

URAVNAVANJE OD UBIKVITIN-PROTEASOM ODVISNEGA SISTEMA RAZKROJA BELJAKOVIN V POSKUSNIH MODELIH MIŠIČNE ATROFIJE*

Matjaž ČERVEK^{a)}, Didier ATTAIX^{b)} in Jasna M. A. STEKAR^{c)}

^{a)} Sedanji naslov: RCP Emona, Kavčičeva 72, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, mag.

^{b)} INRA, Laboratorij za presnovo dušika, Center Clermont-Ferrand-Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, Francija, vodja raziskovalne skupine, dr.

^{c)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof., dr.

Delo je prispelo 1999-10-29, sprejeto 1999-11-10.

Received October 29, 1999, accepted November 10, 1999.

IZVLEČEK

Vedno več je dokazov, da ima od ATP-ubikvitina odvisni proteolitični sistem ključno vlogo pri razkroju beljakovin skeletnega mišičja. V različnih poskusnih modelih mišične atrofije poskušajo raziskovalci ugotoviti, kateri dejavniki in vplivi uravnavajo od ATP-ubikvitina odvisni razkroj beljakovin v skeletnih mišicah. Glede na dejavnike bi jih lahko v grobem razdelili na modele z vplivi prehrane (stradanje, beljakovinsko pomanjkljiva prehrana), z vplivi nerabe mišic (denervacija, breztežnost), z vplivi bolezenskih stanj (sepsa, acidoza, diabetes, opekline, kaheksija), z vplivi hormonov (inzulin, IGF-1, glukokortikoidi) in z vplivi citokinov (tumor nekrozni faktor- α , interleukin-1, interleukin-6).

Ključne besede: beljakovine / razkroj beljakovin / proteasom / ubikvitin / poskusni modeli / skeletno mišičje

REGULATION OF UBIQUITIN-PROTEASOME-DEPENDENT PROTEIN BREAKDOWN IN EXPERIMENTAL MODELS IN MUSCLE ATROPHY†

ABSTRACT

There is more and more evidence that ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system has a key role in muscle protein breakdown. In different experimental models in muscle atrophy we try to define factors involved in regulation of ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. If we use a simplified division, we can talk about experimental models in which we use regulation by nutrients (fasting, protein inadequate diet), by disuse of muscle (denervation, weightlessness), by pathological conditions (sepsis, acidosis, diabetes, burn injury, cachexia), by hormones (insulin, IGF-1, glucocorticoids) and by cytokines (tumor necrosis factor- α , interleukin-1, interleukin-6)

Key words: proteins / protein breakdown / proteasom / ubiquitin / experimental models / skeletal muscle

UVOD

Izgubljanje mišične mase ali mišična atrofija je posledica porušenega ravnotežja med sintezo in razkrojem beljakovin v dobro slednjega. Skeletno mišičje je največji zbiralnik beljakovin v telesu, povečan razkroj beljakovin v telesu pa oskrbuje organizem s prostimi aminokislinami za

* Prispevek je del magistrskega dela (zagovor 17. 12. 1996), mentorica prof. dr. Jasna M. A. Stekar, somentor dr. D. Attaix.

† The paper is a part of master of science thesis (justification 17. 12. 1996), supervisor Prof. Jasna M. A. Stekar, Ph.D., co-advisor D. Attaix, Ph.D.

sintezo novih beljakovin, povečano glukoneogenezo in neposredno oksidacijo. Mehanizmi in dejavniki, ki vplivajo na razkroj mišičnih beljakovin, še niso popolnoma razjasnjeni. Vedno več je novih ugotovitev o od ATP-ubikvitin odvisnemu mehanizmu razkroja beljakovin. Ta ima osrednjo vlogo pri razkroju aktina in miozina v prečno progastih mišičnih vlaknih. V poskusnih modelih mišične atrofije na živalih poskušajo razvozlati njegovo delovanje in nanj tudi aktivno vplivati. Seveda pa je cilj in želja raziskovalcev odkriti ali, mehanizmi razkroja beljakovin, ki so jih proučevali na živalskih modelih, veljajo tudi pri človeku.

URAVNAVANJE S HRANILI

Kratkotrajno stradanje povzroči uporabo mišičnih beljakovin. Zmanjša se sinteza beljakovin, obenem pa poveča razkroj miofibrilarnih in nemiofibrilarnih beljakovin (Li in Goldberg, 1976, Lowell in sod., 1986). Predvidevamo, da je povečan razkroj nemiofibrilarnih beljakovin posledica povečane aktivnosti lizosomalnega proteolitičnega sistema (Lowell in sod., 1986, Wing in Goldberg, 1993). Malo razpoložljivih aminokislin in nizka raven inzulina vplivata na povečan razkroj beljakovin. Tako inzulin, kot proste aminokisliline zavirajo nastanek avtofagičnih vakuol v jetrih (Mortimore in sod., 1992) in razkroj beljakovin v skeletnem mišičju (Kettelhut in sod., 1988). Vendar pa Lowell in sod. (1986) poročajo, da tako izrazito povečanje razkroja miofibrilarnih beljakovin zadnje četrti stradanih podgan ni posledica lizosomalnega ali od Ca^{2+} odvisnega proteolitičnega sistema. V teh poskusih, kjer so zavrli lizosomalno zakisanje (chloroquine, NH_4Cl) ali avtofagično pot (inzulin, aminokisliline) in hkrati zavrli delovanje katepsinov B, H in L ter kalpainov (levpeptin), niso zmanjšali izločanja 3-metilhistadina. Prve dokaze, da se v skeletnih mišicah med stradanjem aktivira od ATP-ubikvitina odvisni proteolitični sistem, so posredovali Medina in sod. (1991). Z uporabo inhibitorjev lizosomalnega in od Ca^{2+} odvisnega proteolitičnega sistema v teh poskusih, proteolize niso zavrli. Po drugi strani pa so s praznjenjem zaloga celičnega ATP inkubiranih mišic skorajda popolnoma zavrli proteolizo kot posledico stradanja (Medina in sod., 1991, Medina in sod., 1992, Wing in Goldberg, 1993). Porast od ATP-odvisne proteolize med stradanjem je povezan s porastom ravni mRNK za ubikvitin (Medina in sod., 1991, Wing in Goldberg, 1993, Medina in sod., 1995) in 14-kDa E_2 , ki posreduje pri nastajanju ubikvitin-proteinskih skupkov (Wing in Banville 1994), kopičenju ubikvitiniranih beljakovin (Wing in sod., 1995) in okrepi ekspresijo podenot proteasoma 20S (Medina in sod. 1995). Po ponovnem krmljenju so se skupna in od ATP odvisna proteoliza, raven ubikvitinsko beljakovinskih skupkov in prisotnost ubikvitina (Medina in sod., 1995), 14-kDa E_2 (Wing in Banville, 1994) ter podenot proteasoma (Medina in sod., 1995) vrnile v meje normale.

Prav tako je bila povečana od ATP-ubikvitin odvisna proteoliza v topnih izvlečkih, dobljenih iz skeletnih mišic stradanih kuncev (Medina in sod., 1992). Ilian in Forsberg (1992) sta poročala, da se je pod podobnimi pogoji povečala količina mRNK za C2 20S podenoto proteasoma. Zanimivo je, da se med stradanjem ni povečala količina omenjene mRNK v množici drugih tkiv, tudi v srcu, jetrih, ledvicah in maščobnem tkivu, iz česar sklepamo, da je ta prilagoditev lastna progastim mišicam (Medina in sod., 1995). Zanimivo je, da je Samuelsova s sod. (1996) poročala o povečanju količine mRNK za ubikvitin, 14-kDa E_2 in 20S podenoto proteasoma v tankem črevesu podgan, ki so jih stradali. Serozna plast tankega črevesa vsebuje miofibrilarne beljakovine, ki se črpajo med stradanjem, kar nas napeljuje na misel, da povečanje količine te mRNK v tankem črevesu izvira od tod.

Tako razkroj kot tudi sinteza beljakovin sta se zmanjšali pri mladih živalih, krmljenih z neustreznim obrokom (Tawa in Goldberg, 1993). Za razliko od stradanja te spremembe v presnovi beljakovin niso prizadele mišične mase in vsebnosti beljakovin. Tawa s sodelavci (1992) je poročal, da je zaviranje razkroja beljakovin pri podganah, ki so jih krmili z obroki, v

katerih je primanjkovalo beljakovin, povezano z zmanjšanim lizosomalnim razkrojem beljakovin. Pomanjkanje beljakovin zmanjšuje raven mnogih lizosomalnih encimov (katepsini B, H, C, in karbopeptidazi A in C) brez vpliva na katepsin D. Čeprav zavremo delovanje lizosomalnega procesa razkroja beljakovin, je razkroj beljakovin pri živalih, ki dobivajo premalo beljakovin, manjši kot pri kontrolnih podganah. To zmanjšanje razkroja beljakovin je posledica zmanjšanja od ATP odvisnega razkroja beljakovin. Zato se tudi precej zmanjša število proteasomov v mišicah živali, ki jih krmimo z obroki, v katerih primanjkuje beljakovin (Tawa in Goldberg, 1993).

Tako lahko s prehransko manipulacijo spodbujamo ali zaviramo od ATP-ubikvitina odvisno pot razkroja beljakovin, kar je jasno povezano z izgubljanjem mišičnih beljakovin (stradanje) ali z začasnim ohranjanjem le teh (odtegotvanje beljakovin v obrokih).

NERABA

Vsebnost beljakovin v mišici in s tem mišična masa sta izredno občutljivi na nerabo. Pri podganah, ki so jim prerezali živec *ishiadicus*, je bila mišična atrofija predvsem posledica povečane proteolize (Furuno in sod., 1990). Postopki, s katerimi so kar najbolj povečali lizosomalno oziroma od Ca^{2+} odvisno pot razkroja beljakovin, so bili uspešnejši pri denerviranih mišicah kot pri kontrolnih. Vendar takšni postopki niso vplivali na razkroj miofibrilarnih beljakovin (Furuno in sod., 1990). Izčrpanje ATP je v denervirani mišici zmanjšalo izločanje metilhistidina s sečem za 56% in zavrlo porast celotnega razkroja beljakovin (Medina in sod., 1991). Povečanje od ATP odvisnega razkroja beljakovin v mišici, ki je atrofirala zaradi denervacije, je bilo povezano s porastom količine mRNK za ubikvitin in 20S podenote proteasoma (Medina in sod., 1995). Obenem se je povečala količina ubikvitinsko-proteinskih skupkov, iz česar lahko sklepamo, da je ta pot razkroja beljakovin odgovorna za izgubo kontraktilnih beljakovin.

Drug primer nerabe mišic je resnična ali pa simulirana breztežnost. V takšnih pogojih je povečan razkroj beljakovin poglavitni vzrok za izgubo mišične mase (Thomason in Booth, 1990). Poskusi Goldspinka in sod. (1986) so podprli trditev, da se aktivira katepsin D. Tischler s sod. (1990) pa je poročal o povečanem delovanju nelizosomalnega, od Ca^{2+} odvisnega mehanizma razkroja beljakovin v takšnih poskusih.

Taillander s sod. (1996) je ugotovil, da sta se v *soleus* mišici podgane v breztežnih pogojih povečali lizosomalna in od Ca^{2+} odvisna proteoliza (254 %). Dokazal je močno povečanje mRNK za lizosomalne (katepsin B, L in D) in za od Ca^{2+} odvisne (m-kalpain) proteinaze v takih mišicah. Vendar pa lizosomalna in od Ca^{2+} odvisna proteoliza nista presežala 18 % skupnega razkroja v atrofirajoči mišici, zavrtje obeh procesov pa tudi ni zaustavilo izgubljanja mišične mase.

Že prej sta Haas in Riley (1988) poročala o močnem porastu ubikvitina znotraj takih mišic.

Torej močno povečanje mRNK za ubikvitin in 14-kDA E_2 prevladuje v *soleus* mišici podgane v breztežnem stanju kot tudi povečano izražanje C2 in C9 podenot 20S proteasoma (Taillander in sod., 1996). Poleg tega so ti poskusi pokazali, da obilje mRNK za C9 podenoto proteasoma pomeni tudi večjo transkripcijo v mišici v breztežnem stanju.

Glavni proteolitični sistemi se tako usklajeno sprožijo pri nerabi. Sklepamo, da je nelizosomalni od Ca^{2+} neodvisni sistem, domnevno od ubikvitin-proteasoma odvisni sistem razkroja beljakovin, večinoma odgovoren za izgubljanje mišične mase.

BOLEZENSKA STANJA

Veliko raziskav potrjuje, da je izgubljanje mišične mase pri sepsi posledica povečanega razkroja beljakovin, čeprav tudi zmanjšanje sinteze beljakovin prispeva k kataboličnemu odgovoru (Hasselgren, 1993). Tiao in sod. (1994) so dokazali, da sepsa pospešuje od energije odvisni proteolitični sistem, ki je odgovoren za razkroj miofibrilarnih beljakovin. Omenjeni avtorji poročajo o povečanju mRNK za ubikvitin v mišicah podgan s sepso in namigujejo, da je bil od ATP odvisni proteolitični sistem, ki se je aktiviral, od ubikvitina odvisni sistem. Sepso so v teh poskusih sprožili z vezanjem debelega črevesa in punkcijo. Za ta model je značilna zelo velika umrljivost v relativno kratkem času bolezni (zato izgubljanje mišične mase ni vidno) in je reprezentančni primer akutne sepse. Zato so sledili tudi poskusi na podganah z dolgo trajajočo sepso, katere posledica je trajno in reverzibilno katabolično stanje, kot so ga opazovali tudi pri ljudeh (Voisin in sod., 1996). Podganam so intravenozno vbrizgali živo *E. Coli* in proučevali akutno fazo sepse (2 dni po infekciji), kronično fazo sepse (6 dni po infekciji) in pozno fazo sepse (10 dni po infekciji). Razkroj beljakovin je bil povečan med akutno in kronično fazo sepse (značilna izguba mišične mase) in se je vrnil v okvire kontrolnih vrednosti v pozni fazi sepse (izgubljanje mišične mase se je ustavilo). Nelizosomalni in od Ca^{2+} odvisni proces sta veljala kot odgovorna za povečanje razkroja beljakovin, vendar so same ravni mRNK za ubikvitin in podenote 20S proteasoma rastle in padali vzporedno z naraščanjem in padanjem proteolize.

Pri kronični sepsi so opazili tudi povečanje ravni mRNK za 14-kDa E2, katepsina B in m-kalpaina. Ta opažanja jasno potrjujejo osrednjo vlogo od ubikvitin-proteasoma odvisnega proteolitičnega procesa med sepso, obenem pa nam dajo slutiti, da sta aktivaciji od Ca^{2+} odvisne in lizosomalne proteolize morda pomembni v kronični fazi.

Dokazali so tudi, da je povečan razkroj beljakovin skeletnega mišičja pri podganah z acidozo (model živali s kronično poškodbo ledvic) posledica aktivacije nelizosomalnega, od Ca^{2+} neodvisnega, toda od ATP odvisnega proteolitičnega procesa (Mitch in sod., 1994, Bailey in sod., 1996). Povečane ravni mRNK za ubikvitin, ki so jih ugotovili v acidoznih mišicah, so se vrstile na kontrolno raven v 24 urah po prenehanju acidoze (Mitch in sod., 1994). V svojih poskusih so Bailey in sod. (1996) dokazali, da je povečana ekspresija ubikvitina in 20S podenot proteasoma v mišicah podgan z acidozo posledica povečane transkripcije njihovih mRNK. Ti avtorji so ugotovili tudi, da ne samo izpraznitev ATP, temveč tudi MG 132 (specifični zaviralec proteasoma), zavre povečanje razkroja beljakovin v atrofirajoči, inkubirani mišici.

Povečano ekspresijo ubikvitina in podenot 20S proteasoma so opazili tudi v mišicah podgan obolelih za diabetesom (Price in sod., 1996). Fang in sod. (1995) so dokazali, da opekline spodbujajo več poti razkroja beljakovin, med njimi tudi od ATP-ubikvitina odvisno proteolitično pot. Končno imamo tudi dokaze, da je od ubikvitin-proteasoma odvisen razkroj beljakovin predvsem odgovoren za izgubljanje mišične mase pri kaheksiji, povzročeni z rakavim obolenjem (glej spodaj).

Vsi ti podatki nam vsiljujejo domnevo, da aktivacija od ubikvitin-proteasom odvisnega sistema povzroči izgubljanje mišične mase, ki ga opazimo pri mnogih bolezenskih stanjih.

OD UBIKVITIN-PROTEASOMA ODVISNI RAZKROJ BELJAKOVIN PRI ČLOVEŠKIH BOLEZNIH

Pomemben cilj raziskovalcev je ugotoviti, ali mehanizmi razkroja beljakovin, ki so jih proučevali na živalskih modelih, veljajo tudi za bolezenska stanja pri človeku. Mansoor in sod. (1966) so poročali o povečanem razkroju beljakovin celotnega telesa in povečanem izločanju 3-metilhistidina v seču pri bolnikih s poškodbami glave. Za primerjavo so uporabili zdrave prostovoljce. Razlike med skupinama so bile povezane s porastom ravni mRNK za ubikvitin, 14-kDa E2 ter HC2 in HC8 20S podenot proteasoma pri mišičnih biopsijah bolnikov s poškodbami

glave. Podobna so bila opažanja pri mišičnih biopsijah kahetičnih bolnikov, obolelih za rakom (Ralliere in Tauveron, 1996, Attaix, 1996). Omeniti moramo, da se hitro pojavi izgubljanje mišične mase pri takih bolnikih, enako kot pri akutnih živalskih modelih. Zato je od ATP-ubikvitina odvisna pot razkroja beljakovin lahko pomembna pri izgubljanju mišične mase v nekaterih akutnih oblikah bolezni pri ljudeh. Za primerjavo pa pri bolnikih s Cushingovim sindromom, ki so izgubljali mišično maso zaradi visokih ravni glukokortikoidov, nismo našli značilnih razlik v ravneh mRNK za različne sestavine proteolitičnega procesa (Ralliere in sod., 1997). Podobno so bile nespremenjene vrednosti mRNK za katepsin D, m-kalpain ali sestavine od ubikvitina odvisne poti razkroja beljakovin pri bolnikih z Duchenneovo mišično distrofijo (Combaret in sod., 1996). Dejstvo, da niso ugotovili aktivacije proteolitičnih sestavin pri teh biopsijah, bi lahko bila posledica sorazmerno progresivnega izgubljanja miofibrilarnih beljakovin tako pri Cushingovem sindromu kot pri DMD bolnikih. Morda neki regulatorni mehanizmi preprečijo porast ekspresije proteolitičnih genov v takšnih primerih in s tem prekomerno in prehitro izgubljanje mišične mase. Vendar mora biti ta hipoteza potrjena z nadaljnjimi raziskavami kroničnih bolezenskih stanj, pri katerih se izgublja mišična masa.

REGULACIJA S HORMONI

Kot je dobro znano, inzulin zavira razkroj beljakovin v mišičnih preparatih (Kettelhut in sod., 1988). Hormonsko znižanje mRNK za 14-kDa E_2 v kulturi mioblastov povzroča zaviranje od ubikvitin-proteasoma odvisne poti razkroja beljakovin (Wing in Banville, 1994, Wing in Bedard, 1996). Prav tako je dobro znano, da inzulin *in vivo* zavira razkroj beljakovin v celem telesu, vendar nam niti tkivo niti pot razkroja beljakovin, na katero inzulin deluje, nista podrobno znani. Učinke inzulina na ravni mRNK za katepsin D, m-kalpain in ubikvitin so proučevali v poskusih *in vivo* v skeletnih mišicah, koži, jetrih in tankem črevesu (Larbaud in sod., 1996). Poskuse so opravljali na kozah, ki so bile 6 ur izpostavljene hiperinzulinemiji, evglikemiji in hiperaminoacidemiji. Koze so vrsta, pri kateri inzulin precej zavira celotno proteolizo v telesu pod takšnimi pogoji (Tesseraud in sod., 1993). Hiperinzulinemija in hiperaminoacidemija sta zavrli rast ravni mRNK za ubikvitin le v hitro krčnih in v mešanih skeletnih mišicah brez sočasnega zmanjševanja ravni mRNK za druge sestavine (14-kDa E_2 in podenote 20S proteasoma) od ubikvitina odvisne poti razkroja beljakovin. Zato bi morda lahko z znižanimi vrednostmi mRNK za ubikvitin razložili antiproteolitični učinek inzulina *in vivo*. Ti podatki so v skladu z dokazi, da je zaviranje razkroja beljakovin z inzulinom v mišicah človeka povezano z nelizosomalno potjo razkroja (Barrett in sod., 1995). Ne izključujejo možnosti, da ima inzulin zaviralni učinek na proteolizo v mišicah preko nekega drugega mehanizma. Duckworth in sod. (1994) poročajo o neposrednem zaviralnem vplivu inzulina na *in vitro* razkroj N-sukcinil-Lev-Lev-Val-Tir-7-amido-4-metilkumarina s prečiščenim kompleksom, ki je vseboval 20S proteasom, in encim, ki razgrajuje inzulin.

IGF-I prav tako zniža ravni mRNK za 14-kDa E_2 v L6 mioblastih, vendar je 100-krat močnejši kot inzulin (Wing in Bedard, 1996). IGF-I ne zmanjšuje transkripcije 14-kDa E_2 , temveč poveča stopnjo razgradnje 1,2 kb transkripta. Ta učinek je značilen za ta gen, medtem ko IGF-I ne vpliva na raven mRNK za ubikvitin in podenote proteasoma. Ali ta opažanje veljajo tudi *in vivo*, je še nejasno. Ravni IGF-I se znižujejo s stradanjem in naraščajo s ponovnim hranjenjem živali. Te spremembe so morda povezane z naraščanjem in zniževanjem ekspresije 14-kDa E_2 , ki so jo opazovali pri stradanju in nato ponovnem krmljenju živali (Wing in Banville, 1994). Te raziskave nam ponujajo mogočo razlago mehanizma o antiproteolitičnih lastnostih hormona. Ta hormon je poznan kot spodbujevalec rasti mišic. Na primer, IGF-I lahko obnovi rast živali z diabetesom brez inzulinske terapije (Scheiwiller in sod., 1986).

Glukokortikoidi povečajo proteolizo v mišicah stradajočih živali (Kettelhut in sod., 1988), pa tudi v nekaterih bolezenskih stanjih. Wing in Goldberg (1993) sta ugotovila, da adrenaletomija delno zavre naraščanje razkroja beljakovin v mišicah in popolnoma zavre naraščanje mRNK za ubikvitin pri stradajočih podganah. Nasprotno pa injekcija deksametazona obnovi obe reakciji na stradanje. Zdi se, da so glukokortikoidi pomembni za aktivacijo od ATP-odvisnega procesa, ne pa za dvig lizosomalne proteolize pri stradanju. Glukokortikoidi vplivajo tudi na povečanje ekspresije ubikvitina in 20S podenote proteasoma v mišicah pri metabolični acidozi (Price in sod. 1994). Sama acidifikacija poveča mRNK za od ubikvitin-proteasoma odvisno pot razkroja beljakovin (Isozaki in sod., 1996). Derdevet in sod. so opazili povečan razkroj beljakovin in povečane ravni mRNK za 14kDa E₂ in 20S podenote proteasoma pri odraslih živalih, tretiranih z deksametazonom, ne pa tudi pri starih podganah. Glukokortikoidi prav tako vplivajo na od ATP-ubikvitina odvisen razkroj beljakovin pri sepsi (Tiao in sod., 1996). Zanimivo pa je, da deksametazom ni vplival na raven mRNK za C2 20S proteasoma v kulturi L8 mišičnih celic (Hong in Forsberg, 1995).

Imamo pa tudi podatke da hipotiroidizem zmanjša obseg od ATP-odvisne proteolize na ta način, da zniža vsebnost 20S in 26S proteasomov v skeletnem mišičju (Tawa in Goldberg, 1993).

URAVNAVANJE S CITOKINI

Tumor nekrozni dejavnik (TNF-a), ki ga prekomerno proizvajajo aktivirani makrofagi, pospešuje razkroj beljakovin v mišicah pri sepsi (Flores in sod., 1989). Garcia-Martinez in sod. (1993) so poročali, da že posamezna intravenozna injekcija TNF-a povzroči zbiranje ubikvitinskih skupkov v skeletnem mišičju podgan. Pomembno vlogo ima TNF-a pri aktivaciji od ATP-ubikvitin odvisne poti razkroja beljakovin tudi pri podganah z rakavim tumorjem (Llovera in sod., 1996). Tretman teh živali proti TNF-a povrne ekspresijo ubikvitina in 20S podenot proteasoma v prejšnje stanje. Drugi citokin, interleukin-1 (IL-1), ki morda naznanja naraščanje proteolize (Baracos in sod., 1983) v sinergiji s TNF-a (Flores in sod., 1989), ni vplival na ekspresijo genov ubikvitina v mišicah pri sepsi (Garcia-Martinez in sod., 1995). Tretji citokin, ki morda prispeva k izgubljanju mišične mase, je IL-6 (Goodman, 1994). Dokazano je, da IL-6 poveča ekspresijo podenot 20S (C2, C8) in 26S (S4) proteasoma in tudi katepsinov B in L v kulturi mišičnih celic (Ebisui in sod., 1995). Citokini niso edini katabolični dejavniki, ki lahko oznanijo povečan razkroj beljakovin pri sepsi, rakavih obolenjih, poškodbah, opeklinah in domnevno pri aidsu. Todorov in sod. (1996) so namreč določili proteoglikan, ki povzroča kaheksijo pri miših in pri človeku. Potrebni so nadaljnji poskusi, ki bodo pokazali, ali ti dejavniki vplivajo posredno ali neposredno na od ubikvitin-proteasoma odvisen razkroj beljakovin.

VIRI

Attaix, D. Osebni razgovor, 1996.

Bailey, J. L./ Wang, W./ England, B. K./ Price, S. R./ Ding, X./ Mitch, W. E.. The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J. Clin. Invest.* 97(1996), 1447-1453.

Baracos, V. E./ Rodemann, H. P./ Dinarello, C. A./ Goldberg A. L. Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E₂ release by leukocytic pyrogen (interleukin-1). *N. Engl. J. Med.*, 308(1983), 553-558.

Barrett, E. J./ Jahn, L. A./ Oliveras, D. M./ Friburg, D. A. Chloroquine does not exert insulin-like actions on human forearm muscle metabolism. *Am. J. Physiol.*, 268(1995), E820-E824.

Combaret, L./ Taillandier, D./ Voisin, L./ Samuels, S. E./ Boespflug-Tanguy, O./ Attaix, D. No alteration in gene expression of components of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in dystrophin-deficient muscles. *FEBS Lett.*, (1996)393, 292-296.

- Duckworth, W. C./ Bennett, R. G./ Hamel, F. G. A direct inhibitory effect of insulin on a cytosolic proteolytic complex containing insulin-degrading enzyme and multicatalytic proteinase. *J. Biol. Chem.*, 269(1994), 24575-24580.
- Ebisui, C./ Tsujinaka, T./ Morimoto, T./ Kan, K./ Iijima, S./ Yano, M./ Kominami, E./ Tanaka, K./ Monden, M. Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clin. Sci.*, 89(1995), 431-439.
- Fang, C./ Tiao, G./ James, H./ Ogle, C./ Fischer, J. E./ Hasselgren, P. O. Burn injury stimulates multiple proteolytic pathways in skeletal muscle, including the ubiquitin-energy-dependent pathway. *J. Am. Coll. Surg.*, 180(1995), 161-170.
- Flores, E. A./ Bistrián, B. R./ Pomposelli, J. J./ Dinarelo, C. A./ Blacburn, G. L./ Istfan, N. W. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergetic effect with interleukin 1. *J. Clin. Invest.*, 83(1989), 1614-1622.
- Furuno, K./ Goodman, M. N./ Goldberg, A. L. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *J. Biol. Chem.*, 265(1990), 8550-8557.
- Garcia-Martinez, C./ Llovera, M./ Agell, N./ Lopez-Soriano, F. J./ Argiles, J. P. Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased during sepsis: involvement of TNF- α , but not IL-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217(1995), 839-844.
- Goldspink, D. F./ Morton, P. A. J./ Loughna, P./ Goldspink, G. The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflügers Arch.*, 407(1986), 333-340.
- Goodman, M. N. Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (1994)205, 182-185.
- Haas, A. L./ Riley, D. A. The dynamics of ubiquitin pools within skeletal muscle. V: The ubiquitin system (ur.: Schlesinger, M./ Herskko, A.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 178-185.
- Hasselgreen, P. O. Protein metabolism in sepsis. Austin, R. G. Landes Co., 1993, 214 s.
- Hong, D. H./ Forsberg, N. E. Effects of dexamethasone on protein degradation and protease gene expression in rat L8 myotube cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 108(1995), 199-209.
- Ilian, M. A./ Forsberg, N. E. Gene expression of calpains and their specific endogenous inhibitor, calpastatin, in skeletal muscle of fed and fasted rabbits. *Biochem. J.*, 287(1992), 163-171.
- Isozaki, Y./ Mitch, W. E./ England, B. K./ Price, S. R. Protein degradation and increased mRNAs encoding proteins of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in BC₃H1 myocytes require an interaction between glucocorticoids and acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(1996), 1967-1971.
- Kettelhut, I. C./ Wing, S. S./ Goldberg, A. L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab. Rev.*, 4(1988), 751-772.
- Larbaud, D./ Debras, E./ Taillandier, D./ Samuels, S. E./ Temparis, S./ Champredon, C./ Grizard, J./ Attaix, D. Euglycemic hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia specifically decrease skeletal muscle ubiquitin mRNA in goats. *Am. J. Physiol.*, 271(1996), E505-E512.
- Li, J. B./ Goldberg, A. L. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *Am. J. Physiol.*, 231(1976), 441-448.
- Li, J. B./ Higgins, J. E./ Jefferson, L. S. Changes in protein turnover in skeletal muscle in response to fasting. *Am. J. Physiol.*, 236(1979), E222-E228.
- Llovera, M./ Carbo, N./ Garcia-Martinez, C./ Costelli, P./ Tessitore, L./ Baccino, F. M./ Agell, N./ Bagby, G. J./ Lopez-Soriano, F. J./ Argiles, J. M. Anti-TNF treatment reverts increased muscle ubiquitin gene expression in tumour-bearing rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221(1996), 653-655.
- Lowell, B. B./ Ruderman, N. B./ Goodman, M. N. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, 234(1986)1, 237-240.
- Mansoor, O./ Beaufrère, B./ Boirie, Y./ Rallièrre, C./ Taillandier, D./ Arousseau, E./ Schoeffler, P./ Arnal, M./ Attaix, D. Increased mRNA levels for components of the lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways in skeletal muscle from head trauma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 93(1996), 2714-2718.
- Medina, R./ Wing, S. S./ Goldberg, A. L. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem. J.*, 307(1995), 631-637.
- Medina, R./ Wing, S. S./ Haas, A./ Goldberg, A. L. Activation of the ubiquitin-ATP-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting and denervation atrophy. *Biomed. Biochim. Acta*, (1991)50, 347-356.
- Medina, R./ Wing, S. S./ Kettelhut, I./ Goldberg, A. L. Regulation of different proteolytic systems in muscle by insulin and food intake. V: Protein metabolism in diabetes mellitus (ur.: Nair, K. S.). London, Smith Gordon, 1992, 111-123.
- Mitch, W. E./ Medina, R./ Griebler, S./ May, R. C./ England, B. K./ Price, S. R./ Bailey J. L./ Goldberg, A. L. Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes. *J. Clin. Invest.*, 93(1994), 2127-2133.

- Mortimore, G. E./ Kadowaki, M./ Heydrick, S. J. The autophagic pathway in liver: its regulation and role in macromolecular turnover. V: Protein metabolism in diabetes mellitus (ur.: Nair, K. S.). London, Smith Gordon, 1992, 125-138.
- Price, S. R./ England, B. K./ Bailey, J. L./ Van Vreede, K./ Mitch, W. E. Acidosis and glucocorticoids concomitantly increase ubiquitin and proteasome subunit mRNAs in rat muscle. *Am. J. Physiol.*, 267(1994), C955-C960.
- Price, S. R./ Bailey, J. L./ Wang, X./ Jurkovitz, C./ England, B. K./ Ding, X./ Phillips, L. S./ Mitch, W. E. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J. Clin. Invest.* 98(1996), 1703-1708.
- Ralliere, C. / Tauveron, I. Osebni razgovor, 1996.
- Ralliere C./ Tauveron I./ Taillandier D./ Guy L./ Boiteux J.P./ Giraud B./ Attaix D./ Thieblot P. Glucocorticoids do not regulate the expression of proteolytic genes in skeletal muscle from Cushing's syndrome patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(1997)9, 3161-3164
- Samuels, S. E./ Taillandier, D./ Arousseau, E./ Cherel, Y./ Le Maho, Y./ Arnal, M./ Attaix, D.. Gastrointestinal tract protein synthesis and mRNA levels for proteolytic systems in adult fasted rats. *Am. J. Physiol.*, 271(1996), E232-E238.
- Scheiwiller, E./ Guller, H. P./ Merryweather, J./ Scandella, C./ Maerki, W./ Zapf, J./ Froesch, E. R. Growth restoration of insulin-deficient diabetic rats by recombinant human insulin-like growth factor I. *Nature (London)*, 323(1986), 169-171.
- Taillandier, D./ Arousseau, E./ Meynial-Denis, D./ Béchet, D./ Ferrara, M./ Cottin, P./ Ducastaing, A./ Bigard, X./ Guezennec, C. Y./ Schmid, H. P./ Attaix, D. Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem. J.*, 316(1996), 65-72.
- Tawa, N. E. Jr./ Kettelhut, I. C./ Goldberg, A. L. Dietary protein deficiency reduces lysosomal and nonlysosomal ATP-dependent proteolysis in muscle. *Am. J. Physiol.*, 263(1992), E326-E334.
- Tawa, N. E. Jr./ Goldberg, A. L. Protein and amino acid metabolism in muscle. V: Myology (ur.: Engel, A. G./ Franzini-Armstrong, C.). New York, Mc Graw-Hill Book Co., 1993, 683-707.
- Tesseraud, S./ Grizard, J./ Debras, E./ Papet, I./ Bonnet, Y./ Bayle, G./ Champredon, C. Leucine metabolism in lactating and dry goats: effect of insulin and substrate availability. *Am. J. Physiol.*, 265(1993), E402-E413.
- Thomason, D. B./ Booth, F. W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.*, 68(1990), 1-12.
- Tiao, G./ Fagan, J. M./ Samuels, N./ James, J. H./ Hudson, K./ Lieberman, M./ Fischer, J. E./ Hasselgren, P. O. Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J. Clin. Invest.*, 94(1994), 2255-2264.
- Tischler, M. E./ Rosenberg, S./ Satarug, S./ Henriksen, E. J./ Kirby, C. R./ Tome, M./ Chase, P. Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism*, 39(1990), 756-763.
- Todorow, P./ Cariuk, P./ McDevitt, T./ Coles, B./ Fearon, K./ Tisdale, M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature (London)*, 379(1996), 739-742.
- Voisin, L./ Breuillé, D./ Combaret, L./ Pouyet, C./ Taillandier, D./ Arousseau, E./ Obled, C./ Attaix, D. Muscle wasting in a rat model of long lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J. Clin. Invest.*, 97(1996), 1610-1617.
- Wing, S. S./ Banville, D. 14-kDa ubiquitin-conjugating enzyme: structure of the rat gene and regulation upon fasting and by insulin. *Am. J. Physiol.*, 267(1994), E39-E48.
- Wing, S. S./ Bedard, N. Insulin-like growth factor I stimulates degradation of a mRNA transcript encoding the 14 kDa ubiquitin-conjugating enzyme. *Biochem. J.*, 319(1996), 455-461.
- Wing, S. S./ Chiang, A. L./ Goldberg, A. L./ Dice, J. F. Proteins containing peptide sequences related to lys-phe-glu-arg-gln are selectively depleted in liver and heart but not skeletal muscle of fasted rats. *Biochem. J.*, 275(1991), 165-169.
- Wing, S. S./ Goldberg, A. L. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am. J. Physiol.*, 264(1993), E668-E676.
- Wing, S. S./ Haas, A. L./ Goldberg, A. L. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem. J.*, 305(1995), 125-132.
- Wing, S. S./ Jain, P. Molecular cloning, expression and characterization of a ubiquitin conjugation enzyme (E2_{17kD}) highly expressed in rat testis. *Biochem. J.*, 305(1995), 125-132.