



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Sanitaria

Tesi di Laurea

“Processing della subunità regolatoria da parte delle calpaine -1 e -2 purificate da cellule di sangue periferico umano (PBMC).”

Relatore:

Prof.ssa Roberta De Tullio

Correlatore:

Prof.ssa Sara Ferrando

Candidata:
Alessia Para

Anno accademico 2020-2021

INDICE

LEGENDA E ACRONIMI.....	4
SCOPO DELLO STUDIO	5
1. INTRODUZIONE.....	6
1.1. IL SISTEMA PROTEOLITICO CALCIO DIPENDENTE	6
2. MATERIALI	9
3. METODI	10
3.1. PREPARAZIONE DI LEUCOCITI DA SANGUE PERIFERICO UMANO (PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS, PBMC).....	10
3.2. PREPARAZIONE DI LISATI DI PBMC.....	11
3.3. PURIFICAZIONE DEGLI ISOENZIMI DELLA CALPAINA DA PBMC.....	12
3.4. PURIFICAZIONE DELLA CALPAINA DA ERITROCITI UMANI.....	12
3.5. DOSAGGIO DELL' ATTIVITÀ DELLE CALPAINE.....	13
3.6. ESPRESSIONE DELLA SUBUNITÀ REGOLATORIA UMANA DELLA CALPAINA IN <i>E. COLI</i> ...	14
3.7. ATTIVAZIONE DELLA CALPAINA ERITROCITARIA E DELLE CALPAINE -1 E -2 DA PBMC....	15
3.8. ELETTROFORESI E WESTERN BLOT (WB)	16
4. RISULTATI.....	17
4.1. ISOFORME DELLE CALPAINE DA CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO UMANO (PBMC).....	17
4.2. DIGESTIONE DELLA SUBUNITÀ REGOLATORIA DA PARTE DELLA CALPAINA ERITROCITARIA.....	18
4.3. DIGESTIONE DELLA SUBUNITÀ REGOLATORIA DA PARTE DELLA CALPAINA-1 DA CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO UMANO (PBMC).....	22
4.4. DIGESTIONE DELLA SUBUNITÀ REGOLATORIA DA PARTE DELLA CALPAINA-2 DA PBMC26	
5. DISCUSSIONE.....	29
6. BIBLIOGRAFIA.....	32

LEGENDA E ACRONIMI

<i>CSSI</i>	Calpain Small Subunit 1
<i>Rec-CSSI</i>	Recombinant-Calpain Small Subunit 1
<i>mM</i>	millimolare
<i>μM</i>	micromolare
<i>Ca²⁺</i>	calcio
<i>N-terminale</i>	estremità ammino-terminale
<i>C-terminale</i>	estremità carbossi-terminale
<i>μ-calpaina</i>	calpaina 1
<i>m-calpaina</i>	calpaina 2
<i>PBMC</i>	cellule mononucleate di sangue periferico umano (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
<i>PBS</i>	tampone fosfato salino
<i>EDTA</i>	acido etilendiamminotetracetico
<i>PM</i>	peso molecolare
<i>kDa</i>	kilodalton
<i>SDS-PAGE</i>	(Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato
<i>WB</i>	Western Blot

SCOPO DELLO STUDIO

L'enzima proteolitico Ca^{2+} -dipendente calpaina è un eterodimero costituito da una subunità catalitica di 80 kDa e da una subunità regolatoria più piccola di $\cong 30$ kDa (CSS1), associata all'enzima nella condizione nativa. In seguito all'esposizione agli ioni calcio, CSS1 si dissocia dalla subunità catalitica e viene digerita dall'enzima in frammenti discreti. Esistono diverse isoforme della calpaina, alcune delle quali sono tessuto-specifiche. Gli enzimi utilizzati in questo studio, la calpaina-1 e -2, sono stati purificati da sangue periferico umano e sono ubiquitari.

In particolare, si è indagato se la subunità regolatoria è processata in modo diverso in sistemi ricostruiti, utilizzando come "substrato" delle calpaine la subunità regolatoria ricombinante umana purificata da batteri. L'interesse di questi esperimenti deriva da evidenze sperimentali che associano un'aumentata espressione di CSS1 alla malignità di tumori del sistema nervoso centrale.

1. INTRODUZIONE

1.1. IL SISTEMA PROTEOLITICO CALCIO DIPENDENTE

In origine, il sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente era costituito da tre molecole proteiche localizzate nel citoplasma di tutte le cellule eucariotiche esaminate [1]. Di queste tre proteine due sono gli enzimi proteolitici, μ -calpaina e m-calpaina, mentre la terza è il loro specifico inibitore naturale denominato calpastatina. Il sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente delle calpaine (Clan CA, family C02; EC 3.4.22.17) è considerato il terzo sistema proteolitico della cellula dopo quello lisosomiale e quello del proteasoma.

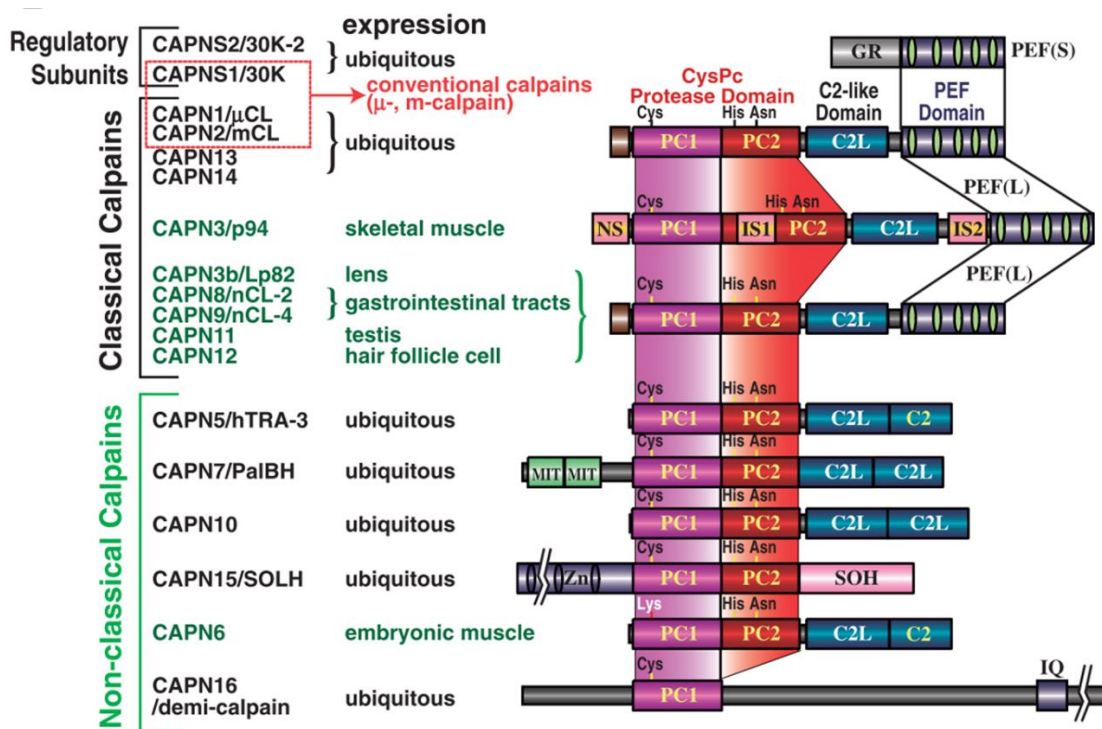


Figura 1. Diagramma schematico della struttura delle calpaine ubiquitarie e tessuto-specifiche.

Come mostrato nella Figura 1 [2], in seguito sono state scoperte molte altre forme di calpaina, accomunate dallo stesso sito catalitico (indicato nella figura come CysPc protease domain, in rosso), contenente la triade Cys/His/Asn caratteristica delle cisteine-proteasi. Di conseguenza, per definizione, il termine “calpaina” si riferisce a una

famiglia di cisteine-proteasi Ca^{2+} -dipendenti. In base alla struttura della subunità catalitica, le calpaine sono classificate in “classiche” e “non classiche”. Il gruppo delle calpaine classiche comprende nove isoforme, tra le quali la calpaina-1, -2 (denominate calpaine convenzionali, PM subunità catalitica $\cong 80$ kDa) e -13 sono ubiquitarie, mentre le calpaine -3, -8 -9, -11 -12 e -14 sono tessuto-specifiche. Rispetto al gruppo delle calpaine “non classiche”, queste isoforme sono caratterizzate dalla presenza di un dominio N-terminale di $\cong 5$ kDa (in marrone nella Figura 1), coinvolto nel mantenimento della forma nativa/inattiva dell’enzima. Questo viene rimosso, per autoproteolisi, durante l’attivazione della proteasi che avviene in presenza di ioni calcio. Tra le calpaine più studiate vi sono la calpaina-1 e calpaina-2 (nome del gene rispettivamente CAPN1 e CAPN2), che inizialmente erano denominate μ -calpaina e m-calpaina in base alla diversa concentrazione di calcio necessaria alla loro attivazione *in vitro* (la calpaina-1 si attiva a una concentrazione dell’ordine del μM [Ca^{2+}], mentre la calpaina-2 del mM [Ca^{2+}]) [1].

Come riportato nella Figura 1 in alto, la calpaina-1 e la calpaina-2, oggetto di studio di questo elaborato, non sono costituite solo dalla subunità catalitica ma sono eterodimeri contenenti anche una subunità regolatoria, più piccola e identica per tutte le isoforme (codificata da un singolo gene sul cromosoma 19 umano), con PM di $\cong 28/30$ kDa. La subunità regolatoria (Calpain Small Subunit 1, CSS1) è caratterizzata da regioni idrofobiche, ricche di glicina e vicine all’estremità N-terminale (indicate con GR nella figura), che vengono rimosse per autoproteolisi [3-4]. Invece, all’estremità C-terminale di CSS1, è presente un dominio “Penta-EF hand” (PEF(S) domain) in grado di legare ioni Ca^{2+} . Un dominio simile si trova anche all’estremità C-terminale della subunità catalitica (PEF(L) domain) di tutte le calpaine classiche. I due domini PEF(S) e PEF(L), rispettivamente nella subunità regolatoria e in quella catalitica, contengono ognuno cinque motivi “EF-hand” ed il quinto motivo di entrambe contribuisce alla formazione dell’eterodimero [5]. È importante notare che, nella struttura tridimensionale della calpaina, la parte N-terminale della subunità catalitica è in contatto con il secondo motivo EF hand (EF-2) della subunità regolatoria e che questa interazione viene distrutta, o in seguito al legame di ioni calcio a EF-2 oppure a causa della rimozione

autoproteolitica dell'estremità N-terminale della subunità catalitica, in seguito all'attivazione della proteasi [5].

La subunità catalitica della calpaina-1 e -2 è codificata da due geni diversi (rispettivamente nei cromosomi 11 e 1 umani) e, a seconda della specie, tra le due isoforme vi è un'omologia di sequenza variabile (55-65%) [6].

La parola "calpaina" combina i termini "cal" che deriva da "calcio" (come, ad esempio, calcitonina e calmodulina) e "paina" che si riferisce alla somiglianza con altre tiolo-proteasi (come papaina e clostripaina). Anche se nei sistemi biologici esistono numerose proteasi e complessi proteolitici, le calpaine sono tra le poche attivate direttamente dagli ioni calcio, un secondo messaggero di primaria importanza per i processi di trasduzione del segnale. Le calpaine agiscono sulle proteine bersaglio in modo specifico mediante una digestione limitata e non degradativa che induce una modificazione, piuttosto che una perdita nella funzione fisiologica, del substrato. Come conseguenza dell'attivazione delle calpaine, è stato ampiamente dimostrato che in patologie, in cui si riscontra un'alterata omeostasi del calcio, queste proteasi sono attivate in maniera eccessiva, acquisiscono una funzione patologica e digeriscono le proteine bersaglio in modo incontrollato [7-11].

Un'attività aberrante della calpaina potrebbe anche essere correlata con l'espressione della subunità regolatoria. Recentemente alcuni autori hanno evidenziato che, in gliomi umani, un'aumentata espressione di CSS1 è associata a condizioni di malignità [12].

In particolare, è stato dimostrato che CSS1 agisce come modulatore della proliferazione e delle metastasi di differenti tipi di cellule tumorali [13-15].

Per stabilire se ci possa essere una correlazione tra i livelli di subunità regolatoria ed il sistema proteolitico calcio-dipendente abbiamo analizzato, *in vitro*, se vi siano delle differenze non solo nell'autoproteolisi della subunità regolatoria "endogena", normalmente associata alla subunità catalitica delle calpaine convenzionali, ma anche nella digestione/degradazione della CSS1 "esogena" da parte delle due calpaine-1 e -2. I due enzimi sono stati purificati da cellule di sangue periferico umano (PBMC), e la CSS1 "esogena" di origine umana, utilizzata come "substrato", è stata espressa come proteina ricombinante in *E. Coli*.

2. MATERIALI

- Plander (40000-50 g/500 ml), Lymphoprep (Cedarlane), resina Source 15Q, resina Phenyl-Sepharose, resina Glutathione agaroso G4510 (Sigma), Ca²⁺ ionophore A23187 (Sigma);
- ECL® Select Detection System comprato da GE-Healthcare;
- Le membrane di nitrocellulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA);
- La soluzione di acrilammide/bis- acrilammide al 30% (37,5:1) sono state acquistate da Bio-Rad;
- Gli anticorpi primari utilizzati in questo studio includono: anti calpaina-1 monoclonale di topo (diluizione 1: 1000, Sigma Aldrich); anti calpaina-2 policlonale di coniglio (diluizione 1:3000, Abcam); anti calpain small subunit 1 (CSS1) monoclonale di topo mAb (diluizione 1:1000, Merck);
- L'anticorpo secondario utilizzato: anti-mouse e anti-rabbit (Cell Signaling, dil 1:5000). Per la calpaina 1 di PBMC, quella eritrocitaria e per la CSS1 anti-mouse, mentre per la calpaina 2 di PBMC anti-rabbit.

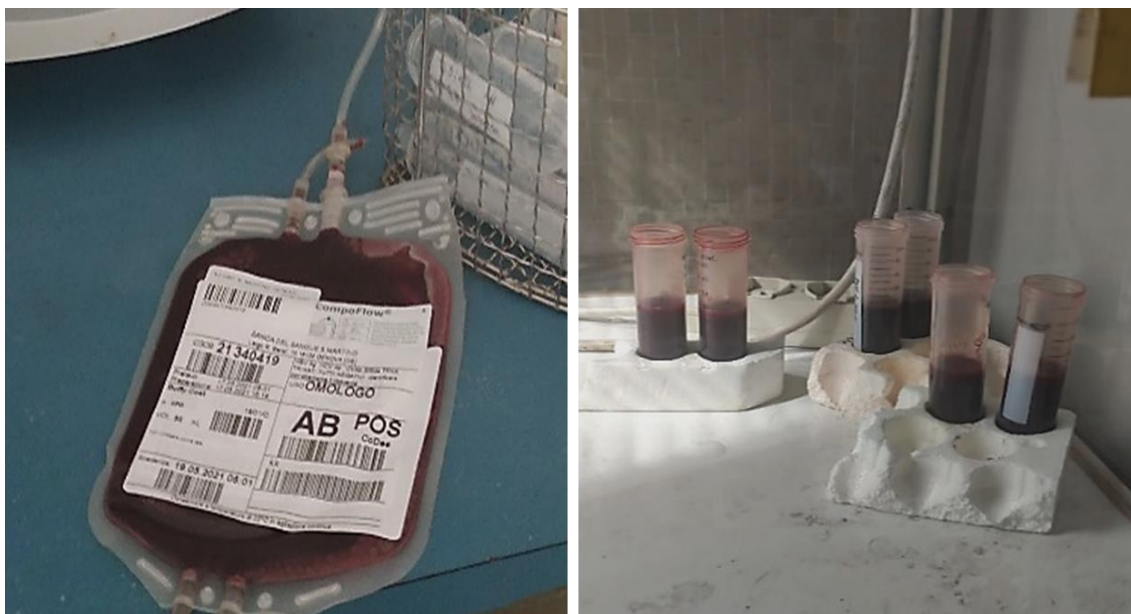
3. METODI

3.1. PREPARAZIONE DI LEUCOCITI DA SANGUE PERIFERICO UMANO (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)

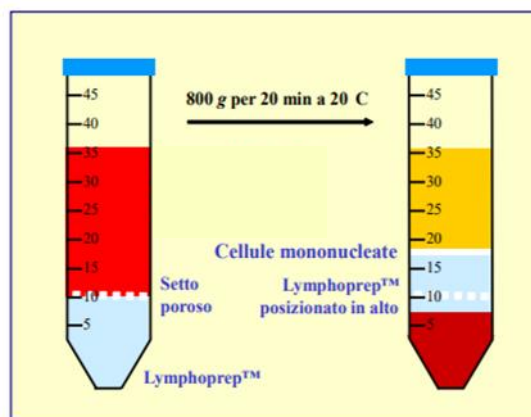
I Buffy coats, che sono stati forniti dal centro trasfusionale dell'Ospedale San Martino (IRCCS) a scopo di ricerca, sono stati preparati da sacche di sangue appena ottenute da donatori sani e controllati. Il concentrato di leucociti di ciascun buffy coat è stato trasferito in provette da 50 ml e diluito 1:5 in Plander.

Dopo aver mescolato, si lasciano sedimentare i campioni per 1 ora a circa 35/37°C.

Man mano che gli eritrociti sedimentano, si preleva il sopranatante (al massimo 20 ml) e si stratifica su 8 ml di Lymphoprep.



Successivamente si centrifugano i campioni, senza freno a 800 g per 20 min a 20°C.



Si trasferisce in un'altra provetta da 50 ml "l'anello" all'interfaccia tra Lymphoprep-plasma, scartando gli eritrociti e i granulociti eosinofili raccolti sul fondo, facendo attenzione a non prelevare né troppo del primo né troppo del secondo perché contenente piastrine che fanno aggregare il sangue.

Si aggiunge il tampone QUIN (10 mM HEPES pH 7,4, contenente 0,14 M NaCl, 5 mM KCl e 2 g/L glucosio) fino a volume in provette da 50 ml e si centrifuga a 800 g, per 10 min a 20°C.

Si risospendono le cellule raccolte sul fondo in Quin e si centrifuga per due volte a 400 g per 10 min, a 20°C. Alla fine le cellule sono risospese in 50 ml di Quin e contate.

3.2. PREPARAZIONE DI LISATI DI PBMC

I PBMC purificati (1×10^9) sono stati lisati in 2 ml 1 mM EDTA pH 7,0 e congelati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Successivamente, le preparazioni dei lisati di PBMC (17×10^9 totali) sono state scongelate e sono state effettuate 3 sonicazioni da 10 sec l'una in ghiaccio. In seguito, il campione è stato centrifugato a 60000 g per 10 min a 4°C e il soprannatante (lisato grezzo, 44 ml) è stato utilizzato per la purificazione delle calpaine.

3.3. PURIFICAZIONE DEGLI ISOENZIMI DELLA CALPAINA DA PBMC

Il lisato grezzo è stato sottoposto a una cromatografia a scambio ionico (**prima tappa**) su una colonna (13 ml), contenente resina SOURCE 15Q, equilibrata in 50 mM Na-Borato pH 7,5 contenente 0,1 mM EDTA e 0,5 mM di β -mercaptoetanololo (tampone A). Dopo il lavaggio estensivo della colonna, le proteine sono state eluite con tampone A contenente 0,5 M NaCl e l'eluato (100 ml) è stato concentrato, sotto azoto, per ultrafiltrazione ed è stato aggiunto il tampone A per avere una concentrazione 0,3 M NaCl finale.

Successivamente, il campione (30 ml) è stato sottoposto a una cromatografia per interazione idrofobica (**seconda tappa**) su una colonna (5 ml), contenente resina Phenyl Sepharose, equilibrata in tampone A contenente 0,3M NaCl. Dopo il lavaggio estensivo della colonna, le proteine (tra cui le calpaine) sono state eluite con tampone A privo di NaCl in frazioni da 2 ml. Questa seconda tappa di purificazione è necessaria per separare le calpaine dal loro inibitore naturale calpastatina che, non interagendo con questa resina, è dosabile nel non adsorbito (NA).

Terza tappa: le frazioni raccolte dopo la seconda tappa di purificazione sono state sottoposte ad una cromatografia a scambio ionico su una colonna (10 ml), contenente resina Source 15Q, equilibrata in tampone A. Le proteine sono state eluite con un gradiente lineare di NaCl 0-0,5M (40+40 ml), raccogliendo frazioni da 1 ml (flusso 0,5 ml/min) [16].

3.4. PURIFICAZIONE DELLA CALPAINA DA ERITROCITI UMANI

La calpaina eritrocitaria umana è stata purificata come riportato [17].

3.5. DOSAGGIO DELL' ATTIVITÀ DELLE CALPAINE

Un'aliquota di ogni frazione eluita dalla colonna (50 µl) è stata incubata 10 min a 30°C in presenza di tampone 50 mM Na-borato pH 7,5, contenente 1 mM CaCl₂ e 2 mg/ml globina come substrato (250 µl di volume di incubazione). Dopo 10 min, l'incubazione viene bloccata con 40 µl di 50% (p/V) acido tricloroacetico (TCA). La globina, utilizzata come "substrato", viene digerita dalle calpaine esponendo i gruppi amminici degli amminoacidi ai quali si lega la fluorescamina. Per separare la globina non digerita dagli amminoacidi liberati, in seguito alla digestione della calpaina, si centrifuga il campione a 1000 g per 10 min a 4°C e 200 µl di soprnatante vengono trasferiti in provette di vetro prima di procedere con la colorazione. Dopo la centrifugazione, la globina non digerita è raccolta sul fondo mentre i piccoli peptidi e gli amminoacidi liberi rimangono nel soprnatante.

A ciascuna provetta di vetro vengono aggiunti, per portare il pH a condizioni di neutralità, prima 2 ml di 0,5 M Na-Borato pH 8,5 e poi in agitazione 200 µl di fluorescamina (30 mg/100 ml di acetone).

La fluorescenza viene misurata utilizzando lo spettrofluorimetro (RF-5000 Shimadzu) ad una eccitazione/emissione di 384/475 nm.

Esempio di un dosaggio degli enzimi:

	Calp-1 GR		Calp-1 PBMC		Calp-2 PBMC
Campione*	50	100	50	100	100
Tampone A	50	/	50	/	/
Na-Borato 0,5 M pH 7,5	40	40	40	40	40
CaCl₂ 10 mM	50	50	50	50	50
CaCl₂ 1 mM	10	10	10	10	10
Globina (56,36 mg/ml)	18	18	18	18	18
H₂O	282	282	282	282	282
Volume incubazione [µl]	500	500	500	500	500

* gli enzimi sono diluiti nel tampone A

3.6. ESPRESSIONE DELLA SUBUNITÀ REGOLATORIA UMANA DELLA CALPAINA IN *E. COLI*

La sequenza della subunità regolatoria della calpaina (GenBank: NM_001749.4) è stata precedentemente clonata nel vettore di espressione batterico pGEX-6-P1 (Pharmacia Biotech), a valle rispetto alla proteina glutatione-S-transferasi (GST).

STIMOLAZIONE DEI BATTERI: per purificare la subunità regolatoria (CSS1) la colonia 12 è stata incubata overnight (ON) a 37°C, in agitazione, in 10 ml di medium di crescita Luria Bertani (LB) + ampicillina (0,1 mg/ml finale).

Il giorno dopo, i batteri sono stati diluiti in 100 ml di LB (senza ampicillina) e lasciati crescere in agitazione a 37°C.

Quando allo spettrofotometro, a una lunghezza d'onda di 600 nm, la densità ottica è maggiore di 0,5 vengono aggiunti, per stimolare la produzione della proteina di fusione GST-CSS1, 110 µl di 0,1 M isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) e lasciati in agitazione a 37°C. Dopo 4 ore di stimolo, si è isolato il pellet contenente i batteri tramite centrifugazione a 7700 g per 10 min a 4°C. Per rimuovere il residuo del medium di coltura, la preparazione batterica è stata risospesa in H₂O ghiacciata e centrifugata per 10 min a 4°C per due volte.

LISI DEI BATTERI: il pellet batterico è stato risospeso in H₂O ed è stato aggiunto il tampone di lisi (300 mM TRIS pH 8,0, contenente 30 mM EDTA, 450 mM NaCl, 3% Triton, 10 µl/ml inibitori proteasi e 1 mg/ml lisozima) in rapporto 1:3 (V/V).

Al campione (3 ml), dopo essere stato incubato per 20 min in ghiaccio, sono stati aggiunti 60 µl di MgCl₂ 1 M + 3 µl di 10 mg/ml DNasi e lasciati in ghiaccio per ulteriori 20 min. Infine, il lisato batterico è stato sonicato due volte per 10 sec e centrifugato a 50000 g per 5 min a 4°C. Il sopranatante (lisato grezzo) è stato raccolto e utilizzato per la purificazione della proteina di fusione GST-CSS1.

PURIFICAZIONE PROTEINA RICOMBINANTE: il lisato grezzo GST-CSS1 (3 ml) è stato lasciato adsorbire sulla resina GSH-agarosio (200 µl) ON, in rotazione, a 4°C. Il giorno successivo, il campione è stato centrifugato a 60 g per 5 min ed il sopranatante, contenente le proteine batteriche, è stato eliminato (non adsorbito, NA).

Alla resina, contenente la proteina di fusione GST-CSS1, sono stati aggiunti 5 ml di

tampone B (100 mM TRIS pH 8, contenente 0,15 M NaCl e 1 mM EDTA) ed il campione è stato lasciato in rotazione per 5 min a 25°C e successivamente centrifugato a 60 g per 5 min a 25°C. Questo passaggio è stato ripetuto per cinque volte in modo da rimuovere tutte le proteine contaminanti che si sono legate in modo aspecifico alla resina.

DISTACCO DI CSS1 DALLA PROTEINA DI FUSIONE GST-CSS1: la resina, contenente la proteina di fusione GST-CSS1, è stata equilibrata nel tampone di digestione (10 ml) della prescission protease™ (50 mM TRIS pH 7, contenente 0,15 M NaCl e 0,1 mM EDTA) mediante rotazione per 5 min a 25°C e centrifugazione a 60 g per 5 min.

Successivamente, la resina è stata risospesa in 1,5 ml di tampone di digestione + 1 mM di ditiotreitolo (DTT) e, dopo aver aggiunto 5 µl di prescission protease, il campione è stato lasciato in rotazione ON a 4°C.

Il giorno seguente il sopranatante, raccolto dopo centrifugazione (60 g per 5 min) e contenente la CSS1 purificata, è stato riunito insieme agli altri sopranatanti ottenuti da 5-6 lavaggi con il tampone di digestione e centrifugazione (60 g per 5 min per ogni lavaggio) in modo da recuperare tutta la CSS1 ricombinante.

I passaggi della purificazione sono stati controllati mediante SDS/PAGE.

3.7. ATTIVAZIONE DELLA CALPAINA-1 ERITROCITARIA E DELLE CALPAINE -1 E -2 DA PBMC

Dopo aver purificato la calpaina-1 eritrocitaria (GR-calpaina) e le calpaine -1 e -2 da PBMC, gli enzimi Ca²⁺-dipendenti (10 pmoli, in 102 µl) sono stati incubati in 50 mM Na-borato pH 7,5 contenenti rispettivamente 50 µM Ca²⁺ per la GR-calpaina, 40 µM Ca²⁺ per la calpaina-1 da PBMC e 400 µM Ca²⁺ per la calpaina-2 da PBMC, a 30°C. Ai tempi 0, 10, 20, 30, 40 min sono state prelevate aliquote (18 µl), mescolate con 4 µl di miscela per SDS/PAGE 6x, bollite 3 min a 95°C, sottoposte a SDS/PAGE e Western blotting utilizzando gli anticorpi specifici per le subunità catalitiche degli enzimi. L'anticorpo diretto contro la subunità catalitica della calpaina -1 di PBMC riconosce anche la subunità catalitica della calpaina-1 eritrocitaria.

3.8. ELETTROFORESI E WESTERN BLOT (WB)

Aliquote delle incubazioni sono state sottoposte ad elettroforesi denaturante SDS/PAGE (gel di poliacrilammide 10%) e le proteine, migrate per peso molecolare, sono state poi trasferite su membrane di nitrocellulosa mediante Western Blotting.

Per identificare la calpaina eritrocitaria (GR-calpaina), le calpaina-1 e -2 da PBMC e CSS1, le membrane di nitrocellulosa sono state incubate overnight con i rispettivi anticorpi primari seguiti da un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (per la GR-calpaina, la calpaina-1 e la CSS1 un anticorpo secondario murino, mentre per la calpaina-2 un anticorpo secondario di coniglio). Successivamente, sono stati visualizzati i segnali immunoreattivi mediante chemiluminescenza usando ECL Select Detection System. Il segnale è stato acquisito dall'apparato Bio-Rad ChemiDoc™ XRS e quantificato con la densitometria ottica utilizzando il software Quantity One 4.6.1 (Bio-Rad).

Come punto di riferimento sono stati utilizzati degli standard a peso molecolare noto (Sharpmass).

4. RISULTATI

4.1. ISOFORME DELLE CALPAINE DA CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO UMANO (PBMC)

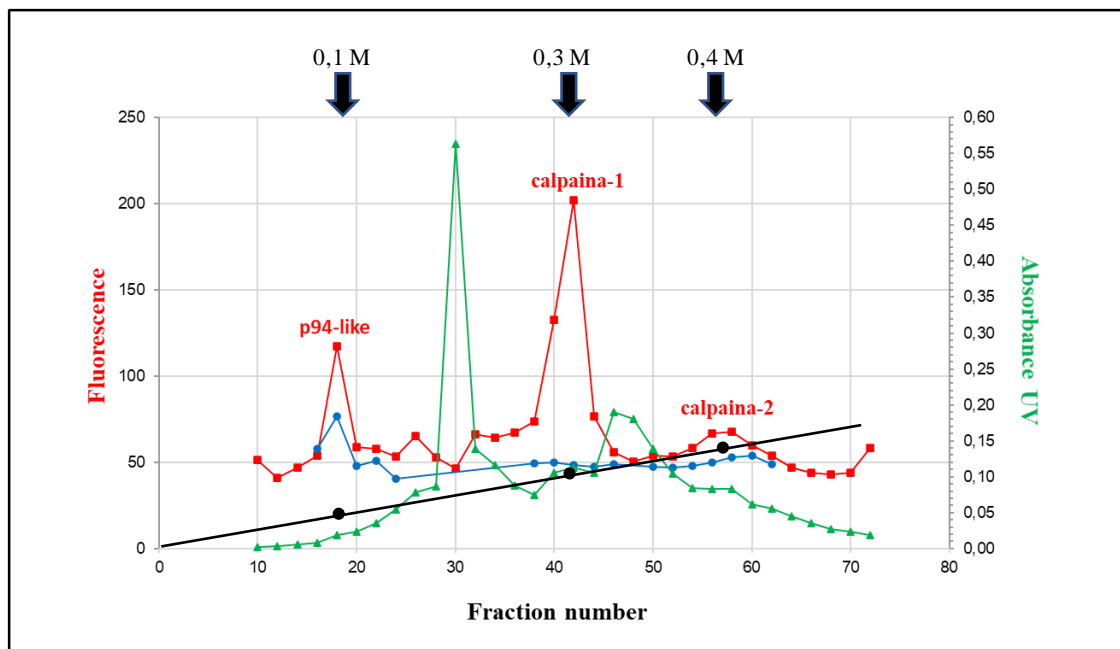


Figura 2. Purificazione degli enzimi del sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente da PBMC. Il lisato grezzo di PBMC (17×10^9) è stato sottoposto a due tappe di purificazione come descritto nei Metodi. Il materiale, raccolto dopo la cromatografia su Phenyl Sepharose, è stato cromatografato su Source 15Q e le proteine sono state eluite con un gradiente lineare di NaCl (0-0,5 M, indicato in nero). L'attività della calpaina (indicata in rosso) è stata misurata su aliquote di ciascuna frazione (50 μ l) in presenza di 1 mM Ca^{2+} come descritto nei Metodi. L'assorbanza a 280 nm è indicata in verde e l'attività Ca^{2+} -indipendente in blu.

Dopo la terza tappa di purificazione delle calpaine da PBMC, abbiamo separato tre picchi di attività Ca^{2+} -dipendente (vedi Figura 2) corrispondenti alle tre isoforme di calpaina identificate, in precedenza, nei PBMC [16]. Il primo picco di attività (frazioni 15-26) corrisponde all'isoforma "p94-like", identificata per la prima volta nei PBMC [16], ed eluisce ad una concentrazione di NaCl di circa 0.1 M. Il secondo picco di attività Ca^{2+} -dipendente corrisponde alla calpaina-1 (frazioni 38-44, eluizione a circa 0.3 M NaCl), l'isoforma più rappresentata nelle cellule circolanti del sangue. È da

notare che la seconda tappa di purificazione, su Phenyl Sepharose (vedi Metodi), è necessaria per separare la calpaina-1 dalla calpastatina che in queste condizioni co-eluiscono. Il terzo picco, che eluisce a circa 0,4 M NaCl, corrisponde invece alla calpaina 2. Questi tre picchi rappresentano effettivamente le calpaine, infatti, non abbiamo osservato alcuna attività in presenza di EDTA (tracciato blu nella Figura 2).

4.2. DIGESTIONE DELLA SUBUNITÀ REGOLATORIA DA PARTE DELLA CALPAINA-1 ERITROCITARIA

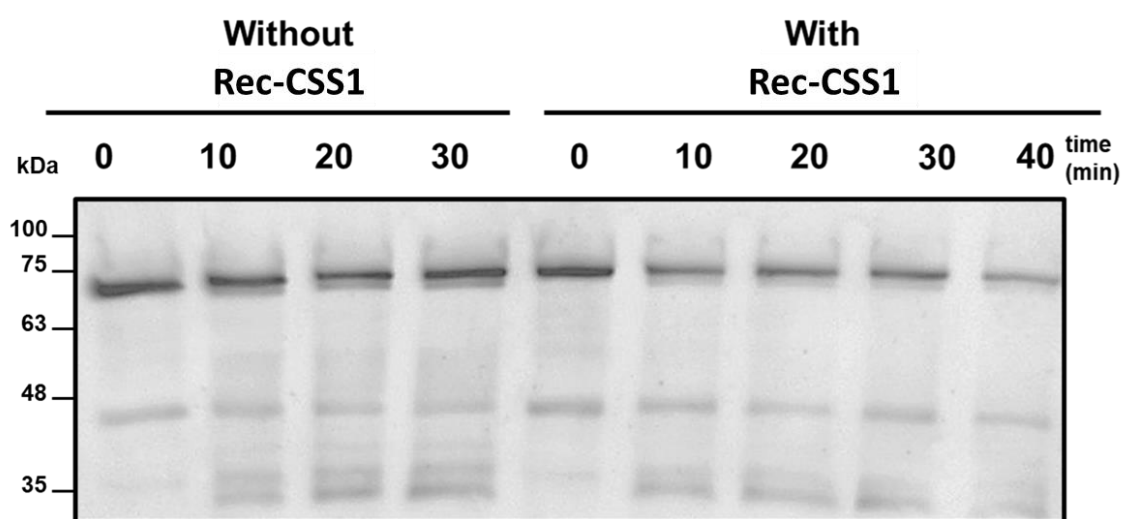


Figura 3. Autoproteolisi della calpaina eritrocitaria in presenza della subunità regolatoria umana ricombinante.

La calpaina di globulo rosso purificata (10 pmoli) è stata incubata in 50 mM Na-Borato pH 7.5, contenente 50 μ M Ca^{2+} a 30°C in assenza (without Rec-CSS1) e in presenza di CSS1 ricombinante (with Rec-CSS1) (0.25 μ g, 10 pmoli). Ai tempi indicati, aliquote di 18 μ l sono state prelevate, mescolate con 4 μ l di miscela per SDS/PAGE 6x, bollite 3 min a 95°C, sottoposte a SDS/PAGE (10%), e WB per identificare la subunità catalitica della calpaina eritrocitaria.

Come punto di riferimento per l'attivazione della calpaina-1 abbiamo utilizzato la calpaina-1 purificata da eritrociti umani. E' noto che l'attivazione della calpaina avviene mediante l'autoproteolisi della subunità catalitica. Specificamente, l'esposizione agli ioni Ca^{2+} induce un cambiamento conformazionale della proteasi, che porta alla rimozione di un frammento di \cong 5 kDa dalla regione N-terminale della subunità catalitica, con la conversione della forma nativa della subunità catalitica da 80 kDa alla

forma attivata di 75 kDa [3]. Nella Figura 3 a sinistra (without Rec-CSS1) si può osservare che la calpaina eritrocitaria esposta a $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$, in assenza di un substrato “esogeno”, viene convertita nella forma da 75 kDa già dopo 10 min di incubazione. La forma nativa, con il passare del tempo, diminuisce in favore di un aumento della forma da 75 kDa. E’ anche possibile osservare che, oltre alla “banda” da 75 kDa, l’anticorpo riconosce altri frammenti discreti prodotti dalla calpaina attivata. Quando abbiamo ripetuto l’esperimento in presenza della subunità regolatoria umana ricombinante della calpaina, purificata da *E. Coli* (vedi Metodi) (Figura 3, with Rec-CSS1), abbiamo osservato che la conversione $80 \rightarrow 75$ kDa sembra più accelerata e che la forma attivata diminuisce più velocemente. È da notare che, in presenza di Rec-CSS1, il tempo di incubazione è stato prolungato fino a 40 min.

Anche in questo esperimento si può apprezzare la presenza di frammenti discreti della calpaina che derivano dalla degradazione della subunità catalitica. Confrontando le due condizioni, in assenza e in presenza di CSS1 “esogena”, a parità di tempo di incubazione, si può osservare una maggiore attivazione/degradazione dell’enzima in presenza di Rec-CSS1.

È noto che, durante l’attivazione della calpaina-1 e -2, non solo la subunità catalitica ma anche la subunità regolatoria di 30 kDa (CSS1) subisce autoproteolisi con formazione di frammenti di peso molecolare diverso [3-4]. La CSS1, infatti, viene processata mediante la rimozione della regione idrofobica, vicino all’estremità N-terminale, ricca di glicina, con l’accumulo progressivo di forme discrete, tra cui vi sono due frammenti più rappresentati e più stabili rispettivamente di 21 e 18 kDa [4].

Per indagare se la subunità regolatoria ricombinante (Rec-CSS1), aggiunta in eccesso rispetto a quella già associata alla calpaina, possa essere riconosciuta come substrato anche dopo che la calpaina è attivata (75 kDa), come prima analisi abbiamo individuato la proteina CSS1 “endogena” con lo specifico anticorpo. A questo scopo, sapendo il PM della CSS1 ($\cong 30$ kDa), abbiamo utilizzato la parte inferiore della stessa membrana di nitrocellulosa mostrata nella Figura 3.

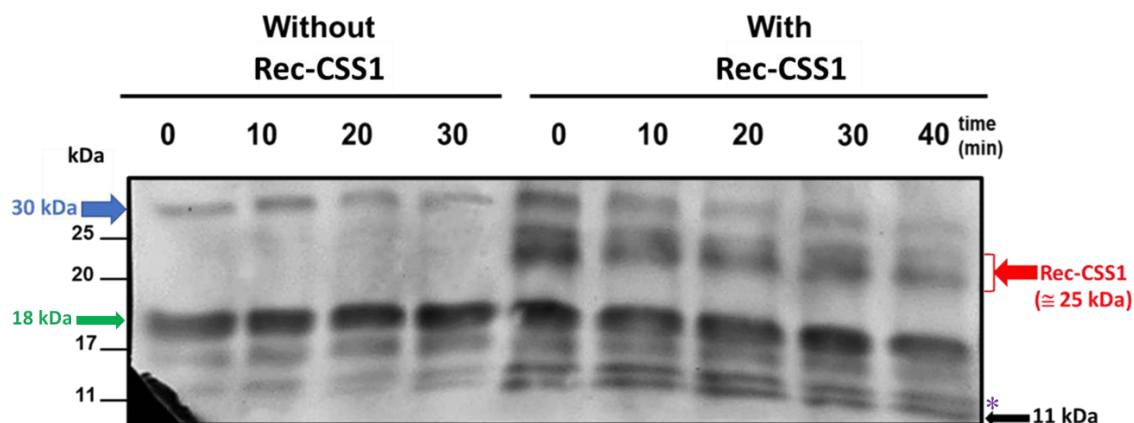


Figura 4. Digestione della subunità regolatoria ricombinante da parte della calpaina eritrocitaria.

La membrana di nitrocellulosa, mostrata nella Figura 3, è stata tagliata a livello della banda standard di PM 35 kDa e rilevata con l'anticorpo specifico contro la subunità regolatoria. La subunità regolatoria endogena (30 kDa) è indicata in blu, la subunità regolatoria ricombinante (Rec-CSS1) in rosso, in verde è mostrato il frammento di PM da 18 kDa, in nero la specie di PM di 11 kDa ed infine, in viola (asterisco), una banda proteica aspecifica di PM maggiore di 11 kDa.

Come si può osservare nella parte sinistra della Figura 4 (without Rec-CSS1), la subunità regolatoria "endogena" della calpaina eritrocitaria è già in parte digerita. Infatti, oltre alla forma nativa da 30 kDa, già al tempo zero è presente il frammento da 18 kDa ed è assente quello intermedio di $\cong 21$ kDa. Comunque, all'aumentare del tempo di esposizione agli ioni Ca^{2+} , si evidenzia una diminuzione della forma nativa di CSS1 in concomitanza con un aumento del frammento di 18 kDa. Questo risultato conferma che la calpaina eritrocitaria si è attivata e la subunità regolatoria è stata processata per autoproteolisi. Inoltre, si può anche osservare che, gradualmente, si accumula un'altra specie immunoreattiva con peso molecolare di $\cong 11$ kDa (freccia nera, in basso a destra della Figura 4).

In presenza di Rec-CSS1 (Figura 4 a destra, with Rec-CSS1) si evidenzia, oltre alla digestione della subunità regolatoria "endogena" (30 kDa), anche una graduale diminuzione della banda proteica relativa a Rec-CSS1 (freccia rossa). Questa osservazione indica che, in presenza di $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , la subunità regolatoria ricombinante (Rec-CSS1) è substrato della calpaina-1 eritrocitaria.

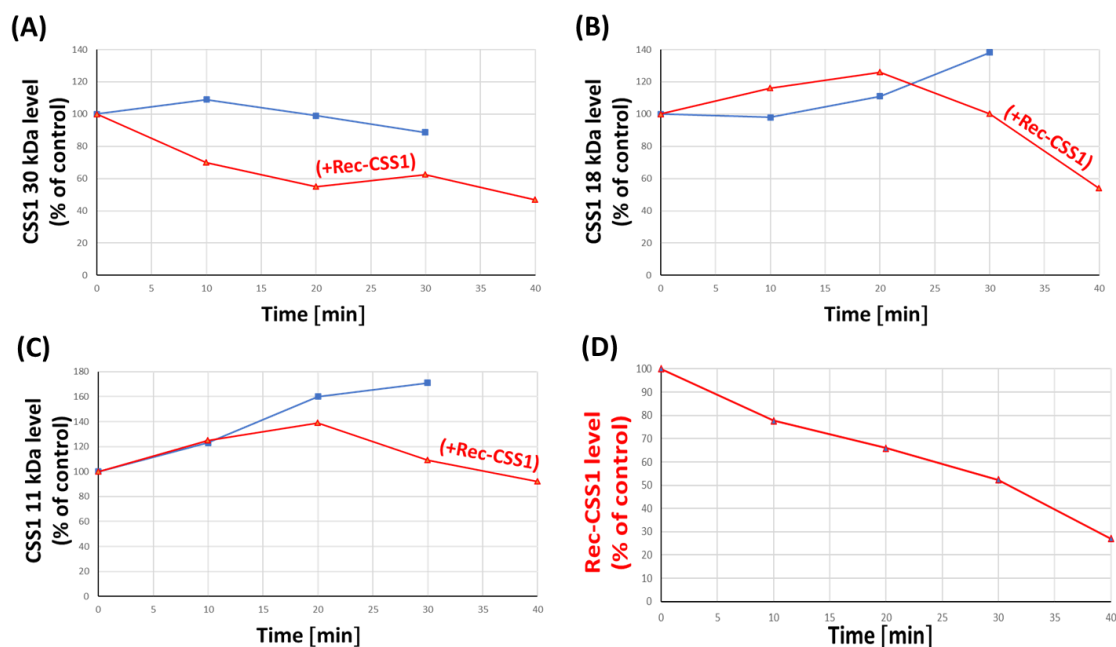


Figura 5. *Quantificazione delle diverse forme di CSS1 generate in seguito all'attivazione della calpaina-1 eritrocitaria.*

Le bande immunoreattive della CSS1, rilevate nella Figura 4, sono state quantificate mediante densitometria ottica utilizzando il software Quantity One 4.6.1 (vedi Metodi). I valori ottenuti sono stati calcolati in percentuale rispetto al controllo (tempo zero) di ciascuna condizione. (A) subunità regolatoria endogena 30 kDa, (B) frammento di 18 kDa, (C) frammento di 11 kDa, (D) subunità regolatoria ricombinante “esogena” (Rec-CSS1).

Confrontando le due condizioni (in assenza e in presenza di Rec-CSS1) si osserva che la forma nativa della subunità regolatoria “endogena” viene autoproteolizzata con maggiore efficacia se nell'incubazione è presente anche Rec-CSS1 (vedi Figura 5A). Contemporaneamente alla diminuzione della banda da 30 kDa, vi è un aumento sia del frammento da 18 kDa (Figura 5B) che di quello da 11 kDa (Figura 5C).

Tuttavia, in presenza di Rec-CSS1, si osserva che dopo 20 min di incubazione entrambi i frammenti diminuiscono, indicando una maggiore degradazione della CSS1 endogena in presenza del “substrato” Rec-CSS1. Questi risultati concordano con quanto evidenziato nella Figura 3, dove abbiamo osservato che in presenza di Rec-CSS1 la calpaina eritrocitaria è più attivata e digerisce la subunità regolatoria endogena con maggiore efficacia. Inoltre, come evidenziato nella Figura 5D, la proteasi, oltre a processare per autoproteolisi la CSS1 endogena, digerisce gradualmente anche la Rec-

CSS1. Dal grafico si osserva anche che la digestione di Rec-CSS1 è lineare nel tempo e la calpaina, dopo 40 min di incubazione, ha degradato circa il 70% della subunità regolatoria ricombinante “esogena”.

4.3. DIGESTIONE DELLA SUBUNITÀ REGOLATORIA DA PARTE DELLA CALPAINA-1 DA CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO UMANO (PBMC).

Gli esperimenti, effettuati con la calpaina-1 eritrocitaria, sono stati ripetuti utilizzando la stessa quantità (10 pmoli) di calpaina-1 purificata da PBMC (vedi Figura 2 e Metodi) ma incubando l'enzima in presenza di 40 μM Ca^{2+} . Come si può osservare nella Figura 6, anche in questo caso, l'attivazione della proteasi avviene mediante l'autoproteolisi della subunità catalitica con la graduale conversione della forma nativa (80 kDa) in quella attivata da 75 kDa.

Confrontando le due condizioni di incubazione, in assenza ed in presenza di CSS1 “esogena” (Figura 6), abbiamo riscontrato delle differenze durante il processo di autoproteolisi della subunità catalitica. Mentre in presenza di Rec-CSS1 (10 pmoli, rapporto 1:1 mol/mol con l'enzima) abbiamo osservato un incremento della calpaina attivata analogo a quello riscontrato in assenza di Rec-CSS1, riguardo alla forma nativa (80 kDa) non abbiamo evidenziato una scomparsa, bensì una diminuzione. Questo risultato sembra indicare una “protezione” della forma nativa dell'enzima in presenza di CSS1 “esogena” anche dopo 40 min di incubazione.

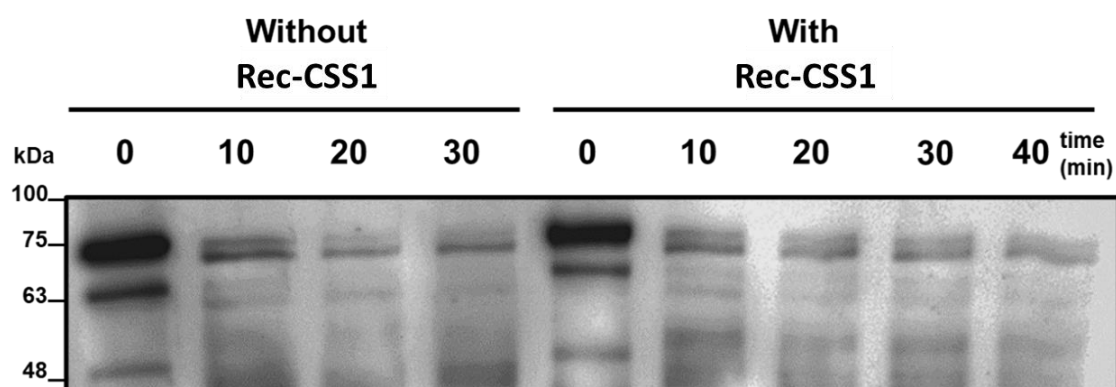


Figura 6. Autoproteolisi della calpaina-1 di PBMC in presenza della subunità regolatoria umana ricombinante.

La calpaina-1 purificata da PBMC (10 pmoli) è stata incubata in 50 mM Na-Borato pH 7.5, contenente 40 μM Ca^{2+} a 30°C in assenza e presenza di CSS1 ricombinante (0.25 μg , 10 pmoli). Ai tempi indicati, aliquote di 18 μl sono state prelevate, mescolate con 4 μl di miscela per SDS/PAGE 6x, bollite 3 min a 95°C e sottoposte a SDS/PAGE (10%), seguito da WB per identificare la subunità catalitica della calpaina-1 da PBMC.

Rispetto a quanto osservato con l'enzima eritrocitario, in assenza di Rec-CSS1, la calpaina-1 da PBMC si trasforma più rapidamente nella forma attivata. Infatti, già dopo 10 min di incubazione, la forma da 75 kDa è quella più rappresentata e dopo 30 min la forma nativa è praticamente scomparsa (confrontare Figura 3 con Figura 6, without Rec-CSS1). In presenza di Rec-CSS1, il rapporto 80 kDa/75 kDa della calpaina-1 da PBMC indica che la forma da 75 kDa è più resistente all'ulteriore degradazione rispetto alla calpaina-1 eritrocitaria (confrontare Figura 3 con Figura 6 with Rec-CSS1, 40 min di incubazione).

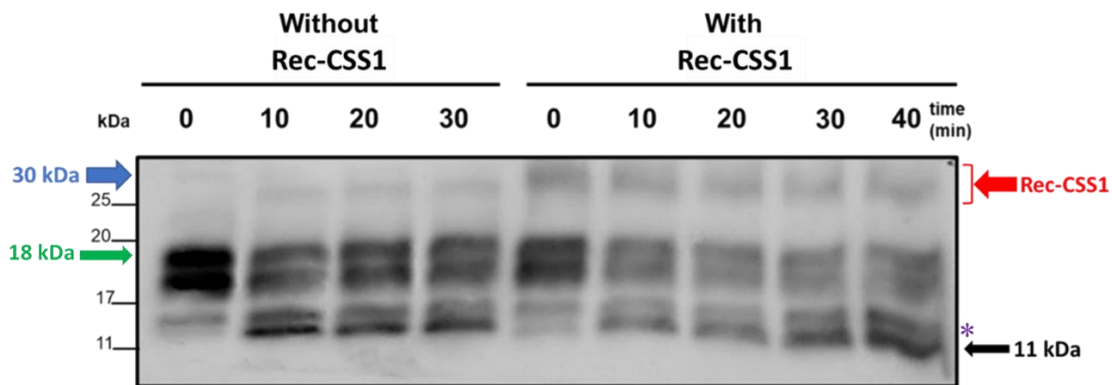


Figura 7. Digestione della subunità regolatoria umana ricombinante da parte della calpaina-1 da PBMC.

La membrana di nitrocellulosa, mostrata nella Figura 6, è stata tagliata a livello della banda standard di PM 35 kDa e rilevata con l'anticorpo specifico contro la subunità regolatoria. La subunità regolatoria endogena (30 kDa) è indicata in blu, la subunità regolatoria ricombinante (Rec-CSS1) in rosso, in verde è mostrato il frammento di PM di 18 kDa, in nero la specie di PM di 11 kDa e infine, rappresentata in viola (asterisco), una banda proteica aspecifica di PM maggiore di 11 kDa.

Per quanto riguarda i frammenti della subunità regolatoria prodotti in seguito all'autoprotelisi della calpaina-1 da PBMC, questi presentano mobilità elettroforetica simile a quelli rilevati nelle incubazioni contenenti la calpaina eritrocitaria (confronta re Figura 7 con Figura 4). Come si può osservare nella Figura 7 (without Rec-CSS1), la subunità regolatoria endogena, già al tempo zero, è quasi completamente digerita. Questa evidenza sperimentale, osservata in precedenza seppure in maniera minore con la calpaina eritrocitaria, è rilevata dalla presenza del frammento da 18 kDa e di altre forme di degradazione di peso molecolare minore. Però, il frammento da 18 kDa prodotto dalla calpaina-1 da PBMC, all'aumentare del tempo di incubazione in Ca^{2+} , viene degradato più rapidamente rispetto a quanto osservato con la calpaina eritrocitaria (confrontare Figura 8A con Figura 5B, tracciato blu).

Tuttavia è da notare, che il frammento da 18 kDa proviene dall'autoproteolisi della forma nativa della subunità regolatoria (30 kDa) [4] e nel caso della calpaina-1 da PBMC, la quantità di 30 kDa, al tempo zero, è minore rispetto a quella riscontrata con la calpaina eritrocitaria. Infatti, mentre in presenza della calpaina-1 da PBMC la quantità della forma da 18 kDa diminuisce già dopo 10 min di esposizione agli ioni Ca^{2+} , negli esperimenti effettuati con la calpaina 1 eritrocitaria la forma da 18 kDa si accumula nel

tempo. Al contrario, il frammento discreto di PM minore (11 kDa) si accumula in entrambi i casi (confrontare Figura 8B con Figura 5C tracciato blu) indicando che la specie da 18 kDa viene ulteriormente degradata e convertita nella forma di 11 kDa.

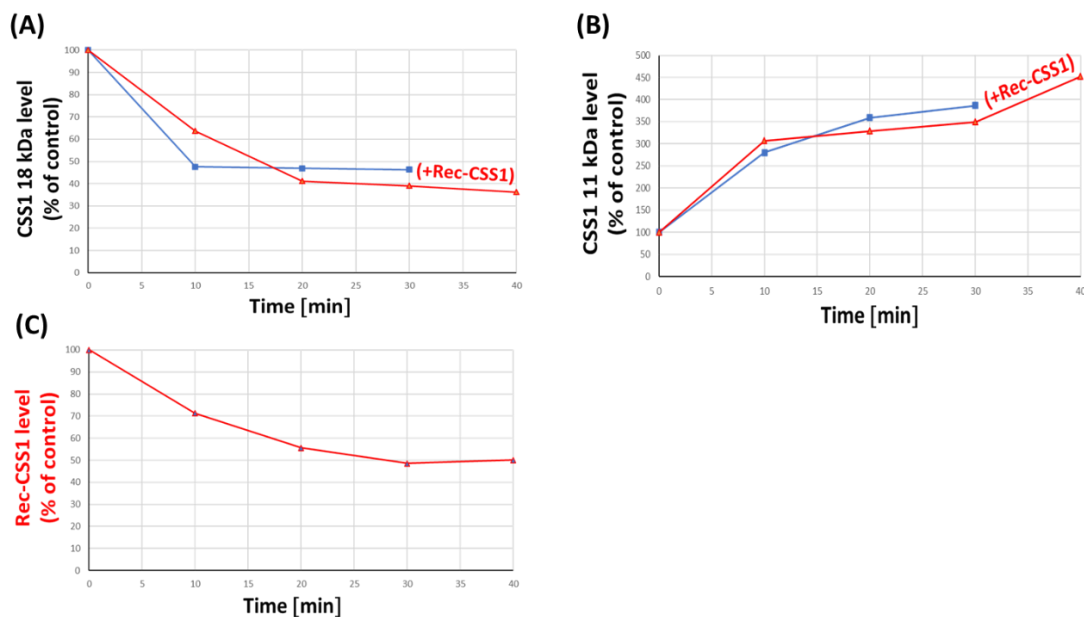


Figura 8. *Quantificazione delle diverse forme di CSS1 generate in seguito all'attivazione della calpaina-1 da PBMC.*

Le bande immunoreattive della CSS1, rilevate nella Figura 7, sono state quantificate mediante densitometria ottica utilizzando il software Quantity One 4.6.1 (vedi Metodi). I valori ottenuti sono stati calcolati in percentuale rispetto al controllo (tempo zero) di ciascuna condizione. (A) frammento di 18 kDa, (B) frammento di 11 kDa, (C) subunità regolatoria ricombinante “esogena” (Rec-CSS1).

In seguito all'aggiunta di Rec-CSS1 (Figura 7, a destra), abbiamo riscontrato, oltre alla digestione della subunità regolatoria “endogena” (30 kDa), anche una graduale diminuzione della banda proteica relativa a Rec-CSS1 (vedi Figura 8C). Questa osservazione indica che, in presenza di 40 μM Ca^{2+} , la subunità regolatoria ricombinante (Rec-CSS1) è substrato non solo della calpaina-1 eritrocitaria ma anche della calpaina-1 da PBMC. Dal grafico si osserva che la digestione di Rec-CSS1 è lineare nel tempo e la calpaina, dopo 40 min di incubazione, ha degradato circa il 50% della subunità regolatoria “esogena”.

Riguardo ai frammenti prodotti dalla calpaina-1 da PBMC, e confrontando le due condizioni (in assenza e in presenza di Rec-CSS1), si osserva, in entrambi i casi, una

diminuzione del frammento da 18 kDa (Figura 8A) ed un aumento di quello da 11 kDa (Figura 8B). L'andamento dei due grafici, che riportano le percentuali delle due forme da 18 e 11 kDa rispetto al tempo zero, indica che la presenza di subunità regolatoria "esogena" non ha effetto sull'attività proteolitica della calpaina-1 da PBMC.

4.4. DIGESTIONE DELLA SUBUNITÀ REGOLATORIA DA PARTE DELLA CALPAINA-2 DA PBMC

Abbiamo effettuato gli stessi esperimenti utilizzando la stessa quantità (10 pmoli) di calpaina-2 purificata da PBMC (vedi Figura 2 e Metodi) in presenza di 400 μM Ca^{2+} . Come si può osservare nella Figura 9, anche in questo caso, l'attivazione della proteasi avviene mediante l'autoproteolisi della subunità catalitica con una rapida conversione della forma nativa (80 kDa) in quella attivata da 75 kDa.

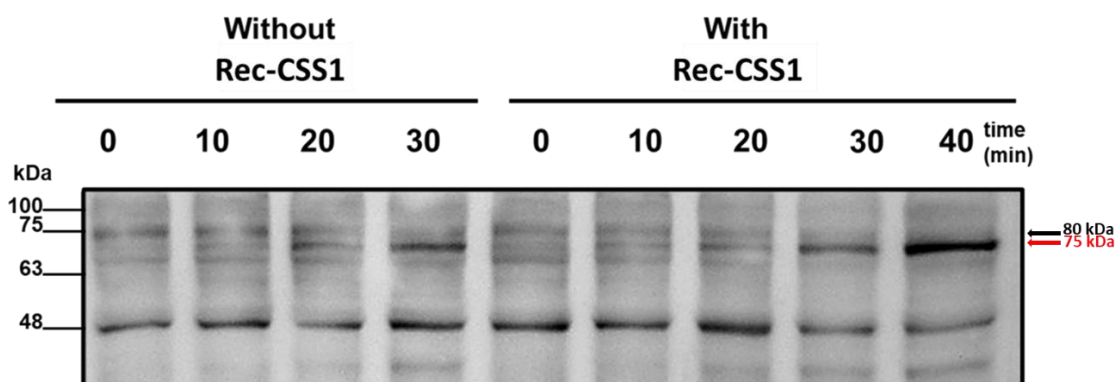


Figura 9. Autoproteolisi della calpaina-2 di PBMC in presenza della subunità regolatoria umana ricombinante.

La calpaina-2 purificata da PBMC (10 pmoli) è stata incubata in 50 mM Na-Borato pH 7.5, contenente 400 μM Ca^{2+} a 30°C in assenza e presenza di CSS1 ricombinante (0.25 μg , 10 pmoli). Ai tempi indicati, aliquote di 18 μl sono state prelevate, mescolate con 4 μl di miscela per SDS/PAGE 6x, bollite 3 min a 95°C e sottoposte a SDS/PAGE (10%), seguito da WB per identificare la subunità catalitica della calpaina-2. In nero (freccia) è mostrata la forma nativa della calpaina (80 kDa), mentre in rosso (freccia) la forma attivata (75 kDa).

Confrontando le due condizioni di incubazione, in assenza e in presenza di CSS1 "esogena" (10 pmoli, rapporto 1:1 con l'enzima) (Figura 9), non abbiamo riscontrato, durante il processo di autoproteolisi della subunità catalitica, differenze significative come quelle osservate nel caso della calpaina eritrocitaria e della calpaina-1 da PBMC.

Infatti, la forma da 80 kDa, col passare del tempo, sparisce in favore di quella da 75 kDa in maniera simile nelle due diverse condizioni (without/with Rec-CSS1). È da notare che il tempo di incubazione in presenza di Rec-CSS1 è stato prolungato fino a 40 min.

Se si confrontano tra di loro le 3 isoforme di calpaina, esaminate in questo lavoro, si osserva che dopo 30 min di esposizione agli ioni calcio, in presenza di Rec-CSS1, la forma attivata della calpaina-1 da PBMC e della calpaina-2 è la specie più rappresentata. Al contrario, nell'isoforma eritrocitaria la forma attivata si degrada più rapidamente e al tempo 30 min è praticamente scomparsa.

Quando abbiamo analizzato la digestione della subunità regolatoria "endogena" da parte della calpaina-2 da PBMC, abbiamo osservato che questa proteasi si comporta diversamente rispetto alle isoforme di calpaina-1. Nella Figura 10, al tempo zero, come osservato negli esperimenti precedenti, la forma nativa della subunità da 30 kDa non è visibile, è presente invece la forma da 18 kDa ma non quella a basso PM di $\cong 11$ kDa. Come già evidenziato nelle Figure 4 e 7, anche in questo caso, è presente una banda proteica aspecifica di PM maggiore di 11 kDa (vedi asterisco) non interessata dalla digestione da parte della calpaina.

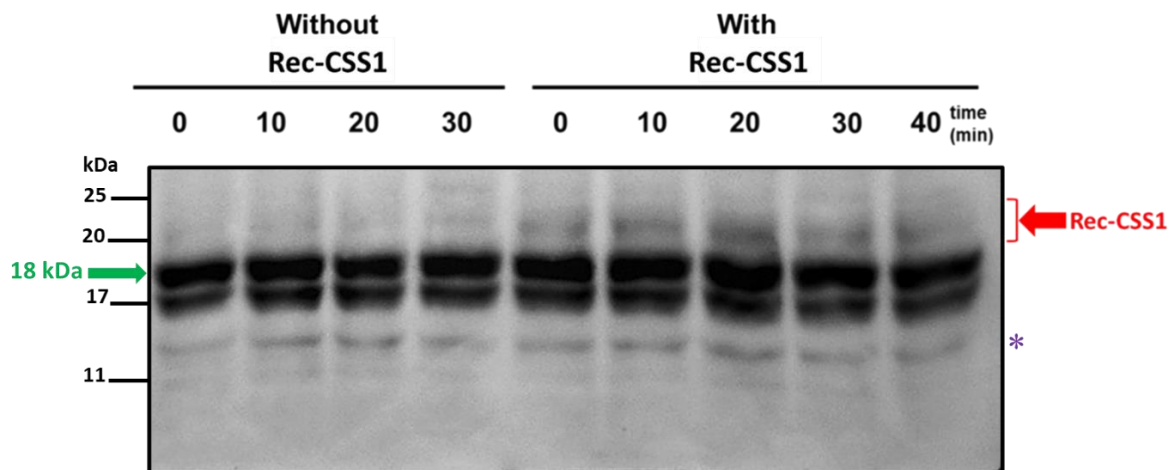


Figura 10. *Digestione della subunità regolatoria umana ricombinante da parte della calpaina-2 da PBMC.*

La membrana di nitrocellulosa, mostrata nella Figura 9, è stata tagliata a livello della banda standard di PM 35 kDa e rilevata con l'anticorpo specifico contro la subunità regolatoria. La subunità regolatoria ricombinante (Rec-CSS1) è indicata in rosso, il frammento da 18 kDa in verde, mentre in viola (asterisco) è mostrata la forma aspecifica di PM maggiore di 11 kDa.

In conclusione, abbiamo quantificato l'intensità del segnale immunoreattivo della forma da 18 kDa e della subunità regolatoria esogena nei diversi tempi di incubazione in presenza di 400 μM Ca^{2+} (Figura 11). Come si può osservare nella Figura, l'attivazione autoproteolitica della subunità catalitica della calpaina-2 da PBMC [3-4] non è correlata né con la formazione del frammento da 18 kDa della subunità regolatoria, che rimane pressochè uguale nel tempo, né con la digestione della CSS1 ricombinante.

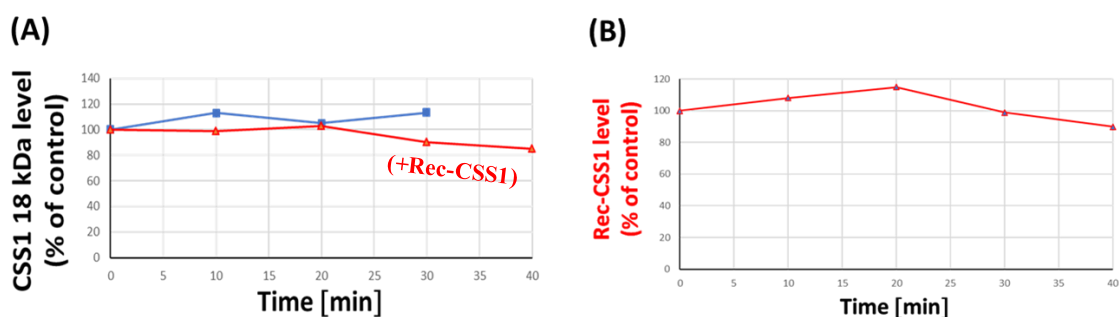


Figura 11. Quantificazione delle diverse forme di CSS1 generate in seguito all'attivazione della calpaina-2 da PBMC.

Le bande immunoreattive della CSS1, rilevate nella Figura 10, sono state quantificate mediante densitometria ottica utilizzando il software Quantity One 4.6.1 (vedi Metodi). I valori ottenuti sono stati calcolati in percentuale rispetto al controllo (tempo zero) di ciascuna condizione. (A) frammento di 18 kDa, (B) subunità regolatoria ricombinante "esogena" (Rec-CSS1).

Infatti, la banda immunoreattiva della Rec-CSS1 rimane uguale con il passare del tempo di incubazione, nonostante l'attivazione dell'enzima sia avvenuta in modo efficace (vedi Figura 9). Dato che la calpaina-2 è attiva e non abbiamo rilevato né diminuzione dei frammenti da 18 kDa, né comparsa/aumento di frammenti da 11 kDa, né variazioni nell'intensità della banda di Rec-CSS1, possiamo affermare che la calpaina-2 purificata da PBMC, in queste condizioni, non riconosce la subunità regolatoria come substrato.

5. DISCUSSIONE

Dal momento che le calpaine risultano coinvolte nella proliferazione e invasione tumorale [18-19], ed è stata recentemente scoperta una correlazione tra i livelli della subunità regolatoria della calpaina e la malignità di diversi tumori [12-15, 18-20], si è voluto indagare se le calpaine-1 e -2, purificate da sangue periferico umano, sono in grado di digerire *in vitro* la subunità regolatoria aggiunta in eccesso. Prima di tutto, per progettare correttamente l'esperimento di autoproteolisi/attivazione della calpaina, abbiamo utilizzato le condizioni già sperimentate con la calpaina eritrocitaria [21] e analizzato, oltre alla subunità catalitica, anche la subunità regolatoria "endogena". Come già riportato in precedenza, con la calpaina eritrocitaria si osserva l'autoproteolisi della CSS1 con la formazione di un frammento discreto di $\cong 18$ kDa [3]. Nei nostri esperimenti, la subunità regolatoria della calpaina di GR era già parzialmente digerita ma, nonostante questo, abbiamo potuto comunque apprezzare, oltre alla forma da 18 kDa, la graduale produzione di frammenti di PM minore ($\cong 11$ kDa, vedi Figura 4). Frammenti simili compaiono anche in seguito all'attivazione della calpaina-1 da PBMC. Dato che in questo caso, la forma nativa della CSS1 endogena (30 kDa) è quasi completamente assente, il frammento da 18 kDa viene degradato più rapidamente e non viene accumulato nel tempo (a differenza di quanto accade con la calpaina-1 eritrocitaria) non essendovi sufficiente autoproteolisi della subunità regolatoria nativa. Però, in entrambi i casi, si accumula la forma a minore PM da 11 kDa.

Riguardo alla calpaina-2 da PBMC, abbiamo osservato, anche in questo caso, l'assenza della forma nativa di CSS1 e la presenza del frammento da 18 kDa. A differenza di quanto osservato con le due forme di calpaina-1, non abbiamo visto, come già dimostrato in precedenza [3-4], né la degradazione della forma 18 kDa, né la comparsa di frammenti immunoreattivi a peso molecolare minore. Quindi, in questo caso, l'attivazione della calpaina-2 è dimostrata esclusivamente dall'autoproteolisi della subunità catalitica.

Abbiamo effettuato gli stessi esperimenti con la stessa quantità di ciascun enzima purificato in presenza di subunità regolatoria umana ricombinante (Rec-CSS1), in rapporto 1:1 (mol/mol) con l'enzima.

Confrontando tra di loro la calpaina-1 da PBMC con la calpaina-1 eritrocitaria, in presenza di Rec-CSS1 abbiamo osservato una maggiore efficienza di degradazione della subunità regolatoria “esogena” con la calpaina eritrocitaria. Infatti, dopo 40 min di incubazione, la calpaina da PBMC ha digerito circa la metà della Rec-CSS1, aggiunta in eccesso, invece del 70% osservato con la calpaina di globulo rosso. Questo dato sembra non concordare con l’osservazione che riguarda la conversione 80→75 kDa della subunità catalitica. Infatti, abbiamo riscontrato che, tra i due enzimi, la forma attivata (75 kDa) è più rappresentata negli esperimenti effettuati con la calpaina-1 da PBMC (confrontare Figure 3 e 6).

Riassumendo quanto già discusso in precedenza, in presenza della calpaina-2 il frammento da 18 kDa, prodotto dall’autoproteolisi della subunità regolatoria “endogena”, non diminuisce né aumenta durante il tempo di esposizione agli ioni calcio e la forma da 11 kDa non compare neanche dopo 40 min di incubazione. Per quanto riguarda la banda immunoreattiva della Rec-CSS1, anch’essa, al contrario di quanto riscontrato sia con la calpaina-1 eritrocitaria sia con quella da PBMC, resta invariata. Queste evidenze sperimentali indicano che la calpaina-2, *in vitro*, nonostante si sia quasi completamente convertita per autoproteolisi nella forma attivata da 75 kDa, non riconosce come substrato la subunità regolatoria ricombinante aggiunta in eccesso.

In conclusione, abbiamo dimostrato che la calpaina-2 da PBMC, a differenza della calpaina-1, indipendentemente che provenga da PBMC oppure da GR, non digerisce la subunità regolatoria se non per autoproteolisi. Questi dati indicano che vi sono delle differenze tra le due calpaine convenzionali del sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente.

Il razionale di queste indagini riguarda le recenti scoperte relative all’aumentata espressione di CSS1 in tumori maligni di diverse origini tissutali [12-15, 18-20] e alla sua correlazione con il Ki67, marker di proliferazione tumorale [22-23].

Infatti, proprio in questo laboratorio, durante precedenti studi riguardanti la caratterizzazione del sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente nel SNC (sono state analizzate 17 biopsie tissutali: 10 meningiomi e 7 glioblastomi), è stata evidenziata una correlazione tra i livelli relativi di CSS1 e Ki67, indipendentemente dal tipo di tumore esaminato. Come si può osservare nella Tabella, tale correlazione è significativa solo considerando i livelli di subunità regolatoria 30 kDa (CSS1) ($r= 0,5338$, $P= 0,0273$) e

non quelli della subunità catalitica, sia della calpaina-1 che della calpaina-2. In particolare, non è stata osservata alcuna relazione né valutando separatamente i livelli della forma da 80 kDa (NCalp-1, NCalp-2), né della forma attivata da 75 kDa (ACalp-1, ACalp-2) e neanche della somma 80 kDa + 75 kDa che indica la quantità di calpaina totale presente in ciascun campione analizzato.

Indice Ki 67	Livelli di Proteina	Valori di Spearman	
		r	P
Ki67	Quantità relativa di calpaina-1 totale	-0.3309	0.1946
Ki67	Quantità relativa di calpaina-2 totale	-0.2263	0.3824
Ki67	Quantità relativa di NCalp-1	-0.1993	0.4432
Ki67	Quantità relativa di NCalp-2	-0.2017	0.4375
Ki67	Quantità relativa di ACalp-1	-0.3813	0.1310
Ki67	Quantità relativa di ACalp-2	-0.1119	0.6689
Ki67	Quantità relativa di CSS1	0.5338	0.0273
Ki67	Acalp-1 %	0.0590	0.8218
Ki67	Acalp-2 %	0.0270	0.9179

Considerando che: 1) la subunità regolatoria si associa normalmente a formare eterodimeri con le subunità catalitiche di entrambe le calpaine-1 e -2 (in rapporto 1:1), 2) viene digerita per autoproteolisi durante l'attivazione della calpaina-1 e -2, e 3) un'aumentata espressione di CSS1 sembra correlata con la malignità di diversi tipi di tumori [12-15, 18-20], è stato naturale domandarsi se CSS1 potesse essere un bersaglio specifico della calpaina. Per tutti questi motivi abbiamo scelto come possibile substrato delle due calpaine da PBMC proprio la subunità regolatoria ricombinante.

I risultati ottenuti dai miei esperimenti, uniti ai dati rappresentati in Tabella, suggeriscono che, anche se non vi è apparente correlazione tra i livelli di subunità catalitica della calpaine -1 e -2 e il Ki67, l'attivazione della calpaina-1 potrebbe regolare la quantità di subunità regolatoria sia per autoproteolisi (processo che si verifica anche

durante l'attivazione della calpaina-2 [4]) sia per digestione di CSS1 come substrato. Di conseguenza, indirettamente l'attivazione/attività della calpaina-1 potrebbe essere correlata al Ki67 in questi tumori. Però, dal momento che nel citosol cellulare sono presenti altri componenti del sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente, come ad esempio la calpastatina, potrebbe accadere che la calpaina-1 non venga attivata oppure non sia attivabile. Quindi, è necessario misurare *in vivo*, su omogenati grezzi, ad esempio mediante zimografia, l'attività reale delle calpaine in presenza di calcio.

In ogni caso, tutte queste osservazioni rappresentano il punto di partenza per nuovi esperimenti che potrebbero essere utili a sviluppare una nuova strategia per il controllo dell'alterazione del sistema proteolitico calcio-dipendente nella progressione delle malattie umane, o semplicemente in condizioni di alterata omeostasi del calcio, oppure a seguito di trattamenti terapeutici.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Goll DE, et al. The calpain system. *Physiol Rev.* (2003); 83: 731-801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>
2. Sorimachi H, et al. Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* (2011); 87:287-327. <https://doi.org/10.2183/pjab.87.287>
3. Cong, J, et al. The role of autolysis in activity of the Ca^{2+} -dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 10096-10103
4. McCelland P, et al. Identification of major autolytic cleavage sites in the regulatory subunit of vascular calpain II. A comparison of partial amino-terminal sequences to deduced sequence from complementary DNA. *J Biol Chem.* (1989); 264: 17428-31.
5. Imajoh S, et al. The COOH-terminal E-F hand structure of calcium-activated neutral protease (CANP) is important for the association of subunits and resulting proteolytic activity. *J Biochem* (1987) 101: 447-52. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a121930>

6. Suzuki K. The structure of the calpains and the calpain gene in: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, edited by Mellgren RL and Murachi T. Boca Raton, FL: CRC, (1990), p. 25–35
 7. Ahmad S, et al. Bromine inhalation mimics ischemia-reperfusion cardiomyocyte injury and calpain activation in rats *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2019) 316: H212-H223. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00652.2017>
 8. Zaichick S V, et al. The role of Ca²⁺ signaling in Parkinson's disease. *Dis Model Mech.* (2017); 10: 519-535. <https://doi.org/10.1242/dmm.028738>
 9. Stifanese R, et al. Adaptive modifications in the calpain/calpastatin system in brain cells after persistent alteration in Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem.* (2010); 285: 631-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031674>
 10. Imam S A, et al. Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *J Neuroimmunol.* (2007) 190: 139-45. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.07.016>
 11. Swapan K Ray, et al. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Brain Res Rev.* (2003)42: 169-85. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(03\)00152-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(03)00152-8)
 12. Cai J J, et al. Increased expression of Capn4 is associated with the malignancy of human glioma. *CNS Neurosci. Ther.* (2014) 20: 521-527. <https://doi.org/10.1111/cns.12248>
 13. Bai D S, et al. Capn4 overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (2009) 49: 460-470. <https://doi.org/10.1002/hep.22638>
 14. Cheng F, et al. Capn4 promotes colorectal cancer cell proliferation by increasing MAPK7 through activation of the Wnt/ β -Catenin pathway. *Exp. Cell Res.* (2018) 363: 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.01.013>
 15. Li Y, et al. The oncoprotein HBXIP enhances migration of breast cancer cells through increasing filopodia formation involving MEKK2/ERK1/2/Capn4 signaling. *Cancer Lett.* (2014) 355 288-296. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.047>
 16. De Tullio R, et al. Characterization of a new p94-like calpain form in human lymphocytes. *Biochem.J.* (2003) 375: 689-696. <https://doi.org/10.1042/bj20030706>
 17. Michetti M, et al. Autolysis of human erythrocyte calpain produces two active enzyme forms with different cell localization. *FEBS Lett.* (1996) 392: 11-15. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00775-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00775-2)
-

18. Marín-Ramos I N, et al. Inhibition of motility by NEO100 through the calpain-1/RhoA pathway. *J Neurosurg* (2019) 16; 1-12. <https://doi.org/10.3171/2019.5.JNS19798>
19. Takahashi K, et al. Sialidase NEU3 defines invasive potential of human glioblastoma cells by regulating calpain-mediated proteolysis of focal adhesion proteins. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj.* (2017) 1861: 2778-2788. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.023>
20. Cai J J, et al. MiR-124 miR-124 suppresses the migration and invasion of glioma cells in vitro via Capn4. *Oncol Rep.* (2016) 35: 284-90. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4355>
21. R. De Tullio, et al. Unexpected role of the L-domain of calpastatin during the autoproteolytic activation of human erythrocyte calpain, *Biosci. Rep.* (2018) 38: BSR20180147. <https://doi.org/10.1042/BSR20180147>
22. Sun J, et al. The correlation between the expression of ADAM17, EGFR and Ki-67 in malignant gliomas. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2017) 21: 4595-4599.
23. Li J, et al. Prognostic Value of Ki-67/MIB-1 Expression in Meningioma Patients: A Meta-Analysis, *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* (2019) 29: 141-150. <https://doi.org/10.1615/critreukaryotgeneexpr.2019025430>

RINGRAZIAMENTI

Si conclude così un percorso, durato 2 anni, un percorso di alti e bassi, pieno di gioie e di sconforto, un percorso altalenante proprio come la vita. Sono qui a scrivere perchè vorrei ringraziare tutte quelle persone che sono state e che sono sempre lì a sostenermi, a sorreggermi anche quando sto per cadere, che mi supportano e sopportano.

Vorrei ringraziare la Professoressa Roberta De Tullio, relatrice di questa tesi di laurea per la pazienza e il tempo dedicatomi durante tutti questi mesi di tirocinio e per la passione e la conoscenza trasmessa. È sempre bello vedere degli insegnanti che amano il loro lavoro e che danno tutto per la ricerca.

Vorrei ringraziare tutta la mia famiglia. Ringrazio i miei genitori che mi hanno sempre tenuta per mano in questo cammino, che mi hanno sempre amata, protetta e accettata così come sono. Spero siate orgogliosi di me, perchè uno dei miei desideri più grandi, nella mia vita, è quello di rendervi fieri. Ringrazio i miei fratelli, Erica e Christian, ai quali, nonostante mi facciano impazzire la maggior parte del tempo, voglio un bene immenso. Non potrei mai vivere senza tutti voi.

Ringrazio mia nonna Anna, che mi ha sempre aiutata, ascoltandomi ripetere quasi ogni giorno. Mi hai ascoltata talmente tanto da poter sostenere gli esami al posto mio! Grazie per tutto e soprattutto per avermi spronata, anche quando non ho creduto in me stessa. Questa laurea è diventata realtà anche grazie a te.

Ringrazio i miei nonni, Vanna e Roberto che, anche se vivono lontani, mi sono sempre stati vicini con il cuore e con il pensiero. Mi avete sempre trattata come una principessa, viziata e coccolata, vi voglio un bene immenso!

Un ringraziamento speciale va però al mio ragazzo Daniele. Grazie per essere il mio migliore amico, il mio compagno di vita, il ragazzo migliore che potessi desiderare. Grazie per accettarmi così come sono, con i miei pregi e i miei mille difetti, grazie per supportarmi sempre, per incoraggiarmi e spronarmi a dare sempre il massimo. Spero tu sia orgoglioso di me come lo sono io di te.

Grazie a tutti i miei amici.

Infine vorrei dedicare questo traguardo a me stessa, sperando che possa essere l'inizio di un nuovo capitolo della mia vita, un piccolo passo in avanti per costruire il mio futuro.

