

DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS. ENVEJECIMIENTO Y EJERCICIO

PROTEIN DEGRADATION. AGING AND EXERCISE

1.- DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Para el mantenimiento de la vida en los seres aerobios es absolutamente imprescindible la presencia del oxígeno. Pero esta realidad fisiológica se ve acompañada de la producción de una serie de cuerpos químicos conocidos como radicales libres de oxígeno (RLO) y otras especies oxígeno reactivas (EOR). Estas sustancias originan modificaciones en los hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas.

Concretamente, las que dan lugar a la aparición de ciertas modificaciones en los aminoácidos, se traducen después por disturbios en la función y/o la actividad enzimática de las proteínas. A pesar de la existencia de los mecanismos reparadores celulares con los que se hallan dotadas las células, la consecuencia más inmediata del fenómeno anterior es su agregación o fragmentación, lo que posteriormente las conduce a la proteólisis.⁽²⁰⁾

En un adulto normal de 70 kg de peso, cada día se sintetizan y degradan unos 280 gramos de proteínas, la mayoría de ellas intracelulares. Normalmente existe un equilibrio homeostático entre ambos procesos, puesto que cualquier desequilibrio al respecto podría originar una importante alteración de las funciones celulares. Ello es lo que ocurre cuando alguna de las dos vías metabólicas anteriores sufre una variación cuantitativa notable, que no es compensada por la otra, siendo diversas las condiciones fisiológicas o patológicas que pueden afectar a las concentraciones o capacidades funcionales de las proteínas.

Durante el estado de equilibrio en el que la cantidad de proteínas contenidas en el organismo permanece constante, el recambio de las mismas no se modifica, dado que la síntesis y la degradación se encuentran perfectamente equilibradas. Sin embargo, en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas que afectan a las proteínas constituyentes de las células, tanto su concentración como su capacidad funcional pueden verse alteradas. Por ejemplo, en lo que se refiere al músculo, las cargas superiores a las que éste habitualmente soporta desequilibran la balanza a favor de la síntesis proteica, en tanto que las inferiores o la falta de uso, ejercen el efecto contrario. La degradación de las proteínas afecta de igual modo a la cantidad y a la calidad de las mismas.

El papel fisiológico de la proteólisis intracelular es variado y complejo y, desde luego, la degradación de las proteínas no sólo cumple una misión negativa, sino que también favorece ciertos aspectos del metabolismo. Así, por ejemplo, cuando un organismo se ve sometido a una restricción calórica intensa, utiliza los aminoácidos producidos en la proteólisis de las proteínas del sistema muscular para generar energía, o para ser transformados en glucosa en el hígado. Otra importante función de la degradación de las proteínas es la de eliminar todas las dañadas o desestructuradas cuya acumulación pudiera deteriorar la función celular⁽¹⁸⁾.

El catabolismo intracelular de las proteínas se lleva a cabo mediante diferentes procesos metabólicos, aunque algunos de ellos aún son poco conocidos. En la degradación de las proteínas existen varias vías o

Dr. J.F. Marcos Becerro⁽¹⁾

Prof. Dr. J.A. Lozano Teruel⁽²⁾

⁽¹⁾ Presidente del Instituto Español de Longevidad y Salud.

⁽²⁾ Vicepresidente de la Federación Española de Medicina Deportiva.

⁽²⁾ Catedrático de bioquímica y biología molecular de la Facultad de Medicina de Murcia.

CORRESPONDENCIA:

Dr. J.F. Marcos Becerro. Arturo Soria, 262 - 3º Centro. Esc. Dcha. 28033 Madrid.

Aceptado:
29.05.02

mecanismos de llevarla a cabo. Las tres más importantes son los siguientes: 1º.- La vía lisosomal. 2º.- El sistema calpaína y 3º.- La vía ubiquitina-proteasoma.

1.1.- La vía lisosomal

La inmensa mayoría de las células de los mamíferos contienen en su interior una serie de organelos, los lisosomas, con enzimas catabólicas que suelen actuar a pH ácidos y consiguen dividir diversas estructuras y moléculas. Entre estas enzimas se encuentran otras cuya misión consiste en degradar las proteínas intracelulares. Los lisosomas, para ejercer su acción proteolítica cuentan con varias endoproteasas, fundamentalmente las conocidas como catepsinas D, B, L, H, E, F, G, etc., y con exoproteasas del tipo carboxipeptidasas y aminopeptidasas ⁽¹³⁾.

Las catepsinas, localizadas primariamente en los lisosomas o endosomas, son enviadas al citosol durante la muerte celular programada o apoptosis, lo que les permite interactuar con las caspasas y otros mecanismos señaladores de la apoptosis. La importancia relativa de la vía lisosomal y las catepsinas en la proteólisis intracelular es discutible. Aunque no se conoce detalladamente su importancia en el mecanismo de degradación, si sabemos que muchas proteínas no utilizan esta vía, y otras sólo lo hacen en determinadas circunstancias, y en tejidos específicos. En el caso del sistema muscular la inhibición de las enzimas lisosomales no afecta a las proteínas contráctiles ⁽⁴⁴⁾.

1.2.- El sistema calpaína.

Casi todas las células de mamíferos contienen, como mínimo, dos isoenzimas de proteasas dependientes de la actividad de calcio. Todas forman parte de un gran sistema de proteasas dependientes de calcio y poseen un inhibidor endógeno de la proteína: la calpastatina y un activador. Las calpaínas constituyen una forma muy conservada de enzimas cistein-proteinasas no lisosomales, dependientes de calcio, que se activan en situaciones patológicas. Existen dos isoenzimas muy ubicuas (calpaína I y calpaína II), con dos subunidades y varias isoformas tisulares específicas (músculo esquelético, riñón, eritrocitos), así como una subunidad reguladora 28Kd (calpaína 4).

La actividad de las calpaínas está muy regulada por su inhibidor endógeno específico, la calpastatina ubicada: en el músculo esquelético, en el riñón, en los eritrocitos y en otros tejidos ⁽¹¹⁾. Aunque las funciones fisiológicas de este sistema enzimático no son totalmente conocidas, existen datos que relacionan a la calpaína con procesos de reabsorción ósea osteoclástica, con el remodelado del citoesqueleto, con la aparición de diversos tipos de cataratas, con la diabetes tipo II, etcétera. En relación con el fenómeno de metástasis tumorales, estas se facilitan por las roturas de las adhesiones célula-célula y célula matriz, roturas que están reguladas por complejos multiproteicos de cadherinas e integrinas.

Es muy importante el hecho de que el aumento de calpaína o la disminución de su inhibidor calpastatina pueden mediar la degradación proteolítica de tales complejos, favoreciendo el desarrollo de diversos tumores. El músculo contiene una forma de calpaína a la que se le achaca la distrofia muscular ⁽³⁶⁾.

1.3.- La vía ubiquitina-proteasoma.

Para los especialistas, la vía ubiquitina-proteasoma cataliza la mayor parte de los procesos de degradación de las proteínas en los que no intervienen los lisosomas. En este complejo se incluyen dos porciones con funciones totalmente distintas: la ubiquitina, cuya misión es señalar las proteínas que deben ser degradadas y el proteasoma 26S que realiza esta última misión. La cifra 26S no es otra cosa que el coeficiente de sedimentación de la proteína.

El proteasoma es un complejo proteasa multi-subunidad con un coeficiente aparente de sedimentación 20 S. En ambos extremos finales del proteasoma 20S cilíndrico se asientan dos complejos regulatorios, conocidos como PA700 y PA28, para formar, respectivamente, un complejo proteasoma 26S en forma de pesa, o un segundo complejo, con forma de balón de fútbol ⁽²⁶⁾. El proteasoma 20S tiene un peso molecular de 700.000 kDa y se halla compuesto de 28 subunidades proteicas que en las células eucariotas están producidas por 14 genes ⁽²²⁾. El proteasoma 20S, por sí mismo, solamente es capaz de degradar péptidos de pequeñas dimensiones, lo que hace con bastante lentitud. Únicamente puede hidrolizar los grandes, cuando éstos se encuentran muy desnaturalizados ⁽⁴³⁾. El proteasoma 26S es una proteína muy

compleja de un peso molecular de 2.100.000 y en su estructura intervienen 48 subunidades que representan 35 productos de distintos genes. En cuanto a las formas funcionales de proteasoma, el proteasoma 26S, está formado por el proteasoma cilíndrico central 20S, que funciona como una máquina catalítica y por los dos módulos terminales PA700 en forma de V, que le da su característica forma de pesa. Su masa molecular es de alrededor de 2,1 Mda. El PA700 es una proteína de 700.000 daltons, compuesta de 20 subunidades, cada una de las cuales se halla codificada por un gen distinto y actúa regulando al proteasoma 20S⁽³⁵⁾.

Dichas subunidades se clasifican en dos subgrupos: A). Éste contiene al menos, 6 ATP-asas que constituyen una familia única multigénica capacitada para codificar polipéptidos homólogos, la cual se ha conservado muy bien durante la evolución, y B) Aquí existen unas 15 proteínas, noATP-asas, poco relacionadas estructuralmente entre sí.⁽¹⁰⁾⁽³⁵⁾. Entre sus funciones destacan la de hacer depender la proteólisis del ATP, la de reconocer selectivamente a las proteínas poliubiquitinadas y la retirar / o desensamblar la cadena de poliubiquitina del sustrato de la proteína. El PA700 purificado funciona como una ATPasa. Prácticamente carecemos de información sobre la forma en que la actividad de dicha ATPasa se une a la función del proteasoma 26S. El proteasoma 26S está compuesto de dos subcomplejos: un subcomplejo de coproteasas, el 20S proteasoma y un módulo regulador, el activador del proteasoma 700 (PA700), también conocido como 19S cap o regulador de la ATPasa.

Para que la proteólisis se pueda llevar a cabo por el proteasoma 26S, es condición indispensable la existencia de una señal de degradación en la proteína objeto de la proteólisis. Para ello, es necesario el concurso de la ubiquitina, que es un polipéptido de 8,6 kDa, muy conservado, que se une covalentemente a las proteínas a señalar, mediante un sistema multienzimático de tres proteínas: E1 (activación de ubiquitina), E2 (conjugación de ubiquitina) y E3 (unión de ubiquitina). La ubiquitinización consiste en la repetición de una reacción en cascada E1->E2->E3. El proceso de ubiquitinización se halla dotado de cierta reversibilidad y se han encontrado diversas enzimas con actividad desubiquitinasa. La unión entre la ubiquitina y la proteína elegida se lleva a cabo

a través de un enlace isopeptídico, lo que da lugar a una proteína de estructura ramificada⁽²³⁾. En el control de este proceso intervienen las tres familias de enzimas: E1, E2 y E3. La ubiquitina es una proteína de 8.500 daltons dotada de múltiples funciones celulares, pero la que nos interesa aquí es la de marcar o señalar a las proteínas que deben ser degradadas por el proteasoma.

El sistema ubiquitinación /desubiquitinación, además de poseer otras funciones, trabaja como marcador específico y lector de pruebas de los sustratos degradados por el proteasoma 26S. Después de ser marcados los sustratos por la ubiquitina, el proteasoma 26S los reconoce y a continuación los degrada hasta convertirlos en péptidos. Debe recordarse que el proteasoma 26S posee la capacidad de reconocer y degradar otras proteínas que no han sufrido la acción de la ubiquitina, lo que demuestra la existencia de múltiples vías en las que intervienen la ubiquitina o el proteasoma. Debido a ello, pueden interferir o cooperar con otros mecanismos proteolíticos⁽⁴⁾. El PA28, con forma de anillo, es otro complejo proteico activador alternativo al PA700, del proteasoma 20S, al que también se puede incorporar en sus extremos.

El PA28 se compone de dos proteínas homólogas, la PA28a δ y la PA28b δ , que se disponen en forma de complejo heterohexamérico PA28 (a δ b δ)₃. El papel de PA28 es incrementar las múltiples actividades peptidasas del proteasoma 20S, pero sin afectar a la destrucción de sustratos proteicos grandes, aunque estos se encuentren ubiquitinados⁽²⁾. Además del PA700 y PA28 existen otras proteínas que regulan la actividad del proteasoma 20S como, el PI31, la HSP90 y la proteína b δ -amiloide⁽²⁾⁽²⁸⁾⁽⁴¹⁾.

1.4. Aspectos biológicos

El proteasoma 26S es el único complejo de proteasas capaz de degradar las proteínas ubiquitinadas. El proteasoma desempeña varias funciones distintas. Una de ellas consiste en realizar el control de algunos aspectos del ciclo de las células, lo que lleva a cabo con la colaboración de ciertas enzimas proteolíticas. También interviene en la respuesta al estrés, retirando las proteínas anómalas originadas por él, y en el sistema inmunitario generando antígenos peptídicos⁽²⁴⁾. Prevenir la acumulación de las proteínas oxidadas en las células, constituye una de las funciones

más importantes del mecanismo proteolítico de los mamíferos, labor encomendada al proteasoma⁽³⁰⁾.

El proteasoma es un mecanismo defensivo complementario de rango inferior a las enzimas antioxidantes, contra la actuación de los radicales libres, y cuya acción consiste en degradar las proteínas desnaturalizadas incapaces de recuperarse tras el ataque moderado de los radicales libres⁽²¹⁾. Por tanto, el proteasoma 26S es el único complejo de proteasas capaz de degradar las proteínas ubiquitinadas, aunque su función no es demasiado satisfactoria. El aumento de los grupos carbonilos de las proteínas de las células envejecidas son un indicio de la existencia de una acción oxidativa sobre dichas biomoléculas, lo que debería provocar un incremento en su degradabilidad. Lo dicho puede interpretarse de diversas maneras: aumento de la oxidación, disminución de los factores protectores contra la oxidación, disminución de la proteólisis, o una combinación de los factores anteriores.

Davies⁽¹²⁾ ha estudiado la relación entre el estrés oxidativo (EO) y el proteasoma en diferentes condiciones. El EO ligero inactiva rápidamente, aunque de forma reversible, el proteasoma 26S y el sistema activación/conjugación de la ubiquitina, pero la porción básica de proteasoma 20S. (El proteasoma «core» 20S) no se ve afectado por este hecho. Según este autor, en las células eucariotas, cuando el EO es ligero, el proteasoma 20S es capaz de reconocer y degradar las proteínas oxidadas en el citosol, en el núcleo y en el retículo endoplásmico, después de que el 26S ha sido inactivado. Un hecho muy interesante es que el proteasoma 20S es capaz de degradar las proteínas modificadas por la oxidación, sin que en ello intervengan el ATP ni la ubiquitina. Por lo tanto, este mecanismo es el utilizado por el proteasoma para eliminar las proteínas celulares alteradas, y de este modo atenuar la citotoxicidad producida por el estrés oxidativo.

Si el EO es intenso, la oxidación de las proteínas es mucho mayor, lo que da lugar a la aparición de fragmentos y de agregados de proteínas, los cuales se hacen progresivamente resistentes a la digestión proteolítica y se unen al proteasoma 20S, produciendo su inhibición irreversible⁽¹²⁾. Los estudios más modernos sugieren que, la vía ubiquitina proteasoma es el mecanismo más importante involucrado en la

degradación de las proteínas. En el sistema muscular, la degradación de las proteínas se ve influida por numerosos factores como las hormonas, el estado nutricional, las lesiones, las infecciones, los programas de desarrollo y diferenciación y las actividades mecánicas (estiramiento y contracción). Los efectos descritos se llevan a cabo a través de la vía ubiquitina proteasoma⁽³¹⁾.

La regulación la vía ubiquitina-proteasoma puede estar producida por modificaciones cualitativas y cuantitativas en los componentes de las proteínas y por alteraciones cuantitativas en su contenido celular⁽¹⁴⁾⁽¹⁾. Parece claro que, el proteasoma ejerce un efecto favorable en la lucha contra el EO. Así, cuando la producción de los agentes oxidantes se lleva a cabo en el tejido cerebral, después de haber sufrido un proceso isquémico, el proteasoma defiende a las neuronas contra el EO, degradando a las proteínas desnaturalizadas⁽⁴²⁾. Según Ding y sus colaboradores⁽¹⁵⁾, las HSPs, o proteínas de shock térmico, pueden preservar la función del proteasoma y por lo tanto atenuar los efectos citotóxicos del EO.

Por otra parte, parece ser que la inhibición del proteasoma estimula la formación de las HSPs y especialmente de la HSP90⁽⁸⁾⁽⁹⁾, lo que según Bush (7) se lleva a cabo a través de la activación de un factor del shock térmico HSF2. El HSF2 inhibe al proteasoma, lo que estimula la producción de HSP y aporta a las células un nuevo mecanismo que regula el gen del shock térmico, con el fin de responder adecuadamente a las modificaciones originadas en el sistema encargado de la degradación de las proteínas⁽²⁹⁾.

2.- ENVEJECIMIENTO Y PROTEASOMA

El envejecimiento afecta a la oxidación de las proteínas y a sus mecanismos degradativos, en especial a la funcionalidad del proteasoma. El envejecimiento se ha asociado con un incremento de proteínas ubiquitinadas y con el aumento de las actividades de las enzimas E1 y E2, pero también, simultáneamente, con la disminución global del catabolismo proteico⁽³⁾. El incremento en proteínas anormales observado en el envejecimiento puede ser debido a un aumento del daño oxidativo producido por los radi-

cales libres, a la pérdida de la actividad del proteasoma, o a la combinación de ambos ⁽³⁸⁾. La segunda opción ha sido demostrada por diversos autores ^{(38),(39),(40),(27),(12)}.

En opinión de Davies ⁽¹²⁾, estos hechos serían los causantes del envejecimiento y de ciertas enfermedades degenerativas. Un caso interesante es el expuesto por Gaczynska y sus asociados ⁽¹⁷⁾. Según ellos, el aumento de la longevidad observado en los animales mediante la utilización de la dieta hipocalórica, se produce por la modulación ejercida sobre las alteraciones del proteasoma.

En las ratas con cataratas hereditarias se ha encontrado un incremento en la proteólisis de algunas proteínas del cristalino. Ello se ha relacionado con el hecho de que en la senectud aumenta el calcio intracelular y éste conduciría a una activación del sistema de las calpaínas ⁽²⁵⁾⁽¹⁹⁾. Sin embargo, algunos autores ponen en duda que la inactividad del proteasoma sea la causa de la acumulación de las proteínas dañadas. Para Shibatani y su grupo ⁽³⁷⁾, al menos en las ratas, la edad no afecta negativamente a los niveles celulares del proteasoma en el tejido hepático, ni tampoco a su actividad caseinolítica. Por lo que según ellos, lo más verosímil es pensar que la acción achacada al enzima sobre el envejecimiento sea debida a modificaciones en la composición de sus subunidades. ⁽³⁷⁾⁽⁶⁾.

El envejecimiento puede ser considerado como un proceso en el que la proliferación celular se mantiene hasta alcanzar un determinado número de divisiones (límite de Hyflick), o hasta que se produce la senescencia en las células indivisibles. Según Friguet y sus asociados ⁽¹⁶⁾, en los fibroblastos humanos senescentes MRC-5 las proteínas oxidadas se acumulan y no son eliminadas con la misma rapidez que en las células jóvenes. En los fibroblastos humanos proliferativos, a medida que aumentan las divisiones celulares disminuye en éstas la capacidad para degradar las proteínas dañadas por el estrés oxidativo, lo que produce su rápida acumulación en las células con gran actividad proliferativa.

En los primeros momentos, dicha acumulación origina una discreta inhibición de la actividad del proteasoma, pero en los estados más avanzados de la duplicación celular, el grado de inactividad del proteasoma aumenta considerablemente, lo que per-

mite a las proteínas degeneradas almacenarse a mayor velocidad. Para compensar este defecto, los lisosomas entran en función, pero la pérdida de la actividad de la catepsina no permite remediar la situación ⁽⁴⁰⁾.

En otros estudios realizados in vitro sobre los fibroblastos BJ humanos proliferativos y no proliferativos senescentes, algunos autores dicen haber observado una buena correlación entre la acumulación de proteínas oxidadas y el declive de la actividad del proteasoma en todas las fases del recambio proteínico celular ⁽³²⁾.

En las ratas LOU el envejecimiento disminuye la cantidad y la actividad del proteasoma. Para Bardad-Gorce ⁽⁵⁾ estos hechos demuestran que el proteasoma es parcialmente responsable de la atrofia muscular observada en las ratas viejas.

3.- EJERCICIO Y PROTEASOMA

Por desgracia, en el momento actual, prácticamente los trabajos publicados sobre este tema son inexistentes, a pesar de ser bien conocidos los excelentes efectos que la actividad física produce en la atrofia muscular asociada al envejecimiento, en la que como es sabido, la acción del proteasoma desempeña un importante cometido ⁽⁵⁾.

Radak y sus colaboradores ⁽³³⁾ han estudiado en las ratas el efecto del ejercicio de moderada intensidad (natación) sobre la actividad del proteasoma en el músculo, la cual aumenta, tanto en los animales jóvenes como en los viejos, lo que a su juicio significa que la respuesta adaptativa contra el estrés oxidativo inducida por el ejercicio moderado constituye un beneficio del mismo. También existen otras evidencias indirectas obtenidas en modelos de ejercicio. En ellos se observa que el esfuerzo físico produce un incremento en la actividad de la calpaína muscular ⁽³⁴⁾.

RESUMEN

En el estado estabilizado del organismo la síntesis y la degradación de las proteínas se hallan equilibradas. Pero cuando por cualquier causa las proteínas celulares se someten a la acción de un agente más o

menos cercano, tanto su estructura como su función o concentración pueden verse perturbadas. En este caso, la degradación o proteólisis no ejerce una actividad negativa, sino más bien la contraria, ya que al suprimir las proteínas afectadas impide que su acumulación afecte a la propia función de la célula. A pesar de que no poseemos una información completa de los mecanismos que intervienen en el

catabolismo de las proteínas intracelulares, en este trabajo se trata de explicar las tres vías más importantes involucradas en el mismo: La vía lisosomal, el sistema calpaina y la ubiquitina-proteasoma. El estrés, la acción de los radicales libres de oxígeno y el envejecimiento constituyen tres aspectos en los que la degradación de las proteínas desempeña un importante cometido.

B I B L I O G R A F I A

- 1 **AHN JY, HONG SO, KWAK KB. et al.:** Developmental regulation of proteolytic activities and subunit pattern of 20S proteasome in chick embryonic muscle. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 15746-15749.
- 2 **AHN, J.Y., TANAHASHI, N., AKIYAMA, K., HISAMATSU, H., NODA, C., TANAKA, K., CHENG, C.H., SHIMBARA, N., WILLY, P. J., MOTT, J.D., SLAUGHTER, C. A. and DEMARTINO, G.N.:** Primary structures of two homologous subunits of PA28, a γ -interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett.* 1995; 366: 37-42.
- 3 **ANDERSSON M, SJOSTRAND J, KARISSESSON J.:** Proteolytic cleavage of N-Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC by the Proteasome in lens epithelium from clear and cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 1998; 67(2): 231-6.
- 4 **ATTAIX D; COMBARET L; POUCH MN; and D. TAILLANDIER:** Regulation of proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001; 4: 45-49.
- 5 **BARDAG-GORCE F; FAROUT L; VEYRAT-DUREBEX C; et al.:** Changes in 20S proteasome activity during ageing of the LOU rat. *Mol Biol ep.* 1999; 26: 89-93.
- 6 **BULTEAU AL; PETROPOULOS I. ET AL.:** Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol.* 2000; 35: 767-777.
- 7 **BUSH KT; GOLDBERG AL; and SK.NIGAM.:** Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 9086-9092.
- 8 **CONCONI M; and B.FRIGUET.:** Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of HSP 90. *Mol Biol Rep.* 1997; 24: 45-50.
- 9 **CONCONI M; PETROPOULOS I; EMOD I; et al.:** Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. *Biochem J.* 1998; 333: 407-415.
- 10 **COUX.O., TANAKA K. and AL. GOLDBERG:** Structure and function of the 20S and 26S proteasomas. *Ann.Rev.Biochem.* 1996; 65: 801-847.
- 11 **CROALL DE and GN DEMARINO:** Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function and regulation. *Physiol. Rev.* 1991; 71: 813-847.
- 12 **Davies KJ.:** Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* 2001; 83: 301-310.
- 13 **DICE.JF.:** Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *FASEB.J.* 1987; 1: 349-357.
- 14 **DICK.T.RUPPERT.TGROEPTTRUP.M. et al.** Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell.* 1996; 86: 253-262.
- 15 **DING Q; and JN.KELLER:** Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins. *J. Neurochem.* 2001; 77: 1010-1017.
- 16 **FRIGUET B; BULTEAU AL; CHONDROGIANNI N; et al.:** Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann N Y Acad. Sci.* 2000; 908: 143-154.
- 17 **GACZYNSKA M; OSMULSKI PA; and WF.WARD.** Caretaker or undertaker? The role of the proteasome in aging. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122: 235-254.
- 18 **GOLGBER.AL. and AC.ST.JOHN.** Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Ann. Rev. Biochem.* 1976; 45: 747-803.
- 19 **GONG X, LI E, KLIER G, HUANG Q, WU Y.:** Disruption of alpha 3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* 1997; 91 (6): 833-843.
- 20 **GRUNE T; REINHECKEL T; and KJ.DAVIES:** Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB.J.* 1997; 11: 526-534.
- 21 **GRUNE T; and KJ. DAVIES.** Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells. *Biofactors.* 1997; 6: 165-172.
- 22 **HEINEMEYER.W., TRONDLE N., ALBRECH G. and DH. WOLF.:** PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry.* 1994; 33: 12229-12237.
- 23 **HERSHKO A. and A. CIECHANOVE:** The ubiquitin system for protein degradation. *Ann.Rev.Biochem.* 1992; 61: 761-807.
- 24 **HILT W; and DH. WOLF.:** Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* 1996; 21: 96-102.

- 25 **INOMATA M, NOMURA K, TAKEHANA M, SAIDO TC.:** Evidence for the involvement of calpain in cataractogenesis in Shuniya cataract rat (SCR). *Biochim Biophys. Acta.* 1997; 1362 (1): 11-23.
- 26 **KEIJI TANAKA.** Proteasomes: Structure and Biology. *J. Biochem.* 1998;123: 195-204.
- 27 **KELLER JN; HANNI KB; and WR. MARKESBERY:** Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev.* 2000; 113: 61-70.
- 28 **MA C., VU JH., PROSKE RJ. et al.:** Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain). *Biochim.Biophys.Acta.* 1992; 1119: 303-311.
- 29 **MATHEW A; MATHUR SK; and RIMORIMOTO:** Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell. Biol.* 1998; 18: 5091-5098.
- 30 **MERKER K; and T.GRUNE:** Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. *Exp.Gerontol.* 2000. 35: 779-786.
- 31 **MITCH.WE. and AL.GOLGBERG:** Mechanims of muscle wasting:the role of ubiquitin proteasome pathway. *New. Eng. J.F. Med.* 1996; 335. 1897-1905.
- 32 **PETROPOULOS I; CONCONI M; WANG X; et al.:** Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000; 55: B220-B227.
- 33 **RADAK Z; KANEKO T; TAHARA S; et al.** The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 69-74.
- 34 **RAJ DA, BOOKER TS, BELCASTRO AN.** Striated muscle calcium-stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise. *Pflugers Arch* 1998; 435 (6): 804-9.
- 35 **RECHSTEINER M.:** Natural substrates of the ubiquitin proteolytic patway. *Cell.* 1991; 66: 615-618.
- 36 **RICHARD I. BROUX. OALLAMAND. V. et al.:** Mutations in the proteolytic enzyme calpain3 cause Limb-a Muscular Distrophy Type 2^a. *Cell.* 1995; 81: 27-40.
- 37 **SHIBATANI T; NAZIR M; and WF. WARD:** Alteration of rat liver 20S proteasome activities by age and food restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med. Sci* 1999; 51: B316-B322.
- 38 **SITTE N; MERKER K; VON ZGLINICKI T; et al.:** Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I - effects of proliferative senescence. *FASEB J.* 2000 ; 14: 2495-2502.
- 39 **SITTE N; MERKER K; VON ZGLINICKI T; et al.:** Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II - aging of nondividing cells. *FASEB J.* 2000; 14: 2503-2510.
- 40 **SITTE N; MERKER K; VON ZGLINICKI T; and T. GRUNE:** Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free. Radic. Biol. Med.* 2000. III; 28: 701-708.
- 41 **TSUBUKI S., SAITO Y. and S. KAWASHIMA.** Purification and characterization of an endogenous inhibitor specific to the Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading activity in proteasome and its identification as heat.shock protein 90. *FEBS. Lett.* 1994; 344. 229-233.
- 42 **WEHI M; SCHMITT M; GIECHE J; et al.:** Proteolysis of oxidized proteins after oxygen-glucose deprivation in rat cortical neurons is mediated by the proteasome. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21: 1090-1096.
- 43 **WENZEL T. and W. BAUMEISTER:** Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Struct.Biol.* 1995; 2. 199-204.
- 44 **WILDENTHAL K., WAKELAND JR., ORD JM. and JT. STULL:** Interference with lysosomal proteolysis fails to reduce cardiac myosin degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980; 96. 793-798.