

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ-ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

Μελέτη της έκφρασης του γονίδιου GDF-8 (growth and differentiation factor-8) σε πάσχοντες από μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα με σύνδρομο απίσχνανσης.



**ΓΚΑΡΛΕΜΟΥ ΚΑΛΛΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**Διδακτορική Διατριβή
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2011**

Τριμελής επιτροπή: Ν. Σταθάκης καθ Παν Θεσσαλίας(επιβλέπων)

Δ. Κυριάκου αν καθ Παν Θεσσαλίας

Π. Ματσουκά αν καθ Παν Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σακκάς Λάζαρος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κουκούλης Γεώργιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κουκούλης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κυριάκου Δέσποινα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ματσουκά Παναγιώτα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Βασιλόπουλος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Εγκρίθηκε την 9^η Μαρτίου 2011 από το Ιατρικό Τμήμα του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343, άρθρο 202, παράγραφος 2).

Στους γιούς μου Θωμά και Νίκο

Στον σύζυγό μου

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</u>	4
<u>1. ΕΙΚΟΝΕΣ</u>	6
<u>2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	26
<u>3. ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗ-ΙΣΤΟΡΙΚΑ</u>	27
<u>4. ΓΟΝΙΔΙΟ</u>	28
<u>5. ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΕΤΑΙ Η ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗ</u>	33
<u>6. ΔΟΜΗ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ</u>	35
<u>7. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ</u>	37
<u>8. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ</u>	39
<u>9. ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΙ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΝΤΑΙ</u>	44
<u>10. ΔΡΑΣΗ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ</u>	49
<u>11. ΣΧΕΣΗ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΜΕ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΑΠΙΣΧΝΑΝΣΗΣ Η ΜΥΪΚΗΣ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑΣ</u>	52
<u>12. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ</u>	58
<u>13. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ</u>	71
<u>14. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ</u>	80
<u>15. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ</u>	82
<u>16. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</u>	87
<u>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	88
<u>1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	89
<u>2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	97
<u>3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	116
<u>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	120
<u>5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	121
<u>6. SUMMARY</u>	125
<u>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	129

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο υποσιτισμός και η απίσχνανση των μυών (muscle wasting) είναι κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα πολλών χρόνιων καταβολικών νόσων, που συνδέονται με αρνητική πρωτεϊνική ομοιόσταση. Η απίσχνανση των μυών χαρακτηρίζεται από την ακούσια απώλεια του βάρους του σώματος (5-10%) οφειλόμενη σε επιταχυνόμενη αποδόμηση πρωτεϊνών των μυών και σε μειωμένη πρωτεϊνική σύνθεση και αντιπροσωπεύει μια κλινικά σημαντική περιπλοκή πολλών χρόνιων νόσων.

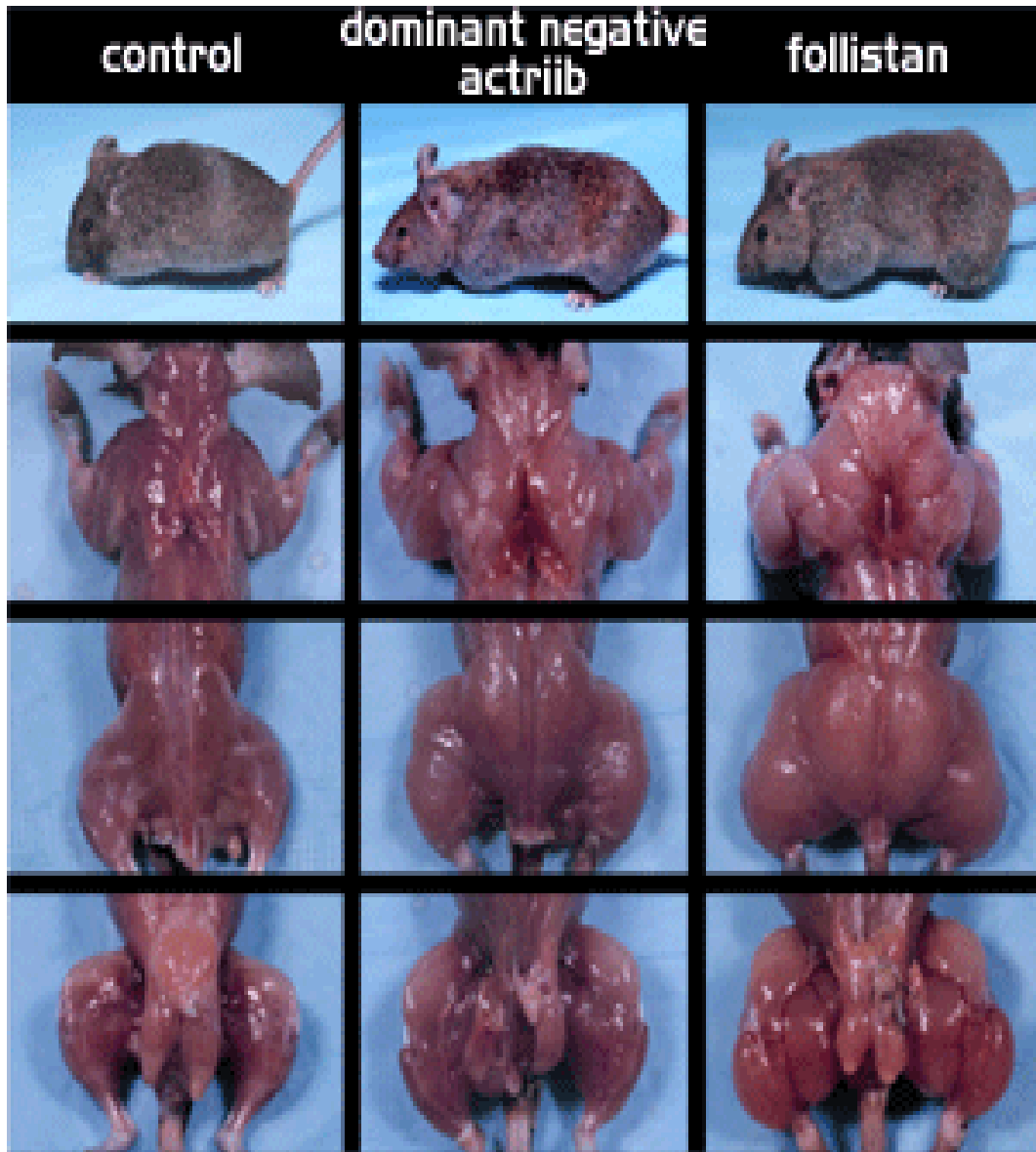
Οι μηχανισμοί της απίσχνανσης των μυών δεν είναι επαρκώς κατανοητοί. Ανεξάρτητα από την αιτία της, η μυϊκή απίσχνανση επηρεάζει την έκβαση της νόσου οδηγώντας σε αδυναμία, σε ανικανότητα, σε κακή ποιότητα ζωής και σε περισσότερες μέρες εισαγωγής στο νοσοκομείο.

Στον άνθρωπο, η ανοσοδραστική πρωτεΐνη μυσστατίνη είναι μία ώριμη γλυκοπρωτεΐνη 26-kDa, η οποία εκφράζεται στον ανθρώπινο σκελετικό μυ και εκκρίνεται στο πλάσμα. Η μυσστατίνη ρυθμίζει αρνητικά την ανάπτυξη του σκελετικού μύος δηλ. είναι μία χαλόνη για τον σκελετικό μυ. Εκτός από τον σκελετικό μυ η μυσστατίνη εκφράζεται στον λιπώδη ιστό και στην καρδιά.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS), για να διαπιστώσουμε αν εκφράζεται το γονίδιο της μυσστατίνης στους ασθενείς αυτούς καθώς και την ποσοτική του έκφραση. Μελετήθηκε η έκφραση αυτού του γονιδίου σε πάσχοντες από σύνδρομο απίσχνανσης και συγκρίθηκε η έκφραση σε MDS με φυσιολογική θρέψη καθώς και σε φυσιολογικά άτομα.

Θα ήθελα να αναγνωρίσω την βοήθεια όλων αυτών, που είχαν σημαντική συνεισφορά στην εκπόνηση της διατριβής. Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Ν. Σταθάκη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του. Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω στην αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Δ. Κυριάκου για την αμέριστη συμπαράσταση από τον σχεδιασμό μέχρι την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο. Επίσης ιδιαίτερα ευχαριστήρια θα ήθελα να εκφράσω στον επίκουρο καθηγητή κ. Ζαχαρούλη για την βοήθειά του στην προμήθεια βιοψικού υλικού από μύες.

Σημαντική βοήθεια προσέφερε η ειδικευόμενη ιατρός χειρουργικής Ελένη Σιώκα. Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου για την αγάπη και την συμπαράστασή τους καθ'όλη τη διάρκεια της προσπάθειας ολοκλήρωσης αυτού του έργου.



Εικόνα 1

Εικόνα 1: Control= φυσιολογικό ποντίκι. ActRIIB= ποντίκι με μία γενετική έλλειψη, που εμποδίζει την μυοστατίνη να συνδεθεί στον καθορισμένο της υποδοχέα. Follistatin=ποντίκι γενετικά τροποποιημένο για την φολλιστατίνη, που παράγει υψηλά επίπεδα φολλιστατίνης και εμποδίζει την μυοστατίνη να προσδεθεί στον υποδοχέα της. Το αποτέλεσμα στις 2 τελευταίες περιπτώσεις είναι δραματική αύξηση της μυϊκής μάζας γιατί η μυοστατίνη είναι ένας παράγοντας που περιορίζει την ανάπτυξη του μυϊκού ιστού.

<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>

1



Εικόνα 2



Εικόνα 3

Εικόνες 2 και 3: Ένα φυσιολογικό ποντίκι και ένα με αυξημένη μυϊκή μάζα, το οποίο δεν παράγει μυοστατίνη. Φαίνεται η διαφορά στους μύες του προσώπου και του πρόσθιου άκρου.

<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>



Εικόνα 4

Εικόνα 4: Σκυλιά ράτσας whippet, ένα φυσιολογικό και ένα με μετάλλαξη στο γονίδιο της μυοστατίνης, που οδηγεί σε έλλειψη μυοστατίνης και επομένως υπερβολική αύξηση της μυϊκής μάζας, την Wendy.

<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>



Εικόνα 5

Εικόνα 5: Η Wendy, που αποκαλείται ο Arnold Schwarzenegger των σκύλων. Εξαιτίας της μετάλλαξης οι άνθρωποι την ονομάζουν pitbull με κεφάλι καρφίτσας. Ζυγίζει 2 φορές το βάρος ενός μέσου whippet, αλλά έχει το ίδιο ύψος, μικρό στενό κεφάλι και καρδιά και πνεύμονες ίδιου μεγέθους.

<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>



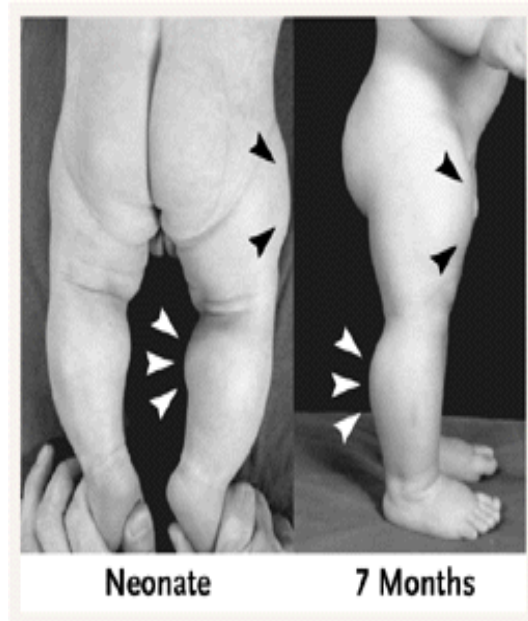
Εικόνα 6

Εικόνα 6: Αγελάδα της φυλής Belgian Blue, που παράγει υπερβολικές ποσότητες κρέατος. Η αγελάδες της φυλής αυτής έχουν μια φυσική μετάλλαξη, που αδρανοποιεί το γονίδιο της μυοστατίνης, η οποία είναι μια πρωτεΐνη-αναστολέας της μυϊκής ανάπτυξης. Επίσης η μετάλλαξη αυτή επιδρά και στην απόθεση λίπους καταλήγοντας σε κρέας με ελάχιστο λίπος.

<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>



Εικόνα 7



Εικόνα 8

Εικόνες 7 και 8: Το super μωρό από την Γερμανία. Πριν την ηλικία των 5 ετών μπορούσε να κρατάει βάρος 7 lbs με τα χέρια σε έκταση, κάτι που δεν μπορούν να κάνουν πολλοί ενήλικες. Έχει διπλάσιο μέγεθος μυών από άλλα παιδιά της ηλικίας του και το μισό λίπος σώματος.

<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>



Εικόνα 9

Εικόνα 9: Ο Richard Sandrak, γνωστός και ως μικρός Ηρακλής, είναι διάσημος για την σωματική του διάπλαση από πολύ μικρή ηλικία. Ξεκίνησε να προπονείται από δύο ετών και στα έξι του μπορούσε να πιέζει 4 φορές το βάρος του. Ακολουθούσε αυστηρή δίαιτα με υγρά συμπληρώματα διατροφής και λαχανικά.

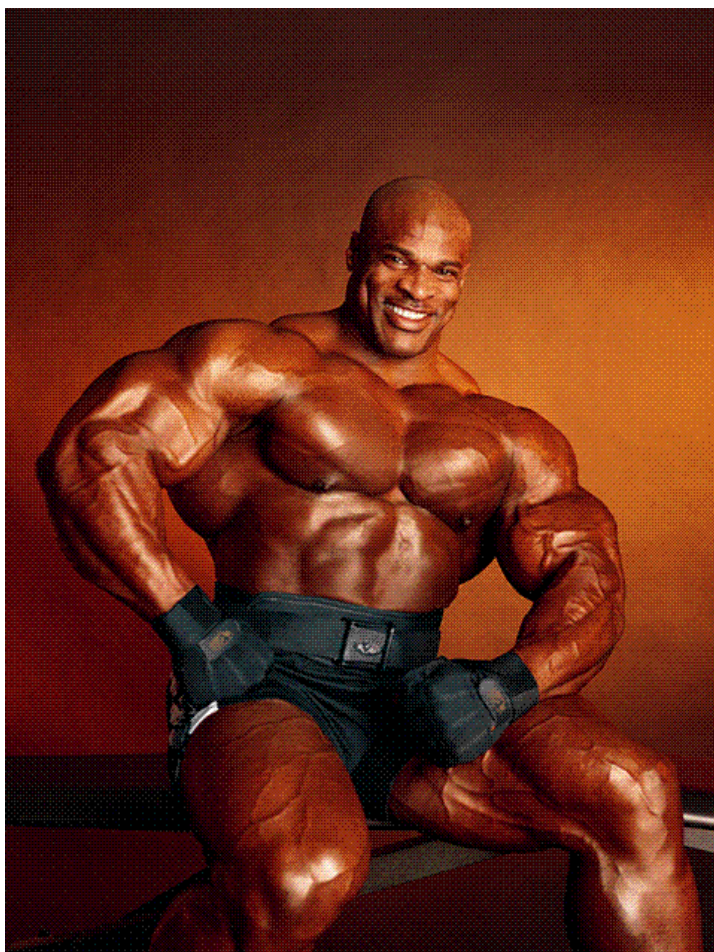
<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>



Εικόνα 10

Εικόνα 10: Ένας διάσημος bodybuilder με έλλειψη μυοστατίνης ο Kenneth “Flex” Wheeler, ο οποίος βγήκε δεύτερος στον διαγωνισμό Mr. Olympia.

<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>



Εικόνα 11

Εικόνα 11: Ένας πρώην Mr. Olympia: ο Ronnie Coleman.

<http://www.who-sucks.com/people/monstrous-myostatin-misfortunes-a-collection-of-myostatin-deficiency-pictures>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύνδρομο απίσχνανσης των μυών

Η πρωτεϊνική ομοιόσταση πραγματοποιείται μέσω μιας λεπτής ισορροπίας, μεταξύ της ροής των αμινοξέων στο πλάσμα, προερχόμενη από την δίαιτα (εξωγενή-exogenous) και την αποδόμηση των μυϊκών πρωτεϊνών (ενδογενή-endogenous) πρώτιστα και της εξόδου των αμινοξέων από το πλάσμα για να χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση και τον μεταβολισμό (τρανσαμίνωση και οξειδωση). Κατά συνέπεια, η επαναχρησιμοποίηση των αμινοξέων αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα του πρωτεϊνικού μεταβολισμού(1).

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα δεν αποθηκεύονται στο σώμα όπως το λίπος και η γλυκόζη στα λιποκύτταρα και στο γλυκογόνο. Η μεγαλύτερη αποθήκη πρωτεϊνών είναι οι σκελετικοί μύες. Κατά συνέπεια, η μυϊκή σκελετική μάζα είναι ο καλύτερος δείκτης της πρωτεϊνικής ομοιόστασης.

Η ανεπαρκής διαιτητική πρόσληψη πρωτεΐνης και ενέργειας, οφειλόμενη στην ανορεξία ή στην υποθρεψία και οι αλλαγμένες μεταβολικές και φυσιολογικές διαδικασίες ως αποτέλεσμα των αυξανόμενων καταβολικών και των μειωμένων αναβολικών ερεθισμάτων, οδηγούν σε απίσχνανση των μυών (2).

Η απίσχνανση των μυών χαρακτηρίζεται από την ακούσια απώλεια του βάρους του σώματος (5-10%) οφειλόμενη σε επιταχυνόμενη αποδόμηση πρωτεϊνών των μυών και σε μειωμένη πρωτεϊνική σύνθεση και αντιπροσωπεύει μια κλινικά σημαντική επιπλοκή πολλών χρόνιων νόσων(3).

Οι μηχανισμοί της απίσχνανσης των μυών δεν είναι επαρκώς κατανοητοί(2). Ανεξάρτητα από την αιτία της, η μυϊκή απίσχνανση επηρεάζει την έκβαση της νόσου οδηγώντας σε αδυναμία, σε ανικανότητα, σε κακή ποιότητα ζωής και σε περισσότερες μέρες εισαγωγής στο νοσοκομείο.

ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗ-ΙΣΤΟΡΙΚΑ

Παρόλο, που για τα σπονδυλωτά έχουν σημειωθεί όσον αφορά στον σχηματισμό ιστών και στην ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης μεγάλες πρόοδοι στην κατανόηση μηχανισμών και μορίων, για τους μηχανισμούς, που ελέγχουν το μέγεθος των ιστών δεν ξέρουμε πολλά. Ο Bullough (4,5,6) πρότεινε 40 χρόνια πριν, ότι αρνητικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης ελέγχουν το μέγεθος των ιστών και τους ονόμασε χαλόνες. Ο Bullough (4,5,6) διαπίστωσε, ότι οι διάφοροι ιστοί εκκρίνουν διαφορετικές χαλόνες, αναστέλλοντας την ανάπτυξη τους. Επειδή όμως τα επόμενα χρόνια δεν βρέθηκαν για κανέναν ιστό μόρια με τις ιδιότητες χαλόνης, η θεωρία του Bullough εγκαταλείφθηκε.

Η μιοστατίνη είναι μια χαλόνη για τον σκελετικό μύ. Πρόσφατα βρέθηκε, ότι η μυϊκή μάζα ελέγχεται από την μιοστατίνη (6). Αρχικά αναγνωρίστηκε η μιοστατίνη σαν ένα νέο μέλος της TGF- β υπερικογενείας, πρωτονομαζόμενη ως GDF-8 (6,7). Στα ποντίκια στην εμβρυονική μέρα 9,5 αρχίζει να εκφράζεται η μιοστατίνη σε αναπτυσσόμενους σωματίτες στο τμήμα του μυοτομίου και συνεχίζει να εκφράζεται σε όλη την διάρκεια της εμβρυογένεσης σε αναπτυσσόμενους σκελετικούς μύες. Η μιοστατίνη σχεδόν αποκλειστικά στους ενήλικες εκφράζεται στον σκελετικό μύ, αν και έχει βρεθεί στον λιπώδη ιστό μιοστατίνης σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Από μυ σε μυ ποικίλουν τα επίπεδα έκφρασης της μιοστατίνης. Η λειτουργία της μιοστατίνης διευκρινίστηκε με γονιδιακή στόχευση σε ποντίκια (6,7). Μία έλλειψη στο γονίδιο της μιοστατίνης, που κωδικοποιούσε την C-τελική της περιοχή είχε σαν αποτέλεσμα σχεδόν τον διπλασιασμό του βάρους των μυών και τεράστια αύξηση στην μάζα των σκελετικών μυών.

Βρέθηκε, ότι η αύξηση της μυϊκής μάζας μεταλλαγμένων ομόζυγων ποντικών ήταν αποτέλεσμα συνδυασμού υπερτροφίας και υπερπλασίας. Η μετάλλαξη επηρέασε κάθε σκελετικό μυ, που εξετάστηκε και υπήρχε αναλογική επίδραση σε αρσενικά και θηλυκά.

Σε ένα πρώιμο στάδιο ανάπτυξης (early age) παρατηρήθηκε σε ποντίκια myostatin-null αύξηση της μυϊκής μάζας, η οποία σε όλη την διάρκεια ζωής του ζώου συνεχίστηκε και διατηρήθηκε (6,8). Στα ετερόζυγα ποντίκια η αύξηση του βάρους των μυών σε σχέση με εκείνα του άγριου τύπου ήταν περίπου 25% πράγμα, που δείχνει, ότι η μιοστατίνη επιδρά με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Φάνηκε, ότι η μιοστατίνη ρυθμίζει την ανάπτυξη του μύς

αρνητικά από την υπερβολική αύξηση της μυϊκής μάζας σε ποντίκια με έλλειψη μυσστατίνης και γι' αυτό της δόθηκε το όνομα μυσστατίνη (6,7). Παρατηρήθηκε στην σκελετική μυϊκή μάζα ποντικών με έλλειψη (deletion) του γονιδίου της μυσστατίνης, που επιτεύχθηκε με στόχευση (targeted), αύξηση μεγαλύτερη του 200%, που οφείλονταν και σε υπερπλασία και σε υπερτροφία των μυϊκών ινών (7,9). Έτσι θεωρήθηκε, ότι η ανάπτυξη του σκελετικού μύος ρυθμίζεται αρνητικά από τον GDF-8 λόγω αυτής της παρατήρησης και γι' αυτό δόθηκε στον GDF-8 το όνομα μυσστατίνη (7,9).

Μυσστατίνη μία χαλόνη για την καρδιά.

Η έννοια της χαλόνης έχει εισαχθεί από τον Bullough το 1960 (5,10). Οι χαλόνες μέσω ενός αρνητικού feedback μηχανισμού αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων, ελέγχοντας σε έναν ειδικό ιστό το μέγεθός του (5,10). Ο ειδικός ιστός παράγει και εκκρίνει την χαλόνη η οποία με την σειρά της ελέγχει το μέγεθος του ιστού με τον αρνητικό feedback μηχανισμό (5,10). Έχει αποδειχθεί από τον Shu et al (10,11) ότι η μυσστατίνη στην καρδιά αποτελεί για το μονοπάτι (pathway) του IGF-1 (insulin growth factor-1) μία καρδιακή χαλόνη. Η ανάπτυξη των καρδιακών μυοκυττάρων επιτυγχάνεται με την μεσολάβηση (mediate) του IGF-1, τα καρδιακά μυοκύτταρα εκκρίνουν μυσστατίνη, η οποία συσσωρεύεται προκαλώντας στην ανάπτυξη της καρδιάς (cardiac growth) αναστολή, όταν φτάσει σε ένα όριο η συσσώρευση της μυσστατίνης (10). Η μυσστατίνη έχει βρεθεί και στην καρδιά (10,12) εκτός από τον σκελετικό μυ όπου εκφράζεται κυρίως (7,10).

ΓΟΝΙΔΙΟ

Οργάνωση ανθρώπινου γονιδίου μυσστατίνης: Το γονίδιο της μυσστατίνης στον άνθρωπο βρίσκεται στα χρωμόσωμα 2 και συγκεκριμένα στην χρωμοσωμική περιοχή 2q33.2. Περιλαμβάνει 3 εξώνια και 2 εσώνια. Το γονίδιο έχει 3 θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Από την μεταγραφή του γονιδίου προκύπτει mRNA 3.1-Kb. Αυτό κωδικοποιεί μία πρόδρομη πρωτεΐνη 375 αμινοξέων. Όμως η ανοσοδραστική πρωτεΐνη μυσστατίνη είναι μία ώριμη γλυκοπρωτεΐνη 26-KDa η οποία εκφράζεται στον ανθρώπινο σκελετικό μυ και

εκκρίνεται στο πλάσμα. Στον άνθρωπο, στους τύπους 1 και 2 μυϊκών ινών εντοπίζεται η ανοσοδραστική πρωτεΐνη μωστατίνη (13).

Εσώνια. Το γονίδιο της μωστατίνης έχει 2 εσώνια. Το εσώνιο 1 έχει μέγεθος 1,789- bp και το εσώνιο 2 έχει μέγεθος 2.4 Kb (13). Στην ακολουθία του cDNA μεταξύ των 372 και 373 νουκλεοτιδίων βρίσκεται το εσώνιο 1 ενώ μετά το 747 νουκλεοτίδιο βρίσκεται το εσώνιο 2 .

Εξώνια: Το πρώτο εξώνιο κωδικοποιεί 125 αμινοξέα, το δεύτερο 124 και το τρίτο εξώνιο 126 αμινοξέα (13). Στο γονίδιο της ανθρώπινης μωστατίνης το εξώνιο 3 είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας αλληλουχίας στην υποθετική ώριμη πρωτεΐνη. Πριν από το κωδικόνιο έναρξης, στην 5' αμετάφραστη περιοχή, δεν υπάρχουν εσώνια. Επίσης δεν υπάρχει κρυμμένη περιοχή συρραφής (cryptic splicing site) εσωνίου/εσωνίου στο εσώνιο 1. Η αλληλουχία του εσωνίου 2 δεν έχει ακόμη αποκωδικοποιηθεί πλήρως, και δεν ξέρουμε αν υπάρχουν σ' αυτό εναλλακτικές θέσεις συρραφής (splicing) (13).

RNA Από διάφορα ανθρώπινα όργανα απομονώθηκαν poly (A)⁺ RNA και χρησιμοποιώντας cDNA ανιχνευτές για μωστατίνη υβριδοποιήθηκαν τα Northern Blots. Τελικά βρέθηκε στον σκελετικό μυ του ανθρώπου ένα μοναδικό είδος μεταγράφου mRNA 3.1 Kb, το οποίο δεν βρέθηκε στο στομάχι, στον προστάτη, στη μήτρα, στο λεπτό έντερο, στο παχύ έντερο, στην καρδιά και στην ουροδόχο κύστη (13).

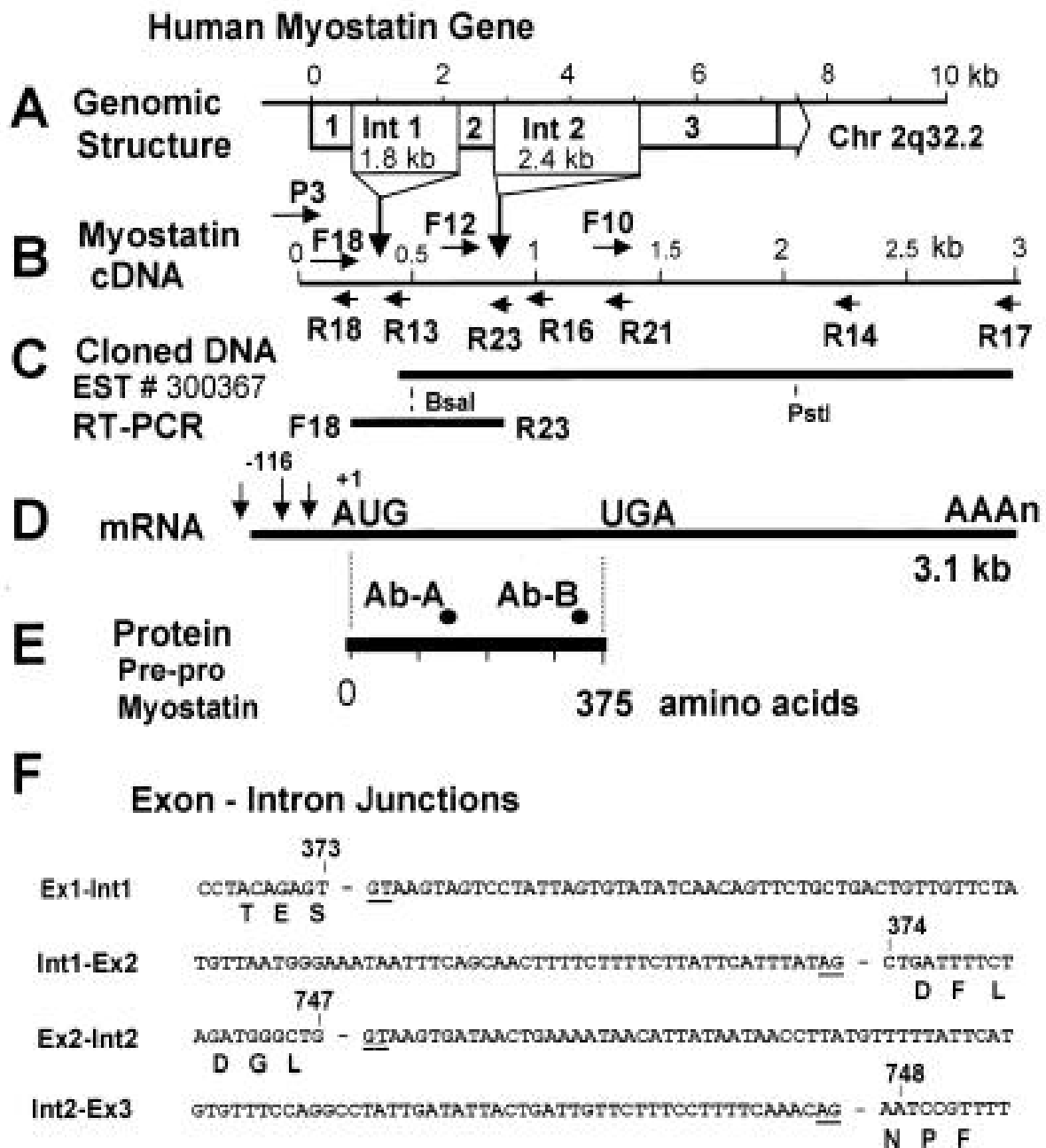
5'- περιβάλλουσα περιοχή (flanking sequence) του γονιδίου της μωστατίνης στον άνθρωπο: AP-1, MyoD, TATA boxes.

Πριν από το κωδικόνιο έναρξης, στο γονίδιο μωστατίνης ανθρώπου, στην 5' αμετάφραστη περιοχή, δεν υπάρχουν εσώνια. (13).

Η 5'- flanking περιοχή αρχίζει 438 ζεύγη βάσεων πριν από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, δηλ το ATG. Στην αλληλουχία αυτή δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί .

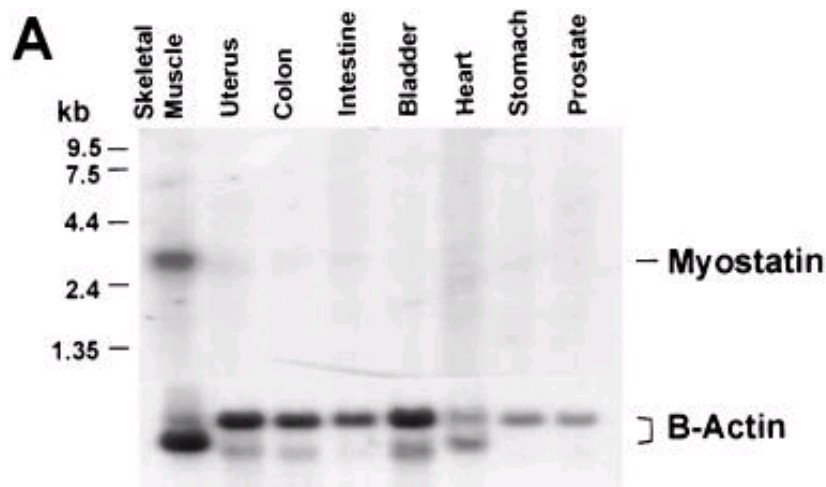
Επίσης βρέθηκε σ' αυτήν την περιοχή μια θέση σύνδεσης για την AP-1 και μια θέση σύνδεσης για την MyoD. Η πρώτη θέση ξεκινούσε 304 νουκλεοτίδια πριν το κωδικόνιο έναρξης και η άλλη 185 nt. Ακόμη στην 5'- flanking region βρέθηκαν δύο TATA περιοχές (14).

Εικόνα 12:Γενετικός καθορισμός της μυοστατίνης στον άνθρωπο ⁽¹³⁾



Εικόνα 12.Α)Το γονίδιο της ανθρώπινης μυοστατίνης και τα προϊόντα του. Β) cDNA Μυοστατίνης, που δείχνει τις θέσεις των συνδέσεων (junctions) εσωνίου/εξωνίου (κάθετα βέλη) και forward (F) και reverse (R) primers ανθρώπου. Ο P3 είναι ο μόνος primer ποντικού.Γ)Στρατηγική κλωνοποίησης (cloning strategy) που δείχνει τις θέσεις Pflm1 και PstI.Δ)mRNA σκελετικού μύος ανθρώπου με τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής(transcriptional initiation sites). (E)πρόδρομη πρωτεΐνη μυοστατίνη με τις θέσεις των συνθετικών πεπτιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία αντισωμάτων. F) Αλληλουχία των ορίων εξωνίου/εσωνίου περιορισμένη στις πρώτες 60 βάσεις μέσα στο εσώνιο και στις 10 συνεχόμενες βάσεις μέσα στο εξώνιο. ⁽¹³⁾

Εικόνα 13: Έκφραση της μυοστατίνης στον ανθρώπινο σκελετικό μύ (13)



Εικόνα 13: Έκφραση του mRNA της μυοστατίνης στον ανθρώπινο σκελετικό μυ.(άνω) Northern blot με poly(A)⁺ RNA υβριδοποιημένο με έναν P3/R13 cDNA ανιχνευτή (probe) μυοστατίνης.(κάτω) Το ίδιο blot υβριδοποιημένο με ανιχνευτή(probe) cDNA β-ακτίνης. (13)

Εικόνα 14: Αλληλουχία του υποκινητή (promoter) του γονιδίου της ανθρώπινης μυοστατίνης (14)

```

-438 CCCCATAGAG TTTGTGTGAG GAGTAGTAAG ATTTAAGTAC AGTTTATATT
-388 ATTGCCAACA TAGACTTTTG TTTTCAAAT GTCACAAATA TCTTTATTA
-338 TTTGTAGATT TATTTCTTTT ATGAAGTAGT CAAATGAATC AGCTCACCCCT
-288 TGACTGTAAC AAAATACTGC TTGGTGACTT GGGACAGACA GGGTTTAAAC
-238 CTCTGACAGC GAGATTCATT GTGGAGCAAG AGCCAATCAT AGATCCTGAC
-188 GACACTTGTC TCATCTAAGT TGGAATATAA AAAGCCACTT GGAATACAGT
-138 ATAAAAGATT CACTGGTGTG GCAAGTTGTC TCTCAGACTG TACATGCATT
-88 AAAATTTTGC TTGGCATTAC TCAAAAGCAA AAGAAAAGTA AAAGGAAGAA
-38 ACAAGAACAA GAAAAAAGAT TATATTGATT TAAAATCAT TCAAAAAGT
13 CAACTCTGTG TTTATATTTA CCTGTTTATG CTGATTGTTG CTGGTCCAGG
63 GGG
    
```

Εικόνα 14.Αλληλουχία του υποκινητή (promoter) του γονιδίου της ανθρώπινης μυοστατίνης.Τα κατά γενική ομολογία TATA boxes είναι υπογραμμισμένα,η κατά γενική ομολογία αλληλουχία της MyoD είναι διπλά υπογραμμισμένη, και η κατά γενική ομολογία θέση σύνδεσηςτης AP-1 είναι υπογραμμισμένη με διακεκομμένη γραμμή.Το κωδικόνιο έναρξης ATG είναι υπογραμμισμένο από πάνω. (14)

Μία κατά γενική ομολογία περιοχή σύνδεσης της MyoD υπάρχει στην περιοχή του υποκινητή της μυοστατίνης. Για ένα γονίδιο, όπως της μυοστατίνης, που σχετίζεται με την ανάπτυξη του σκελετικού μυός αυτό είναι αναμενόμενο (14).

Η MyoD ανήκει στην οικογένεια των helix-loop-helix πρωτεϊνών. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν πρωτεΐνες, που ρυθμίζουν την μεταγραφή αναπτυξιακών γονιδίων (14,15,16). Όσον αφορά στους διαμολυσμένους 10T1/2 ινοβλάστες, η MyoD είναι αναγκαία για την μυογένεση (14,17) και θεωρείται ο κύριος ρυθμιστής της μυογένεσης όπως προκύπτει από μελέτες στην κυτταρική σειρά σκελετικού μυός.

Επειδή πρέπει να εκφραστεί πρώτα η MyoD για να εκφραστεί μετά η μυοστατίνη αυτό δικαιολογεί την παρουσία, πριν από το γονίδιο της μυοστατίνης, της περιοχής σύνδεσης της MyoD (14).

Για την AP-1 γνωρίζουμε, ότι μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες δρα συνεργικά με σκοπό δραστηριοποίηση σε μέγιστο βαθμό της μεταγραφής (transcriptional activation). Όμως, η σπουδαιότητα της ύπαρξης στον υποκινητή της μυοστατίνης, μιας κατά γενική ομολογία περιοχής σύνδεσης της AP-1 δεν είναι γνωστή (14). Στην περιοχή του υποκινητή της μυοστατίνης δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί (variation) σε 80 αλληλόμορφα, που μελετήθηκε η αλληλουχία τους, σε αντίθεση με την κωδική περιοχή (14).

Υποκινητής και περιοχές σύνδεσης αυξητικών παραγόντων μυών για

- 1. ανδρογόνα**
- 2. θυρεοειδική (thyroid) ορμόνη**
- 3. γλυκοκορτικοειδή**
- 4. myogenic differentiation factor 1**
- 5. υποδοχέας peroxisome proliferator-activated**
- 6. myocyte enhancer factor 2**
- 7. nuclear factor-κB.**

Στο γονίδιο της μιοστατίνης του ανθρώπου η 5' ρυθμιστική του περιοχή έχει χαρακτηριστεί (18). Δυνητικές περιοχές σύνδεσης ανδρογόνων θυρεοειδικών ορμονών, γλυκοκορτικοειδών, μυϊκού διαφοροποιητικού παράγοντα-1 (myogenic differentiation factor 1), ενεργοποιημένου υποδοχέα υπεροξυσώματος, ενισχυτικού παράγοντα μυοκυττάρων-2, και για NFκ-B περιέχονται στην αλληλουχία του υποκινητή (promoter) (18). Τα ευρήματα σημαίνουν ότι η έκφραση της μιοστατίνης ενεργοποιείται (upregulate) από γλυκοκορτικοειδή, τα οποία επάγουν την μεταγραφή του γονιδίου (18). Για τον λόγο αυτό υποθέτουμε, ότι η ενεργοποίηση (upregulation) της έκφρασης της μιοστατίνης ίσως είναι εν μέρει υπεύθυνη για ατροφία μυών, που σχετίζεται με γλυκοκορτικοειδή (18).

ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΕΤΑΙ Η ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗ

Σκελετικός μυς. Η μιοστατίνη έχει βρεθεί και στην καρδιά (10,12) εκτός από τον σκελετικό μυ όπου εκφράζεται κυρίως (7,10).

Η μιοστατίνη στο ποντίκι εκφράζεται αρχικά κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης ειδικά σε αναπτυσσόμενους σωματίτες στην στοιβάδα των μυοτομίων απ' όπου θα προκύψει ο σκελετικός μυς και συγκεκριμένα σε πρόδρομα μυογενετικά κύτταρα. Η μιοστατίνη στα επόμενα στάδια ανάπτυξης εκφράζεται σε όλο το σώμα σε όλους τους σκελετικούς μύες σε επίπεδα, που ποικίλουν όπως και στα ενήλικα ποντίκια. (19). Η ρύθμιση της μυϊκής μάζας από την μιοστατίνη γίνεται σε όλη την διάρκεια της ανάπτυξης (through out development), όπως και κατά την εμβρυογένεση (20).

Αν και αρχικά πίστευαν, ότι έχουμε αποκλειστική έκφραση του γονιδίου της μιοστατίνης στον σκελετικό μυ, πρόσφατες αναφορές έχουν δείξει ότι και σε άλλους ιστούς ανιχνεύεται η πρωτεΐνη μιοστατίνη ή το mRNA της. Σε ίνες καρδιάς Purkinje και καρδιακά μυϊκά κύτταρα έχει βρεθεί πρωτεΐνη μιοστατίνη με χρήση ειδικών για την μιοστατίνη αντισωμάτων (12,21). Ακόμη, έκφραση mRNA μιοστατίνης βρέθηκε στον μαστό(7,12,21,22,23).

Παρατηρήθηκε στον σκελετικό μυ ανθρώπου αλλά όχι στον περιβάλλοντα ινοσυνδετικό ιστό. Επίσης, στις μυϊκές ίνες 1 και 2 ανοσοχρώση μιοστατίνης έδειξε παρουσία μιοστατίνης στην ίδια ένταση. Η ανοσοδραστική μιοστατίνη εκφράζεται ως μια 26-KDa πρωτεΐνη, μοναδικά στον ανθρώπινο σκελετικό μυ

και εκκρίνεται στο πλάσμα (13). Η χρωματογραφία Con A- Sepharose δείχνει, ότι η μυοστατίνη είναι σε γλυκοσυλιωμένη μορφή (13).

Μυοσωλήνες C₂C₁₂ κυττάρων εκφράζουν το ισομερές II της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Έχει βρεθεί ότι σε μυοσωλήνες C₂C₁₂ κυττάρων που εκφράζουν το ισομερές II της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (Myosin heavy chain), κυρίως, εκφράζεται η μυοστατίνη στους πυρήνες τους (24). Η μυοστατίνη ίσως να παίζει στην ρύθμιση της μεταγραφής έναν ρόλο, όπως πιθανολογείται από την δεσπόζουσα εντόπισή της στον πυρήνα (24).

Λιπώδης ιστός. Έχει αναφερθεί, ότι η μυοστατίνη εκφράζεται στον λιπώδη ιστό και ότι αναστέλλει ισχυρά την λιπογένεση μαζί με τους TGF-β2 και TGF-β1 (7,25,26,27).

Καρδιακός ιστός cardiomyocytes ίνες purkinje. Αποδείχθηκε, ότι η μυοστατίνη βρίσκεται στον καρδιακό ιστό, σε καρδιομυοκύτταρα και ίνες purkinje(12). Την περιοχή εμφράγματος περιβάλλουν καρδιομυοκύτταρα στα οποία ενεργοποιείται η έκφραση μυοστατίνης (12).

Μαστικός αδένας. Έκφραση μυοστατίνης έχουμε και στον λιπώδη ιστό (adipocytes) και στον μαστικό αδένα (mammary gland) και είναι πιθανό στα επίπεδα της μυοστατίνης στην κυκλοφορία να συνεισφέρουν και αυτοί (28).

Δεν ανιχνεύτηκε πρωτεΐνη μυοστατίνη στα συραγγώδη σωματίδια του πέους,στην ουροδόχο κύστη,στον προστάτη,στο λεπτό και παχύ έντερο στο νεφρό και στον περιβάλλοντα ινοσυνδετικό ιστό.

Η 26-KDa πρωτεΐνη δεν ανιχνεύτηκε σε ιστούς, που διαθέτουν μεγάλες ποσότητες λείου μυός, όπως στα συραγγώδη σωματίδια του πέους, την ουροδόχο κύστη και τον προστάτη (13). Η ανοσοδραστική πρωτεΐνη μυοστατίνη δεν παρατηρήθηκε στο λεπτό και παχύ έντερο στην ουροδόχο κύστη, στον προστάτη και στο νεφρό(13).

ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

Η μυοστατίνη ανήκει στην υπεροικογένεια TGF-β ρυθμιστικών παραγόντων. Η μυοστατίνη μοιράζεται με τα άλλα μέλη της TGF-β κάποια κοινά χαρακτηριστικά:

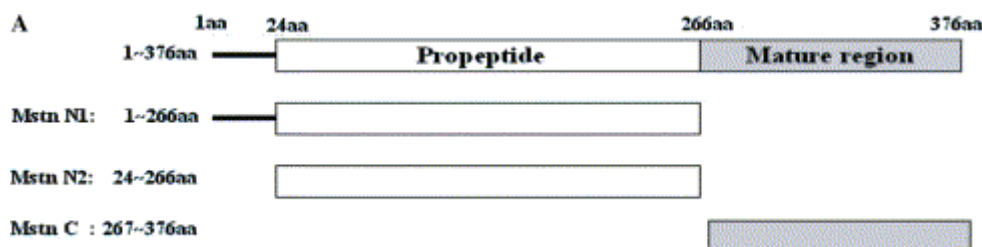
- 1) στο C-τελικό μισό της μυοστατίνης υπάρχει μια RSRR περιοχή που προάγει την πρωτεόλυση (RSRR proteolytic processing site)**
- 2) ένα εκκριτικό σύνθημα (signal) στο N-τελικό άκρο (N-terminal secretory signal)**
- 3) ένα βιολογικά ενεργό C-τελικό (processed) ώριμο τμήμα.**
- 4) στην C-τελική περιοχή 9 κατάλοιπα κυστεΐνης αναγκαία για τη δημιουργία κυστεϊνικού κόμβου (cystine knot).(29).**

Η μυοστατίνη είναι γνωστή και ως GDF-8 (growth and differentiation factor 8) (14). Ταυτοποιήθηκε πρώτα από τους McPherron et al (1997) (7,14,23) στο ποντίκι. Οι ερευνητές αυτοί δημιούργησαν ποντίκι, που δεν παρήγαγε μυοστατίνη (myostatin null mice) και απέδειξαν έτσι, ότι η μυοστατίνη ρυθμίζει την αύξηση του σκελετικού μυός αλλά αρνητικά.

Στα βοοειδή μεταλλάξεις στο γονίδιο της μυοστατίνης προκαλούν «διπλασιασμένους μύες» (14,21,29,30,31,32,33,34). Ο φαινότυπος με μυϊκή υπερπλασία (double-muscled) βοοειδών, περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1807 (14,35) . Στα βοοειδή με αυτόν τον φαινότυπο παρατηρείται αύξηση στην μυϊκή μάζα με ταυτόχρονη μείωση στην ποσότητα λίπους και στην οστική μάζα (14,36,37).

Η μυοστατίνη παράγεται σαν πρόδρομη πρωτεΐνη 375 ή 376 αμινοξέων (Εικόνα 15). Αποτελείται από: α) (1-23αα) υποθετικό πεπτιδίο εκκριτικού συνθήματος β) (24-266αα) το προπεπτιδίο γ) και στο τέλος την ώριμη περιοχή της μυοστατίνης (267-375αα)(21,38).

Εικόνα15: Πρόδρομη πρωτεΐνη μυσστατίνη και ελλειμματικές μορφές⁽³⁸⁾



Εικόνα 15. Σχηματικό διάγραμμα των μεταλλαγμένων μορφών της μυσστατίνης. Το cDNA μυσστατίνης πλήρους μήκους (full length) κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη A(1-376aa) και οι τρεις μεταλλαγμένες μορφές της μυσστατίνης δείχνονται σαν Mstn N1(1-266aa), Mstn N2(24-266aa), και Mstn C(267-376aa).⁽³⁸⁾ Μόνο η παρουσία του N-τελικού άκρου εξασφαλίζει την σύνδεση της hSGT με την μυσστατίνη.

Πρόδρομη πρωτεΐνη 375 αμινοξέων και ανοσοδραστική πρωτεΐνη μυσστατίνη 26-KDa. Βρέθηκαν σε mRNA μυσστατίνης από σκελετικό μυ ανθρώπου 3 θέσεις έναρξης της μεταγραφής (transcription)(13). Παρήχθησαν 2 πολυκλωνικά αντισώματα A και B καθαρισμένα με χρωματογραφία συγγένειας. Το αντίσωμα A αναγνωρίζει την πρόδρομη πρωτεΐνη της μυσστατίνης και το αντίσωμα B και την πρόδρομη πρωτεΐνη και την ώριμη πρωτεΐνη μυσστατίνη. Με το αντίσωμα B ανιχνεύθηκε μία 26-KDa πρωτεΐνη σε ομογενοποίηση ανθρώπινου σκελετικού μυός, στο υπερκείμενό του και σε θραύσματα (fractions) μεμβράνης. Η 26-KDa πρωτεΐνη δεν ανιχνεύθηκε σε ιστούς, που διαθέτουν μεγάλες ποσότητες μαλακού μυός, όπως στα συραγγώδη σωματίδια του πέους, την ουροδόχο κύστη και τον προστάτη (13). Στα Western Blot εκτός από την ταινία, που αντιστοιχεί στην 26-KDa πρωτεΐνη, ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα B στον ανθρώπινο σκελετικό μυ και μια ταινία μεγαλύτερου μεγέθους από την 26-KDa, η οποία φαίνεται να προκαλείται από γλυκοσυλίωση, εν μέρει τουλάχιστον.

Επίσης, παρούσα και στον ανθρώπινο ορό, όπως και στον ανθρώπινο σκελετικό μυ είναι η 26-KDa πρωτεΐνη, που αναγνωρίστηκε με το αντίσωμα B. Χρήση αντισώματος A στον ορό ανθρώπου, που αναγνωρίζει την πρόδρομη πρωτεΐνη μυσστατίνη, δεν έδωσε καμία ταινία σε Western Blot πράγμα που σημαίνει, ότι πρόδρομη πρωτεΐνη μυσστατίνη δεν υπάρχει στην κυκλοφορία σε ανιχνεύσιμα ποσά.

Το μέγεθος της ανοσοδραστικής μυσστατίνης, που ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα Β στον ανθρώπινο μυ και ορό είναι περίπου διπλάσιο από το μονομερές των 106-aa, που εκφράζεται σε CHO ετερόλογα κύτταρα ποντικού (7,13). Γι' αυτό ερευνήθηκε αν η 26-KDa ανοσοδραστική πρωτεΐνη είναι διμερής. Έγινε PAGE(ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη) σε πιο ακραίες συνθήκες αποδιάταξης και αναγωγής αλλά δεν παρατηρήθηκε καμιά αλλαγή στην ηλεκτροφόρηση. Γι' αυτό λοιπόν η 26-KDa πρωτεΐνη θεωρείται, ότι είναι η ανοσοδραστική πρωτεΐνη μυσστατίνη μέχρι να αποδειχτεί η ταυτότητα της(13).

Η ανοσοδραστική μυσστατίνη δεν παρατηρήθηκε στο λεπτό και παχύ έντερο, στην ουροδόχο κύστη, στον προστάτη και στον νεφρό. Παρατηρήθηκε στον σκελετικό μυ ανθρώπου αλλά όχι στον περιβάλλοντα ινώδη-συνδετικό ιστό. Επίσης στις μυϊκές ίνες 1 και 2 ανοσοχρώση έδειξε παρουσία μυσστατίνης στην ίδια ένταση.

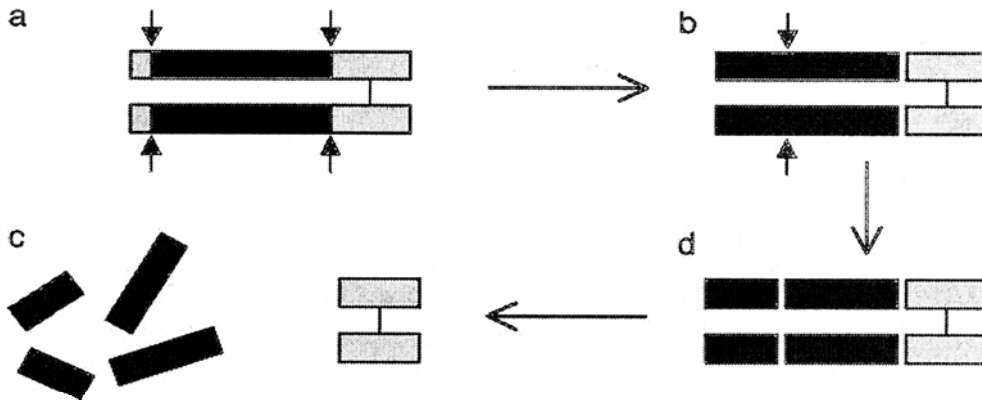
Η μυσστατίνη εκφράζεται ως μια 26-KDa πρωτεΐνη, μοναδικά στον ανθρώπινο σκελετικό μυ και εκκρίνεται στο πλάσμα. Η χρωματογραφία σε A-Sepharose δείχνει ότι η μυσστατίνη είναι σε γλυκοσυλιωμένη μορφή (13).

ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

Η μυσστατίνη συντίθεται και εκκρίνεται, όπως και άλλα μέλη της οικογένειας TGF-β, σαν ένα ανενεργό προπεπτίδιο. Πρώτα η μυσστατίνη διμερίζεται (dimerizes) και μετά για να παραχθεί ο ώριμος τύπος της γίνεται αποκοπή ενός πεπτιδίου (βλέπε σχήμα).

Το N-τελικό τμήμα της πρόδρομης πρωτεΐνης μυσστατίνης, γνωστό ως προπεπτίδιο, υφίσταται την πρωτεολυτική επεξεργασία. Για να παραχθεί το βιολογικά ενεργό μόριο η πρόδρομη πρωτεΐνη υφίσταται δύο πρωτεολυτικές διαδικασίες (Εικόνα 16) (6,7).

Εικόνα 16: Πρωτεολυτική επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης μυσστατίνης⁽⁶⁾



Εικόνα 16. Επεξεργασία (processing) της πρωτεΐνης μυσστατίνης. Η μυσστατίνη συντίθεται σαν πρόδρομο μόριο που υφίσταται δύο πρωτεολυτικές διαδικασίες: η μία απομακρύνει την N-τελική αλληλουχία συνθήματος και η άλλη παράγει το C-τελικό κομμάτι που έχει την ιδιότητα να συνδέεται στον υποδοχέα (a). Μετά την πρωτεολυτική διαδικασία το προπεπτιδίο (σκούρο χρώμα) και το δισουλφιδικά συνδεδεμένο C-τελικό διμερές (ανοικτό χρώμα) παραμένουν συνδεδεμένα με ομοιοπολικό δεσμό σε μία αδρανή πρωτεΐνη (b). Ενεργοποίηση της αδρανούς μυσστατίνης μπορεί να συμβεί με πρωτεολυτική διάσπαση του προπεπτιδίου (b, c) από μέλη της οικογένειας BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) /tolloid των μεταλλοπρωτεασών, που μπορούν να προκαλέσουν διάσπαση του αδρανούς συμπλέγματος (d).⁽⁶⁾

1^η πρωτεόλυση: 24-αμινοξέα N-τελικού άκρου. Το σηματοδοτικό πεπτιδίο, που αποτελείται από τα 24-αμινοξέα του N-τελικού άκρου και χρειάζεται στο εκκριτικό μονοπάτι της μυσστατίνης για στόχευση της πρωτεΐνης, απομακρύνεται με την πρώτη πρωτεόλυση.

2^η πρωτεόλυση: αμινοξέα 240-243 στην θέση RSRR (Arg – Ser – Arg – Arg). Στα αμινοξέα 240-243 στην θέση RSRR (Arg – Ser – Arg – Arg), θεωρώντας ως πρώτο το αμινοξύ μετά την N-τελική αλληλουχία συνθήματος, πραγματοποιείται η δεύτερη πρωτεόλυση. Η δεύτερη πρωτεόλυση δεν γνωρίζουμε από ποια ακριβώς πρωτεΐνη πραγματοποιείται. Προτείνεται το ένζυμο PACE ή αλλιώς furin, που διασπά διβασικά αμινοξέα, επειδή πριν την θέση πρωτεόλυσης υπάρχουν αμινοξέα με διβασική φύση (6,39). Για να

αποκτήσει βιολογική δράση αυτό το ώριμο πεπτίδιο συνδέεται σε έναν υποδοχέα (21,34).

Σε αρχέγονους μυοβλάστες βοός ανιχνεύθηκαν δύο μορφές της πρωτεΐνης, που αντιστοιχούν στην πλήρους μήκους (full length) πρωτεΐνη, που δεν έχει υποστεί επεξεργασία (52KDa) και στο αμινοτελικό 40 KDa LAP (Latency associated peptide). Όμως σε εκχυλίσματα σκελετικού μυός μαζί με το LAP και την πρωτεΐνη πλήρους μήκους, ανιχνεύθηκε η επεξεργασμένη 26 KDa ώριμη μυσστατίνη. Σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα σκελετικού μυός, στα οποία ανιχνεύτηκε η 26 KDa ώριμη πρωτεΐνη μυσστατίνη, σε εκχυλίσματα μυοβλαστών δεν ανιχνεύτηκε. Έτσι η πρωτεΐνη μυσστατίνη, με βάση αυτά τα δεδομένα, συντίθεται στους μυοβλάστες και σ' αυτούς υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία η πρόδρομη μυσστατίνη (21).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

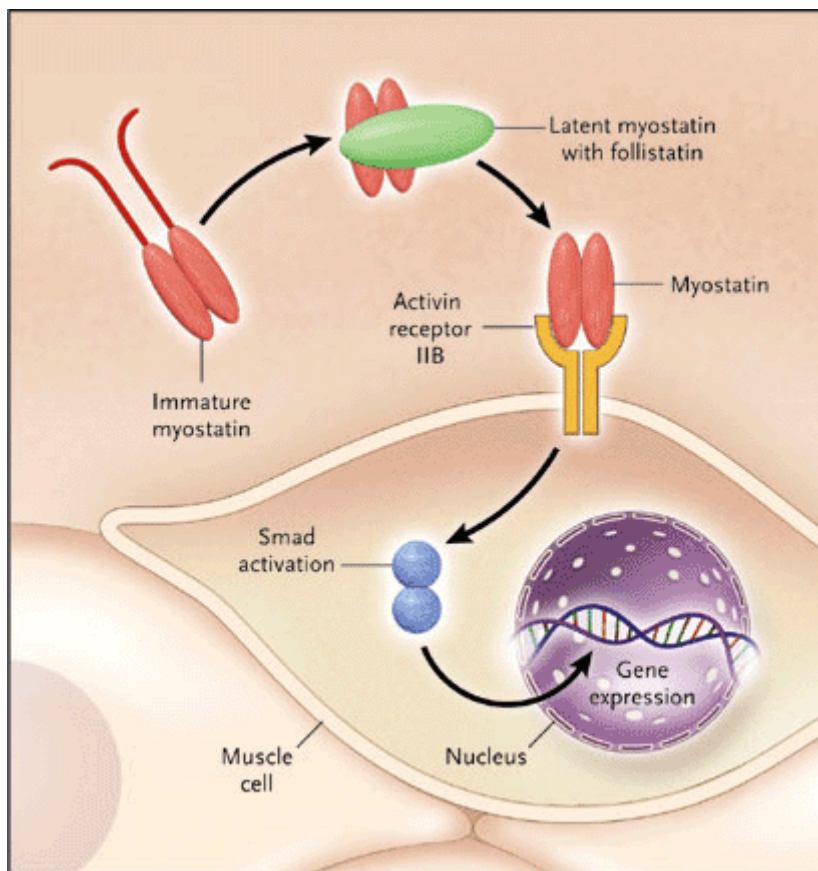
Η λειτουργία της μυσστατίνης μπορεί να εμποδιστεί από την φολλιστατίνη, που συνδέεται με τον αδρανή τύπο της μυσστατίνης. Ο υποδοχέας ακτιβίνης IIB είναι ο υποδοχέας με τον οποίο συνδέεται η ώριμη μυσστατίνη. Μέλη της οικογένειας Smad ενεργοποιούνται από αυτόν τον υποδοχέα για να πετύχουν τις επιδράσεις της μυσστατίνης και να ελέγξουν την μεταγραφή γονιδίων

Για τη ρύθμιση της μυϊκής μάζας σημαντικά κλειδιά είναι η εξακρίβωση του τρόπου επεξεργασίας της μυσστατίνης και των διαδικασιών, που ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση στον υποδοχέα (40).

Το C-τελικό διμερές αποτελεί τον ενεργό τύπο της μυσστατίνης.

Μετά την πρωτεολυτική επεξεργασία προκύπτει το βιολογικά ενεργό μόριο που είναι το C-τελικό κομμάτι. Αν και δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί για το C-τελικό κομμάτι η τρισδιάστατη δομή του είναι πιθανό τα C-τελικά κομμάτια να σχηματίζουν ένα διμερές συνδεδεμένο με δισουλφιδικό δεσμό που αναδιπλώνεται και σχηματίζει μια δομή κόμβου κυστίνης (cystine-Knot), που αποτελεί τον ενεργό τύπο της μυσστατίνης (6,41,42,43,44,45,46,47,48,49).

Εικόνα 17: Η οδός της μυοστατίνης⁽⁴⁰⁾



Εικόνα 17. Η οδός της μυοστατίνης.

Ώριμη μυοστατίνη παράγεται μετά από διμερισμό και αποκοπή. Η μυοστατίνη παραμένει σε αδρανή μορφή, όταν είναι συνδεδεμένη με την Φολλιστατίνη. Η σύνδεση του συνδέτη στον υποδοχέα ακτιβίνης τύπου IIB οδηγεί σε ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών και αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων.⁽⁴⁰⁾

Την πρωτεολυτική επεξεργασία υφίσταται το N-τελικό κομμάτι, που είναι γνωστό ως προπεπτιδίο. Για την δημιουργία της δομής κόμβου-κυστίνης θεωρείται, ότι παίζει σπουδαίο ρόλο το προπεπτιδίο για την αναδίπλωση της C-τελικής περιοχής με σωστό τρόπο (6).

Ένας ακόμη ρόλος του προπεπτιδίου είναι να ρυθμίζει μετά την πρωτεολυτική επεξεργασία την δραστηριότητα του C-τελικού διμερούς (6). Με μεθόδους γενετικής μηχανικής CHO κύτταρα υπερπαρήγαγαν μυοστατίνη. Το προπεπτιδίο με το C-τελικό διμερές σχημάτισαν σύμπλεγμα συνδεδεμένο με ομοιοπολικό δεσμό(noncovalently), που εκκρίνονταν από αυτά τα κύτταρα.

(Εικόνα 16) (6,50). Το C- τελικό διμερές σ' αυτό το σύμπλεγμα διατηρείται σε αδρανή, ανενεργή κατάσταση με την δράση του προπεπτιδίου (6,50,51,52).

Αναστολή δράσης C-τελικού διμερούς εξωκυτταρική μετά από σύνδεση με : 1) προπεπτίδιο. 2) φολλιστατίνη. 3) GASP-1. 4) FLRG. Έχει αποδειχτεί και *in vivo* και *in vitro* ότι το C-τελικό διμερές της μυστατίνης χάνει την βιολογική του δράση λόγω του προπεπτιδίου. Ειδικά με μεθόδους μελέτης έκφρασης καθώς και με μεθόδους σύνδεσης σε υποδοχέα αποδείχτηκε ότι το κεκαθαρμένο C-τελικό διμερές χάνει την δράση του μετά επίδραση του κεκαθαρμένου προπεπτιδίου (6,50,51). Εκτός από την φολλιστατίνη και το προπεπτίδιο η δράση του C-τελικού διμερούς της μυστατίνης φαίνεται να ρυθμίζεται εξωκυτταρικά από δύο άλλες πρωτεΐνες των GASP-1 και την FLRG (6,53,54).

Στο αίμα ανθρώπων και ποντικών η μυστατίνη κάνει σύμπλεγμα και με την GASP-1 και με την FLRG και, όπως φάνηκε από τις μελέτες, το C-τελικό διμερές της μυστατίνης συνδέεται και με τις δύο ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, οι οποίες εμποδίζουν την δράση του (6). Το C-τελικό διμερές της μυστατίνης συνδέεται στο κύτταρο-στόχο, κατά την ενεργοποίησή του από την αδρανή κατάσταση σε ειδικούς υποδοχείς και δίνει το σύνθημα (6).

Το C-τελικό διμερές της μυστατίνης συνδέεται με τον υποδοχέα ακτιβίνης τύπου II. Ο μηχανισμός με τον οποίο στέλνει το σύνθημα η μυστατίνη είναι παρόμοιος, όπως έχει αποδειχτεί με τον μηχανισμό άλλων συνδετών, που σχετίζονται με την οικογένεια TGF. Πιστεύεται ότι οι υποδοχείς τύπου I και II (κινάσες σερίνης/θρεονίνης) κάνουν ετεροδιμερή συμπλέγματα με τα περισσότερα μέλη της TGF-β υπεροικογένειας και έτσι μεταβιβάζουν το σύνθημα (6,55).

Ο υποδοχέας ακτιβίνης τύπου I φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα τύπου II.

Πρώτα γίνεται η σύνδεση με τον υποδοχέα τύπου II για τους περισσότερους συνδέτες. Ο υποδοχέας τύπου II είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης. Μετά από την πρώτη αυτή σύνδεση η κινάση υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα τύπου II και έτσι ενεργοποιείται.

Μελέτες έχουν δείξει, ότι ο ALK-4 και ο ALK-5 είναι δύο υποδοχείς τύπου I με τους οποίους μπορεί να συνδέεται η μυσστατίνη (6,56). Για το αν ο ALK-4 ή ο ALK-5 συμμετέχουν στην μεταβίβαση του σήματος της μυσστατίνης δεν υπάρχουν ακόμη γενετικά δεδομένα (6).

Ακολουθως οι Smad πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται από τον υποδοχέα τύπου I. Τελικά οι Smad πρωτεΐνες ενεργοποιούνται από την μυσστατίνη, όπως προκύπτει από μία ποικιλία δεδομένων είτε οι υποδοχείς τύπου I, ALK-5 και ALK-4, συμμετέχουν στην μεταβίβαση σήματος είτε όχι.

Τα γονίδια Smad 2/Smad 3 ενεργοποιούνται. Έχει δείχτεί, ότι τα γονίδια Smad 2/Smad 3 ενεργοποιούνται και ότι τα επίπεδα των phospho-Smad3 και phosphoSmad-2 αυξάνονται με την επίδραση καθαρής πρωτεΐνης μυσστατίνης σε καλλιέργεια κυττάρων (6,51,56,57,58).

Οι Smad πρωτεΐνες ενεργοποιούν ακολουθίες γονιδίων στον πυρήνα.

Στη συνέχεια η έκφραση γονιδίων στον πυρήνα ρυθμίζεται από τις ενεργοποιημένες Smad πρωτεΐνες, που εισέρχονται σ' αυτόν και μεταφέρουν το μήνυμα. Οι Smad πρωτεΐνες μετά την ενεργοποίησή τους ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων για τα οποία γνωρίζουμε λίγα, αλλά για το πώς αντιδρά στο σύνθημα της μυσστατίνης το κύτταρο έχουν γίνει πρόοδοι(6).

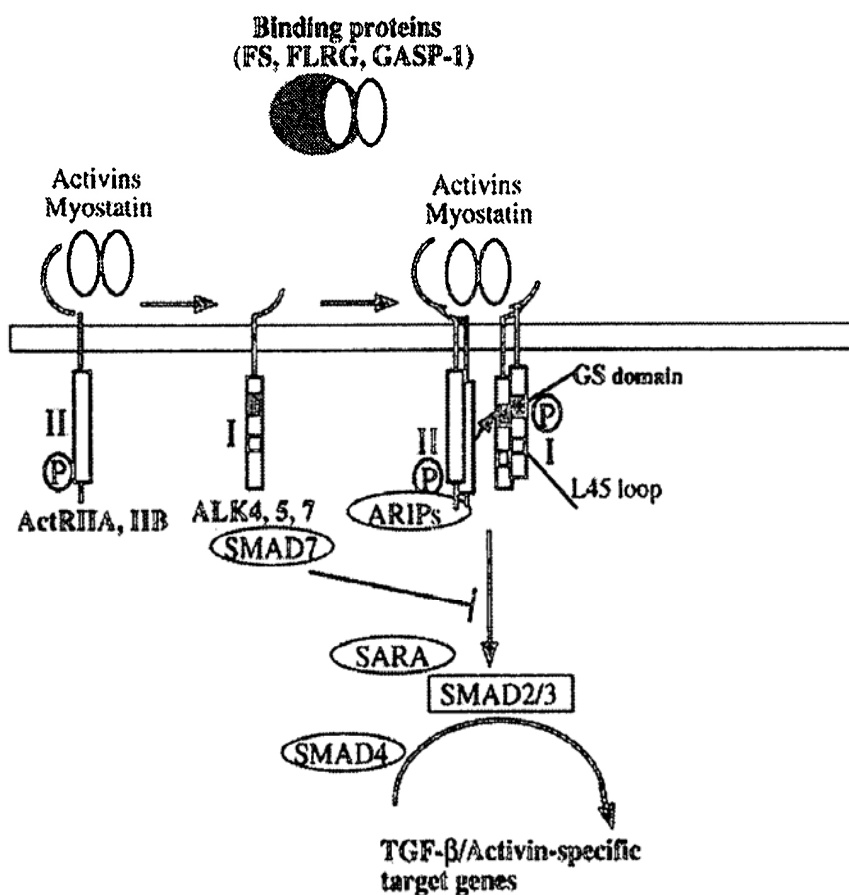
Η πρωτεΐνη c-ski του πυρήνα αναστέλλει την δράση των Smad 2,3,4.

Σε υπερέκφραση c-ski προκαλείται μυϊκή υπερτροφία. Γενετικά δεδομένα δείχνουν, ότι η ανάπτυξη του μυός ρυθμίζεται από μία πρωτεΐνη του πυρήνα καθώς η δράση των Smad 2,3,4 αναστέλλεται μετά από αλληλεπίδραση τους με την πρωτεΐνη αυτή, την c-ski. (6,59,60,61,62,63).

Σε υπερέκφραση c-ski προκαλείται μυϊκή υπερτροφία.

Παρατηρείται μεγάλη μυϊκή υπερτροφία, όταν υπερεκφράζεται η c-ski σε διαγονιδιακά ποντίκια (6,64) ενώ η σκελετική μυϊκή μάζα μειώνεται σοβαρά σε ποντίκια με έλλειψη c-ski (6,65).

Εικόνα 18: Μεταβίβαση σήματος μέσω μυσστατίνης⁽⁵⁸⁾



Εικόνα 18: Μεταβίβαση σήματος μέσω ακτιβινών, μυσστατίνης και σχετικών TGF-β συνδετών. Ακτιβίνες και μυσστατίνη πρώτα συνδέονται με υποδοχείς ακτιβίνης τύπου II (ActRIIA, IIB), και οι περιοχές GS των υποδοχέων τύπου I φωσφορυλιώνονται από υποδοχείς κινάσες τύπου II. Τότε οι υποδοχείς τύπου I φωσφορυλιώνουν την SMAD2 ή SMAD3. Η L45 loop των υποδοχέων τύπου I καθορίζει την ειδικότητα της SMAD. Ο SMAD7 είναι ένας SMAD αναστολέας, που εμποδίζει την SMAD φωσφορυλίωση από τους υποδοχείς τύπου I. Η Sara είναι μια πρωτεΐνη, που συνδέει υποδοχείς τύπου I και SMAD2/3. Έχουν χαρακτηριστεί πρωτεΐνες, που αντιδρούν με πολλαπλούς υποδοχείς (Multiple receptor-interacting proteins), όπως οι ARIPs και πρωτεΐνες-προσαρμογείς (adapter-proteins). Πρωτεΐνες, που συνδέονται εξωκυτταρικά για ακτιβίνες και μυσστατίνη, όπως οι Φολιστατίνες, παίζουν έναν σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση του αρχικού βήματος του συνθήματος ακτιβίνης/μυσστατίνης.⁽⁵⁸⁾

ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΙ, ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗ

Επίδραση μυοστατίνης σε μυοβλάστες

Με κυτταρομετρία ροής διαπιστώθηκε, ότι επώαση των μυοβλαστών παρουσία μυοστατίνης, οδήγησε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 αυξημένου αριθμού μυοβλαστών. Ακόμη παρατηρήθηκε συσσώρευση μυοβλαστών, στο όριο G₂/M του κυτταρικού κύκλου. Σε καλλιέργειες κυττάρων βοοειδών η αναστολή της ανάπτυξης τους από την μυοστατίνη είναι αναστρέψιμη (21). Δεν βρέθηκε καμία αύξηση στην απόπτωση.

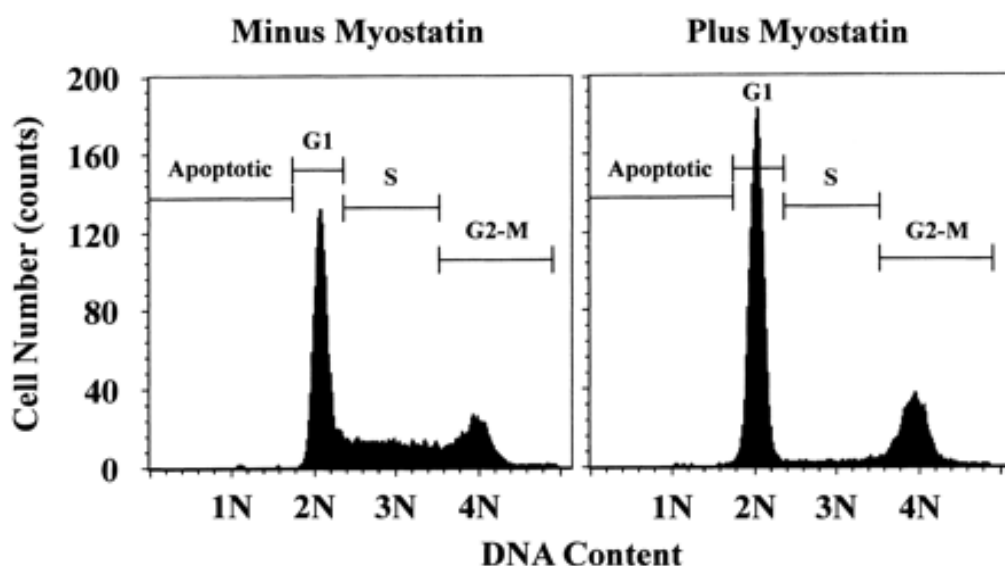
Η αναστολή του πολ/μού με μυοστατίνη, είναι ειδική, γιατί, όταν χρησιμοποιήθηκε μεταλλαγμένη ανασυνδυασμένη μυοστατίνη από το Piedmontese αλληλόμορφο (allele) (21,32,66), δεν ανέστειλε με παρόμοια μέθοδο (³C.Berry, M.Thomas and R.Kambadur in preparation) τον πολ/μό των μυοβλαστών .

Ένας πολύπλοκος μηχανισμός συμμετέχει σ' αυτή την αναστολή. Στον κυτταρικό κύκλο των θηλαστικών για την μετάβαση από την G1 στην S φάση συνεργάζονται κυκλίνες και κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CdKs). Αναστολείς CdK (CKIs) επηρεάζουν τη δράση τους. Στη μετάβαση από την G1 στην S φάση συμμετέχουν τα συμπλέγματα των G1cyclin.CdK. Σ' αυτά ανήκουν οι cyclin- D.CdK4, cyclin-D.CdK6 και η cyclin-ECdK2. Οι αναστολείς τους (CKIs) ανήκουν στις οικογένειες p16 και p21 όπως p16,p15,p27, p21 και p57. Η ανάπτυξη των κυττάρων καταστέλλεται από τον TGF-β με επίδραση στις G1 CdKs. Ο TGF-β δρα στις κινάσες των G1 CdKs αναστέλλοντας τη δραστηριότητά τους. Αυτό το πετυχαίνει με ενεργοποίηση των CKIs (21,67).

Στην περίπτωση της μυοστατίνης, η p21 ειδικά μεσολαβεί για την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, γιατί μόνο η p21 ενεργοποιείται μετά από επίδραση μυοστατίνης σε μυοβλάστες. Οι άλλοι CKIs δηλ. p16, p15, p57, p27 δεν έδειξαν καμία μεταβολή. Επιπλέον, η μικρή μείωση στην πρωτεΐνη CdK2 συσχετίστηκε με αύξηση στην p21. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση στην δραστηριότητα της CdK2. Τώρα είναι ευρέως αποδεκτό, ότι κατά τη διάρκεια της G1 φάσης τα συμπλέγματα cyclin CdK χρειάζονται για

φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ρετινοβλαστώματος (Rb). Για να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή των γονιδίων της S φάσης, απαιτούνται μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο E2F.DP1, με τους οποίους συνδέεται το υποφωσφορυλιωμένο Rb (21,68). Επομένως φωσφορυλίωση από G1-CdKs της πρωτεΐνης του Rb και επομένως αδρανοποίησή του, επηρεάζει τους μεταγραφικούς παράγοντες της S φάσης του κυτταρικού κύκλου απελευθερώνοντάς τους και επιτρέποντας έτσι την διέλευση στην επόμενη φάση (21,69). Αντιστρόφως, μπορούμε να έχουμε αναστολή των κυττάρων στην φάση G1 με αύξηση του Rb στον υποφωσφορυλιωμένο του τύπο διαμέσου αδρανοποίησης G1- CdK. Η αδρανοποίηση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με 2 τρόπους. Ο ένας είναι με αύξηση της συγκέντρωσης του CKIs. Ο άλλος τρόπος είναι και/ή με μείωση της συγκέντρωσης των CdKs πρωτεϊνών (21,70,71). Πράγματι βρέθηκε μείωση και στην CdK2 και στην δραστηριότητά της και αύξηση στην p21 σε μυοστατίνες που επεξεργάστηκαν με μυοστατίνη. Επίσης το Rb παρουσίασε μειωμένη φωσφορυλίωση (21,72,73).

Εικόνα 19: Επίδραση μυοστατίνης σε κύτταρα C_2C_{12} ⁽²¹⁾



Εικόνα 19. Επίδραση της μυοστατίνης στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου C_2C_{12} κυττάρων. C_2C_{12} κύτταρα είτε κάτω από την επίδραση (Plus) είτε χωρίς (Minus) την επίδραση μυοστατίνης, τους έγινε χρώση με propidium iodide και έγινε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. 10.000 κύτταρα αναλύθηκαν για κάθε επίδραση και κατανεμήθηκαν σε γραφική παράσταση σε φάσεις απόπτωσης, G₁, S, G₂/M του κυτταρικού κύκλου, βασισμένες στην ποσότητα DNA.⁽²¹⁾

Πίνακας 1: Κατανομή C₂C₁₂ μυοβλαστών στον κυτταρικό κύκλο μετά από επίδραση μυοστατίνης⁽²¹⁾

	Apoptotic cells	Cells in G ₁		Cells in S	Cells in G ₂ -M
			%		
Without myostatin	0.20(±0.03)	50.94(±0.42)		26.64(±0.18)	22.43(±0.43)
With myostatin	0.58(±0.05)	63.77(±1.07)		5.96(±0.93)	29.74(±0.93)

Πίνακας 1. Κατανομή C₂C₁₂ μυοβλαστών στον κυτταρικό κύκλο μετά από επίδραση μυοστατίνης. Ποσοστό κυττάρων από τις 10.000 μετρήσεις, σε απόπτωση, G₁, S, G₂/M φάσεις του κυτταρικού κύκλου σύμφωνα με FACS-ανάλυση (φαίνεται στην Εικόνα 8). Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι ± S.E. τετραπλοί προσδιορισμοί (quadruplicate determinations).⁽²¹⁾

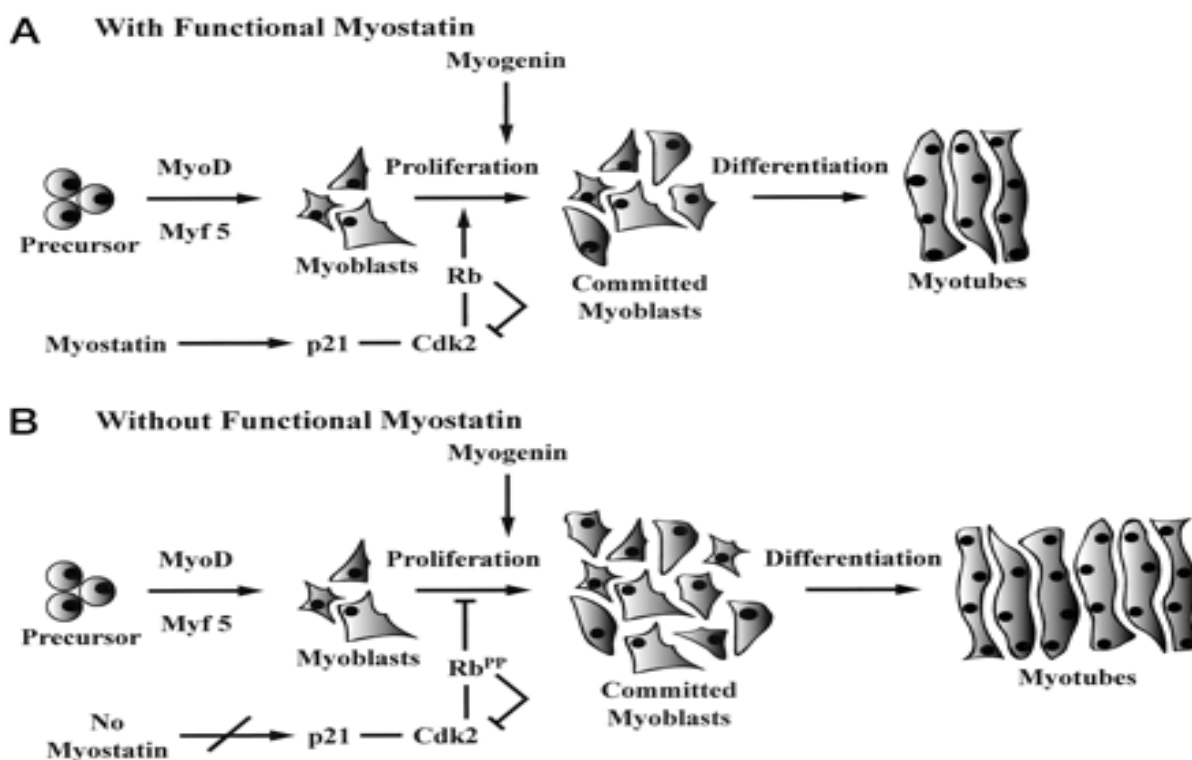
Έτσι η παρατηρούμενη στο ποντίκι χωρίς (null) μυοστατίνη και στο Belgian Blue βόδι, αύξηση στον αριθμό μυϊκών ινών (υπερπλασία) οφείλεται στον αυξημένο πολ/μό των μυοβλαστών. Η ρύθμιση του πολ/μού των μυοβλαστών λόγω μυοστατίνης φαίνεται στο ακόλουθο μοντέλο (Εικόνα 20) (21).

Στα μυϊκά κύτταρα η διαφορετική αντίδραση (differential response) εξωγενούς και ενδογενούς μυοστατίνης πρέπει να οφείλεται στην ύπαρξη αυτοκρινούς μηχανισμού.

Επειδή και η ακτιβίνη μοιράζεται με την μυοστατίνη το ίδιο ζευγάρι υποδοχέων υπάρχει το ερώτημα για το πώς πετυχαίνεται στο σύνθημα της μυοστατίνης εξειδίκευση (74). Έχει αποδειχτεί, ότι σύμπλεγμα υποδοχέων της μεμβράνης, διαμέσου του οποίου στέλνει ενδοκυτταρικά σύνθημα η μυοστατίνη αποτελείται από ActRIIB και ALK4 (ή ALK5). Υποτέθηκε, ότι πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός, που περιορίζει στα μυϊκά κύτταρα την δράση της μυοστατίνης (74). Έτσι σε καλλιεργημένους μυοβλάστες συγκρίθηκε η επίδραση εξωγενούς μυοστατίνης (στο καλλιεργητικό μέσο προστέθηκε ανασυνδυασμένη μυοστατίνη) και ενδογενούς μυοστατίνης (σε διαμολυσμένους (transfected) μυοβλάστες είχαμε υπερέκφραση μυοστατίνης) για να ελεγχθεί η υπόθεση (74). Στους καλλιεργημένους μυοβλάστες, η μεταγραφή ενός γονιδίου-ανταποκριτού (reporter) έγινε με επίδραση ενδογενούς μυοστατίνης και όχι εξωγενούς. Αντίθετα σε κύτταρα Hep2 και

κύτταρα MCF-7 οι συγκεντρώσεις εξωγενούς μυστατίνης ήταν αποτελεσματικές, ενώ σε μυοβλάστες δεν προκάλεσαν αντίδραση (74). Προκύπτει από παρατηρήσεις, ότι στα μυϊκά κύτταρα η διαφορετική αντίδραση (differential response) εξωγενούς και ενδογενούς μυστατίνης οφείλεται στην ύπαρξη κάποιου μηχανισμού (74). Έτσι η δράση της μυστατίνης ασκείται μέσω αυτοκρινούς μηχανισμού (74) στα μυϊκά κύτταρα.

Εικόνα 20: Ρόλος της μυστατίνης στην μυϊκή ανάπτυξη⁽²¹⁾

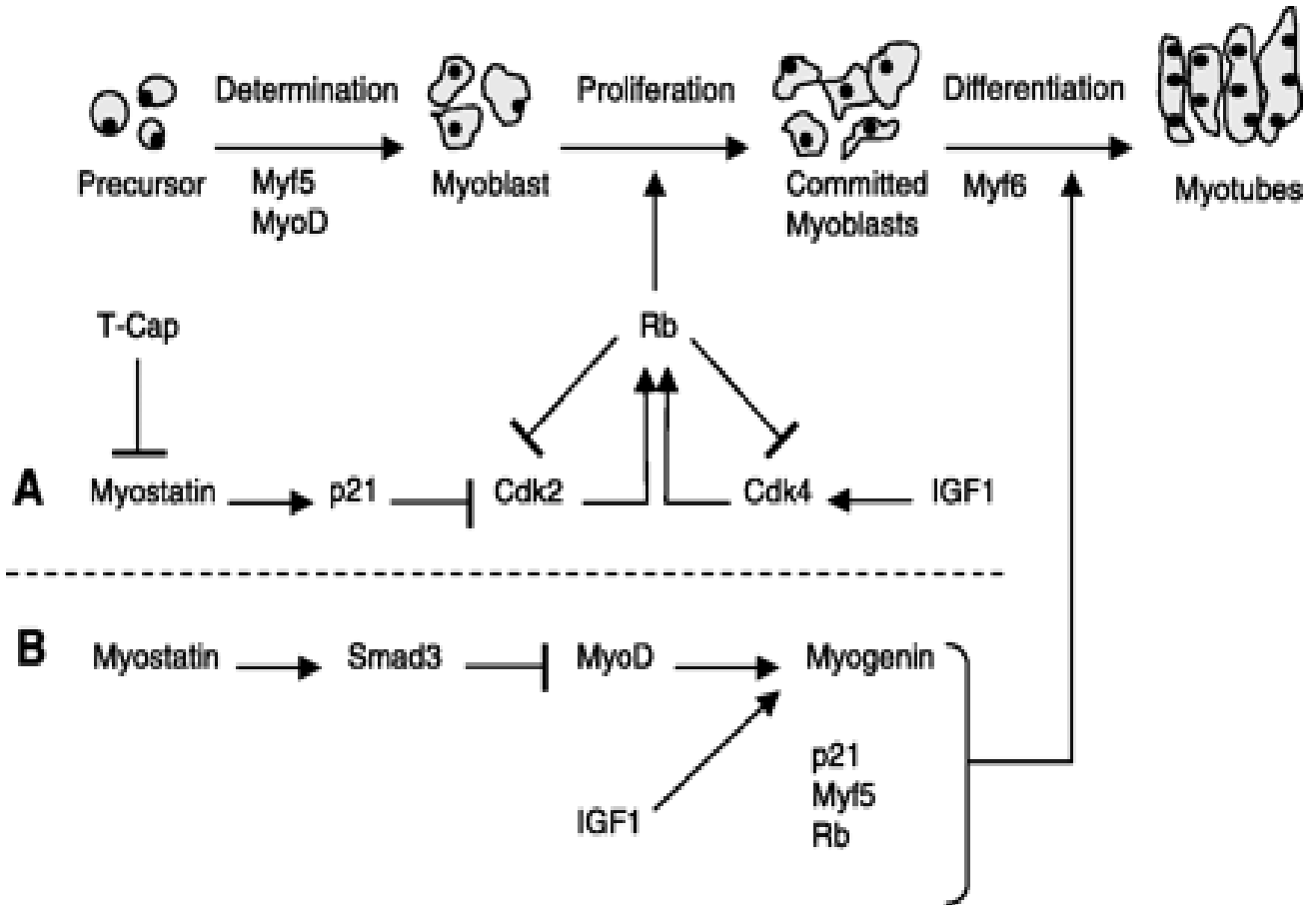


Εικόνα 20. Ένα μοντέλο για τον ρόλο της μυστατίνης στην μυϊκή ανάπτυξη.

A. Κατά την διάρκεια της εμβρυονικής μυογένεσης Myf-5 και MyoD εξειδικεύουν κύτταρα να μετασχηματιστούν σε μυοβλάστες. Οι μυοβλάστες τότε μεταναστεύουν και πολλαπλασιάζονται. Σε απάντηση στο σύνθημα της μυστατίνης, η p21 ενεργοποιείται, αναστέλλοντας την δραστηριότητα της cyclin-E-Cdk2 πράγμα, που προκαλεί αδρανοποίηση του Rb και αναστολή στην G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου. Έτσι ο αριθμός των μυοβλαστών και επομένως ο αριθμός των μυϊκών ινών, που πρόκειται να διαφοροποιηθούν ρυθμίζεται (περιορίζεται).

B. Σε απουσία λειτουργικής μυστατίνης, το σύνθημα για ενεργοποίηση του p21 χάνεται και το Rb παραμένει σε έναν υπερφωσφορυλιωμένο τύπο καταλήγοντας σε αυξημένο πολλαπλό μυοβλαστών, που οδηγεί σε αυξημένο αριθμό ινών.⁽²¹⁾

Εικόνα 21: Ρύθμιση της μυϊκής μάζας από την μυστατίνη⁽⁷⁵⁾



Εικόνα 21. Μυστατίνη και ανθρώπινη μυϊκή δύναμη. Ένα προσαρμοσμένο μοντέλο για τον ρόλο της μυστατίνης και του IGF1 σε μιτωτικές (A) και μυογενετικές (B) συνθήκες⁽⁵⁷⁾. Myf5 και MyoD εξειδικεύουν κύτταρα για την μυϊκή σειρά, και ο Myf6 και μυογενίνη ελέγχουν την διαφοροποίηση των μυοβλαστών. Α: σε καλλιεργητικό μέσο, η μυστατίνη ενεργοποιεί τον p21, έναν αναστολέα της Cdk2, πράγμα που καταλήγει σε υποφωσφορυλίωση του Rb. (B): Σε μυογενετικό υλικό, η μυστατίνη καταστέλλει τα επίπεδα της MyoD, μυογενίνης, p21, και Myf5 διαμέσου αλληλεπίδρασης Smad3-MyoD, οδηγώντας σε αναστολή της διαφοροποίησης των μυοβλαστών. Μειωμένα επίπεδα της MyoD οδηγούν σε μειωμένη σύνδεση με το Rb και αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Σε αντίθεση ο IGF1 επάγει διαφοροποίηση διαμέσου ενεργοποίησης της Myf5 και της myogenin. Τα \rightarrow δείχνουν διέγερση ενώ τα ---| αναστολή⁽⁷⁵⁾.

Σε καλλιέργειες, C₂C₁₂ κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε μυοσωλήνες, στους οποίους παρατηρήθηκε αναστολή στην σύνθεση πρωτεϊνών με την παρουσία μυστατίνης (6,76). Επίσης πιθανότητα υπάρχει για απευθείας επίδραση της μυστατίνης στα λιποκύτταρα λόγω της γρήγορης εξάντλησης των αποθεμάτων λίπους σε ποντίκια, που υπερεκφράζουν την μυστατίνη. Σε καλλιέργειες κυττάρων C3H10T1/2 και 3T3-L1 η λιποκυτταρική διαφοροποίηση αναστέλλεται από την μυστατίνη (2,6,25,56), αν και δεν έχουν ακόμη αναφερθεί επιδράσεις της μυστατίνης σε πλήρως διαφοροποιημένα λιποκύτταρα. Μια άλλη εναλλακτική εξήγηση είναι, ότι οι επιδράσεις της μυστατίνης, που παρατηρούμε στα αποθέματα λίπους και/ή στην μυϊκή μάζα ίσως να οφείλονται στην ενεργοποίηση από την μυστατίνη κάποιων άλλων μεσαζόντων μορίων, που προκαλούν καχεξία (6,8,77).

ΔΡΑΣΗ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

1. Αναστολή δορυφορικών κυττάρων και μυοβλαστών.

Τα προγονικά μυϊκά κύτταρα αναστέλλονται από την μυστατίνη (78).

Στα σπονδυλωτά μυοβλάστες εμβρυϊκοί και εμβρυονικοί διαφοροποιημένοι από την γέννηση σε μεταμιτωτικές και πολυπύρηνες μυϊκές ίνες οδηγούν στην ανάπτυξη του σκελετικού μυός. Ανάμεσα στην βασική μεμβράνη της μυϊκής ίνας και το σαρκόλυμμα υπάρχουν σιωπηλά δορυφορικά κύτταρα από τα οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η ανάπτυξη και αναγέννηση του μυός μετά την γέννηση (78).

Ένας τραυματισμός της μυϊκής ίνας καθώς και άλλα ερεθίσματα ενεργοποιούν τα δορυφορικά κύτταρα συγχωνεύονται με μυϊκές ίνες για να δώσουν ώριμες μυϊκές ίνες μετά από πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (78). Ο μυς αναγεννάται από δορυφορικά κύτταρα, όπως φαίνεται σε πλήρως κατεστραμμένες μυϊκές ίνες σε πειράματα με επίδραση μυοτοξινών. Ο κατεστραμμένος μυς 3 με 4 μέρες μετά την καταστροφή του επιδιορθώθηκε με εν τω γεννάσθαι μυϊκές ίνες από μυογενετικά προγονικά κύτταρα (6,78,79,80,81).

Τα δορυφορικά κύτταρα ενήλικων ζώων είναι ο στόχος της μυστατίνης, όπως προκύπτει από την ρύθμιση του μεγέθους των μυϊκών

ινών με την δράση της. Τα αυξημένα μεγέθη μυϊκών ινών, που μπορεί να προκαλέσει η απώλεια μυστατίνης σημαίνουν, ότι ίσως ο πολμός και/ή η διαφοροποίηση των δορυφορικών κυττάρων καταστέλλονται από την δράση της μυστατίνης. Έτσι σε μεταλλαγμένα για την μυστατίνη ποντίκια έχει βρεθεί, ότι τα ενεργοποιημένα δορυφορικά κύτταρα είναι σε μεγαλύτερη αναλογία και ανά μονάδα μήκους είναι περισσότερα σε αριθμό σε σχέση με ποντίκια άγριου τύπου (6,82,83).

Ο πολμός και η διαφοροποίηση μυοβλαστών βοοειδών καθώς και των C₂C₁₂ μυοβλαστών εμποδίζεται από ανασυνδυασμένη μυστατίνη (21,27,76,84). Σε αναπτυσσόμενα έμβρυα όρνιθος η έκφραση ρυθμιστικών μυογενετικών παραγόντων καταστέλλεται από μυστατίνη και έτσι ο μηριαίος μυς δεν σχηματίζεται κανονικά (78,79,85). Επομένως όπως φαίνεται τα δορυφορικά κύτταρα και οι μυοβλάστες χάρη στην δράση της μυστατίνης διατηρούνται σε κατάσταση ηρεμίας, και αυτά τα προγονικά μυϊκά κύτταρα σε μειωμένα επίπεδα μυστατίνης ενεργοποιούνται, όπως μετά από τραυματισμό των μυϊκών ινών (78).

Εάν η αναστολή των δορυφορικών κυττάρων είναι η κύρια λειτουργία της μυστατίνης θα περίμενε κανείς αύξηση στην αναγέννηση των μυών σε απουσία μυστατίνης (78). Έτσι σε ποντίκια με χρόνιες και έντονες μυϊκές βλάβες αυτό φάνηκε να είναι αληθινό από μελέτες (78). Παρατηρήθηκε σε μυϊκές ίνες μεγάλης διαμέτρου αναγέννηση καθώς και έκφραση ρυθμιστικών μυογενετικών παραγόντων νωρίτερα, σε myostatin-null ζώα, όπου οι μύες τους πληγώθηκαν με καρδιοτοξίνη έντονα, σε σχέση με κανονικούς για την μυστατίνη (78,85).

2. Ο λιπώδης και συνδετικός ιστός απουσία μυστατίνης αναπτύσσονται λιγότερο.

Ο ρόλος της μυστατίνης στον καθορισμό της κυτταρικής σειράς δεν έχει πλήρως ερευνηθεί. Έχει βρεθεί, ότι λιπώδης ιστός, συνδετικός ιστός καθώς και αναπτυσσόμενος μυϊκός ιστός (muscle) αναπτύσσονται λιγότερο σε ζώα με έλλειψη μυστατίνης (7,8,78,86,87).

3. Μείωση της λιπώδους ατροφίας και ίνωσης σε δυστροφικά ζώα απουσία μωστατίνης.

Σε απουσία μωστατίνης παρατηρήθηκε μείωση της λιπώδους διήθησης και ίνωσης μυών σε δυστροφικά ζώα (78,85,88).

Δημιουργείται το ερώτημα εάν η μωστατίνη μπορεί να στρέψει προγονικά πολυδύναμα κύτταρα από την μυογένεση προς την λιπογένεση ή την ινογένεση (78). Η επίδραση ανασυνδυασμένης μωστατίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις οδήγησε σε διέγερση της λιπογένεσης, και μείωση της μυογένεσης με την δράση μωστογενετικών παραγόντων (78,89).

Επειδή στους ανθρώπους τα επίπεδα της μωστατίνης που κυκλοφορεί στο αίμα είναι πολύ χαμηλά σε σχέση με τα τρωκτικά, υπάρχουν δυσκολίες στον προσδιορισμό των επιπέδων μωστατίνης (78). Επίσης επειδή ο GDF-11, που ανήκει και αυτός στην TGF- β οικογένεια, έχει υψηλή ομολογία με την μωστατίνη αυτό κάνει την παραγωγή αντισωμάτων ειδικών για την μωστατίνη δύσκολη (78).

4. Μείωση του ρυθμού πολ/μού των μυοβλαστών και αναστολή της τελικής τους διαφοροποίησης με επέμβαση του Smad 3 στην έκφραση και δράση της MyoD.

Κάτω από την έκφραση των myoD και myf5, που είναι μεταγραφικοί παράγοντες bHLH ειδικοί για τους μύες, για την μωστογενετική διαφοροποίηση μεσεγχυματικά πολυδύναμα πρόδρομα κύτταρα θα δώσουν μυϊκά σκελετικά κύτταρα (27). Στην bHLH οικογένεια ανήκουν επίσης ο μυϊκός ρυθμιστικός παράγοντας 4 και η μωστογενίνη, που εκτελούν το πρόγραμμα διαφοροποίησης, σε απάντηση στα συνθήματα διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα πρωτεΐνες ειδικές για μύες να εκφράζονται και να σχηματίζονται μωστολήνες πολυπύρρηνοι με συγχώνευση μωστοκυττάρων (27,57,90,91,92,93,94,95,96,97).

Η μωστατίνη εμποδίζει την διαφοροποίηση των μυοβλαστών σε μωστολήνες αναστέλλοντας διαμέσου της Smad 3 την έκφραση και δράση της MyoD (57).

Σχέση της μυοστατίνης με καταστάσεις απίσχυανσης ή μυϊκής υπερτροφίας

1. Μυοστατίνη και μάζα σώματος ελεύθερη λίπους σε υγιείς και ασθενείς με AIDS. Έχει αποδειχτεί με RIA, ότι οι συγκεντρώσεις της ανοσοδραστικής μυοστατίνης στον ορό συσχετίζονται αντίστροφα με την μάζα σώματος ελεύθερη λίπους. Επίσης έχει αποδειχτεί, ότι οι συγκεντρώσεις αυτές σε άτομα μολυσμένα από τον ιό HIV, που παρουσιάζουν απώλεια βάρους, αυξάνονται (13). Τα δεδομένα, που υπάρχουν υποστηρίζουν την άποψη, ότι η μυοστατίνη και σε υγιείς ανθρώπους και σε ανθρώπους μολυσμένους από HIV λειτουργεί σαν αναστολέας της μυϊκής αύξησης (13).

Άνθρωποι μολυσμένοι με HIV έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανοσοδραστικής μυοστατίνης στον ορό τους σε σχέση με υγιείς ανθρώπους. Επίσης άνθρωποι μολυσμένοι με HIV, οι οποίοι παρουσιάζουν το σύνδρομο απίσχυανσης κατά την εκδήλωση του AIDS έχουν μεγαλύτερα ποσά της ανοσοδραστικής μυοστατίνης. Ο δείκτης fat-free μάζας σώματος συσχετίζεται αντίστροφα με τις συγκεντρώσεις της ανοσοδραστικής πρωτεΐνης μυοστατίνης (13).

2. Myostatin null ποντίκια και μυϊκή μάζα. Με στόχευση γονιδίου (gene targeting) δημιουργήθηκαν ποντίκια, που δεν παρήγαγαν μυοστατίνη (myostatin null mice) και που η μάζα του σκελετικού τους μύος παρουσιάζει πολύ μεγάλη αύξηση. Στα ποντίκια αυτά συγκεκριμένοι μύες ζυγίζουν 2 με 3 φορές περισσότερο σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Αυτό οφείλεται σε αύξηση στον αριθμό των μυϊκών ινών. Η αύξηση αυτή δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση λίπους (33).

3. Μυοστατίνη και βοοειδή Belgian blue. Ο φαινότυπος «διπλασιασμένοι μύες» παρατηρείται και στην φυλή βοοειδών Belgian blue. Γί'αυτόν θεωρήθηκε υπεύθυνη μία μόνο θέση στο γονιδίωμα, που ονομάστηκε (mh) μυϊκή υπερτροφία (33,98). Η mh θέση αποδείχτηκε ταυτόσημη με το γονίδιο της μυοστατίνης. Η μυϊκή μάζα παρουσιάζει μία μέση αύξηση κατά 20-25% λόγω αυτής της μετάλλαξης, ενώ στα περισσότερα άλλα όργανα η μάζα παρουσιάζει μείωση (33,99,100), όπως επίσης και ο συνδετικός ιστός και το ενδομυϊκό λίπος (33,101).

Στα βοοειδή, μηδενική μετάλλαξη στην μυοστατίνη προκαλεί, σε αντίθεση με το ποντίκι, στην μυϊκή μάζα, μέτρια αύξηση και στα εσωτερικά όργανα μείωση του μεγέθους. (Σε σχέση με τα ποντίκια με έλλειψη μυοστατίνης όπου έχουμε 200-300% αύξηση στην μυϊκή μάζα, στα βοοειδή της φυλής Belgian blue η αύξηση είναι μόνο 20-25%) (33).

4. Γυμναστική και μυοστατίνη. Δεν βρέθηκε σημαντική σχέση ανάμεσα στην αντίδραση στην γυμναστική της ολικής μυϊκής μάζας και στους γονότυπους της μυοστατίνης. Αυτό μας κάνει να πιστεύουμε, ότι η ποικιλομορφία (variation) στο γονίδιο της μυοστατίνης δεν επηρεάζει σημαντικά την αντίδραση της μυϊκής μάζας στην γυμναστική. Αφρικανοί και Καυκάσιοι Αμερικανοί και Ασιάτες σε ένα τυχαίο δείγμα ατόμων υποβλήθηκαν σε έντονες μυϊκές ασκήσεις (strength training) και ταξινομήθηκαν με βάση την αύξηση της μυϊκής τους μάζας, σε κατηγορίες. Στις κατηγορίες 5 ή 4 τοποθετήθηκαν αυτοί που παρουσίασαν μεγάλη αύξηση μυϊκής μάζας σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και θεωρούνται εξαιρετικά ανταποκρινόμενοι (extreme responders), ενώ αυτοί που δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση μυϊκής μάζας μετά από τουλάχιστον 6 μήνες έντονης άσκησης θεωρούνται ως μη ανταποκρινόμενοι (nonresponders) και ταξινομήθηκαν στην κατηγορία 0 ή 1. Τα άτομα αυτά ελέγχθηκαν για το γονίδιο της μυοστατίνης, έγινε ανάλυση μεταλλάξεων καθώς και αναζήτηση των συνήθων πολυμορφισμών (variants) (14).

Επίσης έγινε ταξινόμηση και σύγκριση των ατόμων αυτών ανά φυλή. Στον πίνακα 2 φαίνονται αυτοί, που βρίσκονται στις κατηγορίες 0 και 1 και αυτοί, που ανήκουν στις κατηγορίες 4 και 5. Φαίνονται οι αλλαγές (variation) στην μυοστατίνη μεταξύ των δύο αυτών ομάδων, η σύγκριση μεταξύ αυτών των αλλαγών και τα αποτελέσματα από την σύγκριση. Από τα αποτελέσματα φάνηκε, ότι ανάμεσα στην αντίδραση στην γυμναστική και τον γονότυπο, δεν υπάρχει σημαντική σχέση. Επίσης φάνηκε, ότι ανάμεσα στους Καυκάσιους Αμερικανούς, που ανταποκρίθηκαν και δεν ανταποκρίθηκαν δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 2: Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της μυοστατίνης και ταξινόμηση ανά φυλή⁽¹⁴⁾

Variant	Genotype	Caucasian			African American		
		Responder	Nonresponder	Total	Responder	Nonresponder	Total
Exon 1 <i>AluI</i>	Thr/Thr	—	—	—	—	1	1
	Ala/Thr	—	—	—	3	3	7
	Ala/Ala	42	33	108	16	13	33
Exon 2 <i>BanII</i>	Lys/Lys	39	33	101	13	9	23
	Lys/Arg	3	—	6	7	6	15
	Arg/Arg	—	—	—	—	3	3

5. Μύες ταχείας σύσπασης-αυξημένο mRNA μυοστατίνης. Σε μύες ταχείας σύσπασης (fast-twitch muscle) βρέθηκε υψηλότερη συγκέντρωση mRNA μυοστατίνης απ'ότι σε βραδείας σύσπασης μύες. Άρα στους μύες ταχείας σύσπασης, ο ρόλος της μυοστατίνης είναι ανασταλτικός, και αυτό θα μπορούσε να συμβεί από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην μυοστατίνη, ειδικές για τις μυικές ίνες (fiber-specific) (75,102,103).

Σε Myostatin(Mstn) Knockout ποντίκια λόγω έλλειψης μυοστατίνης έχουμε έναν πιο γλυκολυτικό και πιο ταχύ ολικό μυϊκό φαινότυπο γιατί έχουμε περισσότερες γλυκολυτικές ίνες, περισσότερες ταχείες ίνες τύπου II και επομένως περισσότερες ταχείες ισομορφές της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MHC) (104).

6. Μυοστατίνη και ηλικία (στον άνθρωπο).

Η έκφραση του mRNA της μυοστατίνης δεν επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία (105,106). Σε υπερήλικες έχουμε ανεβασμένα (elevated) επίπεδα μυοστατίνης στον ορό σε σχέση με νεαρούς ενήλικες και υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις μυοστατίνης του ορού και στην μυϊκή μάζα (106,107). Αύξηση της μεταφοράς (transfer) μυοστατίνης στον ορό από τους μύες, αύξηση της σύνθεσης μυοστατίνης στους μύες ή μείωση της κάθαρσης από τον ορό θα μπορούσαν να αυξήσουν τα επίπεδα μυοστατίνης στον ορό. Μια άλλη έρευνα (report) έδειξε ότι στους αρουραίους (rats) με την ηλικία (with aging) αυξάνεται η μεταγραφή του γονιδίου της μυοστατίνης (106,108).

Στον άνθρωπο το mRNA της μιοστατίνης είναι στην πιο υψηλή του συγκέντρωση, σε δείγματα μυών όπου το ταχύτερο (the fastest) τύπου 2X ισομερές (isoform) βαριάς αλυσίδας της μιοσίνης είναι στην υψηλότερή του συγκέντρωση (106). Δεν υπήρχε σημαντική σχέση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των mRNAs των βαρέων αλυσίδων της μιοσίνης, είτε του τύπου 1 είτε του τύπου 2a και στα επίπεδα mRNA της μιοστατίνης.

Αντίθετα σε τετρακέφαλους 29 μηνών αρουραίων (rats) (δηλ. πολύ γηρασμένων) βρέθηκε ότι το mRNA της μιοστατίνης ήταν 300 φορές περισσότερο σε σχέση με 17 μηνών (μεσήλικες) αρουραίους.

Ακόμη όμως για την σαρκοπενία στις μεγάλες ηλικίες δεν μπορούμε να προεξοφλήσουμε έναν ρόλο για τη μιοστατίνη.

7. RMS (Ραβδομυοσάρκωμα) Στα RMS κύτταρα η μιοστατίνη σταματά (arrests) τον πολ/μό τους (22,109,110).

Η προέλευσή του είναι μεσεγγυματική, είναι κακοήθης καρκίνος και θεωρείται (is thought) ότι δημιουργείται από κύτταρα που δεν καταφέρνουν να διαφοροποιηθούν σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα (22,109,110). Σε RD κύτταρα (cultured RMS cell line) η μιοστατίνη και εκφράζεται και μεταφράζεται (22).

Επίσης σε RD cells, που καλλιεργήθηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις εξωγενούς ανασυνδυασμένης μιοστατίνης ο πολ/μός τους μειώθηκε με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο και η ανασταλτική επίδραση ήταν αναστρέψιμη ακριβώς όπως συνέβη με πρωτογενείς βόειους μυοβλάστες και C₂C₁₂ κύτταρα (21,22) χωρίς να ρυθμίζει θετικά τον αναστολέα p21 ή άλλους αναστολείς CKIs όπως p27 και p57 (της p21 family) και p15 και p16 (της p16 family) αντίθετα με τη δράση της σε κανονικούς μυοβλάστες (22).

Ενδεχομένως στη θεραπεία του RMS θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μιοστατίνη αφού αναστέλλει την ανάπτυξη των RMS κυττάρων με καταστολή του συμπλέγματος cyclin-E- CdK2 (22).

8. Ατροφία μυών σχετιζόμενη με γλυκοκορτικοειδή.

Υπάρχουν ευρήματα που δείχνουν ότι η έκφραση της μιοστατίνης ενεργοποιείται (upregulate) από γλυκοκορτικοειδή, τα οποία επάγουν (induce) την μεταγραφή του γονιδίου (18). Έτσι υποθέτουμε ότι η ενεργοποίηση (upregulation) της έκφρασης της μιοστατίνης ίσως είναι εν μέρει υπεύθυνη για ατροφία μυών, που σχετίζεται με γλυκοκορτικοειδή (18).

Στον διαβήτη και στην ομοιόσταση της γλυκόζης εμπλέκονται μέλη της οικογένειας TGF- β όπως ο BMP 9, η ακτιβίνη και η μυστατίνη και γι' αυτό όσον αφορά την θεραπεία του διαβήτη αποτελούν εν δυνάμει (potential) στόχους (58,111).

9. Μεσεγχυματικά πολυδύναμα (multipotent) κύτταρα ποντικού προωθούνται στην λιποκυτταρική σειρά από την μυστατίνη.

Μεσεγχυματικά πολυδύναμα (multipotent) κύτταρα C3H10T(1/2) ποντικού στρέφονται προς την λιποκυτταρική σειρά από την μυστατίνη, η οποία αναστέλλει την μυογένεση (89). Στην μυϊκή ατροφία παράγοντες, όπως η μυστατίνη, μπορούν να επάγουν κάτω από ειδικές συνθήκες απώλεια μυϊκών πρωτεϊνών (112). Αντίθετα σε 3T3-L1 κύτταρα ποντικού η προλιποκυτταρική διαφοροποίηση αναστέλλεται από την μη πρωτεΐνη μυστατίνη (25).

Οι πρωτεΐνες BMP2 και BMP7 επάγουν την λιπογένεση. Η δράση της BMP7 όμως αναστέλλεται από την μυστατίνη. Τα αποτελέσματα πειραμάτων δείχνουν, ότι η μυστατίνη ανταγωνίζεται την BMP7 και είναι έτσι σημαντικός ρυθμιστής της λιπογένεσης. (56).

10. Στα αρσενικά η αυξημένη μάζα σκελετικού μυός και σώματος σε σχέση με τα θηλυκά σχετίζεται με την μειωμένη στα αρσενικά επεξεργασμένη (processed) μυστατίνη.

Σε θηλυκά και αρσενικά ποντίκια ελέγχθηκε το βάρος αντίστοιχων σκελετικών μυών και η παρουσία 26 KDa ώριμης (processed) μυστατίνης (113). Στα αρσενικά ήταν 40% βαρύτερες οι μυϊκές μάζες και η μάζα σώματος σε σχέση με τα θηλυκά (113). Η 26 KDa όμως ώριμη (processed) μυστατίνη στα αρσενικά ήταν 40-60% χαμηλότερη σε σχέση με τα θηλυκά. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι είναι μεταμεταφραστικό και μεταμεταγραφικό γεγονός η μειωμένη ώριμη μυστατίνη και δεύτερον ότι στα αρσενικά η αυξημένη μάζα του σκελετικού μυός και του σώματος σε σχέση με τα θηλυκά σχετίζεται με την μειωμένη στα αρσενικά μυστατίνη (113).

Σε myostatin-null ποντίκια, βρέθηκε σε μύες τους αυξημένη έκφραση ARA70 (androgen receptor associated protein-70, a binding co-factor του androgen receptor-AR). Μία ακόμη επιβεβαίωση, ότι η έκφραση του γονιδίου ARA70 ρυθμίζεται αρνητικά από την μυστατίνη ήταν όταν η έκφραση του ARA70 μειώθηκε (down-regulated) με προσθήκη εξωγενούς μυστατίνης (114).

11. Μυϊκή δυστροφία.

Για την μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD) ελέγξαμε σε μοντέλο mdx ποντικού εάν ο δυστροφικός φαινότυπος βελτιώνεται με *in vivo* αναστολή της μιοστατίνης (115,116,117,118,119,120).

Σε μν mdx ποντικού αναστολή της (blockade) ενδογενούς μιοστατίνης για 3 μήνες κατέληξε σε αύξηση μυϊκής μάζας, βάρους σώματος, μυϊκής δύναμης και μεγέθους και όσον αφορά τον μυϊκό εκφυλισμό (degeneration) σε σημαντική μείωση (120).

Κατά την μυογένεση C₂C₁₂ κυττάρων η έκφραση της μιοστατίνης ενεργοποιείται (upregulated) (90). Επίσης αν εισαγάγουμε cDNA μιοστατίνης ποντικού σε C₂C₁₂ μυοβλάστες αναστέλλεται ο πολ/μός των κυττάρων (90). Παραδόξως σε διαφοροποιούμενα (differentiating) C₂C₁₂ μυοκύτταρα ενισχύεται η επιβίωση σε υπερέκφραση cDNA μιοστατίνης. Όλα αυτά δείχνουν, ότι εκτός από την αναστολή του πολ/μού των μυοβλαστών η μιοστατίνη συμμετέχει και σε άλλο επίπεδο ρύθμισης και άρα είναι πιο σύνθετος ο ρόλος της στην μυογένεση (90).

Στον σκελετικό μν η έκφραση του mRNA μιοστατίνης είναι διαφορετική στους διάφορους τύπους των μυικών ινών και κατά την διάρκεια αποφόρτισης του οπίσθιου μηριαίου αυξάνει (102).

Ένας σημαντικός στόχος της μιοστατίνης είναι η μυογενίνη. Η απόπτωση των μυικών κυττάρων προκαλούμενη από ήπια μιτογόνα μειώνεται σοβαρά σε υπερέκφραση μιοστατίνης (84).

12. s-IBM (Sporadic inclusion-body myositis) για γηραιά άτομα η πιο κοινή μυϊκή ασθένεια.

Σε γηραιά άτομα η πιο κοινή μυϊκή ασθένεια, που είναι εκφυλιστική είναι η s-IBM, δηλαδή, η σποραδική μιοσίτις μυοκυτταρικών εγκλείστων, που χαρακτηρίζεται από απίσχναση των μυών (121). Οριστική θεραπεία για την ασθένεια δεν υπάρχει, η παθογένεση και η αιτιολογία της είναι άγνωστες. Έχει βρεθεί, ότι στην παθογένεση της s-IBM ίσως έναν νέο ρόλο να παίζουν η πρόδρομη μιοστατίνη και η μιοστατίνη είτε συνδεδεμένες με αμυλοειδές-β (Aβ) είτε μόνες (121).

Στις μυϊκές ίνες s-IBM η έκφραση και της πρόδρομης μιοστατίνης και της μιοστατίνης ήταν αυξημένες όπως και η σύνδεσή τους με το Αβ καθώς και η συνύπαρξή τους, μέσα στις μυϊκές ίνες s-IBM (121).

13. Χρόνια οστεοαρθρίτιδα του ισχίου. Σε ασθενείς με χρόνια οστεοαρθρίτιδα του ισχίου (122), που παρουσίασαν χρόνια μυϊκή ατροφία λόγω αχρησίας στον έξω πλατύ μύ του τετρακεφάλου βρήκαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του αυξητικού παράγοντα, που μοιάζει με την ινσουλίνη (insulin-like growth factor-1/ IGF-1), της μιοστατίνης και του ανασταλτή της λευχαιμίας (LIF) mRNAs (Leukemia inhibitory factor) αυξάνονται σε σχέση με μυ από υγιείς μάρτυρες (122). Η μιοστατίνη σύμφωνα με τα αποτελέσματα συνεισφέρει στην ατροφία τύπου 2A και 2B και είναι ένας παράγοντας απίσχνανσης του μύος (122).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

1. Προπεπτίδιο μιοστατίνης, Φολλιστατίνη, υποδοχείς τύπου II, FLRG, GASP-1, TLL-2 και telethonin.

Η ρύθμιση του συνθήματος της μιοστατίνης ερευνήθηκε, με σκοπό την ταυτοποίηση των αναστολέων της. Στην προώθηση της μυϊκής αύξησης ίσως οι αναστολείς αυτοί βρουν εφαρμογή. Από ωθήκη Κινέζικου Hamster κατασκευάστηκε κυτταρική σειρά, που υπερπαρήγαγε μιοστατίνη, λόγω εισαγωγής πολλαπλών αντιγράφων γονιδίου στο γένωμά του (50). Ετσι χρησιμοποιήθηκε καθαρή μιοστατίνη για πειράματα in vitro.

Η πρωτεΐνη φολλιστατίνη μπλοκάρει τη σύνδεση στον ActRIIB υποδοχέα του C-τελικού διμερούς της μιοστατίνης. Επίσης και το προπεπτίδιο της μιοστατίνης αναστέλλει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, τη σύνδεση στον υποδοχέα ActRIIB του C-τελικού διμερούς της μιοστατίνης.

Για να μελετηθεί in vivo πως επηρεάζεται το σύνθημα της μιοστατίνης από τους υποδοχείς ακτιβίνης τύπου II, από την φολλιστατίνη και από το προπεπτίδιο της μιοστατίνης, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια που παράγουν είτε φολλιστατίνη είτε το προπεπτίδιο της μιοστατίνης είτε έναν dominant-negative τύπο του υποδοχέα ActRIIB (50).

Και στις τρεις περιπτώσεις διαγονιδιακών ποντικών παρατηρήθηκε πολύ μεγάλη αύξηση την μυϊκή μάζα σε σχέση με τα μη διαγονιδιακά ποντίκια αναφοράς. Σε σύγκριση με myostatin-knockout ποντίκια παρατηρήθηκε εφάμιλλη αύξηση μ' αυτά. Όλα αυτά δείχνουν ότι και η φολλιστατίνη και ο dominant-negative (με έλλειψη της περιοχής της κινάσης) τύπος του ActRIIB, που αναστέλλουν την δράση της μυστατίνης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε καταστάσεις νοσημάτων στον άνθρωπο για προώθηση της μυϊκής αύξησης καθώς και για εφαρμογές στην κτηνοτροφία (50).

Η FLRG (Follistatin-related gene) (38,53) GDF-8-associated serum protein-1 (GASP-1) (38,54) myostatin propeptide (38,53) και η telethonin (29,38) είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με την μυστατίνη (38).

Περιοχές, που υπάρχουν σε αναστολείς πρωτεασών έχουν βρεθεί στην GASP-1 πράγμα που σημαίνει ότι ίσως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες BMP/tolloid αναστέλλονται από την δράση της GASP-1 (6,53,54,78).

Η βιολογική δράση της μυστατίνης αναστέλλεται από αυτές τις πρωτεΐνες μετά τη σύνδεσή τους με τον ώριμο τύπο της μυστατίνης (38).

2. Η Titin-cap.

Η παραγωγή ή η επεξεργασία της μυστατίνης δεν τροποποιείται, όταν έχουμε υπερέκφραση titin-cap (Tcap), ενώ τα εκκρινόμενα ποσά μυστατίνης μειώνονται σε υπερέκφραση T-cap (29), πράγμα που μπορεί να επιδρά στην μυϊκή ανάπτυξη (29,75). Η T-cap πρωτεΐνη (ή Titin-cap) είναι πρωτεΐνη του σαρκομεριδίου, έχει μοριακό βάρος 19KDa και στον σκελετικό μυ το mRNA της υπάρχει σε αφθονία (29,123). Σε πειράματα με C₂C₁₂ μυοβλάστες που υπερεξέφραζαν T-cap βρέθηκε ότι, σε σχέση με μυοβλάστες ελέγχου (control) πολλαπλασιάζονταν πολύ πιο γρήγορα(29).

Στους μυοβλάστες, που υπερεκφράζουν T-cap παρατηρήθηκε αύξηση στον πολμό τους, που θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της μειωμένης έκκρισης μυστατίνης μιας και ο πολμός των μυοβλαστών ρυθμίζεται αρνητικά από τη μυστατίνη. Έτσι προτείνεται ότι η T-cap στα πρόδρομα μυογενετικά (myogenic) κύτταρα, αλληλεπιδρά με την ώριμη επεξεργασμένη (processed) μυστατίνη και ελέγχει την έκκρισή της χωρίς να επηρεάζει την παραγωγή και επεξεργασία της (29).

3. Μείωση μυοστατίνης μετά από άρση βαρών.

Η έρευνα έδειξε, ότι η έκφραση της μυοστατίνης μειώνεται σημαντικά μετά από πρόγραμμα άρσης βαρών (heavy-resistance strength training) 9 εβδομάδων σε υγιείς γυναίκες και άνδρες, που προηγουμένα έκαναν καθιστική ζωή (sedentary men and women). Φαίνεται, ότι η μείωση στην έκφραση της μυοστατίνης, που έγινε μετά από strength training (ST- mediated decline in myostatin expression) δεν εξαρτάται από το γένος (gender) ή την ηλικία(124).

Σε περιοδική επαναφόρτιση μυός αρουραίου έχουμε λιγότερο ανεβασμένα επίπεδα μυοστατίνης σε σχέση με συνθήκες συνεχούς αποφόρτισης (continuously unloaded condition) (102,103,124,125).

4. Σε παχύσαρκους μετά από χολοπαγκρεατική παράκαμψη (BPD) η έκφραση της μυοστατίνης στον σκελετικό μυ μειώνεται μετά την μείωση της FFM (fat free mass).

Στους μύες των ασθενών μετά την BPD το mRNA της μυοστατίνης βρέθηκε σημαντικά μειωμένο με real-time RT-PCR. Η έκφραση της μυοστατίνης στον σκελετικό μυ μειώνεται μετά την μείωση της FFM (fat free mass) στους ασθενείς, που έχασαν βάρος πράγμα, που μπορεί να θεωρηθεί, ότι έγινε για να μην μειωθεί μετά την BPD η μυϊκή μάζα προοδευτικά.

Κατά τη διάρκεια του ενεργειακού περιορισμού η διατήρηση της μυϊκής μάζας επηρεάζεται και από εξωτερικούς και από εσωτερικούς παράγοντες σε σχέση με τη μείωση των αποθεμάτων λίπους (126).

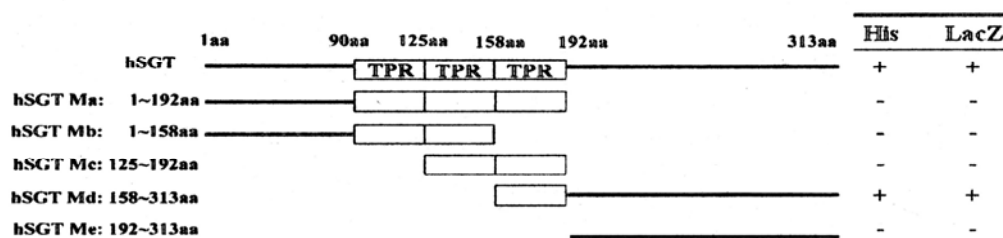
Σε πρώην παχύσαρκους ασθενείς η FFM (fat free mass) διατηρείται μετά την απώλεια βάρους σχεδόν στα προ την επέμβαση (pre-surgery) επίπεδα, πράγμα που ίσως εξηγεί η μείωση της μυοστατίνης στον μυ. Από την έρευνα προκύπτει ότι σε συνθήκες θερμιδικού (caloric) περιορισμού ίσως η μυοστατίνη να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεγέθους του σκελετικού μυός (126).

5. hSGT ρυθμίζει την έκκριση και την ενεργοποίηση της μυστατίνης κατά τη διάρκεια της μυογένεσης στα κύτταρα του σκελετικού μύος.

Η hSGT (human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) είναι πρωτεΐνη που συνδέεται στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα του ανθρώπου με την μυστατίνη. Φαίνεται, ότι για να αλληλεπιδράσει η hSGT με τη μυστατίνη πρέπει να υπάρχει το πεπτιδίο συνθήματος στην N- τελική περιοχή της μυστατίνης. Η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου συνθήματος της μυστατίνης με την hSGT ρυθμίζει την έκκριση λειτουργώντας ως LTBP(Latent TGFβ-binding proteins) και την ενεργοποίηση της μυστατίνης.

Για την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην N- τελική περιοχή (1-24aa) της μυστατίνης και στη hSGT απαιτούνται το τελευταίο TPR μοτίβο της hSGT και τα αμινοξέα 192-313 της καρβοξυτελικής περιοχής της(38,127,128).

Εικόνα 22 :Αλληλεπίδραση ανάμεσα στην N- τελική περιοχή (1-24aa) της μυστατίνης και στην hSGT.⁽³⁸⁾



Εικόνα 22: Το τελευταίο TPR motif της hSGT αλληλεπιδρά με την μυστατίνη.Επιπλέον με την full-length hSGT, 5 μεταλλάξεις έλλειψης της hSGT(hSGT Ma, 1-192 aa; hSGT Mb, 1-158 aa; hSGT Mc, 125-192 aa; hSGT Md, 158-313 aa; και hSGT Me, 192-313 aa; κατασκευάστηκαν σε pACT2 φορέα(vector) με χρήση primers.Τα κύτταρα του μύκητα συνμετασχηματίστηκαν με πλήρους μήκους μυστατίνη και με κάθε μια από τις μεταλλάξεις έλλειψης της hSGT αντίστοιχα. Οι αλληλεπιδράσεις δείχτηκαν με έκφραση (+) ή μη έκφραση (-) 2 γονιδίων αναφοράς, *HIS3* και *LacZ*.⁽³⁸⁾

6. Αντισώματα έναντι μυστατίνης.

Το σύνθημα της μυστατίνης αρχίζει με σύνδεσή της με τον υποδοχέα ActRIIB. Χρησιμοποιήθηκε ένα αδρανοποιητικό αντίσωμα για να αποδειχθεί

αν σε ένα μετά- εμβρυϊκό περιβάλλον (post – embryonic setting) μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μυστατίνη για θεραπευτικούς σκοπούς. Όταν χορηγήθηκε σε ενήλικα ποντίκια αυτό το αντίσωμα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην μυϊκή μάζα και δύναμη. Ενώ παρατηρείται μυϊκή υπερπλασία και υπερτροφία σε ζώα με έλλειψη μυστατίνης(9) παρατηρήθηκε αύξηση μυϊκής μάζας στα ποντίκια, που δέχθηκαν το αντίσωμα διαμέσου ενός υπερτροφικού μηχανισμού. Όλα αυτά δείχνουν, ότι σε ασθένειες μυϊκής απίσχνανσης όπως η πλαγία μυατροφική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis), απίσχνανση σε υπερήλικες, μυϊκή δυστροφία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό μέσο η μυστατίνη (9).

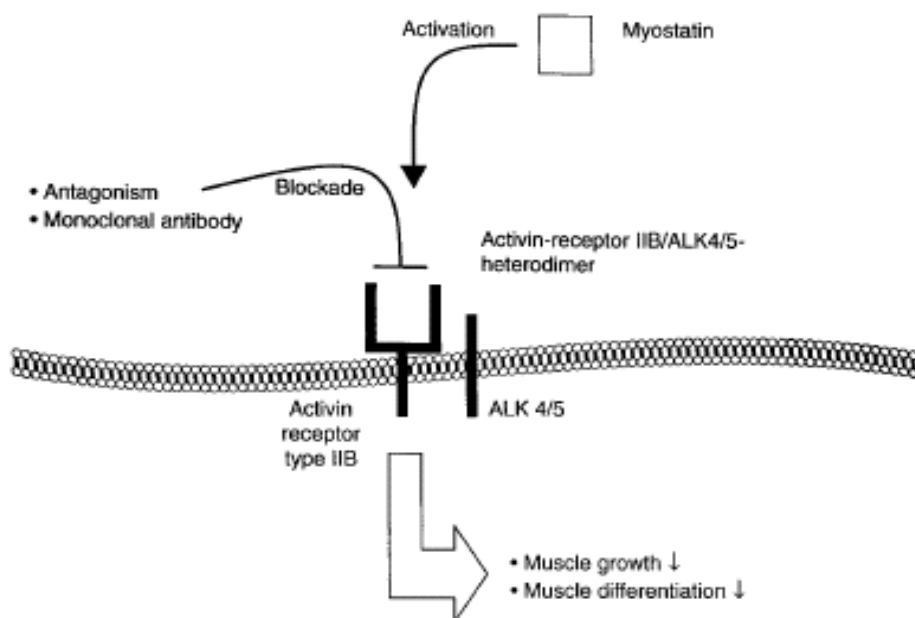
Σαν απάντηση σε καταστάσεις στρες και διαφορετικά ερεθίσματα από το περιβάλλον, όπως τραυματισμούς και γυμναστική, είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη μεμονομένων μυών ελέγχεται τοπικά (6). Πώς τότε η μυστατίνη, που είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής, ο οποίος κυκλοφορεί στο αίμα συστηματικά, συμμετέχει στον τοπικό έλεγχο της ανάπτυξης μυών; Είναι σχεδόν βέβαιο, ότι η μυστατίνη κυκλοφορεί στο αίμα ως βιολογικά ανενεργή γιατί είναι συνδεδεμένη με ανασταλτικές πρωτεΐνες. Υπάρχουν μηχανισμοί, οι οποίοι με τοπικό τους έλεγχο στην θέση στόχο ρυθμίζουν τα επίπεδα δράσης της μυστατίνης(6).

Στην θεραπεία της καχεξίας αναστολή της μυστατίνης ίσως αποτελεί μια ενδιαφέρουσα θεραπευτική οδό (Εικόνα 23). Η παραγωγή χιμαιρικού ποντικο-ανθρώπινου αντισώματος μυστατίνης (PF-354), που αναστέλλει την λειτουργία της βελτίωσε, σε ποντίκια που γερνάνε, την μάζα και την λειτουργία των σκελετικών τους μυών. Συγκεκριμένα αύξησε κατά 12% το μέγεθος των μυϊκών τους ινών, κατά 8-18% την μυϊκή τους μάζα, και εμπόδισε την μείωση μάζας σώματος που σχετίζεται με την ηλικία.

Ένας άλλος τρόπος για να μπλοκάρουμε την δράση της μυστατίνης είναι με χρήση ενός ανταγωνιστή του μονοπατιού ActRIIB, που όχι μόνο εμπόδισε την μυϊκή απίσχνανση αλλά διέγειρε και την ανάπτυξη πρόδρομων μυϊκών κυττάρων. Στην συνέχεια ερευνήθηκε η επίδραση ενός διαλύματος πρωτεΐνης σύντηξης, (που προέκυψε από την εξωκυτταρική περιοχή του ανθρώπινου υποδοχέα ActRIIB συνδεδεμένη στο Fc τμήμα της ανθρώπινης IgG₁ και ονομάστηκε ACE-031) σε υγιείς μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Το ACE-

031 στις μεγάλες δόσεις παρήγαγε δοσοεξαρτώμενες αυξήσεις στην ελεύθερη λίπους μάζα σώματος. Οι μάρτυρες, που πήραν placebo παρουσίασαν μείωση όγκου του μηρού. Το ACE-031 επηρέασε ευνοϊκά τους βιολογικούς δείκτες της μάζας λίπους και του σχηματισμού οστών στις μεγάλες δόσεις. Όλα αυτά τα δεδομένα παρέχουν κλινική απόδειξη, ότι αναστολή του συνθήματος του ActRIIB έχει ισχυρές ταχύτατες και διαρκείς επιδράσεις στην άπαχη μάζα σώματος.(129)

Εικόνα 23:Αναστολή της δράσης της μυοστατίνης με χρήση ανταγωνιστών.⁽¹²⁹⁾



Εικόνα 23:Τα επίπεδα της μυοστατίνης ρυθμίζουν την ομοίωση των μυϊκών σκελετικών κυττάρων. Η μυοστατίνη συντίθεται και εκκρίνεται από μυϊκά κύτταρα. Αυτή δίνει σύνθημα διαμέσω του ετεροδιμερούς υποδοχέα ακτιβίνης IIB/ALK4/5 να ενεργοποιήσει διαφορετικά μονοπάτια περιλαμβάνοντας Smad2/3 και MAPK (ERK1/2, p38MAPK) καταλήγοντας στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Διέγερση της μυοστατίνης καταλήγει σε αναστολή της μυϊκής ανάπτυξης και μυϊκής διαφοροποίησης.⁽¹²⁹⁾

7. Περιβάλλον: Διαθεσιμότητα τροφής, θερμοκρασία. Φυσιολογικές καταστάσεις: εγκυμοσύνη, εξασθένηση λόγω γήρατος, φυσική δραστηριότητα.

Η ολική ικανότητα του μύος για ανάπτυξη περιορίζεται με ρύθμιση των επιπέδων μυοστατίνης του αίματος, ακόμη κι αν στον μυ το σύνθημα της

μυοστατίνης ρυθμίζεται από τοπικούς παράγοντες στο τελικό του σημείο (6). Σύμφωνα με ένα υποθετικό μοντέλο σε συνθήκες περιβάλλοντος, που αλλάζουν όπως διαθεσιμότητα τροφής, θερμοκρασία, καθώς επίσης και σε διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις όπως εγκυμοσύνη, εξασθένηση λόγω γήρατος, φυσική δραστηριότητα κλπ αλλάζουν τα επίπεδα της μυοστατίνης που κυκλοφορούν, και έτσι μεταβάλλεται το ισοζύγιο μεταβολισμού (metabolic homeostatic balance) ανάμεσα στην ανάπτυξη μύος και την αποθήκευση λίπους (fat storage). (6) Έτσι κάτω από κάποιες συνθήκες το ισοζύγιο μπορεί να μετατοπίζεται προς την μυϊκή ανάπτυξη επειδή αυτό μπορεί να είναι πιο πλεονεκτικό ή να μετατοπίζεται προς την αποθήκευση λίπους κάτω από διαφορετικές συνθήκες επειδή αυτό είναι πιο πλεονεκτικό για τον οργανισμό (6).

8. Αύξηση mRNA της μυοστατίνης μετά από άσκησης αντοχής και αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Ωρισμένοι ερευνητές διαπίστωσαν μετά από άσκησης αντοχής (resistance training) 6 και 12 εβδομάδων αυξημένη έκφραση FLRG, μυοστατίνης, mRNA μυοστατίνης, υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και κορτιζόλης (130). Άλλοι περιγράφουν μείωση της μυοστατίνης του ορού μετά από άσκησης αντοχής (131). Σε κάθε περίπτωση υπήρχε αύξηση της μυϊκής μάζας μετά από άσκηση. Στις περιπτώσεις μείωσης της μυοστατίνης εξηγείται εύκολα η αύξηση της μυϊκής μάζας. Στις περιπτώσεις αύξησης της μυοστατίνης η μη επίδραση πάνω στους μύες ερμηνεύεται από το γεγονός, ότι συνυπάρχει αύξηση των αναστολέων της μυοστατίνης (FLRG) καθώς και καταστολή του υποδοχέα της μυοστατίνης (ACTR-II).

9. Πρωτεΐνες με follistatin domain.

Η Φολλιστατίνη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη μυοστατίνη και την ανταγωνίζεται εμποδίζοντάς την να επιδράσει στην μυϊκή ανάπτυξη (development) και να την αναστείλει, όπως φάνηκε σε πειράματα με μύες κοτόπουλου (58,132).

10. Ένας αναστολέας χημικός και μικρός και τα παράγωγά του.

Ένας αναστολέας χημικός και μικρός, που πρόσφατα ανακαλύφθηκε και τα παράγωγά του (58).

11. Ο ACTR-IIB σε διαλυτή μορφή είναι ένας ισχυρός αναστολέας της μυσστατίνης

Ο ACTR-IIB σε ποντίκια άγριου τύπου μετά από ένεση προκάλεσε σε 2 εβδομάδες μέχρι 60% αύξηση μυϊκής μάζας. Επίσης δείχνουμε ότι σε Mstn - /- ποντίκια η επίδραση του διαλυτού υποδοχέα ενισχύεται υποδηλώνοντας, ότι εκτός από την μυσστατίνη κανονικά λειτουργεί ένας τουλάχιστον ακόμη συνδέτης για να περιορίσει την μυϊκή ανάπτυξη(133).

12. Η αυξητική ορμόνη αναστέλλει την έκφραση του mRNA της μυσστατίνης.

Για να μελετηθεί η επίδραση στον σκελετικό μύ της αυξητικής ορμόνης (GH) χορηγήθηκε ανασυνδυασμένη GH σε 12 ενήλικες με υπολειτουργία της υπόφυσης και ανεπάρκεια GH (134). Το αποτέλεσμα ήταν, ότι η χορήγηση GH στους μάρτυρες οδήγησε σε αναστολή μέχρι $31 \pm 9\%$ στην έκφραση του mRNA της μυσστατίνης. Σε μυϊκά σκελετικά κύτταρα in vitro μελέτες έδειξαν, ότι σε απάντηση στην GH η έκφραση της μυσστατίνης στους μυσσωληνίσκους μειώθηκε σημαντικά (134). Τα δεδομένα μας δείχνουν, ότι για την αναβολική δράση, που επάγεται από την GH ένας πιθανός στόχος κλειδί είναι η μυσστατίνη (134).

13. Η Decorin παγιδεύει την μυσστατίνη και την καταστέλλει.

Η Decorin είναι μια πρωτεογλυκάνη μικρή, πλούσια σε λευκίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η μυσστατίνη μπορεί να παγιδευτεί από την ντεκορίνη και στην εξωκυτταρική μήτρα η δράση της μυσστατίνης στα μυσσογενετικά κύτταρα μπορεί να ρυθμιστεί από την ντεκορίνη και συγκεκριμένα να ανασταλεί (135).

14. Γλυκοκορτικοειδή: ενεργοποίηση της έκφρασης της μυσστατίνης.

Επειδή πολλά στοιχεία με υποτιθέμενη απάντηση στα γλυκοκορτικοειδή περιέχονται στην περιοχή του υποκινητή της μυσστατίνης εξετάστηκε η

πιθανότητα η έκφραση του γονιδίου της μυστατίνης να ρυθμίζεται από γλυκοκορτικοειδή (18). Τα αποτελέσματα δείχνουν, ότι η έκφραση της μυστατίνης ενεργοποιείται από γλυκοκορτικοειδή με επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου (18).

15. Η *cystoseira canariensis* δεν αναστέλλει την μυστατίνη.

Υπήρχε ο ισχυρισμός ότι ένα καινούριο συμπλήρωμα διατροφής (a new nutritional/sports supplement) αναστέλλει την δράση της μυστατίνης καθώς συνδέεται μαζί της στον ορό (136). Αυτό το συμπλήρωμα έχει ως ενεργό συστατικό την *cystoseira canariensis* ένα θαλάσσιο φύκος. Μετά από βαριά άσκηση αντοχής 12 εβδομάδων, φάνηκε μη αποτελεσματική η χορήγηση 1200 mg/d του φύκου στην αύξηση της μυϊκής μάζας και δύναμης καθώς και στην αναστολή της μυστατίνης του ορού και την μείωση του λίπους (136).

16. Η άρση βαρών μειώνει την έκφραση της μυστατίνης. Χαλάρωση προκαλεί αύξηση της μυστατίνης.

Σε ηλικιωμένες και νεαρές γυναίκες εξετάσαμε την έκφραση του mRNA της μυστατίνης μετά άρση βαρών (RL), καθώς και την απάντηση γονιδίων κλειδιών, που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο (p27^{kip} και p21^{cip}) και, που τον διεγείρουν (cyclin D1 και B1) καθώς και τον mechano-growth factor (MGF) που είναι μιτογόνο ευαίσθητο στην άρση βαρών και ειδικό για τον μύ (137). Η έκφραση της μυστατίνης σύμφωνα με τα αποτελέσματα βρέθηκε κατεσταλμένη με την επίδραση της άρσης βαρών, οποία μετέβαλλε και την έκφραση των άλλων γονιδίων (137). Πάντως στις υπερήλικες γυναίκες ίσως παίζει κάποιο ρόλο η αποτυχία μείωσης της έκφρασης της μυστατίνης σαν απάντηση στην άσκηση RL(137).

Σε αρουραίους χαλάρωση 10 ημερών οδήγησε σε ατροφία μύς και αύξηση στο mRNA μυστατίνης (103). Ακολούθως μετά 4 μέρες επαναφόρτιση επανέφεραν τις συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης μυστατίνης και του mRNA μυστατίνης σε τιμές παρόμοιες με τους controls (103).

17. Η GASP-1 συνδέεται με την ώριμη μυστατίνη και αναστέλλει την δράση της.

Η GASP-1 (growth and differentiation factor – associated serum protein-1) έχει βρεθεί στον ορό ανθρώπων και ποντικών και συνδέεται με την ενδογενή μυστατίνη. Έχει βρεθεί για την ώριμη μυστατίνη, ότι η βιολογική της δράση αναστέλλεται από GASP-1 ποντικού κλωνοποιημένη (54). Η ώριμη μυστατίνη συνδέεται απευθείας με ανασυνδυσασμένη GASP-1 όχι όμως και το προπεπτίδιο της μυστατίνης (54).

18. IGF-I, TNF-a και IGF-II δεν ελέγχουν in vivo την ποσότητα mRNA μυστατίνης.

Μετά από θερμική βλάβη παρατηρείται μείωση μυϊκής πρωτεΐνης και αύξηση μυστατίνης σε ενήλικους αρουραίους και ο κύριος ρυθμιστής αυτής της ανόδου είναι η άνοδος της ενδογενούς κορτικοστερόνης (138). Επίσης εξωγενή γλυκοκορτικοειδή σε ενήλικες αρουραίους μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα mRNA μυστατίνης. Σε αντίθεση οι IGF-I, TNF-a και IGF-II δεν φαίνεται να ελέγχουν in vivo την ποσότητα mRNA μυστατίνης (138). Η κορτικοστερόνη στην κυκλοφορία αυξάνεται ταχύτατα μετά από θερμική βλάβη (138).

TNF-a,IL-6,IL-1b,IL-2,λεπτίνη,TGF-β. Σε μια οικογένεια ποντικών ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο γονίδιο της μυστατίνης που ονομάστηκε Ln (Lean) και οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας της μυστατίνης. Βρέθηκε ότι ποντίκια ομόζυγα για την μετάλλαξη $Mstn^{Ln/Ln}$ παρουσίασαν μειωμένη έκφραση των γονιδίων TNFa, IL-6, και λεπτίνης στον μυ και στο λίπος και μειωμένη έκφραση του γονιδίου IL-1b στο λίπος συγκρινόμενα με ετερόζυγα για την μετάλλαξη ποντίκια.(139)

Ο TNF-α (Tumor necrosis factor) είναι κυτταροκίνη η οποία συμμετέχει στην αντίδραση οξείας φάσης και στην συστηματική φλεγμονή. Η ρύθμιση των ανοσολογικών κυττάρων είναι ο πρωταρχικός ρόλος του TNF. Σε καχεξία χρόνιων νοσημάτων έχει βρεθεί αυξημένος.(140,141)

Η IL-6 είναι μια κυτοκίνη ,που δρα και ως αντιφλεγμονώδης και ως προφλεγμονώδης. Σε περίπτωση εγκαύματος τραύματος ή άλλης καταστροφής ιστού εκκρίνεται από μακροφάγα και T- κύτταρα για να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση που οδηγεί σε φλεγμονή. (142).

Η IL-1 είναι μια προφλεγμονώδης που εκκρίνεται σαν απάντηση στην κυτταρική βλάβη. Η IL-1α και η IL-1β είναι 2 ξεχωριστές πρωτεΐνες από τις οποίες αποτελείται η IL-1. Οι IL-1α και IL-1β πρωτεΐνες αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές φλεγμονώδους απάντησης σε λοιμώξεις. (143,144,145,146,147,148).

Η IL-2 είναι μια κυτοκίνη-μόριο συνθήματος του ανοσοποιητικού συστήματος που παίζει ρόλο στην αντίδραση (response) του οργανισμού στην μικροβιακή μόλυνση και στην διάκριση ανάμεσα σε ξένα και μη αντιγόνα.(foreign non-self and self) (149,150). Η IL-2 παράγεται κατά την διάρκεια ανοσολογικής απάντησης από τον οργανισμό.(151,152)

Η λεπτίνη είναι μία πρωτεΐνη-ορμόνη 16 KDa από τα πιο σημαντικά παράγωγα-ορμόνες του λιπώδους ιστού (adipose) που παίζει σημαντικό ρόλο στην όρεξη, τον μεταβολισμό, την πρόσληψη και κατανάλωση ενέργειας.(153) Η λεπτίνη αναστέλλει την όρεξη, δρώντας σε υποδοχείς του υποθαλάμου και εξουδετερώνοντας τις επιδράσεις του νευροπεπτιδίου Υ (154,153).

Ο TGF-β είναι μία πρωτεΐνη που ελέγχει τον πολλαπλασιασμό την διαφοροποίηση και άλλες λειτουργίες στα περισσότερα κύτταρα.(155).

19. Εξωγενής μωστατίνη προκαλεί μείωση του mRNA ενδογενούς μωστατίνης.

Η έκφραση του γονιδίου της μωστατίνης αυτορυθμίζεται με μηχανισμό ανάδρομης ρύθμισης (156). Έτσι η προσθήκη εξωγενούς μωστατίνης μειώνει την μεταγραφή του γονιδίου της μωστατίνης.

20. Smad 7 inhibitory: Υπερέκφραση του Smad 7 inhibitory που επάγεται από την μωστατίνη αναστέλλει την δραστηριότητα του promoter της μωστατίνης

Φαίνεται, ότι διαμέσου του Smad 7 η μωστατίνη αυτορυθμίζεται, εφόσον η μωστατίνη επάγει την έκφραση του Smad 7 και στην συνέχεια η δραστηριότητα του υποκινητή της μωστατίνης αναστέλλεται σε υπερέκφραση του Smad 7 (156).

Αντιθέτως έχουμε αύξηση του mRNA μωστατίνης σε καταστολή του Smad 7, πράγμα που σημαίνει, ότι για την έκφραση του γονιδίου της μωστατίνης ο Smad 7 είναι αρνητικός ρυθμιστής (156).

Σύμφωνα με αυτά σε μωσωλήνες, που εκφράζουν μωσστατίνη μη λειτουργική παρατηρείται αύξηση στην παραγωγή της μωσστατίνης και μείωση στο mRNA του Smad 7. Επιπλέον η δραστηριότητα του υποκινητή του Smad 7 δεν επάγεται από την μωσστατίνη, όταν εμποδίζεται το σύνθημα της. (156).

21. FLRG: Η FLRG αλληλεπιδρά με την ώριμη μωσστατίνη και αναστέλλει την δράση της.

Έχουμε δείξει, ότι το FLRG (follistatin related gene) και το προπεπτίδιο της μωσστατίνης, είναι δύο κύριες πρωτεΐνες με τις οποίες συνδέεται η μωσστατίνη στην κυκλοφορία (53). Στον ορό, με το προπεπτίδιο συνδέεται περισσότερο από το 70% της μωσστατίνης in vivo. Μελέτες επιβεβαίωσαν, ότι η FLRG με την ώριμη μωσστατίνη αλληλεπιδρά απευθείας και αναστέλλει την δράση της (53,103).

22. Καλσινευρίνη: Σε υπερφόρτιση μυός ποντικού ενεργοποιείται η καλσινευρίνη, που απενεργοποιεί το γονίδιο της μωσστατίνης.

Η καλσινευρίνη (calcineurin) είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής για όλους τους τύπους μυϊκών ινών(157,158). Σε υπερφόρτιση μυός ποντικού ενεργοποιείται η καλσινευρίνη, που απενεργοποιεί το γονίδιο της μωσστατίνης. Ένας στόχος της καλσινευρίνης είναι η μωσστατίνη (158).

23. HIMPs (hydroxamate-based inhibitors of metalloproteases) αναστολείς υπερτροφία μωσωλήνων.

Αναστολείς όπως οι HIMPs (hydroxamate-based inhibitors of metalloproteases) προκαλούν υπερτροφία μωσωλήνων αυξάνοντας στους C₂C₁₂ μωσβλάστες την συγχώνευσή τους (159). Επεξεργασία C₂C₁₂ κυττάρων με HIMPs οδήγησε σε μείωση της πρωτεολυτικής ωρίμανσης της μωσστατίνης, μόνο στους υπερτροφικούς μωσωλήνες πρόδρομης μη επεξεργασμένης μωσστατίνης (159). Σύμφωνα με αυτά στην διαφοροποίηση και ανάπτυξη του σκελετικού μυός συμμετέχουν μεταλλοπρωτεάσες. Στα C₂C₁₂ κύτταρα ίσως να συνδέεται άμεσα ή έμμεσα η πρωτεολυτική ωρίμανση της μωσστατίνης με την δράση κάποιων μεταλλοπρωτεασών, που είναι HIMP-ευαίσθητες αλλά μη καθορισμένες, και σ' αυτό το in vitro μοντέλο, ίσως η

υπερτροφία των μυοσωλήνων με επίδραση ΗΙΜΡ επιτυγχάνεται λόγω έλλειψης επεξεργασίας της μυοστατίνης (159).

24. Γλυκοκορτικοειδή : Dexamethasone: δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αύξηση στην πρωτεΐνη μυοστατίνη, στην απώλεια μύος και βάρους σώματος.

Μυϊκή ατροφία μπορεί να προκληθεί από υπερβολική ποσότητα γλυκοκορτικοειδών και οι μηχανισμοί δεν είναι ακόμη γνωστοί (160). Έχει ήδη αποδειχθεί, ότι *in vitro* η έκφραση της μυοστατίνης αυξάνεται με δεξαμεθαζόνη στον σκελετικό μυ (160). Παρατηρήθηκε σε αρουραίους μία απώλεια βάρους καθώς και μυϊκή ατροφία δοσοεξαρτώμενη μετά την καθημερινή χορήγηση για 5 μέρες dexamethasone (160). Βρέθηκε επίσης, ότι η ενδομυϊκή αύξηση της έκφρασης της μυοστατίνης και η επίδραση στην απώλεια μύος και στο βάρος σώματος ήταν χρονοεξαρτώμενη από την dexamethasone (160).

25. Η πρωτεολυτική επεξεργασία της μυοστατίνης ρυθμίζεται αρνητικά από την μυοστατίνη

Η μυοστατίνη, πριν την έκκρισή της από μυοβλάστες, με furin πρωτεάσες υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία και μετατρέπεται σε ώριμη ενεργή μυοστατίνη (161). Κατά την διάρκεια της μυογένεσης η επεξεργασία της μυοστατίνης αυτορυθμίζεται από την ώριμη μυοστατίνη.

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου η πρωτεολυτική επεξεργασία της μυοστατίνης ρυθμίζεται αρνητικά από την μυοστατίνη, η οποία ελέγχοντας για το ώριμο πεπτιδίο της μυοστατίνης τις συγκεντρώσεις καθώς και την έκφραση του γονιδίου της furin διευκολύνει την διαφοροποίηση των μυοβλαστών τελικά (161).

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

1. Μεταλλάξεις στα ποντίκια στα Belgian Blue και Piedmontese βοοειδή.

Δημιουργία myostatin null ποντικών με γονιδιακή στόχευση. Με στόχευση γονιδίου δημιουργήθηκαν ποντίκια, που δεν παρήγαγαν μυοστατίνη, που η μάζα του σκελετικού τους μύος παρουσιάζει πολύ μεγάλη αύξηση. Στα ποντίκια αυτά συγκεκριμένοι μύες ζυγίζουν 2 με 3 φορές περισσότερο σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Αυτό οφείλεται πρωταρχικά σε αύξηση στον αριθμό των μυϊκών ινών. Η αύξηση αυτή δε συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση λίπους.

Belgian Blue βοοειδή: Έλλειψη 11 νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 3 του γονιδίου. Δημιουργία πρωτεΐνης με έλλειψη 102 αμινοξέων.

Μελετήθηκε το γονίδιο της μυοστατίνης και σε άλλα ζώα εκτός από το ποντίκι, για να βρεθούν τυχόν αγροτικές και θεραπευτικές εφαρμογές, που μπορεί να έχει η αύξηση της μυϊκής σκελετικής μάζας, που μπορεί να προκύψει με αναστολή της δράσης της μυοστατίνης. Έχει βρεθεί ότι μεταξύ των σπονδυλωτών, το γονίδιο της μυοστατίνης είναι πολύ προστατευμένο (33). Ο φαινότυπος «διπλασιασμένοι μύες» παρατηρείται και στη φυλή βοοειδών Belgian Blue. Η μυϊκή μάζα παρουσιάζει μια μέση αύξηση κατά 20-25% λόγω αυτής της μετάλλαξης, ενώ στα περισσότερα άλλα όργανα η μάζα παρουσιάζει μείωση (33,98, 99,100) όπως επίσης ο συνδετικός ιστός και το ενδομυϊκό λίπος μειώνεται (33,101).

Η κωδική αλληλουχία της μυοστατίνης του υπερτροφικού Belgian Blue εκτός από μια έλλειψη στο 3^ο εξώνιο των νουκλεοτιδίων 937-947 ήταν ταυτόσημη μ'αυτήν της φυλής Holstein, που δεν παρουσίαζε διπλασιασμένους μύες. Αυτή η έλλειψη των 11 νουκλεοτιδίων οδηγεί σε μια εκτρωτική πρωτεΐνη, λόγω μεταβολής του πλαισίου ανάγνωσης, που τερματίζει 14 κωδικόνια μετά τη θέση της μετάλλαξης. Η μετάλλαξη αυτή επειδή συμβαίνει μετά τα 7 πρώτα αμινοξέα της ώριμης ενεργής περιοχής του μορίου δηλ. της C-τελικής περιοχής και καταλήγει σε απώλεια των αμινοξέων 274-375 δηλ. 102 αμινοξέων, αναμένεται να είναι μια null μετάλλαξη (δηλ. που δεν οδηγεί σε παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης) (33).

Πίνακας 3. Φυλή βοοειδών Piedmontese: 2 αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων, μία στο εξώνιο 1 και μία στο εξώνιο 3.⁽³³⁾

Εξώνιο 1	Εξώνιο 3
C σε A	G σε A
Αμινοξύ 94	Αμινοξύ 313
Λευκίνη σε Φαινυλαλανίνη	Κυστεΐνη σε τυροσίνη

Piedmontese βοοειδή: 2 αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων: μία στο εξώνιο 1 και μία στο εξώνιο 3.

Σε μια άλλη φυλή βοοειδών την Piedmontese, στην οποία παρατηρείται σε μεγάλο βαθμό ο φαινότυπος «διπλασιασμένοι μύες» βρέθηκε η αλληλουχία του γονιδίου της μυοστατίνης (33,99). Συγκρινόμενη η αλληλουχία αυτή με την αλληλουχία του γονιδίου της μυοστατίνης στη φυλή Holstein βρέθηκαν 2 αλλαγές σε νουκλεοτίδια. Η μια έγινε στο εξώνιο 1 και ήταν μια αντικατάσταση C σε A που είχε σαν αποτέλεσμα μια αντικατάσταση στο αμινοξύ 94 μιας λευκίνης από φαινυλαλανίνη. Η δεύτερη αντικατάσταση έγινε στο εξώνιο 3 μια A αντικατέστησε την G. Αυτή η αντικατάσταση έγινε στην ώριμη περιοχή της πρωτεΐνης ήταν αντικατάσταση μιας κυστεΐνης από τυροσίνη, και έγινε στο αμινοξύ 313. Εξετάστηκαν 10 ζώα της φυλής Piedmontese με φαινότυπο «διπλασιασμένοι μύες» με ανάλυση Southern blot και βρέθηκε ότι και τα 10 ζώα είχαν δύο αλληλόμορφα με την μετάλλαξη αυτή (33). Έτσι στις δυο αυτές διαφορετικές φυλές βοοειδών Belgian Blue και Piedmontese που παρουσίαζαν το φαινότυπο «διπλασιασμένοι μύες» τόσο οι παρόμοιες θέσεις στον χάρτη του γονιδίου της μυοστατίνης όσο και η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων που βρέθηκαν, προτείνουν ότι για τον φαινότυπο «διπλασιασμένοι μύες» υπεύθυνες είναι αυτές οι μεταλλάξεις (33).

Σε φυλές βοοειδών χωρίς «διπλασιασμένους μύες» βρέθηκαν μόνο πολυμορφισμοί στις αμετάφραστες περιοχές και τα εσώνια ή στις κωδικές αλληλουχίες σιωπηλές αλλαγές.

Σε αντίθεση με το ποντίκι είναι πιθανό το βόδι μετά από επιλεκτική εκτροφή γενεών, να είναι όσον αφορά το μέγεθος του μυός, πιο κοντά σε ένα

μέγιστο όριο. Όμως τα βοοειδή με «διπλασιασμένους μύες» παρουσιάζουν στην σεξουαλική ωρίμανση των απογόνων μείωση της βιωσιμότητας και στα θηλυκά μείωση της γονιμότητας (33,162). Όμως τα μειονεκτήματα αυτά αντισταθμίζονται στη φυλή Belgian Blue από την αύξηση στην επάρκεια τροφής και αύξηση στην μυϊκή μάζα (33,163). Στο γονίδιο της μυσστατίνης η μηδενική μετάλλαξη οδηγεί σε παραγωγή κρέατος υψηλής ποιότητας και σε γόνιμα και βιώσιμα ζώα πράγμα που δείχνει ότι ίσως είναι δυνατή και σε άλλα ζώα, όπως ψάρι, γαλοπούλα, πρόβατο, κοτόπουλο, γουρούνι η παραγωγή μεγαλύτερης μυϊκής μάζας με διακοπή της λειτουργίας της μυσστατίνης. Και η λειτουργία της μυσστατίνης και η αλληλουχία του γονιδίου της μεταξύ των διαφόρων ειδών είναι πολύ προστατευμένες (33).

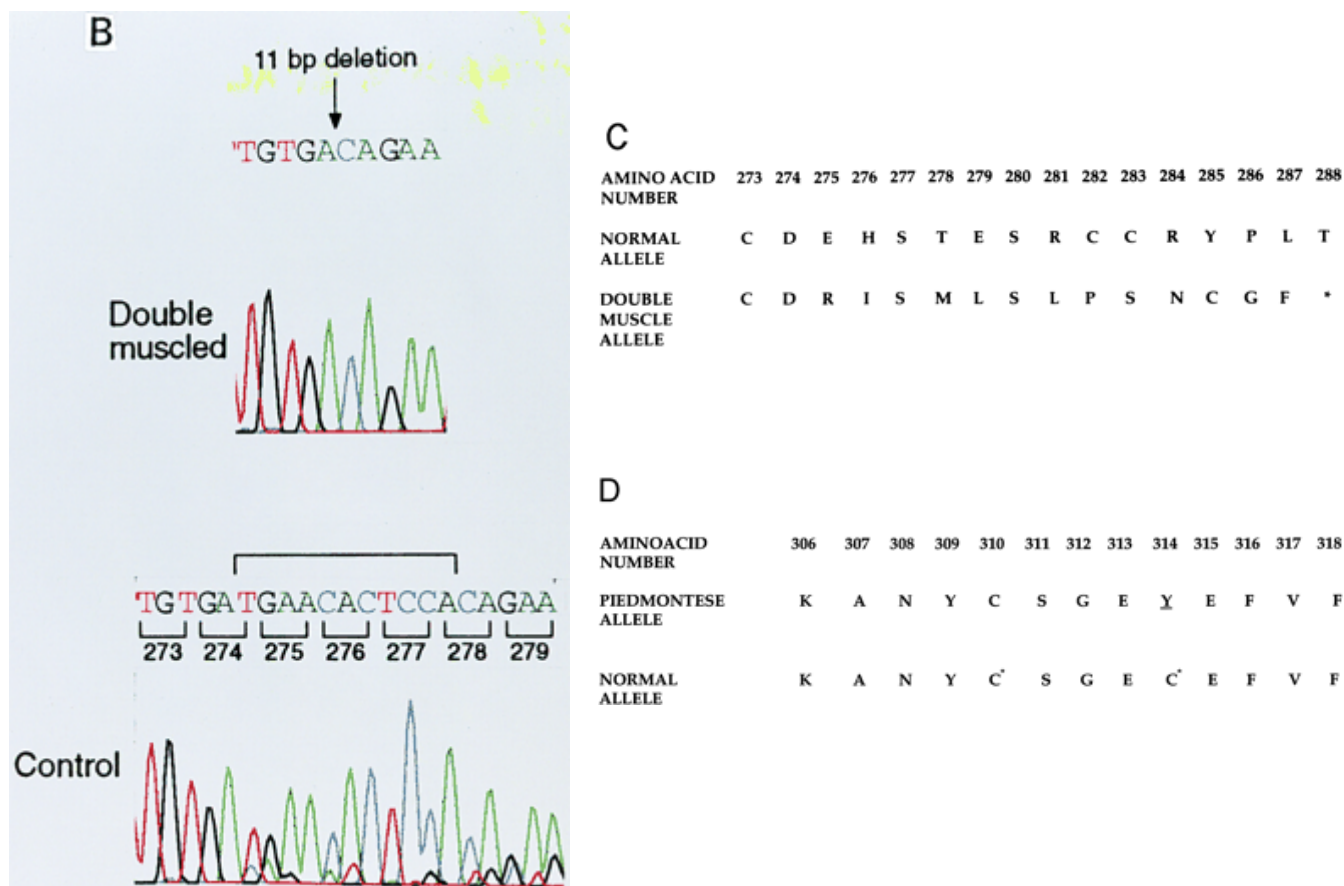
2. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της μυσστατίνης ανθρώπου.

1. Στον υποκινητή της μυσστατίνης ανθρώπου δεν βρέθηκε πολυμορφισμός (variation) (14)

2. Στην 5'-flanking sequence: δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί. Η 5'-flanking sequence αρχίζει 438 ζεύγη βάσεων πριν από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης(ATG). Στην αλληλουχία αυτή δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί (14):

3. Στα 3 εξώνια του γονιδίου βρέθηκαν 6 αλλαγές, που αφορούσαν ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η αλληλουχία των 3 εξωνίων του γονιδίου της μυσστατίνης για την ύπαρξη πολυμορφισμών. Στα χρωμοσώματα 40 ατόμων(14) παρατηρήθηκαν 6 αλλαγές που αφορούσαν ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Οι αλλαγές αυτές δείχνονται στο Πίνακα 4.

Εικόνα 24:Μεταλλάξεις στα βοειδή. (32)



Εικόνα 24. (B). Η έλλειψη ανιχνεύεται με fluorometric sequencing cDNA μυστατίνης από φυσιολογικό βοειδές και βοειδές με διπλασιασμένους μύες. Η αλληλουχία του αλληλομόρφου με τους διπλασιασμένους μύες φαίνεται πάνω από αυτήν του κανονικού αλληλομόρφου (Control) και η θέση, όπου οι 11 βάσεις αφαιρούνται στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο δείχνεται με ένα βέλος. Η μεγάλη αγκύλη στην αλληλουχία του φυσιολογικού δείχνει την περιοχή, που αφαιρείται στο αλληλόμορφο με τους διπλασιασμένους μύες. (C) Η αλληλουχία αμινοξέων της μυστατίνης σε φυσιολογικό βοειδές φαίνεται πάνω από την προβλεπόμενη αλληλουχία αμινοξέων της μυστατίνης σε βοειδές με διπλασιασμένους μύες. Το πρόωρο κωδικόνιο λήξης στο αμινοξύ 288 στο αλληλόμορφο για τους διπλασιασμένους μύες δείχνεται με αστερίσκο. (D) Η προβλεπόμενη αλληλουχία αμινοξέων της μυστατίνης σε φυσιολογικό βοειδές φαίνεται κάτω από αυτή της φυλής Piedmontese. Το αλλαγμένο κατάλοιπο στο αλληλόμορφο Piedmontese είναι υπογραμμισμένο. Αστερίσκοι δείχνουν 2 από τα 9 προστατευμένα κατάλοιπα κυστεΐνης στο εξώνιο 3 του φυσιολογικού αλληλομόρφου μυστατίνης βοειδούς(32),

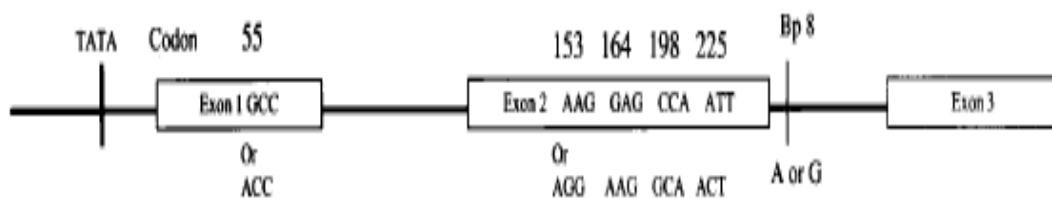
Πίνακας 4: θέση, φύση και μέθοδοι ανίχνευσης της αλληλουχίας των πολυμορφισμών στο γονίδιο της ανθρώπινης μυστατίνης.⁽¹⁴⁾

Amplification primers ^a	Location	bp change	aa change	Detection method
Exon 1 for <i>AluI</i>	aa 55	A to G	A to T	<i>AluI</i>
Exon 2	aa 153	A to G	K to R	<i>BanII</i>
Exon 2	aa 164	G to A	E to K	<i>TaqI</i>
Exon 2	aa 198	C to G	P to A	<i>BstNI</i>
Exon 2	aa 225	T to C	I to T	Sequencing
Exon 2	8 bp 3' to exon 2	A to G	None	Sequencing

Πίνακας 4: θέση, φύση και μέθοδοι ανίχνευσης της αλληλουχίας των πολυμορφισμών στο γονίδιο της ανθρώπινης μυστατίνης.⁽¹⁴⁾

Από τις 6 αντικαταστάσεις οι 5 οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος και μία είναι μη λειτουργική αντικατάσταση. Οι 4 στις 5 έχουν σχέση με πολύ προστατευμένα αμινοξέα (14).

Εικόνα 25: Αναπαράσταση του γονιδίου της μυστατίνης ανθρώπου⁽¹⁴⁾



Εικόνα 25: Αναπαράσταση του γονιδίου της μυστατίνης ανθρώπου με τις εναλλακτικές αλληλουχίες των 5 πολυμορφικών κωδικονίων και την πολυμορφική θέση του εσωνίου 2.⁽¹⁴⁾

Η λειτουργία της πρωτεΐνης μυοστατίνης μπορεί να μεταβληθεί από αυτούς τους πολυμορφισμούς, οι οποίοι σε ομόζυγα ή ετερόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο θα μπορούσαν να μεταβάλλουν την θρέψη(14).

Πίνακας 5: Κατανομή των πολυμορφισμών στο γονίδιο της μυοστατίνης ανά φυλή⁽¹⁴⁾

Variant	Genotype	Caucasian			African American		
		Responder	Nonresponder	Total	Responder	Nonresponder	Total
Exon 1 <i>AluI</i>	Thr/Thr	—	—	—	—	1	1
	Ala/Thr	—	—	—	3	3	7
	Ala/Ala	42	33	108	16	13	33
Exon 2 <i>BanII</i>	Lys/Lys	39	33	101	13	9	23
	Lys/Arg	3	—	6	7	6	15
	Arg/Arg	—	—	—	—	3	3

Πίνακας 5: Κατανομή των πολυμορφισμών στο γονίδιο της μυοστατίνης ανά φυλή και ανταπόκριση της μυϊκής μάζας σε strength training.⁽¹⁴⁾

Ορισμένοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της μυοστατίνης του ανθρώπου σχετίζονται με μειωμένη μυϊκή δύναμη de novo. Ο πολυμορφισμός K153R έχει διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με την μυϊκή δύναμη. Γυναίκες με τον γονότυπο R (Arg 153) είχαν μικρότερη μυϊκή δύναμη καθώς και ηλικιωμένοι με τον ίδιο γονότυπο είχαν επιδεινούμενη σαρκοπενία σε σχέση με αυτούς με τον γονότυπο K (Lys 153) (164,165)

4. Ταυτοποίηση γενετικής βλάβης σε παιδί ανθρώπου με το «σύνδρομο του Ηρακλή»

Περιγράφηκε η γέννηση ενός άρρενος παιδιού μετά από κανονική εγκυμοσύνη που ήταν εξαιρετικά μυώδες με προεξέχοντες μύες στους ανώτερους βραχίονες και στους μηρούς. Η φυσική κατάσταση ήταν κανονική αν εξαιρέσουμε τα αυξημένα τενόντια αντανακλαστικά. Σε ηλικία 6 ημερών επαληθεύτηκε η μυϊκή υπερτροφία με U/S. Σε ηλικία 4,5 ετών το παιδί μπορούσε να κρατά 2 τρίκιλους αλτήρες σε οριζόντια ανάρτηση. Στην

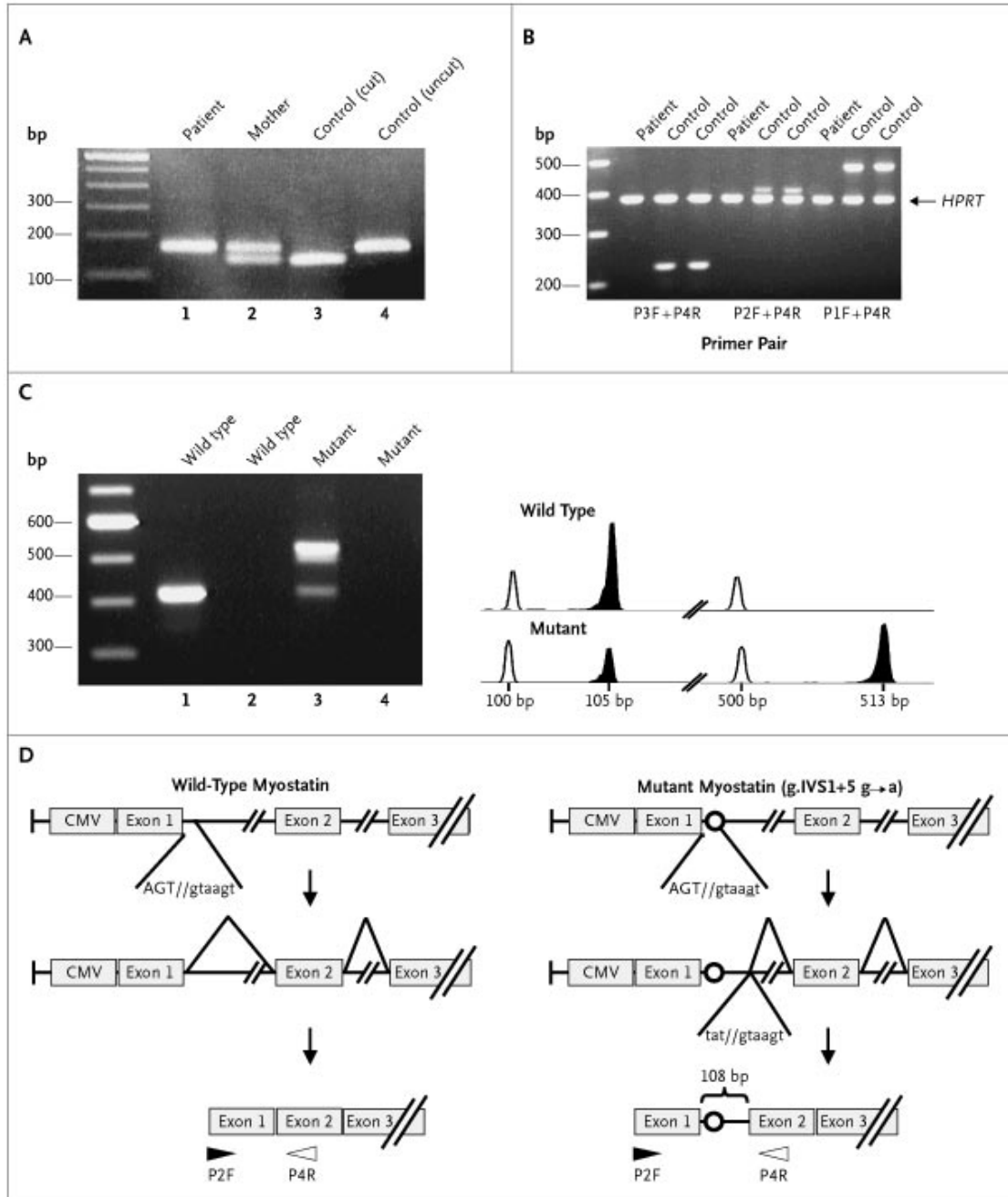
οικογένειά του είχαν παρατηρηθεί μέλη με ασυνήθιστη δύναμη. Το παιδί αυτό παρουσίαζε φαινότυπο παρόμοιο με τα βοοειδή που είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο της μυοστατίνης (αύξηση της μυϊκής μάζας και μειωμένη λιποβρίθεια) (7,8,30,31,32,33,37,77,86).

Κατόπιν της διαπίστωσης αυτής έγινε ανάλυση μεταλλάξεων στο γονίδιο της μυοστατίνης και βρέθηκε αντικατάσταση G>A στο IVS1-5 σε ομόζυγη κατάσταση στο παιδί και σε ετερόζυγη κατάσταση στην μητέρα. Η αλλαγή αυτή οδηγεί σε αλλαγή συρραφής του RNA που στην συνέχεια οδηγεί σε σύνθεση ατελούς μη λειτουργικής πρωτεΐνης (86).

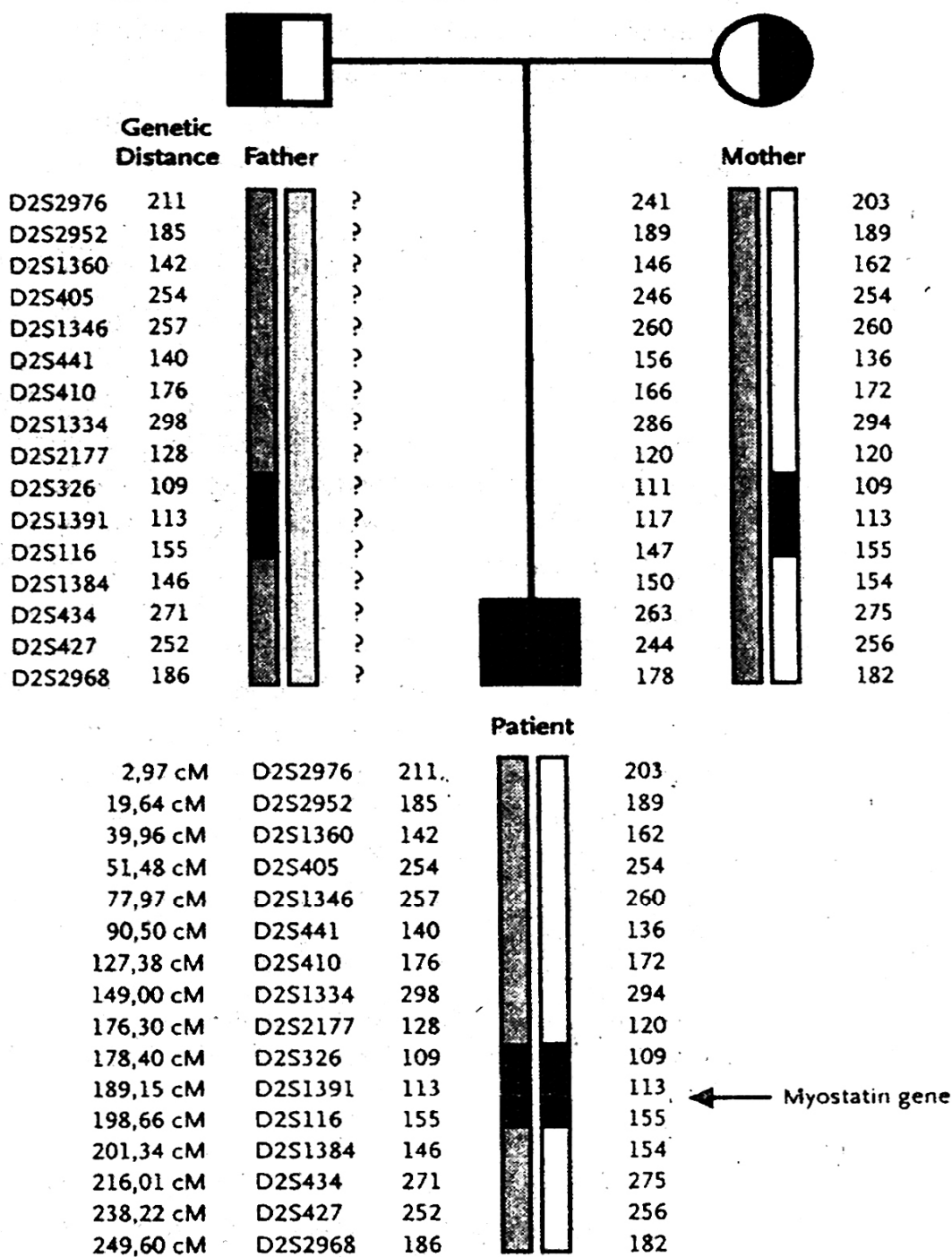
Εικόνα 26(D): Ενεργοποίηση κρυφής θέσης συρραφής RNA στο εσώνιο 1 (at//gtaagt) (86).

Η γέννηση του μυθικού ήρωα Ηρακλή στην Αρχαία Ελλάδα πριν 2500 χρόνια περίπου, ο οποίος στραγγάλισε ένα φίδι σε παιδική ηλικία είναι πιθανό να οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο της μυοστατίνης. Ο Ηρακλής είχε από την γέννηση του και όχι λόγω εξάσκησης, θρυλική δύναμη (166).

Εικόνα 26 (D): Ενεργοποίηση κρυφής θέσης συρραφής RNA στο εσώνιο 1 (at//gtaagt).⁽⁸⁶⁾



Εικόνα 27: Αποτελέσματα ανάλυσης απλοτύπων⁽¹⁶⁷⁾



Εικόνα 27: Αποτελέσματα ανάλυσης απλοτύπων. Η ανάλυση από τον ασθενή και την μητέρα του έγινε με DNA markers στο χρωμόσωμα 2 και ανακατασκευή του αλληλόμορφου του πατέρα. Στην θέση του γονιδίου της μυοστατίνης ο ασθενής βρέθηκε ομόζυγος για έναν απλότυπο (μαύρη ζώνη)⁽¹⁶⁷⁾.

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

1. Σαρκοπενία στους ηλικιωμένους, μυϊκή δυστροφία. Το μονοπάτι της μιοστατίνης θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο σε πολλές κλινικές εφαρμογές για αύξηση της ανάπτυξης του μυός όπως φαίνεται από την βιολογική δράση της μιοστατίνης (6). Παρατηρείται σήμερα μεγάλο ενδιαφέρον για προώθηση της ανάπτυξης του μυός ή διατήρηση της μυϊκής μάζας, με αναστολή, σε ενήλικα ζώα, του συνθήματος της μιοστατίνης, δεδομένου ότι αυτή ίσως έχει στόχο τα δορυφορικά κύτταρα, σε καταστάσεις όπως η σαρκοπενία όπου έχουμε στους ηλικιωμένους(6,168). Ποντίκια, που έχουν στο γονίδιο dystrophin μετάλλαξη (mdx ποντίκια) χρησιμοποιούνται ως μοντέλο για την μυϊκή δυστροφία Duchenne (6,169). Έλλειψη δράσης της μιοστατίνης στα ποντίκια αυτά οδήγησε σε ανάπτυξη μυϊκής δύναμης και μάζας όπως στα ποντίκια άγριου τύπου. Ακόμη οι μύες αυτών των mdx ποντικών παρουσίασαν σημαντική ιστολογική βελτίωση απουσία μιοστατίνης όπως μείωση της ίνωσης, που σημαίνει, ότι η αναγεννητική ικανότητα των μυών ενισχύεται σε έλλειψη μιοστατίνης και σε καταστάσεις εκφυλισμού των μυών, παρόλο που παραμένουν ορισμένες τυπικές για mdx ποντίκια δυστροφικές (dystrophic) αλλαγές. Μια ανησυχία που υπάρχει είναι ότι τα αποθέματα δορυφορικών κυττάρων ίσως εξαντλούνται γρήγορα με αναστολή της δράσης της μιοστατίνης και επομένως η ικανότητα του μυός να αναγεννάται εξαντλείται πρόωρα σε ασθένειες που έχουμε χρόνια εκφυλισμό (6,88).

2. AIDS, καρκίνος, sepsis. Επιπλέον ίσως σε ασθένειες με πιο έντονη απώλεια μυός θα μπορούσε να γίνει στόχευση της μιοστατίνης. Για παράδειγμα σε ασθένειες, όπως το AIDS, ο καρκίνος, η σήψη συχνά παρατηρείται το σύνδρομο απίσχνανσης, καχεξία στο οποίο συμβαίνει απώλεια μυός, που θεωρείται ο κύριος υπεύθυνος και για θνησιμότητα και για την νοσηρότητα (6,170). Αν και δεν έχουν αναφερθεί ακόμη σε μοντέλα καχεξίας επιδράσεις από την αναστολή της μιοστατίνης ίσως να μπορούσαμε να αντισταθμίσουμε την απίσχνανση αναστέλλοντας το μονοπάτι της μιοστατίνης σ' αυτό το σύνδρομο. Επιπλέον το σύνδρομο απίσχνανσης σε ποντίκια που υπερεκφράζουν μιοστατίνη έχει κοινά σημεία με την

ανθρώπινη καχεξία, όπως με κανονική είσοδο θερμίδων απώλεια μυός και λίπους (2,6). Όλα αυτά μας κάνουν να πιθανολογούμε, ότι στην εμφάνιση καχεξίας στους ανθρώπους κρίσιμο ρόλο παίζει είτε η μυοστατίνη ή για το μονοπάτι της μυοστατίνης κάποιος άλλος μεσολαβητής (mediator). Εάν συμβαίνει αυτό, σε πολλές ασθένειες, όπου παρατηρείται καχεξία, θα μπορούσαμε να εξουδετερώσουμε αυτά τα μόρια με στόχευση του μονοπατιού της μυοστατίνης (6).

3. Διαβήτης τύπου II, Παχυσαρκία. Τελικά, όχι μόνο σε συνθήκες απίσχνασης και μυϊκού εκφυλισμού θα μπορούσε να έχει εφαρμογές η στόχευση του μονοπατιού της μυοστατίνης αλλά και σε μεταβολικές ασθένειες όπως διαβήτης τύπου II και παχυσαρκία. Όπως έχει αναφερθεί δεν παρατηρείται συσσώρευση λίπους σε ποντίκια *myostatin mutant* σε συνέπεια της ηλικίας (6,8,77). Έτσι εξετάστηκε η πιθανότητα, σε μη κανονική συσσώρευση λίπους όπως στην παχυσαρκία, να έχει ωφέλιμη επίδραση η απώλεια μυοστατίνης. Πράγματι παρατηρήθηκε καταστολή της εμφάνισης αντίστασης στην ινσουλίνη, και μείωση της συσσώρευσης λίπους στα ποντίκια *Lep^{ob/ob}* και *agouti lethal yellow*, δύο μοντέλα ποντικών με διαβήτη και παχυσαρκία στα οποία εισήχθη μετάλλαξη *myostatin null* (6,8).

Αν και ακόμη δεν ξέρουμε πλήρως τους μηχανισμούς με τους οποίους ο μεταβολισμός της γλυκόζης και του λίπους ρυθμίζονται από την μυοστατίνη, δημιουργείται η πιθανότητα, από αυτά τα ευρήματα, για θεραπεία ή παρεμπόδιση του διαβήτη τύπου II ή της παχυσαρκίας με αναστολή του μονοπατιού της μυοστατίνης.

Το εάν στην ρύθμιση, στους ανθρώπους, της μυϊκής μάζας παίζει ρόλο η μυοστατίνη (όπως στα βοοειδή και στα ποντίκια) είναι ακόμη αναπάντητο(6,8,77).

4. Μετάλλαξη σε αγόρι και μυϊκή απίσχναση. Βρέθηκε στο γονίδιο της μυοστατίνης μια αδρανοποιητική μετάλλαξη σε ένα αγόρι, που γεννήθηκε στο Βερολίνο. Το παιδί μοιάζει με *mini-bodybuilder* στα 4,5 χρόνια (86,171). Σε ασθένειες με μυϊκή απίσχναση (*muscle wasting diseases*) ερευνάται η δυνατότητα εισαγωγής αυτής της μετάλλαξης για θεραπεία τους (171)

5. Μυοστατίνη και δημιουργία φαρμάκων.

Εάν αποδειχτεί πράγματι, ότι η στόχευση του μονοπατιού της μυοστατίνης οδηγεί σε αποτέλεσμα για την θεραπεία ασθενειών του ανθρώπου, η μυοστατίνη θα αποτελέσει στόχο για ανάπτυξη φαρμάκων-αναστολέων(6).

A. Η επίδραση της μυοστατίνης είναι ειδική.

Οι επιδράσεις της μυοστατίνης είναι ειδικές καθώς δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα εκτός από τον μυϊκό και τον λιπώδη ιστό σημαντικές επιδράσεις σε άλλους ιστούς.

B. Εξωκυτταρική δράση μυοστατίνης και ρύθμιση αδρανούς μυοστατίνης. Μια ποικιλία φαρμακολογικών παραγόντων μπορούν να έχουν πρόσβαση στην μυοστατίνη επειδή λειτουργεί εξωκυτταρικά. Επίσης εξωκυτταρικά γίνεται η ρύθμιση της αδρανούς μυοστατίνης και έτσι είναι εύκολα προσβάσιμη.

Γ. η επίδραση της μυοστατίνης είναι δόσοεξαρτώμενη.

Επειδή είναι δόσο-εξαρτώμενη η επίδραση της μυοστατίνης, θα μπορούσαμε να έχουμε στην μυϊκή ανάπτυξη μερική αύξηση με αναστολή της δράσης της μυοστατίνης μερικώς. Πράγμα που σημαίνει ότι θα μπορούσαμε να έχουμε θεραπευτικά οφέλη χωρίς ίσως να είναι αναγκαίο το σύνθημα της μυοστατίνης να μπλοκάρεται τελείως (6).

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

Το γεγονός ότι στα ποντίκια με έλλειψη μυοστατίνης (myostatin null mice) παρατηρείται μυϊκή υπερτροφία, καθώς και το ότι ασθενείς με AIDS που παρουσιάζουν απίσχνανση έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (levels) της ανοσοδραστικής πρωτεΐνης μυοστατίνης, οδηγεί σε σκέψεις, ότι ίσως θα είχε θεραπευτική εφαρμογή στους ανθρώπους μολυσμένους με HIV που παρουσιάζουν απίσχνανση, στους υπερήλικες και στην cancer cachexia πιθανή αναστολή της έκφρασης της μυοστατίνης ή παρεμπόδιση της σύνδεσής της σε κάποιον δυνητικό υποδοχέα (13).

1. Μυοστατίνη και doping. Ένα από τα πιο σύγχρονα «όπλα» στον χώρο του doping είναι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, όπως η αυξητική ορμόνη ανθρώπου (hGH) και η ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (EPO). Το επόμενο επίπεδο doping είναι το gene doping. Γονίδια όπως της αυξητικής ορμόνης ανθρώπου (hGH), της ερυθροποιητίνης (EPO), του υποδοχέα-δ του υπεροξυσώματος ενεργοποιούμενου από πολλαπλασιαστές (peroxisome proliferators-activated receptor-delta (PPARδ), του insulin-like growth factor-1 (IGF-1) και της μυοστατίνης θεωρούνται οι επόμενοι στόχοι doping (171).

Ο IGF-1 παράγοντας ανάπτυξης (insulin-like growth factor-1), όταν υπερεκφράζεται μέσα στους μύες του ποντικίου εμποδίζει τη σαρκοπενία, που σχετίζεται με την ηλικία (age-related) (80, 106,172,173, 174,175,176,177,178). Επομένως προσπάθεια αύξησης του IGF-1 αποτελεί πιθανή αντιμετώπιση της απίσχνανσης των υπερηλίκων.

Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ανασταλτή μυοστατίνης θα μπορούσε να εισαχθεί σε κύτταρα ανθρώπου με την μέθοδο της διαμόλυνσης. Μια τέτοια θεραπεία είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευτεί οδηγεί όμως σε μυϊκή ανάπτυξη (171).

Θα μπορούσαν να προκύψουν μεγάλοι μύες με gene doping με μυοστατίνη ή IGF-1, πράγμα που ίσως επιβάρυνε υπερβολικά οστά και τένοντες ή ακόμα και να τους προκαλούσε καταστροφικό στρες(171). Η World Anti Doping Agency (WADA) εκτός από το πρόβλημα, ότι οι ενδογενείς ουσίες του οργανισμού είναι ίδιες με αυτές, που παράγουν γενετικά χειραγωγημένα κύτταρα ή ξένα γονίδια έχει να αντιμετωπίσει και το πρόβλημα του γενετικού (gene) doping πρωτεϊνών, που χρησιμοποιούνται για ενίσχυση μυών. Αυτές δε φαίνονται στα ούρα ή στο αίμα και παράγονται στον μυ τοπικά, όπως η IGF-1. Η μυϊκή βιοψία είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος, που όμως στον χώρο των σπορ είναι φανερά ανεφάρμοστη. Παρόλα αυτά ερευνώνται διάφορες στρατηγικές (171).

Η παρατηρημένη, λόγω αναστολής της μυοστατίνης, σε μοντέλα ζώων αύξηση της αναγέννησης του μυός προσδοκάται σε μεγάλο βαθμό να εφαρμοστεί σε ανθρώπινες ασθένειες επειδή στους ανθρώπους είναι προστατευμένη η λειτουργία της μυοστατίνης (78).

2. Anti-myostatin αντισώματα και αναστολή της δράσης της μυοστατίνης. Για την μείωση της δράσης της μυοστατίνης μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες στρατηγικές, όπως αναστολή της δραστηριότητας της μυοστατίνης εξωκυτταρικά, μείωση της βιοσύνθεσης της μυοστατίνης ή αναστέλλοντας την μεταβίβαση του ενδοκυτταρικού σήματος.

Πρώτα για την αναστολή της δράσης της μυοστατίνης χρησιμοποιήθηκαν ως θεραπευτικοί παράγοντες αδρανοποιητικά αντισώματα (78,179). Η Wyeth έχει δημιουργήσει το MYO-029 αντίσωμα, που είναι anti-myostatin και humanized, και το προωθεί σε ασθενείς με μυϊκή δυστροφία (78). Αν το MYO-029 στην κατάσταση της μυϊκής δυστροφίας οδηγήσει σε αύξηση της δύναμης με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα τότε θα δοκιμαστεί και σε άλλες κλινικές καταστάσεις όπως σαρκοπενία, καχεξία, φλεγμονώδεις μυοπάθειες ελπίζοντας να διεγείρει την αναγέννηση του μυός (78).

3. FLRG, Φολλιστατίνη, GASP-1, και αναστολή της μυοστατίνης. Προπεπτίδιο μη ευαίσθητο για την οικογένεια μεταλλοπρωτεϊνών BMP/tolloid family.

Εκτός από τα αδρανοποιητικά αντισώματα έχει γίνει προσπάθεια να τροποποιηθούν αρκετοί ενδογενείς αναστολείς της μυοστατίνης για να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες, όπως το FLRG, η Φολλιστατίνη, η GASP-1 και το προπεπτίδιο της μυοστατίνης. Το προπεπτίδιο της μυοστατίνης αναστέλλει την μεταβίβαση σήματος, όσο είναι συνδεδεμένο με την C-τελική ενεργή περιοχή με ομοιοπολικό δεσμό μέχρι να υποστεί πρωτεόλυση. Το προπεπτίδιο της μυοστατίνης άγριου τύπου in vivo είναι ασταθές, αλλά ενδοπεριτοναϊκή εισαγωγή με ένεση ενός τροποποιημένου προπεπτιδίου, μη ευαίσθητου για την οικογένεια μεταλλοπρωτεϊνών (BMP/tolloid family), θα είχε σοβαρή επίδραση στην μυϊκή μάζα (52,78).

Έτσι εγείρεται η πιθανότητα, ότι στην in vivo ενεργοποίηση της ανενεργού μυοστατίνης ίσως εμπλέκονται μέλη της οικογένειας BMP-1/TLD και ότι ίσως μόρια-αναστολείς των πρωτεϊνών αυτών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για κτηνοτροφικές εφαρμογές και για θεραπευτικές εφαρμογές στον άνθρωπο (52). Υπάρχουν δεδομένα ότι ένας αναστολέας της

μυοστατίνης η φολλιστατίνη ίσως χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς εάν εξειδικευθεί (50,78,132,180).

Ίσως αποδειχτούν οι FLRG και GASP-1 για θεραπευτική χρήση πιο ειδικοί αναστολείς καθώς συνδέονται με την μυοστατίνη, που κυκλοφορεί και αναστέλλουν την δράση της (53,54,78).

4. Ραβδομυοσάρκωμα-Υπερέκκριση μυοστατίνης-Έλλειψη διαφοροποίησης.

Στην παιδική ηλικία, ένας από τους πιο κοινούς καρκίνους είναι το ραβδομυοσάρκωμα.. Τα κύτταρα του ραβδομυοσαρκώματος (RMS) δεν πετυχαίνουν να ολοκληρώσουν το πρόγραμμα διαφοροποίησης του σκελετικού μυός καθώς και να εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου οριστικά (181). Ένα κοινό χαρακτηριστικό του RMS είναι η υπερέκφραση μυοστατίνης σε σχέση με μυϊκά σκελετικά κύτταρα μη καρκινικά. Η διαφοροποίηση των RD κυττάρων ενισχύθηκε με αδρανοποίηση της μυοστατίνης. Τα RMS κύτταρα διατηρούνται σε κατάσταση μη διαφοροποίησης χάρη σε μία αυτοκρινή αγγύλη μυοστατίνης και επομένως για την θεραπεία του RMS θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικές προσεγγίσεις βασισμένες σε αδρανοποίηση της μυοστατίνης (181).

5. Μυϊκή δυστροφία Duchenne(DMD).

Σε ασθένειες, όπως η μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD) που σχετίζονται με μυϊκή απίσχναση μια καινούργια θεραπευτική στρατηγική είναι η στόχευση της μυοστατίνης με μία γονιδιακή θεραπεία, που παρέχει στον δυστροφικό μυ λειτουργική βελτίωση και αντιμετωπίζει τα κύρια προβλήματα (120).

6. Καρδιακά εμφράγματα και ενεργοποίηση μυοστατίνης.

Στην φυσιολογία και ανάπτυξη της καρδιάς θα μπορούσε να παίξει σπουδαίο ρόλο η μυοστατίνη, δεδομένου ότι μετά από εμφράγματα στα καρδιομυοκύτταρα ενεργοποιείται η έκφραση της μυοστατίνης και ότι σε καρδιές εμβρύων και ενηλίκων εκφράζεται η μυοστατίνη (12).

7. Mdx ποντίκια και μπλοκάρισμα ενδογενούς μιοστατίνης: Βελτίωση δυστροφικού φαινότυπου.

Σε mdx ποντίκια ο δυστροφικός τους φαινότυπος παρουσίασε βελτίωση βιοχημική, ανατομική και φυσιολογική με αναστολή της ενδογενούς μιοστατίνης. Επιπλέον σ' αυτά τα ποντίκια το mRNA της μιοστατίνης σε αναγεννημένους μύες παρουσιάζει μείωση των επιπέδων του, δείχνοντας, ότι ίσως στην παθογένεση της ασθένειας συμμετέχει και η μιοστατίνη (182).

8. Παιδιά με μιτοχονδριακές εγκεφαλοπάθειες και μυϊκές δυστροφίες

Σε καμία περίπτωση το πρότυπο έκφρασης της μιοστατίνης δεν παρουσίασε διαφορές ακόμη και, όταν υπήρχε σημαντική μυϊκή ατροφία σε κάποιους ασθενείς (182). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν, ότι σε εκφυλιστικές ασθένειες των μυών παρατηρείται απώλεια μύος, που δεν οφείλεται σε αλλαγές στην έκφραση της μιοστατίνης (182).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι μηχανισμοί της ανάπτυξης του συνδρόμου απίσχνανσης, που συνοδεύει πολλές χρόνιες παθήσεις δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι.

Έχει μελετηθεί ο ρόλος διαφόρων κυτταροκινών (TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6, λεπτίνης κ.λ.π), αλλά δεν υπάρχει πάντοτε διαφορά στα επίπεδα των κυτταροκινών αυτών σε ασθενείς με απίσχνανση.

Τελευταία υπάρχει ενδιαφέρον γύρω από την δράση της μυσστατίνης, (που είναι ο κύριος αρνητικός ρυθμιστής της μυϊκής μάζας) κυρίως σε ότι αφορά στην ρύθμιση της αύξησης της μυϊκής μάζας (doping, παραγωγή ζώων με αυξημένη μυϊκή μάζα). Έχουν ανακαλυφτεί αντισώματα και ανασταλτές της μυσστατίνης.

Στην δική μας μελέτη ασχοληθήκαμε με την έκφραση της μυσστατίνης σε ασθενείς με σύνδρομο απίσχνανσης. Θεωρήσαμε ότι αν η οδός της μυσστατίνης συμμετείχε σε μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη του συνδρόμου θα ήταν εύκολη η αναστολή αυτής της χαλόνης με τους προαναφερθέντες αναστολείς και θα απλοποιούσε την αντιμετώπιση αυτού του συνδρόμου. Αντίθετα όλες οι άλλες κυτταροκίνες επιδρούν μέσω πολύπλοκων μηχανισμών και η αναστολή τους δεν είναι αποτελεσματική και παρουσιάζει προβλήματα (πολυπαραγοντική δράση).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Στην έρευνα μετείχαν 81 ασθενείς πάσχοντες από μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Πενήντα ένας ήταν άνδρες και 30 γυναίκες. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον πίνακα 6. Επίσης στην έρευνα μας πήραν μέρος και 17 υγιείς μάρτυρες 9 άντρες και 8 γυναίκες. Τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά τους φαίνονται στον πίνακα 7. Από όλους τους ασθενείς ελήφθη συγκατάθεση μετά από ενημέρωση.

Μέθοδοι

1. Λήψη μυικού ιστού

Έγινε με βιοψία βραχιονίου μυός, μετά από έγγραφη συγκατάθεση των ατόμων, από τον αριστερό βραχιόνιο μυ, μετά από τοπική αναισθησία. Ελήφθησαν 0.5 gr μυικού ιστού από τον κάθε ασθενή και μάρτυρα.

2. Εξαγωγή RNA

DAY 1

- Ομογενοποίηση του μυικού ιστού με υπερήχους.
- Προσθέτουμε = 1600 μl RNAsol και αναδεύουμε πολύ καλά στον πάγο
- Μετάγγιση σε eppendorff
- Προσθήκη χλωροφορμίου σε όγκο 1/10 του RNAsol
- Πολύ καλή ανάδευση (να γίνει ομογενές)
- Ανάδευση σε Vortex για ένα λεπτό και τοποθέτηση σε πάγο για ένα λεπτό. Εναλλαγή vortex-πάγος για 15 min για να γίνει καλή ομογενοποίηση
- Φυγοκέντρηση για 15 min, 12.000 rpm, 4°C
- Μεταφορά πολύ προσεκτικά του υπερκείμενου σε eppendorff των 2 ml.

Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης και τοποθέτηση του eppendorff στους -20°C overnight.

Πίνακας 6: Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με MDS

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	RA	RARS	RAEB	RAEB-T	CMML	TOTAL
ΑΡΣΕΝΙΚΟ	31	5	7	5	3	51
ΘΗΛΥΚΟ	18	1	5	4	2	30
ΔΙΑΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ(ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ)	69 (33-85)	65(56-75)	72(52-80)	69(55-80)	75(61-82)	71(33-85)
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ	34 ± 2.8	30± 8.4	24± 16.9	11.5±9.1	11± 4.24	28±7.8
ΗΠΑΤΟΜΕΓΑΛΙΑ	12	0	10	9	5	36
ΣΠΛΗΝΟΜΕΓΑΛΙΑ	23	0	12	9	5	49
ΛΕΜΦΑΔΕΝΟΠΑΘΕΙΑ	2	0	2	1	2	7
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ						
Ht	33.5 ± 6.36	28± 2.82	29.8± 4.94	29,5± 5	25± 9.89	28±5
Hb	11 ± 1.41	11± 1.41	9.6±1.41	11±1.41	8,5± 3.53	10.5±1.5
MCV	99.5 ± 0.7	83.4±14.84	80.5±3.53	92,3± 2.1	92,5±7.77	94±6
MCH	29 ± 4.24	26.15±5.44	27.75±1.41	30±0	30±2.82	29±1.3
MCHC	31.5± 0.707	32± 0.2	32±0.1	31,33±0.7	33±0.1	31.8±0.2
WBC	3350±212.1	4120±265.	3420±735.4	3066±667	7850±1020	3450±520
ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ	860±58.8	3548±33.8	2235±135.5	1073±342	1812±586	912±433.5
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	2072±426	1520±520	1023±265	1520±423	1566±450	1962±632
ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	268±85	206±189	179±98	674±256	4562±1250	524±325
ΒΛΑΣΤΕΣ	0	0	342±125	995±235	425±125	482±123
PLT×10 ³	103±62.25	291±98.94	135.6±23,7	122±82.8	26±42.42	103±88
ΜΥΕΛΟΣ ΟΣΤΩΝ						
ΒΛΑΣΤΕΣ%	0	0	6	22.5±3.5	32.5±3.5	
ΥΠΕΡΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	45	6	10	6	5	72
ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	4	0	1	3	0	8
ΙΝΩΣΗ	6	0	1	2	2	11
ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	21	0	9	4	0	34
ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ	12	1	3	3	1	20
ΘΕΡΑΠΕΙΑ						
ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ	12	2	5	9	2	30
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ ΜΟΝΟ	9	3	0	0	2	14
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ+G CSF	40	0	5	0	0	45
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	0	0	2	8	2	12
ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ	12	0	4	2	1	19

Πίνακας 7: Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά σε υγιή άτομα

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ
ΑΡΡΕΝ	9
ΘΗΛΥ	8
ΔΙΑΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ (ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ)	71 (33-85)
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	
Ht	40±4.23
Hb	14±1,41
MCV	96±8.5
MCH	33.5 ±3.5
MCHC	33.5±0.7
WBC	9200±707,10
ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ	6072±605
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	2024±356
ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	864±235
PLTx10 ³	354,5±17,68

DAY 2:

- Φυγοκέντρηση για 30 min, 12000 rpm, 4°C
- Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70% (από κατάψυξη)
- Φυγοκέντρηση για 20 min, 12000 rpm, 4°C
- Επανάληψη των 2 προηγούμενων βημάτων
- Αφαίρεση υπερκείμενου και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει, συνήθως overnight, σε πάγο, στο ψυγείο καλυμμένο με διάτρητο παραφίλμ.
- Το ίζημα το διαλύουμε σε 50 μl DEPC H₂O

3. RT-PCR

Έγινε ONE-STEP PCR, όπου το στάδιο της ανάστροφης μεταγραφής και της ενίσχυσης του cDNA με PCR γίνονται στο ίδιο σωληνάριο ταυτόχρονα.

Χρησιμοποιήθηκε το SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq της Invitrogen. (Cat.No.10928-034, Cat.No.10928-042) για να πάρουμε απευθείας προϊόντα PCR από RNA . Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

1) Autoclaved distilled water	15 μl
2) RT Reaction mix	25 μl
3) Template RNA	5 μl → 1 μg
4) Primer F μουσταίνης	1 μl
5) Primer R μουσταίνης	1 μl
6) Primer F	1 μl
7) Primer R	1 μl
8) RT/Platinum Taq Mix	<u>1 μl</u>
	50 μl

Οι εκκινητές (Primers) για το GDF8 mRNA, που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν από το Αιματολογικό Εργαστήριο Παν. Θεσσαλίας και συντέθηκαν στο εργαστήριο του Ιδρύματος Έρευνας και Τεχνολογίας (ITE) Κρήτης.

Δεξιόστροφος primer:

Lina F1: 5' - ccg/gga/act/gat/tga/tca/gta/tga 3'

Αριστερόστροφος primer:

Lina – R1: 5' - ggg – ttt – tcc – atc – cac – ttg – cat – tag – 3'

Με τους εκκινητές αυτούς λαμβάνεται προϊόν : 146 bp

ΣΥΝΘΗΚΕΣ

A) σύνθεση cDNA και πρώτη αποδιάταξη:

50°C για 30 min }
94°C για 2 min } 1 cycle

B) ενίσχυση με PCR :

94°C για 15 sec denaturation }
51°C για 30 sec Annealing } 35 cycles
68°C για 30 sec Extension }

Γ: τελική επέκταση:

72°C για 10 min } 1 cycle
4°C συντήρηση

Για την αντίδραση χρησιμοποιείται σαν γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης της μυσστατίνης.

4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Στην συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%. Σε κάθε υποδοχή του gel αγαρόζης τοποθετούνται 5 μlt χρωστικής +10μlt προϊόντος PCR +5μlt H₂O ad. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε 100bp DNA Ladder 2μl. Η βραδύτερη μπάντα είναι της β-ακτίνης με 290 bp και η ταχύτερη της μυσστατίνης με 146 bp. Στην εικόνα 17 φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη.

5. Έκλυση του DNA από την πηκτή αγαρόζης - Ποσοτικός προσδιορισμός προϊόντων PCR

Για την ποσοτική μέτρηση του cDNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της έκλυσης από την πηκτή αγαρόζης και η φωτομέτρηση του προϊόντος έκλυσης. Σχετική έκφραση ως προς το γονίδιο ακτίνης υπολογίστηκε με τον λόγο cDNA-μυσστατίνης/cDNA-ακτίνης. Χρησιμοποιήθηκε το QIAquick Gel

Extraction Kit (50) της QIAGEN (Cat. No.28704). Εφαρμόστηκε το προτεινόμενο από τον κατασκευαστή πρωτόκολο ως εξής :

- 1) Με μία λεπτή χειρουργική λεπίδα κόβουμε από το gel αγαρόζης το κομμάτι όπου βρίσκεται η ζώνη DNA του δείγματος κάτω από λάμπα φθορισμού (προηγουμένως έγινε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο).
- 2) Ζυγίζουμε το κομμάτι του gel και προσθέτουμε για σε 1 όγκο του πηκτώματος 3 όγκους (volumes) Buffer QG (100 mg \approx 100μl).
- 3) Επωάζουμε το τεμάχιο της πηκτής για 10 min στους 50°C ή μέχρι το κομμάτι του gel να διαλυθεί. Για πιο γρήγορη διάλυση κάθε 2-3 λεπτά κατά την διάρκεια της επώασης αναδεύουμε με vortex το σωληνάριο, που περιέχει το gel.
- 4) Αφού διαλυθεί πλήρως το τεμάχιο του gel, ελέγχουμε το χρώμα του διαλύματος (mixture) να είναι κίτρινο παρόμοιο με του Buffer QG.
- 5) Προσθέτουμε στο δείγμα ίσο όγκο ισοπροπανόλης με το βάρος του κομματιού του gel και αναμειγνύουμε.
- 6) Βάζουμε μια στήλη QIAquick σε έναν σωληνάριο 2 ml.
- 7) Για να δεσμεύσουμε το DNA, βάζουμε το δείγμα στην στήλη QIAquick και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
- 8) Πετάμε το έκπλυμα και τοποθετούμε την QIAquick στήλη πίσω στο ίδιο σωληνάριο συλλογής.
- 9) Προαιρετικά: Προσθέτουμε 0,5 ml Buffer QG στην QIAquick στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
- 10) Ξεπλένουμε (wash) με προσθήκη 0,75 ml Buffer PE στην QIAquick στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
- 11) Πετάμε το έκλουσμα και φυγοκεντρούμε την QIAquick στήλη για 1 επιπλέον λεπτό στις 13,000 rpm (~ 17,900xg).
- 12) Βάζουμε την QIAquick στήλη σε έναν καθαρό 1,5 ml μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο.
- 13) Για να πάρουμε το DNA (eluate DNA) προσθέτουμε 50μl Buffer EB (10mM Tris Cl, pH 8,5) ή H₂O στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης και φυγοκεντρούμε την στήλη για 1 λεπτό. Εναλλακτικά για αυξημένη συγκέντρωση DNA, προσθέτουμε 30 μl elution Buffer στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης αφήνουμε την στήλη ακίνητη (stand) για 1 λεπτό και μετά φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.

- Όλες οι φυγοκεντρήσεις γίνονται στις 13,000 rpm (~ 17,900 xg).

Στην συνέχεια γίνεται φωτομέτρηση των δειγμάτων. Η φωτομέτρηση έγινε με Quant-iT™ ds DNA HS Assay Kit της invitrogen.

Η φωτομέτρηση έγινε στα 485/530 nm. Το κάθε δείγμα ήταν 10 μl.

Χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη, η οποία χαρακτήριζε βάσει των OD, που λαμβάνονται από πρότυπα διαλύματα γνωστής περιεκτικότητας σε DNA.

Κατ'αυτόν τον τρόπο έγινε ποσοτικοποίηση των μετρήσεων και μετατράπηκαν οι OD σε μg DNA.

6. Real Time PCR

Για τον ακριβέστερο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου της μυστατίνης χρησιμοποιήθηκε real time pcr και χρησιμοποιήθηκαν gene specific primers (Lina F₁, Lina R₁) και το universal cybergreen kit της Invitrogen. Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης και οι primers Act F: (5'-CCA-GCC-AGT-GGA-ACC-AAG-GTT-ATC-3') και Act R: (5'-GGT-CTG-GGT-CCT-GGT-GAA-CAC-AAG-3'). Χρησιμοποιήθηκε κυκλοποιητής Robocycler.

7. Έλεγχος μεταλλάξεων.

Προκειμένου να ερευνήσουμε αν το γονίδιο της μυστατίνης έχει μεταλλάξεις στις οποίες μπορεί να οφείλεται η διαφορετική έκφραση έγινε PCR με πλευρικούς εκκινητές (flanking primers) σε κάθε ένα από τα εξώνια του και κατευθείαν ανάλυση αλληλουχίας με ABI sequencer.

Exon 1 : F1 : (5'-AGA-TTC-ACT-GGT-GTG-GCA-AG-3')

R1 : (5'-ATA-GGA-CTA-CTT-ACA-CTC-3')

Exon 2 : F2 : (5'-ATA-GCT-GAT-TTT-CTA-ATG-CG-3')

R2 : (5'-GTT-ATC-ACT-TAC-CAG-CCC-AT-3')

Exon 3 : F3 : (5'-AGT-GTT-CCA-GGC-CTA-TTG-ATA-T-3')

R3 : (5'-AAA-CAC-TTT-AAT-ATA-ACT-TAT-AC-3')

8. Επίπεδα κυτταροκινών στο αίμα

Μετρήθηκαν με ευαίσθητη ELISA τα επίπεδα του TNF-α, TGF-β, λεπτίνης, IL-1, IL2, IL6 και μυστατίνης προκειμένου να διερευνήσουμε το ρόλο αυτών των κυτταροκινών στην ρύθμιση του γονιδίου της μυστατίνης και στην

παθογένεση του συνδρόμου απίσχνανσης. Χρησιμοποιήθηκαν kit της εταιρείας R&D, BIOVENTOR (για την μυστατίνη) και Quantikine για την λεπτίνη.

9. Επίδραση κυτταροκινών σε καλλιεργημένα μυοκύτταρα (TNF-α, TGF, κλπ)

Προκειμένου να διερευνήσουμε αν οι ανωτέρω κυτταροκίνες δρουν κατευθείαν και προκαλούν απίσχνανση η δρουν μέσω ρύθμισης του γονιδίου της μυστατίνης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων και μελετήθηκε η έκφραση της μυστατίνης με και χωρίς την δράση κυτταροκινών.

10. Καλλιέργεια ανθρώπινων μυϊκών κυττάρων:

Οι μυοβλάστες λαμβάνονται από βιοψία βραχιόνιου μυός. Τα κύτταρα λαμβάνονται από καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί πλήρως και ανακαλλιεργούνται σε Ham's F₁₄ medium (Life Technologies) εμπλουτισμένο με 10% fetal calf serum (GIBCO) 10g/ml insulin, 10 ng/ml epidermal growth factor (Sigma), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (Perpro Tech, Rocky Hill NJ) 2 nmol glutamine (Biomerieux) και 40 g/ml gentamycin (Schering Plough). Η διαδικασία γίνεται στους μυοβλάστες, που λαμβάνονται μετά από 12 ανακαλλιέργειες και ενοφθαλμισμό (3000 κύτταρα/cm²) σε τριβλία επικαλυμένα με gelatine 0.1% (100 mm διάμετρος).

Στην καλλιέργεια των κυττάρων προσετίθετο ανάλογα TNFα, IL-1, IL-2, IL-6, TGF-β και λεπτίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις και μετρήσαν η έκφραση της μυστατίνης με RT-PCR στα κύτταρα καθώς και τα επίπεδα της μυστατίνης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.

Τα προϊόντα από την RT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 28. Παρατηρείται σταθερά παρουσία ζώνης β-ακτίνης σε όλα τα δείγματα ενώ η ζώνη της μιοστατίνης κυμαίνεται σε ένταση και σε μερικά δείγματα δεν είναι εμφανής.



Εικόνα 28. Φαίνονται τα προϊόντα RT-pcr της μιοστατίνης και β-ακτίνης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. Το προϊόν της μιοστατίνης είναι 146bp και της β-ακτίνης 290bp. Στην γραμμή 1 και 50 βρίσκεται 100bp DNA ladder.

2. Έκλυση προϊόντων PCR από το πήκτωμα αγαρόζης –Ποσοτικός προσδιορισμός DNA.

Στον πίνακα 8 φαίνονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των προϊόντων έκλυσης της β-ακτίνης και της μιοστατίνης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μg DNA. Επίσης φαίνεται και ο λόγος του cDNA-μιοστατίνης/cDNA-ακτίνης.

Ο λόγος μιοστατίνης/β-ακτίνη στους ασθενείς MDS με απίσχυανση, ήταν 2.052 ± 0.479 ($\bar{x} \pm SD$), στους MDS ασθενείς χωρίς απίσχυανση ήταν 0.474 ± 0.178 και στους φυσιολογικούς 0.555 ± 0.151 . Υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας MDS ισχνών και MDS μη ισχνών ($p=0.00023$) καθώς και μεταξύ ισχνών MDS και φυσιολογικών ($p=5.9 \times 10^{-5}$). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ MDS μη ισχνών και φυσιολογικών ($p=0.55$).

Στον Πίνακα Νο 89 φαίνονται οι τιμές, που ελήφθησαν στις 3 ομάδες ασθενών (μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση) σε μg.

Οι ασθενείς με RA, RAEB, RAEB-T είχαν μεγαλύτερη έκφραση μιοστατίνης σε σύγκριση με CMML, RARS και υγιείς (Πίνακας 10).

Σε ασθενείς με CMML η έκφραση της μιοστατίνης ήταν $25\% \pm 18\%$ ($\bar{x} \pm SD$), σε ποσοστό επί της β-ακτίνης, σε ασθενείς με RARS η έκφραση της

μυοστατίνης ήταν $56\% \pm 35\%$, σε υγιή άτομα η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $59\% \pm 18\%$, σε ασθενείς με RA η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $127\% \pm 50\%$, σε ασθενείς με RAEB η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $250\% \pm 30\%$, σε ασθενείς με RAEB-T η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $104\% \pm 25\%$.

3. Real Time PCR

Για τον ακριβέστερο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου της μυοστατίνης χρησιμοποιήθηκε real time pcr και χρησιμοποιήθηκαν gene specific primers και το universal cybergreen kit της Invitrogen. Η μέση τιμή των αντιγράφων RNA που ελήφθησαν με Real time pcr στους MDS ασθενείς με απίσχυανση ήταν $46997.45 \pm 8934.09 (\bar{x} \pm SD)$, στους MDS ασθενείς χωρίς απίσχυανση ήταν 10702.97 ± 3885.59 , ενώ στους υγιείς ήταν 12657.12 ± 3231.873 . Οι ασθενείς με απίσχυανση είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τους ασθενείς χωρίς απίσχυανση ($p_1=0.00102$) και τους υγιείς ($p_2=0.000512$). Οι ασθενείς χωρίς απίσχυανση δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τους υγιείς ($p_3=0.52$). Διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου της μυοστατίνης σε όλους τους ασθενείς, που παρουσιάζουν σύνδρομο απίσχυανσης σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες και όσους δεν παρουσίαζαν σύνδρομο απίσχυανσης (Πίνακας 9).

4. Έλεγχος μεταλλάξεων.

Προκειμένου να ερευνησουμε αν το γονίδιο της μυοστατίνης έχει μεταλλάξεις στις οποίες μπορεί να οφείλεται η διαφορετική έκφραση έγινε PCR με πλευρικούς εκκινητές (flanking primers) σε κάθε ένα από τα εξώνια του και κατευθείαν ανάλυση αλληλουχίας. Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη σε κανένα από τα δείγματα αλλά ούτε και πολυμορφισμοί, πράγμα που σημαίνει, ότι το γονίδιο της μυοστατίνης είναι αρκετά καλά προστατευμένο. Το γεγονός, ότι δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις σημαίνει, ότι η διαφορετική έκφραση οφείλεται σε διαφορετική ρύθμιση του γονιδίου.

Πίνακας 8. Τιμές ποσότητας cDNA μετά από RT-pcr και 35 κύκλους ενίσχυσης των γονιδίων της μυοστατίνης και β-ακτίνης σε μg. 1-52=MDS με απίσχναση, 53-68=MDS χωρίς απίσχναση, 69-81=φυσιολογικοί μάρτυρες

Εξεταζόμενος	myostatin	β-actin	myo/actin
1	2.5	0.9	2.777
2	2.1	1.1	1.909
3	1.9	0.9	2.111
4	2.9	1.02	2.843
5	1.35	0.72	1.875
6	2.15	1.12	1.919
7	1.19	0.9	1.322
8	2.03	0.8	2.5375
9	2.1	1.01	2.079
10	3.1	1.2	2.583
11	2.65	0.9	2.944
12	1.95	0.85	2.294
13	2.6	0.95	2.736
14	2.15	1.05	2.047
15	2.35	1.01	2.326
16	2.01	0.9	2.233
17	1.98	1.12	1.767
18	3.05	1.01	3.019
19	2.65	0.95	2.789
20	2.6	0.8	3.25
21	1.96	0.75	2.613
22	2.7	1.05	2.5714
23	2.01	1.1	1.827
24	2.1	1.1	1.909
25	2.3	1.11	2.07
26	2.2	1.23	1.788
27	2.12	1.14	1.859
28	1.9	0.99	1.919
29	2.1	1.01	2.079
30	2.1	0.98	2.1428
31	1.22	1.21	1.008
32	2.1	1.32	1.59
33	1.9	1.12	1.696
34	1.89	1.123	1.6829
35			
36	1.63	0.99	1.646
37	2.13	0.9	2.366
38	2.1	1.01	2.079
39	2.01	1.02	1.97
40	1.98	1.09	1.816

Πίνακας 8. Τιμές ποσότητας cDNA μετά από RT-pcr και 35 κύκλους ενίσχυσης των γονιδίων της μυοστατίνης και β-ακτίνης σε μg(συνέχεια).

Εξεταζόμενος	myostatin	β-actin	myo/actin
41	1.86	1.12	1.6607
42	2.01	0.9	2.233
43	1.98	1.01	1.96
44	1.5	1.02	1.47
45	1.69	1.21	1.396
46	1.99	1.32	1.507
47	2.03	1.12	1.8125
48	2.01	1.1	1.827
49	2.31	1.11	2.081
50	2	1.23	1.626
51	1.82	1.32	1.378
52	1.9	1.12	1.696
53	0.21	1.12	0.1875
54	0.36	1.09	0.33
55	0.4	1.12	0.357
56	0.28	0.9	0.311
57	0.351	1.01	0.347
58	0.36	0.99	0.3636
59	0.54	0.9	0.6
60	0.61	1.01	0.6039
61	0.69	1.02	0.676
62	0.61	1.12	0.5446
63	0.64	0.9	0.711
64	0.46	1.01	0.455
65	0.65	1.12	0.58
66	0.25	0.9	0.277
67	0.78	1.01	0.772
68	0.42	0.99	0.424
69	0.351	1.12	0.313
70	0.361	0.9	0.401
71	0.455	1.01	0.45
72	0.326	0.99	0.329
73	0.555	0.9	0.616
74	0.615	1.01	0.608
75	0.691	1.02	0.677
76	0.612	0.9	0.68
77	0.645	1.01	0.638
78	0.741	1.02	0.726
79	0.585	1.09	0.536
80	0.654	1.12	0.5839
81	0.722	0.9	0.802

**Πίνακας 9: Αντίγραφα RNA μυστατίνης με Real-Time PCR σε βιοψία μύος (ανά 1μg ολικού RNA)
1-52=MDS με απίσχναση, 53-68=MDS χωρίς απίσχναση,
69-81=φυσιολογικοί μάρτυρες**

Εξεταζόμενος	Αντίγραφα RNA μυστατίνης
1	47250
2	51750
3	49500
4	47700
5	42750
6	47250
7	47250
8	27450
9	47250
10	42750
11	42525
12	36675
13	47925
14	47250
15	45225
16	44550
17	41850
18	45225
19	44550
20	33750
21	38025
22	44775
23	45675
24	45225
25	51975
26	45000
27	40950
28	42750
29	56250
30	47250
31	42750
32	65250
33	30375
34	48375
35	
36	26775
37	45675
38	47250
39	69750
40	59625

Πίνακας 9: Αντίγραφα RNA μυστατίνης με Real-Time PCR σε βιοψία μύος (ανά 1μg ολικού RNA)(συνέχεια)

Εξεταζόμενος	Αντίγραφα RNA μυστατίνης
41	43875
42	58500
43	48375
44	52875
45	45225
46	44550
47	68625
48	59625
49	58500
50	44100
51	60750
52	45225
53	8100
54	9000
55	6300
56	7897,5
57	8100
58	12150
59	13725
60	15525
61	13725
62	14400
63	10350
64	14625
65	5625
66	17550
67	9450
68	4725
69	7897,5
70	8122,5
71	10237,5
72	7335
73	12487,5
74	13837,5
75	15547,5
76	13770
77	14512,5
78	16672,5
79	13162,5
80	14715
81	16245

Πίνακας 10: Έκφραση μυοστατίνης στις διάφορες κατηγορίες εξετασθέντων σε ποσοστό επί της β-ακτίνης. CMML=Χρονία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, RARS= σιδηροβλαστική αναιμία, RA= ανθεκτική αναιμία, RAEB= ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών, RAEB-T= ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή, HEALTHY= υγιείς μάρτυρες, M=άρρεν, F = θήλυ).

MDSΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	GENDER	ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΥΟΣΤΑΤΙΝΗΣ
CMML		
M	3	
F	2	
Total	5	25%±18%
RARS		
M	5	
F	1	
Total	6	56%±35%
RA		
M	31	
F	18	
Total	49	127%±50%
RAEB		
M	7	
F	5	
Total	12	250%±30%
RAEB-T		
M	5	
F	4	
Total	9	104%±25%
HEALTHY		
M	9	
F	8	
Total	17	59%±18%

5. Επίπεδα κυτταροκινών στο αίμα

Μετρήθηκαν με ELISA τα επίπεδα του TNF-α, TGF-β, λεπτίνης, IL-1, IL2, IL6 και μυσστατίνης προκειμένου να διερευνησουμε το ρόλο αυτών των κυτταροκινών στην ρύθμιση του γονιδίου της μυσστατίνης και στην παθογένεση του συνδρόμου απίσχνανσης. Οι τιμές των ανωτέρω κυτταροκινών φαίνονται στον πίνακα Νο 11.

Υπήρχε θετική συσχέτιση των επιπέδων της μυσστατίνης και των επιπέδων των κυτταροκινών στο αίμα(εικόνες 31-39).

Διαπιστώθηκε, ότι ασθενείς με απίσχνανση είχαν αυξημένα επίπεδα TNFα σε σύγκριση με όσους δεν παρουσίαζαν απίσχνανση και τους υγιείς μάρτυρες. Ο TNF-α στους MDS ισχνούς ήταν $719.88 \pm 126.22 (\bar{x} \pm SD)$, στους MDS μη ισχνούς ήταν $394.52 \pm 60.93 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_1=0.0047$) και στους υγιείς μάρτυρες ήταν $249.84 \pm 64.95 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_2=0.0191$).

Η IL-1 στους MDS ισχνούς ήταν $3713 \pm 892.50 (\bar{x} \pm SD)$, στους MDS μη ισχνούς ήταν $1965.5 \pm 314.20 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_1=0.000114$) και στους υγιείς ήταν $827.23 \pm 125.27 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_2=1.7546 \times 10^{-8}$).

Η IL-6 στους MDS ισχνούς ήταν $773.96 \pm 124.11 (\bar{x} \pm SD)$, στους MDS μη ισχνούς ήταν $478.12 \pm 64.44 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_1=0.0103$) και στους υγιείς ήταν $271 \pm 66 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_2=0.0267$).

Ο TGF-β στους MDS ισχνούς ήταν $928.64 \pm 107.52 (\bar{x} \pm SD)$, στους MDS μη ισχνούς ήταν $343.18 \pm 139.06 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_1=0.2374$) και στους υγιείς ήταν $75 \pm 25.70 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_2=1.09182 \times 10^{-5}$).

Η IL-2 στους MDS ισχνούς ήταν $2725.03 \pm 406.28 (\bar{x} \pm SD)$, στους MDS μη ισχνούς ήταν $1477 \pm 247.42 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_1=0.0478$) και στους υγιείς ήταν $534.53 \pm 75.39 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_2=4.48915 \times 10^{-7}$).

Η μυσστατίνη στους MDS ισχνούς ήταν $14.68 \pm 2.24 (\bar{x} \pm SD)$, στους MDS μη ισχνούς ήταν $3.70 \pm 0.95 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_1=0.00117$) και στους υγιείς ήταν $4.76 \pm 1.25 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_2=0.0373$).

Η λεπτίνη στους MDS ισχνούς ήταν $53.83 \pm 23.16 (\bar{x} \pm SD)$, στους MDS μη ισχνούς ήταν $9.22 \pm 3.26 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_1=3.378 \times 10^{-10}$) και στους υγιείς ήταν $6.83 \pm 3.28 (\bar{x} \pm SD)$, ($p_2=1.97 \cdot 10^{-8}$). (Πίνακας Νο 12).

6. Επίδραση κυτταροκινών σε καλλιεργημένα μυοκύτταρα (TNF-α, TGF, κλπ)

Προκειμένου να διερευνήσουμε αν οι ανωτέρω κυτταροκίνες δρουν κατευθείαν και προκαλούν απίσχνανση η δρουν μέσω ρύθμισης του γονιδίου της μυοστατίνης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων και μελετήθηκε η έκφραση της μυοστατίνης με και χωρίς την δράση κυτταροκινών.

Διαπιστώθηκε, ότι ο TNF-α σε συγκεντρώσεις > 500 ng/ml προκαλεί υπερέκφραση του γονιδίου της μυοστατίνης σε καλλιέργειες ανθρώπινων μυοκυττάρων (εικόνα 40) και επομένως μπορεί να συμμετέχει με αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση του συνδρόμου απίσχνανσης. Δεν μπορεί βέβαια να αποκλεισθεί η δράση του TNF-α μέσω άλλου μηχανισμού. Οι υπόλοιπες κυτταροκίνες δεν τροποποιούσαν την έκφραση της μυοστατίνης πράγμα που σημαίνει, ότι μάλλον η μυοστατίνη η άλλοι παράγοντες οδηγούν στην αύξηση του επιπέδου των κυτταροκινών αυτών στο αίμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Αναλυτική παρουσίαση τιμών στάθμης κυτταροκινών στο αίμα των ασθενών.

1-28: πάσχοντες από MDS με απίσχανση. 29-44 πάσχοντες από MDS χωρίς απίσχανση. 45-57: φυσιολογικοί μάρτυρες.

ασθενείς	IL-1 (pg/dl)	IL2 (pg/dl)	tgf-b (pg/dl)	il-6 (pg/dl)	Myostatin (ng/ml)	Tnfa (pg/dl)	Λεπτίνη (pg/ml)
1	2210	2564	888	725	14.5	625	22.5
2	2890	3250	978	523	18.2	589	15.8
3	4450	2895	856	754	12.1	750	58.6
4	4190	2340	1020	721	10.8	816	29
5	2980	1987	900	732	17.5	788	54.5
6	2920	2895	780	845	16.3	450	26.5
7	2810	2250	880	885	11	850	87.5
8	4340	3690	866	758	16.1	600	88.6
9	5280	2569	1000	952	12.5	780	18.9
10	4986	3120	720	686	14.6	850	69
11	4250	3220	1080	648	13.7	715	78.5
12	2963	2960	880	793	16.8	652	15.8
13	2951	2560	820	839	14.9	951	56.5
14	2954	3000	1010	954	16.5	789	45
15	4280	2800	900	889	14.8	654	39
16	5086	2780	1100	984	12.8	852	45.5
17	2890	2589	1004	758	13.5	741	65.5
18	4450	2980	900	523	14.8	763	88.5
19	3128	2580	980	754	16.9	951	70.5
20	2987	2750	800	721	18.2	753	65.5
21	4230	3000	902	732	16.3	423	70.8
22	4142	2900	1102	845	14.3	654	55.5
23	4002	2870	1080	885	15.6	621	56.5
24	4452	2698	1008	858	14.2	632	55.5
25	3998	1990	1050	852	13.6	745	65.5
26	3968	2564	800	689	15.4	785	66.8
27	4321	2700	930	850	16.3	658	79.48
28	1856	1800	768	516	9	652	15.9
29	1200	1520	255	484	2	451	5.9
30	2320	1489	368	458	3	346	11.5
31	1968	1258	208	446	4	384	5.8
32	1999	1698	476	556	2.5	286	9.5
33	1542	1759	250	415	2.5	248	11.1
34	1852	1648	550	552	3.6	393	8.9
35	1698	1256	300	553	3.7	339	12.5
36	2040	1400	420	323	3.8	354	10.9
37	1879	1624	368	454	4.5	429	5.9
38	2310	1200	352	421	4.5	354	8.1
39	2001	988	350	432	4.3	448	4.9
40	1985	1890	310	545	5.1	384	7.6
41	1879	1366	222	484	5.3	458	12.5
42	2321	1788	422	486	2.8	346	11.5
43	2451	1468	238	548	4.3	456	16
44	2003	1280	402	493	3.4	379	4.9

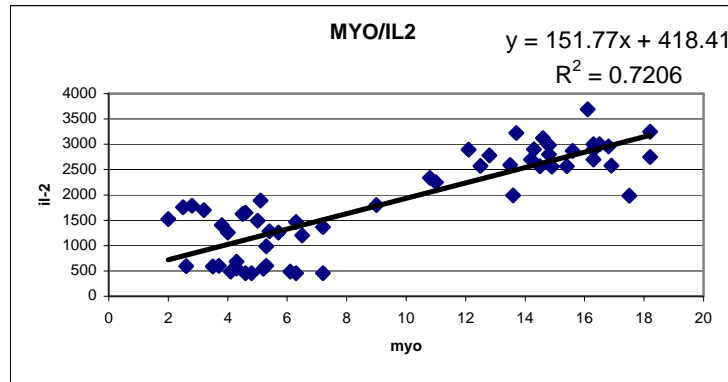
ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Αναλυτική παρουσίαση τιμών στάθμης κυτταροκινών στο αίμα των ασθενών. (συνέχεια)

1-28: πάσχοντες από MDS με απίσχνανση. 29-44 πάσχοντες από MDS χωρίς απίσχνανση. 45-57: φυσιολογικοί μάρτυρες.

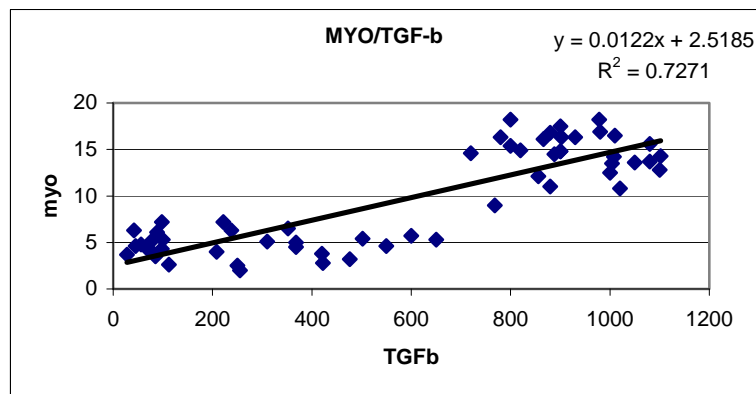
ασθενείς	IL-1 (pg/dl)	IL2 (pg/dl)	tgf-b (pg/dl)	il-6 (pg/dl)	Myostatin (ng/ml)	Tnfa (pg/dl)	Λεπτίνη (pg/ml)
45	1024	588	85	352	3.5	231	2.2
46	896	684	98	254	4.3	253	3.8
47	748	594	112	191	2.6	241	4.7
48	643	546	78	200	5.2	265	5.6
49	968	452	45	304	4.6	365	2.9
50	954	600	28	270	3.7	324	4.8
51	908	458	56	352	4.8	323	9
52	854	452	42	304	6.3	254	11
53	821	600	100	304	5.3	236	8.9
54	832	456	98	251	7.2	223	12.1
55	650	549	69	375	4.3	156	5.9
56	800	486	88	178	6.1	254	11.1
57	656	484	76	200	4.1	123	6.8

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Στάθμες κυτταροκινών στο αίμα των υπό μελέτη ατόμων. Μέσες τιμές, σταθερές αποκλίσεις και σύγκριση τιμών (t-test, p value) μεταξύ των ομάδων.

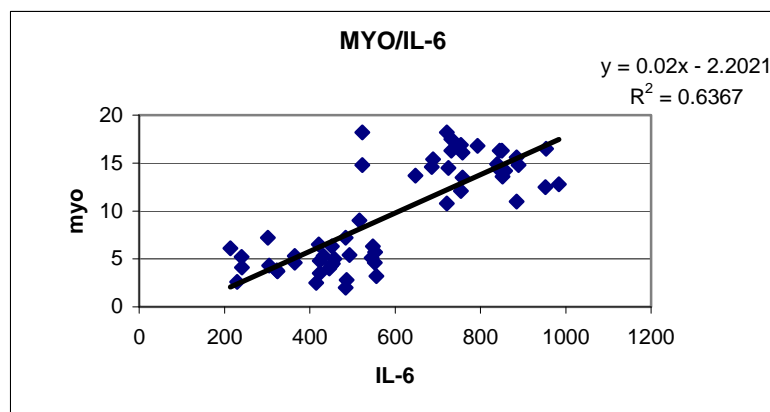
	MDS ισχνοί	ισχνοί/μη ισχνοί (p ₁)	MDS μη ισχνοί	ισχνοί/φυσιολογικοί (p ₂)	φυσιολογικοί	μη ισχνοί/φυσιολογ (p ₃)
TNF-α	719.88	0.004771	394.5294	0.019112	249.8462	0.80264
TNF-α SD	126.2222		60.93381		64.95363	
IL-1	3713	0.00011442	1965.5	1.7546x10-08	827.230769	0.00271554
IL-1SD	892.5012		314.2093		125.2751	
IL-6	773.9643	0.010309	478.125	0.026785	271.9231	0.895411
IL-6 SD	124.1124		64.44313		66.46736	
TGF-β	928.6428571	0.237452256	343.1875	1.09182x10-05	75	7.73511x10-07
TGF-β SD	107.5244		139.069		25.70019	
IL-2	2725.035714	0.047812082	1477	4.48915x10-07	534.5384615	0.000186739
IL-2 SD	406.2815556		247.4254096		75.39077683	
myo	14.68571	0.001178	3.70625	0.037314	4.769231	0.324053
Myo-SD	2.248739		0.958797		1.253917	
leptin	53.83	3.378·10 ⁻¹⁰	9.22	1.97·10 ⁻⁸	6.83	0.96
Leptin SD	23.16		3.26		3.28	



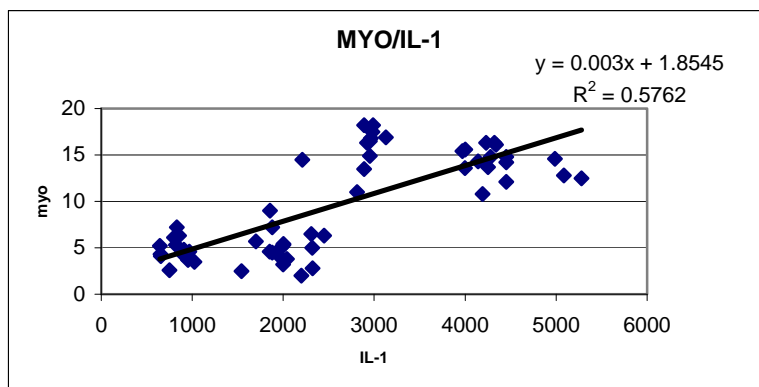
Εικόνα 31: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης myo και IL-2.



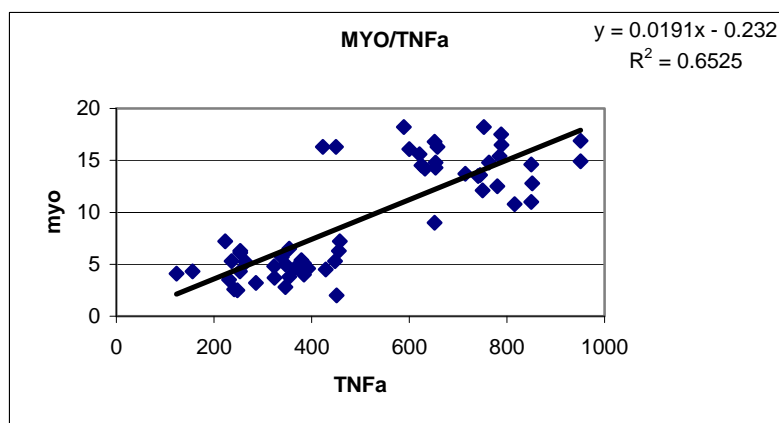
Εικόνα 32: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης TGF-β και myo.



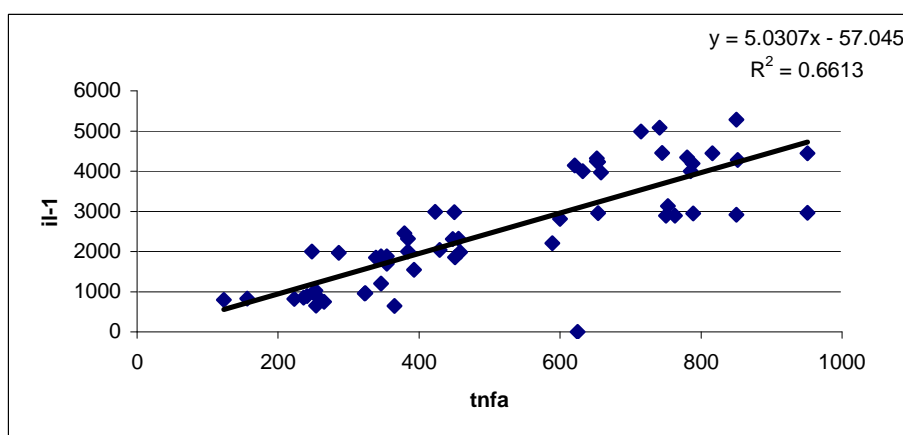
Εικόνα 33: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης IL-6 και myo.



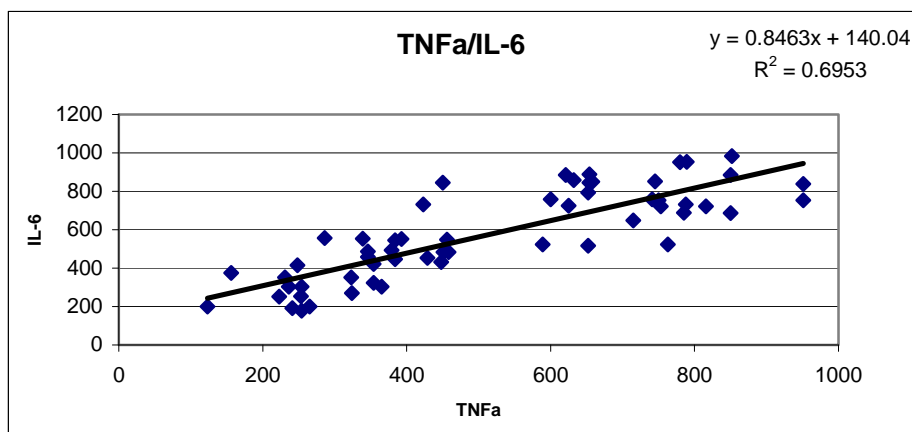
Εικόνα 34: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης IL-1 και myo.



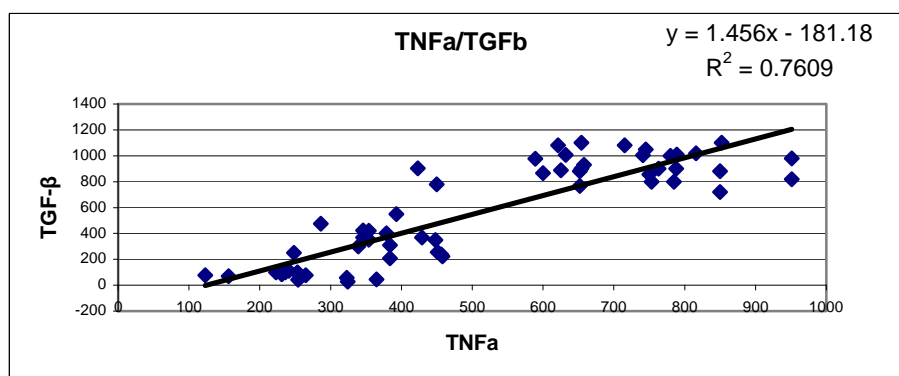
Εικόνα 35: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης TNF-α και myo.



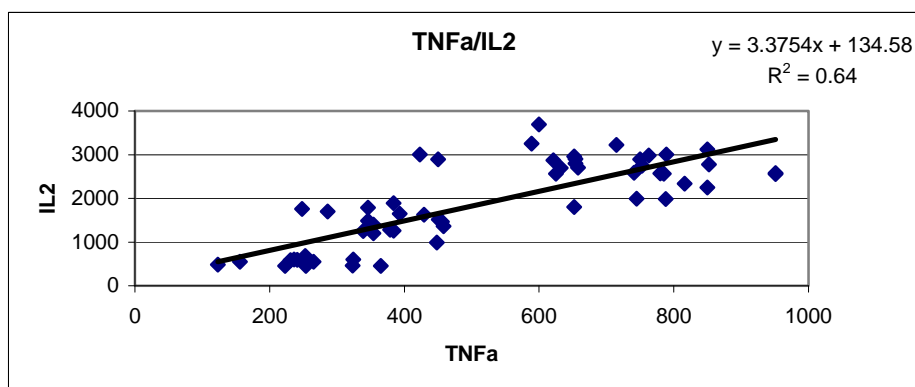
Εικόνα 36: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης TNF-α και IL-1.



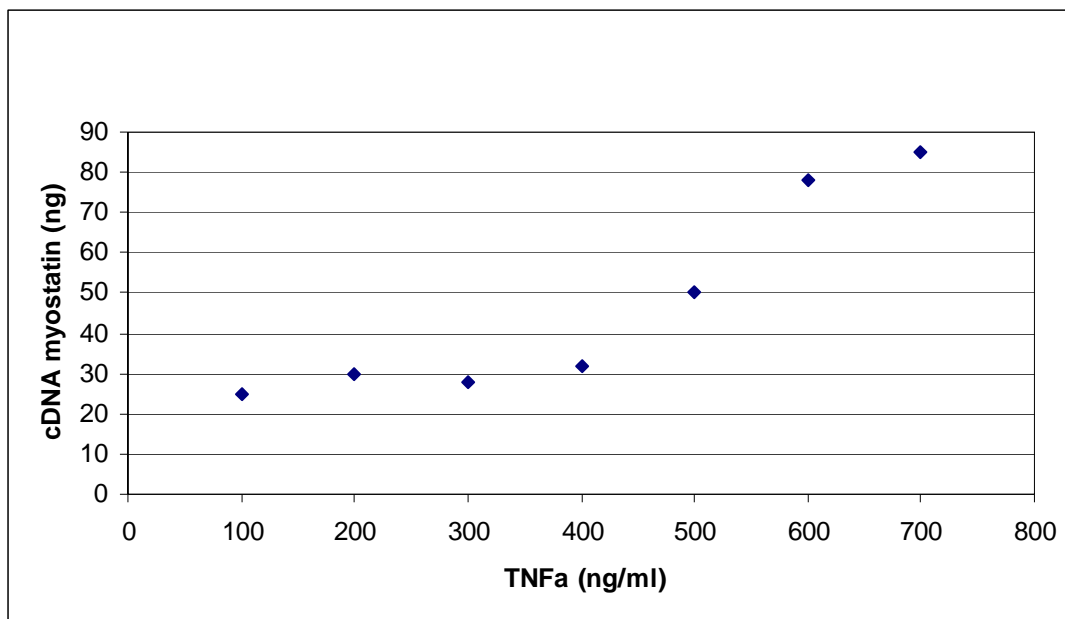
Εικόνα 37: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης TNF-α και IL-6.



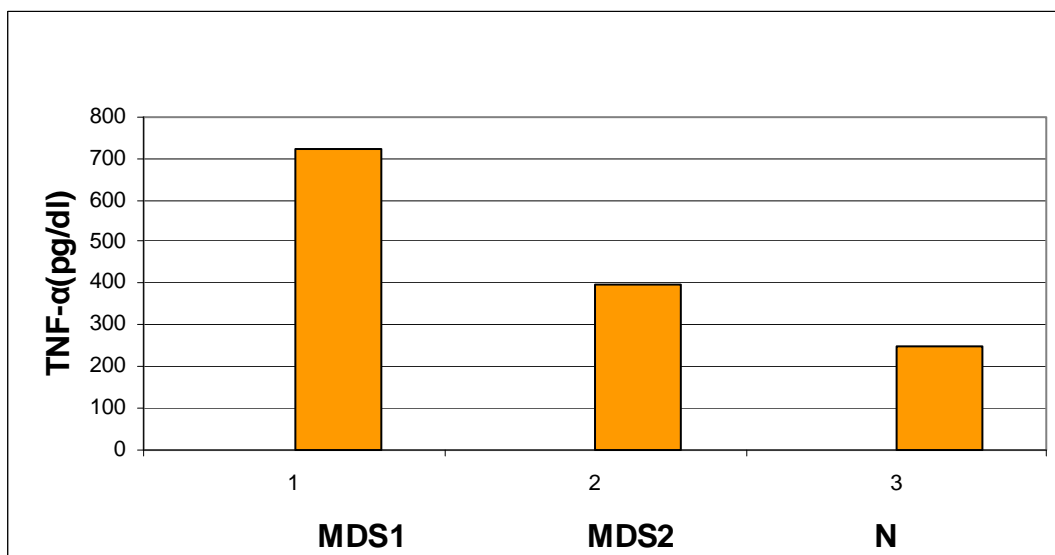
Εικόνα 38: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης TNF-α και TGF-β.



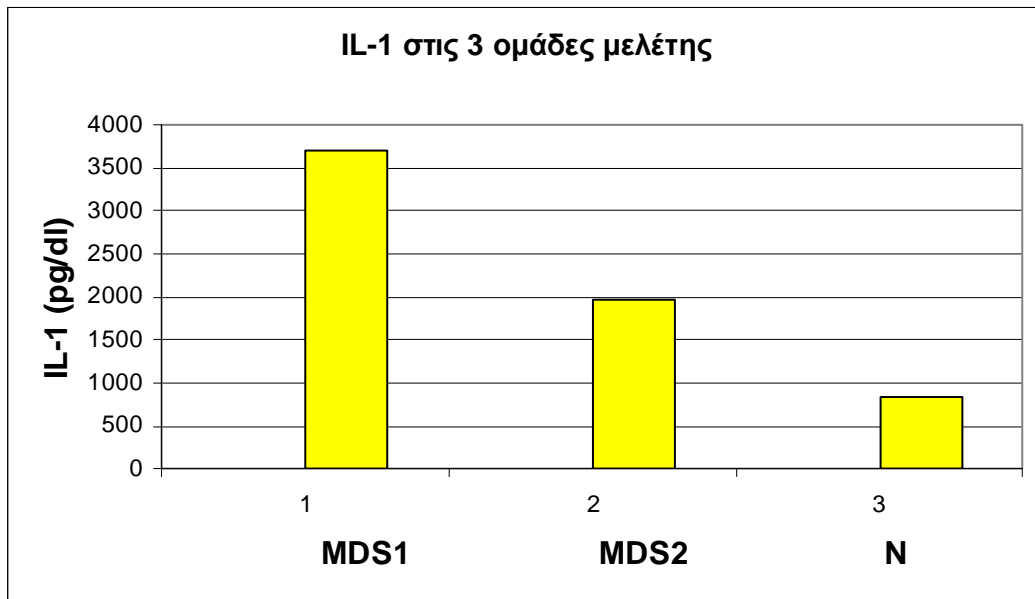
Εικόνα 39: Θετική συσχέτιση μεταξύ στάθμης TNF-α και IL-2.



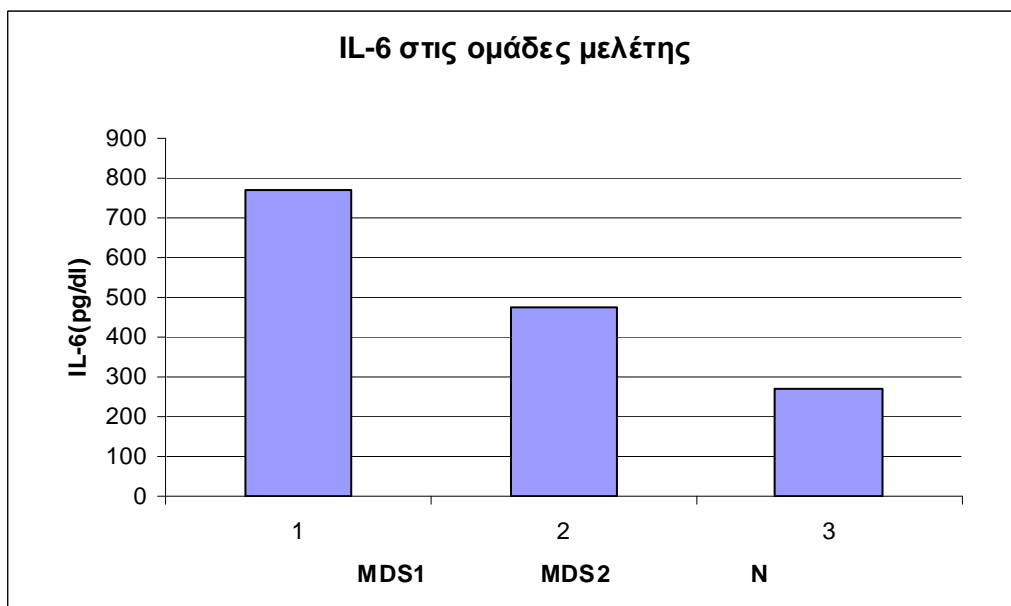
Εικόνα 40: έκφραση μυοστατίνης σε καλλιέργειες μυικών κυττάρων (ανά 5 μg ολικού RNA) μετά προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων TNFα.



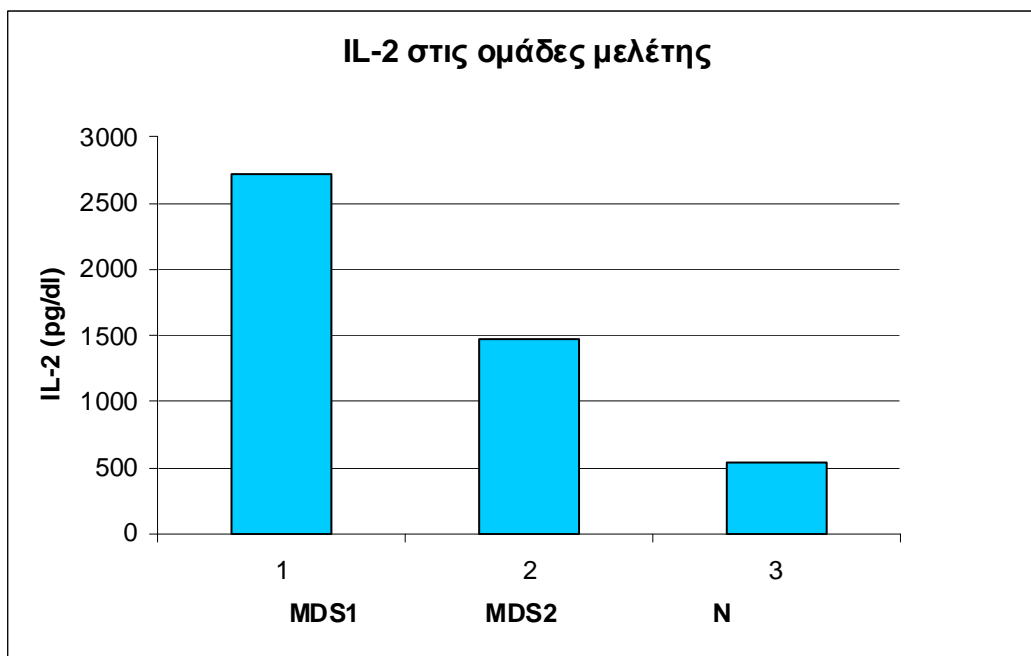
**Εικόνα 41: Μέση τιμή επιπέδων TNF-α στον ορό στις διάφορες ομάδες εξετασθέντων.
MDS1: MDS ασθενείς με σύνδρομο απίσχνανσης,
MDS2: MDS ασθενείς χωρίς σύνδρομο απίσχνανσης,
N: υγιείς μάρτυρες.**



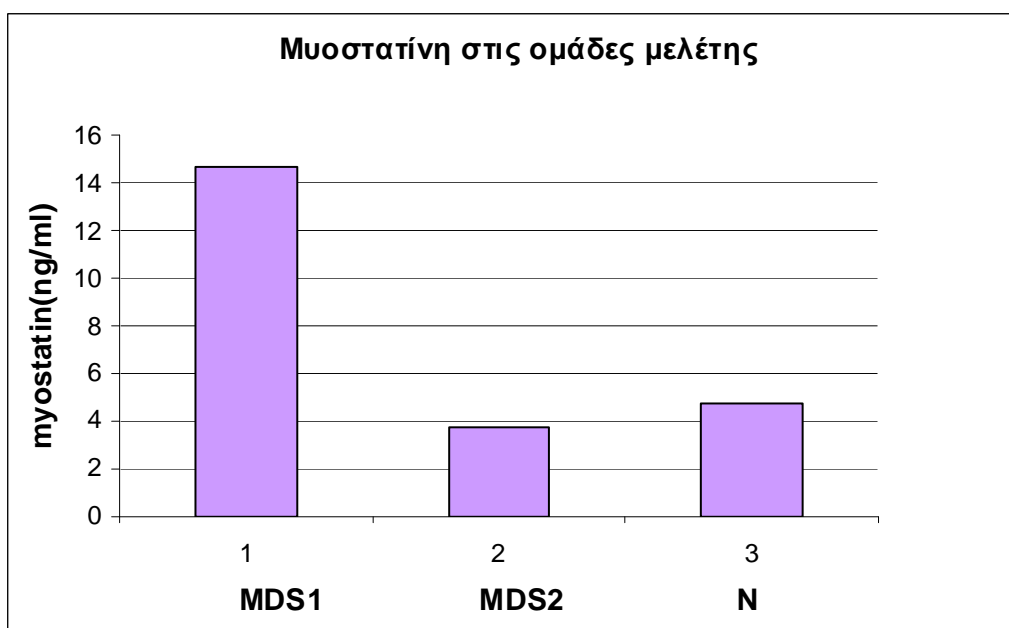
Εικόνα 42: Μέση τιμή επιπέδων IL-1 στον ορό στις διάφορες ομάδες εξετασθέντων.



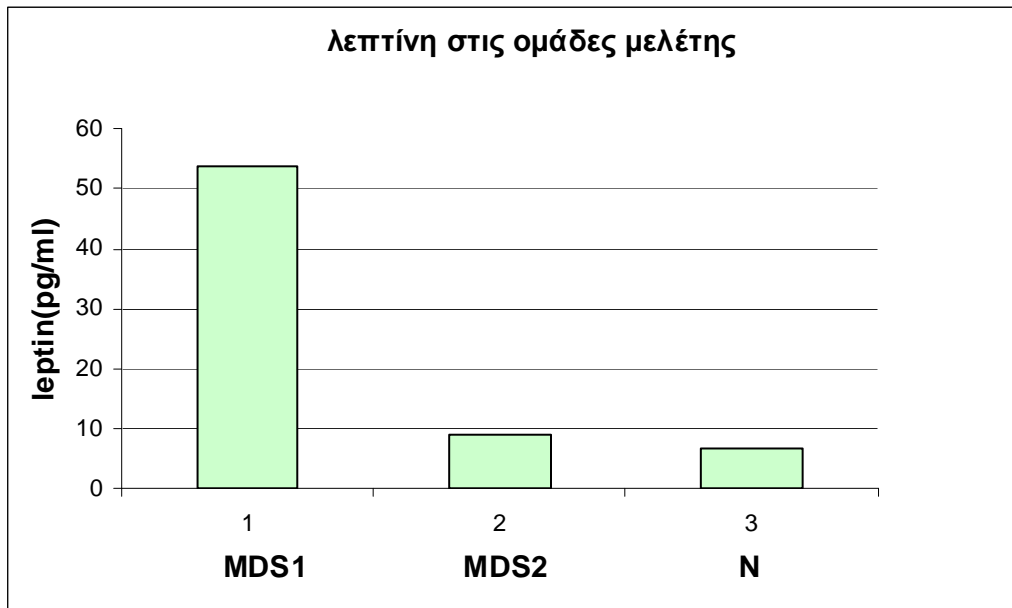
Εικόνα 43: Μέση τιμή επιπέδων IL-6 στον ορό στις διάφορες ομάδες εξετασθέντων.



Εικόνα 44: Μέση τιμή επιπέδων IL-2 στον ορό στις διάφορες ομάδες εξετασθέντων.



Εικόνα 45: Μέση τιμή επιπέδων μυοστατίνης στον ορό στις διάφορες ομάδες εξετασθέντων.



Εικόνα 46: Μέση τιμή επιπέδων λεπτίνης στον ορό στις διάφορες ομάδες εξετασθέντων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σύνδρομο απίσχνανσης (καχεξία) (wasting syndrome) συνοδεύει πολλά νοσήματα και καταστάσεις και χαρακτηρίζεται από την απώλεια τόσο λιπώδους όσο και μυϊκού ιστού. Αντίθετα σε υποθερμιδικές δίαιτες τα άτομα χάνουν περισσότερο λίπος παρά μυϊκή μάζα (183,184).

Η παθοφυσιολογία του συνδρόμου καχεξίας δεν είναι καθ' όλα γνωστή. Κυτταροκίνες, ορμόνες, μυστατίνη εμπλέκονται στον μηχανισμό της ανάπτυξης του συνδρόμου (13,185,186,187,188). Οι ουσίες αυτές δρουν κατευθείαν στον λιπώδη ή στον μυϊκό ιστό ή μέσω άλλων μεσαζόντων μορίων. Κυρίως οι προφλεγμονώδεις και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, των οποίων η στάθμη είναι υψηλή σε όλες τις χρόνιες φλεγμονώδεις και νεοπλασματικές νόσους αποτελούν ίσως τον κύριο μεσάζοντα για την ανάπτυξη του συνδρόμου.

Στην παρούσα εργασία διαπιστώσαμε, ότι τα άτομα με MDS και σύνδρομο απίσχνανσης εκφράζουν περισσότερο το γονίδιο της μυστατίνης σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες και τους πάσχοντες χωρίς σύνδρομο απίσχνανσης, όπως φαίνεται από το ποσόν του mRNA του γονιδίου. Η μυστατίνη θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής της μυϊκής μάζας και πειράματα αδρανοποίησης (knockout) του γονιδίου της μυστατίνης έχουν σαν αποτέλεσμα την μεγάλη αύξηση της μυϊκής μάζας(6,7,8,9). Η μυστατίνη αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση και την σύνθεση του DNA μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενώ αναστέλλει την δραστηριότητα των μυοβλαστών (21,27,32,57,66,67,68,69,70,71,72,73,84,90,91,92, 93,94,95,96,97).

Πρόσφατα διαπιστώθηκε, ότι η μυστατίνη δρα αναστέλλοντας την ενεργοποίηση γονιδίων, που σχετίζονται με την διαφοροποίηση των μυοσωληναρίων (ακόμη και αν χορηγηθεί σε διαφοροποιημένα μυοσωληνάκια) και αναστέλλει την οδό της κινάσης της φωσφατυδιλοϊνοσιτόλης-3 (189).

Αντίθετα η μυσστατίνη προκαλεί πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ινοβλαστών και αύξηση της σύνθεσης εξωκυττάριας ουσίας, πράγμα το οποίο βοηθά στην αναγέννηση των τενόντων και συνδέσμων (190).

Αυξημένα επίπεδα μυσστατίνης σχετίζονται με παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη. Η αναερόβια άσκηση μειώνει τα επίπεδα μυσστατίνης. Η φυσική αδράνεια οδηγεί σε αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω αύξησης της μυσστατίνης (191).

Η μυσστατίνη, που εκλύεται από τα καρδιομυοκύτταρα προκαλεί γενικευμένο σύνδρομο απίσχνανσης. Η αναστολή της μυσστατίνης προλαμβάνει και βελτιώνει την καχεξία και την μυϊκή ατροφία, που αναπτύσσεται σε βαριά καρδιακή ανεπάρκεια. Έχει αναπτυχθεί μηχανισμός αδρανοποίησης του γονιδίου της μυσστατίνης σε καρδιακό μυ κατά τρόπο ιστοειδικό με αποτέλεσμα βελτίωση της καρδιακής ανεπάρκειας αλλά και του συστηματικού συνδρόμου απίσχνανσης (192).

Η μυσστατίνη επίσης έχει δράση στην οστεοσύνθεση (πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση οστεοβλαστικών πρόδρομων κυττάρων). Επομένως ανταγωνιστές μυσστατίνης ενισχύουν την οστική μάζα και την αντοχή των οστών, ενώ υπερέκφραση της μυσστατίνης οδηγεί σε μείωση οστικής μάζας και της ισχύος των οστών (193).

Η μυσστατίνη αποτελεί μοντέλο μελέτης της ρύθμισης της μάζας ενός ιστού (μυϊκού). Έχουν ανακαλυφθεί επαγωγείς και ανασταλτές της μυσστατίνης. Δυνητικοί στόχοι φαρμακολογικής στρατηγικής, που μπορούν να αναστείλουν ή/και να βελτιώσουν την αποδόμηση των μυϊκών ινών σε μυοδυστροφικά σύνδρομα έχουν μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα. Η φαρμακολογία με αυτή την προοπτική παρέχει θεραπευτική ευκαιρία σε δυστροφικούς ασθενείς και μπορεί να τους συντηρήσει σε ικανοποιητική κατάσταση μέχρι την ανεύρεση νεότερων οριστικότερων θεραπειών (194).

Δεν είναι γνωστό επακριβώς πώς γίνεται η ρύθμιση του γονιδίου της μυσστατίνης. Έχει αναφερθεί, ότι κυτταροκίνες ρυθμίζουν την έκφραση της μυσστατίνης, η οποία στην συνέχεια ρυθμίζει την μυϊκή μάζα.

Επειδή η μυσστατίνη είναι ο κύριος ρυθμιστής της κυτταρικής μάζας των μυών πιστεύεται, ότι η ρύθμιση των επιπέδων της μυσστατίνης στον άνθρωπο μπορεί να αποτελεί την λύση για την αντιμετώπιση της καχεξίας. Στους ασθενείς μας μελετήσαμε:

- 1) Τα επίπεδα μυοστατίνης στον ορό
 - 2) την έκφραση μυοστατίνης στον μυϊκό ιστό, που παραλάβαμε από τον αριστερό βραχιόνιο μυ με ανοικτή βιοψία.
 - 3) τα επίπεδα IL-1, TGF-β, TNFα, IL-6, IL-2 και λεπτίνης στον ορό
- Με σκοπό να αναζητήσουμε αιτιοπαθογενετική σχέση με το σύνδρομο απίσχνανσης στους ασθενείς αυτούς.

Η σχέση μεταξύ της IL-1 και της μυοστατίνης έχει περιγραφεί προηγουμένως (139)

Ο TGF-β είναι μία πρωτεΐνη που ελέγχει τον πολλαπλασιασμό την διαφοροποίηση και άλλες λειτουργίες στα περισσότερα κύτταρα.(155).

Στην δική μας εργασία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του κυκλοφορούντος TNFα στον ορό των πασχόντων και βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες ($p < 0.01$) καθώς και σε σχέση με τους πάσχοντες, που δεν εμφάνιζαν το σύνδρομο καχεξίας ($p < 0.01$). Επίσης τα επίπεδα του RNA της μυοστατίνης στους μύες σχετίζονται με τα επίπεδα του TNF-α στον ορό. Αυτό συνηγορεί υπέρ του, ότι ο TNF-α σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα της μυοστατίνης και με το σύνδρομο καχεξίας στους ασθενείς μας. Τα πειράματα με τις καλλιέργειες των μυοβλαστών δείχνουν, ότι συγκέντρωση του TNF-α > 500 pg./dl επάγει την έκφραση του γονιδίου της μυοστατίνης και αυτό σημαίνει ότι ο TNF-α αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα του συνδρόμου απίσχνανσης. Δεν αποκλείεται βέβαια η δράση του TNF-α και μέσω άλλων μηχανισμών. Επομένως χρήση ανασταλτών της μυοστατίνης αναμένεται να βελτιώσουν το σύνδρομο καχεξίας στους ασθενείς.

Έχει αναφερθεί, ότι η μεταλλαγμένη μυοστατίνη, που δεν είναι λειτουργική οδηγεί σε μείωση της IL-6(139). Δεν υπάρχουν μελέτες, που να αναφέρουν την αύξηση της IL-6 από τα αυξημένα επίπεδα της μυοστατίνης. Στην δική μας μελέτη διαπιστώσαμε, ότι υπάρχει θετική συσχέτιση των τιμών της IL-6 και της μυοστατίνης. Στις καλλιέργειες όμως των μυοβλαστών δεν αποδείχτηκε κατευθείαν δράση της IL-6 στην ρύθμιση του γονιδίου της μυοστατίνης.

Η σχέση μεταξύ IL-1, IL-6, TNF-α, λεπτίνης και μυοστατίνης έχει αναφερθεί ανωτέρω (139). Κατόπιν αυτών μελετήθηκαν τα επίπεδα αυτών των κυτταροκινών στον ορό των πασχόντων της μελέτης μας προκειμένου να διαπιστωθεί αν κάποιος από αυτούς συμμετέχει στον μηχανισμό της αύξησης

της έκφρασης της μυοστατίνης και την ανάπτυξη του συνδρόμου απίσχνανσης. Μία τέτοια διαπίστωση θα οδηγούσε στην πιθανή χρήση ανασταλτών για την αντιμετώπιση του συνδρόμου απίσχνανσης.

Από την μελέτη προέκυψε, ότι ο TNF-α ήταν αυξημένος στον ορό των MDS ασθενών με σύνδρομο απίσχνανσης σε σύγκριση με τους MDS ασθενείς χωρίς σύνδρομο απίσχνανσης και τους φυσιολογικούς μάρτυρες($p < 0.01$). (Είναι γνωστός ο ρόλος του TNF-α στην τροποποίηση της λειτουργίας των στρωματικών κυττάρων και στην ανάπτυξη των κυτταροπενιών στα MDS) (195). Επίσης από πειράματα επίδρασης σε μυϊκά κύτταρα κυτταρικών σειρών φαίνεται ότι ασκεί κάπως ρυθμιστικό ρόλο στο γονίδιο της μυοστατίνης. Σε συσχέτισμό με την έκφραση της μυοστατίνης υπάρχει ένδειξη, ότι ο TNFα σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα μυοστατίνης στον ορό στους ασθενείς αυτούς και πιθανόν παίζει θετικό ρυθμιστικό ρόλο στο γονίδιο της μυοστατίνης και να είναι ένας από τους υπεύθυνους παράγοντες της μυϊκής καχεξίας στους ασθενείς αυτούς.

Ο ρόλος του TGF-β στην ανάπτυξη και την παθογένεση των MDS έχει αναφερθεί(196). Στην ομάδα των ασθενών με σύνδρομο απίσχνανσης διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα TGF-β σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς σύνδρομο απίσχνανσης και τους υγιείς μάρτυρες.

Τέλος η IL-6 έχει βρεθεί επίσης αυξημένη στα MDS(197). Επίσης στην δική μας ομάδα η IL-6 βρέθηκε αυξημένη στους πάσχοντες με απίσχνανση σε σύγκριση με τους πάσχοντες χωρίς απίσχνανση και τους υγιείς.

Συμπερασματικά οι κυτταροκίνες, που μελετήθηκαν βρέθηκαν τροποποιημένες στους πάσχοντες από σύνδρομο απίσχνανσης, πράγμα που υποδηλοί, ότι συμμετέχουν μέσω η ανεξάρτητα από το γονίδιο της μυοστατίνης στην ανάπτυξη του συνδρόμου απίσχνανσης στους ασθενείς αυτούς. Δεδομένου, ότι η παραγωγή των κυτταροκινών αυτών γίνεται με την δράση του παθολογικού κλώνου πάνω στα στρωματικά κύτταρα του μυελού, ο περιορισμός της παραγωγής τους δεν είναι ανεξάρτητος της καταστολής του κλώνου, πράγμα το οποίο δεν είναι εφικτό ή σκόπιμο τις περισσότερες φορές. Αντίθετα η εξουδετέρωση αυτών μέσω της χρήσης ανασταλτών πιθανόν θα είχε ευεργετική επίδραση τόσο στην πορεία του MDS όσο και στην αντιμετώπιση της απίσχνανσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην έρευνα μετείχαν 81 ασθενείς πάσχοντες από μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Πενήντα ένας ήταν άνδρες και 30 γυναίκες. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον πίνακα 6. Επίσης στην έρευνα μας πήραν μέρος και 17 υγιείς μάρτυρες 9 άντρες και 8 γυναίκες.

1) Διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου GDF-8 στους MDS ασθενείς με σύνδρομο απίσχνανσης σε σύγκριση με τους MDS ασθενείς χωρίς σύνδρομο απίσχνανσης και τους υγιείς μάρτυρες.

2) Διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα TNF α , TGF- β , IL-1, IL-2, IL-6 και λεπτίνης στον ορό της ίδιας ομάδας ασθενών σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες.

3) Υπάρχει ένδειξη ενεργοποίησης του γονιδίου της μυοστατίνης από τον TNF- α ενώ οι άλλες κυτταροκίνες είναι παράλληλα αυξημένες αλλά δεν φαίνεται να έχουν κατευθείαν ρυθμιστική δράση στο γονίδιο της μυοστατίνης.

4) Περαιτέρω μελέτη με χρήση ανασταλτών των κυτταροκινών αυτών θα επιβεβαιώσει την υπόθεση αυτή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μυοστατίνη ανήκει στην υπεροικογένεια των TGF-β ρυθμιστικών παραγόντων. Αποτελεί τον κύριο αρνητικό ρυθμιστή της ανάπτυξης του σκελετικού μύος. Έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις του γονιδίου της μυοστατίνης που οδηγούν σε αδρανοποίηση του γονιδίου και οι οποίες σχετίζονται με μεγάλη αύξηση της μυϊκής μάζας τόσο σε ζώα όσο και στον άνθρωπο. Αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης οδηγεί σε μείωση της μυϊκής μάζας. Το σύνδρομο απίσχνανσης χαρακτηρίζεται από απώλεια μυϊκής μάζας και λιπώδους ιστού και συνοδεύει πολλά χρόνια και βαριά νοσήματα. Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες αντιμετώπισης αυτού του συνδρόμου προκειμένου να βελτιωθεί η γενική κατάσταση και η ποιότητα ζωής των ασθενών που πάσχουν από αυτό το σύνδρομο.

Η σχέση της μυοστατίνης με το σύνδρομο απίσχνανσης δεν είναι καλά γνωστή. Αναστολείς μυοστατίνης έχουν χρησιμοποιηθεί στο αθλητικό doping αλλά και στην αντιμετώπιση μυοδυστροφιών.

ΣΚΟΠΟΣ: Σκοπός της μελέτης μας είναι να διερευνήσουμε την σχέση της μυοστατίνης με το σύνδρομο απίσχνανσης, που παρουσιάζουν ορισμένοι ασθενείς και στην συνέχεια να γίνει προσπάθεια αντιμετώπισης του συνδρόμου.

ΥΛΙΚΟ: Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 98 άτομα. Από αυτά τα 81 ήταν MDS . 49 άνδρες και γυναίκες με RA, 6 με RARS, 12 με RAEB, 9 με RAEB-T και 5 με CMML με διάμεση ηλικία 71 (33-85). Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν 17 υγιείς , 9 άνδρες και 8 γυναίκες με διάμεση ηλικία 71 (εύρος 33-85)

ΜΕΘΟΔΟΙ: Από ασθενείς και μάρτυρες πήραμε μυϊκό ιστό με βιοψία αριστερού βραχιόνιου μύος τον οποίο ομογενοποιήσαμε με υπερήχους και εξαγάγαμε RNA (κλασική μέθοδος φαινόλης-χλωροφόρμιου) Στην συνέχεια έγινε RT-PCR προκειμένου να εκτιμήσουμε την έκφραση της μυοστατίνης (Kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq της Invitrogen). Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% των PCR προϊόντων. Έκλουση του cDNA από την πηκτή αγαρόζης- Ποσοτικός προσδιορισμός των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της διαφοράς της έκφρασης. Παράλληλα σε μερικά δείγματα έγινε Real Time PCR για τον ακριβέστερο

ποσοτικό προσδιορισμό(universal cybergreen kit της Invitrogen). Έλεγχος μεταλλάξεων στο γονίδιο της μυοστατίνης έγινε με ανάλυση αλληλουχίας των εξωνίων σε ABI sequencer. Για τον έλεγχο της σχέσης των κυτταροκινών με την λειτουργία του γονιδίου της μυοστατίνης μετρήθηκαν τα επίπεδα των TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, TGF- β και λεπτίνης με ELISA (kit R&D, BIOVENTOR) και έγινε συσχέτιση των τιμών με την έκφραση της μυοστατίνης. Για την διερεύνηση της επίδρασης των κυτταροκινών στη ρύθμιση του γονιδίου της μυοστατίνης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων στις οποίες επιδρούσαν διαφορετικές ποσότητες των κυτταροκινών και προσδιορίζονταν το RNA της μυοστατίνης ανά μg ολικού RNA μύος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα προϊόντα από την RT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης, στην συνέχεια έγινε έκλουση των προϊόντων PCR από το πήκτωμα αγαρόζης και φωτομέτρηση των προϊόντων έκλουσης της β -ακτίνης και της μυοστατίνης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μg DNA. Επίσης βρέθηκε και ο λόγος του cDNA-μυοστατίνης/cDNA-ακτίνης.

Ο λόγος μυοστατίνης/ β -ακτίνη στους ασθενείς MDS με απίσχνανση, ήταν 2.052 ± 0.479 ($\bar{x} \pm \text{SD}$), στους MDS ασθενείς χωρίς απίσχνανση ήταν 0.474 ± 0.178 και στους φυσιολογικούς 0.555 ± 0.151 . Υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας MDS ισχνών και MDS μη ισχνών ($p_1=0.00023$) καθώς και μεταξύ ισχνών MDS και φυσιολογικών($p_2=5.9 \times 10^{-5}$). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ MDS μη ισχνών και φυσιολογικών($p_3=0.55$).

Οι ασθενείς με RA, RAEB, RAEB-T είχαν μεγαλύτερη έκφραση μυοστατίνης σε σύγκριση με CMML, RARS και υγιείς.

Σε ασθενείς με CMML η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $25\% \pm 18\%$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$), σε ποσοστό επί της β -ακτίνης, σε ασθενείς με RARS η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $56\% \pm 35\%$, σε υγιή άτομα η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $59\% \pm 18\%$, σε ασθενείς με RA η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $127\% \pm 50\%$, σε ασθενείς με RAEB η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $250\% \pm 30\%$, σε ασθενείς με RAEB-T η έκφραση της μυοστατίνης ήταν $104\% \pm 25\%$.

Η μέση τιμή των αντιγράφων RNA που λήφθηκαν με Real time pcr στους MDS ασθενείς με απίσχνανση ήταν 46997.45 ± 8934.09 ($\bar{x} \pm \text{SD}$), στους MDS ασθενείς χωρίς απίσχνανση ήταν 10702.97 ± 3885.59 , ενώ στους υγιείς

ήταν 12657.12 ± 3231.873 . Οι ασθενείς με απίσχνανση είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τους ασθενείς χωρίς απίσχνανση ($p_1=0.00102$) και τους υγιείς ($p_2=0.000512$). Οι ασθενείς χωρίς απίσχνανση δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τους υγιείς ($p_3=0.52$)

Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη σε κανένα από τα δείγματα αλλά ούτε και πολυμορφισμοί, πράγμα που σημαίνει, ότι το γονίδιο της μυοστατίνης είναι αρκετά καλά προστατευμένο. Το γεγονός, ότι δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις σημαίνει, ότι η διαφορετική έκφραση οφείλεται σε διαφορετική ρύθμιση του γονιδίου.

Από τον προσδιορισμό των επιπέδων των κυτταροκινών στο αίμα διαπιστώθηκε : ο TNF-α στους MDS ισχνούς ήταν 719.88 ± 126.22 ($\bar{x} \pm SD$), στους MDS μη ισχνούς ήταν 394.52 ± 60.93 ($p_1=0.0047$) και στους υγιείς μάρτυρες ήταν 249.84 ± 64.95 ($p_2=0.0191$).

Η IL-1 στους MDS ισχνούς ήταν 3713 ± 892.50 ($\bar{x} \pm SD$), στους MDS μη ισχνούς ήταν 1965.5 ± 314.20 ($p_1=0.000114$) και στους υγιείς ήταν 827.23 ± 125.27 , ($p_2=1.7546 \times 10^{-8}$).

Η IL-6 στους MDS ισχνούς ήταν 773.96 ± 124.11 ($\bar{x} \pm SD$), στους MDS μη ισχνούς ήταν 478.12 ± 64.44 ($p_1=0.0103$) και στους υγιείς ήταν 271 ± 66 ($p_2=0.0267$).

Ο TGF-β στους MDS ισχνούς ήταν 928.64 ± 107.52 ($\bar{x} \pm SD$), στους MDS μη ισχνούς ήταν 343.18 ± 139.06 ($p_1=0.2374$) και στους υγιείς ήταν 75 ± 25.70 ($p_2=1.09182 \times 10^{-5}$).

Η IL-2 στους MDS ισχνούς ήταν 2725.03 ± 406.28 ($\bar{x} \pm SD$), στους MDS μη ισχνούς ήταν 1477 ± 247.42 ($p_1=0.0478$) και στους υγιείς ήταν 534.53 ± 75.39 ($p_2=4.48915 \times 10^{-7}$).

Η μυοστατίνη στους MDS ισχνούς ήταν 14.68 ± 2.24 ($\bar{x} \pm SD$), στους MDS μη ισχνούς ήταν 3.70 ± 0.95 ($p_1=0.00117$) και στους υγιείς ήταν 4.76 ± 1.25 ($p_2=0.0373$).

Η λεπτίνη στους MDS ισχνούς ήταν 53.83 ± 23.16 ($\bar{x} \pm SD$), στους MDS μη ισχνούς ήταν 9.22 ± 3.26 ($p_1=3.378 \times 10^{-10}$) και στους υγιείς ήταν 6.83 ± 3.28 ($p_2=1.97 \cdot 10^{-8}$).

Προκειμένου να διερευνησουμε αν οι ανωτέρω κυτταροκίνες δρουν κατευθείαν και προκαλούν απίσχνανση η δρουν μέσω ρύθμισης του γονιδίου της μυοστατίνης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων και

μελετήθηκε η έκφραση της μυοστατίνης με και χωρίς την δράση κυτταροκινών.

Διαπιστώθηκε, ότι ο TNF-α σε συγκεντρώσεις > 500 ng/ml προκαλεί υπερέκφραση του γονιδίου της μυοστατίνης σε καλλιέργειες ανθρώπινων μυοκυττάρων και επομένως μπορεί να συμμετέχει με αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση του συνδρόμου απίσχνανσης. Δεν μπορεί βέβαια να αποκλεισθεί η δράση του TNF-α μέσω άλλου μηχανισμού.

Οι υπόλοιπες κυτταροκίνες δεν τροποποιούσαν την έκφραση της μυοστατίνης πράγμα που σημαίνει, ότι μάλλον η μυοστατίνη ή άλλοι παράγοντες οδηγούν στην αύξηση του επιπέδου των κυτταροκινών αυτών στο αίμα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

1) Διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου GDF-8 στους MDS ασθενείς με σύνδρομο απίσχνανσης σε σύγκριση με τους MDS ασθενείς χωρίς σύνδρομο απίσχνανσης και τους υγιείς μάρτυρες.

2) Διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα TNFα, TGF-β IL-1, IL-2, IL-6 και λεπτίνης στον ορό της ίδιας ομάδας ασθενών σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες.

3) Υπάρχει ένδειξη ενεργοποίησης του γονιδίου της μυοστατίνης από τον TNF-α ενώ οι άλλες κυτταροκίνες είναι παράλληλα αυξημένες αλλά δεν φαίνεται να έχουν κατευθείαν ρυθμιστική δράση στο γονίδιο της μυοστατίνης.

4) Περαιτέρω μελέτη με χρήση ανασταλτών των κυτταροκινών αυτών θα επιβεβαιώσει την υπόθεση αυτή.

SUMMARY

Myostatin is the main negative regulator of skeletal muscle growth.

Mutations of the myostatin gene lead to higher growth of muscle mass in animals and in humans.

The wasting syndrome is characterized by loss of muscle mass and adipose tissue and accompanies many chronic and serious diseases. Many efforts have been made to improve this syndrome and consequently the quality of life of the patients who suffer from it.

The relation between myostatin and wasting syndrome is not well documented. Myostatin inhibitors have been used in sports doping and in treating muscular dystrophies.

AIM : The aim of our study is to investigate the relationship between the myostatin and wasting syndrome, that some MDS patients exhibit, in an effort to contribute to treatment of this syndrome.

MATERIALS: We used 98 individuals. Eighty-one(51 males and 30 females), suffered from MDS (median age 71, range 33-85), and 17 were age and sex matched healthy controls. Forty-nine were categorized as RA, 6 as RARS, 12 as RAEB, 9 as RAEB-T and 5 as CMML according to FAB criteria. All gave informed consent.

METHODS: We obtained muscle tissue through biopsy of the left arm muscle. RNA was extracted using the classic method of phenol-chlorophorm. The cDNA was quantified by RT-PCR and Real time PCR. Actin gene was used as reference gene. The results were expressed as percentage of the OD of 146bp (myostatin) band to 290bp (actin) band.

Mutation analysis on the myostatin gene was performed by direct sequencing of the exons on an ABI sequencer.

To investigate the correlation between the cytokines and the levels of myostatin we measured the serum levels of TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, TGF- β and leptin with ELISA (kit R&D, BIOVENTOR).

In order to investigate the role of cytokines in the regulation of the myostatin gene we used cultures of muscle cells which grew under the influence of varying quantities of cytokines and thus we determined myostatin RNA per μ g of whole muscle RNA.

RESULTS:

The ratio of myostatin / β -actin cDNA in MDS patients with wasting syndrome was 2.052 ± 0.479 , in MDS patients without wasting syndrome was 0.474 ± 0.178 and in healthy people it was 0.555 ± 0.151 . There was statistically significant difference between the first 2 groups ($p_1=0.00023$) and between first and last group ($p_2=5.9 \times 10^{-5}$). There was no difference between MDS patients without wasting syndrome and healthy controls ($p_3=0.55$). The expression of myostatin was higher in patients with RA, RAEB, RAEB-T in comparison to CMML, RARS and healthy. In CMML patients the myostatin expression was $25\% \pm 18\%$ of the β -actin expression, in RARS $56\% \pm 35\%$, in RA $127\% \pm 50\%$, in RAEB $250\% \pm 30\%$, in RAEB-T $104\% \pm 25\%$, and in healthy individuals $59\% \pm 18\%$.

The mean value of RNA copies obtained with Real Time PCR in MDS patients with wasting syndrome was 46997.45 ± 8934.09 , in MDS patients without wasting syndrome was 10702.97 ± 3885.59 , and in healthy controls was 12657.12 ± 3231.873 . Patients with wasting syndrome had significantly higher copies of myostatin RNA compared to the patients without wasting syndrome ($p_1=0.00102$) and healthy individuals ($p_2=0.000512$). Patients without wasting syndrome did not differ statistically from healthy controls ($p_3=0.52$).

We did not find mutations or polymorphisms in the myostatin gene in any of our samples. That means that the myostatin gene is quite well protected. The fact that we did not find mutations means that the different expression is due to the different regulation of the gene.

We measured the levels of some cytokines in the serum of the patients and controls in order to correlate these levels to the myostatin expression. TNF- α level in MDS patients with wasting syndrome was 719.88 ± 126.22 ($\bar{x} \pm SD$), in MDS patients without wasting syndrome was 394.52 ± 60.93 ($p_1=0.0047$) and in healthy controls was 249.84 ± 64.95 ($p_2=0.0191$). IL-1 in MDS patients with wasting syndrome was 3713 ± 892.50 ($\bar{x} \pm SD$), in MDS patients without wasting syndrome was 1965.5 ± 314.20 ($p_1=0.000114$) and in healthy controls was 827.23 ± 125.27 , ($p_2=1.7546 \times 10^{-8}$).

H IL-6 in MDS patients with wasting syndrome was 773.96 ± 124.11 ($\bar{x} \pm SD$), in MDS patients without wasting syndrome was 478.12 ± 64.44 ($p_1=0.0103$) and in healthy controls was 271 ± 66 ($p_2=0.0267$).

TGF- β in MDS patients with wasting syndrome was 928.64 ± 107.52 in MDS patients without wasting syndrome was 343.18 ± 139.06 ($p_1=0.2374$) and in healthy controls was 75 ± 25.70 ($p_2=1.09182 \times 10^{-5}$).

IL-2 in MDS patients with wasting syndrome was 2725.03 ± 406.28 ($\bar{x} \pm SD$), in MDS patients without wasting syndrome was 1477 ± 247.42 ($p_1=0.0478$) and in healthy controls was 534.53 ± 75.39 ($p_2=4.48915 \times 10^{-7}$).

Myostatin in MDS patients with wasting syndrome was 14.68 ± 2.24 ($\bar{x} \pm SD$), in MDS patients without wasting syndrome was 3.70 ± 0.95 ($p_1=0.00117$) and in healthy controls was 4.76 ± 1.25 ($p_2=0.0373$).

Leptin in MDS patients with wasting syndrome was 53.83 ± 23.16 ($\bar{x} \pm SD$), in MDS patients without wasting syndrome was 9.22 ± 3.26 ($p_1=3.378 \times 10^{-10}$) and in healthy controls was 6.83 ± 3.28 ($p_2=1.97 \cdot 10^{-8}$).

In order to investigate if these cytokines act directly and cause wasting syndrome or act through the regulation of the myostatin gene, we used cultures of human muscle cells and we studied the myostatin expression with or without the action of the cytokines. We found that TNF- α in concentrations >500 ng/ml causes overexpression of the myostatin gene in cultures of human muscle cells and therefore it can participate through this pathway in the appearance of the wasting syndrome. We can't of course exclude the action of TNF- α through another mechanism.

The other cytokines did not change the myostatin expression, which means that rather myostatin or other factors lead to the increase of the level of these cytokines in blood.

CONCLUSIONS

1) We found increased expression of GDF-8 gene in MDS patients with wasting syndrome compared to MDS patients without wasting syndrome and healthy controls.

2) We found increased levels of TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-2, IL-6 and leptin in the serum of the same group of patients in comparison to the other groups.

3) There is indication of activation of the myostatin gene from the TNF- α , while the other cytokines are equally increased but they don't seem to have a direct regulatory action on the myostatin gene.

4) Further study with the use of inhibitors of these cytokines will confirm this hypothesis.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Crim MC, Munro H.: Proteins and amino acids. Modern Nutrition in Health and Disease. (1994);1-30
- 2) 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., :Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. Science(2002);296:1486-1488.
- 3) Roubenoff, R., Heymsfield, SB., Kehayias, JJ., Cannon, JG., Rosenberg, IH. :Standardization of nomenclature of body composition in weight loss. Am J Clin Nutr. (1997);66(1):192-6.
- 4) Bullough WS. :The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc(1962);37:307-42.
- 5) Bullough WS. :Mitotic and functional homeostasis: a speculative review. Cancer Res.(1965);25:1683-727.
- 6) Lee, S-J. :Regulation of muscle mass by myostatin. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.(2004);20:61-86.
- 7) Mc Pherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. :Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. Nature (1997);387:83-90.
- 8) McPherron AC, Lee SJ. :Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. J. Clin Invest (2002);109:595-601.
- 9) F.S, Walsh and A.J. Celeste :Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. Biochem Soc Trans(2005);33(6):1513-1517.

- 10) Gaussin, V., Depre, C. :Myostatin, the cardiac chalone of insulin-like growth factor-1. *Cardiovasc. Res.*(2005); 68:347-349.
- 11) Shyu, KG., Ko, WH., Yang, WS., Wang, BW., Kuan, P. :Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* (2005);68:405-14.
- 12) Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J., and Bass, J.J.:Myostatin,a transforming growth factor- superfamily member,is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell. Physiol.*(1999);180:1-9.
- 13) Gonzalez-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.,and Bhasin S. :Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*(1998);95: 14938-14943.
- 14) Ferrel R.E., Conte V., Lawrence E.C., Roth S.M., Hagberg J.M. and Hurley B.F.: Frequent Sequence Variation in the Human Myostatin (GDF8) gene as a Marker for Analysis of Muscle-Related Phenotypes. *Genomics* (1999);62:203-207.
- 15) Olson, E.N. MyoD family : A paradigm for development *Genes Dev.*(1990);4:1454-1461.
- 16) Weintraub, H. Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, S., Hollenberg, S., Zhuang, Y., and Lassar, A. :The MyoD gene family: Nodal point during specification of the muscle sell lineage. *Science* (1991);251:761-766.
- 17) Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayler, M.J., Cheng, P.F., Weintraub, H., and Lassar, A.B. :MyoD1: A nuclear phosphoprotein requiring a myc

homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* (1988);242:405-411.

18) Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N., Bhasin, S. :Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.*(2001);281:E1128-E1136.

19) Lee, S-J., McPherron, AC. :Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1999);9:604-607.

20) Grobet, L., Pirottin, D., Farnir, F., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Christians, E., Desmecht, D., Coignoul, F., Kahn, R., Georges, M. :Modulating Skeletal Muscle Mass by Postnatal, Muscle-Specific Inactivation of the Myostatin Gene. *Genesis*(2003);35:227-238.

21) Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R. :Myostatin a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. *J. Biol Chem*(2000); 275(51):40235-40243.

22) Langley, B., Thomas, M., McFarlane, C., Gilmour, S., Sharma M., Kambadur, R. :Myostatin inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation through an Rb-independent pathway. *Oncogene* (2004)23:524-534.

23) Ji, S., Losinski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.R., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F.S., and Spurlock, M.E.: Myostatin expression in porcine tissues: Tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol* (1998);275:R1265-1273.

24) Artaza, J.N., Bhasin, S., Mallidis, C., Taylor, W., Ma, K., Gonzalez-Cadavid, N.F. :Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells. *J.Cell. Physiol.*(2002);190:170-179.

- 25) Kim HS., Liang L., Dean RG., Hausman DB., Hartzell DL., Baile CA. :Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun*(2001);281(4):902-906.
- 26) Wang EA., Israel DI., Kelly S., and Luxenberg DP. :Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth factors*(1993);9:57-71.
- 27) Rios R., Carneiro I., Arce VM and Devesa J. :Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* (2002); 282: C993-C999.
- 28) Sharma, M., Langley, B., Bass, J., Kambadur, R. :Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc. Sport Sci. Rev.*(2001);29,(4):155-158.
- 29) Nicholas, G., Thomas, M., Langley, B., Somers, W., Patel, K., Kemp, C.F., Sharma, M., Kambadur, R. :Titin-Cap Associates With, and Regulates Secretion of Myostatin. *J.Cell. Physiol.*(2002);193:120-131.
- 30) Grobet, L., Martin, L.J.R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., and Georges, M.: A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscléd phenotype in cattle. *Nat. Genet.*(1997);17:71-74
- 31) Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Menissier, F., Zanotti, M., Dunner, S., and Georges, M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome*(1998);9:210-213.
- 32) Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P.L., and Bass, J.J. : Mutations in myostatin (GDF8) in double muscléd Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.*(1997);7:910-916.

- 33) McPherron, A.C., and Lee, S. J. : Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1997);94: 12457-12461.
- 34) McPherron, A.C., & Lee, S.-J. (1996) in *Growth Factors and Cytokines in Health and Disease*, eds. LeRoith, D. & Bondy, C. (JAI, Greenwich, CT), Vol. 1B, pp. 357-393.
- 35) Culley, G. (1807). : *Observations on Livestock*, Woodfall, London.
- 36) Shahin, K.A., and Berg, R.T. :Growth patterns of muscle, fat, and bone, and carcass composition of double muscled and normal cattle. *Can. J. Anim. Sci.*(1985); 65:279-293.
- 37) Szabo, G., Dallmann, G., Muller, G., Patthy, L., Soller, M., and Varga, L.:A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome* (1998); 9:671-672.
- 38) Wang, H., Zhang, Q., Zhu, D. :hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochem Biophys Res Commun.*(2003);311:877-883.
- 39) Wise RJ, Barr PJ, Wong PA, Kiefer MC, Brake AJ, Kaufman RJ. :Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1990);87:9378-82.
- 40) Elizabeth M. McNally.:Powerful Genes-Myostatin Regulation of human Muscle Mass. *N. Engl J Med*(2004);350(26):2642-2644.
- 41) Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR. :Crystal structure of transforming growth factor- β 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*(1992);257:369-73.

- 42) Schlunegger MP, Grutter MG. :An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2.Å resolution of human transforming growth factor-β2. Nature(1992);358:430-34.
- 43) Griffith DL, Keck PC, Sampath Tk, Rueger DC, Carlson WD. :Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1996);93:878-83.
- 44) Hinck AP, Archer SJ, Qian SW, Roberts AB, Sporn Mb, et al. : Transforming growth factor β1: three-dimensional structure in solution and comparison with the x-ray structure of transforming growth factor β2. Biochemistry(1996);35:8517-34.
- 45) Mittl PR, Priestle JP, Cox DA, McMaster G, Cerletti N, Grutter MG. :The crystal structure of TGF-β3 and comparison to TGF-β2: implications for receptor binding. Protein Sci.(1996);5:1261-71.
- 46) Eigenbrot C, Gerber N. :X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9. Å resolution and implications for receptor binding. Nat. Struct. Biol.(1997);4:435-38.
- 47) Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M.: Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7. Å resolution. J. Mol. Biol.(1999);287:103-15.
- 48) Kirsch T, Sebald W, Dreyer MK. :Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. Nat. Struct. Biol.(2000);7:492-96.
- 49) Thompson TB, Woodruff TK, Jardetzky TS.: Structures of an ActRIIB: activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-β ligand: receptor interactions. EMBO J.(2003);22:1555-66.
- 50) Lee, S.-J., and McPherron, A.C. :Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2001);98:9306-9311.

- 51) Thies RS, Chen T, Davie MV, Tomkinson Kn, Pearson AA, et al. :GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors*(2001);18:251-59.
- 52) Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, et al.: Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(2003);100:15842-46.
- 53) Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, et al. :The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* (2002);277:40735-41.
- 54) Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M., Wolfman, N.M. :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.*(2003);17:1144-1154.
- 55) Massagué J. :TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*(1998);67:753-91.
- 56) Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana J, Celeste AJ, Attisano L. :Myostatin signals through a transforming growth factor β -like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.*(2003); 23:7230-42.
- 57) Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., and Kambadur R. :Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol Chem* (2002);277:49831-49840.
- 58) Tsuchida K. :Activins, myostatin and related TGF- β family members as novel therapeutic targets for endocrine, metabolic and immune disorders. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.*(2004);4:157-166.

- 59) Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, et al. :The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev.*(1999);13:2196-206.
- 60) Stroschein S, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K.: Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science*(1999);286:771-74.
- 61) Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lane WS, Lodish HF, Weinberg RA. :Interaction of the Ski oncoprotein with Smad 3 regulates TGF- β signaling. *Mol. Cell*(1999a)4:499-509.
- 62) Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA. :SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor β signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1999b);96:12442-47.
- 63) Akiyoshi S, Inoue H, Hanai J, Kysanagi K, Nemoto N, et al. :c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with smads. *J. Biol. Chem.*(1999); 274:35269-77.
- 64) Sutrave P, Kelly AM, Hughes SH. :ski can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice. *Genes Dev.*(1990);4:1462-72.
- 65) Berk M, Desai S, Heyman HC, Colmenares C. :Mice lacking the ski proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial patterning, and skeletal muscle development. *Genes Dev.*(1997);11:2029-39.
- 66) Li, C.-Y., Suardet, L., and Little, J.B. :Potential role of WAF1/Cip1/p21 as a mediator of TGF-beta cytoinhibitory effect. *J. Biol. Chem.*(1995); 270(10):4971-4974.
- 67) Saltis, J. :TGF-beta: receptors and cell cycle arrest. *Mol. Cell. Endocrinol.*(1996);116:227-232.

- 68) Lam, E.W., and La Thangue, N.B. :DP and E2F proteins: coordinating transcription with cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol.*(1994);6:859-866.
- 69) La Thangue, N.B. :E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control. *Biochem. Soc. Trans.*(1996);24:54-59.
- 70) Sherr, C.J. :G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* (1994);79:551-555.
- 71) Zhang, H., Hannon, G.J., and Beach, D. :p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* (1994);8:1750-1758.
- 72) Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F., and Reed, S.I. :Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol. Cell. Biol.*(1998);18:546-557.
- 73) Niculescu, A.B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I. :Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol. Cell. Biol.* (1998);18:629-643.
- 74) Ríos, R., Fernández-Nocelos, S., Carneiro, I., Arce, V.M., Devesa, J. :Differential response to exogenous and endogenous myostatin in myoblasts suggests that myostatin acts as an autocrine factor in vivo. *Endocrinology*(2004);145(6):2795-2803
- 75) W. Huygens, M.A. Thomis, M.W. Peeters, J. Aerssens, R. Janssen, R.F. Vlietinck and G. Beunen. :Linkage of myostatin pathway genes with Knee strength in humans. *Physiol. Genomics* (2004);17:264-270.

- 76) Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, et al. :Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C₂C₁₂ muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*(2001);280:E221-28.
- 77) Lin J., Arnold HB, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA. :Myostatin Knock-out in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*(2002);291:701-6.
- 78) Wagner K.R. :Muscle regeneration through myostatin inhibition. *Curr opin Rheumatol.*(2005);17:720-724.
- 79) Amthor H, Huang R, Mc Kinnell I, Christ B, Kambadur R, et al. :The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryo-genesis. *Dev. Biol.*(2002b);251:241-57.
- 80) Bischoff, R., 1994. : The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel, A.G., Franzini-Armstrong, C. (Eds). *Myology, Basic and Clinical*. Mc Graw-Hill, New York, pp. 97-118.
- 81) Campion D. :The muscle satellite cell: a review. *Int. Rev. Cytol.*(1984);87:225-51.
- 82) Schultz E, Mc Cormick KM. :Skeletal muscle satellite cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*(1994);123:213-57.
- 83) McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. :Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell. Biol.*(2003);162:1135-47.
- 84) Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G. :Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res.*(2003); 286:263-75.

- 85) Wagner KR, Liu X, Chang X, et al. :Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proc Natl Acad Sci USA*(2005); 102:2519-2524.
- 86) Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J.F., and Lee, S-J.,. :Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *N. Engl. J. Med.* (2004);350:2682-8.
- 87) Listrat A, Picard B, Geay Y. :Age-related changes and location of type I, III, IV, V and VI collagens during development of four foetal skeletal muscles of double-muscled and normal bovine animals. *Tissue Cell*(1999);31:17-27.
- 88) Wagner KR, Mc Pherron AC, Winik N, Lee S-J. :Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann. Neurol.*(2002);52:832-36
- 89) Artaza JN, Bhasin S, Magee TR, et al. :Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology*(2005);146:3547-3557.
- 90) Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. :Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*(2001);280:561-66.
- 91) Molkenkin JD., Olson EN. :Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*(1996); 6:445-453.
- 92) Rawls D., Olson EN. :MyoD meets its maker. *Cell*(1997);89:5-8.
- 93) Wang J., Walsh K. :Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science*(1996);273:351-354.

- 94) Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., Arnold, H.H. :A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.*(1989);8, 701-709.
- 95) Edmondson, D.G., Olson, E.N. :A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.*(1989);3,628-640.
- 96) Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B., Miller, A.D. :Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1989);86:5434-5438.
- 97) Miner, J.H., Wold, B. :Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*(1990); 87:1089-1093.
- 98) Hanset, R., Michaux, C.:On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. I. Experimental data. *Genet. Sel. Evol.*(1985);17:359-368.
- 99) Ansay, M. & Hanset, R. (1979) *Livest. Prod. Sci.* 6,5-13.
- 100) Hanset, R (1991) in *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals* ,ed. Owen, J.B. (CAB International, Wallingford, U.K.), pp. 467-478.
- 101) Hanset, R., Michaux, C., Dessy-Doize, C. & Burtonboy, G. (1982) in *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef production*, eds. King, J.W.B. & Ménéssier, F. (Nijhoff, The Hague, The Netherlands), pp. 341-349.
- 102) Carlson CJ, Booth FW, and Gordon SE. :Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases

during hindlimb unloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (1999);277:R601-R606.

103) Wehling M., Cai B., and Tidball JG. :Modulation of Myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J* (2000);14:103-110.

104) Girgenrath, S., Song, K., Whittemore, L-A. :Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow-and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve*(2005);31:34-40.

105) Welle, S., Bhatt, K., Thornton, C.A.,. :High-abundance mRNAs in human muscle: comparison between young and old. *J.Appl. Physiol.*(2000);89:297-304.

106) Welle S, Bhatt K, Shah B, Thornton C,. :Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men. *Exp Gerontol*(2002);37:833-839.

107) Yarasheski, K.E., Bhasin, S., Sinha-HiKim, I., Pak-Loduca, J., Gonzalez-Cadavid, N.F., 1999. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased with muscle wasting and advanced age. *Abstr. 81st Ann. Meet. Endocr. Soc.*, 74.

108) Mallidis, C., Bhasin, S., Matsumoto, K., Shen, R., Gonzalez-Cadavid, N.F., 1999. Skeletal muscle myostatin in a rat model of aging-associated sarcopenia. *Abstr. 81st Ann. Meet. Endocr. Soc.*, 73.

109) Dagher R and Helman L. :Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist*(1999);4:34-44.

110) Merlino G and Helman LJ. :Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene*(1999);18:5340-5348.

- 111) Chen, C.; Grzegorzewski, K.J.; Barash, S.; Zhao, Q.; Schneider, H.; Wang, Q.; Singh, M.; Pukac, L.; Bell, A.C.; Duan, R.; Coleman, T.; Duttaroy, A.; Cheng, S.; Hirsch, J.; Zhang, L.; Lazard, Y.; Fischer, C.; Barber, M.C.; Ma, Z.D.; Zhang, Y.Q.; Reavey, P.; Zhong, L.; Teng, B.; Sanyal, I.; Ruben, S.M.; Blondel, O. and Birse, C.E.
:An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat.Biotechnol.*(2003);21(3):294-301.
- 112) Jackman, R.W., Kandarian, S.C. :The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*(2004);287:C834-C843.
- 113) McMahon, C.D., Popovic, L., Jeanplong, F., Oldham, J.M., Kirk, S.P., Osepchook, C.C., Wong, K.W.Y., Sharma, M., Kambadur, R., Bass, J.J. :Sexual dimorphism is associated with decreased expression of processed myostatin in males. *Am J Physiol Endocrinol Metab*;(2003); 284: E377-E381.
- 114) Siriatt, V., Nicholas, G., Berry, C., Watson, T., Hennebry, A., Thomas, M., Ling, N., Sharma, M., Kambadur, R. :Myostatin Negatively Regulates the Expression of the Steroid Receptor Co-Factor ARA70. *J. Cell. Physiol.*(2006); 206:255-263.
- 115) Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., Moore, K.J. :X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*(1984);81,1189-1192.
- 116) Torres, L.F., Duchen, L.W. :The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*(1987);110:269-299.
- 117) Hoffman, E.P., Monaco, A.P., Feener, C.C., Kunkel, L.M. :Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans. *Science*(1987);238:347-350.

118) Hoffman, E.P., Brown, R.H. Jr., Kunkel L.M. :Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*(1987); 51:919-928.

119) Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A., Sloper, J. C. :The mdx mouse skeletal muscle myopathy. I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*(1988);14: 53-70.

120) Bogdanovich S, Krag TOB, Barton ER, Morris LD, Whittemore L-A, et al. :Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*(2002);420:418-21.

121) Wójcik, S., Engel, W.K., McFerrin, J., Askanas, V. :Myostatin is increased and complexes with amyloid- β within sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Acta Neuropathol* (2005) 110:173-177.

122) Reardon, K.A., Davis, J., Kapsa, R.M., Choong, P., Byrne, E. :Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* (2001);24:893-899.

123) Valle G., Faulkner G., De Antoni A., Pacchioni B., Pallavicini A., Pandolfo D., Tiso N., Toppo S., Trevisan S., Lanfranchi G., :Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett*(1997);415:163-168

124) Roth, S.M., Martel, G.F., Ferrell, R.E., Metter, E.J., Hurley, B.F. Rogers M.A. :Myostatin Gene Expression is reduced in Humans with Heavy-Resistance Strength Training: A brief Communication. *Exp.Biol.Med.*(2003);228:706-709.

125) Lalani R, Bhasin S, Byhower F, Tarnuzzer R, Grant M, Shen R, Asa S, Ezzat S, Gonzalez-Cadavid NF. :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*(2000); 167:417-428.

126) Milan, G., Dalla Nora, E., Pilon, C., Pagano, C., Granzotto, M., Manco, M., Mingrone, G., and Vettor. R. :Changes in muscle myostatin expression in obese subjects after weight loss. *J. Clin Endocrinol Metab*(2004);89(6):2724-2727.

127) Kordes, E., Savelyeva, L., Schwab, M., Rommelaere, J., Jauniaux, J.C., Cziepluch, C. : Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in *saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* (1998);52:90-94.

128) Cziepluch, C., Kordes, E., Poirey, R., Grewenig, A., Rommelaere, J., Jauniaux, J.C. :Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. *J. Virol.*(1998);72:4149-4156.

129) Kung T, Springer J, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. Novel treatment approaches to cachexia and sarcopenia: highlights from the 5th Cachexia Conference. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2010;19(4):579-85.

130) Willoughby, D.S. :Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med. Sci. Sports Exerc* (2004); 36(4):574-582.

131) Walker, K.S., Kambadur, R., Sharma, M., Smith, H.K. :Resistance Training Alters Plasma Myostatin but not IGF-1 in Healthy Men. *Med.Sci.Sports Exerc.*(2004);36(5):787-793.

132) Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, et al. :Follistatin complexes Myostatin and antagonizes Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol*(2004);270:19-30.

133) Lee, S-J., Reed, LA., Davies, MV., Girgenrath, S., Goad, MEP., Tomkinson, KN., Wright, JF., Barker, C., Ehrmantraut, G., Holmstrom, J., Trowell, B., Gertz, B., Jiang, M-S., Sebald, SM., Matzuk, M., Li, E., Liang, L-f., Quattlebaum, E., Stotish, RL., Wolfman NM. :Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. PNAS(2005);102(50):18117-18122.

134) Liu, W., Thomas, SG., Asa, SL., Gonzalez-Cadavid, N., Bhasin, S., Ezzat, S. :Myostatin is a Skeletal Muscle Target of Growth Hormone Anabolic Action. J. Clin. Endocrinol. Metab.(2003); 88(11):5490-5496.

135) Miura, T., Kishioka, Y., Wakamatsu, J., Hattori, A., Hennebry, A., Berry, C.J., Sharma, M., Kambadur, R., Nishimura, T. :Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.(2006);340:675-680.

136) Willoughby, D.S. :Effects of an Alleged Myostatin-Binding Supplement and Heavy Resistance Training on Serum Myostatin, Muscle Strength and Mass, and Body Composition. Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab(2004):14:461-472.

137) Kim, J.S., Cross, J.M., Bamman, M.M. :Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. Am J Physiol Endocrinol Metab(2005);288: E1110-E1119.

138) Lang, C.H., Silvis, C., Nystrom, G., Frost, R.A. :Regulation of myostatin by glucocorticoids after thermal injury. FASEB J(2001);15:1807-1809.

139) Wilkes J.J, Lloyd D.J, Gekakis N. :Loss- of- function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor alpha production and protects liver against obesity - induced insulin resistance. Diabetes. (2009);58(5):1133-43.

140) Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. :The TNF and TNF receptor superfamilies :integrating mammalian biology. *Cell*. (2001) 23;104(4):487-501.

141) Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughon K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G. :A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*. (2004);6(2):97-105.

142) van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF. :Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*. (1997);176(2):439-44.

143) Dinarello CA. :The interleukin-1 family :10 years of discovery. *FASEB J*. (1994);8(15):1314-25.

144) Huising MO, Stet RJ, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade BM. :The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Dev Comp Immunol*. (2004) 3;28(5):395-413.

145) Sims JE, Nicklin MJ, Bazan JF, Barton JL, Busfield SJ, Ford JE, Kastelein RA, Kumar S, Lin H, Mulero JJ, Pan J, Pan Y, Smith DE, Young PR. :A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends Immunol*.(2001);22(10):536-7.

146) Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, O'Neill LA. :Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends Immunol*. (2001);22(10):533-6.

147) HGNC Home Page

148) Morgan MM, Clayton CC, Heinricher MM.: Dissociation of hyperalgesia from fever following intracerebroventricular administration of interleukin-1beta in the rat. *Brain Res.* (2004)1;1022(1-2):96-100.

149) Gordon, J., Maclean, LD. :A Lymphocyte-stimulating Factor produced in vitro. *Nature* (1965);208(5012):795–796.

150) Kasakura, S., Lowenstein, L. :A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leukocyte cultures. *Nature*(1965);208(5012):794–795.

151) Cantrell, DA., Smith, KA. :The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* (1984);224(4655): 1312–6.

152) Smith, KA. :Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* (1988);240(4856): 1169–76.

153) Brennan, AM., Mantzoros, CS. :Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*(2006);2(6): 318–27.

154) Zhang, F., Basinski, MB., Beals, JM., Briggs, S.L., Churgay, LM., Clawson, DK., Dimarchi, RD., Furman, T C., Hale, J.E., Hsiung, HM., Schoner, BE., Smith, DP., Zhang, XY., Wery, J-P., Schevitz, RW. :Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*(1997);387 (6629): 206–9.

155) Hill JJ, Tremblay TL, Cantin C, O' Connor-McCourt M, Kelly JF, Lenferink AE. : Glycoproteomic analysis of two mouse mammary cell lines during transforming growth factor (TGF)-beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Proteome Sci.*(2009)8; 7: 2.

156) Forbes, D., Jackman, M., Bishop, A., Thomas, M., Kambadur, R., Sharma, M. :Myostatin Auto-Regulates its Expression by Feedback Loop Through Smad 7 Dependent Mechanism. *J.Cell.Physiol.*(2006);206:264-272.

157) Dunn SE & Michel RN. :Differential sensitivity of myosin-heavy-chain-typed fibers to distinct aggregates of nerve-mediated activation. *Pflugers Arch*(1999);437:432-440.

158) Michel, R.N., Shannon E. Dunn, S.E., Chin, E.R. :Calcineurin and skeletal muscle growth. *Proc.Nutr. Soc.* (2004);63:341-349.

159) Huet, C., Li, Z-F., Liu, H-Z., Black, R.A., Galliano, M-F., Engvall, E. :Skeletal muscle cell hypertrophy induced by inhibitors of metalloproteases; myostatin as a potential mediator. *Am J Physiol Cell Physiol*(2001);281:C1624-C1634.

160) Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J., Salehian, B. :Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*(2003);285:E363-E371.

161) McFarlane, C., Langley, B., Thomas, M., Hennebry, A., Plummer, E., Nicholas, G., McMahon, C., Sharma, M., Kambadur,R. :Proteolytic processing of myostatin is auto-regulated during myogenesis. *Dev. Biol.*(2005);283:58-69.

162) Ménissier, F. (1982) in *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production*, eds. King J.W.B. & Ménissier, F. (Nijhoff, The Hague, The Netherlands) pp.23-53.

163) Hanset, R., Michaux, C & Stasse, A. *Genet. Sel. Evol.*(1987); 19:225-248.

- 164) Seibert, M.J., Xue, Q-L., Fried, L.P., Walston, JD. :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*(2001);49:1093-1096.
- 165) Corsi, A.M., Ferrucci, L., Gozzini, A., Tanini, A., Brandi, M.L. :Myostatin Polymorphisms and age-related sarcopenia in the Italian population. *J Am Geriatr Soc*.(2002);50(8):1463
- 166) Čatipović B. :Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a child. *N Engl J Med*(2004);351(10):1030.
- 167) Uhlenberg B, Lucke B, Schulke M. :Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a child. *N Engl J Med* (2004);351(10):1030-31.
- 168) Hepple RT. :Sarcopenia-a critical perspective. *Sci. Aging Knowl Environ*.(2003):pe 31-37.
- 169) Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. :The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*(1989);244:1578-80.
- 170) Tisdale MJ. :Wasting in cancer. *J. Nutr*.(1999);129:243S-246S
- 171) Azzazy, H.M.E., Mansour, M.M.H., Christenson, R.H.,. :Doping in the recombinant era : Strategies and counterstrategies. *Clin. Biochem*.(2005);38:959-965
- 172) Barton-Davis, E.R., Shoturma, D.I., Musaro, A., Rosenthal, N., Sweeney, H.L.,. :Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*(1998);95:15603-15607.

173) Musaro, A., Mc Cullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., Rosenthal, N., :Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.*(2001);27:195-200.

174) Adams, G.R., Haddad, F., :The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.*(1996);81:2509-2516.

175) Vandeburgh, H.H., Karlisch, P., Shansky, J., Feldstein, R., :Insulin and IGF-1 induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. *Am. J. Physiol*(1991);260:C475-C484.

176) Butterfield, G.E., Thompson, J., Rennie, M.J., Marcus, R., Hintz, R.L., Hoffman, A.R., :Effect of rhGH and rhIGF-1 treatment on protein utilization in elderly women. *Am. J. Physiol.*(1997);272:E94-E99.

177) Caroni, P., Scheider, C., Kiefer, M.C., Zapf, J., :Role of muscle insulin-like growth factors in nerve sprouting: suppression of terminal sprouting in paralyzed muscle by IGF-binding protein 4. *J. Cell Biol.* (1994);125:893-902.

178) Coleman, M.E., DeMayo, F.J., Yin, K.C., Lee, H.M., Geske, R., Montgomery, C., Schwartz, R.J., :Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*(1995);270:12109-12116.

179) Whitemore LA, Song K, Xiangping L, et al. :Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun.*(2003);300:965-971.

180) Lezzi S, Di Padova M, Serra C, et al. :Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev Cell*(2004);6:673-684.

- 181) Ricaud, S., Vernus, B., Duclos, M., Bernardi, H., Ritvos, O., Carnac, G., Bonniou, A. :Inhibition of autocrine secretion of myostatin enhances terminal differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *Oncogene* (2003); 22:8221-8232.
- 182) Castro-Cago, M., Blanco-Barca, M.O., Eiris-Puñal, J., Carneiro, I., Arce, V.M., Devesa, J. :Myostatin expression in Muscular Dystrophies and Mitochondrial Encephalomyopathies. *Pediatr Neurol*(2006);34:281-284.
- 183) Morley JE, Thomas DR, Wilson MM.Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr.*(2006);83(4):735-43.
- 184) Moore FD et al. :The body cell mass and its supporting environment. Philadelphia:WB.Saunders;1963.
- 185) Rietschel P, Corcoran C, Stanley T, Basgoz N, Klibanski A, Grinspoon S. Prevalence of hypogonadism among men with weight loss related to human immunodeficiency virus infection who were receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* (2000);31(5):1240-4.
- 186) Liu L, Bopp MM, Roberson PK, Sullivan DH. :Undernutrition and risk of mortality in elderly patients within 1 year of hospital discharge. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*(2002);57(11):M741-6
- 187) Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. :Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand.*(1999);100(1):34-41.
- 188) Larsson H, Elmståhl S, Berglund G, Ahrén B. :Evidence for leptin regulation of food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.*(1998);83(12):4382-5.

189) Glass DJ. :Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* (2010);13(3):225-9.

190) Fulzele S, Arounleut P, Cain M, Herberg S, Hunter M, Wenger K, Hamrick MW. :Role of myostatin (GDF-8) signaling in the human anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* (2010)22. [Epub ahead of print]

191) Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE. :Myostatin Decreases with Aerobic Exercise and Associates with Insulin Resistance. *Med Sci Sports Exerc.* (2010);8. [Epub ahead of print]

192) Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Sargent M, York A, Welle S, Molkentin JD. :Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation.*(2010) 26;121(3):419-25.

193) Elkasrawy MN, Hamrick MW. :Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* (2010);10(1):56-63.

194) Mozzetta C, Minetti G, Puri PL. :Regenerative pharmacology in the treatment of genetic diseases: the paradigm of muscular dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* (2009);41(4):701-10.

195) Marcondes AM, Ramakrishnan A, Deeg HJ.: Myeloid Malignancies and the Marrow Microenvironment: Some Recent Studies in Patients with MDS. *Curr Cancer Ther Rev.* (2009)1;5(4):310-314.

196) Powers MP, Nishino H, Luo Y, Raza A, Vanguri A, Rice L, Zu Y, Chang CC. : Polymorphisms in TGFbeta and TNFalpha are associated with the myelodysplastic syndrome phenotype. *Arch Pathol Lab Med.* (2007); 131(12): 1789-93.

197) Aladzsity I, Kovács M, Semsei A, Falus A, Szilágyi A, Karádi I, Varga G, Füst G, Várkonyi J. : Comparative analysis of IL6 promoter

and receptor polymorphisms in myelodysplasia and multiple myeloma.
Leuk Res. (2009);33(11):1570-3.

