla. Voimaharjoittelu näyttäisi nostavan myostatiinin ekspressiota pitkällä aikavälillä, kun taas yksittäinen harjoituskerta kykenee laskemaan sitä (Hulmi *et al.* 2007). Näin ollen voi päätellä, että myostatiinin alassäätelyllä on tärkeä merkitys voimaharjoittelusta seuraavaan lihaskasvun aiheuttajana.

Erilaisten ravintoaineiden vaikutuksesta myostatiiniin on hieman näyttöä. Kreatiini yhdistettynä voimaharjoitteluun näyttäisi vähentävän myostatiinin ekspressiota enemmän kuin voimaharjoittelu yksinään (Saremi *et al.* 2010). D-vitamiini kykenee vähentämään myostatiinin ekspressiota ainakin soluviljelmällä (Garcia *et al.* 2011). Myöskin (-)-epikatekiini kykenee mahdollisesti pienentämään plasman ja lihaskudoksen myostatiinikonsentraatiota ja nostamaan myostatiinia inhiboivan follistatiinin pitoisuutta (Güiterrez-Salmean *et al.* 2014, Mafi *et al.* 2019). Näyttö näiden aineiden toimivuudesta myostatiini-inhibiittoreina on kuitenkin vähäistä, joskin osittain lupaavaa.

Androgeenisten anabolisten steroidien anabolinen vaikutus ei välity vähentyneen myostatiinisignaloinnin seurauksena. Päinvastoin, androgeenit kykenevät suoraan lisäämään myostatiinin ekspressiota transkriptionaalisella tasolla. Näin ollen ne kykenevät itse vähentämään omaa anabolista vaikutustaan (Dubois *et al.* 2014). Tulos on yllättävä, kun

ajatellaan anabolisten steroidien vaikutusta lihasmassaan. Kasvuhormoni puolestaan kykenee vähentämään myostatiinin määrää kasvuhormonin puutoksesta kärsivillä ihmisillä, mikä johtaa lisääntyneeseen lihasmassaan (Liu *et al.* 2003).

Tulevaisuuden myostatiinitutkimuksen suuntana lienee saada markkinoille toimivia ja turvallisia myostatiiniantagonisteja, joiden TGF- β -signalointia inhihoiva vaikutus rajoittuu lihaskudokseen.

Kirjallisuusviitteet

Amirouche, A., Durieux, A., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Mouret, C., . . . Freyssenet, D. (2009). Down-regulation of akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*, 150(1), 286-294. doi:10.1210/en.2008-0959

Bernard, D. J., Cash, J. N., McPherron, A. C., Thompson, T. B., & Rejon, C. A. (2009). The structure of myostatin:Follistatin 288: Insights into receptor utilization and heparin binding. *The EMBO Journal*, 28(17), 2662-2676. doi:10.1038/emboj.2009.205

Bodine, S. C., & Baehr, L. M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 307(6), E484. doi:10.1152/ajpendo.00204.2014

Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., . . . Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology*, 3(11), 1014. doi:10.1038/ncb1101-1014

Castonguay, R., Lachey, J., Wallner, S., Strand, J., Liharska, K., Watanabe, A. E., . . . Kumar, R. (2019). Follistatin-288-fc fusion protein promotes localized growth of skeletal muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 368(3), 435-445.

Chelh, I., Meunier, B., Picard, B., Reecy, M. J., Chevalier, C., Hocquette, J., & Cassar-Malek, I. (2009). Molecular profiles of quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets. *BMC Genomics*, 10(1), 196. doi:10.1186/1471-2164-10-196

- Copps, K., & White, M. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55(10), 2565-2582. doi:10.1007/s00125-012-2644-8
- Cotton, T. R., Fischer, G., Wang, X., McCoy, J. C., Czepnik, M., Thompson, T. B., & Hyvönen, M. (2018). Structure of the human myostatin precursor and determinants of growth factor latency. *The EMBO Journal*, 37(3), 367-383. doi:10.15252/emboj.201797883
- Dubois, V., Laurent, M. R., Sinnesael, M., Cielen, N., Helsen, C., Clinckemalie, L., . . . Claessens, F. (2014). A satellite cell-specific knockout of the androgen receptor reveals myostatin as a direct androgen target in skeletal muscle. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(7), 2979-2994. doi:10.1096/fj.14-249748
- Elkina, Y., von Haehling, S., Anker, S., & Springer, J. (2011). The role of myostatin in muscle wasting: An overview. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2(3), 143-151. doi:10.1007/s13539-011-0035-5
- Forbes, D., Jackman, M., Bishop, A., Thomas, M., Kambadur, R., & Sharma, M. (2006). Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *Journal of Cellular Physiology*, 206(1), 264-272. doi:10.1002/jcp.20477
- Garcia, L. A., King, K. K., Ferrini, M. G., Norris, K. C., & Artaza, J. N. (2011). 1,25(OH)₂Vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 152(8), 2976-2986. doi:10.1210/en.2011-0159
- Glass David, J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(10), 1974-1984. doi:10.1016/j.biocel.2005.04.018
- Glasser, C. E., Gartner, M. R., Wilson, D., Miller, B., Sherman, M. L., & Attie, K. M. (2018). Locally acting ACE-083 increases muscle volume in healthy volunteers. *Muscle & Nerve*, 57(6), 921-926. doi:10.1002/mus.26113
- Gutierrez-Salmean, G., Ciaraldi, T. P., Nogueira, L., Barboza, J., Taub, P. R., Hogan, M. C., . . . Ramirez-Sanchez, I. (2014). Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 91-94. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.09.007

- Heineke, J., Auger-Messier, M., Xu, J., Sargent, M., York, A., Welle, S., & Molckentin, J. D. (2010). Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation*, 121(3), 419-425. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.882068
- Heinemeier, K. M. (2007). Using ribosomal RNA as a reference in mRNA quantification. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 103(5), 1914; author reply 1915. doi:10.1152/jappphysiol.00862.2007
- Hulmi, J. J., Ahtiainen, J. P., Kaasalainen, T., Pöllänen, E., Häkkinen, K., Alen, M., . . . Mero, A. A. (2007). Postexercise myostatin and activin Iib mRNA levels: Effects of strength training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(2), 289-297. doi:10.1249/01.mss.0000241650.15006.6e
- Iskenderian, A., Liu, N., Deng, Q., Huang, Y., Shen, C., Palmieri, K., . . . Ehmann, D. E. (2018). Myostatin and activin blockade by engineered follistatin results in hypertrophy and improves dystrophic pathology in mdx mouse more than myostatin blockade alone. *Skeletal Muscle*, 8(1), 1-16. doi:10.1186/s13395-018-0180-z
- Ji, S., Losinski, R. L., Cornelius, S. G., Frank, G. R., Willis, G. M., Gerrard, D. E., . . . Spurlock, M. E. (1998). Myostatin expression in porcine tissues: Tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *The American Journal of Physiology*, 275(4), 1265. doi:10.1152/ajpregu.1998.275.4.R1265
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P., & Bass, J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled belgian blue and piedmontese cattle. *Genome Research*, 7(9), 910. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314496>
- Kim, J., Cross, J. M., & Bamman, M. M. (2005). Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 288(6), 1110. doi:10.1152/ajpendo.00464.2004
- Kim, J., Petrella, J. K., Cross, J. M., & Bamman, M. M. (2007). Load-mediated downregulation of myostatin mRNA is not sufficient to promote myofiber hypertrophy in humans: A cluster analysis. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 103(5), 1488-1495. doi:10.1152/jappphysiol.01194.2006
- Koundourakis, N. E., Avgoustinaki, P. D., Malliaraki, N., & Margioris, A. N. (2016). Muscular effects of vitamin D in young athletes and non-athletes and in the elderly. *Hormones (Athens, Greece)*, 15(4), 471-488. doi:10.14310/horm.2002.1705

- Lee, J. Y., Hopkinson, N. S., & Kemp, P. R. (2011). Myostatin induces autophagy in skeletal muscle in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415(4), 632-636. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.124
- Lee, Se-Jin & Glass, David. (2011). Treating cancer cachexia to treat cancer. *Skeletal muscle*. 1. 2. 10.1186/2044-5040-1-2.
- Lee, Y., & Lee, S. (2013). Regulation of GDF-11 and myostatin activity by GASP-1 and GASP-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), 3713. doi:10.1073/pnas.1309907110
- Li, J., Li, Y., Zhu, J., Sun, B., Branca, M., Tang, Y., . . . Huard, J. (2007). Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration. *Molecular Therapy*, 15(9), 1616-1622. doi:10.1038/sj.mt.6300250
- Li, Z., Zhao, B., Kim, Y. S., Hu, C. Y., & Yang, J. (2010). Administration of a mutated myostatin propeptide to neonatal mice significantly enhances skeletal muscle growth. *Molecular Reproduction and Development*, 77(1), 76-82. doi:10.1002/mrd.21111
- Liu, W., Thomas, S. G., Asa, S. L., Gonzalez-Cadavid, N., Bhasin, S., & Ezzat, S. (2003). Myostatin is a skeletal muscle target of growth hormone anabolic action. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(11), 5490-5496. doi:10.1210/jc.2003-030497
- Mafi, F., Biglari, S., Ghardashi Afousi, A., & Gaeini, A. A. (2019). Improvement in skeletal muscle strength and plasma levels of follistatin and myostatin induced by an 8-week resistance training and epicatechin supplementation in sarcopenic older adults. *Journal of Aging and Physical Activity*, , 1-8. doi:10.1123/japa.2017-0389
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., . . . Sandri, M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism*, 6(6), 458-471. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.001
- McFarlane, C., Plummer, E., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., . . . Kambadur, R. (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *Journal of Cellular Physiology*, 209(2), 501-514. doi:10.1002/jcp.20757
- Mendias, C. L., Kayupov, E., Bradley, J. R., Brooks, S. V., & Claflin, D. R. (2011). Decreased specific force and power production of muscle fibers from myostatin-deficient mice are

associated with a suppression of protein degradation. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 111(1), 185-191. doi:10.1152/jappphysiol.00126.2011

Miura, T., Kishioka, Y., Wakamatsu, J., Hattori, A., Hennebry, A., Berry, C. J., . . . Nishimura, T. (2006). Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(2), 675-680. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.060

Morissette, M. R., Cook, S. A., Buranasombati, C., Rosenberg, M. A., & Rosenzweig, A. (2009). Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through akt. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 297(5), 1124-1132. doi:10.1152/ajpcell.00043.2009

Mosher, D. S., Quignon, P., Bustamante, C. D., Sutter, N. B., Mellersh, C. S., Parker, H. G., & Ostrander, E. A. (2007). A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLOS Genetics*, 3(5), e79. doi:10.1371/journal.pgen.0030079

Nakao, A., Afrakhte, M., Morn, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., . . . Dijke, P. t. (1997). Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature*, 389(6651), 631. doi:10.1038/39369

Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J. L., Celeste, A. J., & Attisano, L. (2003). Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7230-7242. doi:10.1128/MCB.23.20.7230-7242.2003

Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V. M., & Devesa, J. (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 282(5), 993. doi:10.1152/ajpcell.00372.2001

Rodriguez, J., Vernus, B., Chelh, I., Cassar-Malek, I., Gabillard, J. C., Sassi, A. H., . . . Bonniou, A. (2014). Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(22), 4361-4371. doi:10.1007/s00018-014-1689-x

Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., . . . Glass, D. J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/akt/mTOR and PI(3)K/akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biology*, 3(11), 1009-1013. doi:10.1038/ncb1101-1009

- Saremi, A. Gharakhanloo, R. Sharghi, S. Gharaati, MR. Larijani, B. Omidfar, K. (2010). Effects of oral creatine and resistance training on serum myostatin and GASP-1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 317(1-2), 25-30. doi:10.1016/j.mce.2009.12.019
- Schuelke, M., Wagner, K. R., Stolz, L. E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., . . . Lee, S. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *The New England Journal of Medicine*, 350(26), 2682-2688. doi:10.1056/NEJMoa040933
- Se-Jin Lee. (2007). Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF- β signaling pathways. *PLoS One*, 2(8), e789. doi:10.1371/journal.pone.0000789
- Seumas McCroskery, Mark Thomas, Linda Maxwell, Mridula Sharma, & Ravi Kambadur. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of Cell Biology*, 162(6), 1135-1147. doi:10.1083/jcb.200207056
- McPherron, SJ and Lee, AC. (2002) Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. - PubMed - NCBI. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124152/>. oulu.fi:9443/pubmed/11877467?dopt=Abstract
- Tang, L., Yan, Z., Wan, Y., Han, W., & Zhang, Y. (2007). Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. *Muscle & Nerve*, 36(3), 342-348. doi:10.1002/mus.20791
- Taylor, W. E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D. H., . . . Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280(2), 221. doi:10.1152/ajpendo.2001.280.2.E221
- Thompson, T. B., Lerch, T. F., Cook, R. W., Woodruff, T. K., & Jardetzky, T. S. (2005). The structure of the follistatin:Activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Developmental Cell*, 9(4), 535-543. doi:10.1016/j.devcel.2005.09.008
- Tingqing Guo, William Jou, Tatyana Chanturiya, Jennifer Portas, Oksana Gavrilova, & Alexandra C McPherron. (2009). Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One*, 4(3), e4937. doi:10.1371/journal.pone.0004937

Walker, K. S., Kambadur, R., Sharma, M., & Smith, H. K. (2004). Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36(5), 787. doi:10.1249/01.MSS.0000126384.04778.29

Willoughby, D. S. (2004). Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36(4), 574. doi:10.1249/01.MSS.0000121952.71533.EA

Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016

Zhang, T., Yang, H., Wang, R., Xu, K., Xin, Y., Ren, G., . . . Zhang, Z. (2011). Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice. *Vaccine*, 29(46), 8412-8416. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.007