

ANNA JAKUBIEC-PUKA

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: AJPE@nencki.gov.pl

KALPAINY

WPROWADZENIE

Białko jest zbudowane z łańcucha aminokwasów (łańcucha polipeptydowego), w którym aminokwasy są połączone wiązaniem peptydowym pomiędzy grupą karboksylową jednego aminokwasu, a grupą aminową sąsiedniego aminokwasu. Proces degradacji białek polega na reakcji hydrolizy (proteolizy) wiązań peptydowych, katalizowanej w żywym organizmie przez enzymy zwane proteazami¹. Reakcja proteolizy w warunkach takich jak w żywym organizmie jest nieodwracalna. Toteż hydrolizę każdego wiązania peptydowego w danym białku należy traktować jak kolejny stopień jego degradacji. Równocześnie proteolityczna modyfikacja białek jest końcowym etapem ich biosyntezy; tą drogą większość białek

dochodzi do formy dojrzałej, biologicznie czynnej (SMYTH i COHEN 1994). W wyniku ograniczonej proteolizy, nawet jednego tylko wiązania peptydowego, może zostać usunięty istotny funkcjonalnie peptyd lub nastąpić zmiana przestrzennego upakowania białka. W efekcie zwiększa się lub zmniejsza biologiczna aktywność białka. Równocześnie białko to może zostać wprowadzone na drogę degradacji. Wiadomo, iż degradacja indywidualnych białek jest wybiórczo, precyzyjnie regulowana. Kalpainy są jedną z lepiej poznanych dotychczas grup enzymów proteolitycznych, zapoczątkujących wybiórczą degradację / modyfikację indywidualnych białek w komórkach zwierzęcych².

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI KALPAIN

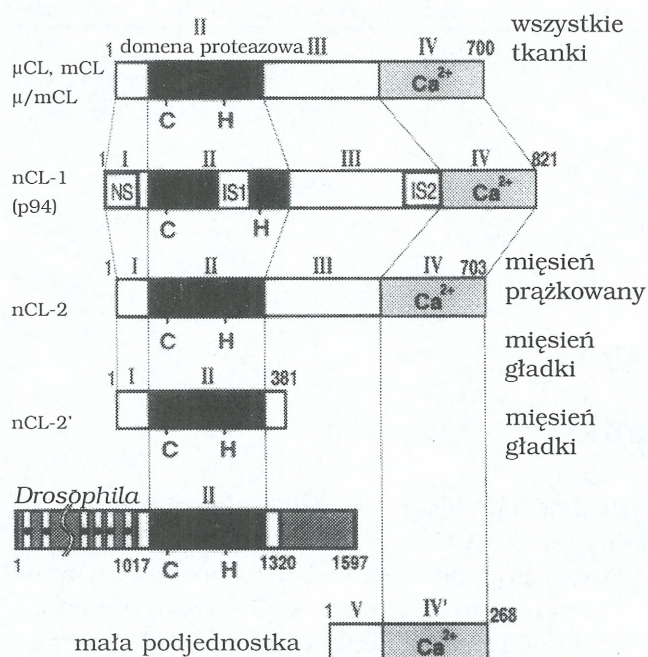
Kalpainy (EC 3.4.22.17), wewnątrzkomórkowe proteazy aktywowane przez jony wapnia, działające w neutralnym zakresie pH, występują powszechnie w komórkach zwierzęcych. Kalpainy należą do grupy proteaz cysteinowych (tiolowych), zawierających w enzymatycznym centrum aktywnym cysteinę i histydynę. Aktywność kalpain jest zależna od obecności Ca^{2+} . Kalpainy są uważane za receptor wtórnygo przekaźnika sygnałów, jakim są jony wapnia, jak też za ważny regulator zależnych od Ca^{2+} funkcji komórkowych. Dotychczas zidentyfikowano co najmniej sześć enzymów z rodziny kalpain. Najwcześniej wykryto i najlepiej poznano dwie izoformy kalpainy: aktywne w mili-

molarnych i mikromolarnych stężeniach Ca^{2+} (m-kalpaina i μ -kalpaina); są one obecne powszechnie w tkankach. W ostatnich latach wykryto u kurczaków μ /m-kalpainę, aktywną w obecności pośrednich stężeń Ca^{2+} oraz tkankowo-specyficzne enzymy: w mięśni szkieletowym n-kalpainę-1 (p94) aktywną w nanomolarnych stężeniach Ca^{2+} i w mięśni gładkim n-kalpainę-2 i -2 (ryc. 1). Przypuszczalnie lista ta nie jest jeszcze pełna (SORIMACHI i współaut. 1994). Stężenia Ca^{2+} , potrzebne dla aktywacji kalpain μ -, m- i μ /m- w warunkach *in vitro* są znacznie wyższe od stężeń Ca^{2+} *in vivo*, które w komórce w stanie spoczynku są w granicach 0,1–0,8 μM . Mimo to w warunkach *in vivo* dzia-

¹ Szersze informacje o białkach i proteazach: BARRETT i McDONALD 1980, HUGLI 1988, STRYER 1997.

² Przegląd literatury dotyczącej kalpain do 1992 roku znajdzie Czytelnik w pracy przeglądowej: JAKUBIEC-PUKA 1993.

Rodzina dużej podjednostki



Ryc. 1. Schematycznie przedstawiona struktura rodziny kalpain.

Arabskimi i rzymskimi cyframi oznaczono odpowiednio, numery aminokwasów i domen. CL — kalpaina; C i H w domenie proteazowej oznaczają aktywne aminokwasy: cysteinę i histydynę (wzorowane na rycinie SORIMACHI i współaut. 1994).

Łączenie μ i m-kalpainy może być efektywne już w $0,1 \mu\text{M}$ stężeniu Ca^{2+} . Przypuszczalne mechanizmy, które to umożliwiają omówiono poniżej.

Budowa kalpainy została przedstawiona na przykładzie m-kalpainy i μ -kalpainy. Kalpaina jest zbudowana z dwóch podjednostek: 80 kDa i 30 kDa, nazwanych dużą i małą. W podjednostce 80 kDa można wyróżnić od N-końca cztery domeny (I–IV), w podjednostce 30 kDa dwie domeny (V i VI), (ryc. 1). Domena I, której sekwencja nie jest homologiczna z żadną ze znanych, działa jako inhibitor aktywności proteolitycznej. Domena II, katalityczna, jest podobna do innych znanych proteaz cysteinowych: katapsyn B, H, L oraz papainy. Domena III posiada sekwencję niepodobną do żadnej ze znanych; jej funkcja jest niejasna. Domena IV, o sekwencji homologicznej z sekwencją kalmoduliny, zawiera cztery rejony o strukturze „EF-hand”, które mogą wiązać Ca^{2+} . Domena V jest bogata w reszty glicynowe i reszty aminokwasów hydrofobowych; przypuszczalnie za jej pośrednictwem kalpaina wiąże się z błonami wewnątrzkomórkowymi. Domena VI posiada sekwencję homologiczną z domeną IV, zawiera cztery rejony wiążące jony Ca^{2+} . Obie podjednostki 80 kDa i 30 kDa łączą

się wiązaniem niekowalencyjnym. Podjednostka 80 kDa jest odmienna dla poszczególnych izoform kalpainy. Ta sama zaś izoforma z tkanek zwierząt różnych gatunków wykazuje znaczne podobieństwo (około 95% homologii). n-Kalpaina-1 (p94) różni się od izoform μ - i m- obecnością trzech dodatkowych odcinków w łańcuchu polipeptydowym, z których jeden ma sekwencję zawierającą sygnał transportu przez błonę jądrową. n-Kalpaina-2 oraz 2' są produktami tego samego genu. Powstają w wyniku różnicowego składania (ang. alternative splicing) wspólnego mRNA. Izofoma 2' nie posiada domeny IV i nie wiąże jonów wapnia, ani małej podjednostki kalpainowej. Wydaje się więc, że jej aktywność jest niezależna od Ca^{2+} . U muszki (*Drosophila*) znaleziono również homolog kalpainy nie posiadający domeny wiążącej Ca^{2+} , natomiast występuje w tym białku domena o strukturze „palców cynkowych”, umożliwiającą wiązanie z DNA. Podjednostka 30 kDa, odpowiedzialna za wrażliwość kalpainy na Ca^{2+} , jest jednakowa w μ - i m-kalpainie i wykazuje wielkie podobieństwo międzygatunkowe. Podjednostki 30 kDa w n-kalpainach dotychczas nie zidentyfikowano (GOLL i współaut. 1992a, b, JAKUBIEC-PUKA 1993, SAIDO i współaut. 1994).

Kalpaina jest enzymem wewnątrzkomórkowym, obecnym zarówno w cytosolu, jak i związanym z błonami wewnątrzkomórkowymi, jądrami, cytoszkieletem, a w komórce dzielącej się — z wrzecionem mitotycznym. W mięśniu szkieletowym μ - i m-kalpaina są związane głównie z linią Z w miofibrach, natomiast n-kalpaina-1 jest związana z białkiem miofibrili tytyną (LANE i współaut. 1992, JAKUBIEC-PUKA 1993, SORIMACHI i współaut. 1995).

Promotor genu podjednostki 80 kDa ma właściwości charakterystyczne dla genów metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping genes). Promotor ten ma ponad dziesięć miejsc zapoczątkowujących transkrypcję oraz poprzedzają go cztery regiony hamujące transkrypcję (tzw. wyciszacze). Geny podjednostek 80 kDa i 30 kDa wykazują znaczne podobieństwo. Każdy z genów większej podjednostki (μ , m- i p94) oraz gen podjednostki 30 kDa występuje w innym chromosomie (u człowieka odpowiednio w 11, 1, 15 i 19 chromosomie) (JAKUBIEC-PUKA 1993, SORIMACHI i współaut. 1995).

Wypada wspomnieć, że oprócz kalpainy w tkankach zwierzęcych są obecne inne, zależne od jonów wapnia, układy proteolityczne, aktywne w neutralnym zakresie pH (JAKUBIEC-PUKA 1993, SMYTH i COHEN 1994).

REGULACJE DZIAŁANIA KALPAIN

Regulacja działania kalpain w komórce jest ciągle jeszcze niejasna. W warunkach *in vitro* na kalpainy działa większość inhibitorów i aktywatorów proteaz cysteinowych. Otrzymano też wiele inhibitorów syntetycznych, specyficznych wobec kalpain i skutecznych również *in vivo*. Spośród związków obecnych w komórce, aktywatorami kalpain są fosfolipidy, obecne głównie w błonach (fosfatydyloinozytole, zwłaszcza fosfatydyloinozytolo (4,5)-bisfosforan, dioleinoglicerol, fosfatydyloseryna a także cerebrozydy i fosfatydy) oraz białka jądrowe histony. Powodują one zwiększenie wrażliwości kalpainy na Ca^{2+} , zbliżając ją do stężenia Ca^{2+} w komórce. Przy czym, optymalne dla działania kalpainy stężenie Ca^{2+} może być różne, zależnie od substratu (JAKUBIEC-PUKA 1993).

W tkankach kalpaina znajduje się w postaci nieaktywnego proenzymu, i jak to udowodniono (w badaniach *in vitro*), aktywacja następuje drogą autolizy w obecności Ca^{2+} . Z domen I i V zostają odtrawione pewne fragmenty, co przypuszczalnie powoduje odsłonięcie centrum aktywnego i obniżenie stężenia Ca^{2+} , potrzebnego dla aktywności proteazowej. Taki mechanizm aktywacji kalpainy może mieć miejsce przypuszczalnie również w warunkach *in vivo*, zwłaszcza w ekstremalnych sytuacjach, prowadzących do nekrozy czy apoptozy. Forma enzymu zaktywowanego nieodwracalnie drogą autolizy jest bardzo nietrwała i stanowi co najwyżej kilka procent całej obecnej w komórce kalpainy. Przy czym n-kalpaina-1 jest tak nietrwała, iż dotychczas izoforma ta nie została wyizolowana, a jej istnienie i sekwencje poznano na podstawie badań DNA. Ostatnie lata przyniosły informacje pozwalające przypuszczać, że kalpaina jest ak-

tywowana w komórce w sposób odwracalny (GOLL i współaut. 1992a, b, SAIDO i współaut. 1994, MOLINARI i CARAFOLI 1997).

Do systemu kalpainowego należy naturalny, specyficzny, wewnątrzkomórkowy, inhibitor kalpainy — kalpastatyna, białko o ciężarze 60–70 kDa. Kalpastatyna ma cztery miejsca inhibitorowe, wiążące w obecności jonów wapnia cztery cząsteczki kalpainy (przypuszczalnie w obrębie IV i VI domeny). Kalpastatyna działa jak odwracalny inhibitor kompetycyjny kalpainy, będący równocześnie jej substratem. Kalpastatyna jest zlokalizowana w tych samych rejonach co kalpaina, co zostało dokładnie przebadane w komórce mięśniowej. Przypuszczalnie kalpastatyna reguluje transport kalpainy w komórce i wiązanie jej z błonami, a wzajemna proporcja zawartości kalpainy i kalpastatyny jest jednym z czynników regulacji aktywności proteazy. Proporcja ta różni się zależnie od regionu komórki i może zmieniać się w przebiegu procesów komórkowych (GOLL i współaut. 1992b, JAKUBIEC-PUKA 1993, KAWASAKI i KAWASHIMA 1996). Na aktywność kalpain mają wpływ czynniki wzrostu. Poszczególne z nich zmniejszają bądź zwiększają aktywność kalpain, przypuszczalnie przez udział w regulacji syntezy kalpain i kalpastatyny, a także przez wpływ na translokację kalpain do błon wewnątrzkomórkowych (NEUBERGER i współaut. 1997). Uważa się coraz powszechniej, że istotnym elementem aktywacji kalpain jest ich wiązanie się z błonami biologicznymi, następujące w obecności Ca^{2+} . Aktywacja ta nie wymaga częściowej autolizy enzymu i jest przypuszczalnie odwracalna (JAKUBIEC-PUKA 1993, YAMASHIMA i współaut. 1996, MOLINARI i CARAFOLI, 1997).

SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA KALPAIN

Kalpaina jest typową endopeptydazą (tnz. rozszczepia wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha polipeptydowego, a nie na jego końcach), specyficznie działającą na białka pewnych grup. Tnie białka na duże peptydy, nie powodując ich dalszej degradacji. Kalpaina w zasadzie nie wykazuje specyficzności wobec aminokwasów otaczających rozszczepiane wiązanie; nie są znane też przyczyny jej specyficzności wobec poszczególnych białek.

Substratami kalpainy są białka wiążące kalmodulinę, niektóre enzymy cytosolowe — zwłaszcza białkowe kinazy (jak kinaza C, kina-

za lekkich łańcuchów miozyny, kinaza zależna od kalmoduliny) i fosfatazy (jak kalcyneuryna), fosfolipaza C, liczne białka cytoszkieletowe, w tym białka filamentów pośrednich i białka wiążące się z aktyną, niektóre białka miofibrili mięśni, dystrofina, proteoglikany, Ca^{2+} -ATPaza, białka związane z mikrotubulami (MAP 1 i MAP 2), niektóre histony, niektóre czynniki transkrypcyjne, liczne białka receptorowe hormonów i czynników wzrostu, cytokiny, niektóre białka adhezji komórek, niektóre białka soczewki oka. Substratami kalpainy nie są: białka cytosolowe (z wyjątkiem kinaz i fosfa-

taz), białka kalmodulino-podobne, a także „natywne” białka miofibrili mięśnia: aktyna, miozyna i α -aktynina. Liczne białka, w formie „natywnej” odporne na działanie kalpajny, sta-

ją się jej substratami po częściowym zdenaturowaniu (GOLL i współaut. 1992a, JAKUBIEC-PUKA 1993, SAIDO i współaut. 1994, KAWASAKI i KAWASHIMA 1996).

ROLA KALPAJNY W KOMÓRKACH

Na podstawie posiadanych obecnie danych, uzyskanych zwłaszcza w ostatnich latach, można z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać, jakie są role μ - i m-kalpajny w komórce; można je pogrupować następująco.

WPROWADZENIE BIAŁKA NA DROGĘ DEGRADACJI

Rozszczepienie nielicznych wiązań peptydowych (nawet tylko jednego) przez kalpajnę może powodować zmianę struktury białka lub jej destabilizację, która umożliwi innym, mniej specyficznym proteazom komórkowym dalsze trawienie białka do mniejszych peptydów i do aminokwasów.

ZMIANĘ AKTYWNOŚCI CZYNNEGO BIOLOGICZNIE BIAŁKA

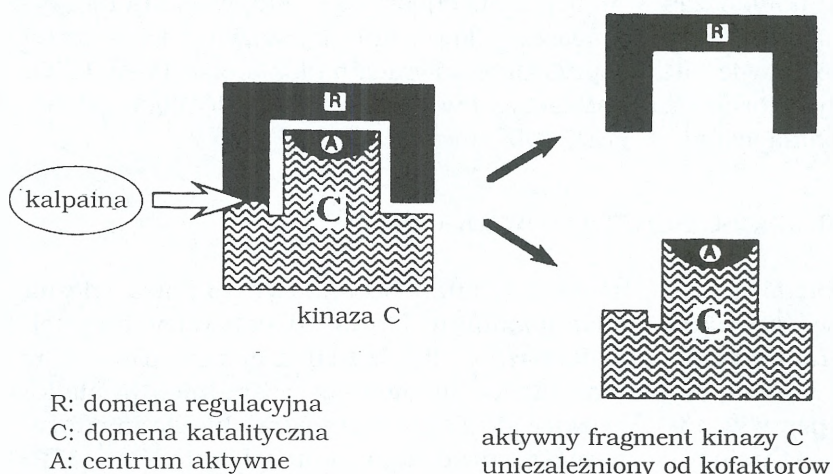
Przykładami białek aktywowanych przez kalpajnę drogą ograniczonej proteolizy są niektóre kinazy C, hydroksylaza tyrozynowa, V i X czynniki krzepnięcia krwi, czy receptor „rianodynowy” w mięśniu szkieletowym. Kalpajna moduluje również proces agregacji płytek krwi poprzez ograniczoną proteolizę agreginy. Przykładami białek unieczynnianych przez kalpajnę są czynniki transkrypcyjne

c-Fos i c-Jun, jak również kinaza pp39^{mos} (JAKUBIEC-PUKA 1993).

Kalpajna, zależnie od jej lokalizacji i warunków działania, może odtrawiać różne fragmenty tego samego białka, co może spowodować uruchomienie odmiennych procesów biologicznych. Przykładem jest trawienie witronektyny przez kalpajnę w krwioobiegu (SEIFFERT 1996).

ZMIANA MECHANIZMU REGULACJI ENZYMÓW

Wynikiem działania kalpajny jest zmiana mechanizmu regulacji aktywności niektórych enzymów. Na przykład, jedna z izoform białkowej kinazy C pozostaje w pełni aktywna po odtrawieniu jej części regulującej (około 30 kDa). Aktywność ta jednak przestaje być zależna od aktywacji przez Ca^{2+} i przez fosfolipidy (ryc. 2). Działanie tak zmodyfikowanej kinazy może być długoterminowe i może przyczyniać się do długotrwałego zwiększenia poziomu Ca^{2+} w cytosolu. Podobnie, działanie kalpajny na niektóre enzymy regulowane przez kalmodulinę (kinazę lekkich łańcuchów miozyny, Ca^{2+} -ATPazę, czy kalcyneurynę) powoduje uniezależnienie ich aktywności od kalmoduliny. Działanie kalpajny może też powodować zmianę umiej-



Ryc. 2. Schematycznie przedstawiona proteolityczna aktywacja białkowej kinazy C przez kalpajnę.

Do aktywności kinazy C jest potrzebna obecność kofaktora, dla uwolnienia centrum aktywnego od segmentu inhibitorowego domeny regulacyjnej. W wyniku ograniczonej proteolizy przez kalpajnę, zostaje usunięta domena regulacyjna i odsłonięte centrum aktywne; kofaktor przestaje być potrzebny dla aktywacji enzymu, który zostaje nieodwracalnie zaktywowany do nie kontrolowanego, przedłużonego działania (wzorowane na rycinie SAIDO i współaut. 1994).

scowienia enzymu w komórce, przez uwolnienie go ze struktur komórkowych (JAKUBIEC-PUKA 1993, SAIDO i współaut. 1994, YAMASHIMA i współaut. 1996).

ZMIANA KSZTAŁTU KOMÓRKI I ORGANIZACJI ORGANELLI SUBKOMÓRKOWYCH

Kalpaina może wpływać na organizację cytoszkieletu oraz na kształt komórki i rozmieszczenie organelli poprzez odcinanie z białek cytoszkieletowych ich fragmentów peptydowych istotnych dla wiązania z innymi białkami. Dobrym przykładem jest degradacja spektryny i zmiana kształtu erytrocytów na skutek aktywacji obecnej w erytrocytach μ -kalpaina przez jony Ca^{2+} , wprowadzone drogą jonoforezy. Przypuszczalnie kalpaina ma wpływ na takie procesy wymagające reorganizacji cytoszkieletu, jak fuzja komórek czy egzocytoza i endocytoza. Dobrym przykładem, i to zarówno wpływu na rozmieszczenie organelli komórkowych, jak i na zapoczątkowanie ich degradacji, jest działanie kalpaina na miofibryle mięśnia prądkowanego. Kalpaina powoduje usunięcie z miofibryli linii Z (struktury umocowującej filamenty aktynowe), co wywołuje dezorganizację miofibryli i uwalnianie z nich filamentów miozynowych i aktynowych. Wzrost aktywności kalpaina powoduje również zwiększenie się puli mobilnych filamentów, umiejscowionych na powierzchni miofibryli oraz przyspieszenie metabolizmu ich białek (GOLL i współaut. 1992a, JAKUBIEC-PUKA 1993, MOLINARI i CARAFOLI 1997).

PRZYPUSZCZALNA ROLA KALPAIN W UKŁADZIE NERWOWYM

W układzie nerwowym kalpaina jest obecna w różnych rodzajach komórek. W neuronach znajduje się w różnych ich rejonach: w ciele komórki, aksonach, dendrytach, w błonach synaptycznych, w pęcherzykach synaptycznych. Działanie kalpaina jest prawdopodobnie istotne dla reorganizacji kontaktów synaptycznych, leżącej u podstaw plastyczności synaps. Przypuszczalnie więc, kalpaina odgrywa ważną rolę w procesach pamięci. Ponadto kalpaina przyspiesza metabolizm mieliny i wydaje się odgrywać rolę w procesie mielinizacji (JAKUBIEC-PUKA 1993, SMYTH i COHEN 1994).

ZMIANY PATOLOGICZNE ZWIĄZANE Z DZIAŁANIEM KALPAIN

Stany powodujące wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} prowadzą również

do zwiększonej aktywności kalpain. Ma to miejsce, na przykład, w niedokrwieniu i stresie oksydacyjnym lub w apoptozie (TRUMP i BEREZESKY 1995). Czy, i w jakim stopniu, wzrost aktywności kalpain może być przyczyną apoptozy nie zostało udowodnione. Faktem jest jednak, że w niektórych przypadkach eksperymentalnej apoptozy zastosowanie inhibitorów kalpaina może jej zapobiegać. Mechanizm tego zjawiska nie jest znany (PATEL i współaut. 1996, ZHIVOTOVSKY i współaut. 1997). W niedokrwionym mózgu kalpaina znajdująca się na błonach ulega aktywacji w wyniku wzrostu stężenia Ca^{2+} i obecności fosfolipidów błonowych. Zwiększona aktywność kalpaina przyczynia się do uszkodzenia błon. Przypuszczalnie taki jest mechanizm uszkodzenia błon lizosomów i uwolnienie z nich enzymów degradacyjnych, przyczyniających się do uszkodzenia i śmierci neuronu (YAMASHIMA i współaut. 1996).

Wzmożenie aktywności kalpaina obserwowano też w eksperymentalnych ogniskowych uszkodzeniach mózgu, i to zarówno krótko po uszkodzeniu (w ciągu minut), jak i trwające przez wiele dni. Miało ono miejsce również w odległych od uszkodzenia rejonach, w tym kontralateralnych. Efektem zwiększonej aktywności kalpaina jest degradacja spektryny i neurofilamentów w neuronach. Przypuszczalnie tą drogą kalpaina odgrywa istotną rolę w procesach neurodegeneracyjnych po uszkodzeniu mózgu (SAATMAN i współaut. 1996, POSMANTUR i współaut. 1997).

Zmniejszenie aktywności kalpain jest również patogenne. Brak aktywności n-kalpaina-1 (p94) staje się przyczyną dystrofii mięśniowej typu obrączkowo-kończynowego 2A, schorzenia występującego rodzinnie i dziedzicznego autosomalnie recesywnie. U osób cierpiących na tę dystrofię wykryto dotychczas kilkanaście różnorodnych mutacji genu n-kalpaina-1 (15q15.1-q21.1). Są to zarówno mutacje powodujące zamianę jednego tylko aminokwasu, jak też mutacje prowadzące do produkcji mniejszej, nieaktywnej kalpaina (RICHARD i współaut. 1995). Nie opisano dotychczas schorzeń związanych z defektem żadnej z powszechnie występujących izoform kalpaina. Przypuszczalnie defekt taki nie pozwala na przeżycie organizmu. Wypada wspomnieć, że kalpainom przypisuje się udział w patogenezie niektórych form nadciśnienia a także takich schorzeń, jak zaćma lub choroba Alzheimera.

PODSUMOWANIE

Kalpainy, wewnątrzkomórkowe proteazy aktywne w obecności Ca^{2+} , mają kluczowe znaczenie dla metabolizmu komórek. Kalpainy drogą ograniczonej proteolizy modyfikują podstawowe dla funkcji i życia komórki białka. W

ten sposób kalpainy wpływają na organizację cytoszkieletu, aktywność enzymów i przebieg procesów komórkowych. Zaburzenie prawidłowego funkcjonowania kalpain staje się przyczyną wielu schorzeń.

CALPAINS

Summary

Calpain, a calcium-activated neutral cysteine protease, is an intracellular endopeptidase present in animal cells. In fact, calpain constitutes a large family of distinct isoenzymes, differing in structure and distribution. Substrates for calpain include cytoskeletal proteins, intracellular enzymes (parti-

cularly kinases and phosphatases) and regulatory proteins. Calpain may play a part in physiological events such as modulation of enzyme activity, protein turnover, or cytoskeletal rearrangement. Disturbances in calpain functions cause several diseases.

LITERATURA

- BARRETT A. J., McDONALD J. K., 1980. *Mammalian proteases a glossary and bibliography*. Volume 1 Endopeptidases. Academic Pres, New York.
- GOLL D. E., THOMPSON V. F., TAYLOR R. G., CHRISTIANSEN J. A., 1992a. *Role of the calpain system in muscle growth*. Biochimie 74, 225-237.
- GOLL D. E., THOMPSON V. F., TAYLOR R. G., ZALEWSKA T., 1992b. *Is calpains activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin?* BioEssays 14, 549-556.
- HUGLI T. E., 1988. Cellular proteases and control mechanisms. Alan R. Liss, Inc., New York.
- JAKUBIEC-PUKA A., 1993. *Rola proteolitycznego systemu kalpainowego w komórkach zwierzęcych*. Postępy Biochemii 39, 251-258.
- KAWASAKI H., KAWASHIMA S., 1996. *Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes*. Mol. Membrane Biol. 13, 217-224.
- LANE R. D., ALLAN D. M., MELLGREN R. L., 1992. *A comparison of the intracellular distribution of μ -calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells*. Exp. Cell Res. 203, 5-16.
- MOLINARI M., CARAFOLI E., 1997. *Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes*. J. Membrane Biol. 156, 1-8.
- NEUBERGER T., CHAKRABARTI A. K., RUSSELL T., DEVRIES G., HOGAN E. L., BANIK N. L., 1997. *Immunolocalization of cytoplasmic and myelin m-calpain in transfected schwann cells: I. Effect of treatment with growth factors*. J. Neurosci. Res. 47, 521-530.
- PATEL T., GORES G. J., KAUFMANN S. H., 1996. *The role of proteases during apoptosis*. FASEB J. 10, 587-597.
- POSMAANTUR R., KAMPFL A., SIMAN R., LIU S. J., ZHAO X., CLIFTON G. L., HAYES R. L., 1997. *A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat*. Neuroscience 77, 875-888.
- RICHARD I., BROUX O., ALLAMAND V., FOUGEROUSSE F., CHIANNILKULCHAI N., BOURG N., BRENGUIER L., DEVAND C., PASTURAUD P., ROUDAUT C., HILLAIRE D., PASOS -BUENO M. R., ZATZ M., TISCHFIELD J. A., FARDEAU M., JACKSON C. E., COHEN D., BECKMANN J. S., 1995. *Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. Cell 81, 27-40.
- SAATMAN K. E., BOZYCZKO-COYNE D., MARCY V., SIMAN R., MCINTOSH T. K., 1996. *Prolonged calpain-mediated spectrin breakdown occurs regionally following experimental brain injury in the rat*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55, 850-860.
- SAIDO T. C., SORIMACHI H., SUZUKI K., 1994. *Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement*. FASEB J. 8, 814-822.
- SEIFFERT D., 1996. *Hydrolysis of platelet vitronectin by calpain*. J. Biol. Chem. 271, 11170-11176.
- SMYTH D., COHEN P., 1994. *Foreword*. Biochimie 76, 195-197.
- SORIMACHI H., SAIDO T. C., SUZUKI K., 1994. *New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains*. FEBS Lett. 343, 1-5.
- SORIMACHI H., KINBARA K., KIMURA S., TAKAHASHI M., ISHIURA S., SASAGAWA N., SORIMACHI N., SHIMADA H., TAGAWA K., MARUYAMA K., SUZUKI K., 1995. *Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence*. J. Biol. Chem. 270, 31158-31162.
- STRYER L., 1997. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- TRUMP B. F., BEREZESKY I. K., 1995. *Calcium-mediated cell injury and cell death*. FASEB J. 9, 219-228.
- YAMASHITA T., SAIDO T. C., TAKITA M., MIYAZAWA A., YAMANO J., MIYAKAWA A., NISHIJO H., YAMASHITA J., KAWASHIMA S., ONO T., YOSHIOKA T., 1996. *Transient brain ischaemia provokes Ca^{2+} , PIP_2 and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys*. Eur. J. Neurosci. 8, 1932-1944.
- ZHIVOTOVSKY B., BURGESS D. H., VANAGS D. M., ORRENIUS S., 1997. *Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 230, 481-488.