

P3303218

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

12317/84

ATP-függő proteáz és inhibitorának alkalmazása leromlás és
izomsorvadás kezelésére

66512

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, Cambridge, MA,

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1992. 05. 11.

Elsőbbsége: 1991. 05. 13. (699 184)

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/03914

Kivonat

Az ATP-ubiquitin dependens folyamatról kimutatták, hogy az a felelős a nagymértékű fehérjelebontásért, amely olyan körülmények között, vagy betegségek kísérőjeként fordul elő, amelyekben nagyon erős a testsúlyvesztés és negatív nitrogén-egyensúlyt lehet kimutatni. A folyamat kulcselemeit azonosították. A találmány tárgya a felgyorsult vagy fokozott proteolízis gátlására szolgáló eljárás, eljárás a folyamat inhibitorának, a multipain és proteaszóma inhibitorának az azonosítására.

pl. abba irány.

[Handwritten signature]

13317/94

P 33 03218

A

Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Budapest

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

3849

NSZ:

C12 N45/54

8/64

15/15

AG1437/64

C12 Q 1/37

ATP-függő proteáz és inhibitorának alkalmazása leromlás és
izomsorvadás kezelésére

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, Cambridge, MA,

Amerikai Egyesült Államok

Feltaláló:

GOLDBERG, Alfred, H.

Brookline, MA,

Brookline, MA,

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1992. 05. 11.

Elsőbbsége: 1991. 05. 13. (699 184)

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/03914

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/20804

78234-7177-GÁ/mzs

Az emlős sejtek legalább négy proteolitikus rendszert tartalmaznak, amelyek a sejtek fehérjéinek feldolgozásában láthatóan különböző funkciókat látnak el. A citoszolban egy oldható proteolitikus bioszintézis út létezik, amelynek ATP-re van szüksége, és az ubiquitin nevű polipeptid játszik szerepet benne. Ez a többkomponensű rendszer katalizálja a nagyon abnormális fehérjék és a rövidéletű szabályozó fehérjék szelektív lebontását. Azonban valószínűleg ez az eljárás a felelős a legtöbb fehérje lebontásáért az érett retikulocitákban [Boches, F. and A.L. Goldberg, Science, 215, 978-980 (1982), Spenser, S and J. Etlinger, Journal of Biological Chemistry, 257, 14122-14127 (1985)] és a szaporodó fibroblasztokban [Ciechanover, A. et al., Cell, 37, 57-66 (1984); Gronostajski, R. et al., Journal of Biological Chemistry, 260, 3344-3349 (1985)]. Azokban a sejtekben, amelyektől a szérumot vagy az inzulint megvonták, az átlagos sejtfehérjék lebomlási sebessége egészen a kétszereséig fokozódik. Ez a felgyorsult proteolízis magában foglalja a lizoszómákat, amelyek a színhelyei az endocitózison átesett és membrán fehérjék lebontásának. Egy másik rendszer, amely révén a vázizom fokozni képes az össz-proteolízist, magában foglalja a Ca^{2+} dependens proteázokat (a calpain I-et és calpain II-t). A disztrófiás vagy roncsolt izomban, vagy a normál izomban olyan kezelés után, amely fokozza az intracelluláris Ca^{2+} szintet, a fehérjelebontás össz-szintje fokozódik, főleg a calpainok aktiválódása következtében. Emellett létezik egy nem-lizoszómális lebontási rendszer, amely ATP-től függetlenül működik; az eritrocitákban ez a rendszer

katalizálja az oxidálószerrek által roncsolt fehérjék szelektív lebomlását. Ezeknek a rendszereknek a viszonylagos fontossága a különböző sejtkomponensek lebontásában különböző körülmények között az izomban ismeretlen.

Az Ub-t igénylő folyamatban számos fehérje lebontásának az első lépése magában foglalja konjugációjukat ezzel a kis fehérjével, egy ATP-t igénylő folyamatban. Az ubiquitinezett fehérjéket azután egy 1000-1500 kDa (26S) ATP-függő proteolítikus komplex, az Ub-konjugátum-lebontó enzim ("UCDEN") bontja le. Ezt a lebontási utat a legjobban a retikulocitákban jellemezték, de kimutatták a vázizomban és egyéb sejtekben is. Az a vélemény terjedt el, hogy a nagyon abnormális fehérjék és számos rövid-életű enzim vagy szabályozó fehérje gyors lebontásáért felelős.

Egy nagy (700 kDa) méretű multimer proteáz az eukarióta sejtekben, amelyet proteaszóma néven említenek, az UCDEN komponense. 12-15 külön alegységet tartalmaz, valamint három különböző proteázt, amelyek eltérő specifitással rendelkeznek. Önmagában a proteaszóma nem képes lebontani az ubiquitinezett fehérjéket, és az UCDEN fő proteolítikus aktivitását szolgáltatja.

A jelen találmány tárgya eljárás a vázizmok felgyorsult lebomlásának gátlására (csökkentésére vagy megelőzésére) szolgáló eljárás, amely a különböző fiziológiás és patológias állapotok kísérője, és nagymértékben felelős az izomtömeg elvesztéséért (atrófia), amely az idegsérülést, éhezést, lázat, acidózist és bizonyos endocrinopathia-kat (belső elválasztású

mirigyek betegsége) kíséri. Amint az alábbiakban ismertetjük, kimutatták, hogy a nem-lizoszómális ATP-ubiquitin-dependens proteolítikus folyamat fokozódik az izomban ezekben az állapotokban, és ez a felelős a legtöbb felgyorsult proteolízisért, amely a sorvadó izmokban fellép. Ezt támogatja annak kimutatása, amit szintén ismertetünk az alábbiakban, hogy specifikus növekedés figyelhető meg az ubiquitin mRNS mennyiségében, azaz a proteaszóma mRNS indukciójában, és megnő az ubiquitinezett fehérje tartalom a sorvadó izmokban, ami nem figyelhető meg a nem-izom szövetekben, ugyanilyen állapotoknál.

A jelen találmány tárgya továbbá egy új ATP-dependens proteáz, amely az ubiquitinezett fehérjék lebontásában játszik szerepet, komplexet képez a proteaszómával, és az 1300-1500 kDa méretű ATP-dependens proteolítikus komplex (az UCDEN-t nevezik 1500 kDa-os komplexnek is) részének tűnik, amely gyorsan lebontja az ubiquitinnel konjugált fehérjéket. Ez az új proteáz, elnevezése multipain, láthatólag kritikus szerepet játszik az ATP-ubiquitin-dependens lebontási útban.

A multipain egy multimer enzim, molekulásúlya körülbelül 500 kDa, amely az aktiválódáshoz ATP hidrolízisét igényli, és főleg az ubiquitinezett fehérjéket bontja le. Ez az új ATP-dependens enzim tiol proteáznak tűnik, és kimutattuk róla, hogy az ubiquitinnel konjugált fehérjéket savban oldható termékekké hasítja. A multipaint azonosítottuk az izomban, és kimutattuk róla, hogy lényeges szerepet játszik abban a citoszólban lejátszódó lebontási útban, amely az izomvesztés különböző formáiban aktiválódik.

A jelen találmány tárgya továbbá a tisztított multipain, olyan forrásokból kinyerve, amelyekben természetes körülmények között előfordul, azaz például vázizom sejtekből; a multipaint kódol DNS vagy RNS; a rekombináns DNS módszerrel előállított multipain; az enzimre specifikus antitestek; a multipaint használó eljárások; valamint a multipain inhibítorok és alkalmazásuk, főleg azzal a céllal, hogy csökkentsük az izomtömeg veszteségét, ami számos különböző betegségben és állapotban előfordul.

Új multipain inhibítorokat lehet előállítani és tervezni az enzim és szerkezete ismeretében, amint azt az alábbiakban ismertetjük, valamint a szakterületen ismert módszerekkel. Például a multipain különböző alegységeinek ismerete, azaz a proteolítikus alegység, az ATP-áz és az ubiquitin-kötő komponens ismerete hasznos ebből a szempontból. A jelen találmány tárgya továbbá olyan létező vegyületek vagy molekulák azonosítására, amelyek a multipain vagy ezen multimer enzim egy komponensének inhibítorai. A multipainról ki lehet mutatni, hogy a cisztatin A gátolja. Ennélfogva a klónozott multipaint expresszáló sejteket arra lehet használni, hogy a cisztatin analógokat megvizsgáljuk abból a szempontból, hogy gátolják-e az enzimet, valamint arra is, hogy más multipain inhibítorokat azonosítsunk velük. Az is lehetséges, hogy a multipain antibiotikum inhibítorait mikroorganizmusok fermentlevében keressük. A multipain inhibítor lehet egy peptid, egy peptid-szerű molekula, vagy egy peptid-származék, például egy peptid-aldehid, egy β -laktám származék, egy peptid-klórmetil-ke-ton, egy epoxid vagy egy peptid

izokumarin.

Az alábbiakban ismertetettek szerint a találmány tárgya egy 40 kDa méretű proteaszóma regulátor. A 40 kDa méretű polipeptidet tisztítottuk, és igazoltuk róla, hogy egy nagy komplex tagja, amely ATP-t köt meg, és gátolja a proteaszóma peptidáz (lebontó) aktivitását.

A természetben előforduló 40 kDa inhibítor elérhetősége lehetővé teszi, hogy meghatározzuk a struktúrális követelményeket, amelyek a proteaszóma gátlásához szükségesek, azonosítsuk az aktív régió(ka)t vagy fragmente(ke)t ezen a szabályozó peptiden, és új proteaszóma inhibítorokat tervezzünk, vagy azonosítsunk létező vegyületeket, amelyek gátolják a proteaszómát.

Egy multipain inhibítort vagy az 1500 kDa komplex egy másik komponensének inhibítorát egy olyan betegnek lehet beadni, akiben az izomvesztés fellép (azaz idegsérülést, éhezést, fertőzést, vagy bizonyos endokrinopátiát követően). Az izomtömeg elvesztése ilyen körülmények között az izomfehérjék felgyorsult lebomlásának következménye, amiről kimutattuk, amint az alábbiakban ismertetjük, hogy nagymértékben annak a következménye, hogy a nem-lizoszómális ATP-ubiquitin-dependens lebontási út aktiválódik, amelyben a multipain szerepet játszik. Egy multipain inhibítor, illetve az ATP-függő proteolítikus komplex egy másik komponense inhibítorának a beadása zavarja, illetve csökkenti a fokozódott fehérje-lebontást, ami általában ilyen körülmények között előfordul. Ennek eredményeképpen a proteolízis csökken, az izomfehérje vesztese kisebb mértékben

folyik tovább, mint amilyen mértékben ilyen körülmények között folya. Ezt a módszert a multipain vagy az 1500 kDa komplex másik komponensének gátlására, és ennek eredményét, az izomfehérje lebomlásának gátlását használhatjuk széles körben előforduló körülmények között, azaz például rák, krónikus fertőző betegségek, láz, az izom nem használása és idegelhalás esetében, ahol előfordul, és gyakran rendkívül káros hatású. Az eljárás vese-elégtelenség esetében is használható, amikor acidózis vagy máj-elégtelenség lép fel, mivel lehetséges az aminosavak keletkezésének csökkentése, és ezáltal csökkenteni lehet a beteg vesékre vagy a májra jutó nitrogén-terhelést.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékletben szereplő ábrákat.

Az 1. ábra grafikus bemutatása a nyúl vázizom II-es frakció frakcionálása eredményeinek mono-Q anioncserélő kromatográfiával. Az ezt követő elemzés a 2-es csúcsra összpontosít, mivel az alábbiak szerint igazoltuk, hogy a lizozim ATP-vel stimulált lebomlásának legnagyobb részéért ez a felelős, erős aktivitással rendelkezik az oxidálószerrek által roncsolt hemoglobinnal szemben, és csekély az aktivitása az SLLVT-MCA ellen, amely a proteaszóma jellegzetes szubsztrátja.

A 2. ábra az elemzés grafikus bemutatása, amelynek tárgya a 2-es csúcs Ubiquitin- ^{125}I -lizozim konjugátumot lebontó aktivitása, amelyben a mintákat az Ubiquitin- ^{125}I -lizozimra nézve vizsgáljuk ATP jelenlétében (fekete háromszög) vagy ATP nélkül (üres háromszög), illetve OH/O_2 -vel kezelt ^{14}C -hemoglobinra nézve (tele kör). A használt molekulasúly markerek

a kék dextrán, a tiroglobulin, a ferritin és a β -amiláz.

A 3. ábrán az 500 kDa proteáz SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézise látható (10%), amelynél a Superose 6 oszlopról származó Ubiquitin- ^{125}I -lizozimet bontó csúcs-aktivitást koncentrálnak, és 25 μg fehérjét analizálunk.

A 4. ábra a lizozim, az ubiquitinezett lizozim, a hemoglobin és az oxidálószerrel roncsolt hemoglobin 500 kDa proteáz általi hidrolízisének relatív sebessége látható.

Az 5. ábra egy 1300 kDa méretű multienzim komplex képződésének grafikus bemutatása, a proteaszóma és a multipain MgATP-vel való előinkubálása után. A használt molekulasúly markerek a kék dextrán, a tiroglobulin, a ferritin és a β -amiláz.

A 6. ábrán a multipain, a proteaszóma-multipain komplex és a részlegesen tisztított proteaszóma SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézisének eredményei láthatók.

A 7. ábrán az Ubiquitin- ^{125}I -lizozim konjugátumok multipainnal (tele kör), vagy a proteaszóma és a multipain inkubálásával kapott komplex (üres kör) való lebontásával kapott savban oldódó termékek grafikus ábrázolása látható. A molekulasúly markerek a szubsztancia P (1347 kDa), az ATP (551 Da), az ADP (427 Da) és az adenzin (267 Da).

A 8. ábrán az Ubiquitin- ^{125}I -lizozim degradáció ATP függésének grafikus ábrázolása látható multipainnal, vagy a proteaszóma és a multipain inkubálása során képződő komplexszel.

A 9. ábra az ATP megvonásnak a fehérje lebomlásra gyakorolt hatásának grafikus ábrázolása látható ideg-irtott és

normális talpemelő izmokban. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az össz-proteolízis elsődlegesen azért növekszik, mert az idegirtást követően az ATP-dependens lebontási út aktiválódik. Az értékek az átlagok $\pm$ SEM legalább 5 patkányra, amelyekben mindkét ülőideg ki van vágva, illetve operálatlan patkányokra vonatkoztatva. A bal felső rész: Teljes fehérje degradáció minden egyes napon az ülőideg kivágása után, illetve hasonló méretű (60-70 g) patkányok normális izmaiban. Jobb felső sarok: Az ATP megvonás hatása a proteolízis sebességére. Bal alsó sarok: az össz-fehérje lebomlás és az energia-független proteolítikus eljárás idegirtás utáni relatív változása (azaz, a proteolízis átlagos sebességeinek különbségei az idegirtott izmok és a normál izmok között. Jobb alsó sarok: Az ATP-függő folyamat relatív változása az idegirtás után.

A 10. ábra az éhezés és újratáplálás hatását mutatja grafikusán patkány extensor digitorum longus izomban. Baloldali panel: A teljes fehérje lebomlást és az energia-független folyamatot a táplált és éheztetett patkányokban táplálék eltávolítása utáni különböző időpontokban mérjük, valamint 24 órával az újratáplálás után. Jobboldali panel: A fehérje lebontás ATP-független komponense. Az értékek átlag $\pm$ SEM 6 patkányra.

A 11. ábra az ubiquitin mRNS Northern blot elemzését mutatja éheztetett és éheztetett-újratáplált patkányok izmaiban. A poli-ubiquitin mRNS szintjét mutatjuk 10 μ g össz-RNS/sáv felvitt nukleinsavban, amelyet táplált patkányok (a), 24 óra hosszat éheztetett (b), 48 óra hosszat éheztetett (c) vagy 48

óra hosszat éheztetett és 24 órája újratáplált (d) esetében. A 28S és 18S jelzi ezeknek a riboszómális RNS-eknek a helyzetét.

A 12. ábra az össz-mRNS szintjeinek grafikus bemutatása dot blot elemzéssel talpemelő izomban meghatározva éheztetett valamint éheztetett és újra táplált patkányokban, a 6. példában leírtak alapján. Szignifikáns különbség a táplált állatoktól, $* < 0,005$, $** < 0,05$.

A jelen találmány azon alapul, hogy azonosítottuk azt a metabolizmus utat, amely a fölösleges fehérje-lebontásért felelős, ami olyan körülmények vagy kóros állapotok esetében fordul elő, amikor a testtömeg súlyos vesztesége áll fenn (lásd kahexia), valamint negatív nitrogén-egyensúly, valamint felfedeztük ennek a lebontási útnak a komponenseit, ami lehetővé teszi, hogy gátoljuk ezt a lebontási utat és a negatív nitrogén-egyensúlyt ezekben a katabolikus állapotokban.

Amint az alábbiakban ismertetjük, az annak tanulmányozására végzett munka, hogy a proteolitikus rendszerek közül melyik felelős a nagymérvű fehérje-lebomlásért a vázizomban a denervációs sorvadás, az éhezés és más katabolikus állapotok (például láz) esetében, kimutatta, hogy az izomban a felgyorsult proteolízis legnagyobb része éhezésnél vagy denervációs sorvadásnál a nem-lizoszómális (citoszólos) ATP-ubiquitin-függő proteolitikus folyamat aktiválódásának következménye, amiről mostanáig általában azt hitték, hogy egy konstitutív folyamat (gyakran "alap fehérje-lebomlás"-nak nevezték), és főleg ez felelős az abnormális vagy rövid-életű szabályozó polipeptidek eliminálásáért. Amint azonban az

alábbiakban ismertetjük, kimutattuk, hogy létezik egy specifikus celluláris válasz, amely az izomfehérje vesztéséhez vezet, és számos különböző fiziológias és patológiás válasz stimulálja. Például az éhezéskor az izomfehérje lebomlásának fokozásához glükokortikoidokra van szükség, valamint alacsony inzulinszintre, lázzal járó fertőzések esetében interleukin-1 és TNF jelenléte is szükséges. Azt is leírjuk, hogy az ubiquitin kritikus szerepet játszik a nem-lizoszómális ATP-dependens folyamatban az izomban denervációs sorvadás, éhezés és hormon- vagy endotoxin kezelés esetében.

Az is lehetséges, hogy az ATP-ubiquitin-dependens lebomlási folyamatban több lépést is érint az izomban az éhezés és idegirtás, de az alábbiakban ismertetett munka eredménye egy új, sebesség-meghatározó komponens izolálása a nagy (1500 kDa) enzim-komplexben, amely hidrolizálja azokat a sejtfehérjéket, amelyek a lebontás céljára az ubiquitin kofaktorkal kovalens kötéssel meg vannak jelölve. Tehát az alábbiakban ismertetett munkával azonosítottunk egy kulcsot a gátláshoz. A leírás szerint egy proteázt azonosítottunk az izomban, amelyről kimutattuk, hogy lényeges szerepet játszik a citoszol ATP-ubiquitin-dependens proteolitikus folyamatában, amelyről már tudjuk, hogy az izomvesztés különböző formáiban aktiválódik. Amint azt a továbbiakban ismertetjük, a proteaszóma lebontó aktivitásának egy peptid-inhibítort is azonosítottunk.

A jelen találmány tárgya eljárás a felgyorsult vagy felfokozott proteolízis gátlására (csökkentésére vagy megelőzésére), amely sorvadó izmokban fellép, és most már ismert

róla, hogy a nem-lizoszómális ATP-igényes folyamat aktiválódásának következménye, amelyben az ubiquitin kulcsszerepet játszik. A jelen eljárásban a felgyorsult proteolízist úgy gátoljuk, hogy zavarjuk az ATP-ubiquitin-dependens folyamatot egy vagy több lehetséges lépésben (azaz csökkentjük az ubiquitin konjugálódását a fehérjékkel, oly módon hogy zavarjuk az UCEN aktivitását, vagy zavarjuk egy vagy több komponensének aktivitását, azaz az új proteáz multipaint, vagy a természetes inhibítort).

A jelen találmány tárgya továbbá egy proteáz felfedezése az izomban, amelynek ATP hidrolízisére van szükség ahhoz hogy működjön, és lényeges szerepet játszik a citoszól ATP-ubiquitin-dependens proteolítikus folyamatban, amely az izomvesztés különböző formáiban aktiválódik. Ez a proteolítikus enzim, amelyet "multipain"-nak nevezünk, egy 500 kDa méretű multimer vagy fehérje-komplex, amely a proteázok papain családjába tartozó tiol-proteáznak tűnik. Hat vagy több nagy molekulasúlyú alegységet tartalmaz (50-130 kDa méretűek), és kimutatták róla, hogy előszeretettel bontja le az ubiquitinnel konjugált fehérjéket egy ATP-függő reakcióban. Számos különböző megfigyelés, amelyeket szintén ismertetünk, azt mutatja, hogy ez a proteáz a sebesség-meghatározó lépés az ubiquitinnel konjugált fehérjék felismerésében és lebontásában. A multipain képes depolimerizálni a többszörös ubiquitin láncokat is egy izopeptidáz aktivitás révén. Érzékeny a szulfhidril-blokkoló ágensekre, a cisztatinra és a rokon polipeptidekre és a peptid-klórmetil-kezonokra, de nem érzékeny a leupeptinre, az E-64-re

vagy a szerin-proteáz inhibitorokra. ATP jelenlétében a multipain 1:1 arányú komplexet képez a proteaszómával; a komplex képződését a cisztatin gátolja.

Tehát az ATP-ubiquitin-dependens lebomlási út gátlása egy új megközelítése a negatív nitrogén-egyensúly kezelésének a katabolikus állapotokban. Ezt befolyásolni lehet például az újonnan felfedezett proteolítikus enzim egy inhibitorának alkalmazásával, aminek az eredménye az izomtömeg vesztésének csökkenése azokban az állapotokban, amikor ez előfordul. Egy ilyen inhibitor használható arra is, hogy csökkentsük a citoszól ATP-ubiquitin-dependens proteolítikus rendszer aktivitását más, az izomsejtektől eltérő sejtekben is. A nagyon jelentős fehérjevesztés általános számos betegtípusnál, beleértve azokat, akik szepszisben, égésekben, traumában, számos különböző formájú rákban, krónikus vagy szisztémás fertőzésekben, neuromotoros degeneratív betegségekben, például izomsorvadásban, acidózisban, gerincvelő vagy idegsérülésben szenvednek. Előfordul olyan betegeknél is, akik kortikoszteroidokat kapnak, valamint olyanoknál is, akiknél a táplálékfelvétel csökkent és/vagy az abszorpció gátolt. Emellett a fehérjelebontási folyamat gátlása valószínűleg érdekes lehet az állatoknál (például az "utazási láz" leküzdésében, ami gyakran vezet jelentős testsúlyvesztéshez a borjaknál és sertéseknél).

Az alábbiakban ismertetjük azt a munkát, amelynek eredménye vezetett azokhoz a felfedezésekhez, hogy a felgyorsult proteolízis az izomban ezeknél az állapotoknál a nem-lizoszómális ATP-igényes folyamat aktiválódásának a

következménye; ennek funkciója a proteolízisben; a proteaszómanınak egy 250 kDa méretű, természetben előforduló inhibítorának izolálása és jellemzése; módszer multipain inhibítorok azonosítására, az ezzel a módszerrel azonosított inhibítorok, és módszer a multipain gátlására, hatása az izom lebomlására.

Annak igazolása, hogy a citoszól ATP-dependens proteolítikus lebomlási útja kritikus a vázizom sorvadásánál

Amint az alábbiakban ismertetjük, különösen a 3-5. példákban, annak megbecslését végeztük el, hogy a felgyorsult proteolízist, ami magától értetődik a vázizom sorvadásánál idegirtás vagy éhezés esetén, a nem-lizoszómális ATP-dependens vagy energia-független lebontó rendszerek katalizálják. Ez a munka világosan igazolja a kapcsolatot a nem-lizoszómális ATP-dependens lebontási út és az izomvesztés között. Amint az alábbiakban ismertetjük, kimutattuk, hogy számos különböző katabolikus állapotban (például idegirtás, éhezés, láz, bizonyos endokrinopátiák vagy metabolikus acidózis) az izomvesztés elsődlegesen a felgyorsult fehérje-lebomlás következménye, és emellett a felgyorsult proteolízis a citoszól ATP-ubiquitin-dependens proteolítikus rendszer aktiválódásának eredménye, amelyről korábban azt hitték, hogy csak az abnormális fehérjék és bizonyos rövid életű enzimek eliminálását szolgálja. Annak a felfedezése, hogy ez a lebontási út a felelős a felgyorsult proteolízisért ezekben a katabolikus állapotokban, azokon a vizsgálatokon alapul, amelyekben a különböző proteolítikus lebontási utakat blokkoltuk, vagy szelektíven mértük az

inkubált izmokban, és ennek a lebontási útnak a komponensei megnövekedett mRNS szintjének felfedezése (például az ubiquitin és a proteaszóma alegységek), valamint az ubiquitin-fehérje konjugátumok megnövekedett szintje a sorvadó izmokban. Amint az alábbiakban ismertetjük, egyszerű állati modelleket fejlesztettünk ki, amelyek jól utánozzák ezeket a katabolikus állapotokat (például használatlanság, sorvadás, szepszis, endotoxin kezelés, ami a lázat és az izomsorvadást utánozza), és vannak módszereink a fehérje-lebontás pontos mérésére az izmokban az in vitro inkubálások során.

Az eredmények azt mutatják, hogy ha in vitro inkubált normális vázizmokat majdnem teljesen megfosztunk az ATP-től, akkor a fehérje-lebontás mértéke 40-70%-kal csökkent. Az ATP-dependens (nem-lizoszómális) proteolitikus folyamatot akkor tudtuk specifikusan és reprodukálhatóan mérni, ha a reziduális ATP-dependens folyamatot kivontuk az összes fehérje-lebontásból, amelyet a kontroll ellenoldali izomban lehet látni. A talpemelő izom idegirtása utáni 1-3 napon belül ez az ATP-dependens folyamat 50-250%-kal megnövekedett, míg a maradék (energia-független) folyamat nem változott. Az ebben az ATP-dependens, nem-lizoszómális folyamatban megfigyelt emelkedés volt az oka a fehérje lebomlás teljes megnövekedésének az idegirtásos sorvadás során, beleértve az aktin gyors lebomlását (amit a megnövekedett 3-metil-hisztidin termelés mutat). Ez a válasz megint megfelelt a megnövekedett fehérje-lebontás legnagyobb részének az éhezés során.

Az élelem megvonása után az izomban az ATP-dependens

proteolízis szelektíven növekedett 150-130%-kal. A táplálás újra kezdése után ez a folyamat 1 napon belül visszatért a normális szintre. Emellett az éheztetett nyulakból származó izomkivonatokban az endogén fehérjék és a ^{14}C kazein ATP-dependens lebomlása körülbelül kétszer gyorsabb mint a táplált állatokból származó kivonatokban. Hasonlóképpen szelektív növekedés lép fel a szépszises izmok ATP-dependens proteolízisében, amit endotoxinok injekciójával lehet modellezni (LPS).

Tehát, amint az alábbiakban igazoljuk, az izomban az ATP-dependens folyamat növekedése egy specifikus sejtválasz, amelyet számos különböző katabolikus állapot aktivál, és ez tűnik felelősnek a legtöbb felgyorsult proteolízisért a sorvadó izmokban. Az ATP-igényes lebontási rendszereket befolyásoló körülmények közé tartozik az idegirtásos sorvadás, az éhezés, a láz, bizonyos endokrinopátiák és az acidózis.

Az ATP-ubiquitin-dependens rendszer aktiválása az izomban éhezés és idegirtásos sorvadás során

Amint az előzőekben ismertettük, egy ATP-dependens folyamat aktiválása tűnik felelősnek a legtöbb megnövekedett fehérjelebontási folyamatnak a vázizomban az éhezés és az idegirtásos sorvadás során. Mivel ez a folyamat magában foglalhatja az ATP-ubiquitin-dependens lebontási utat is, ezért mérjük az ubiquitin mRNS szintjét valamint az ubiquitin fehérje szintjét az ilyen sorvadó izmokban (lásd 6. Példa). Miután a patkányoktól 1 napra megvontuk a táplálékot, két ubiquitin transzkriptum (2,4 és 1,3 kDa) szintjében mutatható ki növekedés

a talpemelő és az extensor digitorum longus izmokban, jóllehet az össz-RNS és össz-mRNS szintjük 50%-kal csökkent. A talpemelő izomban való idegirtás után a poli-ubiquitin mRNS szintjében 2-3-szoros növekedés állt be 1 napon belül, miközben az össz-RNS szintje lecsökkent. Az ubiquitin mRNS szintjének növekedését éhezés vagy idegirtás következtében ezekben az izmokban az ubiquitin össz-mennyiségének egy 60-90%-os növekedése kísérte. Amikor az éheztetett állatokat újra elkezdtek táplálni, izmaikban az ubiquitin mRNS szintje egy napon belül visszatért a kontroll szintre.

A multipain proteáz izolálása és jellemzése

Amint az előzőkben tárgyaltuk, az eukarióta sejtekben számos fehérje lebomlása magában foglalja konjugációjukat egy kis polipeptiddel, az ubiquitinnel, egy ATP-igényes folyamatban. Az UCDEN (Ubiquitin-konjugátum-lebontó-enzim, vagy megapain) lebontja az ubiquitinezett fehérjéket. Az UCDEN pontos természete nem ismert, jóllehet ki lehet mutatni, hogy az 1000-1500 kDa (26S) komplex létrehozható energiától megvont retikulocitákban, három komponens ATP-dependens asszociációja révén, ezek jele CF-1, CF-2 és CF-3 [Ganoth, D. et al., Journal of Biological Chemistry, 263, 12412-12419 (1988)]. A proteaszómáról, amelyet az előzőekben szintén tárgyaltunk, ki lehetett mutatni hogy szintén az UCDEN egyik komponense (CF-3) [Eytan, E. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 7751-7755 (1989); Driscoll, J. and A.L. Goldberg, Journal of Biological Chemistry, 265, 4789-4792 (1990)]. A mai napig azonban a két másik komponens természetét

és funkcióját nem sikerült felderíteni.

A multipain jellemzőinek összefoglalása

Amint az alábbiakban ismertetjük, egy újtípusú proteázt azonosítottunk a vázizomban, és igazoltuk róla, hogy az UC DEN komplex része. Az új proteáz, a multipain egy körülbelül 1500 kDa méretű komplexet képez a proteaszómával és felelősnek tűnik az UC DEN CF-1 komponensének aktív formájáért. A proteaszómával ellentétben, a multipain:

- a) egyedül képes lebontani az ubiquitinezett fehérjéket egy ATP-dependens folyamatban, és nincs, vagy nagyon alacsony aktivitással rendelkezik tipikus proteasóma szubsztrátokkal szemben, azaz például az N-szukcinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-metil-kumarinnal (sLLVT-MCA) és kazeinnel szemben;
- b) érzékeny cisztatin A-ra (ez inhibitora a papain-szerű enzimeknek) és bizonyos alacsony molekulasúlyú inhibitorokra (például a heminre vagy bizonyos peptid-klórmetil-ke-tonokra), de nem érzékeny a szerin-proteázok inhibitoraira (például a diizopropil-fluorofoszfátra), és ennek következtében valószínűleg egy tiol-proteáz;
- c) nem reagál anti-proteasóma antitestekkel; és
- d) legalább hat fő alegységből áll (50-150 kDa), de egyiket sem tartalmazza a proteasóma 20-30 kDa méretű alegységeiből.

Az új proteázról azt is sikerült kimutatni, hogy lebontja a nem-ubiquitinezett fehérjét is (például a lizozimet)

egy ATP-igényes folyamatban, jóllehet kisebb sebességgel bontja, mint az ubiquitinezett fehérjét (ubiquitinezett lizozim), és lebontja az oxidálószerrek által roncsolt hemoglobint egy ATP-dependens mechanizmussal. Az új proteázról kimutattuk, hogy kritikus szerepet játszik kulcs citoszól (nem-lizoszómális) fehérje-lebontó útban, és szinergikusan hat a proteaszómával (egy méretben az UC DEN-hez hasonlítható komplex részeként) az ubiquitinezett fehérjék ATP-dependens lebontásában. A nagy komplexben úgy tűnik, hogy a multipain katalizálja az ubiquitinnel konjugált fehérjék kezdeti hasítását. Összetéve, az ismerttetett felfedezések azt mutatják, hogy a multipain a sebességmeghatározó komponens a felismerésben és az ubiquitinnel-konjugált fehérjék lebontásában.

A multipain tisztítása

Amint azt az 1. példában részletesen ismertetjük, az új proteázt emlős vázizmokból nyerjük ki. Röviden, izmokat preparálunk és dolgozunk fel az 1. példában leírtak alapján, azzal a céllal, hogy izoláljuk azt a frakciót, amely tartalmazza az ubiquitin-fehérje konjugátumokat lebontó aktivitást. Az aktivitást tartalmazó frakciót kromatográfiával tovább szeparáljuk két csúcsra, amelyek ubiquitin-fehérje (ubiquitin- ^{125}I -lizozim) lebontó aktivitást tartalmaznak. A 2. kimutattuk, hogy az ubiquitinezett lizozim ATP-vel stimulált legnagyobb részéért felelős, és erős aktivitással rendelkezik az oxidálószerrek által roncsolt hemoglobinnal szemben, de kicsi az aktivitása az N-szukcinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-metil-kumarinnal (sLLVT-MCA) szemben, amely a proteaszóma jellegzetes

szubsztrátja (1. ábra). Az aktivitást tovább tisztítjuk, és így kapunk egyetlen aktív csúcsot, amelynek molekulásúlya körülbelül 440,000 kDa. Látszólagos molekulásúlya 540 kDa.

A multipain jellemzése

A tisztított proteáz jellemzése azt mutatja, hogy legalább hat fő alegységből áll (molekulásúly értékek 40,000 és 150,000 között változnak), és nem tartalmaz egyetlen a proteaszómára jellemző 20-30 kDa méretű csíkot sem.

A proteáz katalitikus tulajdonságait megvizsgáltuk (1. példa). Az Ubiquitin-lizozim hidrolízisét ötszörösre serkenti az ATP hozzáadása, a lizozim lebontását pedig háromszorosára. Ezzel szemben, a természetes és az oxidálószerekkel roncsolt hemoglobinnak a proteázzal való lebontása független az ATP-től. Az oxidálószerrel roncsolt hemoglobint 15-ször gyorsabban bontja le mint a természetes hemoglobint.

A proteázról azt is kimutattuk, hogy az ubiquitinezett szubsztrátot részesíti előnyben (a nem-ubiquitinezett szubsztráttal szemben). A proteaszóma, ezzel szemben az ubiquitin-konjugátumokkal szemben nagyon alacsony aktivitást mutatott, ha mutatott ilyet egyáltalán. A proteolitikus reakció természetét, amellyel a proteáz az ubiquitin-konjugátumokat lebontja, úgy becsültük meg, hogy meghatároztuk az Ubiquitin- ^{125}I -lizozimból keletkező savban oldódó termékek méretét. Ez a becslés azt mutatta, hogy a proteáz egy endopeptidáz, és láthatóan nincs exopeptidáz aktivitása.

Annak a lehetőségét, hogy az új proteáz a proteaszómával azonos komponenseket tartalmaz, a humán máj-részecske elleni

monoklonális antitesttel vizsgáltuk [II. táblázat; Matthews, W. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 2597-2601 (1989)], valamint a patkány máj proteaszóma elleni poliklonális antitesttel (1. példa). A kereszt-reaktivitásnak ezt a hiányát Western blot elemzéssel erősítettük meg; a két antitest nem volt képes reakcióba lépni az új proteázzal.

Az enzim-inhibítorok hatása a multipainra

A különböző típusú enzim-inhibítorok hatásait is vizsgáltuk, amint azt az 1. példában összegezzük. Az eredményeket az I. táblázatban mutatjuk be. A diizopropil-fluorofoszfát (DFP), a szerin-proteázok irreverzibilis inhibítora nem érintette a konjugátum lebomlását. Az o-fenantrolin, amely a nehézfémeket viszi kelátokba, mutatott némi gátló hatást. Ezzel szemben az N-etil-maleimid (NEM), egy tiol-blokkoló ágens és a tojásfehérje cisztatin (cisztatin A), amelyek számos papainszerű tiol-proteáz erős inhibítorai, erősen gátolták ezt az aktivitást. Hasonló koncentrációkban a cisztatin B (stefin B) 55%-os gátlást mutatott, a cisztatin C-vel pedig nem volt megfigyelhető jelentős hatás. Jóllehet ez az új aktivitás tiol-proteáznak tűnik, ezt csak 30%-ban lehetett gátolni a leupeptinnek, és egyáltalán nem lehetett gátolni E64-gyel, pedig mind a kettő számos tiol-proteáz gátol (például a lizoszómális enzimeket vagy a calpainokat). A leupeptinre és az E64-re való érzékenységet erősen befolyásolja az elhasított kötést megelőző szekvencia, és nem mindegyik tiol-proteáz érzékeny rájuk. A hemin, amely képes teljesen gátolni az ATP-ubiquitin-dependens proteolitikus rendszert és a proteaszómát,

szintén blokkolja az új proteáz konjugátumot degradáló aktivitását.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az új enzimnek az aktív helyén tiol-csoport található. A hatékony inhibitorok mintázata világosan elkülöníti ennek az új enzimnek az aktivitását a proteaszómaétól, amely ha aktiválódik, akkor szerin-proteázként hat, többszörös katalitikus hellyel. A különböző inhibitorok hatása a ^{125}I -lizozim (nem-ubiquitinezett) és az oxidálószer által roncsolt hemoglobin új proteáz általi lebontására hasonló eredményeket adott, mint amilyeneket az ubiquitin-lizozimmal kaptunk. Ez azt sugallja, hogy egyetlen típusú aktív hely vesz részt ezeknek a különböző típusú fehérjéknek a hidrolízisében.

Megvizsgáltuk, hogy az ubiquitinezett és nem-ubiquitinezett fehérjék ugyanahhoz a helyhez kötődnek-e az új proteázon (1. példa). Az eredményekkel nem sikerült kompetíciót igazolni a lizozim, a hemoglobin és az oxidálószerrel kezelt hemoglobin között (azaz ezek közül a szubsztrátok közül egyik sem csökkentette az Ubiquitin- ^{125}I -lizozim degradációját). Ez azt sugallja, hogy az új proteáznak specifikus kötő-doménjei vannak, amelyek felismerik mind az ubiquitinezett mind a nem-ubiquitinezett fehérje szubsztrátokat.

A multipain-proteaszóma komplex

Az új proteázzal sikerült kimutatni, hogy egy 1500 kDa méretű komplexet képez az alaposan tisztított proteaszómával, ha a két anyagot ATP és Mg^{2+} jelenlétében inkubáljuk. A keletkező komplexről igazoltuk, hogy lebontja az ubiquitinezett lizozimet,

és az ubiquitin-konjugátum lebontó aktivitást blokkolni lehet anti-proteaszóma antitestekkel való immunprecipitációval.

A multipain és a proteaszóma között létrejövő komplex nagyon hasonlónak illetve azonosnak tűnik az 1500 kDa méretű ubiquitin-konjugátum degradáló enzimmel, vagy a 26S proteolítikus UC DEN komplexszel, amelyet korábban izoláltak retikulocitákból és izomból. Ezeknek a struktúráknak nagyon hasonló a méretük, labilisak, és ugyanazok a nukleotidok aktiválják. Ugyanazokat a szubsztrátokat bontják le (ubiquitin-lizozim konjugátumok, kazein és fluorometriás peptidek), és ugyanazokra az inhibitor csoportokra érzékenyek. Az itt ismertetett komplex, az előzőekben izoláltakhoz hasonlóan, a jellemző 20-30 kDa méretű proteaszóma alegységeket tartalmazza, plusz számos nagyobb alegységet, beleértve a multipainban talált hat nagy polipeptidet. Az itt keletkező komplex legalább 10-12 polipeptidet tartalmaz, méretük 40-150 kDa között van (2. ábra).

Számos különböző megfigyelés azt sugallja (2. példa), hogy a proteaszóma és a multipain azonos mennyiségben van jelen a komplexben. Az itt ismertetett felismerések is igazolják, hogy a proteaszóma és a multipain szinergisztikusan hat az ubiquitinezett fehérjék ATP-dependens lebontásában. Például, amint azt a 2. példában ismertetjük, ha csak a multipain bontja le az ubiquitin- ^{125}I -lizozimet, akkor az egyetlen ^{125}I -dal jelzett termék egy körülbelül 11 csoportból álló peptid. Ha azonban a proteaszóma-multipain komplex bontja le ezt a szubsztrátot, akkor ezt sokkal gyorsabban teszi (2. példa), és csak kisebb, körülbelül 3-5 csoportból álló peptideket hoz

létre.

A proteaszóma egy endogén inhibítorának izolálása

Amint azt a 7. példában ismertetjük, a proteaszómának egy 40 kDa méretű regulátorát, amely a proteaszóma proteolitikus aktivitását gátolja, sikerült retikulocitákból megtisztítani, és igazolni róla, hogy egy ATP-kötő fehérje, amelynek felszabadulása láthatóan aktiválja a proteolízist. Az izolált inhibítor egy 250 kDa méretű multimer formájában létezik, és meglehetősen labilis (42°C-on). Stabilizálható ATP vagy az ATP egy nem hidrolizálható analógjának a hozzáadásával, jöllehet a tisztított inhibítornak nincs szüksége ATP-re, hogy gátolja a proteaszóma működését, és nem rendelkezik ATP-áz aktivitással. Az inhibítorról sikerült kimutatni, hogy az 1500 kDa-os komplex egy lényeges komponensének felel meg. Ha a retikulocitáktól megvonjuk az ATP-t, akkor az 1500 kDa méretű UC DEN-t nem találjuk. Ehelyett Ganoth és munkatársai [Ganoth, D. et al., Journal of Biological Chemistry, 263, 12412-12419 (1988)] három komponenst, a CF-1-et, a CF-2-t és a CF-3-at azonosították (amint az előzőekben már említettük). Az alábbiakban ismertetett módon izolált inhibítor számos kritérium alapján a CF-2-vel tűnik azonosnak. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az inhibítornak szerepe van az UC DEN komplex ATP-dependens mechanizmusában. Lehetséges például, hogy a fehérje lebontás során az 1500 kDa méretű komplexben az ATP hidrolízis a 40 kDa inhibítor funkcionális felszabadulásához vezet, ideiglenesen lehetővé teszi a proteaszóma aktivitást, és az ubiquitinezett fehérjék indítják be ezt a mechanizmust.

A tisztított faktorról sikerült igazolni, hogy gátolja mind a fluorogén tetrapeptid mind a fehérje szubsztrátok proteaszómával való hidrolízisét, a 7. példában leírtak alapján. Ha az inhibítort, a proteaszómát és a részlegesen tisztított CF-1-et ATP és Mg^{2+} jelenlétében keverjük össze, akkor az 1500 kDa méretű komplexet helyre lehet állítani, és az ubiquitin- ^{125}I -lizozim lebomlása létrejön.

A proteaszóma többszörös peptidáz aktivitása ezen inhibítorának izolálása a farmakológiai beavatkozásnak egy vonzó pontját teszi elérhetővé. Amint az a továbbiakban ismertetjük, ezzel egy természetes inhibítort állítunk elő, amelynek a szerkezeti és működési jellemzőit meg lehet becsülni, hogy a proteaszóma inhibítorok kifejlesztésében használható információkat kapjunk.

A jelen találmány felhasználási lehetőségei

Az ismertetett megfigyelések megváltoztathatják az oldható ATP-ubiquitin-dependens lebontási út fiziológiai szerepéről jelenleg elterjedt véleményeket, amelyről általában az a felfogás terjedt el, hogy egy konstitutív folyamat (gyakran "alap fehérje-lebontási folyamat"-nak nevezik), és elsődlegesen ez a felelős abnormális valamint rövid életű szabályozó polipeptidek eliminálásáért. Amint azt első ízben itt igazoljuk, a testsúlyvesztés és negatív nitrogén-egyensúly, amelyet számos kóros állapotban vagy körülmény mellett jellegzetesen tapasztalni lehet, az ezen a lebontási úton felgyorsult fehérje lebontás eredménye. Az izomvesztés, amely az idegirtás, éhezés, láz vagy metabolikus acidózis következtében lép fel, főleg ennek

a felgyorsult fehérje-lebontásnak a következménye. Most, hogy a felelőssé tehető lebontási utat és annak kulcs-elemeit azonosítottuk (azaz a multipaint és egy természetes proteaszóma szabályozót), lehetséges a felgyorsult fehérje-lebontás lassítása vagy megszüntetése, és ezáltal a testsúlyvesztés valamint a negatív nitrogén-egyensúly helyreállítása. Az ATP-ubiquitin-dependens lebontási útban számos lépés érinthető az izomban éheztetéssel és idegirtással, de a szabályozás egy tiszta pontja az ubiquitin mRNS képződésének szabályozása, amint azt a 6. példában ismertetjük. Emellett, az izomfehérjék ubiquitinnel való megnövekedett konjugációja is igazolható ilyen körülmények között.

Az ilyen megfigyelések szolgálhatnak olyan hatékony módszerek alapjául, amelyekkel lassítani lehet ezt a proteolitikus folyamatot, és így küzdeni lehet az izomvesztés és negatív nitrogén-egyensúly ellen olyan körülmények között, mint a betegségekhez kapcsolható kachexia, amely betegség lehet a rák különböző típusa, AIDS, fertőzés, idegirtásos sorvadás (inaktiválás és használatlanság), szteroid terápia és sebészet. Ez hasznos lehet abban, hogy az ilyen betegségek vagy állapotok olyan következményeit elkerüljük, amelyek súlyosan gátolják a betegeket és jelentősen csökkentik az egyének regenerálódó képességét. Pontosabban, az ATP-ubiquitin-dependens lebontási út részleges gátlása a kezelés egyik megközelítési módja. Ennek eredménye a felgyorsult fehérje-lebontás csökkentése (teljes vagy részleges), amely számos fiziológiás és patológias állapotban előfordul, de nem érinti azokat a normális lebontási

folyamatokat, amelyek ezen az úton zajlanak le.

Az itt ismertetett munka eredményeképpen a multipain hozzáférhető, és kimutattuk róla, hogy kritikus szerepet játszik a citoszólos proteolitikus lebontási útban, amelyről igazoltuk, hogy az izomvesztés különböző formáiban aktiválódik. A jelen találmány szerinti tisztított multipain hozzáférhetővé teszi, hogy meghatározzuk az enzim aktív helyét vagy proteolitikus alegységét, ismert módszerek alkalmazásával. Például, mivel a proteolízist a cisztatin gátolja ($K_i < 1 \mu\text{mol/l}$), az aktív alegység affinitás-kromatográfiája elvégezhető csirke cisztatinnal mint ligandummal, amint azt papainnal is csinálják. Egy másik módszer szerint a ^{125}I -vel jelzett cisztatin multipainnal való keresztkötése bifunkciós reagensek, például dietil-szuberimidát felhasználásával, szintén lehetővé teszi, hogy a cisztatin-kötő komponenst jelezzük. Egy másik módszer szerint radioaktív peptid-klórmetil-keetonokat (CK-k) használhatunk ezeknek az aktív helyeknek a kovalens jelzésére. Emellett új módszereket fejlesztettünk ki ezeknek az inhibítoroknak ^{125}I -vel való jelzésére. A blokkoló CBZ csoportot eltávolítva a CBZ-Ala-Arg-Arg-MNA-ról, majd reagáltatva ^{125}I -Bolton-Hunter reagenssel, lehetségesnek találtuk, hogy ezt az inhibítort nagy specifikus aktivitással jelezzük. A multipain aktív helye jelezhető. Ha egyszer egy ilyen aktív alegységet azonosítunk, akkor a kritikus polipeptid klónoozható, amint azt az alábbiakban ismertetjük.

Más multipain alegységek működését is meghatározhatjuk. Például érdekes az ATP-kötő alegység funkciójának meghatározása

(amely feltehetőleg egy ATP-áz), és annak az alegységnek az azonosítása, amely az izopeptidáz aktivitásért felelős, amely a poliubiquitin láncokat depolimerizálja és a szabad ubiquitint regenerálja. Ha egyszer az aktív helyet vagy alegységet azonosítottuk, akkor kristályosítható, és a kristályszerkezet jellemzői (koordinátái) használhatók az ésszerű gyógyszertervezés alapjául. Például, az aktív alegységet egy ismert inhibítorral képzett komplexeként lehet kristályosítani, például cisztatin A-val, és a kölcsönhatásról kapott információt használjuk multipain inhibítorok tervezésére, amelyek lehetnek "cisztatin-szerű" anyagok (azaz cisztatin analógok), vagy más molekulák, amelyek a multipain aktív helyéhez kötődnek, és megakadályozzák, hogy a multipain működjön, akár egyedül, akár egy komplex tagjaként. Az inhibítorok lehetnek például peptidek vagy peptid-szerű molekulák (például peptid-aldehid, peptid-klórmetil-ke-ton vagy peptid-izokumarin). A multipain aktív hely szerkezetének ismerete lehetővé teszi, hogy olyan gyógyszereket tervezzünk, amelyek arra használhatók, hogy zavarják az ATP-dependens proteolítikus folyamatot, amelyben a multipain a kulcsszereplő, és amelynek aktiválása, amint azt elsőként az alábbiakban mutatjuk ki, felelős a legtöbb felfokozott fehérjelebontásért, ami a vázizomban fordul elő éhezés, idegirtás és fertőzés során. Inhibítorok készíthetők, amelyek specifikus kölcsönhatásba lépnek egy adott alegységgel vagy polipeptiddel, amely a multipain egy komponense.

A tisztított multipaint is használhatjuk peptid-szekvencia információk nyerésére olyan oligonukleotid próbák

előállításához, amelyek használhatók multipain klónozására humán vagy egyéb emlős cDNS könyvtárakból. A tisztított multipain egy részének aminosav szekvenciáját ismert módszerekkel kaphatjuk meg [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)], és az aminosav szekvenciát kódoló nukleotid szekvenciát ebből vezetjük le. A levezetett szekvenciával rendelkező oligonukleotidokat ismert módszerekkel állíthatjuk elő [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)], és használhatjuk humán vagy más emlős cDNS könyvtár átvizsgálására, olyan szekvenciákat keresve, amelyek hibridizálnak a próbával. A könyvtárakból kapott cDNS szekvenciákat azután egy megfelelő vektorba építhetjük be (például pBR322, pUC), majd egy megfelelő gazdaszervezetben (például *Escherichia coli* K12) expresszálhatjuk, így állítva elő rekombináns úton termelt multipaint vagy multipain komponenseket. Az ily módon termelt multipaint ismert technikák alkalmazásával lehet azonosítani (például a fizikai jellemzők alapján, a tisztított multipainnal reagáló antitestekkel való reakció alapján, valamint azon az alapon, hogy képes-e komplexet képezni a proteaszómával).

A klónozott gén expressziója hasznos abból a szempontból, hogy a multipain proteolitikus alegységének hozzáférhetősége nő. Jóllehet kívánatos, hogy a proteolitikus alegységet aktív formában állítsuk elő, a multipain egyéb alegységeire is szükség lehet a helyes háromdimenziós szerkezet kialakításához és a stabilitáshoz. Ennek az alegységnek nagy

mennyiségben való hozzáférhetősége lehetővé teszi, hogy kristályosítsuk, akár önmagában, akár a cisztatinnal képzett komplexe formájában. A keletkező kristályokat Röntgen-diffrakciós elemzésnek vetjük alá, és a kristályszerkezetről kapott információkat használhatjuk új gyógyszerek tervezésében, illetve olyan, már létező gyógyszerek kiválasztásában, amelyek gátolhatják a multipaint.

A multipain gének szekvenálhatók és a nukleotid szekvencia alapján készített oligonukleotid próbák (azaz olyan próbák, amelyek azonosítják, vagy hibridizálnak a multipain génhez) használhatók hasonló gének azonosítására más emlősökben, valamint egyéb sejttípusokban. Amint azt a továbbiakban alkalmazzuk, a multipain gének szakkifejezés olyan DNS molekulára vonatkozik például mint a leírás szerint kapott tisztított multipain gént kódoló DNS, egy multipain alegységet kódoló DNS, egy olyan fehérjét vagy polipeptidet kódoló DNS, amely lényegében ugyanolyan aktivitással és funkcionális jellemzőkkel rendelkezik mint a leírások szerint kapott tisztított multipain, vagy egy olyan DNS, amely a multipain gének alapján készített oligonukleotid próbákhoz hibridizálódik.

A multipainnal reagáló, vagy azt felismerő antitesteket ismert módszerekkel lehet előállítani, és szintén a jelen találmány tárgyát képezik. Poliklonális szérumokat úgy állíthatunk elő, hogy egy megfelelő állatot (például nyulat, egeret, majmot) egyszer vagy többször tisztított vagy rekombináns úton előállított multipainnal injektálunk, majd az antitest termeléshez elegendő idő elteltével vért veszünk az

állattól. A monoklonális antitesteket ismert technikákkal állíthatjuk elő, például Kohler és Milstein módszerével. Akármelyik úton készített antitesteket használhatunk a multipain vagy alegységei azonosítására más szövetekben és más állatokban.

Amint az alábbiakban ismertetjük, az ubiquitin mRNS szint megnő (azaz a poli-ubiquitin gén specifikusan indukálódik) olyan körülmények között, amely körülmények között megnövekedett ATP-dependens fehérje lebontás folyik (azaz például sorvadó izmok, éhezés). Ezek a szintek normális értékre térnek vissza, ha a megnövekedett lebomlás megfordul (azaz például újra táplálás során). Egy megfelelő oligonukleotid próbát készíthetünk az ubiquitin mRNS kimutatására és annak meghatározására, hogy a normál mennyiségnél nagyobb mennyiségben van-e jelen. Ezt használhatjuk a felgyorsult fehérje-lebontás indikátoraként.

Azokat a sejteket, amelyekben a multipain gén expresszálódik (azaz azokat a sejtvonalakat, amelyekben expresszálódik) használhatjuk inhibítorok keresésére. Egy másik módszer szerint a tisztított multipain vagy a rekombináns úton előállított multipain használható inhibítorok keresésére. A potenciális multipain inhibítorok keresését úgy végezhetjük, hogy meghatároz egy potenciális inhibítornak azt a képességét, hogy zavarja-e a proteáz aktivitását. Például egy potenciális inhibítor kombinálódhat a multipainnal, egy ubiquitinezett fehérje szubsztráttal (azaz például ubiquitinezett lizozimmal), ATP-vel és Mg^{2+} ionnal, olyan körülmények között, amelyek megfelelnek ahhoz, hogy a proteáz lebontsa az ubiquitin-fehérje

konjugátumot. Egy kontroll, amely ugyanazokat a komponenseket tartalmazza, a potenciális inhibítor kivételével, használható összehasonlítási célra. Az inhibítorokat azon képességük alapján azonosítjuk, hogy csökkentik a konjugátum lebomlását. A mikroorganizmusok fermentlevelei is hasonlóképpen vizsgálhatók, hogy tartalmazznak-e multipain inhibítor antibiotikumot.

A multipain inhibítorok, valamint a proteaszóma inhibítorok és UCEN inhibítorok használhatók arra, hogy csökkentsük (teljesen vagy részlegesen) a nem-lizoszómális ATP-dependens fehérje-lebontást, amelyről igazolni lehetett, hogy az éhezés, idegirtás vagy alulhasználtság (inaktivitás), szteroid terápia, fertőzés és más körülmények közötti megnövekedett fehérje-lebomlás legnagyobb részéért felelős. Amint az alábbiakban ismertetjük, a cisztatin egy multipain inhibítor és használható arra, hogy zavarja a multipain funkcióját, önmagában, illetve a 700 kDa-os proteaszómával képzett 1500 kDa-os komplex részeként. A cisztatin analógok illetve más molekulák, amelyek zavarják a multipaint és/vagy a komplex képződést, szintén használhatjuk.

Lehetséges az is, hogy megbecsüljük az alacsony molekulasúlyú proteáz inhibítoroknak azt a képességét, hogy mennyire képesek gátolni a multipaint, vagy hogyan kell módosítani ahhoz, hogy módosítsák a multipaint. Például az E-64 és származékai potenciális inhibítorai a legtöbb tiol-proteáznak. Ezek azonban nem képesek gátolni a multipaint. Az E-64-nek számos új analógját és származékát szintetizálták, és ezek, valamint a jelen munkán alapuló egyéb származékok

multipain gátló hatása is megbecsülhető. Különböző peptid-klórmetil-kezonok (CK-k) irreverzibilisen reagálnak mind a szerin- mind a tiol-proteázokban a hisztidin aktív helyekkel. Bizonyos tripeptid CK-k-ről (például a CBZ-ala-arg-arg-CK) kimutattuk, hogy gátolják a multipain, és az 1500 kDa-os komplexet viszonylag alacsony koncentrációban ($50 \mu\text{mol/l}$). Az ilyen ágenseket nagyon specifikussá tehetjük, oly módon hogy átalakítjuk a peptid szekvenciáját és így megvizsgáljuk a multipain gátló hatását. Más vegyületek, amelyek vizsgálhatók, lehetnek peptid-diazometánok, amelyek a tiol-proteázok szelektív inhibítorai, az izokumarinok, amelyek heterociklusos inhibítorok, valamint a különböző szintetikus β -laktámok. Az előzetes adatok azt sugallják, hogy ezek közül a vegyületek közül néhány képes az 1500 kDa méretű ATP-dependens komplex gátlására.

Különösen érdekes potenciális multipain inhibítorok a cisztatin és a cisztatin szupercsalád tagjai (Stefin A és B, cisztatin c, kininogen). A papainnal képzett komplexük terciér szerkezetéről szerzett információk, valamint a klónozott humán cisztatin A helyspecifikus mutagenézise jó alap a tulajdonságok meghatározásában, a mechanizmusok meghatározásában, vagy éppen a multipain proteolitikus alegysége szerkezetének meghatározásában.

Szükséges annak meghatározása, hogy bármely olyan inhibítor, amelyet hatékonynak találtunk az 1500 kDa-os komplexszel szemben, képes-e szelektíven gátolni a fehérje lebomlást az érintetlen sejtekben. Először, az izom nyers

kivonatát használjuk az inhibítor azon képességének vizsgálatára, hogy mennyire tudja blokkolni a teljes ATP-ubiquitin-dependens lebontási utat. Ezekben a vizsgálatokban radioaktívan jelzett szubsztrátokat használunk valamint endogén fehérjéket, amelyeknek a lebomlása könnyen követhető a szabad tirozin megjelenésének mérésével [I.C. Kettelhut et al., Diabetes/Metab., Rev., 4, 751-772 (1988); M.Tischler et al., Journal of Biological Chemistry, 257, 1613-1621 (1982)]. Az ígéretes ágenseket azután ép patkányizmokon és tenyésztett sejteken vizsgáljuk, azzal a céllal, hogy meghatározzuk, mennyire hatékonyak az intracelluláris proteolízis ellen, mennyire képesek bejutni az emlős sejtekbe, és milyen hatással vannak a sejtek életképességére.

A gyógyszerjelöltek vizsgálatának különösen jó megközelítése, ha azt akarjuk vizsgálni, hogy mennyire gátolják az ATP-ubiquitin-dependens lebontási folyamatokat, ha olyan tenyésztett sejtekben végezzük a vizsgálatokat, amelyekben az a rövidéletű fehérje keletkezik, amelynek az ubiquitin-dependens lebomlását vizsgáljuk. A folyamat gátlása ahhoz vezet, hogy a fehérje felhalmozódik a citoszólban. Annak mértékét, hogy a fehérje mennyire halmozódik fel a citoszólban, ismert módszerekkel meghatározhatjuk. Például, a folyamat egy potenciális inhibítorát a tenyésztett, rövidéletű enzimet termelő sejtekbe juttatjuk, és meghatározzuk annak mértékét, hogy az enzim a potenciális inhibítor jelenlétében milyen mennyiségben fordul elő, a távollétében mérhető enzimszinthez viszonyítva. Ha az enzim a potenciális inhibítor jelenlétében

felhalmozódik, akkor ez azt jelzi, hogy az ATP-ubiquitin-dependens folyamatot a vizsgált potenciális inhibitor gátolja. A tenyésztett sejteket, például COS sejteket használhatjuk erre a célra, amelyeket stabilan transzformáltunk egy olyan génnel, amely egy olyan rövidéletű fehérjét kódol, amelynek a lebomlása ubiquitin-dependens (azaz például egy rövidéletű enzim, egy mutáns β -galaktozidáz, amelynek abnormális N-terminálisa van, és ez az abnormális N-terminális jelzi azt, hogy az ubiquitin-dependens lebomlás gyorsan lejátsszódik rajta. Például *Escherichia coli*-ből származó mutáns vagy rekombináns β -galaktozidázt, amelynek felezési ideje körülbelül 15 perc, és amelynek lebomlása ubiquitin-dependens, kódoló génnel stabilan transzformált COS sejtek használhatók [Bachmair, A. et al., *Science*, 234, 179-186 (1986); Gonda, D.K. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 264, 16700-16712 (1989)]. Más mutáns enzimek is használhatók, amelyek gyorsan lebomlanak. A mutáns β -galaktozidáz felhalmozódása a COS citoszólban egy olyan anyag jelenlétében, amelynek azt a tulajdonságát vizsgáljuk, hogy képes-e gátolni a folyamatot (azaz egy potenciális inhibitor), azt jelzi, hogy a folyamat gátlódik. A megfelelő kontroll az, ha a COS sejteket ugyanilyen körülmények között tartjuk, de a potenciális inhibitor nélkül. Ezt a megközelítést használhatjuk mikrobiális eredetű vagy vegyület-bankokból származó hatékony inhibitorok keresésénél.

Ha egy anyagot, amely gátolja a fehérjeszintézist, hozzáadunk ilyen sejtekhez, akkor az enzimaktivitás és az antigén (fehérje) egyforma gyorsasággal tűnik el, és ezzel

lehetővé teszi, hogy megerősítsük a potenciális inhibítor hatását a proteolízisre. A sejtek növekedésének, ATP tartalmának és a fehérjeszintézisnek a mérése az ilyen sejtekben lehetővé teszi, hogy azonosítsunk (és elkerüljünk) erősen toxikus anyagokat, ami nagyon hasznos, mivel bármely olyan anyag, amely elvonja az ATP-t a sejtekből, a proteolízis hatékony inhibítorának tűnhet.

Az inhibítorral kezelt sejtekben az is adhat információt, ha impulzus-jelzéses izotópos módszereket használunk az endogén rövidéletű és hosszú életű fehérjék lebomlási sebességének követésére, különösen azoknál a fehérjéknél, amelyekről ismert, hogy az ubiquitin-dependens úton bomlanak le (ilyen például a myc vagy fos onkogén termék).

Bármely hatékony inhibítort vizsgálhatunk in vivo, inkubált patkányokban. Az ilyen kísérletekben az egyik láb talpemelő vagy extensor digitorum longus izmait inkubálhatjuk egy inhibítorral, míg a másik oldali, azonos izom szolgál kontrollként. Az ilyen megközelítés nagy előnye, hogy nagyon érzékeny, olcsó és nem igényli az állatok izotópos jelölését [I.C. Kettelhut et al., Diabetes/Metab., Rev., 4, 751-772 (1988); K. Furuno et al., Journal of Biological Chemistry, 265, 8550-8557 (1990)]. Megfelelő tapasztalatok birtokában hat állattal könnyen demonstrálni lehet statisztikailag szignifikáns változásokat a teljes fehérje-lebomlásban vagy szintézisben, 10-15%-os, nagyon alacsony szinten is. Az izomfehérjék átlagos turnover idejéből számítható, hogy a proteolízisben még az ilyen nagyságrendű változások is terápiás előnyt jelenthetnek; ha két

hétig sikerül fenntartani, akkor a proteolízisnek még a csak 15%-os csökkenése is az idegirtott izom tömegének megduplázásához vezethet. Az is érdekes lehet, ha követjük az inhibítor hatásait a miofibrilláris fehérjékre, amelyek az izomtömeg 60%-át képezik, és a fő fehérjetartalékot jelentik a szervezetben. Főleg ezek a fehérjék vesznek el az idegirtás vagy éhezés során [K. Furuno et al., Journal of Biological Chemistry, 265, 8550-8557 (1990)]. A miofibrilláris komponensek lebomlását specifikusan lehet követni a 3-metil-hisztidin izmokból való felszabadulásával, ami az aktin lebomlásának specifikus vizsgálata [K. Furuno et al., Journal of Biological Chemistry, 265, 8550-8557 (1990); B.B. Lowell et al., Biochem. J., 234 (1986)]. Különösen érdekes lehet ha az ilyen vizsgálatokat olyan izmokkal végezzük, amelyek idegirtásos sorvadáson estek át (használatlanok), vagy olyanokkal, amelyek éheztetett vagy endotoxinnal kezelt állatokból származnak. Az ilyen szövetekben a fehérjelebomlás összességében fokozódik, és ezáltal nagyon hasonlít a humán betegségekre, de jól meghatározott in vitro körülmények között vizsgálhatók. Ha ilyen preparátumokban igazoljuk a hatékonyságot, akkor ez nagymértékben felgyorsítja a gyógyszerfejlesztési folyamatot.

A fehérjelebontási folyamatok gátlása számos különböző körülmény között hasznos lehet, amelyek esetében izomvesztés fordul elő, ezzel fokozza az előidéző ok hatásait, és tovább gyengíti az érintett egyént. Ilyen körülmény például a rák, az AIDS, az izomvesztés sebészeti beavatkozás vagy sérülés után (a beteg mozdulatlansága vagy bénulása miatt), fertőzés, vagy

bármely okú kahexia, kortikoszteroid kezelés, vagy bármely olyan esemény vagy állapot, amely aktiválja, vagy amelynek eredménye a negatív nitrogén-egyensúly.

A multipain inhibítorokat azért is beadhatjuk, hogy megakadályozzuk a súlyvesztést az állatoknál, illetve működhetnek növekedést elősegítő anyagokként is. Mivel úgy hatnak, hogy gátolják a fehérje lebomlását, ezért elősegítik a nettó fehérje-akkumulációt, és ezzel a fehérjeszintézist sokkal hatékonyabbá tehetik a növekedés elősegítésében. Például beadhatjuk ezeket az anyagokat állatoknak, azzal a céllal, hogy elkerüljük az izomtömeg epidémiás elvesztését (nettó fehérje lebomlás), amelyet utazási láznak is neveznek, ami általában akkor fordul elő, ha a birkákat vagy a borjakat mozdulatlanságra kényszerítik, például szállítás során.

A jelen találmány szerinti multipain inhibítorok számos különböző úton beadhatók (például intravénásan, szubkután, intramuszkulárisan) és általában fiziológiásan elfogadható hordozóval együtt adjuk be (például fiziológiás sóoldattal). A beadott multipain inhibítor mennyiségét tapasztalati úton kell meghatározni, és olyan megfontolásokon alapul, mint hogy milyen inhibítort használunk, a beteg állapota, valamint mérete és súlya. Beadhatjuk egymagában, vagy egyéb multipain inhibítorral együtt, vagy egy másik lebontási út inhibítorával együtt (például a lizoszómális vagy Ca^{2+} dependens lebontási út), amely felelős az izomtömeg elvesztéséért.

A jelen találmányt az alábbi példákon keresztül mutatjuk be, amelyeket nem tekintünk a találmány oltalmi körének

korlátozóinak.

1. Példa

A multipain izolálása és jellemzése

Kísérleti eljárások

Anyagok

A DEAE cellulózt (DE52) a Whatman Biosystems Ltd.-től (Maidstone, Kent, Anglia) vásároljuk. Az ubiquitint, a kazein ammónium-szulfátot (I-es minőség), a nukleotidokat és az N-szukcinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilkumarint (sLLVT-MCA) a Boehringer-től vásároljuk (Mannheim, Németország). A többi leírt peptidet a Bachem Bioscience-től (Philadelphia, PA) vagy az Enzyme Systems Products-től (Livermore, CA) vásároljuk. A frissen tisztított humán hemoglobint (1 mmol) Fagan, J.M. és munkatársai leírása szerint állítjuk elő [Fagan, J.M. et al., Journal of Biological Chemistry, , 261, 5705-5713 (1986)], majd ^{14}C -formaldehiddel jelezzük, Rice és Means leírása szerint [Rice, R.H. and Means, G.E., Journal of Biological Chemistry, 246, 831-832 (1972)]. Oxidálószerrel roncsolt hemoglobin előállításához a ^{14}C -metil-hemoglobint $\cdot\text{OH}$ és $\cdot\text{O}_2$ gyökök hatásának tesszük ki, amelyeket ^{60}Co besugárzással állítunk elő 50 nmol oxigéngyök per nmol fehérje koncentrációban [Davies, K.J.A., Journal of Biological Chemistry, 262, 9895-9901 (1987)]. A kazeint és a lizozimet ^{14}C -formaldehiddel és ^{125}I -dal jeleztük, az előzőekben leírt módon [Waxman et al., Journal of Biological Chemistry, 262, 2451-2457 (1987)].

A kivonatok és az új enzim előállítása

New-Zealand fehér nyulakat (4-5 kg) CO_2 -os fullasztással

megölünk, majd a horpaszizmokot gyorsan kivágjuk. Az izmokról a zsírt és a kötőszövetet levágjuk, majd előre lehűtött húsdarálón ledaráljuk. Körülbelül 250 g izmot (nedves súly) szuszpendálunk jéghideg pufferben (3 ml/g szövet), összetétele: 20 mmol/l TRIS-HCl pH=8,0, 1 mmol/l $MgCl_2$, 0,1 mmol/l EDTA és 1 mmol/l DTT, majd egy egyliteres Waring blenderben homogenizáljuk egy percig maximális sebességgel. Az összes további lépést 4°C-on hajtjuk végre. Miután a pH-t NaOH segítségével 7,0-ra állítottuk, a nyers kivonatokat centrifugálással (10000 x g, 30 perc), majd a felülúszó ultracentrifugálásával (100000 x g, 60 perc) állítjuk elő.

Az ultracentrifugálás után a kivonatokat egy 100 ml-es Fenol:kloroform 1:1 arányú elegyével-52 oszlopra visszük, amelyet 20 mmol/l TRIS-HCl pH=7,0 és 1 mmol/l DDT összetételű, A jelű pufferrel hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot addig mossuk, ameddig az eluátumban fehérje már nem mutatható ki, majd a megkötött fehérjét (II-es frakció), amely a legtöbb ATP-dependens proteolitikus aktivitást tartalmazza, A pufferrel eluáljuk, amely 0,5 mmol/l NaCl-t tartalmaz. Az eluált fehérjéket (II-es frakció) ammónium-szulfátos frakcionálásnak vetjük alá.

Abból a célból, hogy a szabad proteaszómat megtisztítsuk az egyéb aktivitásoktól, a II-es izomfrakcióban 38%-os telítést állítunk be, majd 45 percig kevertetjük. Az oldhatatlan fehérjéket centrifugálással izoláljuk (10000 x g, 20 perc), majd a 0-38%-os csapadékot 20 mmol/l TRIS-HCl pH=7,0, 1 mmol/l DDT összetételű pufferben szuszpendáljuk. Ugyanezzel a pufferrel

szemben végzett kimerítő dialízis után ezt a frakciót töményítjük, és egy Pharmacia Mono Q oszlopra (FPLC) visszük, amelyet 20 mmol/l TRIS-HCl pH=7,8 pufferrel hoztunk egyensúlyba. Azokat a frakciókat, amelyek az ubiquitin-¹²⁵I-lizozimet bontják, (1-es és 2-es csúcsok, lásd 1A ábra) egyesítjük, töményítjük, majd Pharmacia Superose 6 géliszűrő oszlopra visszük, amelyet ugyanazzal a pufferrel hoztunk egyensúlyba, amelyet a Mono Q frakcionáláshoz használtunk, de 150 mmol/l NaCl-t tartalmaz. Az új enzim egyetlen előállítására három egymás utáni futtatást igényel a Mono Q oszlopokon, és az ezekből a futtatásokból származó aktív frakciókat egyesítjük a géliszűrés előtt. A Superose 6 oszlopról származó aktív frakciókat egyesítjük, töményítjük, majd a következő kísérletekben használjuk, az alábbiakban ismertetett módon.

Vizsgálatok

Mindegyik enzim-mérés lineáris, kivéve ott, ahol ezt külön jelezzük. Ha jelen van, akkor az ATP koncentrációja 2 mmol/l a reakcióelegyben. Hacsak külön nem jelezzük, akkor az összes vizsgálatban az oszlopról lejövvő frakcióból vagy a tisztított proteázból 50 µl-es alikvot részeket (10 µg) inkubálunk 200 µl térfogatban, amely 50 mmol/l TRIS-HCl pH=7,8, 10 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l DTT összetételű puffert, 5 µg radioaktív fehérjét, 0,5 µg ubiquitin-konjugátumot vagy 0,5 mmol/l fluorogén peptidet tartalmaz. A proteolízis vizsgálatához a reakcióelegy körülbelül 15 000 cpm ubiquitin-lizozimet vagy jelzett fehérjét tartalmaz. A ¹²⁵I-lizozim, az ubiquitin-¹²⁵I-lizozim, a ¹⁴C-kazein, a ¹⁴C-hemoglobin és az OH/O₂⁻-vel kezelt

^{14}C -hemoglobin lebomlásának vizsgálatát úgy végezzük, hogy mérjük a savban oldódó radioaktivitás keletkezését, 60 perces, 37°C -on végzett inkubálás után. Az ubiquitin- ^{125}I -lizozimot a II-es májfrakcióból állítjuk elő, Hough és Rechsteiner módszerével [Hough et al., Journal of Biological Chemistry, 261, 2400-2408 (1986); Hough, R. and Rechsteiner, M., Journal of Biological Chemistry, 261, 2391-2399 (1986)]. A ^{125}I -lizozimet és az ubiquitin az előzőekben leírt módon állítjuk elő [Waxman et al., Journal of Biological Chemistry, 262, 2451-2457 (1987); Fagan et al., BioChem. J., 243, 335-343 (1987)]. A konjugátumok koncentrációját a konjugátum szintéziséhez használt ^{125}I -lizozim specifikus radioaktivitása alapján számítjuk ki. Egy egység sLLVT-MCA 10 nmol MCA-t keletkezését jelenti 30 perc alatt.

Elektroforézis

A fehérjéket SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel elemezzük (10%-os poli(akril-amid) gélen), Laemmli leírása szerint [Laemmli, U.K., Nature (London), 227, 680-685 (1970)]. A gélét Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkel festjük meg. A nem-denaturáló géleket az előzőekben leírt módon állítjuk elő [Driscoll, J. and Golberg, A.L., Journal of Biological Chemistry, 265, 4789-4792 (1990)].

Immunológiai módszerek

Az immunkicsapásokat anti-proteaszóma IgG-vel (100 μg) végzett inkubálással hajtjuk végre protein-A Sepharose-zal, az előzőekben leírt módon [Matthews et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 2597-2601 (1989)]. A kontroll immunkicsapásokat Hyclone és az anti-Golgi monoklonális

53FC3 felhasználásával végezzük. A tisztított humán máj proteaszóma elleni 2-24-es monoklonális antitesteket [Laemmli, U.K., Nature (London), 227, 680-685 (1970)] K. Tanaka és A. Ichihara (University of Tokushima, Japán) volt szíves a rendelkezésünkre bocsátani. A tisztított humán máj proteaszóma elleni poliklonális antitesteket nyulakban állította elő T. Edmunds és A.L. Goldberg [Matthews et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 2597-2601 (1989)]. Az immunblottoláshoz a fehérjéket elektroforézisnek vetjük alá 10%-os poli(akril-amid) gélen. Miután a fehérjéket nitrocellulóz lapokra vittük át [Hershko et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1783-1786 (1980)], immunblottokat hajtunk végre az előzőekben leírt módon [Hough et al., Journal of Biological Chemistry, 262 8303-8313 (1987); Hough et al., in Ubiquitin (Rechsteiner, M., ed.), 101-134, Plenum Press, New York (1988)].

Eredmények

A multipain izolálása

Az alábbi kísérletben a használt szubsztrát az ubiquitinnel konjugált ^{125}I -lizozim, amelyet Hough és Rechsteiner módszerével állítunk elő [Hough et al., Journal of Biological Chemistry, 261, 2400-2408 (1986); Hough, R. and Rechsteiner, M., Journal of Biological Chemistry, 261, 2391-2399 (1986)], de májkivonatokat alkalmazva. Jóllehet ez az ubiquitinezett fehérje csak lassan bomlik le nyers kivonatokban, a II-es frakció (azaz az a frakció, amely a DEAE-cellulózhoz kötődik és az ATP-dependens lebontási rendszert tartalmazza)

gyorsan savban oldható termékekké hidrolizálja ezt a szubsztrátot (1. táblázat). Ez a folyamat lineáris két óra hosszat, és 3 mmol/l ATP hozzáadásával 2-3-szorosan lehetett serkenteni. Ezzel szemben, a nem-hidrolizálható ATP analógok, azaz az AMP-CPP vagy az AMP-PNP vagy az ATP Mg^{2+} távollétében (és 1 mmol/l EDTA jelenlétében) nem serkentette az ubiquitinnel konjugált fehérjék lebomlását.

1. Táblázat

A nyúl vázizomból származó, az ubiquitinezett lizozimet bontó 500 kDa-os proteáz tisztítási sémája

Frakció	Összfehérje (mg)	Specifikus aktivitás (cpm/h x mg)		ATP serkentés (+ATP/-ATP)
		+ATP	-ATP	
Nyers kivonat	17433	82	74	1,1
DE52 eluátum (II-es frakció)	1170	779	338	2,3
0-38%-os $(NH_4)_2SO_4$ üledék	392	2540	731	3,5
Mono Q	6,6	99433	20836	4,8
Superose 6	2,6	209500	63723	4,7

A Mono Q oszlop korlátozott kapacitása következtében a DE52-ről kapott anyagot három független oszlopozással kellett feldolgozni. Az egyes oszlopozásokból kapott aktív frakciókat a

géliszűrés előtt egyesítettük, az 1. példában leírtak alapján.

Az ubiquitin-konjugátumokat lebontó aktivitások izolálására a II-es frakciót ammónium-szulfátos kicsapásnak vetjük alá. 38%-os $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os telítettségénél a proteaszóma komplex legnagyobb része oldatban maradt [Waxman et al., *Journal of Biological Chemistry*, 262, 2451-2457 (1987); Driscoll, J. and Goldberg, A.L., *Journal of Biological Chemistry*, 265, 4789-4792 (1990)]. A kicsapott fehérjéket szuszpendáljuk, dializáljuk, majd egy Mono Q-FPLC oszlopon (Pharmacia) kromatografáljuk. Két, Ubiquitin- ^{125}I -lizozim lebontó aktivitással rendelkező csúcsot kapunk (2. ábra). Egy kis csúcsot eluálunk körülbelül 100 mmol/l NaCl koncentráció mellett, és egy második csúcsot, amelynek nagyobb az aktivitása 240 mmol/l NaCl koncentráció mellett. Az 1-es csúcsnak is elfogadható lebontási aktivitása van lizozimmal és kazeinnel szemben, és ezt a folyamatot is majdnem ötszörösre fokozza az ATP (1. ábra). Superose 6-on (FPLC) végzett géliszűréssel a látszólagos molekulásúlya 1000 és 1500 kDa között van. Ez tehát megfelel a disszociálatlan UCDEN vagy megapain komplexnek. Érdekes azonban megjegyezni, hogy ez a struktúra a nem-ubiquitinezett lizozimet majdnem olyan könnyedén lebontja mint az ubiquitinnel konjugált fehérjét.

Az ubiquitin-lizozim hidrolízise mellett a 2-es csúcs a lizozim ATP-vel stimulálható degradációját is mutatja, bár ez utóbbi aktivitás kisebb, mint az 1-es csúcs esetében. A 2-es csúcs is erős proteolitikus aktivitást mutat a ^{60}Co besugárzással létrehozott $\cdot\text{OH}$ vagy $\cdot\text{O}_2$ gyököknek kitett, és ennek következtében károsodott hemoglobin (Hb) ellen. Az

oxidálószerrel roncsolt hemoglobin hidrolízise sokkal gyorsabb, mint a természetes HB-é.

Továbbá, az oxidálószerrel roncsolt Hb lebontása független az ATP-től. Korábban azt találták, hogy a vörös vérsejtekben az oxidálószerrel roncsolt hemoglobin is gyorsan lebomlik egy olyan folyamatban, amelyhez nincs szükség ATP-re vagy a proteaszómára. A 2-es csúcs azonban nem mutatott aktivitást, vagy nagyon kis aktivitást mutatott ^{14}C -kazeinnel vagy számos oligopeptiddel szemben, amelyek mindegyike a proteaszóma szubsztrátja, beleértve a szukcinil-Leu-Leu-Val-Tyr-MNA-t, a szukcinil-Phe-Leu-Phe-MNA-t (az MNA a metil-naftilamin rövidítése), a Z-Gly-Pro-MCA-t, a Z-Ala-Arg-Arg-MNA-t, a Z-Leu-Leu-Glu-BNA-t, a glutaril-Ala-Ala-Phe-MNA-t, az Arg-Arg-MNA-t és a Z-Gly-Gly-Arg-MNA-t.

Két csúcsot találtunk, amely sLLVT-MCA elleni, ATP-vel stimulált aktivitással rendelkezik. A hármas csúcs, amely körülbelül 320 mmol/l-nél eluálódik, ATP-vel stimulált aktivitást mutat sLLVT-MCA, lizozim és kazein ellen, valamint a $\cdot\text{OH}/\text{O}_2^-$ gyökökkel kezelt hemoglobin ATP-től nem függő lebontását. Superose 6-on (FPLC) végzett gélszűrőréssel ez a csúcs eluálódott, látszólagos molekulásúlya körülbelül 300 kDa. Ez az aktivitás egy új proteázt jelenthet, illetve ennél valószínűbb, hogy a proteaszóma egy fragmentjét. A négyes csúcsot 430 mmol/l-nél találjuk, ami normálisan az a pozíció, ahol a proteaszóma eluálódik, ha a 38-80%-os ammónium-szulfátos kicsapással kapott frakciót ugyanazon a Mono Q oszlopon futtatjuk. Így molekulásúlya alapján (600 kDa) és azon az alapon, hogy képes az

sLLVT-MCA hidrolizálására, a négyes csúcs hasonlít a proteaszómára, de nem bont le fehérjéket (lizozim, kazein vagy hemoglobin), eddig ismeretlen okok miatt.

Az ezt követő munka a kettes csúcsra koncentrált, mivel az ubiquitinezett lizozim ATP-vel stimulált lebontásának legnagyobb része ennek tulajdonítható, és erős aktivitással rendelkezik az oxidálószerrel roncsolt hemoglobinnal szemben, de csekély aktivitást mutat az sLLTV-MCA-val szemben, ami a proteaszóma jellegzetes szubsztrátja. Ezt az aktivitást gélszűréssel tisztítjuk tovább, Superose 6 gélszűrő oszlopot használva, amellyel egyetlen aktív csúcsot kapunk, amelynek molekulásúlya körülbelül 440000 (2. ábra). Sepharose 300-zal végzett analitikai gélszűréssel a látszólagos molekulásúlya 540 kDa-nak adódott.

Az 1. táblázatban azokat a lépéseket foglaljuk össze, amelyeket az ubiquitin-konjugátum aktivitással rendelkező fő proteáz gyors izolálásában használunk. A tisztaság ellenőrzéséhez az ATP-vel stimulálható csúcsot PAGE-nek vetjük alá, nem-denaturáló körülmények között. Nem-denaturáló gélen egyetlen csíkként lényegesen messzebbre vándorolt (1015 mm) mint a tisztított proteaszóma (lásd 2. példa). Az SDS-poli(akrilamid) gélelektroforézissel végzett elemzéssel a tisztított proteázról kiderült, hogy a csíkok alapján legalább 5 fő alegységből áll, amelyeknek microbiological Reviews, értéke 50000 és 150000 között van (3. ábra), és egyet sem tartalmaz a proteaszómára jellemző 20-30 kDa méretű csíkokból. Korábban Hough és munkatársai [Hough et al., Journal of Biological

Chemistry, 261, 2400-2408 (1986); Hough, R. and Rechsteiner, M., Journal of Biological Chemistry, 261, 2391-2399 (1986)] leírták, hogy a retikulocitákból származó nagyon nagy konjugátum-lebontó komplex SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel végzett analízisével legalább 6-10 nagy molekulásúlyú alegység figyelhető meg (45 és 116 kDa között), valamint Waxman és munkatársai [Waxman et al., Journal of Biological Chemistry, 262, 2451-2457 (1987)] is megfigyeltek 10-12 fő polipeptidet, amelyeknek molekulásúlya 43 és 110 kDa között változott a részlegesen tisztított készítményben. Tehát az új proteáznak olyan alegységei látszanak lenni, amelyek a nagyon nagy komplexben találhatók meg (lásd 2. példa).

Az 500 kDa-os enzim katalitikus tulajdonságai

Gélszűrés után (2. ábra) az 500 kDa-os csúcs ugyanazt az aktivitást mutatja, mint a Mono Q kromatográfia után. Az ubiquitin-lizozim hidrolízisét ötszörösre lehet fokozni 2 mmol/l ATP hozzáadásával, a lizozimét pedig háromszorosára. Másrésről, a természetes és az oxidálószerrel roncsolt hemoglobin lebomlása is független az ATP-től (mint a nyers kivonatokban), és az oxidálószerrel kezelt szubsztrát 15-ször gyorsabban játszódik le mint a természetes hemoglobiné. Ezekkel a szubsztrátokkal, csakúgy mint az ubiquitin-¹²⁵I-lizozimmal és a ¹²⁵I-lizozimmal szemben az enzimnek éles pH-optimuma van, pH=7,8 értéknél. Az aktivitás körülbelül 50%-kal csökken pH=7 vagy pH=10,0 körül, és nem figyelhető meg aktivitás pH=5,0 alatt vagy pH=12,0 fölött.

Az ubiquitinnel konjugált fehérjék nagy mennyiségben való előállításának nehézségei miatt a standard vizsgálatokban

alkalmazott ubiquitinezett lizozim koncentrációja tízszer alacsonyabb mint a szabad lizozimé (ha a ^{125}I -lizozim moláris mennyiségét hasonlítjuk össze). Mindazonáltal, az új proteáz majdnem ugyanolyan gyorsan bontja az ubiquitinezett lizozimet mint a nem-ubiquitinezettet (II. táblázat).

II. Táblázat

Az anti-proteaszóma monoklonális antitesttel végzett immunkicsapás hatása a különböző szubsztrátok proteaszómával és az új proteázzal való lebontására

	Ubiquitinezett					
	Lizozim		lizozim		Kazein	
	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP
	(ng/ó)					
<u>Proteaszóma</u>						
Kontroll antitest	612	1872	7	8	217	856
Anti-proteaszóma	41	105	0	0	32	74
antitest						
 <u>Új proteáz</u>						
Kontroll antitest	79	292	41	190	0	0
Anti-proteaszóma	70	281	36	179	0	0
antitest						

		OH/O ₂ -vel kezelt					
		Hemoglobin		hemoglobin		SLLVT-MCA	
		-ATP	+ATP	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP
		(egység)					
<u>Proteaszóma</u>							
Kontroll antitest		45	51	927	886	0,8	3,7
Anti-proteaszóma		0	0	31	36	0,1	0,1
antitest							
<u>Új proteáz</u>							
Kontroll antitest		19	17	263	270	0,1	0,2
Anti-proteaszóma		15	22	267	256	0,1	0,1
antitest							

Ha a lizozim két formája azonos koncentrációban van jelen, akkor az ubiquitin-¹²⁵I-lizozim körülbelül háromszor gyorsabban bomlik le mint a ¹²⁵I-lizozim (5. ábra). Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy az új proteáz előszeretettel bontja az ubiquitinezett fehérjét, szemben a proteaszómával, amely nagyon kis aktivitást mutatott, ha mutatott egyáltalán, az ubiquitin-konjugátummal szemben. A proteolitikus reakció természetének meghatározásához az ezzel a proteázzal az ubiquitin-¹²⁵I-lizozimból keletkező savban oldódó termékek méretét meghatározzuk. G25 gélszűrő oszlopon végzett kromatográfiával (0,2 mol/l nátrium-acetáttal és 0,1 mol/l NaCl-dal egyensúlyba hozva) a savban oldódó részek egyetlen éles csúcsban eluálódtak, hozzávetőleges molekulasúlyuk 1300 Da, a

marker peptid, a szubsztancia P alapján meghatározva. Tehát az enzim egy endopeptidáz, és láthatóan nincs exopeptidáz aktivitása.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy vajon ez az új proteáz tartalmaz-e a proteaszómával közös komponenseket, a humán májrészecske elleni monoklonális antitestet [Matthews et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 2597-2601 (1989), II. táblázat], vagy a patkány máj proteaszóma elleni poliklonális antitestet használunk. Akármelyik antitesttel végzett immunkicsapás nem érintette az új enzim aktivitását, ha lizozimmal, ubiquitin-lizozimmal, vagy oxidálószerrel kezelt hemoglobinnal vizsgáltuk, jöllehet ezek a kezelések kvantitatíve kicsapják a tisztított nyúlizom proteaszómát, a ^{14}C -kazeinnel vagy sLLVT-MCA-val végzett vizsgálatok szerint (II. táblázat). A különböző proteaszóma aktivitásokat nem gátolják közvetlenül az antitestek, de ezekben a kísérletekben ezeket az aktivitásokat együtt eltávolítottuk protein A-Sepharose-zal való kicsapásokkal. A két multimer proteáz közötti kereszt-reaktivitás hiányát Western blottal is megerősítettük, amelyben ezek a monoklonális vagy poliklonális antitestek nem reagáltak az új proteázzal.

Nukleotid hatások

A III. táblázatban a nukleotidok hatását mutatjuk be az ubiquitin- ^{125}I -lizozim lebontására, a vázizomból származó új aktivitással. Ezekben a vizsgálatokban a Superose kromatográfiából származó aktív csúcsot ubiquitin- ^{125}I -lizozimmal inkubáljuk 37°C -on 1 óra hosszat. A reakcióelegy 2

mmol/l nukleotidot vagy 10 mmol/l PPi-t tartalmaz. Amint a III. táblázatban látható, az ubiquitin- ^{125}I -lizozimnak a tisztított enzimmel való hidrolízisét az ATP hétszeresére fokozta. Ezzel szemben, az ADP vagy az AMP vagy a szervetlen foszfát nem volt jelentős hatással erre a folyamatra. Nem volt megfigyelhető serkentés a nem-hidrolizálódó ATP analógokkal, az adenil-5'-oilimidodifoszfáttal (AMP-PNP) és az adenzin-5'-o-tiotrifoszfáttal (ATP-gamma-S). Ennélfogva úgy tűnik, hogy ehhez a reakcióhoz ATP hidrolízisre van szükség, amint azt az *Escherichia coli*-ból származó ATP-t hasító proteázoknál (La (lon) és Ti (clp)) és a mitokondriumoknál kimutatták, valamint a proteaszóma gyorsan izolált formájánál.

III. Táblázat

A nukleotidok hatása az ubiquitin- ^{125}I -lizozimnak a vázizomból származó új aktivitással való lebontására

<u>Vegyület</u>	<u>Relatív aktivitás</u>
semmi	100
ATP	743
ADP	113
AMP	130
AMP-PNP	90
ATP-gamma-S	103
CTP	373
GTP	435
UTP	108
PPi	118

A reakcióelegyek 1 mmol-t tartalmaznak a

nukleotidokból, illetve 10 mmol PPI-t.

Az ATP távollétében az ubiquitin-konjugátumok hidrolízise a tisztított enzimmel lineáris legalább 2 óra hosszat, és sokszorosra fokozódik, ha ATP-t adunk hozzá (5. ábra). Ennélfogva, ez a hatás magában foglal egy igazi aktiválást az ATP hidrolízisén keresztül, inkább, mint egyszerűen az enzim egyszerű stabilizálását. Az is megjegyzésre érdemes, hogy egy körülbelül 20 perces lag periódus előzi meg az ATP-vel való aktiválást mind az ubiquitinezett mind a nem-ubiquitinezett lizozim esetében (5. ábra). Ez az érdekes lag periódus világosan az ATP serkentő hatásához kapcsolódik, mivel nem figyelhető meg lag periódus ezeknek a szubsztrátoknak vagy az oxidálószerekkel roncsolt hemoglobinnak az ATP-től független lebontásakor, ami egy lineáris folyamat. Ennek az érdekes időfüggésnek az alapja nem ismert, de valószínűleg annak tulajdonítható, hogy bizonyos addicionális komponensek elvesztek. Hasonló hatásokat nem figyeltünk meg más ATP-dependens proteolitikus enzimeknél eukarióta vagy prokarióta sejtekben.

Az ATP igényt részben ki lehet elégíteni CTP-vel vagy GTP-vel, amelyek a fehérje lebomlás körülbelül négyszeres serkentését okozzák (III. táblázat). Ez a nukleotid igény emlékeztet a korábbi, nukleotid specifitásra vonatkozó megfigyelésekre az 1500 kDa-os komplexszel való ubiquitin-konjugátum lebomlásnál. Ezek a nukleotid hatások különböznek azoktól is, amelyeket a proteaszóma ATP-dependens formái igényelnek, amikor bármely nukleotid-trifoszfát, beleértve a

nem-hidrolizálódó analógokat is, képes aktiválni a peptid-szubsztrátok hidrolízisét, de a fehérje lebomlás serkentését csak ATP-vel lehetett megfigyelni.

A különböző ATP koncentrációkat tanulmányozva a konjugátum degradáció maximális serkentését figyeltük meg 1 mmol/l koncentrációnál. Az adatok az ATP-re 0,5 mmol/l vagy alacsonyabb K_m értéket sugallnak, ami jóval az intracelluláris ATP koncentráció alatt van. Tehát ez az aktiváció fiziológiaiainak tűnik, és ez a K_m egyezik a tenyésztett sejteken korábban megfigyelt korábbi megfigyelésekkel, aholis a celluláris ATP-től való megfosztás csak akkor blokkolja a fehérje-lebontást, ha az ATP-szintek drasztikusan csökkentek (>75%).

Az enzim maga meglehetősen labilis. Ha 40°C-on tároljuk ATP távollétében, akkor az ubiquitin-konjugátumokkal szembeni aktivitás progresszív elvesztése figyelhető meg. Még -70°C-on is, az ubiquitin-konjugált lizozim, az ubiquitinnel nem konjugált lizozim vagy az oxidálószerrel roncsolt hemoglobin lebontásának képessége 3-4 nap alatt 50%-kal csökken. Ezt a gyors inaktiválást meg lehet előzni ATP vagy nem-hidrolizálódó analógja, az AMP-PNP jelenlétével. Glicerinnel hozzáadása, amely stabilizálja az ATP-dependens lebontó rendszereket a nyers kivonatokban és a proteaszómát, szintén megakadályozta ennek az aktivitásnak a progresszív elvesztését, és az enzim teljesen funkcióképes hat nap elteltével. A nukleotidoknak és a glicerinnek ez az enzimet stabilizáló hatása megfigyelhető 40°C-on is, ahol az inaktiválódás még gyorsabb is. A proteaszóma ATP-dependens formája szintén labilis, és nukleotidok stabilizálják;

azonban ennek a két proteáz komplexnek a stabilitása teljesen eltérő. Idővel a proteaszóma elveszti ATP-függését és spontán aktívvá válik, az új enzimtől eltérően, amely egyszerűen elveszti az aktivitását az ATP távollétében. Emellett a detergensek, amelyek a proteaszómát serkentik, ilyen például az SDS vagy a zsírsavak, inaktiválják az új enzimet (IV. táblázat), ami sokkal labilisabb struktúrának tűnik.

IV. Táblázat

Az inhibítorok hatása az új proteáz különböző
aktivitásaira és a vázizomból származó proteaszómára

<u>Hozzáadva</u>	<u>Új proteáz</u>		<u>Proteaszóma</u>	
	<u>Ub-lizozim</u>	<u>lizozim</u>	<u>OH/O₂-vel kezelt</u>	<u>SLLVT-MCA</u>
	Relatív aktivitás %			
Semmi	100	100	100	100
DFP	96	92	91	18
(1 mmol/l)				
Cisztatin A	30	24	27	93
(4 µmol/l)				
Hemin	0	0	7	0
(0,1 mmol/l)				
NEM (1 mmol/l)	29	27	30	37
Leupeptin	69	72	73	83
(0,1 mmol/l)				
E64	100	100	100	100
(0,1 mmol/l)				
Na-oleát	29	34	40	179
(0,125 mmol/l)				
SDS (0,01%)	44	46	42	125
o-fenantrolin	48	55	54	60
(0,1 mmol/l)				

Az új proteázt 37°C-on inkubáljuk 1 óra hosszat a fehérje szubsztráttal és 2 mmol/l ATP-vel. A Superose 6 kromatográfiával kapott proteaszómát sLLVT-MCA-val inkubáljuk.

Az elegyeket 10 percig 20°C-on előinkubáljuk, mielőtt a szubsztrátot hozzáadjuk. A DFP-t DMSO-ban oldjuk, amelynek a végkoncentrációja (1%) nem érinti az enzimaktivitást.

Az inhibitorok hatásai

Az új ATP-dependens proteáz további jellemzéséhez a különböző típusú enzim inhibitorok hatását vizsgáljuk (IV. táblázat). A diizopropil-fluorofoszfát (DFP), amely a szerin-proteinázok irreverzibilis inhibitora, nem érinti a konjugátumok lebomlását. Az o-fenantrolin, amely a nehézfémekkel kelátokat képez, mutat bizonyos gátlást. Ezzel szemben az N-etil-maleimid (NEM), egy tiol-blokkoló reagens, és a tyúktojás cisztatin (cisztatin A), amely számos papain-szerű tiol proteináz potens inhibitora, erősen gátolja ezt az aktivitást. Hasonló gátlást lehet megfigyelni a rokon humán polipeptiddel, a Stefin A-val. A cisztatinnak egy hasonló hatását korábban leírták az ATP+ubiquitin-dependens proteolízisről, a nyúlizomból származó nagyon nagy UC DEN komplexszel szemben. A Stefin A gátlása fiziológiailag érdekes, mivel homológ fehérje inhibitorok jelen vannak számos emlős szövetben. Hasonló koncentrációkban a cisztatin B 55%-os gátlást mutat, a cisztatin C-nek pedig nincs jelentős hatása. Jóllehet ez az új aktivitás egy tiol-proteáznak tűnik, a leupeptin jelenléte csak 30%-ban gátolja, az E64 jelenléte pedig egyáltalán nem, pedig mindkettő számos tiol-proteináz gátlószere (ilyenek például a lizoszómális enzimek vagy a calpainok). A leupeptinre és az E64-re való érzékenységet erősen befolyásolja a hasadó kötést megelőző szekvencia, és nem mindegyik tiol proteáz érzékeny rájuk. A hemin, amely képes

teljesen gátolni az ATP-ubiquitin-dependens proteolítikus rendszert és a proteaszómát, blokkolja az új proteáz konjugátumot lebontó aktivitását (IV. táblázat).

Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az új enzim tiol-csoportot tartalmaz az aktív helyén. Ennek megfelelően a ditiotreitol fokozza az aktivitását, és szükséges az enzim-funkció fenntartásához. A hatásos inhibítorok mintázata világosan megkülönbözteti ezt az aktivitást a proteaszómától, amely aktiválva szerin proteázként hat (IV. táblázat) többszörös katalitikus hellyel (jóllehet vannak lényeges szulfhidril csoportjai is). Amint az a IV. táblázatban látható, a különböző inhibítorok hatásait is összehasonlítjuk a ^{125}I -lizozimra és az $\cdot\text{OH}/\text{OY}^2$ -vel kezelt ^{14}C -hemoglobinra. Nagyon hasonló gátló profilokat kapunk ezekkel az anyagokkal, amint azt az ubiquitin-lizozimmal is meg lehetett figyelni. Tehát legvalószínűbbnek, hogy egyetlen típusú aktív hely vesz részt ezeknek a különböző fehérje-típusoknak a hidrolízisében.

Jóllehet az oxidálószerrel roncsolt hemoglobin lebomlása független az ATP-től, míg az ubiquitinezett és nem-ubiquitinezett lizozim lebontásához nukleotid hidrolízisére van szükség, egyetlen enzim-komplex tűnik felelősnek mind a három szubsztrát lebontásáért, számos okból:

- a) Ez a 3 aktivitás együtt tisztítható (1. és 2. ábra)
- b) Az ATP és a glicerín mind a hármat hasonló módon stabilizálja
- c) A különböző aktivitásoknak hasonló a pH optimuma
- d) A cisztatinnak és egyéb inhibítoroknak az a

képessége, hogy csökkenti az ubiquitin-konjugátumok lebontását, korrelál azzal a képességükkel, hogy gátolják más fehérjék lebontását.

Ezeknek az adatoknak a legegyszerűbb interpretálása az lehet, hogy mind a három szubsztrátot egyetlen aktív hely vagy egyetlen típusú hely bontja le, még akkor is, ha nehéz megérteni, hogy az ATP miért segíti elő csak néhány, és nem az összes szubsztrát lebomlását.

Annak vizsgálatára, hogy az ubiquitinezett és nem-ubiquitinezett fehérjék ugyanahhoz a helyhez kötődnek, a tisztított enzimet 1 óra hosszat 37°C-on inkubáljuk telítési koncentrációjú (5-25 μ g) lizozim, hemoglobin vagy oxidálószerrel telített hemoglobin jelenlétében. Ezek közül a szubsztrátok közül egy sem csökkenti az ubiquitin- 125 I-lizozim (0,5 μ g lizozimet tartalmaz) lebomlását, jóllehet a jelzetlen lizozim és az oxidált hemoglobin lineárisan csökkenti a homológ radioaktív fehérjék lebomlását. Emellett nem mutatható ki kompetíció a lizozim és az oxidálószerrel kezelt hemoglobin között ezeknél a koncentrációknál. Az, hogy nem sikerült kompetíciót kimutatni a három szubsztrát között, azt sugallja, hogy a proteáznak specifikus kötő doménjei vannak, amelyek felismerik ezeket a különböző fehérje szubsztrátokat, valamint azt is, hogy az ubiquitin-lizozim lebomlása nem jár együtt szabad lizozim keletkezésével.

A proteaszómával való asszociáció

Annak következtében, hogy az enzim képes az ubiquitinnel konjugált lizozim lebontására, az enzim lehet egy komponense az

1500 kDa méretű UC DEN komplexnek. Tény, hogy az új enzim méretében és kromatográfiás viselkedésében hasonlít a retikulocitákból származó "CF-1" komponenshez. Ha így van, akkor komplexet képezhet a proteaszómával ATP jelenlétében. Ennek a hipotézisnek az ellenőrzésére körülbelül egyforma mennyiségű multipaint és alaposan megtisztított, izomból izolált proteaszómát inkubálunk 37°C-on, Mg^{2+} -ATP jelenlétében vagy távollétében. A Superose 6 gélszűrés után kapott aktív csúcsokat (mindegyik 1 mg fehérje) együtt inkubáljuk 1 mmol/l Mg ATP jelenlétében 30 percig, majd ugyanarra a Superose 6 oszlopra visszük fel. 1 ml-es frakciókat szedünk 0,1 ml/perc áramlási sebesség mellett. A mintákat ubiquitin- ^{125}I -lizozimre vizsgáljuk.

Amint az az 5. ábrán látható, az Mg^{2+} -ATP jelenlétében való előinkubáció lehetővé tette egy 1300 kDa méretű komplex keletkezését, amely szintén bontja az ubiquitinezett lizozimet. Az ATP vagy a Mg^{2+} kihagyása (5. ábra), vagy az ATP helyettesítése az analóg AMP-PNP-vel megakadályozza a komplex képződését, és az 500 valamint 700 kDa méretű enzimek valamelyes lebomlását is eredményezi. Ha a proteaszómát nem tesszük bele, akkor a multipain aktivitásában nem figyelhető meg változás az Mg^{2+} -ATP-vel való együtt inkubálás során (nem közölt adatok). Ezek a megfigyelések azt is megerősítik, hogy a multipain készítményeknek menteseknek kell lenniük a proteaszómától, ahogy azt az SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézis és a Western blot elemzés sugallja, és azt is jelzik, hogy az ATP-vel való aktiválás időbeli késése (4. ábra) nem intermolekuláris

asszociációk következménye. Végezetül, az in vitro keletkező ubiquitin-konjugátum lebontó aktivitás blokkolható anti-proteaszóma antitestekkel végzett immunológiai kicsapással, úgy mint az előző vizsgálatokban a natív komplexszel.

. 2. Példa

A proteaszóma és a multipain közötti komplex vizsgálata, és a komplex tulajdonságai

Kísérleti eljárások

A szubsztrátokat (^{125}I -lizozim, ubiquitinezett ^{125}I -lizozim, ^{14}C -metil-hemoglobin és OH valamint O_2 gyökökkel roncsolt ^{14}C -metil-hemoglobin) az 1. példában leírtak alapján készítjük el.

Az izomkivonatok frakcionálása - A horpaszizmokat 4-5 kilós hím New Zealand White nyulakból (Millbrooka Farms, MA) vágjuk ki, majd poszt-mitokondriális kivonatokat készítünk és frakcionálunk DEAE cellulózon, az 1. példában leírtak alapján. A DEAE cellulózra abszorbált és 0,5 mmol/l NaCl-dal eluált (II. frakció) fehérjéket $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ frakcionálásnak vetjük alá, azzal a céllal, hogy a szabad proteaszómát (38-80%) a többi aktivitástól elválasszuk (0-38%). Mindkét frakciót betöményítjük, és külön egy Pharmacia Mono Q oszlopra visszük (FPLC). A proteaszóma és multipain frakciókat emellett egy Pharmacia Superose 6 gélszűrő oszlopra visszük, majd az aktív frakciókat egyesítjük, és a további kísérletekben alkalmazzuk.

Vizsgálatok

A ^{125}I -lizozim, az Ubiquitin- ^{125}I -lizozim, a ^{14}C -kazein, a ^{14}C -hemoglobin és az OH/ O_2 -vel kezelt ^{14}C -hemoglobin

vizsgálatát az 1. példában leírtak alapján, valamint Tanaka és munkatársai leírása alapján végezzük [Tanaka K. et al., Journal of Biological Chemistry, 261, 15197-15203 (1986)]. Mindegyik mérés két óra hosszat lineáris. Hacsak külön nem jelezzük, a vizsgálatokban az oszlopról lejött frakciókból 50 μ l-es alikvot részeket, illetve a tisztított proteázból 5 μ g-ot inkubálunk 200 μ l végtérfogatban, amelynek összetétele 50 mmol/l TRIS-HCl pH=7,8, 10 mmol/l $MgCl_2$, 1 mmol/l DTT és 5 μ g a radioaktív fehérjékből, 0,5 μ g a ^{125}I -lizozim konjugátumokból vagy 0,5 mmol/l a fluorigén peptidből, a szukcinil-Leu-Leu-Val-Try-7-amido-4-metilkumarinból (sLLVTA-MCA). Az ubiquitin konjugátumok mennyiségét az ubiquitinhez kötött ^{125}I -lizozim specifikus radioaktivitása alapján számítjuk ki. Egy egység sLLVT-MCA azt jelenti, hogy 10 nmol MCA keletkezik 30 perc alatt.

Elektroforézis

A fehérjét Bradford módszerével mérjük [Bradford, M.M., Analytical Biochemistry, 72, 248-254 (1976)]. A fehérjét SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel vizsgáljuk (10%-os poli(akril-amid)), Laemmli módszerének alkalmazásával [Pickart, C.M. et al., Arch. Biochem. Biophys., 272, 114-121 (1989)] és Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkel festjük. Nem-denaturáló elektroforézist 4%-os poli(akril-amid) gélben végzünk, az 1. példában leírtak alapján, illetve Driscoll és Goldberg leírása alapján [Driscoll, J. and A.L. Goldberg, Journal of Biological Chemistry, 265, 4789-4792 (1990)].

Eredmények

Komplexbépződés a proteaszóma és a multipain között

Ennek a két ATP-vel aktivált proteáznak azt a képességét, hogy egy olyan nagyobb komplexet képeznek, amely az ubiquitin konjugátumokat lebontja, az alábbiakban tovább definiáljuk. A Superose 6 gélszűrőssel kapott multipain és proteaszóma frakciókat ATP és Mg^{2+} jelenlétében illetve távollétében 30 percig $37^{\circ}C$ -on inkubáljuk, majd ugyanarra a gélszűrő oszlopra visszük fel. Ezek a körülmények vezetnek ahhoz, hogy a proteaszóma (700 kDa) és a multipain (500 kDa) aktivitások legnagyobb része egy nagyobb formátumba konvertálódik, amely 1500 kDa-nál eluálódik. A nagyobb csúcs a ^{125}I -ubiquitin-lizozim, a ^{125}I -lizozim, az sLLVT-MCA és a ^{14}C -kazein ATP-vel aktivált hidrolízisét mutatja.

Ha az ATP-t és az Mg^{2+} -t kihagyjuk, vagy a nem-hidrolizálódó ATP analógot, az AMP-PNP-t adjuk a rendszerhez az ATP helyett, ez teljesen megakadályozza a komplex-képződést. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a nukleotid hidrolízise szükséges a két enzim asszociációjához. Mind a proteaszóma mind a multipain szükséges az 1300 kDa méretű komplex kialakulásához; tény, hogy ha egyedül inkubáljuk őket, akkor ezek közül az enzimek közül egyik sem mutatott semmilyen tendenciát nagy komplexek kialakítására ATP és Mg^{2+} jelenlétében. Ahogy izoláljuk, mind a proteaszóma mind a multipain meglehetősen labilis a tárolás során, jóllehet az ATP és a glicerín valamelyest javítja a stabilitást. Az ATP és az Mg^{2+} távollétében kevesebb össz-proteáz és peptidáz aktivitás nyerhető vissza az oszlopról, és az ATP-független aktivitás emelkedése volt megfigyelhető. A nagy komplex izolálásánál

használt Superose 6 géliszűrő oszlopot rutinszerűen ATP-t nem tartalmazó pufferben futtatjuk; mindazonáltal, a komplex nem disszociál jelentősen, még az ismételt géliszűrés hatására sem. Tehát 4°C-on ATP-re van szükség ahhoz, hogy a proteaszóma és a multipain asszociációját fenntartsuk.

Számos különböző megfigyelés alapján azt állíthatjuk, hogy a multipain és a proteaszóma azonos mennyiségben található meg a komplexben. Például ha az asszociációs reakcióban, vagy a multipain vagy a proteaszóma frakciót felére csökkentjük, akkor a komplexképződés is körülbelül a felére csökken, ami egy specifikus összetételű komplex képződésénél várható. Egy 1:1 arányú asszociáció várható a géliszűréssel a komplexre kapott molekulaméret (1300-1500 kDa) alapján (700 kDa plusz 500 kDa) valamint az SDS gélmintázatok alapján.

Az 1500 kDa komplex polipeptid komponensei

A multipain, ha SDS poli(akril-amid) gélelektroforézissel vizsgáljuk, akkor legalább 6 nagy polipeptidet tartalmaz, méretük 70-150 kDa, ez eltér a proteaszóma 20-30 kDa méretű alegységeitől. Ha a proteaszóma-multipain komplexet SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel elemezzük (6. ábra), akkor azt láthatjuk, hogy a tisztított multipainban levő összes polipeptidet (azaz 5 darab 70-200 kDa közötti csíkot) tartalmazza, tartalmazza a tisztított proteaszóma megismert alegységeit (azaz a 20-30 kDa közötti csíkokat), valamint számos, 40-110 kDa közötti polipeptidet. Ez utóbbi polipeptidek a részlegesen tisztított proteaszóma frakcióban is jelen vannak (6. ábra), és beépülnek az 1500 kDa

méretű csíkba a komplexképződés során. Ezekben a kísérletekben sok hosszú lépés kombinációjával tisztított proteaszómákat használunk (beleértve a DEAE kromatográfiát, az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kicsapást, a Mono Q kromatográfiát és a Superose 6 gélszűrést. Ennélfogva, a 40-110 kDa méretű polipeptideknek nagyon szoros kapcsolatban kell állniuk a proteaszómával, mivel együtt tisztulnak a 700 kDa méretű részecskékkel, legalábbis a szűrési lépések során.

Fontos megfigyelés, hogy ha a proteaszóma frakciót tovább tisztítjuk, Affigel-blue kromatográfiával, oly módon hogy főleg 20-30 kDa méretű alegységek találhatók SDS poli(akrilamid) gélelektroforézissel, akkor a kapott proteaszóma nem képes komplexet képezni a multipainnal ATP és Mg^{2+} jelenlétében. Tehát az Affigel-blue lépés feltehetőleg eltávolított néhány komponenst, feltehetően egyet vagy többet a 40-110 kDa méretű polipeptidek közül, amelyek szükségesek a komplexképződéshez.

Az 1500 kDa méretű komplex proteolitikus aktivitása

Amellett, hogy az ubiquitin-lizozimet lebontja, az 1500 kDa méretű komplex számos konjugátlan szubsztrátot is lebont, csakúgy mint a multipain és a proteaszóma (V. táblázat, 7. ábra).

V. Táblázat

A proteaszóma, a multipain és a komplex relatív aktivitásainak összehasonlítása különböző szubsztrátokkal szemben

Aktivitás	Ubiquitinezett		
	lizozim	Lizozim	Kazein
			($\mu\text{g/h} \times \text{nmol}$)
Proteaszóma	0,3	56	24
Multipain	5	6	0
Komplex	11	92	31

Aktivitás	$\cdot\text{OH}/\text{O}_2^-$ -vel kezelt		
	hemoglobin	Hemoglobin	sLLVT-MCA
			(egység)
Proteaszóma	1	30	133
Multipain	0,4	7	5
Komplex	0,7	29	162

Mindegyik fehérje szubsztrát koncentrációja $25 \mu\text{g/ml}$, az ubiquitin- ^{125}I -lizozim kivételével, amelynek koncentrációja $2,5 \mu\text{g/ml}$. (A ^{125}I -ubiquitin-lizozim esetében ez a koncentráció a jelenlevő ^{125}I -lizozim koncentrációjára vonatkozik).

A lebomlási sebességeket 2 mmol/l ATP jelenlétében nmol enzimre számítva számoljuk ki, 670 kDa -os értéket használva a proteaszóma molekulasúlyaként, 500 kDa -os értéket használva a

multipain molekulasúlyaként és 1300 kDa-t a komplex molekulasúlyaként.

ATP hidrolízisre nemcsak a komplex képződéséhez van szükség, hanem a legtöbb szubsztráttal szembeni maximális aktivitáshoz is. Az ubiquitin- ^{125}I -lizozim, a ^{125}I -lizozim, az sLLVT-MCA vagy a kazein komplex által történő lebomlása lineáris sebességgel történik, és az ATP 3-5-szörösre fokozza (7. ábra, illetve nem közölt adatok). Jóllehet a kazein és a lizozim komplex által történő lebomlását az ATP serkenti, a hemoglobin (egy gyenge szubsztrát) vagy az oxidálószerrel roncsolt hemoglobin (egy sokkal jobb szubsztrát) lebomlását nem befolyásolja az ATP. A proteaszómáról és a multipainról is kiderült, hogy az oxidálószerrel roncsolt hemoglobint (ezekkel a más szubsztrátokkal ellentétben) egy energia-független folyamatban bontják le, eddig ismeretlen okból. Tehát a komplex az összes olyan enzimaktivitást mutatja, amely mind a proteaszómára mind a multipainra jellemző, beleértve az ATP-vel való aktiválást is.

Az ubiquitin-konjugátumok nagy mennyiségben való előállításának nehézségei miatt a vizsgálatokban rutinszerűen alkalmazott ubiquitin- ^{125}I -lizozim koncentrációja molárisan körülbelül tízszer alacsonyabb mint a ^{125}I -lizozimé (a lizozim moláris mennyisége alapján meghatározva). Ha a lizozim szabad és konjugált formája ugyanabban a moláris koncentrációban van jelen, akkor a multipain ubiquitin-lizozimot 2-4-szer gyorsabban hidrolizálja mint a konjugálatlan szubsztrátot.

Érdemes megjegyezni, hogy mind a lizozim, mind az

ubiquitinezett lizozim körülbelül kétszer gyorsabban bomlik le a komplex hatására, mint azonos moláris mennyiségű multipain vagy proteaszóma hatására (V. táblázat). Tehát a komplexben ezek az enzimek szinergisztikusan működnek a lizozimmal és az ubiquitinezett lizozimmal szemben (VI. táblázat).

VI. táblázat

A multipain és a proteaszóma szinergisztikusan működik az ubiquitin-lizozim konjugátumok lebontásában

Kezdetben hozzáadott enzim	Lebomlás az 1. órában	Hozzáadás a a 60. percben	Lebomlás a a 2. órában
	(ng)		(ng)
multipain	80	semmi	74
		proteaszóma	156
		cisztatin	4
		proteaszóma+cisztatin	12
proteaszóma	9	semmi	5
komplex	71	semmi	65
		proteaszóma	71
		cisztatin	

A VI táblázatban bemutatott adatokat az alábbiak szerint kapjuk: az enzimeket ekvimoláris mennyiségben adjuk az elegyekhez, a 670 kDa, 500 kDa és 1300 kDa látszólagos molekulásúly alapján. A reakcióelegyek 2 mmol/l ATP-t és 500 ng radioaktív szubsztrátot tartalmaznak. Ha külön jelezzük, akkor a tyúktojás cisztatint 4 μ mol/l koncentrációban adjuk a

reakcióelegyhez a multipain inaktiválására. Az ubiquitin-konjugátumok lebomlását úgy követjük, hogy mérjük a savban oldódó radioaktivitást 60 és 120 perc elteltével 37°C-on. Emellett, ha a proteaszóma frakciót adjuk a multipainhoz ATP jelenlétében, hogy ezzel lehetővé tegyük a komplexképződést (VI. táblázat), együtt sokkal gyorsabban bontják le az ubiquitinezett lizozimet mint amikor a multipain egyedül hat, illetve ha a multipain, majd utána a proteaszóma frakció hat erre a szubsztrátra (VI. táblázat). Ebben a kísérletben a komplexképződés kétszeres lebomlást eredményez, mint csak a multipainnal. Emellett, ha proteaszómát adunk a multipainhoz, de a multipaint cisztatinnal inaktiváljuk, nagyon kevés savban oldódó aktivitás keletkezik, vagy semennyi nem keletkezik azon felül, amelyet a multipain hozott létre az előző órában. Tehát az 500 kDa-os és a 700 kDa-os enzimek szinergisztikus hatása csak akkor nyilvánvaló, ha komplexképződés történik.

Jóllehet a proteaszóma frakciónak a multipainhoz való hozzáadása sokkal gyorsabb lebomlást eredményez az ubiquitin-lizozimmel szemben mint ha csak a multipain alkalmazzuk (VI. táblázat), a DFP-vel inaktivált proteaszóma hozzáadása nem fokozza az ubiquitin-¹²⁵I-lizozim lebomlását, akkor sem, ha ilyen körülmények között komplexképződés játszódik le, amint azt gélszűrőssel ki lehet mutatni. A proteolítikus aktivitás tehát nem tűnik szükségesnek a komplexképződéshez, és a komplexen belül a multipain és a proteaszóma szinergisztikusan hat, feltéve, hogy mindkét komponens enzimatikusan aktív. Azt is érdemes megjegyezni, hogy ha az izolált komplexhez (azaz azonos

moláris mennyiségű 700 kDa és 1500 kDa méretű részecskék) főlegben adunk proteaszómát, akkor ez nem fokozza tovább az ubiquitin-konjugátum lebomlását (VI. táblázat). Tehát a proteaszómával asszociálódó peptidázok látszólag nem bontják le jelentősen sem az ubiquitin-konjugátumokat sem a multipain aktivitás termékeit, hacsak nincsenek meghatározott sztöchiometrikus arányban a multipainnal kapcsolatban.

Az ubiquitin-lizozim lebomlásának termékei

Az ubiquitin-lizozim lebomlásának peptid-termékeit is vizsgáljuk, annak eldöntésére, hogy a multipainnal való komplexképzés megváltoztatja-e a proteolízis mértékét (a sebesség mellett). A szubsztrátnak multipainnal vagy a komplexszel való inkubálása után a savban oldódó radioaktív termékeket géliszűrésnek vetjük alá Sepharose G-25-ön. Amint az a 7. ábrán látható, a multipain, miközben az ubiquitin- ^{125}I -lizozimet hidrolizálja, egyetlen éles radioaktivitási csúcsot eredményez. A géliszűrés során együtt eluálódik a P szubsztanciával, egy lineáris polipeptiddel, amelynek a molekulásúlya 1347 kDa. Ha azonban az 1500 kDa méretű komplex az ubiquitin-lizozim lebomlást katalizálja, akkor nem eluálódik ilyen méretű ^{125}I aktivitás. Ehelyett az összes radioaktivitást két kisebb, körülbelül 600 és 400 kDa méretű csúcsban találjuk meg (azaz körülbelül 5 és 3 csoportot tartalmazó peptidekben). Ezek a megfigyelések erősen azt sugallják, hogy a proteaszóma peptidáz funkciója lényeges a multipainnal indított ubiquitin-lizozim lebomlásának teljessé tételéhez. Emellett, amint azt a VI. táblázatban is igazoltuk, mindkét enzimnek egyszerre kell

jelen lennie, hogy ezzel a koordinált funkciójuk lehetségessé váljon. Tehát, ha a multipaint ubiquitin- ^{125}I -lizozimmel inkubálunk, majd az aktivitását cisztatinnal gátoljuk (amint az a VI. táblázatban látható), a proteaszóma hozzáadása nem okoz további lebomlást a multipain által létrehozott, savban oldódó peptidekben. Tehát ahhoz, hogy hatékony legyen a multipain által létrehozott peptid lebontásában, a proteaszómának vele komplexben kell jelen lennie.

Az inhibítorok hatása

Amint az az alábbiakban bemutatott adatokból nyilvánvaló, az 1500 kDa méretű komplex érzékeny mind a proteaszóma mind a multipain funkcióinak inhibítoraira.

Az 1500 kDa méretű komplex további jellemzéséhez a komponens enzimek különböző inhibítorait vizsgáljuk. Ezt az alábbi körülmények között végezzük: Az enzimeket ubiquitin- ^{125}I -lizozimmel inkubáljuk (komplex vagy multipain), vagy SLLVT-MCA-val (proteaszóma), a VII. táblázatban jelzett vegyületek jelenlétében. A vizsgáló elegyek 2 mmol/l ATP-t tartalmaznak. A reakcióelegyeket 10 percig 20°C-on inkubáljuk, a szubsztrát hozzáadása előtt. A DFP-t DMSO-ban oldjuk. A DMSO végkoncentrációja 1%, ami nem érinti a konjugátum lebomlását. A multipainra és a proteaszómára vonatkozó adatokat azonos kísérleti körülmények között kaptuk. Amint az a VII. táblázatból látható, az izolált komplex érzékeny mind a proteaszóma mind a multipain funkciók inhibítoraira. A diizipropil-fluorofoszfát (DFP), amely a szerin proteázok és a proteaszóma irreverzibilis inhibítora, és az o-fenantrolin, amely kelátokat képez a

nehézfémekkel, körülbelül 60%-ban gátolja a konjugátum lebomlását. Ez utóbbi megfigyelés azt sugallja, hogy egy metalloproteináz is jelen lehet a nagyon nagy komplexben.

VII. táblázat

A komplex, a multipain és a proteaszóma proteolitikus aktivitására ható inhibitorok hatásainak összehasonlítása

Vegyület	Komplex	Multipain	Proteaszóma
	(ubiquitin- ^{125}I -lizozim)		(sLLVT-MCA)
	Relatív aktivitás (%)		
Semmi	100	100	100
DFP (1 mmol/l)	38	96	18
Cisztatin (4 $\mu\text{mol/l}$)	35	30	93
NEM (1 mmol/l)	33	29	37
Leupeptin (100 $\mu\text{mol/l}$)	75	69	83
E-64 (100 $\mu\text{mol/l}$)	96	100	100
Nátrium-oleát (125 $\mu\text{mol/l}$)	38	29	179
SDS (0,01%)	46	44	125
o-fenantrolin (100 $\mu\text{mol/l}$)	57	48	60

Az inhibitoroknak a komplexre gyakorolt hatását összehasonlítottuk azzal a hatással, amit külön a multipainra és a proteaszómára gyakorolnak (lásd VII. táblázat). Az N-etil-maleimid (NEM), egy tiol-blokkoló ágens, és a tyúktojás fehérjéjében levő cisztatin (cisztatin A), amely számos papain-szerű tiol-proteináz hatékony inhibitora, 65%-kal lassítja a komplex aktivitását. Az ATP-ubiquitin-dependens proteolízis cisztatinnal való hasonló gátlását írták le korábban nyúl

izomból izolált UC DEN komplexre [Fagan, J.M. et al., Biochem. J., 243, 335-343 (1987)]. A tiol-proteázok egyéb inhibítorai, mint például a leupeptin vagy az E64, nem mutattak jelentős hatást a komplexre, amint az várható volt abból, hogy nem képesek gátolni a proteaszómát vagy a multipaint.

Érdemes megjegyezni, hogy a komplex érzékeny mind a proteaszóma inhibítoraira (például a DFP-re) mind a multipain inhibítoraira (például a cisztatin A-ra). Tehát úgy viselkedik, hogy mind szerin proteáz, mind tiol proteáz tulajdonságai vannak. A detergensokről, például az SDS-ről vagy a zsírsavakról (oleát) már korábban közölték, hogy aktiválják a proteaszómát [Hough, R. et al., Journal of Biological Chemistry, 262, 8303-8313 (1987)], és kimutatták róluk, hogy gátolják a multipaint. Mindkét említett ágens gátolja a komplex működését. Tehát, az ubiquitin-konjugátum komplex általi lebontásához szükséges mindkét proteáz komponens. Továbbá, ezek a megfigyelések együttesen azt sugallják, hogy a multipain iniciálja az ubiquitin-konjugátumok lebomlását, míg a proteaszóma teljessé teszi (VI. táblázat és 7. ábra).

Azt is vizsgáltuk, hogy a multipain és/vagy a proteaszóma aktív helye befolyásolja-e azt a képességüket, hogy komplexet képeznek. Ha a proteaszóma frakciót előinkubáljuk 10 percre 1 mmol/l DFP-vel, az 1300 kDa-os struktúra képződés még lehetséges, még akkor is, ha a kezelés a proteaszóma funkció nagyon erős gátlását okozza (VII. táblázat). Ezzel szemben, ha a multipaint 10 percre előinkubáljuk 4 μ mol/l cisztatin jelenlétében, akkor a komplex nem jön létre (VI. táblázat).

Lehetséges, hogy a cisztatin-érzékeny proteináz is lényeges a komplex képződéséhez, vagy a cisztatin kötődése sztérikusan gátolja az asszociációs reakciót.

A nukleotidok hatása

Az 1500 kDa-os komplex működéséhez szükséges nukleotid igény hasonlít a multipain nukleotid igényéhez (VIII. táblázat, 7. ábra).

Amint az a VIII. táblázatban látható, az ubiquitin-¹²⁵I-lizozim komplexszel való hidrolízisét az ATP ötszörösre fokozza. Ezzel szemben az ADP vagy az AMP nincs jelentős hatással erre a folyamatra. Nem látható serkentő hatás a nem-metabolizálódó ATP analógokkal sem, azaz az AMP-PNP-vel és az ATP-gamma-S-sel. Ennélfogva ez a reakció láthatólag igényli az ATP hidrolízisét, amint azt korábban kimutatták az UCEN hidrolízisére. Mivel az ub-konjugátumok hidrolízise a komplexszel lineáris legalább 2 óra hosszat ATP jelenlétében illetve távollétében (7. ábra), és sokszorosára fokozódik ha ATP-t adunk hozzá, ez a folyamat láthatólag magába foglal egy valódi, az ATP hidrolízise révén lejátszódó enzim-aktiválást.

VIII. Táblázat

A nukleotidok hatásának összehasonlítása az ubiquitin-lizozim lebomlására a komplex vagy a multipain révén

<u>Vegyület</u>	<u>Komplex</u>	<u>Multipain</u>
	Relatív aktivitás (%)	
Semmi	100	100
ATP	458	743
ADP	146	113
AMP	99	130
AMP-PNP	109	90
ATP-gamma-S	135	103
CTP	410	373
GTP	326	435
UTP	174	108
PP _i	113	118

A reakcióelegy 2 mmol/l nukleotidot vagy 10 mmol/l PP_i-t tartalmaz.

Amint azt az előző példában megjegyeztük, az ATP csak egy húszperces lappangási idő után fokozza a multipain aktivitását, aminek az okát nem ismerjük. Érdekes megjegyezni, hogy ilyen késés nem figyelhető meg a komplexszel. Az ATP serkenti az aktivitását mind az ubiquitin-lizozim mind a lizozim ellen, mindenféle késleltetési idő nélkül (7. ábra).

Az ATP igényt részben kielégíthetjük CTP-vel vagy GTP-vel, ami a fehérje lebomlás 3-4-szeres fokozódását okozza (VII. táblázat). A komplex nukleotid specifikitása emlékeztet azokra a

korábbi megfigyelésekre, amelyeket a retikulocita kivonatok, az UC DEN és a tisztított multipain (VIII. táblázat) ubiquitin-konjugátumos lebontásának nukleotid-specifitására tettek. Ezek a hatások ellentétben vannak az izolált proteaszóma aktiválásával, ami csak ATP-vel fordul elő, és így valószínűleg egy külön nukleotid-kötő fehérjét is magába foglal.

Ha különböző ATP koncentrációkat vizsgálunk, akkor az ubiquitin-konjugátumok maximális lebomlását körülbelül 0,7 mmol/l koncentrációnál figyelhetjük meg. Hasonló eredményeket lehet megfigyelni mind a multipain, mind az 1500 kDa-os komplex esetében is (8. ábra). Ezek az adatok azt sugallják, hogy az ATP K_m értéke mindkét esetben 0,3 mmol/l vagy kevesebb, ami messze az intracelluláris ATP koncentráció alatt van. Tehát ezeknek az enzimeknek ATP által való aktiválása fiziológiásan releváns. Továbbá, ez a K_m konzisztens a korábbi megfigyelésekkel, ami az érintetlen fibroblasztokban lejátszódó fehérjelebomlás energiaigényére vonatkozik [Gronostajski, R., Pardee, A.B. and Goldberg, A.L., Journal of Biological Chemistry, 260, 3344-3349 (1985)], amelynek során a nem-lizoszómális fehérje lebomlás csak akkor csökken, ha az ATP szintjét a sejtben több mint 70%-kal csökkentik (azaz körülbelül 3 mmol/l-ről 1 mmol/l alá).

Jóllehet ezek a vizsgálatok hangsúlyozzák, hogy a komplex képződése egy asszociációs folyamat a proteaszóma és a multipain között, a komplex azonban világosan kimutathatóan még 4-5 azonosítatlan polipeptidet tartalmaz, molekulásúlyuk 65-110 kDa, valamint egy körülbelül 40 kDa méretű fő csíkot, Amerikai Egyesült Államok megfelel az előzőekben említett proteaszóma

inhibítornak. Ezek a különböző csíkok a részlegesen tisztított proteaszóma készítményekben találhatók meg. A legvalószínűbb, hogy ezek a polipeptidek szorosan kötődnek a proteaszómához, mivel együtt tisztulnak ezekkel a részecskékkel az ammónium-szulfátos kicsapás, a DEAE Mono Q és gél-szűrési kromatográfia során. Ezek azonban nem felelnek meg a jól definiált 20-30 kDa-os alegységeknek, amelyek közül számosat klónoztak és szekvenciájukat meghatározták, és igazolták róluk, hogy hasonlítanak egymásra [Fujiwara, T. et al., *Biochemistry*, 28, 7332-7340 (1989)]. Ezek közül a nagyobb polipeptidek közül legalább néhánynak lényegesnek kell lennie a komplex képződése szempontjából, mivel a jobban tisztított proteaszóma készítmények nem képesek a multipainnal asszociálódni ATP jelenlétében.

Ezeknek a polipeptideknek a természete és funkciójuk a nagyobb komplexben nem biztos. Az SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézis alapján megfigyelt egyik jellegzetes komponens egy 40 kDa-os polipeptid, amelyről igazoltuk, hogy megfelel a nagymolekulasúlyú proteázok Murakami és munkatársai által leírt [Murakami et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 83, 7588-7592 (1986)] 250 kDa-os inhibitorának. Emellett a retikulocitáknál szerzett bizonyítékok azt mutatják, hogy ez az inhibitor megfelel az 1500 kDa-os komplex három komponense közül egynek (CF-2). Nemrég sikerült egy ATP-át tisztítani, amely megfelel a 95-105 kDa-os proteaszómához kapcsolódó fehérjék közül egynek, és amely szabályozhatja a proteaszóma aktivitását a komplexen belül. A multipainnak és a

nagyobb komplexnek tartalmazniuk kell olyan helyeket, amelyek felismerik az ubiquitin-konjugátumokat, amelyek lebontják a poli-ubiquitin láncokat (ez egy izopeptidáz aktivitás), és amelyeknek cisztatin-érzékeny proteolitikus aktivitásuk van. Ezáltal, amellett, hogy az ubiquitinezett lizozimet kis peptidekre bontja, az izolált multipain gyorsan lebontja a többszörösen ubiquitinezett fehérjét, ubiquitint és fehérjét szabadítva fel.

Az 1500 kDa-os komplexben a proteaszóma és a multipain szinergisztikusan hat az ubiquitinnel konjugált fehérjék lebontása során. A konjugátum lebomlásának mind a sebessége mind a mértéke nagyobb a komplexszel mint csak a multipainnal. Emellett, ez a szinergizmus csak akkor látható, ha a multipain és a proteaszóma egymáshoz kapcsolódik. Ha a szubsztrátokat először a multipainnal majd a proteaszómával hozzuk érintkezésbe, vagy ha az 1500 kDa-os komplexeket főlegben levő proteaszómákkal keverjük össze (VI. táblázat), akkor ez nem eredményezi az ubiquitin-lizozim gyorsabb lebomlását. Mivel a proteaszómák magukban nem emésztik ezt a szubsztrátot, az első támadást a multipainnak kell intéznie, majd a termékek további emésztéséhez kell a proteaszóma. Érdekes megjegyezni, hogy ha a proteaszómát a multipain után adjuk a reakcióelegyhez, akkor nem emészti tovább a multipain által termelt radioaktív peptideket, amint azt teszi a komplexben (7. ábra), ahol ezek a proteázok láthatóan integrált valószínűleg processzív módon működnek. A komplex rövid oligopeptideket eredményez, jóllehet in vivo és a retikulocita kivonatokban a fehérjéket egészen szabad

aminosavakig emésztí. Valószínűleg más exopeptidázok katalizálják ennek a hidrolitikus lebontási útnak a teljes lejátszódását.

A komplex működéséhez világosan szükséges az egyes komponens proteázok proteolitikus aktivitása, mivel érzékeny mind a multipain inhibitoraira (cisztatin, zsírsavak, SDS), mind a proteaszóma inhibitoraira (DFP). Jóllehet a lizozim és az ubiquitin-lizozim lebontása magába foglalni látszik mind a két enzim szinergisztikus hatását, a proteaszóma-specifikus aktivitások (peptid vagy kazein lebontás) változatlanak tűnik a komplex kialakulása után. Érdekes, hogy a komplex és a multipain hasonló koncentrációban igényli az ATP-t a maximális aktivitáshoz, és mindkettőt aktiválja mind a GTP mind a CTP. Ezáltal egy, a multipainnal asszociálódó ATPáz tűnik a sebességmeghatározónak a komplex aktivitása szempontjából, jóllehet további ATP hidrolitikus lépések, amelyek feltehetően eltérő ATP-ázokat használnak, szintén fontosak ebben a bioszintézis útban, a komplexképződésben és a proteaszóma aktiválásában. A komplexképződésnek egy érdekes következménye az, hogy eltűnik a multipain ATP-aktiválásánál megfigyelt hosszú lag periódus. Ha a lag fázis in vivo is előfordul, akkor ez azt jelentheti, hogy ha egy multipain molekula egyedül megköt egy ubiquitin-konjugátumot, akkor a fehérje degradáció nagyon lassan játszódik le, egészen addig, ameddig a multipain is kölcsönhatásba lép a proteaszómával és nagyobb, aktívabb lebontási komplexet képez.

3. Példa

A citoszol ATP-dependens proteolítikus lebontási út aktiválásának igazolása vázizom idegirtás hatására bekövetkező sorvadása során

Amint azt a 3. és 4. példában leírjuk, a nem-lizoszómális (citoszol) ATP-független proteolítikus lebontási út aktiválását harántcsíkolt (váz) izomban igazoltuk idegirtásos sorvadás és éhezés során, és igazoltuk, hogy ez a felelős a megnövekedett fehérjelebontás legnagyobb részéért, amely mindkét állapotban előfordul.

Anyagok

Minden anyagot a Sigma Chemical Co.-tól vásároltunk (St. Louis, MO), hacsak külön nem jelezzük. Az E-64c és a leupeptin Dr. H. Hanada ajándéka (Taisho Pharmaceutical Co., Tokió, Japán).

Az izmok inkubálása

Ezekben a kísérletekben fiatal (60-80 g-os) hím Charles River patkányokat alkalmazunk, amelyek kedvük szerint fogyasztottak vizet és Purina Lab Chow tápot. A talpemelő izomban idegirtást végeztünk az előzőkben leírt módon [Furuno K. et al., Journal of Biological Chemistry, 265, 8550-8557 (1990)], majd kontrollként látszathibából operált patkányokat használtunk. Az ülőideg kivágása után, vagy a táplálék megvonása után különböző időpontokban elpusztítottuk a patkányokat, és a talpemelő izmot vagy az extensor digitorum longus-t (EDL) kivágtuk és in vitro inkubáltuk, az előzőkben leírt módon [Furuno K. et al., Journal of Biological Chemistry, 265, 8550-8557 (1990); Baracos, V.E. et

al., Am. J. Physiol., 251, C588-596; Kettlehut, I.C., Am. J. Physiol., in press (1991)]. Egy egyórás előinkubálás után az izmokat friss közegbe tesszük, majd két óra elteltével mérjük a tirozin felszabadulását. A legtöbb kísérletben használt Ca^{2+} -mentes Krebs-Ringer bikarbonát puffer összetétele: 5 mmol/l glükóz, 0,5 mmol/l cikloheximid, 4 $\mu\text{g/ml}$ inzulin, 0,17 mmol/l leucin, 0,1 mmol/l izoleucin, 0,2 mmol/l valin, 10 $\mu\text{mol/l}$ metilamin és 50 $\mu\text{mol/l}$ E-64. Ahhoz, hogy az izmokból elvonjuk az ATP-t, dinitrofenollal inkubáljuk őket (0,1 és 0,5 mmol/l), majd 2-dezoxiglükózzal (5 mmol/l), miután a glükózt eltávolítottuk a közegből.

Az összes fehérjelebomlás méréséhez a tirozin sejtekből való felszabadulását olyan körülmények között követjük, amely körülmények között a fehérje-szintézis blokkolva van. A 3-metil-hisztidin akkumulálódását úgy mérjük, hogy követjük a miofibrilláris fehérjék lebomlását; a 3-metil-hisztidin és specifikus összetevője az aktinnak és a miozinnak [Goodman, M.N., Biochem. J., 241, 121-127 (1987); Lovell, B.B et al., Metabolism, 35, 1121-112 (1986)]. A proteolitikus sebesség számításához a tirozin vagy a 3-metil-hisztidin nettó felhalmozódását a táptalajban kombináljuk bármely változással, amely ezeknek az aminosavaknak az intracelluláris pool-jában előfordul. Az ilyen változások elhanyagolhatók, vagy kicsinyek, azokkal a mennyiségekkel összehasonlítva, amelyek a közegbe kerültek, amint azt az előbbiekben megjegyeztük [Furuno, K. et al., Journal of Biological Chemistry, 256, 8550-8557 (1997); Li, J.B. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 231, 441-448 (1976);

Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 251, C588-596 (1986); Tischler, M. et al., Journal of Biological Chemistry, 257, 1613-1621 (1982)].

Az izmok ATP tartalmát metabolikus inhibitorokkal vagy azok nélkül végzett előinkubálás után határozzuk meg, az előzőekben leírt módon [Gronostajski, R., Pardee, A.B. and Goldberg, A.L., Journal of Biological Chemistry, 260, 3344-3349 (1985); Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 251, C588-596 (1986)].

Eredmények

Az ATP megvonás hatása a proteolízisre a vázizomban

Egy egyszerű kísérleti módszert fejlesztettünk ki arra, hogy megfelelő módon mérjük az ATP-dependens rendszert az érintetlen izomban in vitro.

Annak ellenére, hogy az izomkivonatok tartalmazzák az ATP-ubiquitin-dependens rendszert [Matthews, W. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 2597-2601 (1989); Fagan, J.M., Biochem. J., 243, 335-343 (1987)] és az ATP-vel aktivált proteáz komplexeket [Driscoll, J. and Goldberg, A. L., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 787-791 (1989); Fagan, J., Journal of Biological Chemistry, 264, 17868-17872 (1989)], az erőfeszítések sorra kudarcot vallottak, amelyekkel a proteolízis visszaesését akarták demonstrálni annak hatására hogy metabolikus inhibitorokkal megfosztják az érintetlen izmokat az ATP-től [Goodman, M.N., Biochem. J., 241, 121-127 (1987)]. Más vizsgált sejtekben, beleértve a fibroblasztokat, hepatocitákat,

retikulocitákat vagy az *Escherichia colit* [Etlinger, J. and Goldberg, A.L., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 74, 54-58 (1977); Gronostajski, R. et al., Journal of Biological Chemistry, 260, 3344-3349 (1985); Goldbert, A.L. and St. John, A., Ann. Rev. Biochem., 45, 747-803 (1976)] kiderült, hogy azok az ágensek, amelyek blokkolják az ATP termelését, a fehérje lebomlását 50-90 százalékban gátolják. Ha azonban a patkányláb izmait inkubáljuk normál táptalajban (amely tartalmaz Ca^{2+} ionokat) cikloheximiddel, dinitrofenollal (DNP) és 2-dezoxiglükózzal, akkor az izom ATP-tartalma több mint 90%-kal csökken, a teljes proteolízis mégis 80-200 %-kal nő [Fulks, R. et al., Journal of Biological Chemistry, 250, 190-298 (1975)]. Mind a sötét talpemelő izom mind a világos EDL izom hasonló aktiválódást mutat a proteolízisben az ATP-megvonást követően, mint a talpemelő izmok az állatokban végzett idegirtást vagy az állatok kétnapos éheztetését követően. Ez az emelkedés a proteolízisben akkor is megfigyelhető, ha az izmokat olyan körülmények között inkubáljuk, amelyek csökkentik a nettó fehérje lebomlást (azaz feszültség alatt való inkubálás inzulinnal és aminosavak jelenlétében) [Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 251, C588-596 (1986)]. Ilyen körülmények között az izmok megmerevednek, ami jellemző az ATP megvonásra. Számos különböző bizonyíték (lásd az alábbiakban) azt mutatja, hogy a proteolízisnek ez a rendellenes aktiválása annak a következménye, hogy ha az izomból eltávolítjuk az ATP-t, akkor Ca^{2+} ionok lépnek a citoszólba és aktiválják a Ca^{2+} -dependens proteázokat, és a teljes proteolízis így beálló

serkentése elfedi az ATP-dependens lebontási folyamatok egyidejű csökkenését (lásd IX. táblázat és 10. ábra).

IX. táblázat

A különböző sejt-proteázok inhibitorainak és az ATP termelésnek a hatása a miofibrilláris- és az össz-fehérje lebomlására az idegirtott talpemelő izomban

<u>Gátolt</u>	<u>Összfehérje</u>		<u>Miofibrilláris fehérjék</u>	
<u>lebontási út</u>	<u> tirozin</u>		<u>3-metilhisztidin</u>	
	<u>felszabadulás</u>		<u>felszabadulás</u>	
	(pmol/mg/2h)	%	(pmol/mg/2h)	%
Semmi	328±10	100	5,11±0,21	100
Lizoszómális	330±11	100	5,05±0,19	99
+Ca ²⁺ dependens	324±10	99	5,23±0,22	100
+ lizoszómális				
ATP dependens	112±14*	34	2,24±0,17*	44
lebontási út +Ca ²⁺				
dependens +				
lizoszómális				

Az értékek 5 izom átlag±SEM értékei, az ülőideg kivágása után három nappal. A szignifikáns különbség *p<0,01. A fehérje lebomlását pihenő izmokban mértük pihenő hossz mellett, Ca²⁺ mentes Krebs-Ringer bikarbonát pufferben, amely inzulint és aminosavakat tartalmaz. A metilamin (10 µmol/l) a lizoszómális proteolízis inhibitora, az E-64c (50 µmol/l) gátolja mind a lizoszómális tiolproteázokat mind a calpaint, dinitrofenolt (0,1 mmol/l) és 2-dezoxiglükózt (2DG) (5 mmol/l) az ATP-dependens

lebontási út gátlása céljából tettük a reakcióelegybe. A glükózt kihagytuk a DNP-t és a 2-dezoxiglükózt tartalmazó közegekből.

Az ATP-dependens proteolízis inkubált izmokban való mérésének körülményei

Ki lehetett alakítani olyan inkubálási körülményeket, amelyek között az ATP-dependens és energiafüggetlen lebontási folyamatot egymástól függetlenül lehet mérni. Ahhoz hogy mérjük az ATP-dependens folyamatot, ahhoz az kellett, hogy megakadályozzuk a Ca^{2+} dependens proteázok ATP-megvonás hatására bekövetkező aktiválódását (lásd fent). Az izmokat ennél fogva nyugalmi hosszukban tartottuk [Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 251, C588-596 (1986)] Ca^{2+} mentes táptalajban, amely E-64c-t, a calpainok egy hatásos inhibitorát tartalmazta [Hanada, K. et al., Agric. Biol. Chem., 42, 523-528 (1978)]. A korábbi vizsgálatok igazolták, hogy ezek a körülmények blokkolják a proteolízis aktiválását anoxiás (rövidített) izmokban [Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 251, C588-596 (1986); Kettelhut, I.C. et al., Am. J. Physiol. (1991) in press], illetve Ca^{2+} ionofórokkal való kezelésre [Zeman, R.J. et al., Journal of Biological Chemistry, 260, 13619-13624 (1985); Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 251, C588-596 (1986)]. Amint azt az előzőkben leírtuk, ebben a táptalajban az ATP termelés inhibitorairól kiderült, hogy csökkentik a fehérjék lebomlását az izomban (9. ábra), ugyanúgy mint más sejtekben [Gronostajski, R. et al., Journal of Biological Chemistry, 260, 3344-3349 (1985); Goldbert, A.L. and St. John, A., Ann. Rev. Biochem., 45, 747-803

(1976)]. Ahhoz hogy megakadályozzuk a lizoszómális fehérje lebomlást ezekben az izmokban [Furuno, K. and Goldberg, A.L., Biochem. J., 237, 859-864 (1986); Zeman, R.J. et al., Journal of Biological Chemistry, 260, 13619-13624 (1985); Furuno, K. et al., Journal of Biological Chemistry, 256, 8550-8557 (1990)], az inkubáló táptalaj tartalmaz inzulint és aminosavakat is, ami elnyomja az autofágiát [Dicem, J.F., FASEB J., 1, 349-356 (1987); Lardeux, B.R. and Mortimore, G.F., Journal of Biological Chemistry, 262, 14514-14519 (1987)], valamint tartalmaz metilamint is, amely a lizoszómális savasodás inhibítora [Poole, B. and Okhuma, S., Journal of Cellular Biology, 90, 665-669 (1981)]. Emellett az E-64c inaktiválja a lizoszómális tiol-proteázokat (katepszin B, H és L) az intakt izmokban [Baracos, V.E. et al., Am. J. Physiol., 13, E702-710 (1986)]. Ezek az inkubálási körülmények nem érintik az ATP vagy a kreatinfoszfát szintjét a szövetekben, illetve a fehérjeszintézis sebességét [Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 251, C588-596 (1986); Kettlehut, I.C., Am. J. Physiol., in press (1991)].

Akkor is, ha a lizoszómális és a Ca^{2+} -dependens proteolitikus rendszereket blokkoljuk, az izmokban a fehérjelebontás sebessége lineáris volt (10. ábra). Ezek a sebességek hasonlóak voltak azokhoz, amelyek az inhibitorokat nem tartalmazó komplett táptalajokban tartott izmokban mérhetők [Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 251, C588-596 (1986); Kettlehut, I.C., Am. J. Physiol., in press (1991); Baracos, V.E. et al., Am. J. Physiol., 13, E702-710 (1986)]. Ez a megfigyelés megegyezik azokkal a korábbi vizsgálatokkal,

amelyek azt mutatják, hogy a lizoszómális és Ca^{2+} -dependens folyamatok nagyon kis mértékben járulnak hozzá az "alapszintű" fehérje lebontáshoz [Rechsteiner, M., *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 3, 1-30 (1987); Dicem, J.F., *FASEB J.*, 1, 349-356 (1987); Gronostajski, R. et al., *J. Cell. Physiol.*, 121, 189-198 (1984); Furuno, K. and Goldberg, A.L., *Biochem. J.*, 237, 859-864 (1986); Zeman, R.J. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 260, 13619-13624 (1985); [Baracos, V.E. and Goldberg, A.L., *Am. J. Physiol.*, 251, C588-596 (1986)]. Ha normál talpemelő vagy EDL izmokat ebben a közegben 96%-ig megfosztunk az ATP tartalmától (dinitrofenollal és 2-dezoxiglükózzal) akkor a fehérje lebomlás 50-70%-kal csökken (10. ábra), ami hasonlít a fehérje lebomlásnak ahhoz a frakciójához, amely a fibroblasztokban ATP-dependens [Gronostajski, R. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 260, 3344-3349 (1985)]. Ennek az ATP-dependens komponensnek a mennyiségi meghatározására az egyik combban lecsökkentettük az ATP mennyiségét, míg az ellenoldali izom szolgált kontrollként. Összehasonlítottuk a fehérjelebomlás sebességét a két izomban. Az összes fehérjelebomlás nettó növekedése tartalmazza az ATP-dependens komponenst és így nagyon reprodukálhatóan mérhető a különböző fiziológiai állapotú izmokban (9. ábra) [Kettelhut et al., *Diabetes/Metab., Rev.*, 4, 751-772 (1988); Han, H.Q. et al., *Federation Proc.*, 2, A564 (1988); Kettelhut, I.C. et al., *Federation Proc.*, 2, A564 (1988)].

Az izmok ATP-től való megfosztásához az izmokat 1 óra hosszat előinkubáljuk 2,4-dinitrofenollal (DNP) és 2-

dezoxiglükózzal, hogy blokkoljuk az oxidatív foszforilációt és a glikolízist. A fibroblasztokban [Gronostajski, R. et al., Journal of Biological Chemistry, 260, 3344-3349 (1985)] és a hepatocitákban [Hershko, A. and Tomkins, G.M., Journal of Biological Chemistry, 246, 710-714 (1971)] ezek az ágensek reverzibilisen blokkolják az ATP termelését és a fehérje lebomlást. Egyik inhibítor sem érinti az ATP-dependens vagy energia független proteolitikus rendszereket az izom sejtmentes kivonataiban. Tipikusan a DNP-vel (0,1 mmol/l) és 2-dezoxiglükózzal (5 mmol/l) való egyórás előinkubálás >85%-ban csökkenti az ATP-tartalmat, a normál izmokban 0,5 mmol/l DNP 5 mmol/l dezoxiglükózzal >96%-ban csökkenti az ATP mennyiségét. Ezek a kezelések hasonló csökkenést okoznak az ATP-tartalomban az idegirtott izmokban és éheztetett állatokból származó izmokban, amelyeknek az indulási ATP tartalmuk hasonló a kontroll izmokéhoz. Ezek a különböző DNP koncentrációk hasonló csökkenést okoznak a fehérje lebomlásában. Ezekben az ATP-től megfosztott szövetekben a maradék (energia-független) fehérje lebomlás sok órán át lineáris, és a tirozin intracelluláris pooljai hasonlóak az ellenoldali (kezeletlen) izmokéihoz.

Változások a fehérje lebomlásban idegirtásos sorvadás során

Ha egy patkánynak az ülőidegét kivágjuk, akkor a használatlan talpemelő izom azon a lábon gyors sorvadásnak indul, és három napon belül elveszti súlyának és fehérjetartalmának körülbelül 30%-át [Furuno, K. et al., Journal of Biological Chemistry, 256, 8550-8557 (1990); Goldspink, D.F.,

Biochem. J., 156, 71-80 (1976)]. Ezalatt az idő alatt a teljes fehérje lebomlás növekszik és 3 nap elteltével 2-3-szor nagyobb mint az ellenoldali kontroll talpemelő izomban [Furuno, K. et al., Journal of Biological Chemistry, 256, 8550-8557 (1990)]. Hasonló növekedés figyelhető meg az összes fehérje lebomlásban, ha az idegirtott és kontroll izmokat normál Krebs-Ringer bikarbonátban inkubáljuk, vagy olyan körülmények között, amelyek megakadályozzák a lizoszómális vagy Ca^{2+} dependens proteolízist [Furuno, K. et al., Journal of Biological Chemistry, 256, 8550-8557 (1990)].

Annak vizsgálatára, hogy az ATP-dependens lebontási út a felelős-e a fokozott fehérje lebontásért, a sorvadó és a kontroll talpemelő izmot az ideg kivágása után különböző időpontban megfosztjuk az ATP-től, az előzőekben leírt módon. A kontroll kísérletek azt mutatják, hogy sem a 3 napig tartó idegirtás, sem az éhezés nem érinti az izom kiindulási ATP-tartalmát, sem a DNP-vel és dezoxiglükózzal indukált ATP csökkenés (IX. táblázat). A celluláris ATP eltávolítása azonban sokkal nagyobb nettó növekedést okoz a proteolízisben az idegirtott izmokban mint a kontrollban (9. ábra). Például egy jellemző kísérletben ezek az inhibítorok a kontroll talpemelő izomban 43%-kal csökkentik a proteolízist (53 ± 13 pmol/mg/2h), és 64%-kal a 3 napja idegirtott talpemelő izomban (146 ± 13 pmol/mg/2h) ($p < 0,01$). Az ATP eltávolítása után a proteolízis megmaradó szintje nem különbözik az idegirtott és a kontroll szövetekben (9. ábra). Tehát a sorvadó izmokban egy nem-lizoszómális ATP-dependens proteolítikus folyamat látszik

aktiválódni, míg nincs változás a maradék energia-független folyamatban.

Az összes fehérjelebontás a talpemelő izomban egy nappal az ideg kivágása után fokozódik, majd egyre jobban nő a következő 3 napban (9. ábra). Az ATP-dependens komponens párhuzamosan fokozódik az összes proteolízissel ez alatt az idő alatt. Ezzel szemben, az energia-független folyamat végig állandó maradt, Tehát az energia-független folyamat egy eltérő folyamatot képvisel, és nem csak egy műtermék, ami annak a következménye, hogy nem sikerül teljesen blokkolni az ATP-dependens lebontási utat. Az ATP-igényes folyamat fokozódása tehető felelőssé az összes megnövekedett fehérje lebontásért az idegirtott, ily módon fenntartott izomban (9. ábra).

4. Példa

A citoszól ATP-dependens proteolítikus lebontási út aktiválódásának kimutatása éhezés következtében sorvadó vázizomban

Az éheztetés és újra táplálás hatásai

Az éheztetett patkányok izmait tanulmányozzuk annak vizsgálatára, hogy vajon ez a lebontási folyamat más fiziológiai körülmények között aktiválódik-e, ahol az izomfehérje lebomlása fokozódik. Az élelemtől megfosztott állatokban az izomfehérje gyors növekedése figyelhető meg, ami lényegesnek tűnik ahhoz, hogy a szervezetet a glükoneogenezishez szükséges aminosavakkal lássuk el [Li, J.B. and Goldberg, A.L., Am. J. Physiol., 231, 441-448 (1976); B.B. Lowell et al., Biochem. J., 234 237-240 (1986); Goldberg, A.L. et al., Federation Proc., 39, 31-36

(1980); Lowell, B.B et al., *Metabolism*, 35, 1121-112 (1986)]. Amikor az éheztetett állatokból származó EDL izmokat olyan körülmények között inkubáljuk, amelyek blokkolják a lizoszómális és a Ca^{2+} -dependens lebomlási folyamatokat, akkor ezekben az össz-proteolízis nagymértékű növekedést mutat (10. ábra), összhangban a 3-metil-hisztidin termelésnél megfigyelttel [Lowell, B.B et al., *Metabolism*, 35, 1121-112 (1986)]. Ha azonban az éheztetett vagy táplált állatokból származó izmokat metabolikus inhibitorokkal inkubáljuk, hogy megakadályozzuk az ATP-igényes folyamatot, akkor ezek a különbségek a fehérje lebontás sebességében eltűnnek. Tehát éhezésnél az izom proteolízis növekedése egy energia-igényes nem-lizoszómális folyamat következményének tűnik.

Az ebben az ATP-igényes folyamatban beálló növekedés nyilvánvalóvá válik egy nappal a táplálék megvonása után, és ez lehet a felelős az összes megnövekedett proteolízisért, ami az EDL izomban látható ilyen inkubálási körülmények között (12. ábra). Éhezésnél az össz-proteolízis növekedése nagyobb a világos izmokban, azaz például az EDL-ben, mint a sötét talpemelő izomban [Li, J.B. and Goldberg, A.L., *Am. J. Physiol.*, 231, 441-448 (1976)]. Ennek megfelelően a talpemelő izom egy hasonló, de kisebb növekedést mutat az ATP-dependens folyamatban. A talpemelő izomban az átlagos növekedés éhezés során 20-48%-kal kisebb mint a világos EDL-ben ($p < 0,01$).

A patkányok újra táplálásával az EDL-ben a fehérje lebomlás az alapszintre csökken vissza 1 nap alatt (10. ábra). Ez a válasz ismét az ATP-dependens folyamatban beálló változás

következménye, anélkül, hogy változás állna be az energia-független lebontási útban.

Az idegirtásos sorvadás egyik fő tulajdonsága a miofibrilláris fehérjék megkülönböztetett vesztese, de a felgyorsult lebomlásért felelős rendszert még nem sikerült azonosítani [Furuno, K. et al., Journal of Biological Chemistry, 256, 8550-8557 (1990)]. Ezeknek a fehérjéknek a lebomlása követhető, ha mérjük a 3-metil-hisztidin keletkezését, amely az aktin specifikus alkotóeleme, és bizonyos esetekben a mioziné is [Goodman, M.N., Biochem. J., 241, 121-127 (1987); Lowell, B.B et al., Metabolism, 35, 1121-112 (1986)]. Ha ezeket a fehérjéket hidrolizáljuk, akkor ez az aminosav nem használható újra a fehérjeszintézisnél, tehát megjelenése a miofibrilláris fehérje lebomlását jelzi [Goodman, M.N., Biochem. J., 241, 121-127 (1987); Lowell, B.B et al., Metabolism, 35, 1121-112 (1986)]. A 3-metil-hisztidin fokozott keletkezése az idegirtás után jelentősen csökkenthető az ATP termelés blokkolásával, de nem érintik az olyan kezelések, amelyek megakadályozzák a lizoszómális és a Ca^{2+} -dependens proteolízist [Furuno, K. et al., Journal of Biological Chemistry, 256, 8550-8557 (1990)]. Ezek a megfigyelések, valamint az össz-fehérjelebontásra vonatkozó megfigyelések azt mutatják, hogy egy nem-lizoszómális ATP-dependens folyamat felelős elsősorban az izomsorvadásért.

5. Példa

Vizsgálatok sejtmentes kivonatokban az ATP-ubiquitin-dependens rendszer aktiválásának becslésére

A proteolízis mérése izomkivonatokban

Táplált és éheztetett nyulakból származó horpaszizmusokat használunk arra, hogy elegendő anyaghoz jussunk az ATP-dependens rendszer sejtmentes kivonatokban való vizsgálatához. Az éheztetett nyulakat elég hosszú ideig fosztjuk meg a tápláléktól ahhoz, hogy körülbelül 20%-os legyen a testsúly-veszteségük (hasonló ahhoz, amit az egy napig éheztetett patkányoknál tapasztalunk). Az állatokat érzéstelenítjük, majd horpaszizmusokat kivágjuk, és az előzőekben leírt módon homogenizáljuk [Fagan, J., *Journal of Biological Chemistry*, 261, 5705-5713 (1986)].

Centrifugálás után (10000xg, majd 100000xg) az izomkivonatokat DE52 cellulózon frakcionáljuk az ubiquitin és a legtöbb sejtfehérje eltávolítása céljából, az előzőekben leírt módon [Han, H.Q. et al., *Federation Proc.*, 2, A564 (1988); Waxman et al., *Journal of Biological Chemistry*, 262, 2451-2457 (1987)]. Az ATP-Ubiquitin-dependens proteolitikus rendszert tartalmazó frakciót [Hershko, A.J., *Journal of Biological Chemistry*, 263, 15237-15240 (1988); Rechsteiner, M., *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 3, 1-30 (1987); Fagan, J.M. et al., *Biochem. J.*, 243, 335-343 (1987)] 0,5 mmol/l NaCl-dal eluáljuk ("II-es frakció"), 50 mmol/l TRIS-HCl pH=7,8, 1 mmol/l ditiotreitol és 20% glicerín összetételű pufferrel szemben dializáljuk, majd az aktivitás mérése előtt töményítjük. Az endogén izomfehérjék lebomlását úgy vizsgáljuk, hogy mérjük a szabad tirozin mennyiségét, amit fluorimetriásan határozzunk meg a fehérjék triklórecetsavas kicsapása után [Tischler, M. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 257, 1613-1621 (1982); Fulks, R. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 250, 190-298 (1975)].

Emellett az izomfehérjék lebomlását vizsgáljuk, oly módon hogy mérjük a savban oldódó radioaktivitást [Waxman et al., Journal of Biological Chemistry, 262, 2451-2457 (1987); Fagan, J.M. et al., Biochem. J., 243, 335-343 (1987)].

Ezek, a 3. és 4. példából származó megfigyelések erősen azt sugallják, hogy az oldható ATP-igényes proteolítikus rendszer, amely tartalmazza az ubiquitint, aktiválódik éhezés vagy idegirtásos sorvadás során. Az ilyen mérések az érintetlen izmokon azonban nem tudnak különbséget tenni más lehetséges változásoktól ezekben a katabolikus állapotokban. Ennélfogva a táplált és éheztetett nyulakból származó izmok oldható sejtmentes kivonatait használjuk annak vizsgálatára, hogy az éhezés során fellépő megnövekedett proteolízis az ATP-ubiquitin-dependens rendszer aktiválódásának következménye. ATP-ubiquitin-dependens proteolízist mutató sejtmentes készítményeket leírtak nyúl izmokból [Fagan, J.M. et al., Biochem. J., 243, 335-343 (1987)]. A nyúl izmokból származó proteolítikus proteolítikus rendszert részlegesen tisztítottuk nagysebességű centrifugálással és ultracentrifugálással, hogy a miofibrillumokat és a membrán komponenseket eltávolítsuk, majd DEAE kromatográfiának vetjük alá, hogy a legtöbb (>90%) oldható fehérjét eltávolítsuk, beleértve a szabad ubiquitint is. A kapott frakció tartalmazza az összes enzimet az ubiquitin-konjugáláshoz és az ubiquitin-fehérje konjugátumok hidrolíziséhez [Hershko, A.J., Journal of Biological Chemistry, 263, 15237-15240 (1988); Waxman et al., Journal of Biological Chemistry, 262, 2451-2457 (1987); Fagan, J.M. et al., Biochem.

J., 243, 335-343 (1987); Hough et al., Journal of Biological Chemistry, 261, 2400-2408 (1986)], valamint a proteaszóma ATP-vel aktivált formáját (multikatalitikus komplex) [Waxman et al., Journal of Biological Chemistry, 262, 2451-2457 (1987)].

Ezekben a kivonatokban az endogén fehérjék hidrolízise (amit a tirozintermelés mutat) 5-9-szeresre nőtt az ATP hozzáadásával, majd még tovább fokozódott, ha az ATP-t ubiquitinnel együtt adtuk hozzá (X. táblázat). Ez az ATP-vel aktivált folyamat kétszer erősebb az éheztetett állatokból származó kivonatokban, mint a kontroll állatokban. Az ubiquitin hozzáadása tovább fokozta a proteolízist mindkét készítményben, de láthatólag csökkentette az éhezésnél látható relatív növekedést. Emellett a proteolízisnek a hozzáadott ATP nélkül megfigyelt kismennyiségű növekedése szintén nagyobb az éheztetett állatokból származó kivonatokban.

X. Táblázat

Az éhezés hatása nyulakban az ATP-ubiquitin-aktivált proteolízisre horpaszizom kivonatokban

<u>Állapot</u>	<u>Endogén fehérjék hidrolízise</u>		
	<u>Nincs hozzáadás</u>	<u>+ATP</u>	<u>+ATP+Ubiquitin</u>
		(felszabadult tirozin nmol/2h)	
Etetett	0,6±0,1	5,7±0,9	9,2±1,8
Éheztetett	2,0±0,1	10,8±2,1	15,2±3,7
Növekedés	1,4±0,1*	5,1±2,3*	6,0±3,8
%-os változás	234%	90%	65%

¹⁴C-kazein hidrolízise

(μg hidrolizált kazein/h)

Etetett	1,1±0,2	1,5±0,2	1,6±0,2
Éheztetett	1,6±0,2	2,3±0,2	2,5±0,2
Növekedés	0,5±0,3	0,8±0,3	0,9±0,3**
%-os változás	46%	56%	53%

Az értékek jelentése átlag±SEM 7 nyúlra. Szignifikáns különbség * p < 0,05 és ** p < 0,01. Ezeket a vizsgálatokat részlegesen tisztított proteolitikus frakciókkal végezzük ("II-es frakciók"), amint azt a továbbiakban a példában ismertetjük. Az endogén fehérjék lebomlását (tirozin-termelés) 2 óra hosszat mérjük 37°C-on 5 mg II-es frakció fehérjével. A ¹⁴C-kazein lebomlását 37°C-on vizsgáljuk 1 óra hosszat 400 μg II-es frakció fehérjével és 20 μg ¹⁴C-kazeinnel. A vizsgálatokat TRIS pufferben (50 mmol/l, pH=7,8) végezzük, amely tartalmaz ditiotreitolt (1 mmol/l) és MgCl₂-ot (10 mmol/l) 200 μl végtérfogatban. 5 mmol/l ATP-t vagy 15 μmol/l ubiquitint adunk az elegyhez, ahol ezt külön jelezzük.

Abból a célból, hogy tovább vizsgáljuk az ATP-dependens lebontási rendszer egy aktiválását, ahelyett hogy a szubsztrátként szolgáló endogén sejtfehérjék eltérését néznénk, ¹⁴C-metil-kazeint használunk szubsztrátként (X. táblázat). Ezt a fehérjét is gyorsan lebontják az ATP-től független enzimek, és erről az ATP-től független folyamatról tűnik úgy, hogy éhezés hatására megnövekedik (jóllehet ez a trend nem jelentős statisztikailag). ATP illetve ATP és ubiquitin hozzáadásával a kazein lebomlásában tiszta növekedés észlelhető, és ez az ATP-

dependens kazein hidrolízis, függetlenül attól, hogy ubiquitin jelen van-e vagy nincs, majdnem kétszer nagyobb a nyulak 6 napig tartó élelemtől való megfosztása után. Részletes időlefutások nem vizsgálhatók, mert ezeket a készítményeket nehezen lehet előállítani, és a nyulaknál észlelt azon tendencia következtében, hogy az emésztőrendszerükben nagymennyiségű táplálékot tartalékolnak. Azonban a proteolízisnek ilyen növekedése nem volt megfigyelhető olyan nyulak izmaiból készült kivonatokban, amelyeket 6 napnál rövidebb ideig éhezettünk, ami alatt nem mutattak testsúlyvesztést, és még jelentős mennyiségű táplálékot tartalmazott a bélrendszerük. Mindegyik esetben az exogén vagy endogén szubsztrátokkal végzett vizsgálatok világosan jelzik az ATP-dependens lebontó rendszer megnövekedett kapacitását éhezés során, amit az inkubált izmokon végzett mérések sugallnak (10. ábra).

6. Példa

További bizonyítékok az ATP-ubiquitin-dependens folyamat aktiválására a különböző katabolikus állapotokban

Az ATP-ubiquitin-dependens proteolitikus folyamatról kimutattuk, hogy a vázizomban idegirtásos sorvadás, éhezés és lázas fertőzés során fellépő fokozott fehérjelebontás legnagyobb részéért felelős. Emellett a poli-ubiquitin mRNS és a proteaszóma mRNS szintjéről is kimutattuk, hogy a vázizomban idegirtásos sorvadás, éhezés és lázas fertőzés során megnő, amint azt az alábbiakban igazoljuk. Hasonló adatokat kaptunk patkányokkal metabolikus acidózis során (amit ammónium-kloridos injekcióval lehet indukálni), vagy rákos kachexia során (amit

aszцитесzben növekvő, transzplantálható hepatómával lehet indukálni).

Anyagok és módszerek

Izomkészítmények

Fiatal hím patkányokat (60-80 g, Charles River CD törzs) Purina Lab Chow-n és vízen tartunk, tetszés szerinti mennyiséget fogyaszthatnak belőlük. Mindegyik kezelést a 3. példában leírtak alapján végezzük el. Az egyik hátsó comb talpemelő izmának idegirtásához az ülőideget kivágjuk körülbelül 1 cm-rel a térdhajlati üreg fölött, miközben az állatok el vannak altatva [Furuno, K. et al., Journal of Biological Chemistry, 256, 8550-8557 (1990)]. Mindegyik esetben az állatokat nyaki diszlokációval pusztítjuk el, majd az EDL és talpemelő izmokat kivágjuk az előzőekben leírt módon.

RNS készítés és Northern blot elemzés

Az izmokból össz-RNS-t izolálunk a guanídium-izotiocianát/CsCl módszerrel, majd az RNS elektroforézisét 1%-os agaróz gélben végezzük, amely 0,2 mol/l formaldehidet tartalmaz [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)]. Az RNS-t a gélből egy nylon membránra visszük át (Gene Screen Dupont, New England Nuclear Research Pro.) 20XSSC (3 mol/l nátrium-klorid, 0,3 mol/l nátrium-citrát). Az RNS-t keresztkötéssel kötjük a membránhoz UV fényt alkalmazva 1200 mikrojoule energiával egy Stratalinker berendezésben (Stratagene Co., CA). A membránokat 65°C-on hibridizáljuk ³²P-jelzett cDNS próbával, a random indító molekula módszer alkalmazásával

[Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Analytical Biochemistry*, **132**, 6-13 (1983)]. A hibridizációs puffer összetétele: polivinil-pirrolidon 40000 (0,2%), Ficoll 400000 (0,2%), szarvasmarha szérumalbumin (BSA, 0,2%), TRIS-HCl (0,05 mol/l, pH=7,5), NaCl (1 mol/l), nátrium-pirofoszfát (0,1%), nátrium-dodecil-szulfát (SDS, 1%) és heringsperma DNS (100 µg/ml). A hibridizálás után a membránokat 0,5X SSC/1% SDS összetételű oldatban mossuk 42°C-on vagy 65°C-on, A membránokat XAR-2 filmre exponáljuk (KODAK) az autoradiográfiához.

A dot blot elemzéshez négy koncentrációjú (1,5 µg-ról kétszeres higítások) a talpemelő vagy EDL izomból származó összesenaturált RNS-t cseppentünk Gene Screen membránokra. az egyes pontokra felvitt RNS mennyiségét 1,5 µg-on tartjuk, oly módon hogy *Escherichia coli* tRNS-t adunk hozzá (amely a patkányizom távollétében nem mutat hibridizálást). A hibridizációs próba egy ubiquitin cDNS fragment [Agell, N. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **85**, 3693-3697 (1988)], más HSP cDNS próbák és oligo dT [Harley, C.B., *Gene Anal. Tech.*, **4**, 17-22 (1987)], az összes poli-A-tartalmú RNS mérése esetében. Az ubiquitin cDNS-hez Dr. M. Schlesinger szívességéből jutottunk hozzá (Washington University Medical School), a HSP70 cDNS-hez Dr. R. Voellmy jóvoltából, a HSP 90 cDNS-hez Dr. L.A. Weber jóvoltából jutottunk hozzá (University of Miami School of Medicine). A blottokat az ubiquitin próbával hibridizáljuk 65°C-on, az oligo-determináns-vel szobahőmérsékleten, majd ezen ezeken a hőmérsékleten mossuk. A poliUb RNS és az össz-RNS szintjét az autoradiogramokon levő pontok intenzitásából

határozzuk meg, automatizált denzitometriás pásztázással. A páratlan Student féle t-tesztet használjuk a statisztikai elemzésekben, hogy összehasonlítsuk a táplált és az éheztetett állatok izmait, a páros Student féle t-tesztet használjuk arra, hogy összehasonlítsuk az ellenoldali idegirtott és kontroll izmokat.

Az össz-ubiquitin tartalom (amely tartalmazza mind a szabad ubiquitint mind a fehérjéhez ligált ubiquitint) mérését A Riley, D.A. és munkatársai által leírt immunkémiai módszerrel végezzük [Riley, D.A. et al., J. Histochem. Cytochem., 36, 621-632 (1988)].

Eredmények

Ubiquitin mRNS éhezés során

Annak vizsgálatára, hogy vajon az ubiquitin mRNS szintje növekszik-e miközben az izomfehérje lebomlása fokozódik, a poliUb transzkriptumok szintjét patkányizmokban a táplálék megvonása után különböző időpontokban mérjük. Amint az a 11. ábrán látható, a talpemelő izom két transzkriptumot tartalmaz, méretük 2,4 illetve 1,3 kb, ami megfelel a poliUb gének méretének más fajokban [Schlesinger, M.J. and Bond, U., in Oxford Surveys on Eukaryotic Genes (Maclean, N., ed.), 4, 7691 (1987)]. Mindkét transzkriptumnak a szintje progresszíven emelkedik az éheztetett állatok izmaiban. Az ubiquitin mRNS relatív szintjét ezekben az éheztetett patkányokból származó szövetekben dot-blot elemzéssel és autoradiográfiával mérjük (12. ábra). A táplálék megvonása után 48 órával az összes ubiquitin mRNS szintje az extensor digitorum longus (EDL)

izmokban négyszeres növekedést mutat a kontroll állatok izmaival szemben (13. ábra, felső panel). A talpemelő izom, amely az éhezés során kevésbé sorvad mint az ELD [Li, J.B. and Goldberg, A.L., *Am. J. Physiol.*, 231, 441-448 (1976)], az ubiquitin mRNS szintjének kétszeres emelkedését mutatja. Egy harmadik, minor ubiquitin transzkript (mérete 0,9 kb) is kimutatható az autoradiogrammok túlexpozíciójával. Méretében megfelel az ubiquitin-extenzió gén termékének [Schlesinger, M.J. and Bond, U., in *Oxford Surveys on Eukaryotic Genes* (Maclean, N., ed.), 4, 7691 (1987)], amelynek expressziója a riboszóma biogenezéséhez kapcsolódik [Finley, D. et al., *Nature*, 338, 394-401 (1989); Redman, K. and Rechsteiner, M., *Nature*, 338, 438-440 (1989)]. Ennek a transzkriptumnak nem nő a mennyisége, a poliUb mRNS-sel ellentétben, amely így úgy tűnik, hogy szelektíven fokozódik.

Annak vizsgálatára, hogy a poliUb mRNS növekedése reverzibilis-e, az éheztetett patkányok közül néhánynak adunk táplálékot 24 óra hosszat. Az újra táplálás után 24 órával a poliUb mRNS szintje visszatért a normál állatok izmaiban levő szintre. Ez a növekedés és csökkenés a poliUb mRNS szintjében tehát párhuzamosan fut az össz-fehérje lebomlással (10. ábra), és az ATP-dependens lebontási folyamattal (10. ábra).

Annak meghatározására, hogy a poliUb mRNS specifikus módon szabályozódik-e éhezés során, megvizsgáljuk, hogy vajon ezekben az izmokban az össz-RNS vagy a mRNS mennyisége is megváltozik-e a táplálék megvonása után, csakúgy, mint a poliUb mRNS szintje. Az össz-RNS tartalmat abszorbancia spektrofotometriával mérjük, és a poli-A-tartalmú RNS össz-

mennyiségét a dot blottokban ^{32}P -oligo-dT próbával mérjük. A poliUB mRNS-sel ellentétben az össz-RNS-tartalom és az mRNS mennyisége (azaz a poli-A-tartalmú RNS mennyisége) a talpemelő izomban és az EDL-ben körülbelül 50%-kal csökkent a táplált állatok izmaiban talált értékhez képest. Az össz-RNS $72 \pm 3,5$ -ről $35 \pm 1,5$ $\mu\text{g}/\text{izom}$ szintre esett vissza, és az össz-mRNS (önkéntes denzitometriás egységekben kifejezve) 2133 ± 376 -ról 1004 ± 20 egység/izomra esett vissza a talpemelő izomban éhezés során. Az éheztetett EDL-ben az össz-RNS 68 ± 6 -ról $38,5 \pm 1$ $\mu\text{g}/\text{izom}$ értékre esett vissza, az össz-RNS mennyisége pedig 710 ± 73 -ról 413 ± 11 egység/izom értékre esett vissza. Az össz-RNS és az össz-mRNS aránya, az ubiquitin mRNS-sel ellentétben tehát nem változik jelentősen a 48 órás táplálék-megvonás során, illetve az újratáplálás során (12. ábra).

Ubiquitin mRNS más szövetekben

A következő kísérletekben azt vizsgáljuk, hogy a poliUb mRNS mennyiségének növekedése éhezés során csak a vázizomra jellemző, vagy egyéb patkány szövetek is mutatnak hasonló választ két nappal a táplálék megvonása után. Az éhezésnél megfigyelt fokozott proteolízist elsősorban a lizoszómális folyamatnak tulajdonítjuk. Az éhező patkányok szívében (kamra) a poliUb mRNS hasonló növekedése figyelhető meg mint az EDL izmokban. Ezzel szemben ilyen változás nem figyelhető meg egyik vizsgált szövetben sem, beleértve a májat, lépét, zsírszövetet, agyat, heréket és a vesét. A májban, vesében és zsírszövetekben jelentős súly és fehérjevesztés volt megfigyelhető éhezés során, de amint várható volt, sem a herék, sem az agy nem mutatott

jelentős súlyvesztést ilyen körülmények között. Tehát az éhezés során az ubiquitin mRNS növekedése a harántcsíkolt izmok speciális adaptációjának tűnik, és nem figyelhető meg más szövetekben.

Ubiquitin mRNS szint idegirtásos sorvadásnál

Az ATP-dependens proteolízisnek egy hasonló, 2-3-szoros felgyorsulása figyelhető meg az izmokban az idegirtásos sorvadás során. Annak vizsgálatára, hogy vajon ebben az állapotban a poliUb gének expressziója is aktiválódhat-e, vizsgáltuk az ubiquitin mRNS-ek szintjét a talpemelő izomban 1 és 3 nappal az idegirtás során (XI. táblázat). Az idegirtást követő 1. és 3. napon a poliUb transzkriptumok szintje jelentősen megnövekedett, az ellenoldali kontroll izomban mérhető szintek fölé. Az izmok dot blot elemzésével kiderült, hogy a poliUb mRNS szint 2-3-szorosra nő az össz-mRNS proporációja következtében az idegirtást követően (XI. táblázat). Jóllehet a kontroll izmokban az ubiquitin mRNS szint nem változott ennek a vizsgálatnak a során, ezzel szemben az össz-RNS tartalom az idegirtáson átesett talpemelő izomban 3 nap alatt 40%-kal csökkent (XI. táblázat).

Az ubiquitin mRNS-nek ez a növekedése korrelált az izomban megfigyelhető felgyorsult proteolízissel.

XI. Táblázat

A patkány talpemelő izom egyoldali idegirtásának hatása
a poliUb mRNS tartalomra, az össz-RNS tartalomra és a súlyra
Az operáció után eltelt idő

	<u>Kontroll</u>	<u>Idegirtott</u>	<u>Kontroll</u>	<u>Idegirtott</u>
Ub mRNS/ μ g össz-RNS	2,4 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 0,6*	2,5 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,9**
mRNS/ μ g össz-RNS	23,8 $\pm$ 1,4	23,1 $\pm$ 1,4	22,7 $\pm$ 0,8	23,7 $\pm$ 1,4
Össz RNS(μ g) /	42,3 $\pm$ 2,2	36,7 $\pm$ 1,3**	54,0 $\pm$ 6,5	32,5 $\pm$ 4,2*
/talpemelő izom				
Izomsúly (mg)	28,8 $\pm$ 0,7	26,3 $\pm$ 0,8**	30,7 $\pm$ 1,1	23,5 $\pm$ 2,1*
Súlyvesztés		-9%		-23%
(a kontroll %-a)				

Az értékek hat állat átlagát $\pm$ SEM jelentik. A
szignifikanciaszint a kontroll értékektől * $p < 0,005$,
** $p < 0,05$.

Az izmok ubiquitin tartalma

Annak meghatározására, hogy a poliUb mRNS szintjének növekedése az ubiquitin fokozott termelését eredményezi-e, ennek a fehérjének az össz-mennyiségét az izmokban immunesszével vizsgáljuk (XII. táblázat). Ezek a tömbök mind a szabad ubiquitin mind a sejtfehérjékhez konjugált ubiquitin mennyiségét mérik [Riley, D.A. et al., J. Histochem. Cytochem., 36, 621-632 (1988)]. Két napja éhező állatokból származó EDL izmokban az ubiquitin szint 63%-os szintnövekedése figyelhető meg a táplált kontrollokhoz képest. Egy ennél még nagyobb, 91%-os növekedés figyelhető meg a talpemelő izom ubiquitin tartalmában, két nappal az ülőideg kivágása után. Tehát az össz-ubiquitin

tartalom korrelál az ATP-dependens proteolízis és az ubiquitin mRNS növekedésével.

Az ubiquitin sejtfehérjékhez való kovalens kötéséről ismert, hogy a gyors lebontáshoz jelzi meg őket. Emiatt mértük az izmok ubiquitin-konjugátum tartalmát a normál és az idegirtott izomban. Amint a XIII. táblázatban látható, az ubiquitinezett fehérjék szintje 158%-kal növekedett két nappal az idegirtás után. Hasonló növekedés látható az ubiquitinezett fehérjékben a patkányok éheztetése után (nem közölt adatok), és ez a különbség eltűnt, miután az állatokat újra tápláltuk egy napig. Ezek a megfigyelések jelzik az ubiquitin-dependens folyamat aktiválását a sorvadó izmokban.

Az idegirtott izmokban és az éheztetett állatokban a proteaszóma szintézisében is megfigyelhető növekedés, amit a proteaszóma különböző alegységeit kódoló mRNS-ek 2-3-szoros növekedése is jelez (XIII. táblázat). A C-3 és C-9 alegységek mRNS-ei láthatók, és rokon kísérletekben hasonló növekedés figyelhető meg három másik alegység mRNS-ében. Tehát a sorvadó izmokban ennek a lebontási útnak több komponense megnövekedett szinttel szerepel.

Értékelés

Az ubiquitin mRNS szintjének ezek a változásai az idegirtást, éhezést vagy újratáplálást követően párhuzamosnak tűnnek, és kapcsolódni látszanak az össz-fehérje lebontás változásaival, és a miofibrilláris fehérjék inkubált izmokban mért lebomlásával. A sorvadó izmokban mért ubiquitin mRNS szintnövekedés tűnik felelősnek a megnövekedett ubiquitin

tartalomért (XII. táblázat), ami az össz izomfehérje nettó vesztesége ellenére áll elő. Emellett az előző példák igazolják, hogy ezek, az össz-proteolízisben beálló változások a nem-lizoszómális ATP-dependens folyamat aktiválódásának következményei, és az éhezés megnövekedett ATP-ubiquitin-serkentett proteolízishez vezet az izmok oldható kivonataiban.

Számos friss megfigyelés is erősen alátámasztja azt a következtetést, hogy az ubiquitin-dependens proteolítikus rendszer működése fokozódik ilyen körülmények között. Amint az alábbiakban ismertetjük, azt is megfigyeltük, hogy az éhező állatokból származó izmok és az idegirtott izmok is magasabb ubiquitin-konjugált fehérje szintet valamint a proteaszómát kódoló mRNS szintet mutatnak, ami lényeges az ilyen ubiquitinezett fehérjék lebontása során. Ezek az eredmények együtt azt mutatják, hogy az izomban az ubiquitin-dependens rendszert pontosan szabályozza az összehúzóási aktivitás és a táplálékfelvétel. Az éhezésre adott válaszhoz adrenális szteroidokra van szükség [Kettelhut et al., Diabetes/Metab., Rev., 4, 751-772 (1988); Goldberg, A.L. et al., Federation Proc., 39, 31-36 (1980)], és a glükokortikoszteroidokról is kiderült, hogy az éhezés során szükségesek mind a megnövekedett ATP-dependens proteolízishez mind az ubiquitin mRNS ezt kísérő megnövekedéséhez.

Az itt bemutatott változások az ubiquitin mRNS szintjében pontosan párhuzamba állíthatók az összfehérje lebomlás változásaival, valamint a miofibrilláris fehérjék lebomlásával, és mindkettőről kiderült az előző példák során,

hogy egy ATP-dependens nem-lizoszómális folyamatban előfordulnak. A jelen adatok azt sugallják, hogy ez a rendszer sokkal általánosabb szerepet játszik a normális izomfehérjék lebontásában, beleértve valószínűleg a hosszúéletű miofibrilláris komponenseket is.

A poliUb gén tűnik egy olyan gén példájának, amely specifikusan indukálódik a sorvadó izmokban. Az éhezési vagy idegirtásos sorvadás során, amikor az izomtömeg és az össz-RNS csökken, a poliUb mRNS és az ubiquitin koncentráció nő. Ezzel szemben, az ubiquitin-extenziós mRNS szintje nem növekszik, vagy éppen csökkenhet, amint az várható, mivel ez a transzkriptum az új riboszómák keletkezésében vesz részt [Finley, D. et al., *Nature*, 338, 394-401 (1989); Redman, K. and Rechsteiner, M., *Nature*, 338, 438-440 (1989)]. Tehát a poliUb mRNS szintek és az ubiquitin termelés szabályozása fordítottan tűnik az össz-RNS-sel szemben, illetve az ubiquitin-extenziós fehérje mRNS-ével szemben.

Különösen érdekes fiziológiailag az a megfigyelés, hogy az ubiquitin mRNS növekedése (és feltehetően az ubiquitin növekedése) a harántcsíktolt izmokra korlátozódik. Ilyen változások előfordulnak a patkányszívben is, amely az éhezés során jelentős súlyvesztésen esik át. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az ATP-dependens proteolízis fokozódik a szívizomban is ilyen körülmények között, jóllehet rendszeres vizsgálatokat nem közöltek ebben az ügyben. Várható volt, hogy a herékben és az agyban nem lesz változás az ubiquitin szintekben, mivel ezekben a szervekben a fehérjetartalom és a szerv mérete

állandó marad. Azt azonban érdemes megjegyezni, hogy az ubiquitin mRNS szintje nem változik a májban, amelyben az össz-proteolízis világosan fokozódik alacsony inzulinszintű állapotokban, egy lizoszómális autofágiás mechanizmussal [Dicem, J.F., FASEB J., 1, 349-356 (1987); Lardeux, B.R. and Mortimore, G.F., Journal of Biological Chemistry, 262, 14514-14519 (1987); Mortimore, G.E. et al., Diabetes/Metabolism Reviews, 5, 49-70 (1989)]. Ezek a megfigyelések tehát azt sugallják, hogy a különböző proteolítikus folyamatok relatív fontossága különbözik az eltérő szövetekben, és az ATP-ubiquitin-dependens lebontási útnak speciális jelentősége van a harántcsíkolt izomban, különösen katabolikus állapotokban.

XII. Táblázat

Az idegirtás és éhezés hatása az ubiquitin szintekre a
patkány vázizmokban

<u>Izom</u>	<u>Összfehérje</u>	<u>Össz-ubiquitin</u>	
	(mg/izom)	(pmol/izom)	(pmol/mg fehérje)
<u>Talpmelő</u>			
Beidegzett	3,5±0,4	89±5	27±2
Idegirtott	2,7±0,2	137±12	51±2
Különbség	-0,8±0,3**	+47±11**	+24±3**
%-os változás	-23%	+53%	+91%
<u>EDL</u>			
Táplált	4,5±0,3	71±6	16±1
2 napig	3,1±0,4	79±7	26±2
éheztetett			
Különbség	-1,4±0,5*	+7±9	+10±2**
%-os változás	-32%	+10%	+63%

Az értékek jelentése átlag ± SEM az extensor digitorum longum (EDL) izmoknál négy táplált vagy éheztetett állat alapján, és hét páros talpmelő izomnál az egyik ülőideg kivágása után. A szignifikancia különbség * p < 0,05

** p < 0,01.

XIII. Táblázat

A kétnapos idegirtás hatása az ATP-dependens proteolízisre valamint az ubiquitin és ubiquitin-konjugátumok szintjére patkány talpemelő izomban

	ATP-dependens <u>proteolízis</u> (pmol tyr/mg/2h)	Szabad <u>ubiquitin konjugátumok</u>	Ubiquitin (pmol Ub/mg fehérje)	Össz <u>ubiquitin</u>
Kontroll	63,0±11	17,0±1,3	10,0±0,7	27±1,9
Idegirtott	201±17	25,0±1,2	26,0±1,3	51±2,2
%-os növekedés	232%*	52%*	158%*	92%*

* jelentése átlag ± SEM 7 állatra

* p < 0,01

XIV. Táblázat

A patkány lábikraizom idegirtása 4 napra fokozza az ubiquitin és két proteaszóma alegység mRNS tartalmat

<u>mRNS</u>	<u>Kontroll</u>	<u>Idegirtott</u>
	(tetszőleges egységek)	
Poliubiquitin	36,4±3,58	63,4±3,63**
C3-proteaszóma alegység	32,6±4,41	67,2±4,29**
C9-proteaszóma alegység	25,2±7,79	74,4±7,78*

** (p>0,01)

* (p>0,05)

XV. Táblázat

Az Escherichia coli endotoxin (LPS) injekciók gyorsan
serkentik a fehérje lebomlást, hasonlóképpen a patkány extensor
digitorum longus izomban

		Proteolízis (nmol tirozin/rng/2h)	
Injekció	Sóoldat	Kezelt	Különbség
LPS	0,214±0,013	0,280±0,15	+31% P<0,01

Az endotoxin (LPS) injekció aktiválja az ATP-dependens
fehérje lebomlást patkányizmokban

Hozzáadás		Proteolízis (nmol tirozin/mg/2h)	
Nem-lizoszómá- lis proteo- lízis*			
0,145±0,009	0,190±0,017	+31% P<0,05	
ATP megvonás után			
0,094±0,004	0,102±0,004	NS	
(ATP-depen- dens	0,051±0,009	0,088±0,014	+73% P<0,05

* A lizoszómális és Ca²⁺ folyamat nem változik ilyen
körülmények között

Fiatal (60-80g) hím Charles River patkányoknak tetszés
szerint adtunk vizet és Purina Lab Chow-t. De 7 és 8
között injekcióztuk őket steril sóoldattal (0,9% NaCl)
és Escherichia coli LPS-sel (40 mg/100 g testsúly,
sóoldatban oldva), majd 6 órával később a patkányokat
elpusztítottuk.

A fehérje lebomlás aktiválása szisztémás fertőzések
során

Egy másik állapot, amely során az izomfehérje lebomlás jelentősen megnövekszik, a bakteriális, virális vagy parazita eredetű szisztémás fertőzés. A szepszises betegeknél, amely állapot gyakran követi a traumás sérüléseket, gyakran tapasztalható jelentős negatív nitrogén egyensúly, ami főleg a felgyorsult izomlebomlás következménye. Ez a válasz lázzal áll kapcsolatban, és a szervezet akut fázisos válaszának részét képezi. Ez állatokban utánozható, ha endotoxinnal vagy élő baktériumokkal injekciózzuk őket [Goldberg et al., J.Clin. Inv. (1989)]. Számos különböző kísérlet jelzi, hogy a proteolízisnek ezt a fokozódását az aktivált makrofágok által kibocsátott keringő faktorok jelzik. Amint az a XV. táblázatból látható, hat órával az endotoxin injekció után az állatokat elpusztítjuk és lábizmaikat in vitro vizsgáljuk. Az EDL gyors növekedést mutat az össz-fehérje lebomlásban. Ezt a választ nem a lizoszómális vagy kalciummal aktivált proteázok okozzák. Ha az ATP-dependens degradatív rendszert mérjük, akkor azt látjuk, hogy 70%-kal megnőtt és teljes egészében a számlájára írható az állatokban megfigyelt össz-fehérje lebomlás. Ha a patkányokat endotoxinnal kezeljük, akkor ez szintén 2-3-szoros növekedést okoz a poliUb mRNS szintjében ezekben az izmokban 6-7 órán belül. A poliUb mRNS ilyen növekedése, amely hasonlít az éhezés vagy idegirtás során adott válaszra, nem látható egyéb szövetekben. A lábikraizmokban, amelyeket az Escherichia coli endotoxin (40 µg/100g testsúly) injekciózása után Northern blottal elemzünk,

poliubiquitin gének cDNS próbáinak felhasználásával, szintén megfigyelhető az ubiquitin mRNS indukciója (nem közölt adatok). Ezek a megfigyelések tehát azt jelzik, hogy egy általános biokémiai program van az izomban, amely ebben a három katabolikus állapotban és egyéb állapotokban, amilyen például a rákos kachexia, amit az aszciteszben Yoshida hepatómát hordozó patkányokban lehet indukálni, valamint metabolikus acidózisban, amelyet patkányokban NH_4Cl injekciójával lehet indukálni (nem közölt adatok), fokozott fehérje lebomláshoz vezet.

7. Példa

A proteaszóma 40 kDa-os inhibítorának izolálása

Anyagok és módszerek

A DEAE-cellulózt (DE-52), CM-cellulózt (CM-52) és a foszfocellulózt (P11) a Whatman cégtől szerezzük be. Az ubiquitin-konjugáló enzimeket (E1, E2 és E3) ubiquitin-sepharose affinitás-oszlop felhasználásával izoláljuk [Hershko, A. et al., Journal of Biological Chemistry, 258, 8206-8214 (1983)], és az ubiquitin- ^{125}I -lizozim konjugátumok készítéséhez használjuk [Hershko, A and H. Heller, Biochemical and Biophysical Research Communications, 128, 1079-1086 (1985)]. Az összes többi anyagot az előző példákban leírtuk.

Tisztítások

Fenilhidrazin injekciókkal indukált nyúl retikulocitákat állítunk elő [az előzőekben leírt módon, illetve vásároljuk a Green Hectares (Oregon, WI) cégtől]. A retikulocitákat megfosztjuk az ATP-től, oly módon hogy 2,4-dinitrofenollal és 2-dezoxi-glükózzal inkubáljuk a leírt módon [Ciechanover, A. et

al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 81, 1100-1105 (1978)]. Ezután elkészítjük a lizátumokat, és DE-52 kromatográfiának vetjük alá. A 0,5 mol/l NaCl-dal eluálódó fehérjét [Hershko, A. et al., Journal of Biological Chemistry, 258, 8206-8214 (1983)] betöményítjük, ammónium-szulfátot használva 80%-os telítésig, 10000 x g-vel centrifugáljuk 20 percig, majd 20 mmol/l TRIS-HCl pH=7,6, 1 mmol/l DTT összetételű (A jelű) pufferben szuszpendáljuk. Az ugyanezzel a pufferrel szemben végzett extenzív dialízis után a fehérjét (II-es frakció) vagy -80°C-on tároljuk 0,5 mmol/l ATP-ben, vagy tovább frakcionáljuk.

A II-es frakciót (kb. 200 mg) ubiquitin-sepharose oszlopra visszük, majd az ubiquitin-konjugáló enzimeket specifikusan eluáljuk [Hershko, A. et al., Journal of Biological Chemistry, 258, 8206-8214 (1983)], majd ubiquitin-lizozim előállítására használjuk [Hershko, A and H. Heller, Biochemical and Biophysical Research Communications, 128, 1079-1086 (1985)]. A nem adszorbeált frakciót 38%-os telítésre állítjuk be, ammónium-szulfát felhasználásával, majd 20 percig kevertetjük, Ganoth és munkatársai leírása szerint [Ganoth, D. et al., Journal of Biological Chemistry, 263, 12412-12419 (1988)]. A kicsapott fehérjéket centrifugálással nyerjük ki (10000 x g, 15 perc). Az üledéket A pufferben szuszpendáljuk, majd ammónium-szulfáttal ismét 38%-os telítést állítunk be. A kicsapott anyagot a fentiek szerint kinyerjük, majd 10% glicerint tartalmazó A pufferben szuszpendáljuk. Ugyanezzel a pufferrel szemben végzett dialízis után a 0-38%-os üledéket Mono-Q

anioncserélő oszlopon kromatografáljuk, amelyet 10% glicerint tartalmazó A pufferrel hoztunk egyensúlyba. A fehérjét eluáljuk, 60 ml lineáris NaCl gradiens alkalmazásával, amelynek koncentrációja 20-400 mmol/l között változik. Egyesítjük azokat a frakciókat, amelyek gátolják a proteaszóma peptidáz aktivitását, majd betöményítjük, és Superose 6 (Hírvivő 10/30) gélszűrő oszlopon kromatografáljuk, amelyet 100 mmol/l NaCl-t és 0,2 mmol/l ATP-t tartalmazó A pufferrel hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot 0,2 ml/perc áramlási sebességgel futtatjuk, majd 1 ml-es frakciókat szedünk. Egyes olyan kísérletekben, amelyekben a CF-2 tulajdonságait vizsgáljuk (lásd eredmények), az inhibítor további tisztítása érhető el egy második, sokkal keskenyebb (50-300 mmol/l NaCl) Mono-Q kromatográfiás gradiens alkalmazásával, ami az inhibítor éles csúcsban való megjelenését eredményezi, és ebben csak a 40 kDa-os csík látható SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézis és Coomassie festés után. A proteaszómával szemben gátló hatással rendelkező frakciókat egyesítjük, majd B pufferrel szemben dializáljuk, amelynek összetétele: 20 mmol/l KH_2PO_4 (pH=6,5), 10% glicerin, 1 mmol/l DTT és 1 mmol/l ATP. A mintát azután egy 2 ml-es foszfocellulóz oszlopra visszük fel, amelyet B pufferrel hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot 4 ml ilyen pufferrel mossuk, majd 4 ml ilyen puffert engedünk át rajta, és utána 20, 50, 100, 400 vagy 600 mmol/l NaCl-t tartalmazó B puffert bocsátunk át rajta.

A részlegesen tisztított CF-1 előállításához a mono Q frakciókat, amelyek 100-240 mmol/l NaCl-nál eluálódtak, egyesítjük, 1 ml-re töményítjük, majd egy Superose 6 oszlopra

viSSzük fel őket, amelyet 100 mmol/l NaCl-t és 0,2 mmol/l ATP-t tartalmazó A pufferrel hoztunk egyensúlyba. A körülbelül 600 kDa-nál eluálódó frakciókat használjuk CF-1 tartalmú frakciókként.

A proteaszómát a két 38%-os ammónium-szulfát kicsapásnál kapott felülúszókból izoláljuk. A felülúszókban ammónium-szulfáttal 80%-os telítést állítunk be, majd 20 percig kevertetjük. A kicsapott fehérjét centrifugálással kinyerjük, A pufferben szuszpendáljuk, majd extenzíven dializáljuk ugyanezzel a pufferrel szemben. A proteaszómát Mono-Q anioncserélő kromatográfiával majd Superose 6-on végzett gélszűréssel izoláljuk az előzőekben leírt módon [Driscoll, J. and Goldberg, A. L., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 787-791 (1989)].

Az 1500 kDa méretű proteolítikus komplexet úgy állítjuk elő, hogy a II-es retikulocita frakciót 37°C-on inkubáljuk 30 percig 2 mmol/l ATP, 5 mmol/l MgCl₂ jelenlétében 50 mmol/l TRIS-HCl pH=7,6 pufferben. 38%-os telítettségű ammónium-szulfáttal való kicsapás után az üledéket centrifugálással nyerjük ki (10000xg, 10 perc), majd A pufferben szuszpendáljuk, és Mono Q anioncserével majd Superose 6 kromatográfiával izoláljuk.

Vizsgálatok

A proteaszóma gátlását úgy mérjük, hogy az egyes oszlop-frakciókat a proteaszómával inkubáljuk 1 mmol/l ATP jelenlétében 37°C-on 10 percig. Az előinkubálás után a reakciócsöveket jégre tesszük, majd vagy ¹²⁵I-lizozimet vagy Suc-LLVY-MCA-t adunk hozzá. A reakciókat 37°C-on hajtjuk végre, ¹²⁵I-lizozimmal 60

percig, Suc-LLVY-MCA-val 10 percig. A fehérje hidrolízisét úgy mérjük, hogy mérjük a 10%-os triklórecetsavban oldódó radioaktivitást, a peptid hidrolízisét pedig a metilkumaril-7-amid felszabadulásával [Driscoll, J. and Goldberg, A. L., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 787-791 (1989)]. Az ubiquitin-konjugált ^{125}I -lizozim lebomlását 27°C -on 60 percig végzett reakcióval mérjük. A reakcióelegyek vagy 5 mmol/l EDTA-t vagy 2 mmol/l ATP-t és 5 mmol/l MgCl_2 -t tartalmaznak, és 10% triklórecetsav hozzáadásával állítjuk le.

Eredmények

Az inhibitor izolálása

Annak megértésére, hogy a proteaszóma hogyan szabályozódik in vivo, és hogyan működik az ubiquitin-konjugátumot lebontó komplexben, megpróbáltuk izolálni azokat a faktorokat, amelyek befolyásolják az aktivitását. A retikulocita II-es frakciót ammónium-szulfáttal olyan frakciókra választjuk szét, amelyek vagy 0-38%-nál vagy 40-80%-nál csapódnak ki. Az utóbbi frakciót használjuk a proteaszómák izolálására. Ezek a részecskék (ily módon ATP-től megfosztott retikulocitákból előállítva) jelentős aktivitást mutatnak ^{125}I -lizozimmal és Suc-LLVY-MCA-val szemben, ami független az ATP-től [Eytan, E. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 7751-7755 (1989); Driscoll, J. and A.L. Goldberg, Journal of Biological Chemistry, 265, 4789-4792 (1990)]. Sem a proteaszóma, sem a 0-38%-os frakció nem mutat jelentős aktivitást az ubiquitin-konjugált ^{125}I -lizozimmal szemben [Eytan, E. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 7751-

7755 (1989); Driscoll, J. and A.L. Goldberg, Journal of Biological Chemistry, 265, 4789-4792 (1990)]. Amint azonban azt korábban leírták, az ubiquitinezett lizozim ATP-dependens degradációját azután figyelték meg, hogy a proteaszómát és a 0-38%-os frakciót előinkubálták ATP jelenlétében (nem közölt adatok).

A 0-38% mellett kicsapott anyagot azután Mono-Q anioncserélőn választjuk szét, és mindegyik frakciót megvizsgáljuk, hogy képes-e befolyásolni a proteaszóma Suc-LLVY-MCA elleni vagy a ^{125}I -lizozim elleni aktivitását. Az oszlopfrakciókat 10 percig előinkubáljuk a proteaszómával, majd valamelyik szubsztrátot hozzáadjuk. Önmagában egyik oszlopfrakció sem mutatott jelentős hidrolitikus aktivitást, nem érintette a proteaszóma aktivitását, a gátló hatás csúcsát körülbelül 240-280 mmol/l NaCl-nál eluáljuk. Ez jelentősen csökkenti mindkét szubsztráttal szembeni proteolitikus aktivitását. Emellett a lizozim és a peptid hidrolízisét hasonló mértékben gátolja.

A gátló hatást hordozó anyag további tisztítása érdekében az aktív frakciókat egyesítjük, majd gélszűrőssel kromatografáljuk. Az inhibítort egy éles csúcs formájában eluáljuk, látszólagos molekulásúlya 100-150 kDa.

Az aktív frakciókat egyesítjük, majd vizsgáljuk, hogy mennyire képesek gátolni a proteaszómák szubsztrát hidrolizáló aktivitásait. A növekvő inhibítor koncentráció mellett a proteaszómák aktivitása lineárisan csökken mind a ^{125}I -lizozimmal, mind a Suc-LLVY-MCA-val szemben, jóllehet a gátlás

mértéke erősen változik az egyes preparátumok között.

Az inhibitor az 1500 kDa-os proteolitikus komplex egyik komponense

Az inhibitorhoz hasonlóan az 1500 kDa-os komplex egy komponenséről (CF-2) is leírták, hogy molekulásúlya körülbelül 250 kDa. Annak ellenőrzésére, hogy az inhibitor megegyezik-e a CF-2-vel, a gélszűréssel kapott inhibítort foszfocellulóz kromatográfiának vetjük alá. Eytan és munkatársai [Eytan, E. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 7751-7755 (1989)] megjegyzik, hogy a CF-2-nek kicsi az affinitása a foszfocellulózhoz, és kisebb mint 100 mmol/l NaCl koncentráció mellett eluálódik. Ennek megfelelően a gátló aktivitást az átfolyóból és a 20 mmol/l-es NaCl eluátumból lehet kinyerni (azaz abból a régióból, ahol a CF-2 aktivitást leírták). Az egyes foszfocellulóz frakciókat azután megvizsgáljuk, hogy képesek-e helyreállítani az ubiquitinezett lizozim lebomlását. Egyedileg vagy kombinálva, a proteaszómát és a CF-1-et tartalmazó frakció nem támogatja az ubiquitinezett lizozim gyors lebomlását. Ha azonban ezt az elegyet kombináljuk az inhibitor aktivitással, akkor az ubiquitin-¹²⁵I-lizozim aktivitás élesen megnő. Egyik másik foszfocellulóz frakció sem serkenti ezt a folyamatot.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az inhibitor megfelel a CF-2-nek, és így lényeges az ubiquitinnel ligált fehérjék hidrolíziséhez. A CF-2 egyik szokatlan tulajdonsága, hogy meglehetősen labilis 42°C-ra melegítve, de az ATP stabilizálja [Ganoth, D. et al., Journal of Biological

Chemistry, 263, 12412-12419 (1988)]. Annak további vizsgálatához, hogy a proteaszóma inhibítora megfelel-e a CF-2-nek, a tisztított inhibítort 42°C-on ATP-vel vagy anélkül, vagy a nem-hidrolizálódó analóggal, az AMPPNP-vel előinkubáljuk. A proteaszómát hozzáadjuk, majd a peptidáz aktivitást 10 perc múlva vizsgáljuk. A gátlás mértéke gyorsan csökken az előinkubálás során, ha nem adunk az elegyhez nukleotidot. Az ATP vagy az AMPPNP jelenléte megakadályozza ezt az aktivitásvesztést. Továbbá ennek az anyagnak az a képessége, hogy helyreállítja az ubiquitinnel konjugált lizozim lebomlását, szintén gyorsan csökken 42°C-on végzett inkubálással, és az ATP vagy az AMPPNP hozzáadása (nem közölt adat) megelőzi ezt az aktiválást. Mivel az ubiquitin-konjugátum lebomlás gátlása és helyreállítása hasonló inaktiválási kinetikát mutat, és hasonlóképpen stabilizálódik ATP hozzáadásával, ez a két funkció valószínűleg egyetlen molekulában található meg, amely láthatóan köti az ATP-t.

Jóllehet az ATP stabilizálja a gátló faktort, nem fontos a proteaszóma gátlásához. Az inhibítort 20 percig előinkubálva ATP-vel vagy anélkül, hasonló mértékű gátlás figyelhető meg. Mindazonáltal, az ATP-vel való stabilizálás következtében, ezt a nukleotidot rutinszerűen hozzáadjuk mindegyik inkubáláshoz.

Ha SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel elemezzük, akkor az inhibitor preparátum egy fő csíkot mutat körülbelül 40 kDa-nál. Annak vizsgálatára, hogy ez a 40 kDa-os alegység megfelel-e az 1500 kDa-os komplex valamelyik alegységének, előállítjuk az 1500 kDa-os komplexet a II-es frakció Mg^{2+} -ATP-

vel való inkubálása révén, majd anioncserélő és gélszűrési kromatográfiával izoláljuk. Ezeknek az aktív frakcióknak az SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel való elemzése azt mutatja, hogy számos, az erre a komplexre korábban leírt peptidekhez hasonló peptideket tartalmaz [Hough, R. et al., Journal of Biological Chemistry, 262, 8303-8313 (1987); Ganoth, D. et al., Journal of Biological Chemistry, 263, 12412-12419 (1988); Eytan, E. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 7751-7755 (1989)]. Ebben a frakcióban azonban egy gyorsan megjelenő 40 kDa méretű csík a jellemző. Hogy tovább vizsgáljuk azt a kérdést, hogy milyen fehérjék asszociálódnak a proteaszómával, a II-es frakciót immunológiailag kicsapjuk, anti-proteaszóma monoklonális antitestet használva, majd SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel elemezve. Az ubiquitin-konjugátum lebontó aktivitásról korábban kimutatták, hogy a II-es frakció immunológiai kicsapásával eltávolítható [Matthews, W. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 2597-2601 (1989)]. Az immunológiailag kicsapott anyagot SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel vizsgálva a proteaszóma alegységek jellegzetes csoportja figyelhető meg, méretük 20 és 34 kDa között változik, más, magasabb molekulásúlyú csíkokkal együtt. Fontos, hogy egy 40 kDa méretű csíkot, amely hasonlít az inhibítorhoz, és hasonlít ahhoz, amelyet a részlegesen tisztított komplexben lehet látni, ki lehet mutatni az immunológiailag kicsapott anyagban.

Ekvivalensek

A szakterületen jártas szakember rutin kísérletezéssel

az ismertetett találmány specifikus megvalósítási módjainak számos ekvivalensét képes megvalósítani. Ezeket az ekvivalenseket és az alábbi igénypontok oltalmi körébe tartozónak tartjuk.

Szabadalmi igénypontok

1. Izolált multimer tiol-proteáz, azzal jellemezve, hogy molekulásúlya hozzávetőlegesen 500 kDa, az aktiváláshoz ATP-t igényel, főleg az ubiquitinezett fehérjéket bontja le, illetve egy olyan enzim, amely lényegében ezzel azonos aminosav szekvenciával rendelkezik.

2. Az 1. igénypont szerinti multimer tiol-proteáz, azzal jellemezve, hogy egy endopeptidáz.

3. Az 1. igénypont szerinti multimer tiol-proteáz, azzal jellemezve, hogy izomból izoláljuk.

4. Izolált ATP-dependens multimer tiol-proteáz, azzal jellemezve, hogy molekulásúlya hozzávetőlegesen 500 kDa, egy körülbelül 1500 kDa-os molekulásúlyú komplexet képez a körülbelül 700 kDa molekulásúlyú proteaszómával.

5. Lényegében tiszta multipain.

6. Rekombináns technikával előállított multimer tiol-proteáz, azzal jellemezve, hogy molekulásúlya 500 kDa, az aktiváláshoz ATP-t igényel, és főleg az ubiquitinezett fehérjéket bontja.

7. Multimer tiol-proteáz, amelynek molekulásúlya 500 kDa, azzal jellemezve, hogy:

- a) részt vesz az ubiquitinezett lizozim ATP-vel serkentett lebontásában;
- b) erős proteolítikus aktivitást mutat az oxidálószerekkel roncsolt hemoglobinnal szemben; és
- c) csekély proteolítikus aktivitást mutat az sLLVT-MCA-val szemben.

8. DNS, azzal jellemezve, hogy egy olyan multimer tiol-proteázt kódol, amelynek molekulasúlya 500 kDa, az aktiváláshoz ATP hidrolízist igényel, és főleg az ubiquitinezett fehérjéket bontja le.

9. Gazdasejt, azzal jellemezve, hogy egy körülbelül 500 kDa molekulasúlyú multimer tiol-proteázt expresszál, amely az aktiváláshoz ATP hidrolízisét igényli, és főleg az ubiquitinezett fehérjéket bontja le.

10. Eljárás annak meghatározására, hogy egy anyag képes-e gátolni a multipaint, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket tartalmazza:

- a) az anyagot, a multipaint, egy ubiquitinezett fehérjét, ATP-t és Mg^{2+} ionokat kombinálunk;
- b) az a) pont szerint előállított kombinációt az ubiquitinezett fehérje ATP-vel serkentett lebontására alkalmas körülmények között tartjuk; és
- c) meghatározzuk, hogy lejátszódik-e az ubiquitinezett fehérje ATP-vel serkentett lebomlása.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a c) lépésben meghatározzuk az ubiquitinezett fehérje ATP-vel serkentett lebomlásának mértékét, és az eredményeket egy megfelelő kontrollhoz hasonlítjuk.

12. Eljárás annak meghatározására, hogy egy anyag mennyire képes a multipaint gátolni, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket alkalmazzuk:

- a) az anyagot multipainnal, ATP-vel és Mg^{2+} ionnal kombináljuk; és

- b) meghatározzuk, hogy vajon komplex képződik-e a multipain és a proteaszóma között, mikoris a komplex képződésének elmaradása azt jelzi, hogy az anyag gátolja a multipaint.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) lépésben egy ubiquitinezett fehérje is jelen van, és a b) lépésben egy aktív multipain-proteaszóma komplex jelenlétét úgy becsüljük meg, hogy meghatározzuk, vajon az ubiquitinezett fehérje ATP-vel serkentett lebomlása lejátszódik-e.

14. Eljárás a sejtekben lejátszódó ATP-ubiquitin-dependens lebontási folyamatok inhibítorának gyors keresésére, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket tartalmazza:

- a) olyan sejteket tenyésztünk amelyekben egy rövidéletű fehérje keletkezik, amelynek lebomlása ubiquitin-dependens;
- b) a tenyésztett sejteket egy olyan anyaggal hozzuk érintkezésbe, amelyről feltételezzük, hogy képes az ATP-ubiquitin-dependens lebontási folyamatot gátolni, olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik az anyag belépését a tenyésztett sejtekbe;
- c) meghatározzuk, hogy a rövidéletű fehérje mennyi ideig van jelen a tenyésztett sejtek citoszoljában, mikoris a rövidéletű fehérje felhalmozódása a citoszólban azt jelzi, hogy az ATP-ubiquitin-dependens folyamat gátlódik.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tenyésztett sejtek COS sejtek, amelyek egy enzim

rövidéletű mutáns formáját termelik.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az enzim az *Escherichia coli* β -galaktozidáz egy mutáns formája.

17. Eljárás az izomban lejátszódó ATP-ubiquitin-dependens folyamat inhibitorának azonosítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- a) egy idegirtásnak, éhezésnek, lázas fertőzésnek vagy metabolikus acidózisnak kitett állatból talpemelő vagy extensor digitorum longus izmot inkubálunk az ATP-ubiquitin-dependens folyamat egy potenciális inhibitorával együtt, olyan körülmények között, amelyek alkalmasak az ubiquitinezett fehérjék lebontására;
- b) mérjük az izomfehérje egyik lebomlási termékét a potenciális inhibitor jelenlétében; és
- c) összehasonlítjuk a b) pontban kapott eredményeket az izomfehérje lebomlási termékeinek felszabadulásával olyan talpemelő vagy extensor digitorum longus izomban, amelyet egy idegirtásnak, éhezésnek, lázas fertőzésnek vagy metabolikus acidózisnak kitett állatból izoláltunk, a potenciális inhibitor távollétében,

mikoris az izomfehérje bomlási termékeinek csökkent mértékű felszabadulása jelzi az ATP-ubiquitin-dependens folyamat gátlását.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve,

hogyan az izomfehérje bomlási terméke a 3-metil-hisztidin.

19. Eljárás egy állatban lejátszódó ATP-ubiquitin-dependens folyamat inhibitorának azonosítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- a) egy állatot idegirtásnak, éhezésnek, lázas fertőzésnek vagy metabolikus acidózisnak teszünk ki;
- b) az állatnak az ATP-ubiquitin-dependens folyamat egy potenciális inhibitorát adjuk be; és
- c) mérjük, hogy az állat mennyi 3-metil-hisztidint választ ki; és
- d) a c) pontban a 3-metil-hisztidin kiválasztására kapott eredményeket összehasonlítjuk egy olyan állattal kapott eredményekkel, amelyet idegirtásnak, éhezésnek, lázas fertőzésnek vagy metabolikus acidózisnak tettünk ki, hasonló módon mint a a) pontban,

mikoris a 3-metil-hisztidin csökkent kibocsátása jelzi az ATP-ubiquitin-dependens folyamat gátlódását.

20. Eljárás a multipain gátlására, azzal jellemezve, hogy a multipaint érintkezésbe hozzuk egy olyan anyaggal, amely kötődik a multipain egy aktív pontjához, olyan körülmények között, amelyek megfelelőek az anyag multipainhoz való kötődésére, és így egy multipain-anyag komplex képződik.

21. Eljárás a multipain sejten belüli gátlásának gyors vizsgálatára, azzal jellemezve, hogy a sejtbe egy olyan anyagot juttatunk be, amely megakadályozza az 1500 kDa méretű multipain-proteaszóma komplex működését.

22. eljárás az ATP-ubiquitin-dependens folyamat aktiválásának gátlására egy sejtben, azzal jellemezve, hogy a sejtbe elegendő mennyiségű multipain inhibítort juttatunk be, olyan körülmények között, amelyek alkalmasak ahhoz, hogy a multipain inhibitor a multipainhoz kötődjön, ennek következtében az inhibitor kötődik a multipainhoz, és a multipain inhibitor gátolja a lebomlási folyamatot.

23. Eljárás az ATP-ubiquitin-dependens folyamat gátlására egy izomsejtben, azzal jellemezve, hogy az izomsejtbe egy olyan anyagot juttatunk be, amely megakadályozza egy körülbelül 1500 kDa molekulasúlyú komplex képződését, amely tartalmazza a multipaint és a proteaszómát.

24. Eljárás az izomtömeg csökkenésének gátlására, azzal jellemezve, hogy zavarjuk a nem-lizoszómális ATP-igényes proteolítikus folyamatot az izomsejtekben.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nem-lizoszómális ATP-igényes proteolítikus gátoljuk az izomsejtben, oly módon hogy az izomsejtekben zavarjuk egy körülbelül 500 kDa molekulasúlyú multimer tiol-proteáz aktivitását, amely az aktiválásához ATP hidrolízisét igényli, és elsősorban az ubiquitinezett fehérjéket bontja le.

26. A 24. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nem-lizoszómális ATP-igényes proteolítikus folyamatot gátoljuk az izomsejtekben, oly módon hogy megakadályozzuk a multipain-proteaszóma komplex működését.

27. Eljárás egy egyedben az izomtömeg veszteségének gátlására, azzal jellemezve, hogy az egyednek egy multipain

inhibítort adunk be, olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik hogy a multipain inhibitor belépjen az egyed izomsejtjeibe, és a multipain valamint a multipain inhibitor egymáshoz kapcsolódjon az izomsejteken belül, aminek eredménye az ATP-ubiquitin-dependens lebontási út gátlása.

28. Eljárás egy citoszól ATP-ubiquitin-dependens proteolítikus folyamat aktiválásának megelőzésére egy emlős sejtben, amely folyamatban egy körülbelül 500 kDa molekulasúlyú ATP-vel aktivált tiol-proteáz játszik szerepet, azzal jellemezve, hogy az emlős sejtet egy olyan anyaggal hozzuk érintkezésbe, amely képes az említett ATP-ubiquitin-dependens proteolítikus lebontási út aktivitását csökkenteni, oly módon, hogy kapcsolódik az ATP-dependens tiol-proteáz aktív helyéhez.

29. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az anyag a papain-szerű enzimek egy inhibitora.

30. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az anyag egy cisztatin A analóg vagy annak származéka.

31. Szintetikus proteaszóma inhibitor.

32. Szintetikus peptid, azzal jellemezve, hogy utánozza az izomsejtekből izolált 40 kDa molekulasúlyú proteaszóma inhibitor aktivitását.

33. Peptid, azzal jellemezve, hogy molekulasúlya 40 kDa-nál kisebb és gátolja a 700 kDa molekulasúlyú proteaszómát.

129 oldal
12 ábrával
141

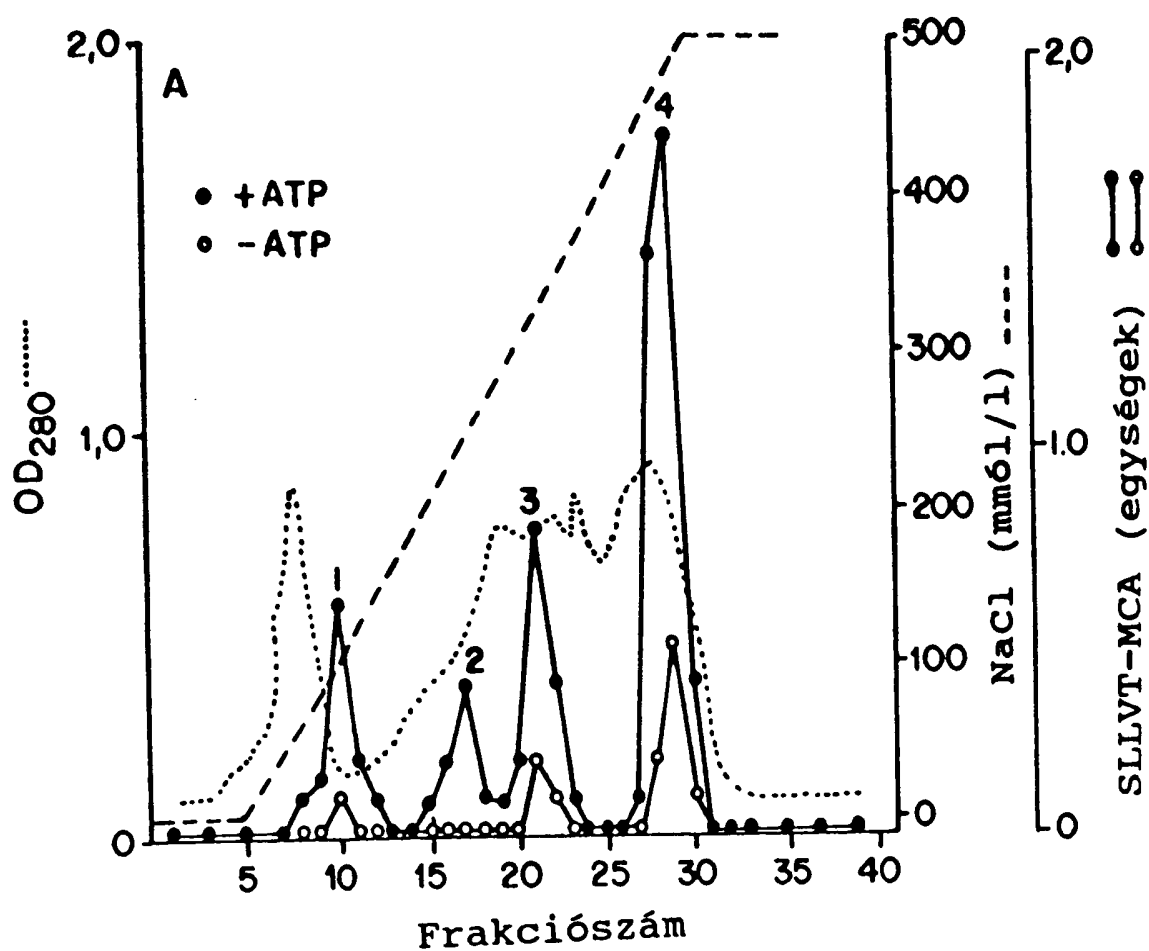
[Handwritten signature]

A meghatalmazott:
[Handwritten signature]
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
7.

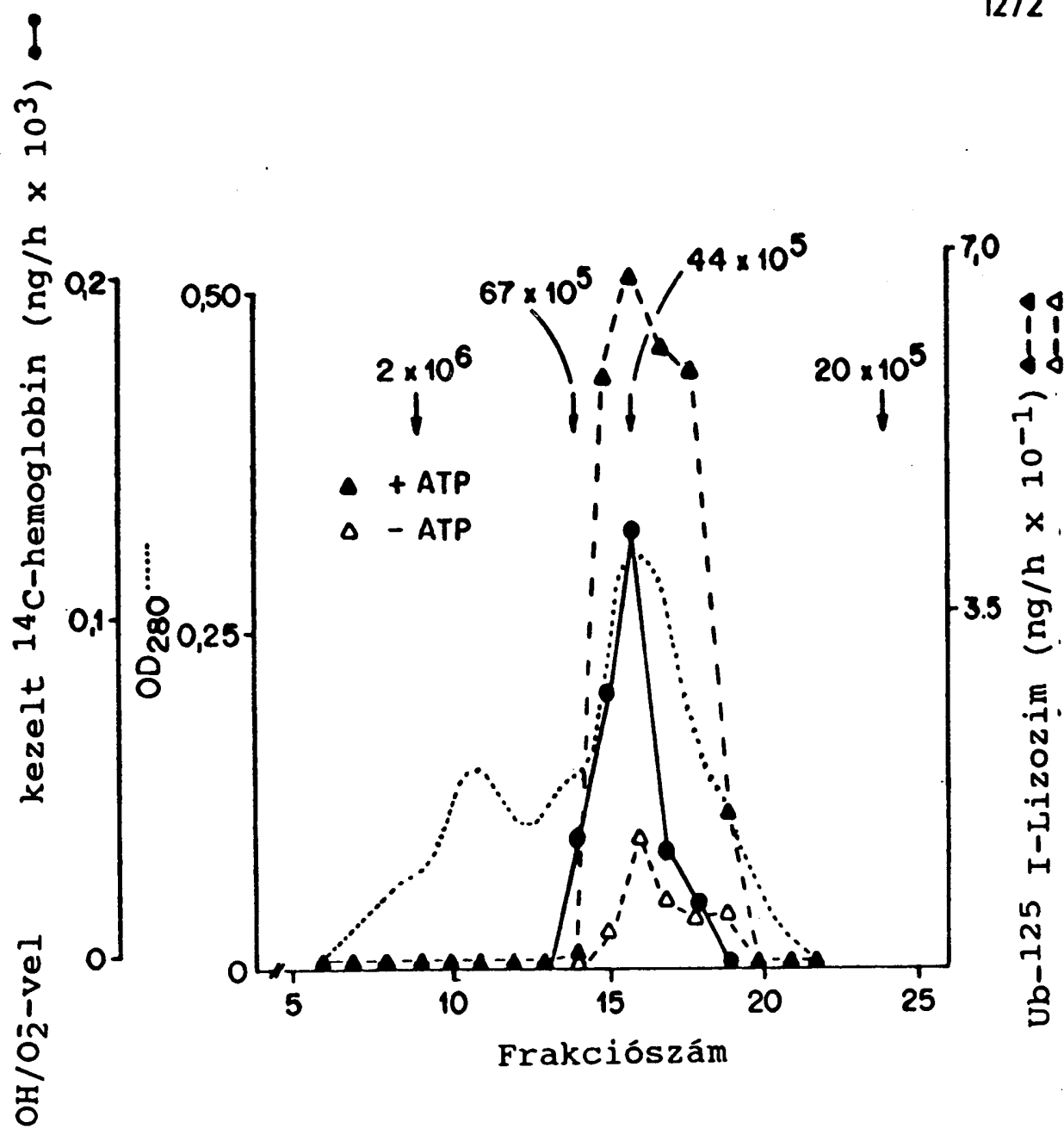
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

12/1

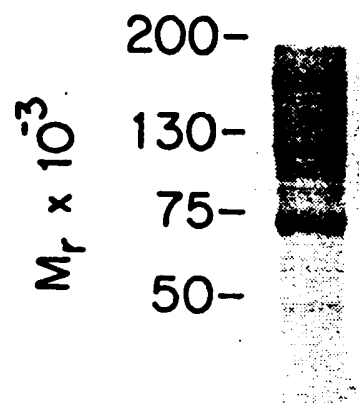
15654



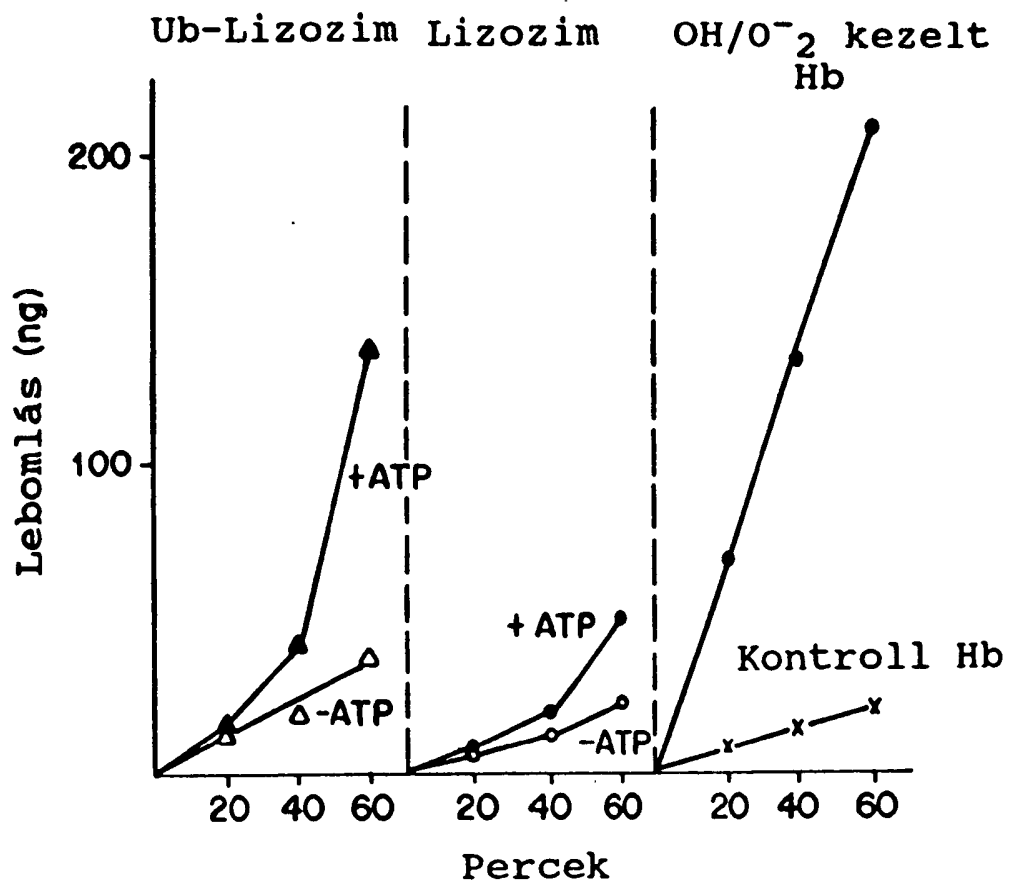
1 ÁBRA



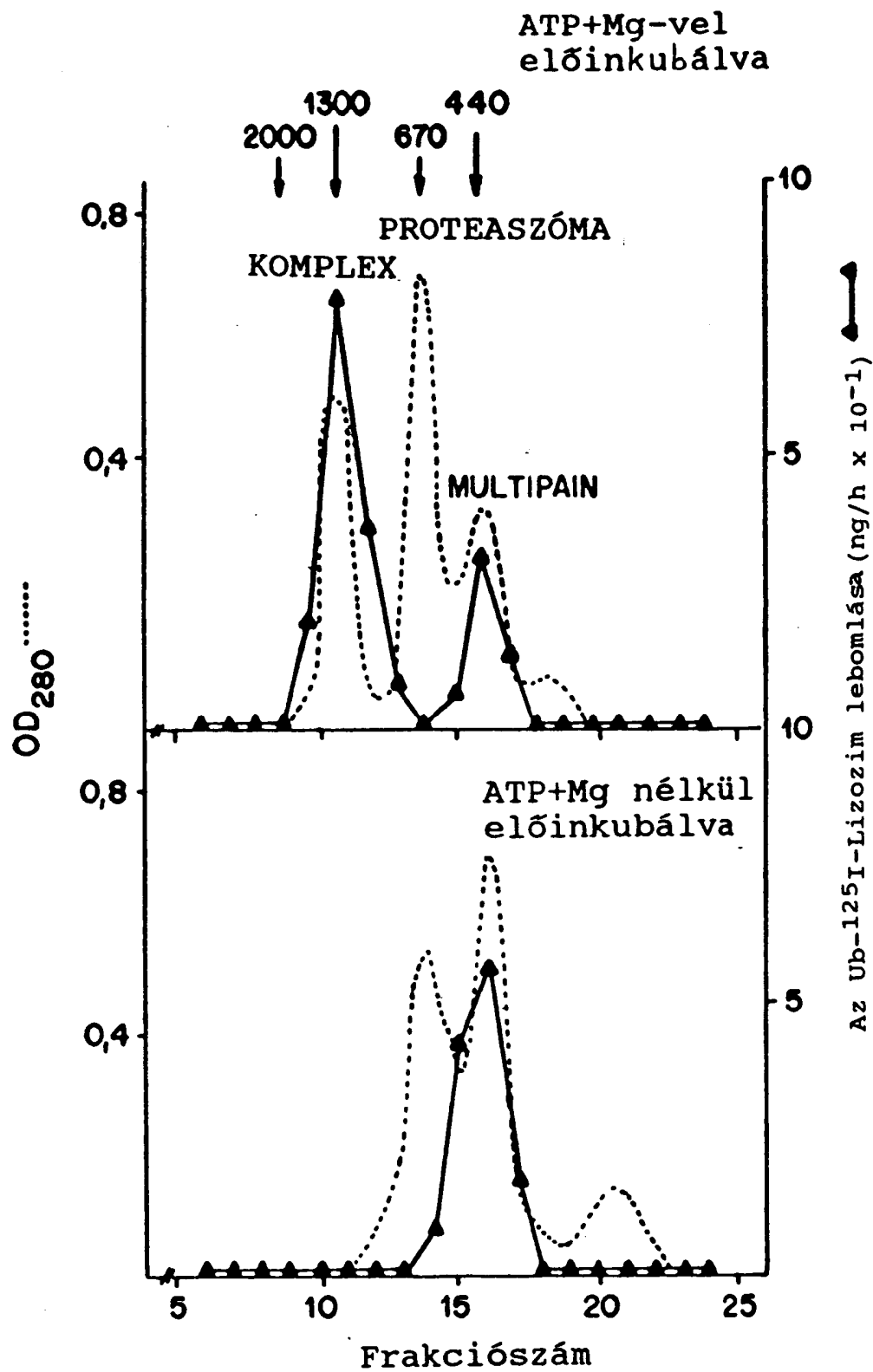
2. ÁBRA



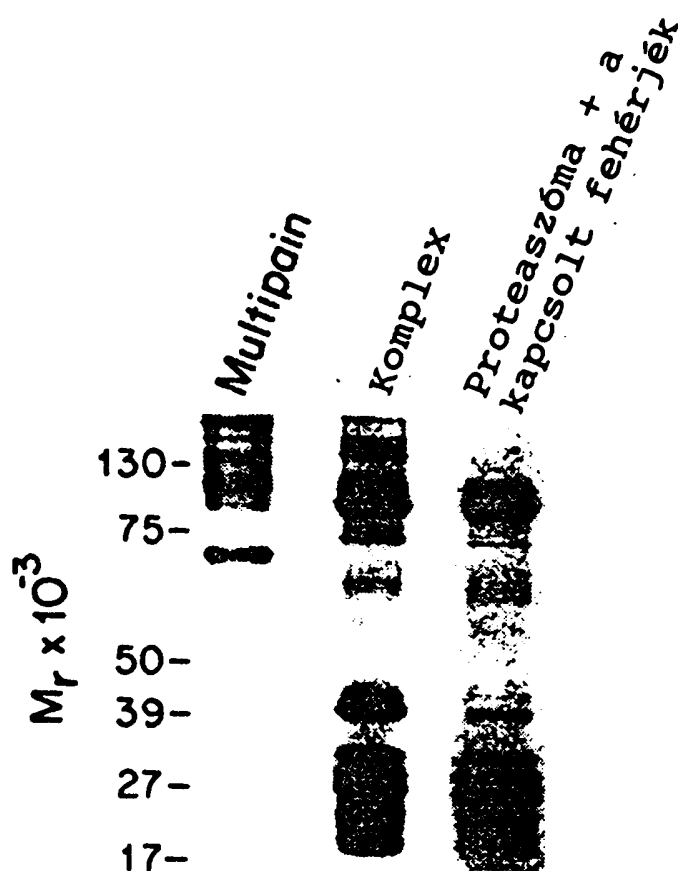
3. ÁBRA



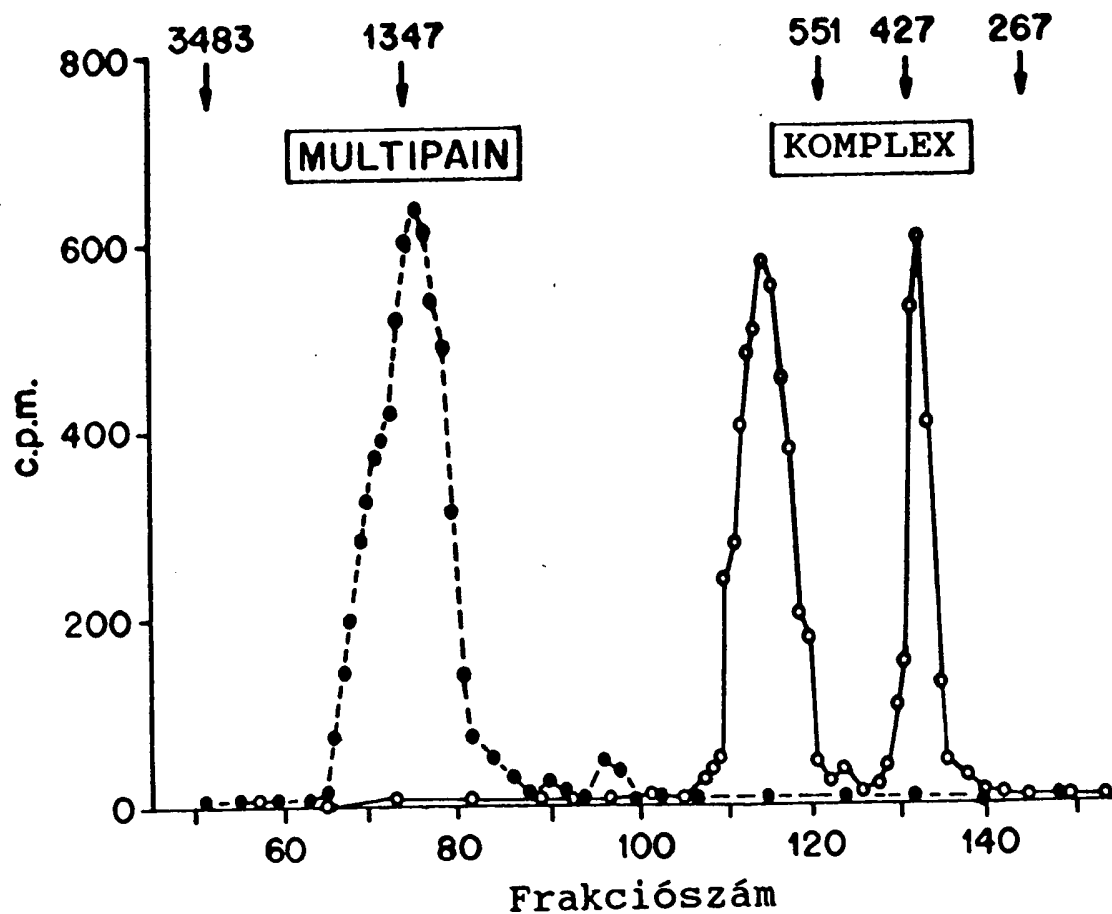
4. ÁBRA



5. ÁBRA

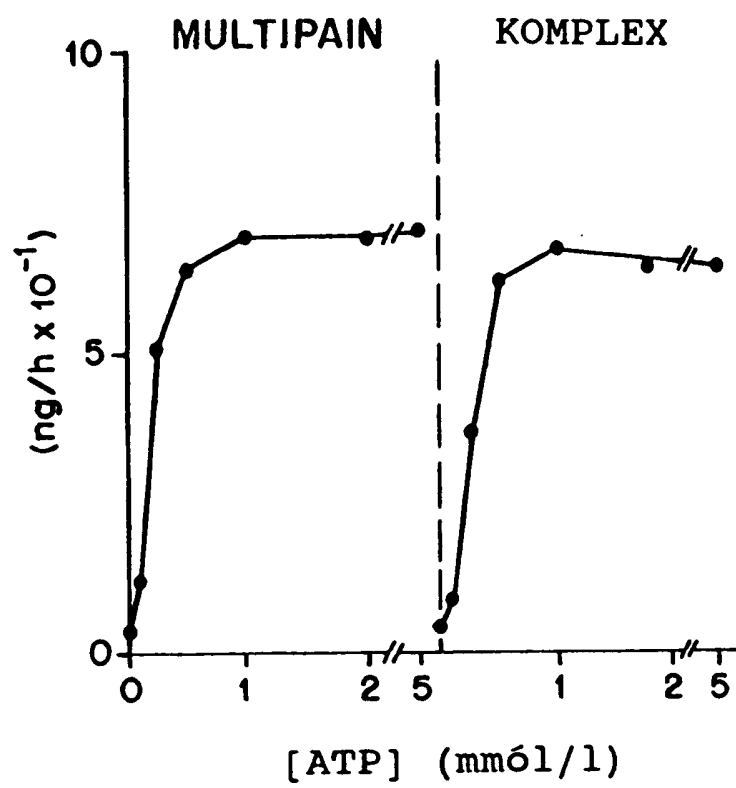


6. ÁBRA

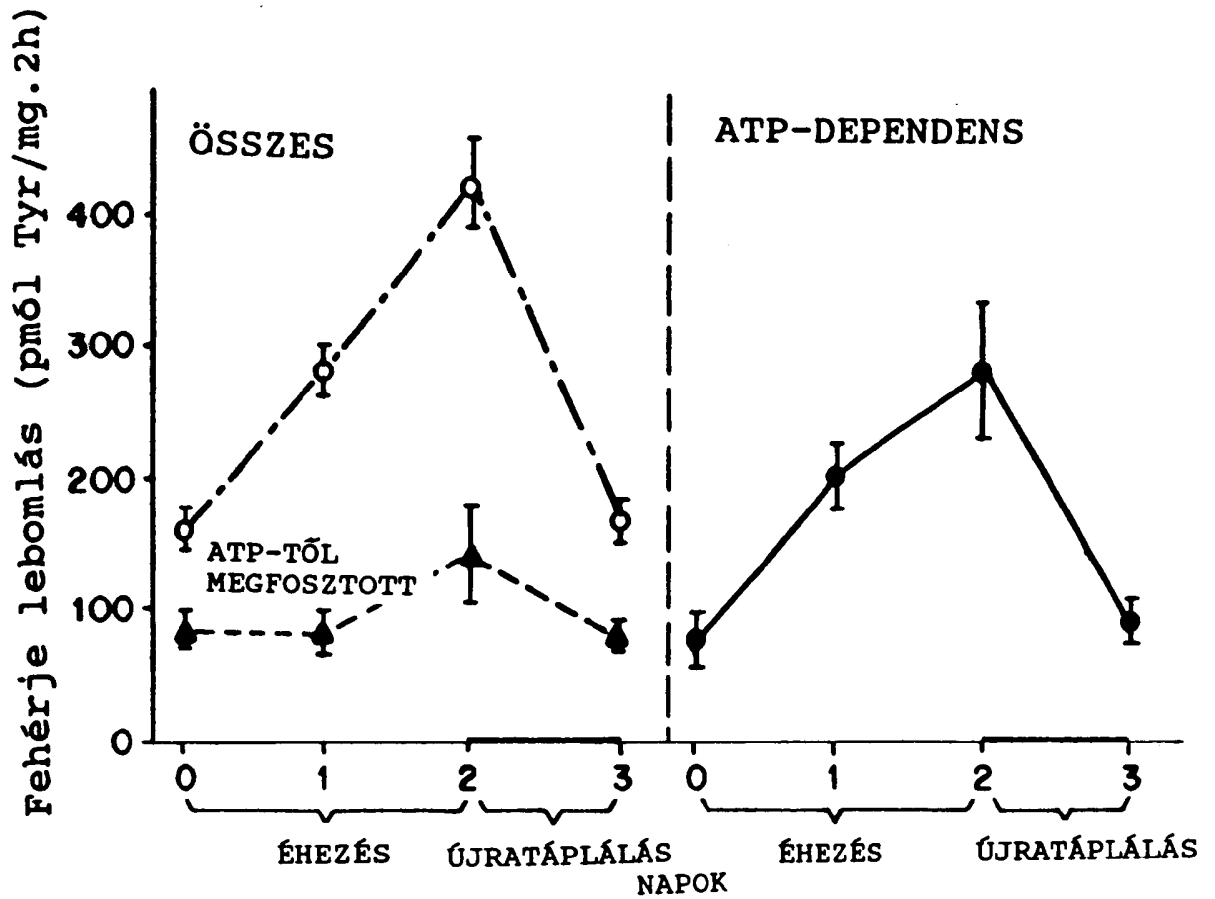


7. ÁBRA

Válasz 89'



8. ÁBRA



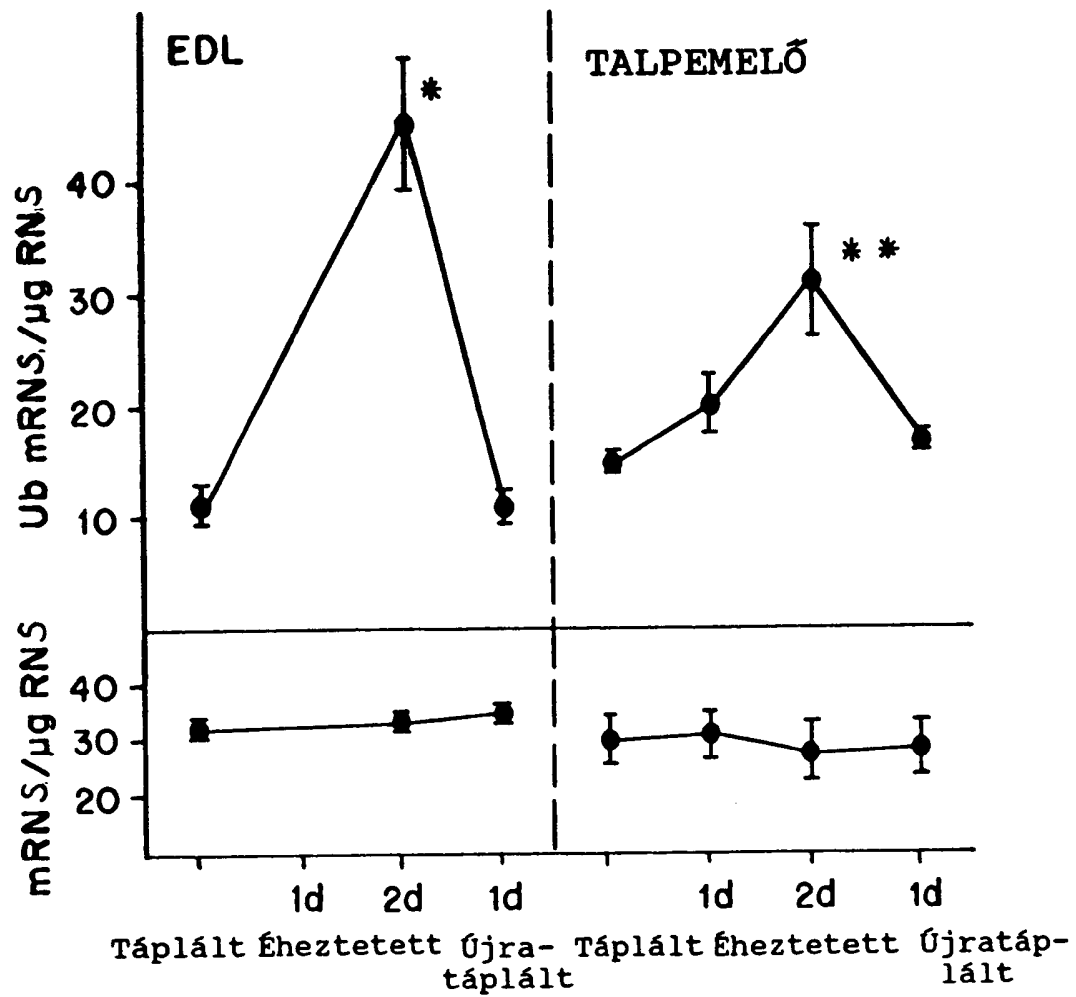
10. ÁBRA

a b c d



11. ÁBRA

Válasz 15'



12. ÁBRA