IGOR LUCHINI BAPTISTA

**PAPEL DE E3 LIGASES NA PLASTICIDADE
MUSCULAR ESQUELÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2012

IGOR LUCHINI BAPTISTA

**PAPEL DE E3 LIGASES NA PLASTICIDADE
MUSCULAR ESQUELÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Baptista, Igor Luchini.

Papel de E3 ligases na plasticidade muscular esquelética / Igor Luchini Baptista. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Plasticidade Muscular.

Versão do título para o inglês: Role of E3 ligases in skeletal muscle plasticity.

1. Atrofia muscular 2. Músculos 3. Expressão gênica
4. Regeneração 5. Aminoácidos 6. Reação tecidual I. Moriscot, Prof. Dr. Anselmo Sigari II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0167/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Igor Luchini Baptista.

Título da Tese: Papel de E3 ligases na plasticidade muscular esquelética.

Orientador(a): Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **168** nas fls. **24** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Anselmo Sigari Moriscot, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Aspectos estruturais e moleculares da plasticidade muscular**" do qual participou(aram) o(s) alunos: **Patrícia Ney Sato, Elen Haruka Miyabara, Camila Valentim Deluca, Hércio Yogi Ono, Vanessa Fonseca Vilas Boas, Igor Luchine Baptista, Rodrigo Saltão, Marina Malta Letro Kizys, Talita Cristiane Conte**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.02.2006**.

São Paulo, 06 de março de 2006.

Profa. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEEA.28.09

São Paulo, 06 de outubro de 2009.

REF.: Protocolo nº168/05.

"Aspectos estruturais e moleculares da plasticidade muscular"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 23.02.2012.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEEA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética em
Experimentação Animal - ICB /USP

Ilmo.Sr.

Prof. Dr. ANSELMO SIGARI MORISCOT

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

À minha noiva e meus pais, com amor, admiração e gratidão por sua
compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo
do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Alice Luchini Baptista e Edgar Baptista, toda a minha gratidão pela disciplina, amor e educação essenciais para minha formação humana e profissional.

À minha noiva, Lygia Samartin Gonçalves, com amor pelo apoio e companheirismos incondicionais.

Aos meus tios Luis Carlos Luchini e Mara M. de Andrea pelo exemplo a ser seguido e por propiciar o início dessa caminhada.

Aos meus avós, Iva B. Luchini e Osvaldo Luchini, *in memoriam*, pelo amor.

Ao meu primo Danilo Mustafa e minha irmã, Thais Luchini Baptista pela amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot pela confiança, atenção e oportunidades ao longo dos anos.

Aos colegas de laboratório com quem tive o prazer de conviver e dividir experiências, em especial para Andrei Rozanski, Graciele V. Ramos, Marcelo L. Leal, Guilherme G. Artioli, William J. da Silva, João Paulo F.L. Guilherme, João Guilherme, Valéria Jorge, Andrea Ferian e tantos outros nestes anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida para realização deste projeto (2007/57613-3).

“Cem vezes, todos os dias lembro a mim mesmo que minha vida interior e exterior depende dos trabalhos de outros homens, vivos ou mortos, e que devo esforçar-me a fim de devolver na mesma medida que recebi”.

Albert Einstein

RESUMO

BAPTISTA, I. L. **Papel de E3 ligases na plasticidade muscular esquelética.** 2012. 102 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O tecido muscular esquelético é altamente adaptável podendo modular sua massa e sua composição de miofibras, além de possuir uma grande capacidade regenerativa. Nesta tese analisamos o envolvimento de enzimas ligadoras de ubiquitina (E3 ligases) sob três aspectos da plasticidade muscular esquelética: a perda de massa decorrente do desuso, a manutenção de populações de miofibras específicas e a regeneração do tecido muscular. Nosso primeiro objetivo foi determinar se leucina, um aminoácido essencial com início de seu metabolismo no músculo esquelético, era capaz de atenuar a perda de massa provocada pelo modelo de imobilização parcial de membro. Nossos resultados mostraram que este aminoácido evitou a perda do conteúdo proteico e, consequentemente a perda de massa, principalmente através da inibição da expressão de E3 ligases (Mafbx/Atrogin-1 e MuRF1). O segundo objetivo foi determinar se a ausência de duas E3 ligases, MuRF1 e MuRF2, poderia alterar a proporção de miofibras tipo I (oxidativas) e tipo II (glicolíticas). Através do uso de animais geneticamente modificados, detectamos que na ausência destas E3 ligases, a identidade de fibras tipo II era perdida mesmo em condições fisiológicas, além de estas fibras apresentarem uma proteção contra atrofia na ausência de MuRF1. Nossos dados também mostraram que na ausência destas E3 ligases a expressão de miozeninas, componentes essenciais para a via da calcineurina, era reduzida, indicando um possível mecanismo pelo qual E3 ligases podem controlar o fenótipo de miofibras. Por fim, analisamos o papel de MuRF1 e MuRF2 no tecido muscular em regeneração, utilizando-se de animais nocautes para essas proteínas. Os resultados mostraram que estas E3 ligases em conjunto são cruciais para a regeneração satisfatória do tecido. Além disso, nossos dados apontam que as células-satélites necessitam de MuRF1 e MuRF2 para sua ativação (redução na expressão de MyoD/ β -catenina), proliferação (redução nos níveis de Ki67) e diferenciação (redução nos níveis de MHCn e NCAM). De maneira geral nossos dados mostram que determinadas E3 ligases exercem um papel crucial para a plasticidade muscular sob diferentes demandas, além de mostrar que a expressão destas enzimas pode ser regulada por aminoácidos.

Palavras-chave: Tecido muscular. Atrofia muscular. Regeneração. Fibras tipo II.

ABSTRACT

BAPTISTA, I. L. **Role of E3 ligases on skeletal muscle plasticity**. 2012. 102 f. Ph.D. Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Skeletal muscle is a highly adaptable tissue, which can modulate its mass and composition of myofibers and can trigger an efficient regenerative response. In the present thesis we analyzed the involvement of ubiquitin ligases (or E3 ligases) under three aspects of skeletal muscle plasticity: mass loss resulting from disuse, maintenance of specific myofibers populations and regeneration of muscle tissue. Our first aim was to determine whether leucine, an essential amino acid that starting your metabolism in skeletal muscle, was able to attenuate the mass loss caused by partial immobilization model. Our results showed that this amino acid prevented the loss of protein content and thus the mass loss, mainly by inhibiting the expression of E3 ligases (Mafbx/Atrogin-1 and MuRF1). The second aim was to determine whether the absence of two E3 ligases, MuRF1 and MuRF2, could alter the proportion of type I (oxidative) and type II (glycolytic) myofibers. Through the use of genetically modified animals, we found that in the absence of these E3 ligases, the identity of type II fibers was lost even under physiological conditions, and these fibers were protected against atrophy in the absence of MuRF1. Our data also showed that in the absence of these E3 ligases expression miozenins was reduced, indicating a possible mechanism by which E3 ligases can control the phenotype of myofibers, since miozenins are an essential components for the calcineurin pathway. Lastly, we analyze the role of MuRF1 and MuRF2 in muscle tissue regeneration, using knockout animals for these proteins. The results showed that these E3 ligases together are crucial to an adequate tissue regeneration. Moreover, our data indicate that satellite cells require MuRF1 and MuRF2 for its activation (reduction in the expression of MyoD / β -catenin), proliferation (reduction in levels of Ki67) and differentiation (reduction in levels of MHCn and NCAM). Overall, our data show that certain E3 ligases can play a crucial role in muscle plasticity under different demands and demonstrated that the expression of these enzymes can be regulated by amino acids.

Key words: Skeletal muscle tissue. Muscle atrophy. Regeneration. Myofibers type II.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
CAPÍTULO 1 – LEUCINA EXERCE EFEITO ANTI-ATRÓFICO VIA ATENUAÇÃO DO AUMENTO DE ATROGENES NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	14
1.1 Introdução	14
1.2 Material e métodos	16
1.2.1 Animais	16
1.2.2 Amostras de tecido	16
1.2.3 Síntese proteica.....	17
1.2.4 Histoquímica para ATPase miosínica e área de secção transversal (CSA)	17
1.2.5 Extração de RNA Total e Quantificação	18
1.2.6 Reação de Transcrição Reversa.....	18
1.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real	19
1.2.8 Western Blot	20
1.2.9 Medidas do Nível de Insulina Plasmática.....	20
1.3 Resultados.....	21
1.4 Discussão.....	22
CAPÍTULO 2 – PAPEL DE MURF1 E MURF2 NA DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS	26
2.1 Introdução	26
2.2 Material e Métodos.....	28
2.2.1 Animais	28
2.2.2 Amostras de tecido	29
2.2.3 Imunofluorescência.....	29
2.2.4 Análise quantitativa e morfométrica das imunofluorescência.....	30
2.2.5 Western Blot	30
2.2.6 Experimentos de duplo híbrido em leveduras	31
2.3 Resultados.....	31
2.4 Discussão.....	34
CAPÍTULO 3 – PAPEL DE MURF1 E MURF2 NA REGENERAÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA.....	37

3.1 Introdução	37
3.2 Material e Métodos.....	38
3.2.1 <i>Animais e tratamentos</i>	38
3.2.2 <i>Histologia</i>	39
3.2.3 <i>Análise quantitativa e morfométrica das colorações histológicas</i>	39
3.2.4 <i>Anticorpos utilizados para imunofluorescência e Western blot</i>	39
3.2.4 <i>Imunofluorescência</i>	40
3.2.5 <i>Western blot</i>	40
3.2.6 <i>Deteção de apoptose</i>	40
3.3 Resultados.....	41
3.4 Discussão.....	43
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE A - Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases.....	56
APÊNDICE B - MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance	66
APÊNDICE C - MuRF1 and MuRF2 play a key cooperative role in skeletal muscle regeneration	77

APRESENTAÇÃO

A estrutura dessa tese foi organizada em capítulos focando em estudos distintos, porém relacionados. Esse modelo é um dos sugeridos pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP e segundo nosso entendimento facilita a descrição desses 3 trabalhos que são interligados, no entanto possuem trajetória própria.

Enzimas ligadoras de ubiquitina (E3 ligases) tem ganhado importância em diversos quadros clínicos e diferentes tipos celulares (CHHANGANI; JANA; MISHRA, 2012; YAGISHITA et al., 2012). No músculo esquelético a super expressão destas enzimas foram, ao longo da última década, relacionadas a quadros atroficos (BODINE et al., 2001; CLARKE et al., 2007). Apesar da grande quantidade de estudos envolvendo E3 ligases e quadros atroficos, pouco tem sido estudado a respeito da importância destas enzimas em outras situações fisiológicas ou patológicas.

Os trabalhos aqui apresentados (ver Apêndices A, B e C), compartilham a característica de analisar o papel de E3 ligases sobre diferentes aspectos da plasticidade muscular: no primeiro analisamos o efeito da suplementação de leucina sobre a resposta do tecido muscular diante de um quadro atrofico, focando principalmente na expressão gênica de E3 ligases (Capítulo 1); no segundo demonstramos que algumas destas enzimas ligadoras de ubiquitina estão envolvidas também na modulação de vias que influenciam a identidade da fibra muscular (Capítulo 2); no terceiro avaliamos como a ausência de duas destas E3 ligases acarreta um grande prejuízo para a capacidade regenerativa do tecido muscular (Capítulo 3). Os dois primeiros capítulos referem-se a artigos publicados, enquanto o terceiro apresenta dados de um artigo em preparação.

Após o terceiro capítulo, encontram-se as considerações finais, onde são discutidos os achados destes trabalhos como um todo, além da inserção de cada um dos trabalhos publicados na literatura recente. Na seção “considerações finais” também apresentamos outros dados relevantes (ainda não publicados), os quais foram iniciados com base nesta tese e não foram formalmente incorporados na forma de capítulos.

CAPÍTULO 1 – LEUCINA EXERCE EFEITO ANTI-ATRÓFICO VIA ATENUAÇÃO DO AUMENTO DE ATROGENES NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

1.1 Introdução

O músculo esquelético é um tecido altamente especializado na geração de tensão, o que está diretamente relacionado com muitas funções em nosso organismo, tais como fixação e mobilidade do esqueleto, retorno venoso, movimentação do globo ocular, termogênese e respiração (LIEBER, 1992). A massa e a composição do músculo esquelético são críticas para sua função e podem ser reguladas por diferentes demandas tais como alterações no estresse mecânico, lesão e sobrecarga hormonal. Podemos citar como exemplo, a grande perda de massa muscular (atrofia) causada por desuso e microgravidade (AOKI et al., 2004; BODINE et al., 2001; RILEY et al., 1996)

O processo de atrofia é altamente ordenado e regulado, sendo caracterizado por uma redução da área de secção transversal das fibras musculares e conteúdo proteico, redução da força, aumento da fadigabilidade e aumento da resistência à insulina (ZHANG; CHEN; FAN, 2007). Sabemos que a redução da área de secção transversal induzida por desuso é o produto da diminuição de síntese e aumento de degradação proteica, sendo que quantitativamente a proteólise desempenha um papel preponderante em várias situações atroficas tais como, desuso, sepsis e insuficiência renal (FAREED et al., 2006).

Neste contexto, foi demonstrado que a via proteolítica dependente de ubiquitina-proteassoma é a principal responsável pela degradação proteica no músculo esquelético (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). Este sistema de degradação é conhecido como Sistema Ubiquitina Proteassoma (UPS), o qual é constituído por três componentes distintos: E1 – proteínas ativadoras da ubiquitina; E2 – proteínas carreadoras da ubiquitina ativada; E3 – conhecidas como ubiquitina-ligases (E3 ligases ou atrogenes), são as proteínas responsáveis por transferir o conjugado ubiquitina para resíduos de lisina na proteína alvo; ao fim da ubiquitinação, a proteína alvo é então degradada no complexo 26S do proteassoma (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). Porém, o processo de ubiquitinação não é irreversível. Proteínas conhecidas como desubiquitinases (DUBs) possuem a capacidade de retirar o conjugado ubiquitina da proteína alvo, evitando assim sua degradação (CROSAS et al., 2006; LEGGETT et al., 2002).

No músculo esquelético, as principais ubiquitina-ligases reguladas durante a proteólise muscular, são MAFbx/atrogin-1, Murf-1, e E3 α (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). O controle da expressão gênica de algumas E3 ligases, em resposta a diferentes quadros atróficos, vem sendo amplamente estudado e demonstrado sob a influência de FOXO (“fork head family transcription factors”), o qual por sua vez é inibido por fosforilação via PI3K/Akt (ZHANG; CHEN; FAN, 2007), uma via extremamente importante no controle da síntese proteica através de seu principal efetor, mTOR (“mammalian target of rapamycin”). Interessantemente, além de vias metabólicas que controlam a atividade de mTOR em associação com outras proteínas (“mTORC1 – mTOR complex 1”) (LANG; FROST; VARY, 2007; VARY et al., 2007), existem evidências de que nutrientes, como o aminoácido leucina controle este complexo, regulando a síntese proteica (ANTHONY et al., 2001a; ANTHONY et al., 2001b).

A inativação do eixo Akt/mTORC1 somada ao aumento de translocação de FOXO para o núcleo, com resultante aumento da expressão gênica de MAFbx/atrogin-1 e Murf-1, são sugeridas como as principais responsáveis pela degradação proteica em modelos de atrofia muscular *in vivo* e *in vitro* (KANDARIAN; JACKMAN, 2006), e apesar das evidências apontarem para uma forte capacidade de ativação do complexo mTORC1 pela suplementação de leucina (ANTHONY et al., 2001a; ANTHONY et al., 2001b; KIMBALL; JEFFERSON, 2006a, b), os efeitos desta suplementação sobre a regulação de E3 ligases, e consequentemente sobre a atrofia muscular, são ainda desconhecidos.

Recentemente Sugawara e colaboradores (SUGAWARA et al., 2008) mostraram que a suplementação com leucina em um modelo de privação proteica minimizou o catabolismo proteico sem afetar a expressão de atrogenes. Estes autores sugerem que o efeito observado decorre da diminuição da atividade da via lisossomal, uma via proteolítica distinta, em detrimento do UPS. Apesar de a privação proteica ativar eficientemente vias de degradação da massa muscular, este modelo experimental não foi realizado para investigar efeitos locais do desuso na massa muscular.

Nessa etapa de nosso estudo, buscamos entender o efeito que a suplementação de leucina teria sobre a degradação proteica, sobre o sistema ubiquitina-proteassoma, no músculo esquelético de ratos durante a imobilização parcial do membro posterior. Nós hipotetizamos que a suplementação com leucina poderia atenuar o aumento de degradação proteica induzido pelo desuso.

1.2 Material e métodos

1.2.1 Animais

Controles

Ratos Wistar machos (~250 g) foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos. Os ratos foram mantidos em regime de claro/escuro de 12 h/12 h, no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB1/USP), com ração e água *ad libitum*. Os ratos do primeiro grupo foram anestesiados (30 mg/kg corporal de citadina e 10 mg/kg corporal de xilazina) tiveram sua pata posterior esquerda imobilizada com o músculo sóleo em posição encurtada (n=10, Imob), com o auxílio de gesso, por sete dias sendo sacrificados ao final deste período. Outro grupo será imobilizado como descrito anteriormente, porém, ao sétimo dia os animais tiveram seu membro liberado, sendo permitido a este animal a recuperação por sete dias (n=10, 7R). O grupo que serviu como controle negativo, passou pelos mesmos procedimentos da imobilização, porém, sem a imobilização efetiva (n=10, Controle).

Tratados

Os grupos com sobrecarga de leucina receberam leucina diariamente (2,7 mg/kg corporal), *via gavage*, por todo o período de tratamento, com o início da suplementação 3 dias antes da imobilização. Um grupo foi imobilizado, como descrito anteriormente para o grupo Imob, e sacrificado no 7º dia (n=10, Imob+Leu). A outro grupo, assim como o grupo 7R, foi permitido a recuperação (n=10, 7R+Leu).

1.2.2 Amostras de tecido

O músculo sóleo foi removido e pesado, sendo sua massa normalizada pela massa corporal ("Soleus M/BM"). Após a pesagem, estes músculos foram cortados transversalmente ao meio: um segmento foi imerso por 30 segundos em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C para a realização de experimentos de histoquímica; o segundo segmento foi congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para a realização de expressão gênica e proteica.

1.2.3 Síntese proteica

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof^o. Dr. Rui Curi, sendo realizados por pessoas treinadas e em ambiente regulamentado.

Os músculos foram pré-incubados por 30 minutos em tampão Krebs-Ringer (DMEM - Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos, St. Louis, MO, Estados Unidos). Foram transferidos para outro frasco contendo o mesmo tampão acrescido de 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ L-[U- ^{14}C]-fenilalanina e incubados por 2 horas (haverá 80 μL de solução radioativa em 20 mL de tampão frio). Foram separadas 4 alíquotas de 100 μL de meio quente com 1,5 mL de líquido de cintilação para contar a radioatividade. Ao final da incubação, os frascos foram colocados no gelo por aproximadamente 2 minutos. Em seguida, os músculos foram retirados do meio de incubação, lavados em meio frio gelado, secados, os tendões serão cortados e os músculos forma congelados em nitrogênio líquido. Estes músculos foram pesados e transferidos para falconetes de 2 mL contendo 400 μL de TCA 10%. Essa mistura foi homogeneizada em homogeneizador Polytron (Kinematica AG, Lucerna, Suíça) e seu volume foi completado com 1 mL de TCA 10 %. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8000 rpm e o sobrenadante será desprezado. Será adicionado 1 mL de TCA 10 % e as amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, 1 mL de etanol:éter 1:1 será adicionado as amostras que serão novamente centrifugadas por 10 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 500 μL de KOH 1 M foi adicionado as amostras. Após esta etapa, as amostras foram levadas ao banho seco a 60 °C por 30 minutos e, em seguida, uma alíquota de 200 μL foi transferida e 2 mL de líquido de cintilação foi adicionado. A contagem de radiação liberada foi realizada através de um beta-contador.

1.2.4 Histoquímica para ATPase miosínica e área de secção transversal (CSA)

O músculo sóleo de animais de cada grupo foi removido, seccionado em sua porção média e congelados imediatamente em isopentano e estocados em nitrogênio líquido. Secções seriadas (10 μm) destes músculos foram obtidas com o auxílio de um criostato. Após a obtenção dos cortes em lâminas histológicas, foi realizada a reação histoquímica para ATPase miosínica, adaptada de Brooke (1970) (BROOKE, 1970), que permite, através de diferentes pHs, a determinação de fibras tipo I e II.

Para a reação em pH 10,3, os cortes foram fixados em a 4 °C em formol cálcio de Backer (50ml de formalina 10% e 0,5 g de cloreto de cálcio), posteriormente lavados com água destilada e pré-incubados por 10 min. em tampão glicina (0,75 g de glicina, 0,59 g de NaCl, 0,8 g de CaCl₂, 100 ml de água destilada e 90 de NaOH 0,1M, pH 10,3).

Para a reação em pH 4,3, os cortes não fixados, foram incubados em tampão acetato (44 ml de acetato de sódio 0,2 M, 50 ml de 1,2% ácido acético glacial, 200 ml de água destilada e 530 mg de CaCl₂, pH 4,3) durante 10 min.

Após a incubação em soluções de pHs diferentes os cortes foram lavados em água destilada e incubados em solução contendo 60ml de tampão glicina e 100 mg de ATP-Na₂, pH 9,5 por 35 min. a 37 °C. Em seguida foram enxaguados com água destilada e mantidos em cloreto de cobalto 2% por cinco minutos. Em seguida, os cortes foram mantidos em solução 0,5% de sulfeto de amônio por 3 min., sendo finalmente enxaguados com água destilada e montados com gelatina-glicerina.

Após a confecção das lâminas histológicas, foi possível a contagem e determinação da área de secção transversal (CSA), através do programa Image-ProPlus, dos diferentes tipos de fibra que compõe o músculo. Esta técnica permite medidas seguras do nível de atrofia induzida nas fibras musculares, já que uma redução do diâmetro e, por conseguinte da área, está bem descrita na literatura (FAREED et al., 2006).

1.2.5 Extração de RNA Total e Quantificação

Como descrito para todos os métodos anteriores, após sacrifício, retiramos o músculo sóleo. Para isolamento do RNA total, foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos, Carlsbad, CA, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante. Quantificou-se por espectrofotometria (Eppendorf® Spectrophotometer), medindo-se a absorbância a 260 nm. A pureza do RNA foi determinada fazendo-se a relação entre 260 e 280 nM. Submeteu-se à corrida em gel denaturante para análise qualitativa.

1.2.6 Reação de Transcrição Reversa

1 µg de RNA extraído foi utilizado na típica reação de transcrição reversa, contendo Oligo dT (500ug/ml), 10 nM de dNTP Mix, 5x First Strand Buffer, 0,1 M de DTT e 200 U de

transcriptase reversa (MMLV Reverse Transcriptase - Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos Corporation, Madison, WI, Estados Unidos). A transcrição reversa foi efetuada a 70 °C por 10 minutos. Adicionada a enzima, continuou-se o ciclo a 42 °C por 60 minutos e 95 °C por 10 minutos.

1.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A expressão gênica de MAFbx/Atrogin-1, Murf-1, E3α, UBP69, UBP45, USP28, foi analisada através da quantificação da fluorescência com ABI Prism 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) baseada em metodologia já descrita (BUSTIN, 2002). A reação foi feita com DNAc (DNA complementar), diluído em mix contendo Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), água MiliQ e respectivos iniciadores senso e anti-senso. As condições de ciclagem utilizadas foram 60 °C por 1 min, 50 °C por 2 min e 95 °C por 10min e a amplificação ocorre em 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e anelamento e extensão a 60 °C por 60 s. Os iniciadores (“primers”) desenhados com auxílio do programa Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), e sintetizados pela Integrated DNA Technologies, Inc, estão demonstrados na Tabela 1.

Realizamos a análise da amplificação com auxílio do Applied Biosystems' Sequence Detection Software. O Ct, limiar de ciclagem em que pode ser notado um aumento na fluorescência, indica a quantidade de DNA complementar (DNAc) presente nas amostras, e consequentemente os níveis de RNA mensageiro (RNAm) que estavam presentes na reação. A expressão gênica foi medida através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrito por K. Livak no Manual do Usuário do Biosystem Sequence Detector Bulletin 2, onde $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ amostra} - Ct \text{ controle interno da mesma amostra}] - [Ct \text{ controle} - Ct \text{ do controle interno com a mesma amostra controle}]$. A fórmula é baseada na suposição que a taxa com que o Ct mude versus a taxa que a cópia alvo mude, seja idêntica para o gene de interesse e o controle interno (Ciclofilina A). Os iniciadores utilizados nesse estudo estão na Tabela 1 do Apêndice A.

1.2.8 Western Blot

Após extração de proteína total dos tecidos utilizando tampão RIPA 2,5x na proporção de 1 g de tecido para 10 ml de tampão (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 10% SDS e 0,1 ml de inibidor de proteinase Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), realizou-se quantificação através do método de Bradford. Preparou-se o gel de eletroforese 12% e de stacking 5% e aplica-se 30-70ug de proteína diluída em tampão de amostra. Após corrida e transferência, realizamos a coloração com Ponceau Vermelho (Biorad) para assegurar a presença de igual quantidade de proteína em cada faixa do gel. O anticorpo primário utilizado foi Anti-Ubiquitina (1:1000 – BostonBiochem). Após incubação (overnight a 4 °C) e lavagem, foi realizada a incubação com solução de anticorpo secundário (AP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG) por 1 h. Terminada a incubação, lavou-se com TBST 2x de 5 min cada e uma lavagem com tampão de detecção (1M TRIS, 1M NaCl, 100mM MgCl₂, pH 9,5). A revelação foi feita mergulhando-se as membranas em tampão de detecção contendo NBT/BCIP (substrato) por 5-8 minutos.

1.2.9 Medidas do Nível de Insulina Plasmática

A fim de verificar o envolvimento de vias anabólicas na resposta de leucina durante o tratamento, realizamos medidas de insulina plasmática. As primeiras medidas de insulina plasmática foram determinadas 1 e 3 h após uma única dose de leucina (n=5 por grupo) para verificarmos efeitos agudos do tratamento. Além disso, para determinar efeitos crônicos da suplementação, ratos foram suplementados por 5 dias e os níveis de insulina foram determinados após 1 ou 3 horas da última dose de leucina (n=5 por grupo). Amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas (2000 rpm, 10 min a 4 °C), e o plasma foi estocado a -80 °C. Os níveis de insulina foram determinados por RIA, com Porcina radiomarcada (I 125, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos).

1.3 Resultados

O protocolo de imobilização se mostrou eficaz em promover a perda de massa do músculo sóleo (dia 7: ~29%; $P < 0.05$) (Figura 1A - APÊNDICE A). A suplementação de leucina atenuou a perda da massa induzida pela imobilização após 7 dias ($P < 0.05$; Figura 1A - APÊNDICE A). Além disso, a razão “Soleus Mass/BM” no grupo imobilizado foi significativamente menor quando comparada ao grupo suplementado com leucina após 7 dias de recuperação ($P < 0.05$). Como esperado, o processo de imobilização induziu uma redução considerável na razão CSA/BM de fibras do tipo I (30%; $P < 0.05$ vs. Control), mas esta redução foi bloqueada pela suplementação com leucina (Figura 1B - APÊNDICE A). Semelhantemente, em fibras tipo II, a imobilização promoveu uma redução na razão CSA/BM (day 7: ~27%; Figura 1B - APÊNDICE A). Interessantemente, a suplementação de leucina não preveniu a queda da razão CSA/BM induzida pela imobilização em fibras do tipo II (dia 7), mas foi capaz de aumentar a razão CSA/BM durante o período de recuperação (Figura 1B - APÊNDICE A).

A análise da expressão gênica de E3 ligases revelou um aumento robusto nos níveis de mRNA de Mafbx/Atrogin-1, com pico em 2 e 3 dias de imobilização (280%; $P < 0.05$ vs. "Control"), retornando aos níveis basais ao sétimo dia (Figura 2A - APÊNDICE A). Interessantemente, a suplementação de leucina reduziu fortemente o pico de expressão do gene Mafbx/Atrogin-1 induzido pela imobilização (100% no dia 2; $P < 0.05$ vs. Im). Durante a fase de recuperação, a expressão do gene Mafbx/Atrogin-1 diminuiu em ambos os grupos, imobilizado e imobilizado com suplementação de leucina. Uma resposta muito similar foi observada na expressão gênica de MuRF1 (Figura 2B - APÊNDICE A). O processo de imobilização por 7 dias levou a um aumento de 200% na expressão gênica de E3alpha, o que não foi alterado pela suplementação com leucina (Figura 2C - APÊNDICE A). Durante o período de recuperação, o mRNA de E3alpha retornou aos níveis basais em ambos os grupos de animais, imobilizados e imobilizados com suplementação de leucina (Figura 2C - APÊNDICE A).

O estudo da expressão gênica de USP28, mostrou que a imobilização não promoveu alterações significativas, porém em animais imobilizados e suplementados com leucina apresentaram uma expressão significativamente maior após 2 dias de tratamento (200%; Figura 2D - APÊNDICE A). O pico de expressão deste gene parece ter ocorrido no 3º dia, porém devido a grande variabilidade estes valores não foram estatisticamente significantes ($P < 0.087$). Após 2 dias, a expressão gênica de USP28 voltou aos níveis basais e permaneceu inalterada durante a

recuperação tanto em animais imobilizados quanto imobilizados e suplementados (Figura 2D - APÊNDICE A). O processo de imobilização *per se* causou um aumento nos níveis de expressão gênica de UBP45 (Figura 2E - APÊNDICE A) após 3 dias, com redução da expressão após 7 dias de imobilização (Figura 2E - APÊNDICE A). Os níveis de expressão deste gene permaneceram baixos durante a fase de recuperação. A suplementação com leucina não alterou estes padrões de maneira significativa. O grupo de animais apenas imobilizados apresentou um decréscimo nos níveis de expressão de UBP69 após 7 dias, retornando aos níveis basais durante a fase de recuperação. Este padrão não foi alterado pela suplementação com leucina (Figura 2F - APÊNDICE A).

A imobilização do membro posterior dos animais promoveu um acúmulo de proteínas ubiquitinadas após 3 dias (Figura 3 - APÊNDICE A). Interessantemente, a suplementação com leucina foi capaz de reduzir os níveis totais de ubiquitinação (Figura 3 - APÊNDICE A).

Os níveis de síntese proteica foram medidos após 3 dias de imobilização. Uma redução significativa na taxa de síntese foi observada em animais imobilizados (redução de 35%; $P < 0,05$ vs. Control – Figura 4 - APÊNDICE A). Curiosamente, a suplementação com leucina não foi capaz de reverter a redução na taxa de síntese provocada pela imobilização neste período (Figura 4 - APÊNDICE A).

Além disso, a suplementação com leucina não alterou os níveis de insulina plasmática em nenhum dos tratamentos: 1 e 3 horas após uma única dose de leucina ou 1 e 3 horas após 5 dias de tratamento com leucina (Figura 5 - APÊNDICE A).

1.4 Discussão

O objetivo deste estudo foi analisar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito protetor da suplementação de leucina sobre a atrofia muscular causada durante o desuso. Os principais resultados deste estudo foram: (a) a suplementação com leucina atenuou a perda de massa muscular e facilitou a recuperação da massa muscular após o processo de imobilização; (b) os picos de expressão gênica de E3 ligases e conteúdo de proteínas ubiquitinadas foram atenuados no grupo suplementado com leucina; e (c) a dieta rica em leucina não alterou a síntese proteica em músculos isolados após 3 dias de imobilização.

O efeito deletério da imobilização no músculo esquelético está bem estabelecido, e há um aumento nas evidências a respeito de mecanismos moleculares envolvidos na atrofia muscular

durante o desuso (FAVIER; BENOIT; FREYSSINET, 2008; GLASS, 2003; KANDARIAN; JACKMAN, 2006; ZHANG; CHEN; FAN, 2007). Devido a condições de desuso afetarem uma ampla gama de indivíduos, muita atenção vem sendo dada à estratégias que possam minimizar a perda de massa muscular sob várias condições. A suplementação com certos aminoácidos tem sido demonstrada como promotora da síntese proteica e/ou diminuição da degradação proteica muscular (STIPANUK, 2007; VARY et al., 2007).

Neste estudo, a atrofia muscular induzida pela imobilização foi suprimida pela suplementação com leucina. Os animais suplementados com leucina apresentaram, tanto massas musculares quanto CSA, maiores após imobilização quanto após a recuperação quando comparados a grupos não suplementados. Interessantemente, apenas fibras do tipo I foram eficientemente protegidas contra imobilização em animais suplementados, enquanto fibras do tipo II não foram protegidas. As causas deste efeito fibra-tipo I específico são ainda desconhecidas. Algumas possibilidades incluem diferente capacidade de captação de leucina por cada tipo de fibra e o início do metabolismo de leucina ocorrer preferencialmente em fibras do tipo I (BIOLO et al., 1995a; BIOLO et al., 1995b; WITT et al., 2008).

Para investigar os mecanismos associados com o efeito de leucina sobre a degradação proteica, nós determinamos o níveis de mRNA de proteínas associadas ao sistema ubiquitina-proteassoma. Como descrito na literatura, a expressão gênica de E3 ligases apresentou um aumento agudo e transiente em resposta à imobilização. Estudos prévios mostraram que graves condições catabólicas estão associadas com a expressão gênica de E3 ligases (BODINE et al., 2001; CROS et al., 2001; PATTISON et al., 2003; URSO; CLARKSON; PRICE, 2006). A suplementação com leucina reduziu severamente o aumento na expressão de E3 ligases, sugerindo que o efeito anti-catabólico está associado com a atenuação da expressão destes genes. Aparentemente, estes dados são contrastantes com os encontrados por Sugawara e colaboradores (SUGAWARA et al., 2008), os quais reportaram que a suplementação com leucina não atenuou a expressão gênica de Mafbx/atrogin-1 e MuRF1 em um modelo de déficit proteico. Estes pesquisadores propuseram que a via proteolítica lisossomal seria preferencialmente envolvida nos efeitos protetores de uma dieta rica em leucina. A razão para estas discrepâncias pode estar relacionada ao momento temporal no qual as análises foram realizadas. Em nosso estudo, nós detectamos um aumento transiente nos níveis de expressão gênica de E3 ligases, com picos de expressão em 2 e 3 dias, com retorno aos níveis basais após 1 semana de imobilização. Sugawara

et al. (SUGAWARA et al., 2008) analisou a expressão destes genes apenas no sétimo dia em um modelo de restrição proteica.

Recentemente, uma família de proteínas envolvidas na atividade do UPS foi descrita: DUBs (desubiquitinases). Nossos resultados mostraram que a suplementação com leucina promoveu um aumento agudo na expressão gênica de USP28 no grupo imobilizado, suportando a hipótese de que a suplementação com leucina promove a minimização da atividade do UPS. Contudo, a leucina não afeta a expressão de outras DUBs (UBP45 e UBP69) durante a imobilização. Considerando os resultados dos níveis de mRNA de E3 ligases e DUBs reportados neste estudo, podemos supor que E3 ligases, mas não DUBs, desempenham um papel central nos efeitos decorrentes da imobilização. Por exemplo, ambos Mafbx/atrogin-1 e Murf-1 respondem rápida e robustamente à imobilização e tem sua resposta diminuída pelo tratamento com leucina. Por outro lado, a resposta da expressão gênica de DUBs à imobilização se mostrou bastante complexa, e o tratamento com leucina não causou grandes alterações neste perfil de resposta. Vale a pena mencionar que ao menos em uma condição de sobrecarga mecânica do músculo esquelético, E3 ligases e DUBs parecem trabalhar de maneira coordenada, como mostrado por Soares e colaboradores (SOARES et al., 2007). Neste estudo, os autores reportaram que a expressão gênica de todas E3 ligases (Mafbx/atrogin-1, Murf-1 e E3 alpha) aumentam durante o crescimento longitudinal do músculo esquelético induzido por alongamento. Adequadamente, em períodos de tratamento similares, a expressão gênica de todas as DUBs analisadas (USP28, UBP45 e UBP69) aumentaram, o que aparentemente reforça a idéia de sistema adaptativo, no qual o resultado pode ser o acúmulo de proteínas (SOARES et al., 2007).

É possível que diferentes modelos de atrofia muscular (por exemplo, privação proteica e imobilização) ativem vias proteolíticas distintas. Nossos dados sugerem que a atrofia muscular induzida pela imobilização é altamente dependente da ativação do sistema ubiquitina-proteassoma por mecanismos que ainda necessitam ser esclarecidos. Existe a possibilidade de que leucina direta ou indiretamente possa diminuir a atividade de fatores de transcrição que modulam a transcrição de atrogenes, como FOXO. Neste estudo determinamos os níveis de ubiquitinação total de proteínas. Como esperado, o conteúdo de proteínas ubiquitinadas no músculo sóleo rapidamente aumenta após a imobilização. Estes resultados podem ser explicados pela rápida resposta na expressão gênica de E3 ligases observada em grupos imobilizados. Além disso, a suplementação com leucina atenuou a ubiquitinação de proteínas, fato este que está alinhado com

o efeito de leucina sobre a expressão gênica de atrogenes. Em conjunto, nossos resultados trazem informações adicionais para suportar a hipótese de que a suplementação com leucina promove a atenuação do sistema ubiquitina-proteassoma.

A influência de aminoácidos utilizados como suplementos para induzir aumento no conteúdo proteico do músculo esquelético tem sido demonstrado por estudos prévios, os quais demonstraram que a ingestão de aminoácidos poderia estimular a síntese proteica em animais em jejum (GARLICK; MILLWARD; WATERLOW, 1973; YOSHIZAWA et al., 1998). Um aminoácido em particular, leucina, parece mediar a maioria dos efeitos metabólicos da ingestão de aminoácidos/proteína. A função estimulante de leucina no metabolismo proteico do músculo esquelético tornou-se clara na década de 1970 (GARLICK; MILLWARD; WATERLOW, 1973; YOSHIZAWA et al., 1998), mas os mecanismos envolvidos permanecem sem uma completa compreensão. Leucina estimula a síntese proteica através da ativação da tradução, estimulando a via na qual mTOR está inserida (ANTHONY et al., 2001a; ANTHONY et al., 2001b; BIOLO et al., 1995b; VARY et al., 2007). Neste estudo, como esperado, a síntese proteica foi reduzida após 3 dias de imobilização. Um efeito positivo da suplementação de leucina após 3 dias não foi observado. Nesta mesma linha, Sugawara e colaboradores (SUGAWARA et al., 2008) não reportaram nenhum efeito da suplementação de leucina sobre a síntese proteica durante a deprivação proteica. Nossos resultados reforçam a hipótese de que o efeito protetor de leucina é mediado pela redução da expressão gênica de E3 ligases, e não pelo bem estabelecido efeito de leucina sobre a síntese proteica. Neste estudo também analisamos os níveis plasmáticos de insulina após uma única dose de leucina e após 5 dias de suplementação com leucina. Os resultados claramente mostraram que os níveis de insulina não foram significativamente afetados pela suplementação com leucina, o que descarta a possibilidade de que os efeitos aqui descritos pudessem ser devido a um aumento na insulina plasmática.

Assim, nossos resultados mostraram que a suplementação com leucina atenuou a atrofia muscular induzida pela imobilização. O efeito protetor da suplementação com leucina foi, no mínimo parcialmente, mediado pela redução da expressão gênica de componentes do sistema ubiquitina-proteassoma, e não pelo estímulo sobre a síntese proteica.

CAPÍTULO 2 – PAPEL DE MURF1 E MURF2 NA DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

2.1 Introdução

Como explanado no capítulo 1, o tecido muscular esquelético representa um tipo tecidual que pode ser remodelado de diversas formas. Por exemplo, aumentando a carga mecânica, o que ocorre durante o exercício físico, o músculo esquelético responde com um grande aumento no diâmetro das fibras musculares (hipertrofia); durante o desuso que ocorre, por exemplo, com pacientes acamados, os músculos respondem rapidamente reduzindo seu diâmetro (atrofia). O mecanismo para regular hipertrofia/atrofia inclui um aumento da sinalização de vias pró-síntese proteica como mTOR/p70S6K, e/ou vias relacionadas ao estresse intracelular, incluindo a via p38/ERK/MEK (POTTHOFF; OLSON; BASSEL-DUBY, 2007). As adaptações ao exercício físico não incluem apenas a regulação positiva do trofismo da fibra muscular, mas também inclui adaptações metabólicas, como um aumento no conteúdo mitocondrial (HOOD, 2009) e mudanças no tipo de fibra muscular (LEE-YOUNG et al., 2009).

Um exemplo dessa capacidade de alteração no tipo da fibra muscular ocorre durante o tratamento com hormônio tireoidiano (MIYABARA et al., 2005b), ou durante estimulação elétrica de baixa frequência (PUTMAN et al., 2004). Apesar da caracterização dos fatores que determinam o tipo de fibra continuarem a serem descobertos, calcineurina, MEF2, CaMK e pGC-1 (ref) foram identificados como fatores promotores de fibras do tipo I, contrariamente ao que promove o hormônio tireoidiano (MIYABARA et al., 2005b). Recentemente um fator chamado miozenina-1 (também conhecido como calsarcina-2 ou FATZ) foi descrito como responsável pela manutenção de fibras rápidas. Funcionalmente, miozenina-1 pertence à família das calsarcinas, cujos membros inibem a fosfatase calcineurina (FREY et al., 2008) a qual ativa o fator de transcrição NFAT por defosforilação. Estudos recentes em animais nocauteados para miozenina-1 demonstraram que a expressão desta proteína é essencial para a manutenção de fibras rápidas (FREY et al., 2008). Consistente com a maior presença de fibras do tipo I, animais nocautes para miozenina-1 apresentaram uma grande capacidade para correr longas distâncias (FREY et al., 2008).

A perda crônica de sarcômero, particularmente de fibras tipo II durante o envelhecimento (SNIJDERS; VERDIJK; VAN LOON, 2009) tem recebido muita atenção devido a sua

importância clínica. Durante atrofia muscular crônica, a perda de sarcômeros é acompanhada por diversas alterações no conteúdo proteico, metabolismo e transcriptoma, incluindo redução do metabolismo mitocondrial e de genes músculo-específicos. Análises genômicas de larga escala de músculos saudáveis e sob quadros atroficos identificaram grupos de genes que são regulados positivamente durante estes estímulos (LECKER et al., 2004; LECKER et al., 1999). Estas mudanças transcricionais incluem genes que estão diretamente ligados ao desenvolvimento da atrofia muscular, estes genes são conhecidos como atrogenes (BODINE et al., 2001; LECKER et al., 1999). Em particular, atrogin-1 (também conhecido como Mafbx) e MuRF1 ("muscle ring finger -1") possuem grande importância no remodelamento da massa muscular (BODINE et al., 2001). Em camundongos selvagens o músculo gastrocnemio pode perder até 50% da sua massa após 2 semanas de denervação, enquanto em animais nocautes sem a expressão de atrogin-1 ou MuRF1 ocorre a perda de apenas 20% em relação ao controle (BODINE et al., 2001). Estes estudos com animais nocautes sugerem que o aumento de Mafbx/atrogin-1 e MuRF1 em animais selvagens após a denervação é essencial para o desenvolvimento do quadro atrofico.

Atrogin-1 e MuRF1 são E3 ligases e como tal podem potencializar a multi-ubiquitinação de proteínas alvo, iniciando dessa forma a degradação dependente do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) (PICKART; EDDINS, 2004). Aqui, nós focamos em MuRF1 e MuRF2 ("muscle ring finger 2") que compartilham um domínio "RING finger" em sua porção N-terminal (que contém a atividade E3 ligase), seguido por domínios "B-box" e um central chamado "coiled-coil domain". Com relação à atividade E3 ligase, MuRF1 por exemplo foi demonstrada como responsável por multi-ubiquitinar troponina I *in vitro* (KEDAR et al., 2004), miosina (CLARKE et al., 2007) e actina (COHEN et al., 2009). Contudo, *in vivo*, os mecanismos que levam a ubiquitar determinada proteína são mais complexos, já que Atrogin-1 e MuRF1 podem ter acesso a diferentes proteínas na fibra muscular. Para responder a essa questão, Cohen e colaboradores (COHEN et al., 2009) utilizaram um sistema cre-lox induzível no qual a indução deletou o domínio "RING finger", abolindo assim a atividade ubiquitina-ligase permitindo que MuRF1 exercesse sua possível função estrutural relacionada à banda M (MCELHINNY et al., 2002; MROSEK et al., 2007). Neste modelo, a miosina não foi protegida da multi-ubiquitinação e degradação após denervação, contrastando com os resultados *in vitro* que apontavam esta proteína como alvo de MuRF1 (CLARKE et al., 2007). Entretanto, dois outros componentes dos filamentos grossos, a cadeia leve da miosina 2 (MLC2) e a proteína C ligante de miosina foram

protegidas da degradação, sugerindo que a ubiquitinação destas proteínas seria mediada por MuRF1 (COHEN et al., 2009). Desta forma, pesquisas recentes estão focadas na identificação de alvos *in vivo* de atrogin-1 e MuRF1 usando por exemplo modelos de animais transgênicos e transferência gênica de E3 ligases através de adenovírus. Utilizando esta última metodologia Mearini e colaboradores sugeriram que atrogin-1 e MuRF1 provavelmente reconhecem proteínas diferentes (MEARINI et al., 2009). Hirner e colaboradores (HIRNER et al., 2008) utilizaram animais transgênicos para demonstrar que a expressão específica no tecido muscular esquelético não foi suficiente para causar atrofia muscular, ao invés disso, resultou em defeitos metabólicos, implicando desse modo MuRF1 em alterações metabólicas durante a atrofia muscular (HIRNER et al., 2008).

A discussão acima a respeito dos estudos sobre atrofia foi focada na proteção da massa muscular após longos períodos de estímulo atrofico (por exemplo, denervação acima de 10 dias) e não sob parâmetros fisiológicos como força ou composição de tipos de fibra muscular. Aqui, nós caracterizamos músculos MuRF1 deficientes após denervação com interesse na composição de tipos de fibra musculares, na tentativa de demonstrar que o músculo de animais nocautes para MuRF1 são fisiologicamente normais e que a remoção deste gene poderia ser uma estratégia de proteção da massa muscular. Surpreendentemente nós encontramos que MuRF1 não está expressa de maneira homogênea pelo músculo esquelético, e é preferencialmente expressa em fibras do tipo II. Além disso, MuRF1 é preferencialmente induzido em fibras do tipo II após denervação. Consistente com a função de MuRF1 em remodelar fibras tipo II, nós encontramos que em animais nocaute para MuRF1, fibras do tipo II foram consideravelmente mais protegidas da perda de massa do que fibras do tipo I. A interação física de MuRF1 com miozenina-1 pode explicar as bases do mecanismo pelo qual MuRF1 está envolvido na especificidade de fibras do tipo II, implicando MuRF1, dessa forma, em condições patofisiológicas que levam ao remodelamento da proporção de fibras que ocorre durante a denervação ou envelhecimento.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Animais

Animais MuRF1 e MuRF2 knockout (MuRF1 KO, MuRF2KO e dKO - duplamente nocauteados) foram feitos usando linhagem C57/BL6 seguindo trabalho previamente descrito

(WITT et al., 2001; WITT et al., 2008). A linhagem superexpressante de MuRF1 (MuRF1 TG) foi desenvolvida como em trabalho anterior (HIRNER et al., 2008). Os animais foram mantidos em regime de claro/escuro de 12 h/12 h, no Biotério da Universitätsklinikum Mannheim, com ração e água *ad libitum*.

Camundongos MuRF1 nocaute tiveram seu nervo ciático cortado como descrito anteriormente (STOCKHOLM et al., 2001). Primeiramente, a pele dorsal da parte superior das patas traseiras foi cortada e os músculos posteriores separados a fim de exhibir o nervo ciático. Uma denervação crônica foi obtida através da extração cuidadosa de uma secção (10 mm) do nervo ciático. Após 5 e 14 dias o músculo tibial anterior e o músculo sóleo foi removido. A efetividade da denervação foi confirmada pela observação da locomoção debilitada dos animais e também verificada pela descontinuidade do nervo ciático após o sacrifício dos animais.

2.2.2 Amostras de tecido

Os músculos sóleo e tibial anterior foram removidos e pesados. Após a pesagem, estes músculos foram cortados transversalmente ao meio: um segmento foi imerso por 30 segundos em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C para a realização de experimentos de imunofluorescência; o segundo segmento foi congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C para a realização de expressão proteica.

2.2.3 Imunofluorescência

Secções transversais dos músculos soleus e tibial anterior para imunomarcacão foram fixadas com acetona por 10 minutos à -20 °C, lavado com PBS 3 vezes por 3 minutos cada um e em seguida bloqueadas/permeabilizadas com 0,1 glicina/0,1% Triton X-100 em tampão fosfato salino (PBS) por 1 hora. Posteriormente as lâminas foram incubadas “overnight” com uma solução contendo o anticorpo primário, 3% de soro normal de cabra e 0,1% Triton X-100/0.1 M. Após a incubação com o anticorpo primário as lâminas foram lavadas (três vezes de 5 minutos cada) em PBST 0,1% e incubadas em anticorpo secundário (respectivo de acordo com o primário utilizado) por 1 h em temperatura ambiente. Após esse período as lâminas foram lavadas (três vezes de 5 minutos cada) em PBST 0,1% e montadas com Vectashield (Dako, Dinarmaca) meio

de montagem para fluorescência com 40,6-diamididino-2-phenylindole (DAPI) (cat #H-1200, Vector Labs, Burlingame, CA, Estados Unidos) e lamínulas.

Os anticorpos primários utilizados para a imunolocalização foram: MuRF1 e MuRF2, detectados com anticorpos específicos recentemente descritos (HIRNER et al., 2008; WITT et al., 2008; WITT et al., 2005), MHC Slow (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) e MHC Fast (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), mono-ubiquitina (Cat. nº ab7780) e multi-ubiquitina (Cat. nº 20239). Os anticorpos secundários utilizados para a imunofluorescência foram: (1) donkey anti-chicken Cy3 IgY-cianina (1:1000; # cat 703-165-155 Jackson Lab, West Grove, PA, Estados Unidos), (2) donkey Cy3 cianina anti-rabbit (1:1000; cat 715-165-150 Jackson Lab, West Grove, PA, Estados Unidos) e (3) donkey Cy2 cianina ass anti-mouse (1:1000; cat # 715-165-150 Jackson Lab, West Grove, PA, Estados Unidos).

2.2.4 Análise quantitativa e morfométrica das imunofluorescência

A análise quantitativa foi realizada em microscópio equipado com uma câmera digital. Para processamento das imagens, utilizamos os softwares Metamorph da Universal Imaging Corporation (Estados Unidos) e o Image Pro-plus (Media Cybernetics, Estados Unidos). A frequência e área de secção transversal (CSA) das fibras do tipo I e tipo II, foram determinadas de um total aproximado de 500 fibras para o sóleo e 1000 fibras para o tibial anterior em cada grupo experimental. Entre três e quatro secções de cada músculo foram analisadas em todos os grupos. Para a determinação do tipo de fibra, utilizamos a imunomarcagem com MHC I e MHCII. Fibras marcadas fracamente foram consideradas intermediárias.

2.2.5 Western Blot

Os experimentos de expressão proteica aqui realizados seguiram os mesmo métodos acima descritos no Capítulo 1, seção 1.2.8 Western Blot, com a diferença apenas nos anticorpos utilizados: MuRF1 e MuRF2 utilizados também na seção 2.2.3 Imunofluorescências, Atrogin-1 (Cat. nº: AP2041 - EMC Biosciences), Miozenina-1 (Cat nº ab58704 - ABCAM, Cambridge, MA, Estados Unidos) e Miozenina-2 (Cat nº ab26200 - ABCAM, Cambridge, MA, Estados Unidos).

2.2.6 Experimentos de duplo híbrido em leveduras

Os experimentos de interação proteína-proteína através de duplo híbrido foram realizados no laboratório do Prof^o Siegfried Labeit. Os cDNAs humanos completos de MuRF1 e MuRF2 foram amplificados do cDNA total de músculo esquelético e inseridos em plasmídeo pGBKT7 (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos). Para a realização de “yeast two hybrid system”, iscas recombinantes de MuRF1 e 2 foram inseridas em *Saccharomyces cerevisiae*, cepa AH109, que foi subsequentemente co-transformadas com bibliotecas de cDNA inseridas em pGADT7 como descrito anteriormente (WITT et al., 2008). Para o contato, fragmentos do gene de myozenin-1 foram inseridos em pGADT7. Constructos de myozenin-1 foram co-transformados junto com clones de pGBKT7-MuRF1 e pGBKT7-MuRF2 em células AH109. O resgate dos plasmídeos que interagiram com as presas e suas sequências foram analisados como descrito anteriormente (WITT et al., 2005).

2.3 Resultados

Neste estudo, primeiramente nós determinamos a especificidade do anticorpo para MuRF1 obtidos de galinha (IgY) (Figura 1A - Apêndice B) através de diversos Western Blot de extratos de músculos tibial e sóleo. A seguir, nós examinamos músculos sóleo e tibial anterior após 14 dias da ruptura do nervo ciático com imunofluorescência para MuRF1 e MHC I (fibras do tipo I) e MHC II (fibras do tipo II). No músculo com composição mista, sóleo, MuRF1 foi expresso preferencialmente em fibras do tipo II (Figura 1B - Apêndice B). No músculo tibial anterior, onde predomina fibras do tipo II, MuRF1 foi expresso em todas as fibras. Após a denervação, MuRF1 continuou associado a fibras do tipo II em ambos, sóleo e tibial anterior (Figura 1 C - Apêndice B), e foi expresso em altos níveis como indicado pelos imunoblotes (Figura 1A - Apêndice B).

A seguir, analisamos a indução de MuRF1, MuRF2 e atrogin-1 (devido a sobreposição de funções destas proteínas). Após 14 dias, MuRF1 foi detectado como uma banda dupla no imunoblote, levantando a possibilidade de modificações pós-traducionais ou degradação (Figura 2A - Apêndice B). O nível de expressão da isoforma de 60kDa de MuRF2 não foi alterado, porém uma isoforma de 50kDa foi induzida pela denervação (visível como a banda de menor tamanho na Figura 2B - Apêndice B). Por fim, nós não detectamos alterações significantes nos

níveis de expressão de atrogin-1, após 5 e 14 dias, confirmando a informação de que o aumento na expressão de atrogin-1 é transiente (SACHECK et al., 2007).

Foi demonstrado anteriormente que a inativação de MuRF1 protege o tecido muscular esquelético da atrofia após denervação (BODINE et al., 2001). Devido à associação de MuRF1 às fibras do tipo II, nós investigamos a proteção que a ausência desta proteína poderia causar no músculo sóleo (músculo que contém ambos tipos de fibra) e no músculo tibial anterior (fibra tipo II predominante). Este experimento demonstrou que o músculo tibial anterior de animais MuRF1 nocautes foi protegido da atrofia após 14 dias de denervação (Figura 3A- Apêndice B). Em contraste, os sóleos destes animais apresentaram atrofia significativa, com perda de massa muscular aproximadamente de 35% (Figura 3B - Apêndice B). Consistente com a proteção preferencial do músculo tibial anterior, as CSA de fibras tipo II foram fortemente protegidas após denervação em camundongos nocautes para MuRF1, mas também notamos uma hipertrofia significativa antes da denervação nas fibras tipo II do músculo tibial anterior destes animais (Figura 3C - Apêndice B). Apesar disso, a CSA de fibras do tipo II no músculo tibial anterior sofreu uma redução de 22% após 14 dias de denervação. Em comparação, no músculo sóleo a CSA das fibras apresentou uma queda mais pronunciada (33% após 14 dias de denervação). Por fim, notamos durante nossa análise do tipo de fibra que a maioria das fibras tipo II perderam a clara definição de seu fenótipo após denervação em camundongos MuRF1 nocautes: ocorreu um aumento de fibras musculares marcadas com MHC I e co-marcadas para MHC II, sendo então classificadas como intermediárias (Fig. 3D -Apêndice B). Em suma, a inativação de MuRF1 protege da atrofia preferencialmente fibras do tipo II após denervação.

A expressão de MuRF1 em fibras tipo II e a proteção preferencial do músculo tibial anterior sugerem uma dependência das funções de MuRF1. Assim, decidimos analisar os clones que previamente interagiram com MuRF1 (WITT et al., 2008) e determinamos quais parceiros de MuRF1 poderiam estar envolvidos na sinalização para determinação de tipos de fibra muscular. Nesta pesquisa, notamos que 10 presas para o gene miozenina-1 foram pescadas em quatro experimentos independentes de duplo híbrido utilizando bibliotecas de cDNA de músculo cardíaco e esquelético e MuRF1 e MuRF2 como iscas. Em contraste, nenhum dos experimentos de duplo híbrido identificou clones de miozenina-2. O sequenciamento destes dez clones identificou a região de 380-1265bp no gene de miozenina-1 como sendo esta, a responsável pela interação com MuRF1 e MuRF2 (Figura 4A - Apêndice B). A seguir nós testamos se a deleção

de MuRF1 e/ou MuRF2 afetaria a expressão de miozenina-1 *in vivo* no músculo tibial anterior (em nossas padronizações detectamos miozenina-1 apenas no músculo tibial anterior e não no músculo sóleo, confirmando dados publicados por Frey et al. (FREY et al., 2008)). Enquanto camundongos nocautes para apenas um destes genes (MuRF1 ou MuRF2) apresentaram efeitos moderados, a deleção combinada de MuRF1 e MuRF2 extinguiu a expressão de miozenina-1 no tibial anterior (Figura 4B - Apêndice B). Notamos também uma tendência para redução da expressão de miozenina-2 em animais duplamente nocauteados, em ambos os músculos tibial anterior e sóleo (Figura 4C e D - Apêndice B), apesar dessa redução ser muito menos significativa que a redução de miozenina-1. Podemos resumir então, que a deleção combinada de MuRF1 e MuRF2 bloqueia a expressão de ambas proteínas, miozenina-1 e miozenina-2, levando a ativação da via calcineurina-NFAT.

A redução na expressão de miozenina-1 em animais MuRF1/MuRF2 duplamente nocauteados aumenta a possibilidade de que estes animais tenham problemas na especificação de fibras do tipo II (FREY et al., 2008). Assim, estudamos a distribuição de fibras tipo I e fibras tipo II em camundongos dKO. No músculo tibial anterior, não detectamos um efeito na composição dos tipos de fibra: o músculo tibial anterior de camundongos é composto puramente por fibras do tipo II (AUGUSTO, 2004), sendo o caso também de animais dKO (Figura 5 A - Apêndice B). Contudo, no músculo sóleo de composição mista, notamos uma mudança na proporção favorecendo um aumento de fibras do tipo I (Figura 5B - Apêndice B). Em contraste não detectamos alterações nas proporções de tipo de fibras em animais MuRF1 TG (Figura 5C - Apêndice B). Assim, concluímos que a inativação de MuRF1 e MuRF2 causa uma perda significativa de fibras do tipo II no músculo sóleo.

Estudos de interação identificaram diversas interações de MuRF1 e MuRF2 com proteínas sarcoméricas (WITT et al., 2005). Desta forma, testamos a distribuição de ubiquitina nas fibras musculares do tibial anterior por imunofluorescências usando anticorpos específicos para mono- e multi-ubiquitina. Detectamos uma marcação perinuclear e/ou nuclear com o anticorpo multi-ubiquitina (não foi possível distinguir se esta marcação foi nuclear com a microscopia usada). Também detectamos uma marcação citoplasmática (Figura 6A-F - Apêndice B). Em contraste, quando usamos o anticorpo mono-ubiquitina, nós detectamos um claro padrão estriado (Figura 6G - Apêndice B). Curiosamente, não notamos qualquer diferença óbvia entre amostras preparadas de animais selvagens ou duplamente nocauteados (Figura 6A e D; Figura 6G e H -

Apêndice B). Concluímos que as expressões de MuRF1 e de MuRF2 não são necessárias para a distribuição global de ubiquitina em fibras musculares, ao menos não detectamos com as técnicas aqui utilizadas.

2.4 Discussão

A transcrição de MuRF1 é induzida após desuso no músculo esquelético, por exemplo como promovido pela denervação. Aqui, estudamos MuRF1 e proteínas relacionadas após 5 e 14 dias de denervação. Interessantemente, encontramos que MuRF1 foi expresso de uma maneira fibra tipo II específica em situações fisiológicas e também pós-denervação. Consistente com a função de MuRF1 para o trofismo de fibras tipo II, nós detectamos uma proteção diferencial do músculo tibial anterior (onde predominam fibras tipo II) quando comparado ao músculo sóleo (músculo com uma subpopulação igual entre os tipos de fibra I e II): o tibial anterior foi significativamente mais protegido da atrofia após a ausência de estímulo mecânico. Considerando que após 2 semanas de denervação, a massa muscular e a CSA de fibras do músculo tibial anterior de animais MuRF1 nocaute permaneceram próximas ao nível do controle de animais selvagens. Também devemos levar em conta que estes animais MuRF1 KO apresentaram cerca de 20% de hipertrofia antes da denervação, e a atrofia induzida pela denervação foi atenuada (ocorreu a redução da CSA em cerca de 22% no músculo tibial anterior - Figura 3C - Apêndice B). Este conjunto de dados, indicam que MuRF1 possui um importante papel no trofismo das fibras tipo II em quadros fisiológicos e durante condições patofisiológicas. Além disso, MuRF1 em conjunto com MuRF2 foi necessário para a manutenção da identidade de fibras tipo II (Figura 3D - Apêndice B). Portanto, as funções de MuRF1 vão além de apenas um atrogene, e este trabalho indica que esta E3 ligase pode ser um fator crucial para fibras do tipo II durante a denervação.

Quando estudamos modelos de atrofia devemos levar em consideração a função de MuRF1 sendo fibra-específica. Por exemplo, a mudança de tipo de fibra ocorre após denervação e isso irá afetar a distribuição de proteínas que são dependentes do tipo de fibra, como a cadeia pesada da miosina e isoformas da proteína C ligante a miosina. Provavelmente, algumas proteínas são alteradas após a denervação em animais MuRF1 nocautes e isto pode ocorrer devido à sua proteção da degradação no sistema UPS. Por exemplo, se MuRF1 for incapaz de degradar

miozenina-1, MHC I pode ser protegida secundariamente já que a via calcineurina estará livre para manter a expressão de MHC I.

Nossos dados sugerem que, *in vivo*, a função de MuRF1 para a regulação de fibras tipo II é complexa e depende de sua associação com MuRF2 (Figura 5 - Apêndice B): MuRF1 e MuRF2 regulam miozenina-1 e 2, fatores envolvidos na especificação de fibras tipo II. A marcante perda de miozenina-1/miozenina-2 em animais duplamente nocauteados para MuRF1 E 2 pode explicar porque estes camundongos apresentaram uma pronunciada redução da população de fibras tipo II (Figura 4 - Apêndice B). Análises recentes de modelos animais deficientes para miozenina-1 e miozenina-2 demonstrou que ambas proteínas são cruciais para a manutenção de fibras tipo II (FREY et al., 2008; FREY; RICHARDSON; OLSON, 2000). Funcionalmente, camundongos deficientes de miozenina-1 e 2 apresentam uma superatividade da via calcineurina/NFAT em seus músculos (FREY et al., 2008; FREY; RICHARDSON; OLSON, 2000). Por analogia, como a remoção de MuRF1 e MuRF2 resultou em uma redução drástica de ambas miozeninas (Figura 5B e C - Apêndice B) podemos esperar que a via calcineurina/NFAT estará ativada.

Futuros estudos serão necessários para esclarecer porque miozenina-1 e miozenina-2 estão sendo reduzidas em animais dKO. Interessantemente, MuRF1/2 interagem diretamente com miozenina-1 (Figura 4 - Apêndice B). Miozenina-1 e MuRF1/2 compartilham interações com proteínas da banda Z entre outras (FAULKNER et al., 2000; TAKADA et al., 2001; WITT et al., 2005). Portanto, parece plausível que miozenina-1 e MuRFs constituem um complexo proteico com função de sinalização, como por exemplo regular a via calcineurina/NFAT (FREY; RICHARDSON; OLSON, 2000). O fato de não encontrarmos interação entre MuRFs e miozenina-2 sugere que existam outras proteínas intermediárias nessa relação. Considerando esse contexto, MuRF1 e MuRF2 estariam "upstream" à miozeninas na via de sinalização, e potencialmente regulam o balanço relativo entre fibras glicolíticas (tipo II) e oxidativas (fibras tipo I). Ao nível proteico, esta relação permanece sem ser esclarecida já que a redução da expressão de miozeninas em animais dKO não é suportada pela multi-ubiquitinação destas proteínas por MuRF1 ou MuRF2. Uma possibilidade é a ligação de MuRF1/2 à miozenina-1 para seu acoplamento à banda Z, mediando a ubiquitinação de componentes desta via de sinalização intracelular (ver modelo na Figura 7 - Apêndice B), isto poderia ser alcançado por alterações específicas no arranjo do disco Z. Detectamos um padrão estriado na imunomarcação usando o anticorpo para mono-ubiquitina, o que reforça a ideia de que proteínas sarcoméricas são alvo de

E3 ligases. Por outro lado, quando o anticorpo para multi-ubiquitina foi utilizado, detectamos apenas uma marcação difusa no citoplasma. Combinados, nossos resultados de imunofluorescência sugerem que proteínas sarcoméricas são preferencialmente mono-ubiquitinadas, o que pode indicar finas regulações na atividade dessas proteínas (Fig 6 - Apêndice B).

Futuros estudos se mostram necessários para entender se as alterações que o complexo MuRF1/miozenina-1 possa realizar no disco Z alteram a atividade do complexo miozenina-1/calcineurina. Os dois conceitos: de que MuRF1 atua em condições patofisiológicas como um causador de atrofia em fibras do tipo II, mas ao mesmo tempo possui importância crucial na determinação dessas fibras, não são mutualmente exclusivos. Uma possibilidade, seria que em estados basais, a função de MuRF1 nas fibras tipo II seria regular a hipertrofia, e proteger estas fibras durante estresses metabólicos, por exemplo. Este modelo ajuda a explicar porque níveis elevados de MuRF1 em animais transgênicos para esta proteína, não desenvolvem sarcopenia de fibras tipo II em situações fisiológicas. Sob condições de desuso, os camundongos MuRF1 nocautes então, apresentariam a determinação das fibras tipo II diminuída e a CSA dessas fibras protegidas da redução induzida pelo quadro atrofico. Durante o desuso essas fibras "protegidas" perdem sua especificidade para o tipo II e são classificadas como intermediárias (Figura 3D - Apêndice B). Por fim, estudos futuros são necessários para esclarecer a função de MuRF1 sob condições de estresse, porém considerando esta proteína não apenas como um atrogene.

CAPÍTULO 3 – PAPEL DE MURF1 E MURF2 NA REGENERAÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA

3.1 Introdução

A regeneração do músculo esquelético é um processo potente e altamente sincronizado que envolve a ativação de várias respostas celulares. Após a injúria, o reparo do músculo esquelético é inicialmente caracterizado pela necrose e rápida ativação da resposta inflamatória (TIDBALL, 2005). A fase inflamatória (tipicamente poucos dias) (SUDO; KANO, 2009), inclui a ativação de células satélites, as quais proliferam e consequentemente podem se fundir umas às outras para formar novas fibras, ou se fundem a fibras lesionadas doando seus núcleos. Na fase pós inflamatória, há um acúmulo proteico e a fibra muscular recupera seu tamanho e função (TIDBALL; VILLALTA, 2010). Apesar de outros tipos celulares recentemente serem associados com a regeneração (DUGUEZ et al., 2003; PAYLOR et al., 2011), mas são as células satélites que possuem papel crucial no reparo do músculo esquelético (SAMBASIVAN et al., 2011).

As bases moleculares da regeneração do músculo esquelético permanecem pouco claras, apesar de diversos estudos identificarem vários reguladores, incluindo proteínas do choque térmico (CONTE et al., 2008; MIYABARA et al., 2006), MGF/mIGF I (MUSARO, 2005; PELOSI et al., 2007), SRF (CHARVET et al., 2006; LATASA et al., 2007), FGF6 (ARMAND et al., 2004; ARMAND et al., 2005), calcineurina (MIYABARA; AOKI; MORISCOT, 2005; MIYABARA et al., 2005a) entre outros. Interessantemente, a maioria desses fatores compartilham a propriedade de estimular respostas anabólicas. Por outro lado, pouca atenção tem sido dada à função de vias catabólicas no processo de regeneração do músculo esquelético. Na verdade, existe uma perda severa do conteúdo proteico durante a fase inflamatória da regeneração, sugerindo que a proteólise pode ter uma função nesse processo. O sistema de proteólise proteassomal, nesse caso, é um bom candidato, já que este sistema é crucial para a perda proteica em outras condições, por exemplo durante a atrofia. Os poucos estudos que tem acessado a expressão de genes envolvidos em vias proteolíticas na regeneração do músculo esquelético, mostraram que estes genes são modulados (ARMAND et al., 2003; MIYABARA et al., 2005a). Entretanto, permanece para ser investigado se a proteólise durante o reparo muscular

é uma consequência indesejável, ou se possui função crucial. Neste estudo hipotetizamos que as E3 ligases MuRF1 e MuRF2 estão envolvidas na resposta regenerativa do músculo esquelético.

Nesta estudo comparamos animais selvagens (WT), MuRF1 e MuRF2 nocautes (MuRF1 e MuRF2 KO) e animais duplamente nocauteados para MuRF1 e MuRF2 (MuRF1/2 dKO) após 1, 3, 10 e 28 dias da injeção de cardiotoxina no músculo tibial anterior. As expressões proteicas de MuRF1 e MuRF2 foram fortemente moduladas no músculo tibial anterior em regeneração de animais WT, e interessante a regeneração de animais duplamente nocauteados (MuRF1/2 dKO) mostrou-se bastante deficitária, envolvendo prejuízo de células-satélites. Estes resultados mostram que há um papel de cooperação de MuRF1 e MuRF2 na resposta regenerativa do tecido muscular esquelético.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Animais e tratamentos

Camundongos machos C57/Bl6 (8 semanas de idade, 30g±3g) foram mantidos em caixas plásticas em salas próprias para manutenção de animais, com condições ambientais controladas, com ração e água *ad libitum*. Animais nocaute para MuRF1 e MuRF2 foram feitos como previamente descrito (WITT et al., 2008; WITT et al., 2005). Os camundongos MuRF1/2 dKO foram obtidos através do cruzamento de animais heterozigotos para evitar qualquer seleção de genes modificados.

O músculo tibial anterior (TA) de animais WT, MuRF1 KO, MuRF2 KO e MuRF2 dKO foi injetado intramuscularmente com cardiotoxina (4 injeções de 6µl com concentração de 10 µM em salina). Para a realização das injeções, os animais foram anestesiados e o músculo exposto cirurgicamente. Após os músculos serem injetados, os acessos foram fechados e os animais mantidos em placas aquecidas (37°) por algumas horas para evitar hipotermia. A injeção foi realizada sempre na pata posterior esquerda, sendo a contralateral utilizada com o controle. Os animais foram divididos em 12 grupos: 4 grupos de animais WT e MuRF1/2 dKO foram injetados e analisados após 1, 3, 10 e 28 dias (n=5 em cada grupo). Os camundongos MuRF1 e MuRF2 KO foram injetados e analisados após 3 e 10 dias (n=5 cada) após a lesão.

3.2.2 Histologia

Os camundongos foram mortos por deslocamento cervical e o músculo TA imediatamente retirado, pesado e metade de cada músculo foi imediatamente congelada em isopentano gelado e estocados em nitrogênio líquido. As amostras de músculo foram cortadas em criostato (Leica, Alemanha), gerando cortes de 10µm de espessura. A coloração com hematoxilina-eosina foi realizada para analisar as características morfológicas gerais. A outra metade do músculo TA foi congelada para realização de imunoblotes.

As fibras musculares necrosadas foram detectadas pela técnica histoquímica de detecção da atividade da fosfatase ácida lisossomal (método de Gomori) seguindo Bancroft e colaboradores (BANCROFT, 1996). Esta coloração histológica permitiu quantificar o nível de injúria, através da quantificação de fibras necrosadas por mm² (N.F./mm²).

3.2.3 Análise quantitativa e morfométrica das colorações histológicas

A quantificação e análise morfométrica foram realizadas através de uma câmera acoplada ao microscópio, como descrito anteriormente na seção 2.2.4.

O número de miofibras necrosadas do músculo TA foi expressa como porcentagem média de 1000 fibras contadas (total de 3000). A área de secção do músculo TA de três animais diferentes foram analisadas por grupo.

3.2.4 Anticorpos utilizados para imunofluorescência e Western blot

Os anticorpos primários utilizados para imunofluorescência foram: (1) MuRF1 e (2) MuRF2 (HIRNER et al., 2008; WITT et al., 2008), (3) Ki67 (Cat#VPRM04, Vector Labs, Burlingame, CA, Estados Unidos); (4) NCAM (Cat# sc-10735, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, Estados Unidos); (5) Laminin (Cat#L9393, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos); (6) MHCn (Cat# sc-53097); (7) MyoD (Cat#IMG132, Imgenex); (8) Pax7 (Cat# NBP1-40767, Novus Biologicals, Littleton, CO, Estados Unidos); (9) β-Catenin (Cat# 18-272-196288, Genway, San Diego, CA, Estados Unidos).

Os anticorpos secundários utilizados para imunofluorescência foram: (1) Cy3 Donkey anti-Chicken (1:100, Jackson Labs, West Grove, PA, Estados Unidos); (2) Cy3 Goat anti-Rabbit

(1:100, Jackson Labs, West Grove, PA, Estados Unidos); (3) Cy2 Donkey anti-Rabbit (1:50, Jackson Labs, West Grove, PA, Estados Unidos);

Os anticorpos primários para Western blot foram: (1) MuRF1 e (2) MuRF2 (HIRNER et al., 2008; WITT et al., 2008); (2) Atrogin/Mafbx-1 (Cat#AP2041, ECM Biosciences, Versailles, KY, Estados Unidos); (3) TRIM32 (Cat#sc-99011, Santa Cruz, , Santa Cruz, CA, Estados Unidos); (4) Myf-5 (Cat#sc-302, Santa Cruz, , Santa Cruz, CA, Estados Unidos); (5) Myogenin (Cat#AB1835, ABCAM, Cambridge, MA, Estados Unidos).

Os anticorpos secundários para Western blot foram: (1) Donkey anti-Chicken (Jackson Labs, West Grove, PA, Estados Unidos); (2) Goat anti-Rabbit (Jackson Labs, West Grove, PA, Estados Unidos); (3) Goat anti-Mouse (Jackson Labs, West Grove, PA, Estados Unidos).

3.2.4 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência utilizada nesse estudo foi idêntica à descrita na seção 2.2.3 do Capítulo 2.

3.2.5 Western blot

A técnica de Western blot utilizada nesse estudo foi idêntica à descrita na seção 2.2.5 do Capítulo 2.

3.2.6 Detecção de apoptose

A apoptose foi detectada através da marcação pela técnica de TUNEL ("deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling"), usando um kit (Roche Molecular Biochemicals, Alemanha). As lâminas foram montadas usando Vectashield (Dako, Dinarmaca), meio de montagem para fluorescência com 40,6-diamididino-2-phenylindole (DAPI) (cat #H-1200, Vector Labs, Burlingame, CA, Estados Unidos) e lamínulas. As lâminas prontas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss, Munique, Alemanha).

3.3 Resultados

Nosso primeiro objetivo foi investigar a expressão proteica de MuRF1 e MuRF2 no músculo TA durante a regeneração. Para níveis de comparação realizamos as medidas de expressão de outras E3 ligases, como Mafbx/Atrogin-1 e TRIM32 (Figura 1a -Apêndice C). A expressão proteica de MuRF1 e MuRF2 foi fortemente elevada após a injúria, especialmente MuRF1, o qual detectamos elevações já após 3 dias. Em contraste, Mafbx/Atrogin-1 teve sua expressão proteica reduzida após a injúria; TRIM32 apresentou sua expressão levemente elevada (Figura 1a -Apêndice C). Pelas análises de imunofluorescência, observamos que sob condições basais MuRF1 apresentou um padrão pontual no citoplasma das miofibras (sustenido na Figura 1b - Apêndice B). Três dias após a injúria, a imunodectecção de MuRF1 parece positiva em células proliferantes e/ou células satélites (setas na Figura 1c - Apêndice C). Dez dias após a injúria a distribuição de MuRF1 parece retornar aos padrões puntiformes da situação controle (sustenido na Figura 1d -Apêndice C). A imunomarcacão para MuRF2 por outro lado, possui um padrão de de expressão periférico nas miofibras em condições controle (cabeças de setas em Figura 1e). Após três dias da injúria, pequenas células foram marcadas positivamente para MuRF2 (setas em Figura 1f). Após dez dias, a marcação periférica de MuRF2 retorna acompanhada de marcação citoplasmática puntiforme (cabeças de setas e sustenido na Figura 1g). Para caracterizar e confirmar a identidade destas pequenas células, utilizamos dupla marcação de MuRF1 e MuRF2 com MyoD (um marcador de células-satélites) três dias após a injúria. Notamos claramente que as células-satélites expressam MuRF1 (Figura 1h-k - Anexo3) e MuRF2 (Figura 1l-o - Apêndice C). Após essa caracterização inicial, exploramos a função de MuRFs na regeneração através da utilização de animais nocautes para esses genes.

A histologia de secções transversais de músculo TA após 3 e 10 dias da injúria com cardiotoxina foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio. Após 3 dias, a injeção de cardiotoxina induziu danos significativos no músculo tibial anterior de animais selvagens, como observamos pela presença de fibras hipercontraídas, células inflamatórias e áreas claras deixadas por miofibras rompidas, o que indica mionecrose, ruptura do tecido e edema (Figura 2a - Apêndice C). Neste período de análise, animais MuRF1 KO e MuRF2 KO apresentaram sinais semelhantes aos animais WT. Curiosamente, o músculo de animais MuRF1/2 dKO apresentaram mais áreas claras e menos fibras, apesar de fibras com núcleo centralizados estarem presentes (Figura 2d -Apêndice C). Após dez dias da injúria, os músculos em

regeneração de animais MuRF1 KO e MuRF2 KO apresentaram arquitetura similar aos músculos de animais WT, ou seja, grande quantidade de miofibras com núcleos centralizados e ausência de áreas sem fibras (Figura 1e-g - Apêndice C). As análises histológicas 10 dias após a lesão mostraram um sério déficit na estrutura tecidual de animais MuRF1/2 dKO (Figura 2h - Apêndice C). Mesmo após 28 dias da lesão (considerado um longo período para o processo regenerativo em animais) o músculo de animais MuRF1/2 dKO ainda apresentavam uma estrutura tecidual debilitada (Figura 2i e j - Apêndice C). Estruturas semelhantes à adipócitos no entorno das miofibras foram notadas frequentemente. Apesar destas observações, não está claro se a ausência de MuRF1/2 causa um déficit na regeneração, ou faz estes músculos mais susceptíveis à injúria. Para responder a essa questão, as reações de fosfatase ácida foram realizadas 1 dia após a injúria. Não ocorreram alterações significativas quando comparamos os músculos de animais MuRF1/2 dKO e WT (Figura 2k - Apêndice C). Uma vez que o músculo de animais MuRF1 KO e MuRF2 KO não apresentaram déficits significativos em sua análise histológica, decidimos focar nossos estudos em animais MuRF1/2 dKO.

A seguir realizamos o estudo de marcadores moleculares tanto na fase inflamatória (3 dias após injúria) quanto na fase pós-inflamatória (10 dias após a injúria). Como esperado, na fase inflamatória, Ki67 (um marcador de proliferação celular), foi altamente expresso em pequenas células do músculo em regeneração de animais WT, em sua maioria células satélites (Figura 3a - Apêndice C). Neste período, NCAM ("Neural Cell Adhesion Molecule") também foi altamente expressa no músculo de animais WT em regeneração após 3 dias da lesão, identificando células-satélites em diferenciação (Figura 3a - Apêndice C). No terceiro dia após a injúria, MuRF1/2 dKO apresentaram uma redução dramática em células positivas para Ki67 ou NCAM (Figura 3b - Apêndice C). Além disso, como esperado, após 10 dias de regeneração, MHCn ("Myosin Heavy Chain neonatal") foi altamente expressa em animais WT (Figura 3c - Apêndice C), enquanto animais MuRF1/2 dKO apresentaram uma redução drástica na marcação para esta proteína (Figura 3d Apêndice C).

Para avaliar a atividade de células-satélites em animais MuRF1/2 dKO após a injúria, examinamos por imunofluorescência a expressão de MyoD e Pax7. Em músculos em regeneração de animais WT, como esperado, notamos uma co-localização de MyoD e Pax7 (Figura 4a e b - Apêndice C). Por outro lado, em animais MuRF1/2 dKO não notamos qualquer co-marcação entre MyoD e Pax7 (Figura 4c e d -Apêndice C). No décimo dia pós-lesão poucas células-

satélites marcadas com MyoD e Pax7 foram identificadas em animais WT (Figura 4e e f - Apêndice C). Curiosamente, animais MuRF1/2 dKO apresentaram uma forte marcação para estas proteínas, porém, neste caso, as células-satélites parecem estar organizadas em grupos, provavelmente na tentativa de formar um miotubo (Figura 4g e h - Apêndice C).

Uma vez que MyoD tem sua ativação controlada por β -catenina, decidimos acessar por imunofluorescência a localização desta proteína em tecidos na fase regenerativa. Como esperado, β -catenina apresentou-se aumentada em células-satélites de animais WT decorridos 3 dias pós-lesão (Figura 5b e g-j - Apêndice C). Adequadamente, após 10 dias, β -catenina retorna aos níveis normais (Figura 5c - Apêndice C). Em contraste, após 3 dias da lesão, animais MuRF1/2 dKO não apresentaram expressão de β -catenina em células satélites (Figura 5e e k-n - Apêndice C). Após 10 dias β -catenina foi encontrada no músculo dos animais MuRF1/2 dKO (Figura 5f - Apêndice C).

Nós também avaliamos outros fatores miogênicos e proteínas envolvidas na ativação de células-satélites por Western blot. Enquanto a expressão de Myf-5 foi severamente reduzida em animais MuRF1/2 dKO quando comparados à animais WT (Figura 6a - Apêndice C), o aumento na expressão de Myogenina não foi alterado em animais MuRF1/2 dKO. Interessantemente, dois fatores envolvidos na diferenciação de células-satélites FHL2 e MARP2, tiveram sua expressão reduzida em animais MuRF1/2 dKO durante a regeneração quando comparados aos animais WT (Figura 6a -Apêndice C). Uma vez que o número de células-satélites é resultado da proliferação e também morte celular, decidimos avaliar os níveis de apoptose em animais WT e MuRF1/2 dKO durante a regeneração. A porcentagem de núcleos marcados para apoptose foi significativamente elevada em animais MuRF1/2 dKO quando comparado ao grupo WT (Figura 6b-f - Apêndice C).

3.4 Discussão

Neste estudo nós mostramos que as E3 ligases MuRF1 e MuRF2 foram altamente induzidas durante a regeneração do músculo esquelético e redudentemente necessárias para o reparo do tecido. A deleção de ambas MuRFs leva a um severo déficit na capacidade das células-satélites, o que envolve a inabilidade para ativar β -catenina, fatores miogênicos e aumentou a morte celular.

Nossos resultados claramente mostram que a deleção simultânea de MuRF1 e MuRF2 levam a um dramático déficit regenerativo no músculo esquelético quando as preparações

histológicas foram observadas (Figura 2 -Apêndice C). Mesmo decorrido 10 dias da injúria, notamos sinais de células inflamatórias e espaços vazios entre as fibras remanescentes, características que normalmente notamos na fase aguda da regeneração. Este déficit pode ser notado mesmo após 28 dias da lesão, quando em animais WT a arquitetura está reparada, mas em animais MuRF1/2 dKO observamos áreas ocupadas por adipócitos brancos. Estes depósitos anormais de adipócitos tem sido descritos em alguns quadros de degeneração do músculo esquelético, como no caso de distrofias musculares (PASTORET; SEBILLE, 1995) e mais recentemente a deficiência de Pax7 tem sido associada a depósitos de gordura no músculo esquelético (LEPPER; PARTRIDGE; FAN, 2011). No caso deste estudo, acreditamos que estes adipócitos possam ser resultado de uma diferenciação deficitária de células-satélites. Consistente com esta ideia, observamos que células-satélites foram fortemente marcadas para MuRF1 e MuRF2, aumentando a possibilidade de que estas E3 ligases possam desenvolver algum papel na ativação e diferenciação destas células.

A perda de MuRF1 e MuRF2 tornou as células-satélites incapazes de proliferar e também de diferenciar, como avaliado por imunofluorescência para Ki67 e NCAM (Figura 3 – Apêndice C). Acreditamos que dois eventos possam estar ocorrendo: a regeneração estar completamente impedida; ou que esteja ocorrendo apenas um atraso no processo regenerativo. Primeiramente, observamos que após 28 dias da injúria em animais sem MuRF1 e MuRF2, haviam claros sinais de degeneração do músculo esquelético, como a presença de adipócitos, o que suporta a ideia de que a regeneração nestes animais foi ineficiente. Por outro lado, notamos neste mesmo período, grande quantidade de miofibras com núcleos centralizados (uma evidência de fibras regeneradas). Interessantemente, quando utilizamos outros marcadores de células-satélites (Pax7/MyoD) e analisamos 3 dias após a lesão (maior atividade destas células), encontramos em músculos de animais MuRF1/2 dKO ausência de expressão de Pax7 e MyoD, mas surpreendentemente a expressão estava presente 10 dias após a lesão. Este padrão “atrasado” é exatamente o oposto do esperado, o que confirmamos nos animais WT (Figura 4 – Apêndice C). Os conjuntos de células marcadas positivamente para Pax7 e MyoD 10 dias após a lesão em animais MuRF1/2 dKO parece ser uma tentativa de fusão para formação de miotubos. Desta forma, assumimos que as miofibras com núcleos centralizados observadas 28 dias após a lesão nada mais são do que parte destas células que foram bem sucedidas na fusão/doação de seus núcleos.

Para tentar entender os mecanismos moleculares envolvidos na perda de ativação de fatores miogênicos durante a regeneração em animais MuRF1/2 dKO, decidimos analisar uma importante proteína, β -catenina, a qual possui a capacidade de regular a expressão de MyoD. Interessantemente, a expressão dessa proteína foi severamente afetada em animais nocautes para MuRF1 e MuRF2. O aumento esperado de β -catenina em células-satélites foi completamente bloqueado no músculo dos animais MuRF1/2 dKO 3 dias após a injúria (Figura 5 – Apêndice C). Estes dados combinados, sugerem que β -catenina pode ser alvo de ubiquitinação de MuRFs, de maneira a estabilizar esta proteína. Alguns estudos recentes tem demonstrado que mono-ubiquitinação de proteínas pode estar envolvida na estabilização de proteínas (SUZUKI et al.). Outra possibilidade a ser considerada é a de que MuRFs possam poliubiquitinar e induzir a degradação de inibidores de β -catenina, como axina e GSK3 β .

Nossos dados mostraram um aumento nos níveis de apoptose em animais MuRF1/2 dKO durante a regeneração (Figura 6 - Apêndice C), deixando evidente que não apenas a proliferação está comprometida mas também a viabilidade das células-satélites. Este aumento na morte celular sugere que algumas células foram capazes de proliferar mas não foram capazes de acionar o programa miogênico de maneira adequada, ativando o programa de morte celular.

As principais observações neste estudo mostraram que MuRFs são altamente expressos em músculos durante a regeneração e que estas E3 ligases são essenciais para o reparo muscular, levantando a ideia de que o processo de intensa perda de proteínas, normalmente observada em quadros regenerativos do tecido muscular, é essencial para tal. MuRFs podem exercer um papel crucial de marcar proteínas para rápida degradação, deixando espaço para novas proteínas. Uma outra possibilidade inclui uma regulação fina de MuRFs no músculo em regeneração. Mais estudos são necessários para entendermos o destino de células-satélites na ausência de MuRF1 e MuRF2. No futuro experimentos envolvendo cultura primária de células-satélites adultas podem ajudar a entender a verdadeira necessidade de MuRF1 e MuRF2 para o processo de diferenciação destas células.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro estudo inserido nesta tese abordou o efeito da suplementação com o aminoácido essencial leucina sobre o processo atrófico induzido pelo desuso. Desde o início deste estudo, até atualmente, diversos trabalhos investigaram como este aminoácido é capaz de alterar os níveis de síntese proteica, porém a partir de 2008 (SUGAWARA et al., 2008, 2007) surgiram as primeiras evidências de que leucina poderia ter efeitos sobre vias proteolíticas. Como discutido acima no capítulo 1, o grande avanço deste estudo foi demonstrar que este aminoácido era capaz de atenuar a perda de massa muscular através da inibição da via ubiquitina-proteassoma no seu componente mais específico, as E3 ligases. Antes deste trabalho o paradigma central associava leucina com aumento de síntese proteica, associação essa que em nosso trabalho não se mostrou positiva. Na figura 4 do APÊNDICE A mostramos que em modelo de imobilização a suplementação com leucina não promoveu aumento da síntese proteica em músculo isolado. Cabe ressaltar que a associação de leucina ao aumento de síntese proteica foi estabelecida no músculo esquelético utilizando-se animais em privação alimentar e por curtos períodos de tempo (cerca de 30 minutos) (CROZIER et al., 2005). Essas discrepâncias nos modelos empregados explicam a diferença de resultados de nosso estudo que claramente sugerem que em um período de dias após imobilização, leucina não possui efeitos sobre síntese proteica, mas sim sobre a degradação. Do ano de sua publicação (2010) até o momento, nosso trabalho mostrado no APÊNDICE A, ganhou importância sendo referência para outros trabalhos que envolvem outros quadros atróficos (BORGENVIK; APRO; BLOMSTRAND, 2012; STOHS; DUDRICK, 2011) inclusive em seres humanos. Esta abordagem nutricional é de extremo interesse, por exemplo, para pacientes acamados. Este tipo de tratamento vem sendo estudado desde o final da década de 1990 através do uso de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, isoleucina e leucina), porém devido ao paradigma vigente, estes estudos foram voltados a explicar seus resultados através do aumento da síntese proteica (STEIN et al., 1999). Assim, nosso trabalho abriu a possibilidade de que os efeitos protetores observados pela suplementação de leucina possam ser preferencialmente explicados pela inibição de vias proteolíticas.

Uma nova abordagem tem investigado se metabólitos secundários de leucina, absorvidos pela fibra muscular como HMB (β -hidroxi- β -metilbutirato), possuem alguma função durante a atenuação da atrofia muscular esquelética. Em um estudo paralelo, analisamos os efeitos da

suplementação de HMB em comparação à suplementação com leucina durante atrofia induzida por dexametasona (um glicocorticoide) ou por imobilização. Nossos resultados mostraram que apenas leucina, e não HMB, foi capaz de atenuar a perda de massa muscular induzida pela imobilização, não apresentando o mesmo efeito quando a atrofia é causada por dexametasona. Estes dados sugerem que a sinalização intracelular nestes modelos de atrofia possa ter diferenças importantes, além disso, demonstram que os componentes do metabolismo de leucina provavelmente não estão envolvidos nos efeitos anti-atrófico de leucina. Apesar da crescente quantidade de estudos envolvendo a suplementação de leucina, ainda não está claro como este aminoácido é capaz de modular a expressão gênica de E3 ligases,

No segundo estudo desta tese demonstramos que MuRF1, uma E3 ligase, possui sua expressão preferencial em fibras do tipo II. Ainda mostramos que MuRF1 é um controlador chave da proteólise neste tipo de fibra em quadros atróficos. Além disso, mostramos que MuRF1 juntamente com MuRF2 (outra E3 ligase), são importantes mantenedores da identidade destas fibras. Este trabalho foi pioneiro em mostrar que E3 ligases poderiam exercer um papel crucial em outro aspecto da plasticidade muscular: o fenótipo das miofibras. Desde então, diversos autores têm levado em consideração esta especificidade de MuRF1 por fibras do tipo II (FILES et al., 2012; MORESI et al., 2010), já que este tipo de miofibras é caracteristicamente mais afetado por alguns quadros atróficos. Curiosamente, como discutido ao longo do capítulo 2, um dos mecanismos pelos quais MuRFs são capazes de prover identidade de fibras tipo II envolve a manutenção de proteínas denominadas calsarcinas, também conhecidas como miozeninas. Estas proteínas são potentes inibidores de calcineurina, uma proteína diretamente envolvida na identidade de fibras tipo I (FREY et al., 2008; FREY; RICHARDSON; OLSON, 2000). Concebendo esse cenário, a remoção de MuRFs causa uma forte diminuição da expressão de miozeninas, o que poderia levar a um aumento da atividade da via da calcineurina que por sua vez levaria a conversão de fibra tipo II para fibras tipo I. A partir destes dados, podemos assumir que ainda não compreendemos por completo todas as funções que E3 ligases desempenham na fibra muscular esquelética.

O terceiro estudo desta tese partiu do conceito de que ocorre uma perda proteica acentuada no início da regeneração do tecido muscular, o que levantava a hipótese de que E3 ligases pudessem exercer um papel nessa perda. Porém, como descrito e discutido no capítulo 3, a ausência de MuRF1 e MuRF2 nos levou novamente a ideia de que E3 ligases, ou o resultado de

suas ubiquitinações, são fundamentais para outros processos no tecido muscular e não simplesmente como fatores de degradação proteica. Apesar de ainda não publicados, os dados desse estudo são inovadores e apontam em uma nova direção: E3 ligases podem estar relacionadas à diferenciação miogênica. Alguns estudos já demonstraram, por exemplo, que MuRF1 pode ser encontrado no núcleo de cardiomiócitos, algo a princípio novo e curioso já que prioritariamente esta E3 ligase foi relacionada à banda M do sarcômero (MCELHINNY et al., 2002; MROSEK et al., 2007). O estudo a que se refere o capítulo 3 desta tese está sendo complementado por experimentos em nosso laboratório que vem demonstrando o translocamento de MuRF1 para o núcleo ao longo da diferenciação de células-satélites *in vitro*, além de apontar que tanto MuRF1 quanto MuRF2, são cruciais para a diferenciação destas células em cultura.

Assim, com estes 3 estudos pudemos não só identificar uma maneira de atenuar a expressão de E3 ligases durante um quadro clássico no qual são relevantes, como descrever duas novas situações onde a presença destas enzimas são cruciais para o tecido muscular esquelético.

REFERÊNCIAS*

- ANTHONY, J. C.; ANTHONY, T. G.; KIMBALL, S. R., et al. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.*, v. 131, n. 3, p. 856S-860S, 2001a.
- ANTHONY, T. G.; ANTHONY, J. C.; YOSHIZAWA, F., et al. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J. Nutr.*, v. 131, n. 4, p. 1171-1176, 2001b.
- AOKI, M. S.; LIMA, W. P.; MIYABARA, E. H., et al. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. *Clin. Nutr.*, v. 23, n. 5, p. 1176-83, 2004.
- ARMAND, A. S.; DELLA GASPERA, B.; LAUNAY, T., et al. Expression and neural control of follistatin versus myostatin genes during regeneration of mouse soleus. *Dev. Dyn.*, v. 227, n. 2, p. 256-265, 2003.
- ARMAND, A. S.; LECOLLE, S.; LAUNAY, T., et al. IGF-II is up-regulated and myofibres are hypertrophied in regenerating soleus of mice lacking FGF6. *Exp. Cell Res.*, v. 297, n. 1, p. 27-38, 2004.
- ARMAND, A. S.; PARISSET, C.; LAZIZ, I., et al. FGF6 regulates muscle differentiation through a calcineurin-dependent pathway in regenerating soleus of adult mice. *J. Cell Physiol.*, v. 204, n. 1, p. 297-308, 2005.
- AUGUSTO, V.; PADOVANI, C. R.; CAMPOS, G. E. R. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Braz. J. Morphological Sciences*, v. 21 (2), n., p. 89-94., 2004.
- BANCROFT, J. D. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Chapter 27. New York: Livingstone. 1996. 391 - 410 p.
- BIOLO, G.; FLEMING, R. Y.; MAGGI, S. P., et al. Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v. 268, n. 1 Pt 1, p. E75-84, 1995a.
- BIOLO, G.; MAGGI, S. P.; WILLIAMS, B. D., et al. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am. J. Physiol.*, v. 268, n. 3 Pt 1, p. E514-520, 1995b.
- BODINE, S. C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S., et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BORGENVIK, M.; APRO, W.; BLOMSTRAND, E. Intake of branched-chain amino acids influences the levels of MAFbx mRNA and MuRF-1 total protein in resting and exercising human muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.*, v. 302, n. 5, p. E510-521, 2012.

BROOKE, M. H. Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of Neurology*, v. 23, n. 4, p. 369-379, 1970.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.

CHARVET, C.; HOUBRON, C.; PARLAKIAN, A., et al. New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Mol. Cell Biol.*, v. 26, n. 17, p. 6664-6674, 2006.

CHHANGANI, D.; JANA, N. R.; MISHRA, A. Misfolded Proteins Recognition Strategies of E3 Ubiquitin Ligases and Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.*, v. DOI: 10.1007/s12035-012-8351-0, in press, p., 2012.

CLARKE, B. A.; DRUJAN, D.; WILLIS, M. S., et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.*, v. 6, n. 5, p. 376-385, 2007.

COHEN, S.; BRAULT, J. J.; GYGI, S. P., et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J. Cell Biol.*, v. 185, n. 6, p. 1083-1095, 2009.

CONTE, T. C.; FRANCO, D. V.; BAPTISTA, I. L., et al. Radicol improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice. *Toxicon*, v. 52, n. 1, p. 146-155, 2008.

CROS, N.; TKATCHENKO, A. V.; PISANI, D. F., et al. Analysis of altered gene expression in rat soleus muscle atrophied by disuse. *J. Cell Biochem.*, v. 83, n. 3, p. 508-519, 2001.

CROSAS, B.; HANNA, J.; KIRKPATRICK, D. S., et al. Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell*, v. 127, n. 7, p. 1401-1413, 2006.

CROZIER, S. J.; KIMBALL, S. R.; EMMERT, S. W., et al. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J. Nutr.*, v. 135, n. 3, p. 376-382, 2005.

DUGUEZ, S.; BIHAN, M. C.; GOUTTEFANGEAS, D., et al. Myogenic and nonmyogenic cells differentially express proteinases, Hsc/Hsp70, and BAG-1 during skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 285, n. 1, p. E206-215, 2003.

FAREED, M. U.; EVENSON, A. R.; WEI, W., et al. Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogen-1/MAFbx and MuRF1 expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 290, n. 6, p. R1589-1597, 2006.

FAULKNER, G.; PALLAVICINI, A.; COMELLI, A., et al. FATZ, a filamin-, actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 52, p. 41234-41242, 2000.

FAVIER, F. B.; BENOIT, H.; FREYSSINET, D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch.*, v. 456, n. 3, p. 587-600, 2008.

FILES, D. C.; D'ALESSIO, F. R.; JOHNSTON, L. F., et al. A critical role for muscle ring finger-1 in acute lung injury-associated skeletal muscle wasting. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 185, n. 8, p. 825-834, 2012.

FREY, N.; FRANK, D.; LIPPL, S., et al. Calsarcin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J. Clin. Invest.*, v. 118, n. 11, p. 3598-3608, 2008.

FREY, N.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 97, n. 26, p. 14632-14637, 2000.

GARLICK, P. J.; MILLWARD, D. J.; WATERLOW, J. C. Protein turnover in cardiac and skeletal muscle. *J. Physiol.*, v. 231, n. 2, p. 101P-102P, 1973.

GLASS, D. J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol. Med.*, v. 9, n. 8, p. 344-350, 2003.

GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T., et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 98, n. 25, p. 14440-5, 2001.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 67, n., p. 425-479, 1998.

HIRNER, S.; KROHNE, C.; SCHUSTER, A., et al. MuRF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies. *J. Mol. Biol.*, v. 379, n. 4, p. 666-677, 2008.

HOOD, D. A. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, v. 34, n. 3, p. 465-472, 2009.

KANDARIAN, S. C.; JACKMAN, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*, v. 33, n. 2, p. 155-165, 2006.

KEDAR, V.; MCDONOUGH, H.; ARYA, R., et al. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 101, n. 52, p. 18135-18140, 2004.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 83, n. 2, p. 500S-507S, 2006a.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.*, v. 136, n. 1 p. 227S-31S, 2006b.

LANG, C. H.; FROST, R. A.; VARY, T. C. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 293, n. 2, p. E453-459, 2007.

LATASA, M. U.; COUTON, D.; CHARVET, C., et al. Delayed liver regeneration in mice lacking liver serum response factor. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 292, n. 4, p. G996-G1001, 2007.

LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; GILBERT, A., et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J.*, v. 18, n. 1, p. 39-51, 2004.

LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; MITCH, W. E., et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.*, v. 129, n. 1S, p. 227S-237S, 1999.

LEE-YOUNG, R. S.; CANNY, B. J.; MYERS, D. E., et al. AMPK activation is fiber type specific in human skeletal muscle: effects of exercise and short-term exercise training. *J. Appl. Physiol.*, v. 107, n. 1, p. 283-289, 2009.

LEGGETT, D. S.; HANNA, J.; BORODOVSKY, A., et al. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol. Cell*, v. 10, n. 3, p. 495-507, 2002.

LEPPER, C.; PARTRIDGE, T. A.; FAN, C. M. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development*, v. 138, n. 17, p. 3639-3646, 2011.

LIEBER, R. L. *Skeletal muscle structure and function*. Los Angeles: Lippincott Williams & Wilkins, 1992

MCELHINNY, A. S.; KAKINUMA, K.; SORIMACHI, H., et al. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol.*, v. 157, n. 1, p. 125-136, 2002.

MEARINI, G.; GEDICKE, C.; SCHLOSSAREK, S., et al. Atrogin-1 and MuRF1 regulate cardiac MyBP-C levels via different mechanisms. *Cardiovasc. Res.*, v. 85, n. 2, p.357-366, 2009.

MIYABARA, E. H.; AOKI, M. S.; MORISCOT, A. S. Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 38, n. 4, p. 559-563, 2005.

MIYABARA, E. H.; AOKI, M. S.; SOARES, A. G., et al. Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. *Cell Tissue Res.*, v. 319, n. 3, p. 479-489, 2005a.

- MIYABARA, E. H.; AOKI, M. S.; SOARES, A. G., et al. Thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. *Cell Tissue Res.*, v. 321, n. 2, p. 233-241, 2005b.
- MIYABARA, E. H.; MARTIN, J. L.; GRIFFIN, T. M., et al. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 290, n. 4, p. C1128-38, 2006.
- MORESI, V.; WILLIAMS, A. H.; MEADOWS, E., et al. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell*, v. 143, n. 1, p. 35-45, 2010.
- MROSEK, M.; LABEIT, D.; WITT, S., et al. Molecular determinants for the recruitment of the ubiquitin-ligase MuRF-1 onto M-line titin. *Faseb J.*, v. 21, n. 7, p. 1383-1392, 2007.
- MUSARO, A. Growth factor enhancement of muscle regeneration: a central role of IGF-1. *Arch. Ital. Biol.*, v. 143, n. 3-4, p. 243-248, 2005.
- PASTORET, C.; SEBILLE, A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve*, v. 18, n. 10, p. 1147-1154, 1995.
- PATTISON, J. S.; FOLK, L. C.; MADSEN, R. W., et al. Selected Contribution: identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J. Appl. Physiol.*, v. 95, n. 5, p. 2171-2179, 2003.
- PAYLOR, B.; NATARAJAN, A.; ZHANG, R. H., et al. Nonmyogenic cells in skeletal muscle regeneration. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 96, n., p. 139-165, 2011.
- PELOSI, L.; GIACINTI, C.; NARDIS, C., et al. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *Faseb J.*, v. 21, n. 7, p. 1393-1402, 2007.
- PICKART, C. M.; EDDINS, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1695, n. 1-3, p. 55-72, 2004.
- POTTHOFF, M. J.; OLSON, E. N.; BASSEL-DUBY, R. Skeletal muscle remodeling. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v. 19, n. 6, p. 542-549, 2007.
- PUTMAN, C. T.; DIXON, W. T.; PEARCEY, J. A., et al. Chronic low-frequency stimulation upregulates uncoupling protein-3 in transforming rat fast-twitch skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 287, n. 6, p. R1419-1426, 2004.
- RILEY, D. A.; ELLIS, S.; SLOCUM, G. R., et al. In-flight and postflight changes in skeletal muscles of SLS-1 and SLS-2 spaceflown rats. *J. Appl. Physiol.*, v. 81, n. 1, p. 133-144, 1996.
- SACHECK, J. M.; HYATT, J. P.; RAFFAELLO, A., et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *Faseb J.*, v. 21, n. 1, p. 140-155, 2007.

- SAMBASIVAN, R.; YAO, R.; KISSENPFENNIG, A., et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*, v. 138, n. 17, p. 3647-3656, 2011.
- SNIJDERS, T.; VERDIJK, L. B.; VAN LOON, L. J. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Res. Rev.*, v. 8, n. 4, p. 328-338, 2009.
- SOARES, A. G.; AOKI, M. S.; MIYABARA, E. H., et al. Ubiquitin-ligase and deubiquitinating gene expression in stretched rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*, v. 36, n. 5, p. 685-693, 2007.
- STEIN, T. P.; SCHLUTER, M. D.; LESKIW, M. J., et al. Attenuation of the protein wasting associated with bed rest by branched-chain amino acids. *Nutrition*, v. 15, n. 9, p. 656-660, 1999.
- STIPANUK, M. H. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. *Nutr. Rev.*, v. 65, n. 3, p. 122-129, 2007.
- STOCKHOLM, D.; HERASSE, M.; MARCHAND, S., et al. Calpain 3 mRNA expression in mice after denervation and during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 280, n. 6, p. C1561-1569, 2001.
- STOHS, S. J.; DUDRICK, S. J. Nutritional supplements in the surgical patient. *Surg. Clin. North Am.*, v. 91, n. 4, p. 933-944, 2011.
- SUDO, M.; KANO, Y. Myofiber apoptosis occurs in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats. *J. Physiol. Sci.*, v. 59, n. 6, p. 405-412, 2009.
- SUGAWARA, T.; ITO, Y.; NISHIZAWA, N., et al. Supplementation with dietary leucine to a protein-deficient diet suppresses myofibrillar protein degradation in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, v. 53, n. 6, p. 552-525, 2007.
- SUGAWARA, T.; ITO, Y.; NISHIZAWA, N., et al. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids*, v. 34, n. 3, p. 609-616, 2008.
- SUZUKI, T.; KIM, M.; KOZUKA-HATA, H., et al. Monoubiquitination of Tob/BTG family proteins competes with degradation-targeting polyubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 409, n. 1, p. 70-74, 2011.
- TAKADA, F.; VANDER WOUDE, D. L.; TONG, H. Q., et al. Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 98, n. 4, p. 1595-1600, 2001.
- TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 288, n. 2, p. R345-353, 2005.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 298, n. 5, p. R1173-1187, 2010.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M.; PRICE, T. B. Immobilization effects in young and older adults. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 96, n. 5, p. 564-571, 2006.

VARY, T. C.; ANTHONY, J. C.; JEFFERSON, L. S., et al. Rapamycin blunts nutrient stimulation of eIF4G, but not PKCepsilon phosphorylation, in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 293, n. 1, p. E188-196, 2007.

WITT, C. C.; GERULL, B.; DAVIES, M. J., et al. Hypercontractile properties of cardiac muscle fibers in a knock-in mouse model of cardiac myosin-binding protein-C. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 7, p. 5353-5359, 2001.

WITT, C. C.; WITT, S. H.; LERCHE, S., et al. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *Embo J.*, v. 27, n. 2, p. 350-360, 2008.

WITT, S. H.; GRANZIER, H.; WITT, C. C., et al. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J. Mol. Biol.*, v. 350, n. 4, p. 713-722, 2005.

YAGISHITA, N.; ARATANI, S.; LEACH, C., et al. RING-finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.*, v. doi: 10.3892/ijmm.2012.1129, n. in print, p., 2012.

YOSHIZAWA, F.; KIMBALL, S. R.; VARY, T. C., et al. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.*, v. 275, n. 5, p. E814-820, 1998.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med. Hypotheses*, v. 69, n. 2, p. 310-321, 2007.

**APÊNDICE A - Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin
ligases**

LEUCINE ATTENUATES SKELETAL MUSCLE WASTING VIA INHIBITION OF UBIQUITIN LIGASES

IGOR L. BAPTISTA, PhD(Stud),¹ MARCELO L. LEAL, PhD(Stud),¹ GUILHERME G. ARTIOLI, PhD(Stud),¹ MARCELO S. AOKI, PhD,² JARLEI FIAMONCINI, PhD,³ ANTONIO O. TURRI,¹ RUI CURI, PhD,³ ELEN H. MIYABARA, PhD,⁴ and ANSELMO S. MORISCOT, PhD¹

¹ Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1524, Butantã, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil

² School of Arts, Sciences, and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

Accepted 5 October 2009

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the effect of leucine supplementation on elements of the ubiquitin–proteasome system (UPS) in rat skeletal muscle during immobilization. This effect was evaluated by submitting the animals to a leucine supplementation protocol during hindlimb immobilization, after which different parameters were determined, including: muscle mass; cross-sectional area (CSA); gene expression of E3 ligases/deubiquitinating enzymes; content of ubiquitinated proteins; and rate of protein synthesis. Our results show that leucine supplementation attenuates soleus muscle mass loss driven by immobilization. In addition, the marked decrease in the CSA in soleus muscle type I fibers, but not type II fibers, induced by immobilization was minimized by leucine feeding. Interestingly, leucine supplementation severely minimized the early transient increase in E3 ligase [muscle ring finger 1 (MuRF1)] and muscle atrophy F-box (MAFbx/atrogin-1) gene expression observed during immobilization. The reduced peak of E3 ligase gene expression was paralleled by a decreased content of ubiquitinated proteins during leucine feeding. The protein synthesis rate decreased by immobilization and was not affected by leucine supplementation. Our results strongly suggest that leucine supplementation attenuates muscle wasting induced by immobilization via minimizing gene expression of E3 ligases, which consequently could downregulate UPS-driven protein degradation. It is notable that leucine supplementation does not restore decreased protein synthesis driven by immobilization.

Muscle Nerve 41: 800–808, 2010

Prolonged periods of skeletal muscle inactivity due to bed rest, denervation, hindlimb unloading, microgravity, or immobilization can result in considerable muscle wasting. The well-known functional and morphological consequences of muscle inactivity include decreased muscle fiber cross-sectional area (CSA) and protein content, reduced force and power output, increased fatigability, and increased insulin resistance.^{1,2} However, the molec-

ular mechanisms responsible for muscle wasting induced by disuse are still poorly understood.^{3–5}

Much attention has been given to intracellular pathways associated with muscle mass control such as Akt–mammalian target of rapamycin (Akt–mTOR), myostatin, and the ubiquitin–proteasome system (UPS).^{5–8} Evidence suggests that the enhancement of proteolysis in atrophying muscles results mainly from a general activation of the UPS protein degradation.^{4,9,10} In various types of atrophy, including Cushing's syndrome,¹¹ diabetes,¹² sepsis,¹³ cancer cachexia,¹⁴ and renal failure,¹⁵ muscles exhibit a common series of adaptations, including increased content of ubiquitin (Ub)–protein conjugates¹⁶ and mRNA encoding Ub,¹⁷ certain ubiquitination enzymes,¹² and multiple proteasome subunits.^{15,18}

The UPS is an adenosine triphosphate (ATP)–requiring multienzyme process that mediates protein degradation by the proteasome. Briefly, prior to degradation, a target protein undergoes a three-step process which covalently links a polyubiquitin chain to the substrate. Three enzyme components are involved in this process, E1 (Ub-activating enzyme), E2 (Ub-conjugating enzymes), and E3 (ubiquitin protein ligase), which present substrate recognition sites.^{19,20} The ubiquitinated substrate can then be recognized and degraded by the proteasome. In atrophy models, the genes atrogin-1, also called muscle atrophy F-box (MAFbx), and muscle ring finger 1 (MuRF1), encoding E3 ubiquitin ligases, are upregulated.^{9,21} In addition, UPS activity is also influenced by a family of enzymes known as deubiquitinating enzymes (DUBs).²² These enzymes can destabilize the covalent bond formed between polyubiquitin chain and substrate.²² The role of DUBs in skeletal muscle plasticity is elusive; to date, only one study has determined gene expression of DUBs during longitudinal skeletal muscle growth.²³

In addition to mechanical stimuli, certain essential amino acids (leucine in particular) also modulate protein turnover in skeletal muscle.^{24,25} It is well known that leucine, per se, can promote

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; ATP, adenosine triphosphate; BSA, bovine serum albumin; CSA, cross-sectional area; CSA/BM, cross-sectional area/body mass; Ct, cycle threshold; dNTP, deoxynucleotide phosphate; DTT, dithiothreitol; DUB, deubiquitinating enzyme; ECL, electrochemiluminescence; EDTA, ethylene-diamine tetraacetic acid; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid; Im, immobilized; KHB, Krebs–Henseleit buffer; Leu, leucine; MAFbx, muscle atrophy F-box; MuRF1, muscle ring finger 1; PBS, phosphate-buffered saline; Rec, recovery; soleus M/BM, soleus mass/body mass; RT, reverse transcription; TCA, trichloroacetic acid; Ub, ubiquitin; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; UPS, ubiquitin–proteasome system

Key words: atrophy; immobilization; leucine; soleus; ubiquitin–proteasome system

Correspondence to: A.S. Moriscot; e-mail: moriscot@usp.br

© 2010 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 15 January 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/mus.21578

an acute increase in protein synthesis; however, the effects upon degradation pathways are still poorly understood. It has been shown that protein degradation can be minimized by leucine supplementation, although the precise mechanisms remain to be elucidated.^{26–28} Recently, Sugawara et al.²⁸ showed that leucine feeding in a protein-deprivation model minimizes protein catabolism without affecting expression of atrogenes. They suggested that downregulation of lysosomal pathway activity, rather than UPS, is preferentially involved in the protective effect of a leucine-enriched diet.²⁸ Although protein deprivation efficiently activates muscle mass degradation pathways, this experimental model is not designed for investigating the localized effects of disuse on muscle mass.

This study was conducted to gain further insight into the effect of leucine supplementation on UPS protein degradation in rat skeletal muscle during immobilization. We hypothesized that leucine feeding might attenuate protein degradation induced by disuse through downregulation of UPS.

METHODS

The protocols used in this study are in agreement with the ethical principles in animal research followed by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Institute of Biomedical Sciences/University of São Paulo, Ethics Committee for Animal Research (No. 168/05).

Animals and Leucine Supplementation. Male Wistar rats ($n = 70$, $n = 5$ per group), ~2 months old and weighing 260 ± 30 g, were housed in standard plastic cages in an animal room with controlled environmental conditions and maintained on standard food and water ad libitum.

Leucine (L-leucine; Ajinomoto, Tokyo, Japan) was administered orally (via gavage) once a day at a dose of 2.7 g/kg body mass per day (modified from Kimball and Jefferson²⁹), starting 3 days prior to immobilization. A control group received saline only.

Immobilization Procedure. Unilateral hindlimb immobilization was performed on the left hindlimb by applying a cast with total plantar extension. The knee was kept in total extension, as previously reported.³⁰

Four groups of animals were immobilized and analyzed, at 1, 2, 3, and 7 days after immobilization (Im 1d, 2d, 3d, 7d). Another four groups received leucine supplementation starting 3 days prior to immobilization, which was maintained up to the end of the experiment (1, 2, 3, and 7 days after immobilization: Im 1d + Leu, Im 2d + Leu, Im 3d + Leu, and Im 7d + Leu, respectively). To eval-

uate whether leucine interferes with regrowth of skeletal muscle after immobilization, we supplemented animals with leucine starting 3 days prior to immobilization for 7 days and subsequently released them from immobilization, allowing recovery for a further 7 days while maintaining supplementation during recovery (Rec 7d + Leu). As controls, we also immobilized animals for 7 days and subsequently allowed them to recover for 7 days (Rec 7d).

Tissue Samples. The soleus muscle was removed and weighed, and mass was normalized by body mass (soleus M/BM). Subsequently, these muscles were transversely cut in half: one segment was immersed in cold isopentane for 30 seconds, cooled in liquid nitrogen, and stored at -70°C for histochemistry; the other segment was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for RNA and protein expression analysis.

Histochemistry and CSA. The frozen muscles were cut into 10- μm cross-sections through the proximal-to-distal region using a cryostat (CM3050; Leica, Nussloch, Germany). Alternate serial cross-sections were obtained in the proximal and middle regions of both muscles incubated for myofibrillar ATPase activity after alkaline (ATPase, pH 10.3) or acid preincubation (ATPase, pH 4.3).^{31,32} After classification, the ratio between the CSA and body mass (CSA/BM) was obtained by measuring the CSAs of approximately 2000 muscle fibers (expressed as mean $\pm$ SD). The CSA was determined using a microscope (Eclipse E600; Nikon, Fukuoka, Japan) equipped with a digital video camera and imaging software (Metamorph; Universal Imaging Corp., Downingtown, Pennsylvania).

RNA Isolation. Muscle samples (25 mg) were homogenized with a polytron (Kinematica AG, Littau-Lucerne, Switzerland) homogenizer, and total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California), following the manufacturer's recommendations. These samples were dissolved in free ultrafiltered water, and their concentrations were determined by measuring the optical density at 260 nm with an Eppendorf spectrophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany). The purity of the RNA was determined by calculating the absorbance ratio at 260 nm and 280 nm, and RNA integrity was checked on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide.

Reverse Transcription Reaction. One microgram of total RNA was used in a reaction containing oligo-dT (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 10 mM of each deoxyribonucleoside phosphate (dNTP), 5 $\times$ first-strand buffer, 0.1 M dithiothreitol (DTT), and 200 U reverse transcriptase (SuperScript II; Invitrogen, San

Table 1. Primer sets.

	Forward	Reverse
Cyclophilin A	GCCGATGACGAGCCCTTG	TGCCGCCAGTGCCATTAT
MAFbx/atrogin-1	TACTAAGGAGCGCCATGGATACT	GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT
MuRF1	TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG	TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG
E3alpha	AGCACAGTGCAGCATTTCAGTT	TTGCACAATCCCTACAGGAATATGT
USP28	AAAGGCCAGTAATGGTGACATCA	GTCGTGACTGGGCTCCTTAAC
UBP45	CAGCATGCGTACCTCCTACACC	ACTCTTTGAATCTTGGCTTTGTTGA
UBP69	CCGGACACAGCCCATGAG	GTAGCGGGACGATTCTGTATAGC

Diego, California). The reverse transcription (RT) reaction was performed at 70°C for 10 min, followed by 42°C for 60 min and 10 min at 95°C.

Oligonucleotide Primers. Primer sets for rat MAFbx/atrogin-1, E3alpha, UBP45, UBP69, USP28, and cyclophilin A were designed using Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, California) software. Primer sequences for MuRF1 were taken from the study by Wray et al.³³ All primers were synthesized by IDT (Coralville, Iowa) (Table 1).

Quantitative Polymerase Chain Reaction. For each gene, a polymerase chain reaction (PCR) was performed in duplicate with a 25-μl reaction volume of 5–20 ng cDNA, 12.5 μl SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), and 50–200 nM of each primer. PCR analyses were carried out using the following cycle parameters: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. The fluorescence intensity was quantified, and amplification plots were analyzed by a sequence detector system (ABI Prism 7300; Applied Biosystems). Results were expressed using the comparative cycle threshold (Ct) method, as described in User Bulletin No. 2 from the manufacturer (Applied Biosystems). ΔCt values were calculated in every sample for each gene of interest as follows: $Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{reporter gene}}$, with cyclophilin A as the control gene. Relative changes in the expression level of one specific gene (ΔΔCt) were calculated by subtraction of the ΔCt from the control group (used as a calibrator) to the corresponding ΔCt from the treated groups. The values and ranges given in Figure 2 were determined as follows: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, with ΔΔCt and the control levels arbitrarily set to 1.

Western Blotting Analysis. The primary antibody used for Western blotting was rabbit polyclonal antibody against ubiquitin (1:1,500; Cat. No. A-100; BostonBiochem, Cambridge, Massachusetts). The secondary antibody used was peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (1:10,000; AffiniPure, Cat. No. 111-035-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania).

Soleus muscles were homogenized in an extraction solubilization buffer [50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.3 M sucrose, 0.5 mM DTT, 1 mM ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA, pH 8.0), 0.3 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 10 mM NaF, and phosphatase inhibitor cocktail (1:100; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri)] or radioimmunoprecipitation assay buffer [0.625% Nonidet P-40, 0.625% sodium deoxycholate, 6.25 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA (pH 7.4)] containing 10 μg/ml of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) to detect the expression of Ub-conjugating protein. Homogenates were centrifuged at 12,000 × g for 10 min at 4°C, and the supernatant was used. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, California), with bovine serum albumin as standard.

Equal amounts of protein (70 μg) were run on 15% sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P; Millipore Co., Bedford, Massachusetts). The membranes were stained with Ponceau S to confirm the protein amount and then rinsed with Tween Tris-buffered saline solution [0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), and 0.1% Tween-20]. All membranes were incubated with 0.1% Tween 20 in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at room temperature. Membranes were then incubated overnight with primary antibodies at 4°C. After a 45-min wash in Tween Tris-buffered saline solution, membranes were incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature and washed again for 45 min in Tween Tris-buffered saline solution. Labeled proteins were detected with the enhanced chemiluminescence system (ECL; Amersham, Buckinghamshire, UK). Quantification from the whole spectrum was determined using Image (Scion Corp., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) software.

Protein Synthesis Measurement. At 3 days post-immobilization (Im 3d and Im 3d + Leu) rats were deeply anesthetized, and soleus muscles were dissected, trimmed of extraneous muscles, fat, and connective tissue, and fixed with a metal clip to

FIGURE 1. (A) Soleus mass/body mass ratio during immobilization (days 1, 2, 3, and 7) and after recovery (day 14). **(B)** CSA [$(\mu\text{m}^2)/\text{g}$] after 7 days of immobilization and after recovery (day 14). Filled bars: type I fiber; open bars: type II fiber. Data expressed as mean $\pm$ SD. ^a $P < 0.05$ Im 7d or Rec 7d vs. control; ^b $P < 0.05$ Im 7d + Leu vs. Im 7d; ^d $P < 0.05$ Rec 7d + Leu vs. Rec 7d.

maintain the normal length. Based on the method of Weinstein et al.,³⁴ soleus muscles were longitudinally cut for improved diffusion and preincubated at 34°C for 3 hours in stoppered Erlenmeyer flasks containing 3 ml of oxygenated Krebs–Henseleit bicarbonate (KHB) buffer (pH 7.4) supplemented with 5 mM glucose, 5 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (HEPES) buffer, and 1% bovine serum albumin (BSA). Thereafter, muscles were incubated for 2 h in the same medium, supplemented with 0.5 mM phenylalanine and 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of [^{14}C] phenylalanine. At the end of the incubation period, muscles were blotted, frozen between aluminum blocks, cooled in liquid nitrogen, and weighed. Frozen muscles were homogenized in 500 μl of 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged for 10 min at $8000 \times g$. Pellets were washed with 1 ml of 10% TCA and then 1 ml of ethanol:ether (ratio 1:1). Dried pellets were solubilized in 500 μl of 1 M KOH solution. A scintillation cocktail (3 ml of Ecolume; ICN) was added to 200 μl of the solubilized pellet. Samples were analyzed for radioactivity in the ^{14}C channel (liquid scintillation counter). Net protein synthesis was expressed as millimoles of ^{14}C -phenylalanine incorporated per gram of muscle in a 2-h incubation period.

Insulin Levels. To clarify the potential acute effect of leucine supplementation on circulating insulin, insulin plasma levels were determined at 1 and 3 h after a single bout of leucine supplementation ($n = 5$ per group). Also, to determine the chronic effects of leucine supplementation, rats were supplemented with leucine for 5 days, and insulin plasma levels were determined at 1 and 3 hours after the last bout of leucine supplementation ($n = 5$ per group). The blood samples were centrifuged (2000 rpm, 10 min at 4°C), and the plasma was stored frozen at -20°C . Insulin plasma levels were determined by RIA, with porcine radiolabeled (^{125}I) (Sigma Co.).

Statistical Analysis. Multiple comparisons of mean values were performed using analysis of variance (ANOVA) and a post hoc Tukey's test to compare mean values when appropriate. For all comparisons, $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Soleus Mass and CSA. The immobilization protocol was effective in promoting soleus mass loss (day 7: $\sim 29\%$; $P < 0.05$) (Fig. 1A). Leucine supplementation attenuated soleus mass/BM ratio reduction driven by immobilization after 7 days ($P < 0.05$; Fig. 1A). In addition, the soleus M/BM ratio

FIGURE 2. Gene expression of MAFbx/atrogenin-1 (**A**), MuRF1 (**B**), E3alpha (**C**), USP28 (**D**), UBP45 (**E**), and UBP69 (**F**) during immobilization (days 1, 2, 3, and 7) and after recovery (day 14). Control is arbitrarily set to 1. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 5$ per group). ^a $P < 0.05$ Im vs. control; ^b $P < 0.05$ Im + Leu vs. Im; ^c $P < 0.05$ Im + Leu vs. control.

in the immobilized group was significantly lower compared with the immobilized leucine-supplemented group after 7 days of recovery ($P < 0.05$). Soleus fiber type composition was not significantly changed by immobilization (~65% fiber type I and ~35% fiber type II, data not shown).

As expected, immobilization for 7 days induced a considerable reduction in the CSA/BM ratio of fiber type I (~30%; $P < 0.05$) (Fig. 1B), but this reduction was blunted by leucine supplementation in this fiber type (Fig. 1B). Similarly, in fiber type II, immobilization induced a reduction in the CSA/BM ratio (day 7: ~27%; Fig. 1B). Interestingly, leucine supplementation did not prevent CSA/BM ratio loss induced by immobilization in fiber type II (day 7), but it was able to improve CSA/BM gain during the recovery period (Fig. 1B).

Gene Expression of E3 Ligases and DUBs. A robust increase in mRNA levels of MAFbx/atrogenin-1 was observed, peaking at 2–3 days (~280%; $P < 0.05$)

of immobilization and returning to basal levels at day 7 (Fig. 2A). Interestingly, leucine supplementation greatly reduced the peak of MAFbx/atrogenin-1 gene expression driven by immobilization (~100% at day 2; $P < 0.05$). During the recovery phase, gene expression of MAFbx/atrogenin-1 decreased in the immobilized and immobilized leucine-supplemented groups (~60% reduction). A very similar response was observed in gene expression of MuRF1 (Fig. 2B).

Immobilization for 7 days resulted in a 200% increase in gene expression of E3alpha that was not altered by leucine supplementation (~100% and 180%, respectively; Fig. 2C). During the recovery period, E3alpha mRNA levels returned to baseline level in both immobilized and immobilized leucine-supplemented groups (Fig. 2C).

On day 2, immobilization did not promote a significant increase in gene expression of USP28, but this expression significantly increased in the leucine-supplemented immobilized group (200%; Fig. 2D), and peaked on day 3 after the onset of

FIGURE 3. Representative Western blot of ubiquitin–protein conjugates in control, Im 3d, and Im + Leu 3d groups. Muscle samples are identified at the top. Mw, molecular weight. Quantification was normalized by Ponceau S.

immobilization, although this difference was not statistically significant due to large variability ($P = 0.087$). Subsequently, USP28 gene expression dropped to baseline level and remained unchanged during recovery in both immobilized and immobilized leucine-supplemented groups (Fig. 2D). Immobilization per se caused an increase in UBP45 gene expression (Fig. 2E) at day 3 and subsequently dropped to reach a sub-baseline level on day 7 (Fig. 2E). It remained downregulated during the recovery phase. Leucine supplementation tended to attenuate the increase in UBP45 gene expression driven by immobilization, although no statistically significant difference was observed (Im 3d vs. Im + Leu 3d: $P = 0.065$). In the recovery phase, UBP45 gene expression remained below the baseline level in the immobilized leucine-supplemented group (Fig. 2E). Immobilization promoted a significant decrease in UBP69 gene expression on day 7 and subsequently reached basal levels during the recovery phase (95% reduction; $P < 0.001$).

FIGURE 4. Protein synthesis measurements in control, Im 3d, and Im 3d + Leu groups ($n = 5$ per group). ^a $P < 0.05$ Im vs. control; ^b $P < 0.05$ Im + Leu vs. control.

This response was not altered by leucine supplementation (~65% reduction; $P < 0.01$) (Fig. 2F).

Polyubiquitinated Proteins. Immobilization for 3 days promoted an accumulation of ubiquitinated proteins (Fig. 3). Interestingly, leucine supplementation was able to reduce the total level of protein ubiquitination (Fig. 3).

Protein Synthesis and Insulin Levels. Protein synthesis rate was measured after 3 days of immobilization. A significant reduction in the synthesis rate was observed in immobilized animals (~35% reduction; $P < 0.05$ vs. control) (Fig. 4). Interestingly, leucine supplementation did not affect protein synthesis reduction driven by immobilization in this time-point (~35% reduction; $P < 0.05$ vs. control) (Fig. 4).

FIGURE 5. Plasma insulin level after leucine supplementation. Leucine did not alter insulin levels after 1 or 3 hours in acute groups (white bar and gray bar, respectively), or in chronic treatment (white lined bar: 1 hour after 5 days of leucine supplementation; gray lined bar: 3 hours after 5 days of leucine supplementation) ($n = 5$ per group).

In addition, leucine supplementation was not able to increase insulin plasma levels neither 1 and 3 hours after a single bout of leucine nor 1 and 3 hours after 5 days of leucine supplementation (Fig. 5).

DISCUSSION

In this study we aimed to gain further insight into the molecular mechanisms involved in the protective effect of leucine supplementation on muscle wasting during disuse. The main results of this study are: (a) leucine supplementation attenuates muscle mass loss and facilitates muscle mass recovery from immobilization, as type I fiber CSA decrease was attenuated in the leucine-supplemented group whereas type II fiber CSA loss induced by immobilization was not altered by leucine supplementation; (b) E3 ligase gene expression and polyubiquitinated protein content peak were severely attenuated in the leucine-supplemented group; and (c) a leucine-enriched diet did not affect protein synthesis after 3 days of immobilization.

The deleterious effect of immobilization on skeletal muscle is well established, and there is growing evidence regarding the molecular mechanisms involved in muscle wasting during disuse.⁵⁻⁸ Because disuse conditions affect a wide range of individuals, much attention has been given to developing strategies to minimize muscle mass loss in such conditions.^{5,8} Supplementation of certain amino acids has been shown to promote muscle protein synthesis and/or decrease muscle protein degradation.^{24,25,35}

In this study, muscle wasting induced by immobilization was suppressed by leucine supplementation. The leucine-supplemented animals showed greater muscle mass and CSA after the immobilization and recovery periods. Interestingly, only type I fibers were effectively protected against immobilization in leucine-supplemented animals, whereas type II fibers were not protected. It is currently unclear why leucine supplementation provides a type I fiber-specific protection against disuse. Possibilities include different fiber-type leucine uptake capacity and preferred metabolism of leucine by type I fibers.^{36,37}

In order to investigate the mechanisms associated with the effect of leucine on protein degradation, we determined the mRNA and protein levels associated with the UPS. Overall, E3 ligase gene expression showed an early transient increase in response to immobilization. Previous studies have also shown that severe catabolic conditions are associated with E3 ligase gene expression.^{4,9,10,38} Leucine supplementation severely minimized the increase in E3 ligase expression, suggesting that the anti-catabolic effect is associated with attenuation of atrogene expression. Apparently, the data presented herein are in contrast to those of Suga-

wara et al.,²⁸ who reported that leucine feeding did not attenuate MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 gene expression in a protein-deficient diet. Those investigators proposed that the lysosomal pathway is preferentially involved in the protective effects of a leucine-enriched diet. The reason for such discrepancies may be related to the time-points evaluated. In our study, we detected a transient increase in atrogene mRNA levels that peaked at 2-3 days and returned to basal levels up to 1 week after the onset of immobilization. Sugawara et al.²⁸ assessed atrogene expression only at day 7 after the onset of a protein-deficient diet regimen.

Recently, a family of proteins also involved in UPS activity was described: DUB proteins. Our results show that leucine feeding promoted an early increase in USP28 gene expression in the immobilized group, supporting the hypothesis that leucine supplementation promotes downregulation of UPS activity. However, leucine did not affect the expression of the other DUBs (UBP45 and UBP69) during immobilization. Considering the results of mRNA levels of E3 ligases and DUBs reported in this study, it seems that E3 ligases, but not DUBs, play a major role in the effects of immobilization. For instance, both MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 quickly and robustly respond to immobilization and have a diminished response to leucine treatment. On the other hand, DUB gene expression response to immobilization is complex, and leucine treatment does not cause major alterations in the profile of this response. It is worth mentioning that in at least one muscle overload condition E3 ligases and DUBs seem to work in coordination, as shown by Soares et al.²³ In that study, the investigators reported that the expression of all E3 ligase genes (atrogen, MuRF1, and E3 ligase) transiently decreased during longitudinal growth induced by stretching. Accordingly, in a similar time-frame, gene expression of all DUBs analyzed (USP28, UBP45, and UBP69) increased, apparently reflecting an adaptive mechanism, resulting in protein accumulation.²³

It is possible that different muscle-wasting models (e.g., protein deprivation and immobilization) activate different proteolytic pathways. Our data suggest that muscle wasting induced by immobilization is highly dependent on UPS activation by mechanisms still to be discovered. It is possible that leucine directly or indirectly downregulates transcription factors that modulate transcription of atrogenes, such as FOXO.

In this study we also determined the levels of protein ubiquitination. As expected, the content of ubiquitinated proteins in the soleus muscle rapidly increased after immobilization. These results might be explained by the early E3 ligase expression responses observed in the immobilized group. In

addition, leucine supplementation attenuated protein ubiquitination, which is in line with the fact that leucine severely minimized E3 ligase gene expression. Taken together, our results provide additional information to support the hypothesis that leucine feeding promotes downregulation of the UPS pathway.

The influence of supply of amino acids for feeding-induced increase in muscle protein synthesis has been demonstrated by previous studies reporting that the ingestion of a mixed meal stimulates skeletal muscle protein synthesis in food-deprived animals.^{39,40} One particular amino acid, leucine, appears to mediate most of the effects of protein/amino acid intake on protein metabolism. The stimulatory role of leucine on muscle protein metabolism became clear in the mid-1970s,^{24,25} but the mechanisms involved are still not fully elucidated. Leucine stimulates protein synthesis through protein translation activation by mTOR signaling.^{25,36,41,42} In this study, as expected, protein synthesis decreased after 3 days of immobilization. A positive effect of leucine feeding on protein synthesis after 3 days of immobilization was not observed. Accordingly, Sugawara et al.²⁷ reported no effect of leucine feeding on protein synthesis during protein deprivation. Our results reinforce the hypothesis that leucine's protective effect is mediated by reduction of ubiquitin ligase gene expression rather than the well-established stimulatory effect of leucine on protein synthesis.

In our study we measured plasma insulin after a single bout of leucine and after 5 days of leucine supplementation. The results clearly show that insulin levels are not significantly affected by leucine (Fig. 5), not even 5 days after leucine supplementation, which rules out the possibility that the muscle-sparing effects of leucine could occur due to an increase in plasma insulin.

In conclusion, our results show that leucine supplementation attenuates muscle wasting induced by immobilization. The protective effect of leucine supplementation is at least partially mediated by downregulation of UPS gene expression, rather than by stimulation of protein synthesis. Our data also suggest that leucine can be used as a therapeutic tool for individuals who are scheduled for long periods of immobilization after programmed surgery, such as joint reconstruction.

This work was supported by FAPESP grants (06/61523-7 and 07/57613-3). The authors thank Alex Tavares for technical assistance.

REFERENCES

1. Booth FW. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1982;52:1113–1118.
2. Booth FW, Gollnick PD. Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 1983;15:415–420.

3. St-Amand J, Okamura K, Matsumoto K, Shimizu S, Sogawa Y. Characterization of control and immobilized skeletal muscle: an overview from genetic engineering. *FASEB J* 2001;15:684–692.
4. Urso ML, Clarkson PM, Price TB. Immobilization effects in young and older adults. *Eur J Appl Physiol* 2006;96:564–571.
5. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses* 2007;69:310–321.
6. Favier FB, Benoit H, Freyssen D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflügers Arch* 2008;456:587–600.
7. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1974–1984.
8. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 2006;33:155–165.
9. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704–1708.
10. Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Booth FW. Selected contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J Appl Physiol* 2003;95:2171–2179.
11. Kayali AG, Young VR, Goodman MN. Sensitivity of myofibrillar proteins to glucocorticoid-induced muscle proteolysis. *Am J Physiol* 1987;252:E621–E626.
12. Lecker SH, Solomon V, Price SR, Kwon YT, Mitch WE, Goldberg AL. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *J Clin Invest* 1999;104:1411–1420.
13. Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M, et al. Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 1994;94:2255–2264.
14. Baracos VE, DeVivo C, Hoyle DH, Goldberg AL. Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am J Physiol* 1995;268:E996–E1006.
15. Price SR, Bailey JL, England BK. Necessary but not sufficient: the role of glucocorticoids in the acidosis-induced increase in levels of mRNAs encoding proteins of the ATP-dependent proteolytic pathway in rat muscle. *Miner Electrolyte Metab* 1996;22:72–75.
16. Wing SS, Haas AL, Goldberg AL. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem J* 1995;307:639–645.
17. Medina R, Wing SS, Goldberg AL. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem J* 1995;307:631–637.
18. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004;18:39–51.
19. Passmore LA, Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* 2004;379:513–525.
20. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:55–72.
21. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14440–14445.
22. Guterman A, Glickman MH. Deubiquitinating enzymes are IN/(trinitic to proteasome function). *Curr Protein Pept Sci* 2004;5:201–211.
23. Soares AG, Aoki MS, Miyabara EH, Deluca CV, Ono HY, Gomes MD, et al. Ubiquitin-ligase and deubiquitinating gene expression in stretched rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2007;36:685–693.
24. Stipanuk MH. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. *Nutr Rev* 2007;65:122–129.
25. Vary TC, Anthony JC, Jefferson LS, Kimball SR, Lynch CJ. Rapamycin blunts nutrient stimulation of eIF4G, but not PKCepsilon phosphorylation, in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E188–E196.
26. Nagasawa T, Kido T, Yoshizawa F, Ito Y, Nishizawa N. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. *J Nutr Biochem* 2002;13:121–127.
27. Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T. Supplementation with dietary leucine to a protein-deficient diet suppresses myofibrillar protein degradation in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2007;53:552–555.
28. Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids* 2009;37:609–616.
29. Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr* 2006;136(suppl):227S–231S.
30. Aoki MS, Lima WP, Miyabara EH, Gouveia CH, Moriscot AS. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. *Clin Nutr* 2004;23:1176–1183.
31. Ansd T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand* 1995;154:291–302.

32. Guth L, Samaha FJ. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 1969;25:138–152.
33. Wray CJ, Mammen JM, Hershko DD, Hasselgren PO. Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:698–705.
34. Weinstein RB, Tritschler HJ, Henriksen EJ. Antioxidant alpha-lipoic acid and protein turnover in insulin-resistant rat muscle. *Free Rad Biol Med* 2001;30:383–388.
35. Nobukuni T, Kozma SC, Thomas G. hVps34, an ancient player, enters a growing game: mTOR complex1/S6K1 signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:135–141.
36. Biolo G, Fleming RY, Maggi SP, Wolfe RR. Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995;268:E75–E84.
37. Biolo G, Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, Wolfe RR. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* 1995;268:E514–E520.
38. Cros N, Tkatchenko AV, Pisani DF, Leclerc L, Leger JJ, Marini JF, et al. Analysis of altered gene expression in rat soleus muscle atrophied by disuse. *J Cell Biochem* 2001;83:508–519.
39. Garlick PJ, Millward DJ, Waterlow JC. Protein turnover in cardiac and skeletal muscle. *J Physiol* 1973;231:101P–102P.
40. Yoshizawa F, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 1998;275:E814–E820.
41. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr* 2001;131(suppl):856S–860S.
42. Anthony TG, Anthony JC, Yoshizawa F, Kimball SR, Jefferson LS. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J Nutr* 2001;131:1171–1176.

APÊNDICE B - MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance

MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance

Anselmo S. Moriscot^{a,1}, Igor L. Baptista^{a,b,1}, Julius Bogomolovas^b, Christian Witt^b, Stephanie Hirner^b, Henk Granzier^c, Siegfried Labeit^{b,*}

^a Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Lineu Prestes Av., 1524, 05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil

^b Institute for Integrative Pathophysiology, Universitätsmedizin Mannheim, 68167 Mannheim, Germany

^c Department of Physiology, University of Arizona, Tucson, AZ 85724, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2009

Received in revised form 4 February 2010

Accepted 4 February 2010

Available online 10 February 2010

Keywords:

Muscle atrophy

MuRF1

Myozenin-1/calsarcin-2

Muscle fiber types

ABSTRACT

MuRF1 is a member of the RBCC (RING, B-box, coiled-coil) superfamily that has been proposed to act as an atrogen during muscle wasting. Here, we show that MuRF1 is preferentially induced in type-II muscle fibers after denervation. Fourteen days after denervation, MuRF1 protein was further elevated but remained preferentially expressed in type-II muscle fibers. Consistent with a fiber-type dependent function of MuRF1, the tibialis anterior muscle (rich in type-II muscle fibers) was considerably more protected in MuRF1-KO mice from muscle wasting when compared to soleus muscle with mixed fiber-types. We also determined fiber-type distributions in MuRF1/MuRF2 double-deficient KO (dKO) mice, because MuRF2 is a close homolog of MuRF1. MuRF1/MuRF2 dKO mice showed a profound loss of type-II fibers in soleus muscle. As a potential mechanism we identified the interaction of MuRF1/MuRF2 with myozenin-1, a calcineurin/NFAT regulator and a factor required for maintenance of type-II muscle fibers. MuRF1/MuRF2 dKO mice had lost myozenin-1 expression in tibialis anterior muscle, implicating MuRF1/MuRF2 as regulators of the calcineurin/NFAT pathway. In summary, our data suggest that expression of MuRF1 is required for remodeling of type-II fibers under pathophysiological stress states, whereas MuRF1 and MuRF2 together are required for maintenance of type-II fibers, possibly via the regulation of myozenin-1.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Skeletal muscles represent a tissue type that can be functionally remodeled in remarkable ways. For example, upon increasing load, as occurs during exercise, skeletal muscle respond with a large increase in fiber-diameter (hypertrophy); upon unloading, as occurs for example in bedridden patients, muscles rapidly reduce diameter (atrophy). The mechanisms for hypertrophy/atrophy include an up-regulation of the calcineurin-NFAT pathway (stimulated by the calcium influx into the sarcoplasm), activation of protein synthesis via the mTOR/p70S6 K pathway (caused by myofibrillar stretch), and activation of intracellular stress/strain-response signaling (including the p38/ERK/MEK kinase pathways), for review see (Potthoff et al., 2007). These adaptations to exercise include not only positive feedback regulation of fiber trophicity but also include metabolic adaptations, such as increase in mitochondrial content (Hood, 2009), and changes in fiber-type (Lee-Young et al., 2009).

For example, enhanced neuro-muscular activity as induced by chronic low-frequency stimulation, which is experimentally used to mimic exercise, evokes transitions in myofibrillar protein expression, ultimately leading to a conversion of fast into a slower skeletal muscle fiber type (Putman et al., 2004). Although the characterization of factors determining fiber-type specification are still ongoing, calcineurin, MEF2, CaMK and PGC-1 (Chin et al., 1998; Lin et al., 2002) have been identified as muscle fiber-type I promoting factors, whereas thyroid hormone acts as a type-II driving factor (Simonides and van Hardeveld, 2008). One recent factor emerging for the maintenance of fast fiber-types is myozenin-1 (also called calsarcin-2 or FATZ). Functionally, myozenin-1 belongs to the calsarcin protein family whose members inhibit the protein phosphatase calcineurin (Frey et al., 2008) which in turn activates the transcription factor NFAT by dephosphorylation. Among the calsarcin family, myozenin-1 has a specialized function for muscle fiber-type specification. Recent studies on the myozenin-1 gene-deficient mouse model demonstrated that normal expression of myozenin-1 is required for the maintenance of fast fibers (Frey et al., 2008). Consistent with having almost pure type-I muscle fiber skeletal muscles; myozenin-1 KO mice have a marked capacity for long distance running (Frey et al., 2008).

* Corresponding author. Fax: +49 621 3831971.

E-mail address: labeit@embl.de (S. Labeit).

¹ These authors contributed equally to this study.

The chronic loss of sarcomeres, particularly of type-II fibers with increasing age (Snijders et al., 2009) is receiving growing attention because of its clinical importance. During chronic muscle wasting, loss of sarcomeres is accompanied by numerous alterations in the proteome, metabolome and transcriptome, including down-regulation of mitochondrial metabolism, and of muscle specific genes. Genome-wide comparisons of healthy and wasting muscle tissues identified a specific set of genes that become up-regulated during diverse states of muscle wasting (Lecker et al., 1999, 2004). These transcriptional changes are not merely a down-regulation of the exercise-stimulated genes and include genes that have been postulated to be causally linked to the development of muscle atrophy, the so-called atrogens (Lecker et al., 1999; Bodine et al., 2001). In particular, atrogin-1 (also known as MAFBx) and MuRF1 (muscle ring finger-1) might play key roles in the regulation of muscle remodeling (Bodine et al., 2001). While gastrocnemius mouse leg muscle loses as much as ~50% mass loss during 2 weeks after denervation, gastrocnemius muscles in knock-out mice deficient for atrogin-1 or for MuRF1 are significantly spared from mass loss (only 20% of control) (Bodine et al., 2001). In conclusion, these knock-out studies suggest that the upregulation of MafBx/atrogin-1 and MuRF1 in wild-type mice after denervation is required for the development of atrophy. MuRF1 has been implicated in amino acids metabolism control (Koyama et al., 2008) and might also be a target of certain amino acids such as leucine, since it has been shown that MuRF1 up regulation during skeletal muscle atrophy is minimized by leucine supplementation (Baptista et al., 2010). MuRF1 might also be an important player in skeletal muscle longitudinal growth (Soares et al., 2007).

A direct mechanistic link explaining why up-regulation of atrogin-1 and MuRF1 might trigger the degradation of muscle tissues during atrophy is that both proteins have ubiquitin ligase activities. Atrogin-1 and MuRF1 can potentially catalyze as E3 ubiquitin ligases the specific multi-ubiquitination of target protein, thereby initiating their proteasome-dependent degradation by the ubiquitin proteasome system (UPS) (Pickart and Eddins, 2004). Here, we focus on MuRF1 and MuRF2 (muscle ring finger-2) that share an N-terminal RING finger domain (that contains the ubiquitin E3 ligase activity), followed by a B-box and a central coiled-coil domain. MuRFs are also members of the RBCC superfamily (RING + B-box + coiled-coil) as are TRIM (Tripartite Motif-containing) (Mrosek et al., 2008). With regards to its E3 ligase activity, MuRF1 for example was shown in vitro to multi-ubiquitinate troponin-I (Kedar et al., 2004), myosin (Fielitz et al., 2007; Clarke et al., 2007) and actin (Cohen et al., 2009). However, in vivo, the mechanisms leading to the targeting of certain muscle proteins are more complex, because atrogin-1 and MuRF1 might have differential accessibility to different proteins within the myocyte. To address this issue, Cohen and colleagues (Cohen et al., 2009) used in a well-designed set of studies an inducible cre-lox mouse model that upon Cre-induction deletes MuRF1's RING finger domain, thus abolishing its ubiquitination-activity while leaving the remainder of MuRF1 and its potential structural functions for M-line assembly intact (McElhinny et al., 2002; Mrosek et al., 2007). In this model, myosin was not protected from multi-ubiquitination and degradation after denervation, contrasting its previous identification as an in vitro target of MuRF1 (Clarke et al., 2007). Rather, two other components of the thick filament, myosin light chain-2 (MLC2) and myosin-binding protein-C were protected from degradation, suggesting that their ubiquitination is MuRF1-mediated (Cohen et al., 2009). Therefore, current research is focused on the identification of the in vivo targets of atrogin-1 and MuRF1 using for example transgenic mouse models and adenoviral gene transfer of selected E3 ubiquitin ligase activities. Accordingly, a recent study used adenoviral based approaches suggested that atrogin-1

and MuRF1 are likely to recognize different targets (Mearini et al., 2009). Hirner et al. demonstrated by using a transgenic mouse model that the skeletal muscle specific overexpression of MuRF1 was not sufficient to cause muscle wasting and instead resulted in metabolic defects, thereby implicating MuRF1 in metabolism re-routing during muscle atrophy (Hirner et al., 2008).

The above discussed denervation studies were focused on the protection of muscle tissue mass from atrophy following long term denervation (>10 days) and less on other physiological parameters such as force or fiber-type composition. Here, we characterized the MuRF1-deficient muscles after denervation with regards to fiber-type composition in an attempt to clarify whether MuRF1-deficient muscles are physiologically normal and thus whether removal of MuRF1 activity could indeed present a muscle protective strategy. Surprisingly we found that MuRF1 is not evenly distributed in normal muscle tissue, and is preferentially expressed in type-II fibers. In addition, MuRF1 is preferentially induced in type-II fibers after denervation. Consistent with a role of MuRF1 in fast fiber-type remodeling we found that in MuRF1-KO mice fast fiber-rich muscles are considerably more protected than slow fiber-type muscles. The direct physical interaction of MuRF1 with myozenin-1 may provide a mechanistic basis of how MuRF1 is involved in type-II fiber specification, thereby implicating MuRF1 in chronic pathophysiological fiber-type remodeling conditions such as occurs during denervation and ageing.

2. Materials and methods

This study was conducted with animal care guidelines issued by the German National Research Foundation. All protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of *Universitätsmedizin Mannheim*.

2.1. Animals

All mice were bred in-house and genotyped by standard methods. MuRF1 and MuRF2 null mice were on a C57/BL6 background and were made as previously described (Witt et al., 2001, 2008). MuRF1/2 double null mice (5–6 months) were obtained by breeding double heterozygous mice to avoid any selection of potential modifier genes. The MuRF1-overexpressing transgenic line (MuRF1 TG) was described recently (Hirner et al., 2008). Animals were housed in standard plastic cages in an animal room with controlled environmental conditions and maintained on standard food and water *ad libitum*.

2.2. Experimental design

MuRF1 mice had their sciatic nerve sectioning as described elsewhere (Stockholm et al., 2001). Briefly, the dorsal skin of the thigh was cut and the posterior muscles divided to show the sciatic nerve. A chronic denervation was obtained by carefully cutting a 10-mm section of the sciatic nerve. After 5 and 14 days tibialis anterior and soleus muscles were excised. The effectiveness of denervation was confirmed by observing the locomotion of the life mouse and also by verifying the discontinuity of the sciatic nerve at the thigh level after the animal was sacrificed.

2.3. Immunohistochemistry

The primary antibodies used for immunostaining were: (1) monoclonal mouse anti-myosin heavy chain (MHC) II, clone MY-32 (1:1000; cat# M4276, Sigma) and (2) monoclonal mouse anti-skeletal myosin MHC I, clone NOQ7.5.4D (1:4000; cat# M8421, Sigma), (3) monoclonal multi-ubiquitin (1:1000; cat#

ab20239), (4) monoclonal mono-ubiquitin (1:1000; cat# ab7780) and (5) MuRF1 were detected with specific antibodies recently described (Witt et al., 2005); (Hirner et al., 2008). The secondary antibodies used for immunostaining were: (1) goat anti-mouse IgG-cyanine Cy2 (1:100; cat# 115–225–174 Jackson Lab), (2) donkey anti-chicken IgY-cyanine Cy3 (1:1000; cat# 703–165–155 Jackson Lab), (3) donkey anti-mouse cyanine Cy3 (1:1000; cat# 715–165–150 Jackson Lab) and (4) donkey anti-rabbit cyanine Cy3 (1:100; cat# 711–165–152 Jackson Lab). Cross-sections of muscles for immunostaining were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.2 M phosphate buffer (PB) for 10 min at room temperature, washed with PBS 3 times for 3 min each and then blocked/permeabilized with 0.1 glycine/0.2% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h. Subsequently the slides were incubated with a solution containing the primary antibody, 3% normal goat serum and 0.3% Triton X-100/0.1 M PB overnight in a moisture chamber (4 °C). After washing with 0.1 M PBS (three times for 10 min each),

a solution containing the secondary antibody and 0.3% Triton X-100/0.1 M PBS were added for 2 h in a dark chamber. The slides were then washed in 0.1 M PB (three times for 10 min each) and mounted with Vectrashield mounting medium for fluorescence with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (cat# H-1200, Vector Labs) and coverslipped.

2.4. Quantitative and morphometric analysis

The quantitative and morphometric analysis was performed on a microscope (Nikon Eclipse E600©, Fukuoka, Japan) equipped with a digital video camera. For image processing, we used the software Metamorph from Universal Imaging Corporation (Downingtown, USA) and Image Pro-plus (Media Cybernetics, Bethesda, USA). The frequency of muscle type I and II fibers and their cross-sectional areas (CSAs) were determined from a total of approximately 500 (soleus) or 1000 muscle fibers (tibialis anterior)

Fig. 1. Fiber-type preferential induction of MuRF1 during denervation. (A) Specificity of the used antibody and blotting conditions for MuRF1 as indicated by the absence of MuRF1 signal in MuRF1-KO extracts. In WT, MuRF1 was induced about twofold by denervation (DEN) in both in soleus (SO) and tibialis anterior (TA) muscles. (B) SO and (C) TA muscles were examined 14 days after N. ischiadicus lesion with antibodies specific for MuRF1, type-I MHC (MHC I), and type-II MHC (MHC II). From left to right, immunohistochemistry with MuRF1, MHC-I, or MHC-II antibodies. MuRF1 is expressed preferentially in type-II muscle fibers 400×.

within each experimental group, respectively. Three to four cross-sections of the soleus and tibialis anterior muscles from different animals were analyzed in all groups. For classification of type-I and type-II fibers, positive immunolabeling for MHCI and MHCII antibodies were used, respectively. Fibers which were lightly labeled were considered intermediary.

2.5. Gel electrophoresis and Western blot

Protein extracts were prepared from frozen samples of tibialis anterior and soleus muscles tissue of wild type and KO mice; for each sample 50 μ g of total protein was loaded. The protein levels of MuRF1 and MuRF2 were determined with specific antibodies recently described (Hirner et al., 2008; Witt et al., 2008). Atrogin/Mafbx (Cat#AP2041, ECM Biosciences) and myozenin-1 (Cat#-ab58704 Abcam) and myozenin-2 (Cat# 26200 Abcam) were detected with commercially available antibodies. For detection, muscle tissues were homogenized and protein species resolved on 4–10% gradient SDS-acrylamide gels (Invitrogen) followed by transference. After incubation, with primary antibodies, horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody, specific bands were visualized by enzymatic chemiluminescence (Super Signal West Pico, Pierce, Bonn, Germany), and densitometry was quantified using a one-dimensional scan software package (Scanalytics, Rockville, USA). Loading variations were monitored by Coomassie-staining.

2.6. Yeast two hybrid protein interaction studies

The human full length MuRF1 and MuRF2 cDNAs were amplified from total human skeletal muscle cDNA and inserted into pGBKT7 (BD Biosciences). For Y2H screens, the recombinant MuRF1,2 baits were transformed into *Saccharomyces cerevisiae*, strain AH109, that were subsequently co-transformed with cDNA libraries inserted in pGADT7 as described earlier (Witt et al., 2008). For mating, myozenin-1 gene fragments were inserted into pGADT7. Myozenin-1 constructs were co-transformed together with pGBKT7-MuRF1 and pGBKT7-MuRF2 clones, respectively, into AH109 cells. The Y2H screens and matings were essentially as described by the manufacturer (Yeastmaker Yeast Transformation System 2, Clontech). Co-transformed cells were incubated for 5 days at 30 °C on SD/Leu-/Trp-/His-plates. Subsequent determination of β -galactosidase activities, further mapping studies by mating of deletion constructs, rescue of plasmid DNA from interacting prey clones and their sequence analysis with AD3 primer was performed as described previously (Witt et al., 2005).

2.7. Statistical analysis

Multiple comparisons of mean values were performed with analysis of variance (ANOVA) and a post hoc Tukey's test to compare mean values when appropriate. For comparisons between only two groups, the unpaired *t*-test was used. For all comparisons, a $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Induction of MuRF1 and its associated signaling partners during denervation

Previous studies on MuRF1 have been limited by the lack of specificity of available MuRF1 antibodies. Here, we tested the various sera raised in our laboratory first by Western blotting of soleus and tibialis anterior extracts, both from WT and MuRF1-KO mice. This confirmed specificity of IgY-type anti-MuRF1 antibodies ob-

Fig. 2. Time-course of induction of MuRF1 and MuRF2 and MuRF-associated proteins after denervation as determined by Western blot studies. (A) Protein expression of MuRF1 and MuRF2 after denervation (DEN) in quadriceps was monitored at 5 and 14 days. MuRF1 is induced 5 days after DEN. At 14 days, MuRF1 is still elevated, but appears as a slightly faster migrating doublet, possibly indicating its degradation. (B) MuRF2's 60 kDa isoform is not significantly altered in expression before and after DEN. An about 50 kDa MuRF2 species is induced by denervation. (C and D) In contrast to MuRF1, atrogin-1 as detected with the available antibodies was not significantly altered at day 14 both in soleus (SO) and tibialis anterior (TA). Histograms show the relative protein expression and bars represent the mean of each group expressed in arbitrary units (A.U.) with indicated the standard deviation.

tained from chicken (Fig. 1A). Next, we examined soleus and tibialis anterior muscles after 14 days after lesion of *N. ischiadicus* (innervates knee flexors, plantar flexors (i.e. soleus) and plantar extensors (i.e. tibialis anterior)) with these antibodies as well as

antibodies specific for type-I (MHC I), and type-II (MHC II). In the mixed fiber-type composed soleus, MuRF1 was expressed preferentially in type-II muscle fibers (Fig. 1B). In the fast-fiber-type tibialis anterior, MuRF1 was expressed in all fibers (which are type II). After denervation, MuRF1 was still associated with type-II fibers both in soleus and tibialis anterior (Fig. 1C), and was expressed at higher levels as indicated by Western blots (Fig. 1A).

Next, we monitored the induction of MuRF1, MuRF2, and of atrogin-1 (because of their overlapping signaling functions). At 14 days, MuRF1 appears as a doublet, raising the possibility of its post-translational modification or degradation (Fig. 2A). The expression level of MuRF2's 60 kDa isoform is not altered. However, a 50 kDa sized isoform of MuRF2 was induced by denervation (visible on the Western blots as minor bands below the major 60 kDa MuRF2 skeletal isoform, see Fig. 2B). Finally, we noted that atrogin-1 was not significantly induced at days 5 and 14 in soleus and tibialis anterior (Fig. 2C and D), consistent with a recent report that atrogin is only transiently increased after denervation (Sacheck et al., 2007).

3.2. Differential protection of tibialis anterior and soleus muscle tissues after denervation in MuRF1-KO mice

Inactivation of MuRF1 was previously shown to protect muscle from atrophy after denervation (Bodine et al., 2001). Because of its type-II fiber association we investigated the relative

amounts of atrophy protection after denervation in soleus (as a muscle containing both type-I and type-II fibers), and tibialis anterior muscles (a muscle composed of almost exclusively type-II fibers). This demonstrated that tibialis anterior from MuRF1-KO mice was essentially protected from atrophy 14 days after denervation, at least with regards to its whole mass: we detected only a trend towards weight loss (the mean weight was reduced by 10% with a p value of 0.062; see Fig. 3A). In contrast, soleus from MuRF1-KO mice significantly atrophied with a weight loss of ~35% reduction (see Fig. 3B). Consistent with a preferential protection of tibialis anterior, CSA of individual type-II fibers was strongly protected after denervation in MuRF1-deficient mice, but we also noted a significant hypertrophy before denervation in MuRF1-KO type-II fibers from tibialis anterior (Fig. 3C). Overall, fiber-type II CSA in tibialis anterior was reduced 22% after 14 days of denervation.

In comparison, muscle fibers in soleus showed a more pronounced CSA reduction (33% after 14 days of denervation). Somewhat surprisingly, we did not note a difference between type-I and type-II fibers in soleus (data not shown).

Finally, we noted during our fiber-type analysis that most type-II fibers lost their clear specification after denervation in MuRF1-KO mice: most MHC-II positive fibers co-stained also with MHC-I and were grouped into an intermediate class (Fig. 3D). In summary, MuRF1 inactivation preferentially protects type-II fibers from atrophy after denervation.

Fig. 3. Differential protection of tibialis anterior (TA) and soleus (SO) muscles after denervation in MuRF1-KO mice. (A and B) Comparison of whole muscle mass 14 days after denervation (DEN). TA muscles were strongly protected from atrophy in a MuRF1-KO background and only lost 6% mass during 14 days of denervation. SO atrophied in both WT and MuRF1-KO mice; atrophy protection in the MuRF1-KO mice was 13% when compared to WT. (a) $p < 0.05$ vs. WT control group; (b) $p < 0.05$ vs. MuRF1 KO control group and (c) $p < 0.05$ vs. WT denervated group. (C) Consistent with the total muscle mass protection of TA, single fiber cross sectional areas (CSA) from MuRF1-KO mice remained strongly protected after DEN. Elevated CSAs before DEN contributed to this effect. (a) $p < 0.05$ vs. WT control group; (b) $p < 0.05$ vs. MuRF1 KO control group and (c) $p < 0.05$ vs. WT denervated group. (D) Fiber-type composition in SO and its dependence on DEN and MuRF1 expression. Black bars represent type I, white bars type II and grey bars intermediate fiber-type occurrence as percentile of total fibers. DEN resulted in the prominent appearance of an intermediate fiber type in the MuRF1-KO background (also detectable in WT after DEN at low frequency). (a) $p < 0.05$ vs. WT control group; (b) $p < 0.05$ vs. MuRF1 KO control group and (c) $p < 0.05$ vs. WT denervated group. Error bars represent the mean of at least three measurements from three independent experiments, lines represent standard deviation.

3.3. Regulation of myozenin-1/2 expression by MuRF1 and MuRF2

The expression of MuRF1 in type-II fibers and the preferential protection of tibialis anterior muscle suggested a fiber-type dependence of MuRF1 functions. Therefore we surveyed the previously identified 75 MuRF1 interacting prey clones (Witt et al., 2008) and determined which potential binding partners of MuRF1 might account for fiber-dependent signaling. In this survey, we noted that we had fished 10 myozenin-1 gene prey clones in the four independent Y2H screens using cardiac and skeletal cDNA libraries and MuRF1 and MuRF2 baits, respectively. In contrast, none of our Y2H screens identified MYO22 prey clones. The sequencing of these ten prey clones assigned the region of interaction to bp 380–1265 in the human myozenin-1 gene (Fig. 4A). This segment is predicted to interact with both MuRF1 and MuRF2. Next we tested if the deletion of MuRF1 and/or MuRF2 affects the expression of myozenin-1 in vivo in tibialis anterior muscle (in our initial Western blot experiments we could detect myozenin-1 in the fast-twitch tibialis anterior muscle but not in soleus muscle, consistent with Frey (2008)). While both single KO models had a moderate effect (less than twofold change), the combined deletion of MuRF1 and MuRF2 virtually abolished myozenin-1 expression in tibialis anterior (Fig. 4B). We noted also a trend of myozenin-2 loss in double-deficient MuRF1/MuRF2 KO mice, both in tibialis anterior and soleus (Fig. 4C and D), although this loss was less striking than myozenin-1. In summary, combined deletion of MuRF1 and MuRF2 functionally knocks down both myozenin-1 and myozenin-2, and

is therefore predicted to lead to an activation of the calcineurin-NFAT pathway.

3.4. Requirement of MuRF1 and MuRF2 for physiological fiber-type specification

The functional knock-down of myozenin-1 in MuRF1/MuRF2-deficient mice raised the possibility of an impairment of type-II fiber specification in dKO mice (Frey et al., 2008). Therefore we studied next the distribution of type-I and type-II fibers in dKO mice. In tibialis anterior muscles, we did not find an effect on fiber-type composition: mouse tibialis anterior is a pure fast-fiber composed muscle (Augusto et al., 2004), and this was also the case in dKO tibialis anterior (Fig. 5A). However, in the mixed fiber-type soleus muscle, we noted a marked shift towards type-I fibers (Fig. 5B). In contrast, we did not find a significant fiber-type shift in soleus in a MuRF1 overexpressing model (Fig. 5C). Similarly, we did not note a significant shift towards type-I fibers in the single MuRF2 KO models (data not shown). In summary, we conclude that only the combined inactivation of MuRF1 and MuRF2 caused a significant loss of type-II fibers in soleus.

3.5. Analysis of the distribution of ubiquitin in skeletal muscle fibers and its dependence on MuRF1/MuRF2 expression

Interaction studies identified numerous interactions of MuRF1 and MuRF2 with sarcomeric proteins (for review, Witt et al.,

Fig. 4. Physical and functional interaction of MuRF1 and MuRF2 with the calsarcin members myozenin-1 and 2. (A) Top green bar shows the translated region of the myozenin-1 cDNA (spanning from bp 348 to 1126; accession NM021245). A total of 10 myozenin-1 (MYOZ-1) prey clones were identified in the MuRF1 screen (blue), or in the MuRF2 screen (grey). All ten MYOZ1 prey clones represent full-length or close to full-length cDNA clones. This predicts that the region encompassing nucleotides 383 up to the 3' end is required for the interaction of MYOZ1 with MuRF1 and MuRF2. (B) Western blot analysis of MYOZ-1 expression in MuRF1, MuRF2 and dKO mice. Consistent with Frey et al. (2008) we detected MYOZ1 in tibialis anterior (TA) but not soleus (SO) by Western blots. Combined deletion of MuRF1 and MuRF2 results in loss of MYOZ1 expression in TA. (a) $p < 0.05$ vs. WT group; (b) $p < 0.05$ vs. MuRF1 KO group and (c) $p < 0.05$ vs. MuRF2 KO group; A.U. arbitrary units. (C) Myozenin-2 (MYOZ-2) expression was also reduced after MuRF1/MuRF2 deletion, although the effect was less striking (left: SO; right: TA). (a) $p < 0.05$ vs. WT group; (b) $p < 0.05$ vs. MuRF1 KO group and (c) $p < 0.05$ vs. MuRF2 KO group.

Fig. 5. Effect of combined MuRF1/MuRF2 deletion and MuRF1 overexpression on muscle fiber-type distribution. Type-I and type-II fibers were detected by immunofluorescence with antibodies specific for MHCI and MHCII, respectively (left), and their relative frequencies were determined in tibialis anterior (TA) and soleus (SO) (right) of WT, dKO, and MuRF1-overexpressing (MuRF1-TG) mice. Black bars represent type I, white bars type II and grey bars intermediate fiber-type occurrence as percentile of total fibers. (A) Combined inactivation of MuRF1 and MuRF2 did not affect the pure type-II fiber type found in TA. 100 $\times$. (B) SO from dKO mice was markedly enriched in type-I fibers 100 $\times$. (C) Overexpression of MuRF1 did not affect fiber-type distribution (see text for details). 100 $\times$. Data are expressed as mean SD; $n = 3$ whole cross-sections; $p < 0.05$ vs. WT.

2005). We therefore tested the ubiquitin distribution in skeletal muscle fibers from tibialis anterior by immunohistochemistry, using antibodies specific for multi-ubiquitin or mono-ubiquitin epitopes. We detected perinuclear and/or nuclear labeling with the multi-ubiquitin specific antibody (it was not possible to accurately distinguish between perinuclear or nuclear labeling by the fluorescence microscopy used here). We detected a cytoplasmic labeling as well (Fig. 6A–F). In contrast, when using the mono-ubiquitin specific antibody, we detected a clear striated labeling pattern (Fig. 6G). Intriguingly, we did not note any obvious differences between samples prepared from wild type or MuRF1/MuRF2 double knock-out mice (both for sections stained with mono- or the multi-ubiquitin specific antibodies; comparisons in Fig. 6A and D; 6G and H, respectively). We conclude that the expression of MuRF1/MuRF2 is not required for global ubiquitin distribution within myocytes, at least as detected by the here used methods.

4. Discussion

MuRF1 transcription is induced after muscle unloading, for example as induced by denervation, as part of the atrophy-response program. Here we studied MuRF1 and related proteins after 5 and 14 days of denervation. Intriguingly, we found that MuRF1 is expressed in a fiber-type II specific fashion in control muscle and

likewise post-induction by denervation. Consistent with a role of MuRF1 for type-II fiber trophicity we detected a differential protection of tibialis anterior muscle (predominantly type-II fibers) as compared to soleus muscle (a mixed muscle with about equal sub-populations of type-I and type-II fibers): Tibialis anterior muscle was significantly more protected from wasting after unloading. As long as 2 weeks after denervation, tibialis anterior total mass and CSA remained at about wild type levels. Also, when taking into account that tibialis anterior muscles in MuRF1-KOs were about ~20% hypertrophic before denervation, denervation-induced atrophy was still attenuated (CSA reduction after denervation in tibialis anterior was 22%, see Fig. 3C; in soleus 33% (not shown)). Taken together, these results implicate MuRF1 in the physiological regulation of type-II fiber trophicity during pathophysiological stress conditions. Finally, we noted in our Western blot studies that MuRF1 protein is expressed at significant levels in normal tibialis anterior muscle (Fig. 1), pointing also at physiological roles of MuRF1 in healthy type-II muscle fibers. Possibly, MuRF1 in conjunction with MuRF2 is required for maintaining type-II fiber identity (Fig. 3D). Therefore, MuRF1's functions are likely to extend beyond serving as an atrogene, and this work implicates this E3 ligase as a type-II driving factor during DEN.

A fiber-type dependence of MuRF1's function in muscle protection needs to be considered when interpreting atrophy models. For

Fig. 6. Ubiquitin immunolocalization in skeletal muscle fiber. Immunofluorescence of longitudinal sections of tibialis anterior muscle using a multi-ubiquitin (A, C, D and F) and a mono-ubiquitin specific antibody (G and H); ubiquitin epitopes were detected in red. Nuclei were labeled with DAPI in blue (see B and E). Multi-ubiquitin and DAPI labelings co-localized both in wild type (WT, A and B) and in MuRF1/MuRF2 double knockout tibialis anterior muscles (dKO, D and E); for co-localization see asterisks in A and D. In addition, the multi-ubiquitin antibody labeled the cytoplasm diffusely, both in WT (C) and dKO (F; arrow heads indicate the limits of one skeletal muscle fiber). The mono-ubiquitin specific antibody detected a striated pattern, both in WT (G) and dKO (H) animals. No differences were noted in ubiquitin distribution between WT and dKO samples (multi-ubiquitin: compare A and D, C and F; mono-ubiquitin: compare G and H).

example, fiber-type shifts occurring after denervation will affect distribution of muscle proteins that have a fiber-type dependent expression such as myosin heavy and light chain isoforms and MyBP-C isoforms. Possibly, some previously noted protein shifts after denervation on a MuRF1-KO background might have been partially caused by fiber-type shifts superimposed on their potential protection from UPS-degradation. For example, if MuRF1 is unable to target myozenin-1, MHC-I could be protected secondarily as myozenin-1 halts its inhibitory action on the calcineurin pathway, which is involved in MHC-I maintenance. Similarly, the interaction of CARP with MuRF1 and MuRF2 (Witt et al., 2008) might affect MLC-2 transcription as part of the Nkx2-5 pathway that is regulated by CARP (Zou et al., 1997).

Our data also suggest that the *in vivo* roles of MuRF1 for fiber-type II regulation are complex and depend on its associated signaling partner MuRF2 (Fig. 5): MuRF1 and MuRF2 together regulate myozenin-1 and myozenin-2, factors involved in type-II fiber specification. The marked loss of myozenin-1/myozenin-2 in the MuRF1 + 2 – double-deficient background could explain why dKO mice have a pronounced loss of type-II fibers (Fig. 4): Recent analysis of a myozenin-1 and myozenin-2-deficient mice model demonstrated a requirement of both proteins for maintenance of type-II fibers (Frey et al., 2004, 2008). Functionally, myozenin-1 and myozenin-2-deficient mice had an upregulation of calcineurin/NFAT activity in their skeletal muscles (Frey et al., 2004, 2008). In analogy, the removal of MuRF1 and MuRF2 resulting in a functional knock-down of both myozenin-1 and myozenin-2 (Fig. 5B and C) is expected to activate the calcineurin-NFAT pathway in tibialis anterior. This in turn can explain the hypertrophy of tibialis anterior muscles before and after denervation (Fig. 2A and C).

Future studies will need to clarify why myozenin-1 and myozenin-2 expression is lost in MuRF1/2 double-deficient mice. Interestingly, MuRF1/MuRF2 directly interacts with myozenin-1 (Fig. 4A). Myozenin-1 and MuRF1/MuRF2 share in common the interactions with Tcap, myotilin, and Z-disc bound filamin (for the interaction of FATZ/myozenin-1, see (Faulkner et al., 2000); for MuRF1/2 interaction with these three proteins, see (Witt et al., 2005, 2008); for the interaction with filamin see (Takada

et al., 2001)). Therefore, it appears likely that myozenin-1 and MuRF1/2 constitute a common protein complex with signalosome functions within the Z-disc region that includes regulation of the calcineurin-NFAT pathway (Frey et al., 2000). The fact that we did not detect a direct interaction between MuRFs and myozenin-2 suggests that other players exist, such as intermediate bridging proteins. Within this signaling pathway context, MuRF1 together with MuRF2 could be located upstream of myozenins, and potentially regulate the balance between relatively oxidative versus glycolytic fiber types in fast-type II fibers. On the protein level, it remains to be elucidated what the functional consequences of these interactions are, because the striking down-regulation in the dKO model does not support the idea that MuRF1/MuRF2 downregulates myozenin-1 by multi-ubiquitination as E3 ligases. Possibly, MuRF1/2 docking to Z-disc bound myozenin-1 (Frey et al., 2008) mediates the ubiquitination of specific components of this signalosome (for such a possible model, see Fig. 7), which could be achieved by specific modifications in the Z-disc lattice. We did find a striated labeling pattern by using a mono-ubiquitin antibody, reinforcing the idea that sarcomeric proteins are targeted by E3 ligases. On the other hand, when we used a multi-ubiquitin antibody, a diffuse cytoplasmic labeling was obtained. Combined, our ubiquitin immunofluorescence localization data suggest that sarcomeric proteins, (at least in a healthy muscle) are preferentially mono-ubiquitinated, which might be indicating fine tune modifications in sarcomeric protein activity (Fig. 6). By using the multi-ubiquitin antibody, we also detected a very strong perinuclear and/or Nuclear labeling, which has been previously reported (Fig. 6). Future studies are required to address if MuRF1/myozenin-1 based modifications of the Z-disc lattice can affect the activity of the myozenin-1/calcineurin complex.

The two concepts that MuRF1 acts under pathophysiological conditions as a player for causing type-II fiber sarcopenia and at the same time is required for physiological maintenance of type-II fiber identity are not mutually exclusive. Possibly, in a basal state, MuRF1's physiological role in type-II fibers is to negatively regulate hypertrophy, by down-regulating the NFAT pathway, and protect them during chronic metabolic stress and challenge situations. This model would explain why the pronounced eleva-

Fig. 7. Model for MuRF1/2 dependent type-II fiber trophicity and NFAT signaling control. (A) Drawing summarizing the main findings of the study. In WT mice type-II fibers (pink) preferentially express MuRF1 (small green dots inside the fiber), whereas MuRF1 is lower in type-I fibers (red). After denervation (DEN), MuRF1 expression is further elevated in type-II fibers, thereby decreasing their cross sectional area (WT DEN). In MuRF1-KO mice after DEN, type-II fibers are preferentially spared from atrophy when compared to type I fiber tissues. In addition, MuRF1-deficient fibers lose their type-II fiber identity as unloading evolves, migrating towards an intermediate state (represented by orange color). (B) Proposed model for MuRFs' signaling on type-II muscle fibers. Modification of the myozenin-1 (MYOZ-1)/calcineurin and myozenin-2 (MYOZ-2)/calcineurin complex by MuRF1 and MuRF2 results in a down-regulation of the calcineurin-NFAT pathway that opposes type-I identity. Therefore, combined deletion of MuRF1/MuRF2 might result in an enhanced calcineurin-NFAT signaling, that interferes with the physiological maintenance of type-II fibers.

tion of MuRF1 in the recently described MuRF1-transgenic model does not drive type-II fiber sarcopenia under non-challenge conditions. Upon non-physiological and permanent removal of MuRF1 and challenge by disuse, the type-II fiber determination function is impaired, and fibers become hypertrophic (Fig. 3A and C). As disuse progresses those “protected” fibers lose type-II specification and now fall an intermediate classification (Fig. 3D). Clearly, future studies involving for example conditional KO models need to address MuRF1's role in muscle under stress conditions that extend beyond the atrogenic concept.

Acknowledgments

The authors thank Alexander Gasch for support with the protein interaction studies and a critical reading of the manuscript, and Nicole Macha for excellent mouse breeding support. Supported by DFG (La668/13-1 to SL), by NIH HL062881 to H.G and FAPESP (Grants # 07/57613-3 and 06/61523-7).

References

Augusto, V., Padovani, C.R., Campos, G.E.R., 2004. Skeletal muscle fiber types in C57BL/6J mice. *Braz. J. Morphological Sci.* 21 (2), 89–94.

- Baptista, I.L., Leal, M.L., Artioli, G.G., Aoki, M.S., Fiamoncini, J., Turri, A.O., Curi, R., Miyabara, E.H., and Moriscot, A.S., 2010. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve*, doi:10.1002/mus.21578.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z.Q., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704–1708.
- Chin, E.R., Olson, E.N., Richardson, J.A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J.M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R., Williams, R.S., 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 12, 2499–2509.
- Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E., Glass, D.J., 2007. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* 6, 376–385.
- Cohen, S., Brault, J.J., Gygi, S.P., Glass, D.J., Valenzuela, D.M., Gartner, C., Latres, E., Goldberg, A.L., 2009. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J. Cell Biol.* 185, 1083–1095.
- Faulkner, G., Pallavicini, A., Comelli, A., Salamon, M., Bortoletto, G., Ievolella, C., Trevisan, S., Kojic, S., Dalla Vecchia, F., Laveder, P., Valle, G., Lanfranchi, G., 2000. FAT2, a filamin-, actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 275, 41234–41242.
- Fielitz, J., Kim, M.S., Shelton, J.M., Latif, S., Spencer, J.A., Glass, D.J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2007. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J. Clin. Invest.* 117, 2486–2495.
- Frey, N., Richardson, J.A., Olson, E.N., 2000. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14632–14637.

- Frey, N., Barrientos, T., Shelton, J.M., Frank, D., Rutten, H., Gehring, D., Kuhn, C., Lutz, M., Rothermel, B., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Katus, H.A., Hill, J.A., Olson, E.N., 2004. Mice lacking calstabin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat. Med.* 10, 1336–1343.
- Frey, N., Frank, D., Lippl, S., Kuhn, C., Kogler, H., Barrientos, T., Rohr, C., Will, R., Muller, O.J., Weiler, H., Bassel-Duby, R., Katus, H.A., Olson, E.N., 2008. Calstabin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J. Clin. Invest.* 118, 3598–3608.
- Hirner, S., Krohne, C., Schuster, A., Hoffmann, S., Witt, S., Erber, R., Sticht, C., Gasch, A., Labeit, S., Labeit, D., 2008. MuRF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies. *J. Mol. Biol.* 379, 666–677.
- Hood, D.A., 2009. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34, 465–472.
- Kedar, V., McDonough, H., Arya, R., Li, H.H., Rockman, H.A., Patterson, C., 2004. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 18135–18140.
- Koyama, S., Hata, S., Witt, C.C., Ono, Y., Lerche, S., Ojima, K., Chiba, T., Doi, N., Kitamura, F., Tanaka, K., Abe, K., Witt, S.H., Rybin, V., Gasch, A., Franz, T., Labeit, S., Sorimachi, H., 2008. Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J. Mol. Biol.* 376, 1224–1236.
- Lecker, S.H., Solomon, V., Mitch, W.E., Goldberg, A.L., 1999. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* 129, 227S–237S.
- Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E., Goldberg, A.L., 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J.* 18, 39–51.
- Lee-Young, R.S., Canny, B.J., Myers, D.E., McConell, G.K., 2009. AMPK activation is fiber type specific in human skeletal muscle: effects of exercise and short-term exercise training. *J. Appl. Physiol.* 107, 283–289.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Duby, R., Spiegelman, B.M., 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797–801.
- McElhinny, A.S., Kakinuma, K., Sorimachi, H., Labeit, S., Gregorio, C.C., 2002. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J. Cell Biol.* 157, 125–136.
- Mearini, G., C. Gedicke, S. Schlossarek, C.C. Witt, E. Kramer, P. Cao, M.D. Gomes, S.H. Lecker, S. Labeit, M.S. Willis, T. Eschenhagen, and L. Carrier, 2009. Atrogin-1 and MuRF1 regulate cardiac MyBP-C levels via different mechanisms. *Cardiovasc. Res.*
- Mrosek, M., Labeit, D., Witt, S., Heerklotz, H., von Castelmur, E., Labeit, S., Mayans, O., 2007. Molecular determinants for the recruitment of the ubiquitin-ligase MuRF-1 onto M-line titin. *Faseb J.* 21, 1383–1392.
- Mrosek, M., Meier, S., Ucurum-Fotiadis, Z., von Castelmur, E., Hedbom, E., Lustig, A., Grzesiek, S., Labeit, D., Labeit, S., Mayans, O., 2008. Structural analysis of B-Box 2 from MuRF1: identification of a novel self-association pattern in a RING-like fold. *Biochemistry* 47, 10722–10730.
- Pickart, C.M., Eddins, M.J., 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 55–72.
- Potthoff, M.J., Olson, E.N., Bassel-Duby, R., 2007. Skeletal muscle remodeling. *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 542–549.
- Putman, C.T., Dixon, W.T., Pearcey, J.A., Maclean, I.M., Jendral, M.J., Kiricsi, M., Murdoch, G.K., Pette, D., 2004. Chronic low-frequency stimulation upregulates uncoupling protein-3 in transforming rat fast-twitch skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R1419–R1426.
- Sacheck, J.M., Hyatt, J.P., Raffaello, A., Jagoe, R.T., Roy, R.R., Edgerton, V.R., Lecker, S.H., Goldberg, A.L., 2007. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *Faseb J.* 21, 140–155.
- Simonides, W.S., van Hardeveld, C., 2008. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid* 18, 205–216.
- Snijders, T., Verdijk, L.B., van Loon, L.J., 2009. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Res. Rev.* 8, 328–338.
- Soares, A.G., Aoki, M.S., Miyabara, E.H., Deluca, C.V., Ono, H.Y., Gomes, M.D., Moriscot, A.S., 2007. Ubiquitin-ligase and deubiquitinating gene expression in stretched rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 36, 685–693.
- Stockholm, D., Herasse, M., Marchand, S., Praud, C., Roudaut, C., Richard, I., Sebillé, A., Beckmann, J.S., 2001. Calpain 3 mRNA expression in mice after denervation and during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C1561–C1569.
- Takada, F., Vander Woude, D.L., Tong, H.Q., Thompson, T.G., Watkins, S.C., Kunkel, L.M., Beggs, A.H., 2001. Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1595–1600.
- Witt, C.C., Gerull, B., Davies, M.J., Centner, T., Linke, W.A., Thierfelder, L., 2001. Hypercontractile properties of cardiac muscle fibers in a knock-in mouse model of cardiac myosin-binding protein-C. *J. Biol. Chem.* 276, 5353–5359.
- Witt, S.H., Granzier, H., Witt, C.C., Labeit, S., 2005. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J. Mol. Biol.* 350, 713–722.
- Witt, C.C., Witt, S.H., Lerche, S., Labeit, D., Back, W., Labeit, S., 2008. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *Embo J.* 27, 350–360.
- Zou, Y., Evans, S., Chen, J., Kuo, H.C., Harvey, R.P., Chien, K.R., 1997. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* 124, 793–804.

APÊNDICE C - MuRF1 and MuRF2 play a key cooperative role in skeletal muscle regeneration

MuRF1 and MuRF2 play a key cooperative role in skeletal muscle regeneration

Igor Luchini Baptista^{1,3}, Julius Bologomovas², Siegfried Labeit², Anselmo Moriscot^{1,3}

¹*Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Lineu Prestes Av., 1524, 05508-900, Sao Paulo, SP, Brazil*

²*Institute for Integrative Pathophysiology, Universitätsmedizin Mannheim, 68167 Mannheim, Germany*

³*Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Lineu Prestes Av., 2415, 05508-900, Sao Paulo, SP, Brazil*

ABSTRACT

Although it is clear that certain E3 ligases are involved in skeletal muscle wasting, the role of such enzymes on other features of muscle plasticity is currently elusive. In the present study we hypothesized that the E3 ligases MuRF1 and MuRF2 are involved in skeletal muscle regeneration. Here we show both MuRF1 and MuRF2 are strongly overexpressed during regeneration and MuRF1 localizes in satellite/proliferating cells. MuRF2 rather localizes inside the myofiber. Histological analysis showed severe skeletal muscle regenerative deficit in MuRF1 and MuRF2 double knock mice (MuRF1/2 dKO). In addition, key molecular regeneration markers (Ki67/NCAM in inflammatory phase and neonatal MHC in post inflammatory phase) were found severely down regulated in dKO animals. Specific immunolabeling for MyoD and Pax7 showed very few satellite cells and we have also detected increased apoptotic levels. Interestingly, while Myf-5 expression was severely decreased in regenerating MuRF1/2 dKO muscle, myogenin was unaltered as compared WT. The results of this study revealed the key cooperative role of the E3 ligases MuRF1 and MuRF2 in skeletal muscle regenerative response.

INTRODUCTION

Skeletal muscle regeneration is a powerful and highly synchronized process involving the activation of various cellular responses. After injury, the skeletal muscle repair is initially characterized by necrosis and rapid activation of an inflammatory response [1]. The inflammatory phase (typically lasts few days)[2], includes activation of satellite cells, which proliferate and subsequently can either fuse to each other forming new fibers, or fuse to damaged fibers donating new nuclei to the fiber. In the post inflammatory phase, protein is reaccumulated and fiber size and function are recovered [3]. Although other cell types have been recently associated with regeneration [4, 5] satellite cells are considered major players in skeletal muscle repair [6].

The molecular basis of skeletal muscle regeneration is still not well understood, even though several regulators have been identified, including heat shock proteins [7, 8], MGF/mIGF I (mechano growth factor) [9, 10], SRF (serum response factor) [11, 12], FGF6 (fibroblast growth factor) [13, 14], calcineurin [15, 16], Wnt/ β -catenin [17, 18] and mTOR pathways [12, 18, 19]. Interestingly, most of those factors/pathways share the property of being stimulating, driving anabolic responses. On the other hand, not much attention has been given to understand the role of catabolic pathways in skeletal muscle regeneration. In fact there is a severe loss of protein content during the inflammatory phase of regeneration, suggesting that proteolysis might play a role. The proteasomal proteolysis is a good candidate since it has been extensively shown that this system plays a key role in atrophy, another condition involving severe protein loss. Few studies have addressed the expression of genes involved in proteolytic pathways in skeletal muscle regeneration and they suggest that those genes are modulated [16, 20]. Nonetheless it remains to be investigated whether proteolysis during muscle repair is an undesirable consequence of the initial injury, or rather plays an adaptive role. In this study we hypothesized the E3 ligases MuRF1 (Muscle RING Finger) and MuRF2 are involved in the skeletal muscle regenerative response.

MuRF1 and Atrogin1/MAFbx (Muscle Atrophy Fbx) were first identified by transcript profiling in fasting and immobilisation models of muscle atrophy in mice [4, 31]. Robust increases in their gene expression have been observed in a wide range of in vivo models of skeletal muscle atrophy including diabetes, cancer, renal failure, denervation, unweighting and glucocorticoid or cytokine treatment [4, 31], and their expression is primarily confined to striated muscle [31, 30]. The importance of these atrophy-regulated genes, also known as “atrogenes”, in muscle wasting was established through knockout mice studies where an absence of MAFbx or MuRF1 reduced denervation-induced muscle atrophy [21, 22, 26]. Although many studies have observed changes in the gene expression of MAFbx and MuRF1 and their role in atrophy is clear, the cellular/molecular mechanisms involved are still not completely unraveled. It is clear that these genes are regulated by FOXO 3A. Indeed expression of constitutively active FOXO3 induces atrogin in vivo and causes severe atrophy of mouse muscles.

MAFbx and MuRF1 belong to the ubiquitin proteasome pathway (UPP), the primary pathway involved in intracellular protein degradation in skeletal muscle [21-25]. The E3 proteins contain several binding sites, one for their substrates, one for an E2 Ub-conjugating enzyme and at least one more for other Ub molecules [53]. The ability of the E3 protein to recognize its substrate is dependent on amino acid sequence and/or specific structural and phosphorylated domains.

In the present study we have compared wild type (WT), MuRF1 and MuRF2 deficient mice (MuRF1 and MuRF2 KO) and MuRF1/2 deficient mice (MuRF1/2 dKO) after 1, 3, 10 and 28 days of cardiotoxin injection in tibialis anterior muscle. MuRF1 and MuRF2 expression was severely elevated in regenerating tibialis anterior muscle in WT and regeneration in MuRF1/2 dKO was strictly deficient, involving satellite cell impairment.

The results of this study revealed the key cooperative role of the E3 ligases MuRF1 and MuRF2 in skeletal muscle regenerative response.

MATERIAL AND METHODS

The protocols used in this study are in agreement with the ethical principles in animal research followed by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Institute of Biomedical Sciences/University of São Paulo, Ethics Committee for Animal Research (No. 168/05) and this study was conducted with animal care guidelines issued by the German National Research Foundation. All protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Universitätsmedizin Mannheim.

In vivo procedures

Adult male C57/Bl6 mice (8 weeks old, 30±3g) were housed in standard plastic cages in an animal room with controlled environmental conditions and maintained on standard food and water ad libitum. MuRF1 and MuRF2 null mice were on a C57/BL6 background and were made as previously described [27, 28]. MuRF1/2 dKO mice (5–6 months) were obtained by breeding double heterozygous mice to avoid any selection of potential modifier genes.

Tibialis anterior muscle (TA) from WT, MuRF1 KO, MuRF2 KO and MuRF1/2 dKO animals were injected with cardiotoxin intramuscularly (4 injections of 6 µL 10 µM solution made in saline equally distributed along the muscle longitudinal length). In order to perform the injections, the animals were anesthetized and the muscle was surgically exposed and injections were made with the aid of a surgical binocular (Zeiss, Germany). Extreme care was taken to provide homogeneous distribution of cardiotoxin [29, 30]. After the muscles were injected, wounds were closed with polyamide threads (6-0), and thereafter, the animals were kept for several hours on a warm plate (37°C) to prevent hypothermia. Always the left leg was cardiotoxin injected and the contralateral tibialis anterior muscle was used as control. In previous experiments (data not shown) we have certified that saline injections following the same regimen do not drive any detectable histological modification. The animals were divided into 12 groups, i.e. 4 groups of WT mice and MuRF1/2 dKO mice that were injected and analyzed 1, 3, 10 and 28 days after cardiotoxin induced lesion (n=5 each). MuRF1 KO and MuRF2 KO groups were injected with cardiotoxin and analyzed after 3 and 10 days (n=5 each) after lesion.

Histology

Mice were killed by cervical dislocation and immediately TA muscles were removed, weighed and half of each muscle was immediately frozen in hypercooled isopentane and stored in liquid nitrogen. Frozen muscles were cut, generating 10 μm thick cross-sections using a cryostat (Leica, Germany). Hematoxylin and eosin staining was used for the general morphology and structure analyses. The other half of each muscle was used for immunoblotting analysis.

Necrosed muscle fibers were detected by histochemical lysosomal acid phosphatase activity (ac-phosphatase, Gomori lead method) according to Bancroft [31]. This was used to express the level of injury in necrosed fibers per mm^2 (N.F./ mm^2).

Quantitative and morphometric analysis

The quantitative and morphometric analysis were evaluated on a digitizing unit connected to a computer (Image Pro-plus, Media Cybernetic).

The number of TA necrosed myofibers was expressed by mean percentage of 1000 counted fibers (total of 3,000). Three cross-sections of TA muscles from different animals were analyzed in all groups.

Antibodies for immunofluorescence and western blot

The primary antibodies used for immunofluorescence were: (1) MuRF1 and (2) MuRF2 [28, 32]; (3) Ki67 (Cat#VPRM04, Vector Labs); (4) NCAM (Cat# sc-10735, Santa Cruz); (5) Laminin (Cat#L9393, Sigma); (6) MHCn (Cat# sc-53097); (7) MyoD (Cat#IMG132, Imgenex); (8) Pax7 (Cat# NBP1-40767, Novus Biologicals); (9) WNT3 (Cat#sc-5210, Santa Cruz); (11) β -Catenin (Cat# 18-272-196288, Genway).

The respective secondary antibodies used for immunofluorescence were: (1) Cy3 Donkey anti-Chicken (1:100, Jackson ImmunoResearch); (2) Cy3 Goat anti-Rabbit (1:100, Jackson ImmunoResearch); (3) Cy2 Donkey anti-Rabbit (1:50, Jackson ImmunoResearch);

The primary antibodies used for western blot were: (1) MuRF1 and (2) MuRF2 [28, 32]; (2) Atrogin/Mafbx-1 (Cat#AP2041, ECM Biosciences); (3) TRIM32 (Cat#sc-

99011, Santa Cruz); (4) Myf-5 (Cat#sc-302, Santa Cruz); (5) Myogenin (Cat#AB1835, ABCAM); (6) α -Tubulin (Cat# ab1835, Abcam).

The respective secondary antibodies used for western blot were: (1) Donkey anti-Chicken (Jackson ImmunoResearch); (2) Goat anti-Rabbit (Jackson ImmunoResearch); (3) Goat anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch).

Immunofluorescence

The cross-sections of muscles for immunofluorescence against all antibodies were fixed with acetone at -20°C, washed (2 times for 3 min each) and blocked with histoblock solution [5% normal goat serum, 1% bovine serum albumin, 1% teleost gelatin in PBS-T (PBS with 0.05% Tween 20)] for 1 hour. The slides were incubated with a solution containing the primary antibody in histoblock solution, overnight in a moisture chamber (4°C). After washing with PBS-T 0.1% (PBS with 0.1% Tween 20; 3 times for 5 min each), a solution containing the secondary antibody and histoblock solution was added for 1h in a dark room. In addition the slides were washed in PBS-T 0.1% (3 times for 5 min each) and then mounted with Vectashield mounting medium for fluorescence with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (cat# H-1200, Vector Labs) and coverslipped.

Observations and digital acquisitions of the stained sections were made with a fluorescent microscope (Zeiss, Germany) equipped with FITC, rhodamine and UV filters. Images were acquired in 40x objective or 100x oil immersion objective.

Western blots

Proteins expression levels in skeletal muscle were determined by performing Western immunoblotting similar to [27, 33]. Immediately after euthanasia, tibialis anterior muscles were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen. For protein detection, muscle tissues were homogenized and protein species resolved on 8%, 10% or 12% gel (depending on protein size) SDS-acrylamide gels followed by semi-dry transference. After incubation, with primary antibodies and alkaline-phosphatase (AP) conjugated secondary antibody, specific bands were visualized by enzymatic colorimetric NBT/BCIP (Roche, Mannheim, Germany), and densitometry was quantified using Image J software.

Loading variations were monitored by Coomassie-staining and by alpha-tubulin Western immunoblotting.

Apoptosis detection

Apoptosis was detected by a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay, using a kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). The slides were coverslipped using mounting medium for fluorescence with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (cat# H-1200, Vector Labs); the slides were observed under a fluorescence microscope (Zeiss, Germany).

Statistical analysis

Multiple comparisons of group mean values were performed with analysis of variance (ANOVA) and a subsequent Tukey's test to compare mean values more than two experimental groups. The unpaired *t*-test was used to compare differences between 2 groups. For all comparisons, a $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Our first goal was to investigate protein expression of MuRF1 and MuRF2 in regenerating tibialis anterior muscle and also, for comparison purposes, protein expressions of Mafbx/Atrogin-1 and TRIM 32 as these are also well known muscle E3 ligases (Fig. 1a). Protein expression of both MuRF1 and MuRF2 were strongly elevated after injury especially MuRF1 where we detected higher protein levels as soon as 3 days after injury. In contrast Mafbx/Atrogin-1 was down regulated after injury and TRIM 32 was slightly elevated (Fig. 1a). By immunofluorescence analysis, we observed that under basal conditions MuRF1 is punctiformly located in the muscle fiber cytoplasm (Fig. 1b, hashes). Three days after injury, MuRF1 immunolabelling seems to be positive in proliferating/satellite cells and there is a strong decrease in immunolabelling on myofibers cytoplasm (Fig. 1c, arrows). Ten days after injury the punctiform labeling for

MuRF1 returns (Fig. 1d, hashes). MuRF2 immunolabeling, on the other hand, has predominantly a peripheral pattern along the muscle fibers in basal conditions (Fig. 1e, arrowheads). Interestingly, this previously observed peripheral labeling pattern fades away in muscles by three days post-injury, giving place to a more diffuse cytoplasmatic labeling (Fig. 1f). Few small cells were MuRF2 positive (Fig. 1f, arrow). At ten days post-injury, the peripheral labeling is recomposed and a punctiform labeling in the myofiber is now apparent (Fig. 1g arrowheads and hash, respectively). To better characterize MuRF1 and MuRF2 tissue location we double labeled regenerating muscles with MuRFs and MyoD (a marker of satellite cells) three days after injury. It is clear that satellite cells express MuRF1 (Fig. 1 h-k). MuRF2 was also found to be expressed in satellite cells (Fig. 1 l-o). After this initial characterization, we explored the role of MuRFs in regeneration by injuring skeletal muscles from mice with ablation of MuRF1 and MuRF2 genes.

Histological cross-sections of TA muscles from 3 and 10 days after cardiotoxin lesion were stained with hematoxylin eosin and microscopically analyzed. At 3 days post injury, the cardiotoxin injection induced significant damage in tibialis anterior muscles from wild type mice, observed by presence of hypercontracted fibers, inflammatory cell infiltration and empty spaces among the cells which clearly indicate myonecrosis, tissue disruption and edema (Fig. 2a). At the same time point, the muscles from both MuRF1 KO and MuRF2 KO mice had similar signals of lesion (Fig. 2 b and c). Strikingly, MuRF1/2 dKO muscles had a much more empty spaces and fewer fibers, although fibers with centralized nuclei was also noticeable (Fig. 2d). At ten days post-injury, MuRF1 KO and MuRF2 KO regenerating muscles depicted similar tissue architecture as compared to WT muscles, i.e. many fibers containing centralized nuclei and no clear spaces (Fig 1 e-g). Histological analysis at 10 days after injury also showed a severe deficit in tissue structure in MuRF1/2 dKO muscle (Fig. 2h). We have further addressed MuRF1/2 dKOs by analyzing tibialis anterior muscles 28 days post injury. Even after this relatively long period, histological features from MuRF1/2 dKO still indicate structural shortage (Fig. 2i and j). Round structures among the fibers resembling white adipocytes were frequently observed. Overall, these observations suggest that lack of MuRF1/2 drive either a

deficient regeneration, or make the muscle tissue more susceptible to injury. In order to address this question, acid phosphatase reactions were performed in injured muscles for 1 day. We observed no differences in number of acid phosphatase positive fibers when comparing muscles from MuRF1/2 dKO and WT animals (Fig 2k). Since MuRF1 and MuRF2 single KO animals did not show noticeable alterations in histology in their injured tibialis anterior muscles, we decided to focus our further analysis in MuRF1/2 dKO animals.

Next we analyzed regeneration markers at both inflammatory (3 days after injury) and post-inflammatory (10 days after injury) phases. As expected, at the inflammatory phase, Ki67, a cell proliferative marker, was highly expressed in small cells from regenerating WT muscle, which mostly stand for proliferating satellite cells (Fig. 3a). Also, NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, representing the inflammatory phase) was highly expressed in WT regenerating muscle 3 days post-injury and identify differentiating satellite cells (Fig. 3a). At three days post-injury, Murf1/2 dKO muscle showed a dramatic reduction in positive cells either for Ki67 or NCAM (Fig 3b). In addition, as expected, at 10 days post-injury, MHCn (Myosin Heavy Chain neonatal) was highly expressed in regenerative myofibers from WT animals (Fig. 3c). On the other hand, MHCn labeling was dramatically reduced in MuRF1/2 dKO muscles (Fig. 3d).

In order to specifically examine activity of satellite cells in MuRF1/2 dKO injured muscles, at inflammatory and post-inflammatory phases; we have examined by immunofluorescence MyoD and Pax7 expression. In WT regenerating muscles, as expected, we observed co-labeling of MyoD and Pax7 3 days after injury (Fig. 4a and b). On the other hand, MuRF1/2 dKO muscles did not show co-labeling for those proteins 3 days post-injury (Fig. 4c and d). At 10 days post-injury MyoD and Pax7 were detected only in few activated satellite cells in WT muscles (Fig. 4e and f). Strikingly, in MuRF1/2 dKO muscles we have observed strong labeling in satellite cells that seem to organize in clusters, likely attempting to form a myotube (Fig 4g and h).

Since MyoD activation is controlled by B catenin, we decided to address immunolocalization of this protein in regenerating muscles from MuRF1/2 dKO. As expected, B catenin boosts in satellite cells in WT muscle 3 days post-injured (Fig. 5b and g-j). Accordingly, 10 days post-injury, B catenin immunoexpression returns to basal levels (Fig. 5c). In contrast, at 3 days post-injury in MuRF1/2 dKO muscles no expression of B catenin was detected in satellite cells (Fig 5e and k-n). At ten days post-injury, B catenin was found to be expressed in MuRF1/2 dKO muscle (Fig 5f). We also evaluated other myogenic factors and also factors involved in satellite cell activation by Western Blot. While Myf-5 expression was severely down-regulated in MuRF1/2 dKO 3 days after injury when compared to WT(Fig. 6a), Myogenin increased expression was not affected in regenerating MuRF1/2 dKO. Interestingly, two activators of satellite cell differentiation FHL2 and MARP2, are down regulated in MuRF1/2 dKO regenerating muscles as compared to WT (Fig 6a). Since the number of satellite cells is a result of proliferation and also cell death we decided to address apoptotic levels in WT and MuRF1/2 dKO regenerating muscles. Percentage of apoptotic nuclei is significantly elevated in MuRF1/2 dKO as compared to WT animals (Fig. 6b-f).

DISCUSSION

In this study we have showed that the E3 ligases MuRF1 and MuRF2 are highly induced in regenerating skeletal muscle and are redundantly critical for proper tissue repair. Depletion of both MuRFs leads to a severe deficit in satellite cell outcome, which involves inability to activate the bcatenin, myogenic factors and increased cell death.

Our results clearly showed that simultaneous deletion of MuRF1 and MuRF2 drive a dramatic regenerative deficit in skeletal muscle when histological preparations were observed (Fig. 2). In fact at 10 days post injury we still observed signals of inflammatory cells and also empty spaces, features normally observed in the acute phase of regeneration, typically up to few days after injury. Even after 28 days post injury, where normally tissue arcquiteture is well repaired, we observed signals of degeneration, such

as spaces occupied by what resembles white adipocytes. Abnormal white adipocyte deposits have been described in several manifestations of skeletal muscle degeneration, such as in muscular dystrophies [34] and more recently Pax7 deficiency has been associated with fatty deposits in skeletal muscle [35]. We speculate that non-appropriately placed adipocytes might be the outcome of defective satellite cells, which cannot undergo proper differentiation. In fact we observed strong MuRF1 and MuRF2 labeling in satellite cells from regenerating muscles, raising the possibility that those E3 ligases play a role in satellite cell activation and differentiation.

Lack of MuRF1 and MuRF2 drives satellite cells unable to proliferate and also differentiate, as addressed by KI67 and NCAM immunolabeling (Fig. 3). One could envision this means regeneration is completely impaired, or alternatively severely delayed. Those possibilities are not mutually exclusive, in fact we have data to support the notion that both outcomes are caused by lack of MuRF1 and MuRF2. Firstly we have seen that even at 28 days post-injury there are signals of skeletal muscle degeneration, i.e. presence of figures resembling adipocytes, clearly supporting the notion that regeneration was deficient. On the other hand one can see in MuRF1/2 dKO 28 days post-injury muscle, many fibers with centralized nuclei (a hallmark of a successfully regenerated fiber). Interestingly, when we used other markers (Pax7/MyoD) of satellite cells and evaluated not only at 3 days post-injury (when these cells are more active) but also at 10 days, we noticed that in MuRF1/2 dKO muscles, Pax7/MyoD immunolabeling was completely abrogated at 3 days post-injury but surprisingly upregulated at 10 days post-injury. This is precisely the opposite one would expect, which we have confirmed in WT animals (Fig. 4). In fact at 10 days post-injury in MuRF1/2 dKO muscles, many Pax7/MyoD positive cells are clattered together in what seems be an attempt to fuse and form myotubes. Based on the observations on MuRF1/2 dKO after 28 days of injury, i.e. fibers with centralized nuclei, we assume that part of these myotubes successfully attach to damaged myofibers.

In order to get further insight on the mechanisms involved on the lack of activation of myogenic factors during regeneration in MuRF1/2 dKO, we have addressed an important

upstream protein, B catenin, which upregulates myogenic factors such as MyoD. Interestingly the expression of this protein is severely affected by MuRF1 and MuRF2 knock out. The expected increase of B catenin in satellite cells was completely blunted in MuRF1/2 dKO regenerating muscles 3 days post-injury (Fig 5). These data combined suggest that B-catenin might be an ubiquitination target of MuRFs, stabilizing the protein. In fact several studies show that monoubiquitination might involved in protein stabilization [36]. Also one could consider that MuRFs might poliubiquitinate and induce degradation of a B catenin inhibitor, such as axin and GSK3b.

Our data shows increased levels of apoptosis in MuRF1/2 dKO regenerating muscles (Fig 6), firstly showing not only cell proliferation is compromised but also sustaining of cell viability. It is possible increased cell death is associated with proliferating cells which where not able to trigger appropriately the myogenic program (Fig. 6) and then with no tissue identification engaged in programed cell death.

Overall these data indicate that in a MuRF1/MuRF2 depleted environment, activated satellite cells fail to express important signaling molecules such as MyoD and undergo a misdifferentiation towards either another cell type, i.e. white adipocyte or programed cell death. Future studies addressing the impact of MuRFs upon detailed features of satellite cell proliferation and differentiation are warranted.

The main observations in this study that MuRFs are highly induced in regenerating muscle and those E3 ligases are essential for muscle repair, raise the idea that the intense loss of proteins normally observed in regenerating muscles are part of a necessary, likely adaptive, process in which defective proteins are removed. It is possible that MuRFs could play an important role in labeling those proteins for rapid degradation, leaving room for new proteins to take place. Another not mutually exclusive possibility includes a fine tune regulatory role of MuRFs in regenerating skeletal muscle. Our observation of nuclear localization of MuRF1 raises the possibility this E3 ligase acts as a transcriptional regulator, via interaction with nuclear factors. McElhinny et al. [23] have showed MuRF1 is able to translocate to the nucleus in cardiomyocytes and they suggested that MuRF1

could act as a cofactor modulating transcriptional activity. Other than a transcriptional Role, MuRF1 could degrade in a fine tune manner regulatory proteins in the nucleus.

These data suggest MuRF1 and MuRF2 as key regulators in skeletal muscle regeneration, probably exercising its effects through satellite cell activation, proliferation and differentiation. More studies are necessary to explain how these E3 ligases are able to control the myogenic factors expression.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Germany) for funding this study. This work was also supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil).

FIGURES

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 6

Figure Legends

Fig. 1: **a)** Protein level for MuRF1, MuRF2, Mafbx/Atrogin-1 and TRIM 32 detected by Western blot, 3 and 10 days post-injury. **b-g)** Immunofluorescence for MuRF1 (b-d) and MuRF2 (e-g) 3 and 10 days after injury. MuRF1 or MuRF2 in red and to evidence the nucleus, DAPI in blue. 400x. **h-o)** Co-labeling for MuRF1 (in red in h and k) or MuRF2 (in red in l and o) plus MyoD (green in i, k, m and o). Dapi in blue. 400x.

Fig. 2: Hematoxylin-eosin stained TA muscle cross-sections and necrosed myofibers/mm². **a-d)** TA muscles cross-sections from WT (a), MuRF1 KO (b), MuRF2 (c) and MuRF1/2 dKO (d) animals 3 days after injury. Note hipercontracted fibers (arrows), inflammatory cells (asterisks) and clear areas (hashes). 200x. **e-h)** TA muscles cross-sections from WT (a), MuRF1 KO (b), MuRF2 (c) and MuRF1/2 dKO (d) animals 10 days after injury. Note myofibers with nuclei centralized (arrowheads) and clear areas (hashes). 200x. **i-j)** hematoxylin-eosin stained TA muscle cross-sections 28 days post-injury in WT (i) and MuRF1/2 dKO (j) animals. Note myofibers with nuclei centralized (arrowheads) and the presence of adipocytes (asterisk in j). **k)** Necrosed fibers/mm² analyzed 24 hours post-injury in WT (grey) and MuRF1/2 dKO (black). Bars represent mean±S.D.

Fig. 3: **a-b)** Immunofluorescence for NCAM (red) and Ki67 (green) and nuclei labeled with DAPI (blue) in WT and MuRF1/2 dKO animals. Note the reduction in Ki67 (arrowhead) labeling and the absence of NCAM positive cells groups (dashed line in WT) in MuRF1/2 dKO animals. 100x. **c-d)** Immunofluorescence for Laminin (red) and MHCn (green) in WT and MuRF1/2 dKO animals 10 days post-injury. Note the reduction in MHCn (arrows) labeling. 100x.

Fig. 4: **a-d)** Immunofluorescence for MyoD (red) and Pax7 (green) and nuclei labeled with DAPI (blue) in WT and MuRF1/2 dKO animals 3 days after cardiotoxin injection. Note the presence of satellite cells positive for MyoD and Pax7 in WT animals (arrows in a and b) and the absence of labeling in MuRF1/2 dKO (c and d). 400x. **e-f)** Immunofluorescence for MyoD (red) and Pax7 (green) and nuclei labeled with DAPI (blue) in WT and MuRF1/2 dKO animals 10 days after cardiotoxin injection. Note the reduction of MyoD/Pax7 positive cells in WT (arrows in e and f) and the cluster formation in MuRF1/2 dKO animals (arrowheads in g and h). 400x.

Fig. 5: **a-f)** β -catenin (green) localization 3 and 10 days after CTX injection, nuclei was detected with DAPI (blue). Note the perinuclear presence of β -catenin in proliferating cells in WT after 3 days (arrowheads in b). In MuRF1/2 dKO animals this pattern is present only 10 days after the injection (arrowheads in f). 400x. **g-n)** Co-localization of MyoD (red) and β -catenin (green) 3 days post-injury in WT (g-j) and MuRF1/2dKO (k-n), nuclei was detected with DAPI (blue, i, j, m and n). Note the co-labeling for β -catenin and MyoD in WT cells (arrows in g-j) and the absence of this pattern in MuRF1/2 dKO animals (k-n).

Fig. 6: a) Representative Western blot for Myf-5, Myogenin, FHL2 and MARP2 3 and 10 days after injury. Note the drastic reduction of Myf-5, FHL2 and MARP2 in MuRF1/2 dKO animals. **b-f)** Apoptotic nuclei labeling by TUNEL (green in c-f) with DAPI to detect nuclei (blue in c-f). The bars in b) represent the percentage of apoptotic nuclei 3 and 10 days after CTX injection. In c-f, arrows pointing apoptotic nuclei. 400x.

REFERENCES

1. Tidball, J.G., *Inflammatory processes in muscle injury and repair*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(2): p. R345-53.
2. Sudo, M. and Y. Kano, *Myofiber apoptosis occurs in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats*. J Physiol Sci, 2009. **59**(6): p. 405-12.
3. Tidball, J.G. and S.A. Villalta, *Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **298**(5): p. R1173-87.
4. Paylor, B., et al., *Nonmyogenic cells in skeletal muscle regeneration*. Curr Top Dev Biol. **96**: p. 139-65.
5. Duguez, S., et al., *Myogenic and nonmyogenic cells differentially express proteinases, Hsc/Hsp70, and BAG-1 during skeletal muscle regeneration*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(1): p. E206-15.
6. Sambasivan, R., et al., *Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration*. Development. **138**(17): p. 3647-56.
7. Miyabara, E.H., et al., *Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(4): p. C1128-38.
8. Conte, T.C., et al., *Radical improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice*. Toxicon, 2008. **52**(1): p. 146-55.
9. Pelosi, L., et al., *Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines*. Faseb J, 2007. **21**(7): p. 1393-402.
10. Musaro, A., *Growth factor enhancement of muscle regeneration: a central role of IGF-1*. Arch Ital Biol, 2005. **143**(3-4): p. 243-8.
11. Charvet, C., et al., *New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor I pathways*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(17): p. 6664-74.
12. Latasa, M.U., et al., *Delayed liver regeneration in mice lacking liver serum response factor*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(4): p. G996-G1001.
13. Armand, A.S., et al., *IGF-II is up-regulated and myofibres are hypertrophied in regenerating soleus of mice lacking FGF6*. Exp Cell Res, 2004. **297**(1): p. 27-38.
14. Armand, A.S., et al., *FGF6 regulates muscle differentiation through a calcineurin-dependent pathway in regenerating soleus of adult mice*. J Cell Physiol, 2005. **204**(1): p. 297-308.
15. Miyabara, E.H., M.S. Aoki, and A.S. Moriscot, *Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(4): p. 559-63.
16. Miyabara, E.H., et al., *Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A*. Cell Tissue Res, 2005. **319**(3): p. 479-89.

17. Kim, C.H., et al., *Beta-catenin interacts with MyoD and regulates its transcription activity*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(9): p. 2941-51.
18. Otto, A., et al., *Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 17): p. 2939-50.
19. Miyabara, E.H., et al., *Mammalian target of rapamycin complex 1 is involved in differentiation of regenerating myofibers in vivo*. Muscle Nerve. **42**(5): p. 778-87.
20. Armand, A.S., et al., *Expression and neural control of follistatin versus myostatin genes during regeneration of mouse soleus*. Dev Dyn, 2003. **227**(2): p. 256-65.
21. Bodine, S.C., et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
22. Gomes, M.D., et al., *Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14440-5.
23. McElhinny, A.S., et al., *Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1*. J Cell Biol, 2002. **157**(1): p. 125-36.
24. Glass, D.J., *Molecular mechanisms modulating muscle mass*. Trends Mol Med, 2003. **9**(8): p. 344-50.
25. Glass, D.J., *Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(10): p. 1974-84.
26. Moriscot, A.S., et al., *MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance*. J Struct Biol. **170**(2): p. 344-53.
27. Witt, S.H., et al., *MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination*. J Mol Biol, 2005. **350**(4): p. 713-22.
28. Witt, C.C., et al., *Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2*. Embo J, 2008. **27**(2): p. 350-60.
29. de la Garza-Rodea, A.S., et al., *Long-term contribution of human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice*. Cell Transplant. **20**(2): p. 217-31.
30. Hosaka, Y., et al., *Alpha1-syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1097-107.
31. Bancroft, J.D., *Enzyme Histochemistry, in Theory and Practice of Histological Techniques*, J.D.a.S. Bancroft, A., Editor. 1996, Livingstone: New York. p. 391-410.
32. Hirner, S., et al., *MuRF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies*. J Mol Biol, 2008. **379**(4): p. 666-77.
33. Centner, T., et al., *Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain*. J Mol Biol, 2001. **306**(4): p. 717-26.
34. Pastoret, C. and A. Seville, *Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse*. Muscle Nerve, 1995. **18**(10): p. 1147-54.

35. Lepper, C., T.A. Partridge, and C.M. Fan, *An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration*. Development. **138**(17): p. 3639-46.
36. Suzuki, T., et al., *Monoubiquitination of Tob/BTG family proteins competes with degradation-targeting polyubiquitination*. Biochem Biophys Res Commun. **409**(1): p. 70-4.