Uloga kalpaina u proteolizi mišićnog tkiva

Rak, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:860432

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ivana Rak

Uloga kalpaina u proteolizi mišićnog tkiva

Završni rad

Mentor:

dr. sc. Elizabeta Has-Schön, izv. prof.

Osijek, 2010.

Sažetak

Kalpainski enzimski sustav čine dvije sveprisutne proteaze, μ-kalpaina i *m*-kalpaina, te njihov inhibitor, kalpastatin. Kalpaini su heterodimeri koji se sastoje od dvije podjedinice: velike katalitičke veličine 80 kDa organizirane u četiri domene, te male regulatorne veličine 30 kDa organizirane u dvije domene. Na temelju dosadašnjih saznanja o katalitičkim svojstvima kalpaina, aktivnost kalpaina se regulira koncentracijom Ca^{2+}, autproteolizom, kalpastatinom, staničnom lokalizacijom i specifičnim područjem aktivnog mjesta. Kalpaini sudjeluju u različitim staničnim procesima uključujući staničnu mobilnost, prijenos signala, stanični ciklus, apoptozu, patološke bolesti i postmortalnu proteolizu. Mehanizam posmortalne proteolize mesa je vrlo složen proces u kojem sudjeluje velik broj različitih enzima. Glavnu ulogu u miofibrilarnoj proteolizi imaju kalpaini. Miofibrilarna žilavost posljedica je mrtvačke ukočenosti, dok je miofibrilarno omekšavanje uzrokovano cijepanjem miofibrilarnih proteina kalpainima. Na temelju važnih dosadašnjih dokaza, razjašnjeni su mnogi faktori koji utječu mekoću mesa.

Ključne riječi: μ-kalpain, *m*-kalpain, kalpastatin, proteoliza, meso

Summary

The calpain system consist of calpains, a family of Ca^{2+} dependent cysteine proteases whose members are expressed ubiquitously or in a tissue-specific way. Calpains are heterodimeric proteins, composed of catalytic subunit of about 80 kDa organised in 4 domains and the small 30 kDa subunit organised in 2 domains. Based on the current knowledge of the catalytic properties of the calpains, it seems that calpain activity is regulated by Ca^{2+} concentration, calpastatin, intracellular location and subsite specificity of the calpains. Calpains participate in a variety of cellular processes including cell motility, signal transduction pathways, the cell cycle, apoptosis, long-term potentiation, pathological states in cells and postmortem proteolysis. The exact mechanisms involved in the postmortem meat tenderization process are complex and includes a large number of different enzymes. The main myofibrillar proteolysis can be attributed to calpains. The myofibrillar toughness is considered to be affected by the development of rigor-mortis and tenderization caused by calpains break-down of the contractile proteins. Based on the relevant evidence thus far obtained, factors affecting meat tenderness, although not fully understood, are in perspective to be clarified.

Key words: μ-calpain, *m*-calpain, calpastatin, proteolysis, meat

Sadržaj

1.Uvod 5

2. Kalpainski enzimski sustav 6

2.1. Struktura kalpaina 6

2.2. Kalpastatin 10

3. Regulacija kalpainske aktivnosti 12

3.1. Autoproteolitičko cijepanje 12

3.2.Regulacija kalcijem 13

3.3. Regulacija vrlo specifičnim područjem aktivnog mjesta 14

3.4. Regulacija kalpastatinom 14

4. Uloga kalpaina 16

4.1. Kalpaini u postmortalnoj proteolizi mišićnog tkiva 18

5. Metode za mjerenje aktivnosti kalpaina 21

6. Zaključak 25

7. Popis literature 26

1.Uvod

Omekšavanje mesa jedno je od najistraživanijih područja u pogledu senzorske kvalitete mesa, ali unatoč tome ono zahtijeva daljnji napredak. Procesi uključeni u omekšavanje mesa uglavnom su enzimatski te uključuju proteolitičke sustave. Nakon smrti organizma (svinje, goveda i sl.), miofibrilarna struktura mišića se progresivno mijenja procesom proteolize tijekom pohrane mesa. Navedene promjene su odgovorne za omekšavanje mesa (Zamora i sur, 1996). Proteoliza je složeni biokemijski proces u kojem se proteini pod utjecajem endogenih enzima hidroliziraju u manje jedinice. Postmortalna razgradnja mišićnih proteina odvija se pod utjecajem mišićnih proteaza odnosno endopeptidaza koje sudjeluju u početnom omekšavanju mišićnog tkiva. Proteoliza u mišićima započinje oslobađanjem Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog retikuluma i aktivacijom kalpaina koji razlažu membranu i regulatorne proteine (Krvavica i sur, 2007)..

Dvije su hipoteze koje trenutno objašnjavaju omekšavanje mesa na osnovi enzimske biokemije. Prema prvoj hiptezi, na omekšavanje mesa utječe isključivo μ-kalpain, proteaza odgovorna za miofibrilarnu razgradnju proteina (Koohmaraie and Geesink, 2006). Drugi znanstvenici zastupaju hipotezu prema kojoj je mekšanje mesa multienzimski proces koji odgovara apoptozi u kojem μ-kalpain ima važanu ulogu (Luciano i sur, 2007). Može postojati značajna uloga multienzimskih kompleksa iako su miofibrili vrlo siromašni supstrati za taj proteolitički sustav. Isto tako, razgradnja strukture miofibrilnih proteina djelovanjem multienzimskih kompleksa ne oponaša razgradnju u postmortalnim mišićima. Prema tome, sustav kalpaina (ili neki drugi još neistražen sustav) ostaje proteolitičkim sustavom koji je odgovoran za postmortalnu proteolizu ključnih miofibrilnih proteina što rezultira omekšavanjem mesa (Koohmaraie i Geesink, 2006). Iako proces omekšavanja mesa nije potpuno razjašnjen, postoji čvrst dokaz da su kalpainski enzimi sudionici u postmortalnoj proteolizi (Huff-Lonergan i Lonergan, 1999; Huff-Lonergan i sur, 1996; Koohmarie, 1992).

2. Kalpainski enzimski sustav

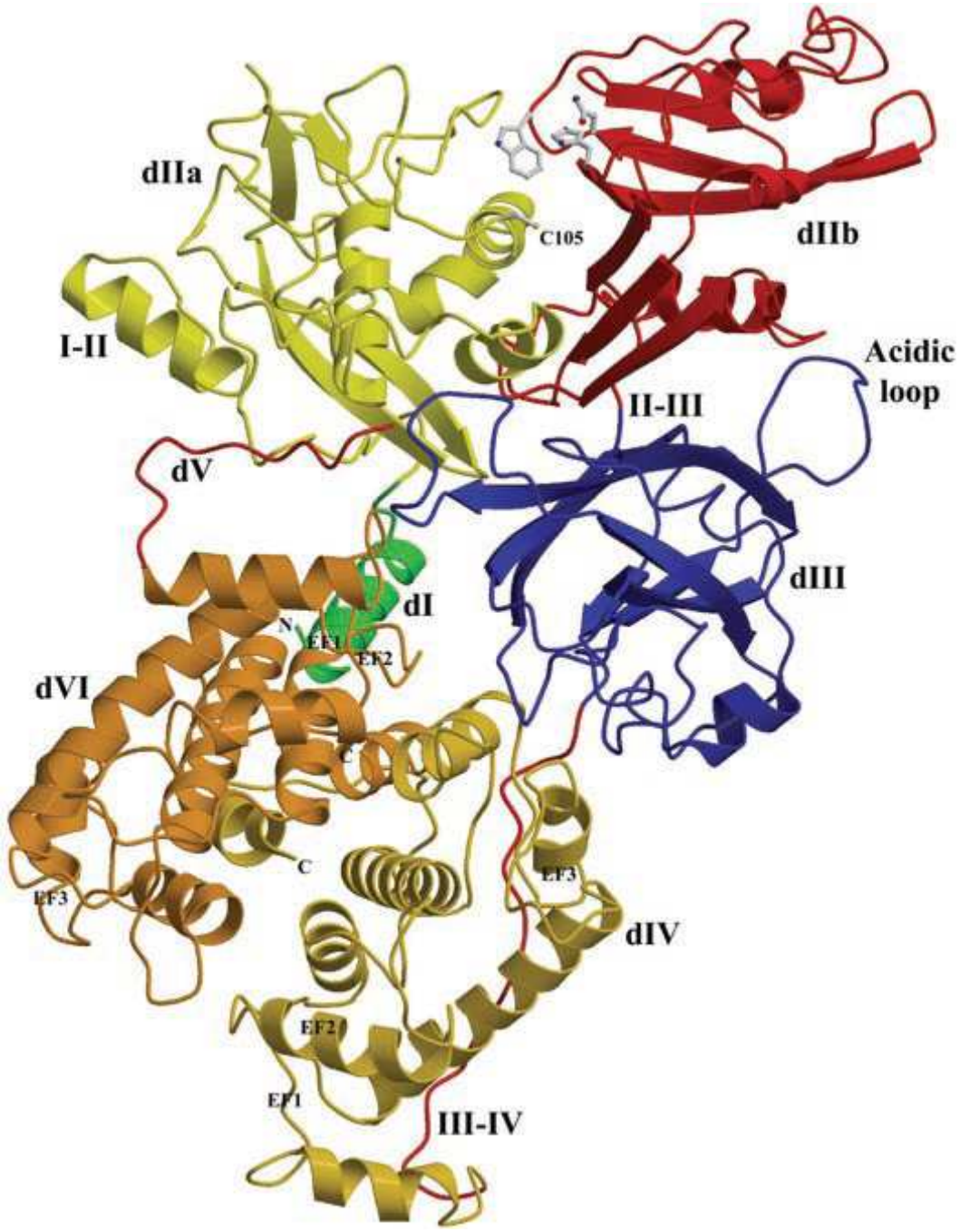
Kalpainski enzimski sustav se sastoji od dvije sveprisutne proteaze, *μ*-kalpaina i *m*-kalpaina, te njihova inhibitora, kalpastatina. Osim tri navedena, dobro karakterizirana proteina, pronađeno je još desetak cDNA molekula srodnih proteina. Suzuki i suradnici 1995. godine spominju i jedan tkivno specifični kalpain, p94 (kalpain 3). Iako je količina mRNA kalpaina 3 deset puta veća od količine mRNA *μ*- i *m*-kalpaina u stanicama skeletnih mišića, nije dokazana njegova uloga u *post mortem* proteolizi mišićnog tkiva (Koohmaraie i sur, 2002).

Kalpaini pripadaju porodici Ca^{2+}- ovisnih cisteinskih proteaza. Eksprimirani u obliku različitih ubikvitarnih i tkivno specifičnih izoformi široko su rasprostranjeni u višim organizmima. Homolozi katalitičkih podjedinica kalpaina su također prisutni i u nižim organizmima uključujući nematode, biljke, kvasce i muhe (Perrin i Huttenlocher, 2002).

2.1. Struktura kalpaina

Dvije najčešće izoforme kalpaina su *μ*-kalpain i *m*-kalpain (Slika 1). To su heterodimeri koji se sastoje od zajedničke, male regulatorne podjedinice (Capn4), veličine 28 kDa, i velike katalitičke podjedinice (80 kDa) koja se razlikuje kod *μ*- i *m*-kalpaina. Velike katalitičke podjedinice se međusobno razlikuju u količini kalcija potrebnoj za induciranje njihove aktivnosti. Tako, velika podjedinica *μ*-kalpaina (Capn1) zahtjeva koncentraciju kalcijevih iona reda veličine mikromola (3-50 *μ*M za postizanje polovice maksimalne aktivnosti), dok su velikoj podjedinici *m*-kalpaina (Capn2) potrebne koncentracije Ca^{2+} reda veličine milimola, i to 0.4-0.8 mM za postizanje polovice maksimalne aktivnosti.

Kalpaini su smješteni u citosolu, te se čini da su djelomično povezani sa substaničnim strukturama, kao što su miofibrili u skeletnim mišićima, citoskelet u nemišićnim stanicama, vezikule i plazma membrane. Maksimalnu aktivnost postižu kod neutralnog pH (oko pH 7.5) (Goll i sur, 2003; Perrin i Huttenlocher, 2002).



Slika 1. Kristalografska struktura humanog *m*-kalpaina. Domene, u različitim bojama, označene su kao: dI, dIIa, dIIb, dIII, dIV, dV i dVI. I-II je α-uzvojnica koja povezuje domene I i IIa. Vezna „domena“ je crvena linija između dIII i dIV (III-IV). Naznačeni su položaji veznih mjesta EF-1, EF-2 i EF-3 i domene IV i VI. Aktivna mjesta Cys, C105, su u sivoj boji kao i His-262, Asn-286 i Trp-288 na vrhu domene IIb. [Preuzeto od Goll i sur, 2003.]

Kalpaini sadrže šest domena s različitim funkcijama. Velika podjedinica je organizirana u četiri domene (domene I – IV), dok je mala podjedinica organizirana u dvije domene (domene V i VI). Iako je na temelju aminokiselinskog slijeda velika podjedinica podijeljena u četiti domene, kristalografska su istraživanja humanog *m*-kalpaina pokazala kako velika podjedinica ima šest "domena", od kojih dvije sadrže samo 18 (I domena, N-terminalna) i 17 (vezna domena) aminokiselinskih ostataka.

Domenu I čini N-terminalni kraj katalitičke podjedinice. Ima slijed aminokiselina koji ne pokazuje homologiju ni sa jednim drugim trenutno poznatim polipeptidnim slijedom. Sadrži autolitičko mjesto, a točna funkcija joj nije poznata.

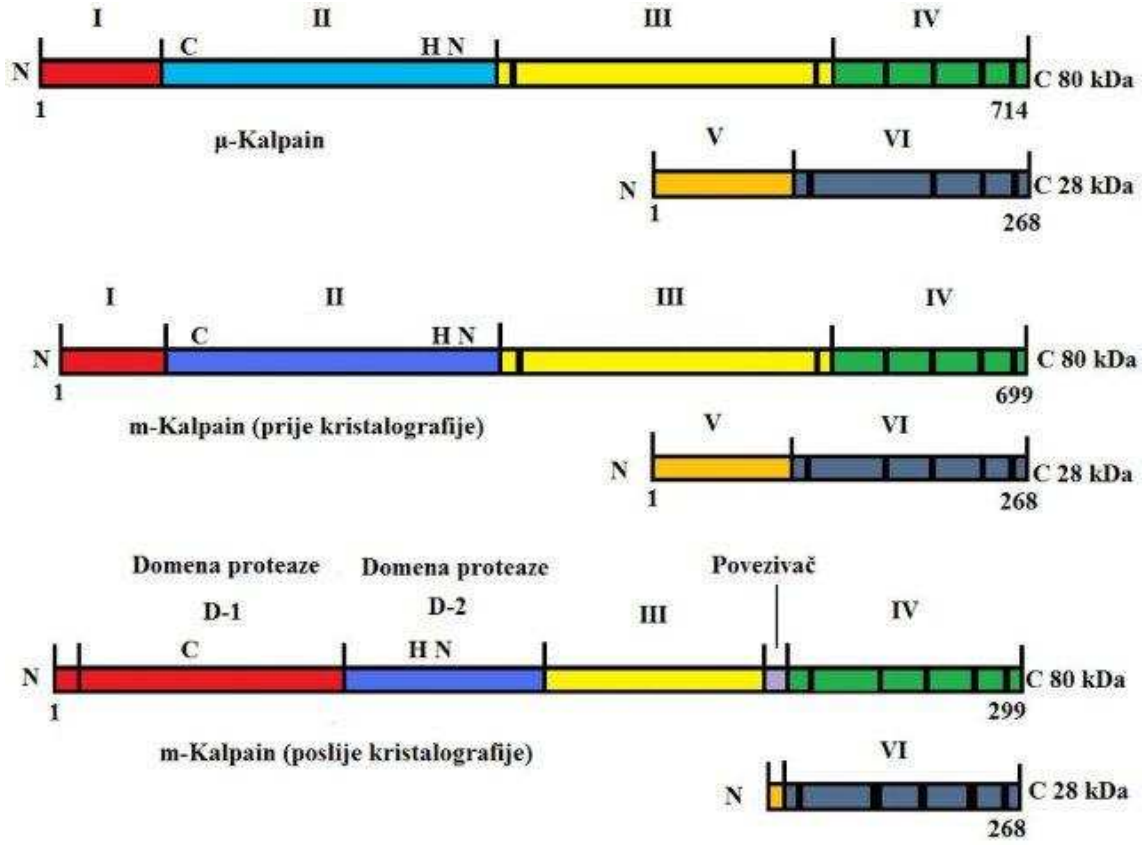
Domena II je proteolitička domena koja se može podijeliti na dvije poddomene, IIA i IIB. Sadrži Cys ostatak na mjestu 115 (μ-kalpain) ili 105 (*m*-kalpain), His ostatak na mjestu 272 (μ-kalpain) ili 262 (*m*-kalpain) i Asn ostatak na mjestu 296 (μ-kalpain) ili 286 (*m*-kalpain). Ova tri ostatka čine aktivno mjesto enzima, te zajedno tvore katalitičku trijadu karakterističnu za cisteinske proteaze kao što su papain i katepsini. Slijed domene II, međutim, vrlo se malo podudara s drugim cisteinskim proteazama, te je domena vjerojatno evoluirala iz nekog drugog srodnog gena.

Domena III je poveznica između katalitičke domene i domene IV za vezanje Ca^{2+}. Funkcija domene III jos nije poznata. Prema dosadašnim spoznajama smatra se da je uključena u vezanje fosfolipida te da na taj način može sudjelovati u interakciji sa staničnom membranom. Također se čini da sudjeluje i u regulaciji aktivnosti kalpaina svojim sudjelovanjem u bitnim elektrostatskim interakcijama.

Domena IV ima aminokiselinski slijed djelomično homologan sa kalmodulinskim slijedom, te sadrži EF strukture (*EF-hand*), tj. Ca^{2+} vezna mjesta (Slika 2). Kristalografskom analizom utvrđeno je pet EF struktura (EF-1, EF-2, EF-3, EF-4 i EF-5) od N-terminalnog kraja do C-terminalnog kraja velike podjedinice, bitne za vezanje kalcijevih iona. Peta, C-terminalna EF struktura sudjeluje u dimerizaciji velike i male podjedinice.

Domenu V čini N-terminalni kraj male podjedinice. Bogata je glicinskim aminokiselinskim ostacima, te se često opisuje kao hidrofobna domena.

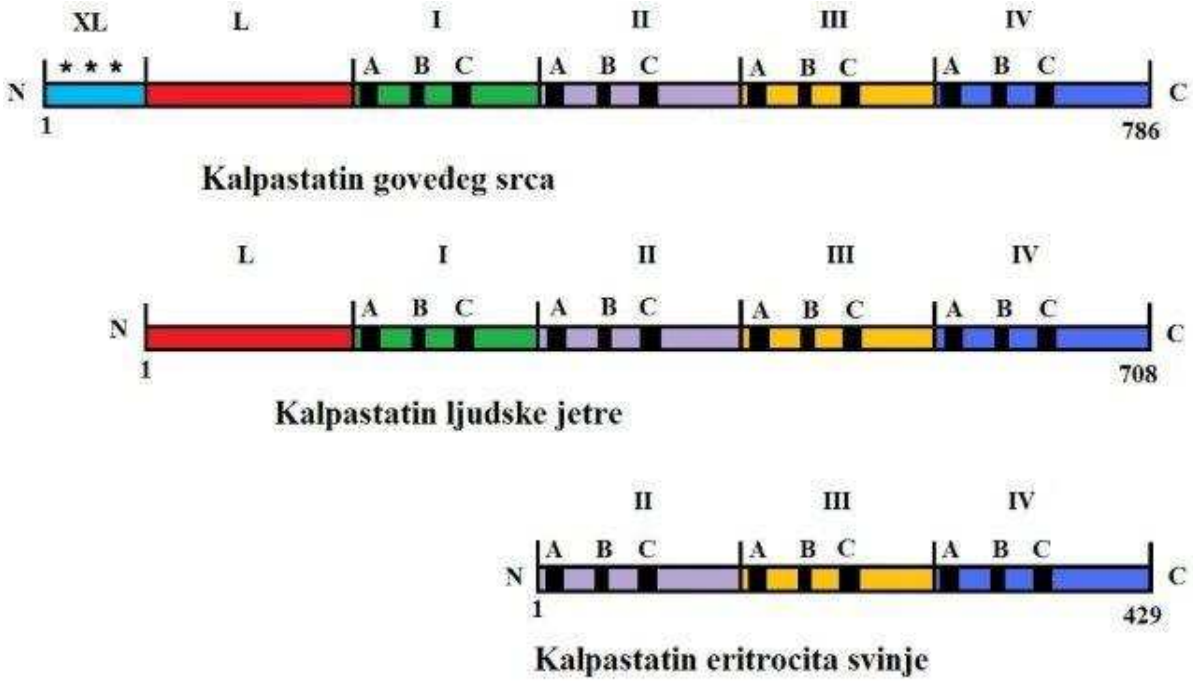
Poliprolin povezuje domenu V sa C-terminalnom domenom VI, koja je homologna domeni IV katalitičke podjedinice. Poput domene IV i domena VI je kalcij vezujuća domena, te je kristalografskom analizom utvrđeno pet EF struktura (Goll i sur, 2003; Strobl i sur, 2000; Hosfield i sur, 1999).



Slika 2. Shematski dijagram prikazuje strukturu domena humanog *μ*- i *m*-kalpaina predviđenu njihovim aminokiselinskim slijedom i strukturu domena humanog *m*-kalpaina određenu kristalografijom. Vertikalne trake prikazuju šest EF-veznih mjesta u 80-kDa podjedinici i pet EF-veznih mjesta u 28-kDa podjedinici. Kristalografska struktura *m*-kalpaina pokazuje da šesto EF-vezno mjesto predviđeno aminokiselinskim slijedom na granici domena II i III nema strukturu EF-veznog mjesta u kalpainskoj molekuli, te vjerojatno ne veže Ca^{2+}. Kristalografska analiza ukazuje na to da je EF-vezno mjesto na C-terminalnom kraju domene IV i VI 80- i 28-kDa podjedinicama uključeno u udruživanje tih podjedinica, a ne za vezanje Ca^{2+}. [Modificirano prema Goll i sur, 2003.]

2.2. Kalpastatin

Istraživanjem aktivnosti *m*-kalpaina u ekstraktima mišićnog tkiva otkriveno je da postoje i inhibitori njihove aktivnosti. Utvrđeno je da je inhibitor na toplinu neosjetljiv protein (do 100ºC) otporan na razne denaturirajuće agense kao što su urea, SDS ili triklorocetna kiselina. Inhibitor je nazvan kalpastatin. Rani pokušaji pročišćavanja kalpastatina dali su vrlo varijabilne rezultate na što je utjecalo jako puno faktora. Danas je poznato da je kalpastatin monomer, polipeptid spiralnog oblika (Goll i sur, 2003). Brojnim je istraživanjima otkrivena puno detaljnija struktura, oblik i karakteristike ovog inhibitora kalpaina. Kalpastatin se zajedno sa kalpainom nalazi u istom staničnom području i specifični je kompetitivni inhibitor kalpaina. Istraživanja su pokazala da sadrži četiri ponavljajuće inhibitorne domene I, II, III, IV, te N-terminalnu domenu koja nema inhibitorsku aktivnost i koja je nazvana domenom L (Slika 3). Aminokiselinski slijed inhibitorskih domena nije homologan ni s jednim peptidom što govori da je kalpastatin jedinstveni inhibitor. Svaka inhibitorska domena može inhibirati jednu molekulu kalapina tako da je prisutnost više domena objašnjenje zašto kalpastatin može inhibirati višestruke kalpainske molekule. Proučavanje aminokiselinskog slijeda kalpastatina iz različitih vrsta dovelo je do identifikacije 3 poddomene A, B i C (Wendt i sur, 2004). Inhibitorske mogućnosti pojedinih domena na μ- ili *m*-kalpainu razlikuju se prema svojoj učinkovitosti (Kawasaki i sur, 1989). Domena I je najučinkovitija inhibitorska domena, zatim slijede domena IV, domena III, te najmanje učinkovita domena II. Također, inhibicija μ-kalpaina je učinkovitija nego *m*-kalpaina. Razlozi različite mogućnosti inhibicije kalpaina pojedinim domenama još uvijek nisu poznati. Konzervirani aminokiselinski slijedovi svake domene su bitni za inhibitorsku aktivnost, te je mutacijom dviju aminokiselina u ovom području inhibitorska aktivnost kalpastatina gotovo potpuno poništena. Kalpastatin, kojem nedostaje poddomena B nema inhibitorsku aktivnost, kao ni kalpastatinske molekule kojima nedostaju važni aminokiselinski ostaci, iz čega se može zaključiti da je kompletna kalpastatinska molekula najučinkovitiji inhibitor (Goll i sur, 2003).



Slika 3. Shematski prikaz strukturnih domena tri različita oblika kalpastatina. Oblici kalpastatina koji sadrže L ili XL domene pronađeni su u tkivima različitih vrsta te nisu jedinstveni za navedene vrste i tkiva. A, B i C su tri poddomene u svakoj domeni. *** Tri mjesta na XL domeni su fosforilirana protein-kinazom A. [Modificirano prema Goll i sur, 2003.]

3. Regulacija kalpainske aktivnosti

S obzirom da su kalpaini proteaze prisutne u citoplazmi stanice u velikim količinama, te da na taj način mogu cijepati mnoge unutarstanične signalne i strukturne proteine, vrlo je važna složena strategija za prostornu i vremensku regulaciju aktivnosti kalpaina.

Još uvijek nije u potpunosti poznato kako kalpaini djeluju *in vivo*. Postoji niz dokaza da su kalpaini čvrsto regulirani brojnim mehanizmima, koji uključuju inhibitor kalpaina - kalpastatin, koncentraciju kalcija, autoproteolitičko cijepanje, aktivatore, fosfolipide. Također, kalpaini sadrže puno fosforilacijskih mjesta, tako da se njihova aktivnost može regulirati i fosforilacijom (Perrin i Hutenlocher, 2002).

3.1. Autoproteolitičko cijepanje

Danas je poznato da i μ- i *m*-kalpain podliježu autolizi kada se inkubiraju sa Ca^{2+} (Cong i sur, 1989). Iako nije neuobičajeno za proteolitičke enzime da podliježu autolizi, autoliza kaplaina ima nekoliko posebnih svojstava. Kratka autoliza u prisutnosti Ca^{2+} ima za posljedicu smanjenu potrebu za koncentracijom Ca^{2+} koja omogućuje postizanje polovice maksimalne aktivnosti μ-kalpaina i *m*-kalpaina bez utjecaja na specifičnu aktivnost drugih enzima (Goll i sur, 1995; Edmunds i sur, 1991). Autoliza reducira masu 80 kDa podjedinice μ-kalpaina na 76 kDa, masu 80 kDa *m*-kalpaina na 78 kDa, te masu zajedničke 28 kDa podjedinice μ- i *m*-kalpaina na 18 kDa (Graham-Siegenthaler i sur, 1994). Istraživanja slijeda aminokiselina pokazuju da su tijekom autolize iz velike i male podjedinice uklonjeni N-terminalni krajevi (Suzuki, 1990). Iako se autoliza događa brzo, ona se odvija u nekoliko koraka. Mala podjedinica *m*-kalpaina se autolizira brže nego velika podjedinica, dok se autoliza velike podjedinice u μ-kalpainskoj molekuli događa istom ili čak većom brzinom nego autoliza male podjedinice u ovoj molekuli (Brown i Crawford, 1993). Iako su biokemijske promjene koje prate autolizu već vrlo dobro okarakterizirane, fiziološko značenje autolize ostaje kontroverzno. Koncentracije Ca^{2+} potrebne za autolizu su slične ili malo više od onih potrebnih za proteolitičku aktivnost u živim stanicama (Cong i sur, 1989). Zbog sličnosti tih potreba za Ca^{2+}, u *in vitro* analizama

proteolitička aktivnost je praćena autolizom, osim ako koncentracije Ca^{2+} nisu pažljivo odabrane tako da budu malo niže od onih potrebnih za pokretanje autolize. Analize proteolitičke aktivnosti koja je praćena autolizom povećavaju vjerojatnost da su neautolizirani kalpaini zapravo proenzimi koji zahtjevaju autolizu za svoju aktivaciju (Mellgren, 1987). Koncept da su kalpaini proenzimi je široko prihvaćen u 1990-tima te su radovi opisivali autolizu kao „aktivaciju“ kalpaina. Iako su brojna istraživanja pokazivala da su neautolizirani μ-kalpain i neautolizirani *m*-kalpain (Goll i sur, 1992) aktivne proteaze, druga kinetička istraživanja su pronašla da autoliza prethodi proteolitičkoj aktivnosti kalpaina (Zalewska i sur, 2004). Kristalografijom je utvrđeno da autoliza kalpaina uklanja N-terminalne krajeve no ipak nije dokazano da N-terminalni krajevi blokiraju aktivno mjesto enzima. Stoga je pitanje jesu li neautolizirani kalpaini enzimski aktivni ili nisu još uvijek sporno (Goll i sur, 1992), no čini se da autoliza ima neku važnu ulogu u funkciji kalpaina. Moguće je da peptidi otpušteni tijekom autolize kalpaina imaju važna, a još uvijek neotkrivena svojstva. Stoga će uloga autolize u fiziološkoj funkciji kalpaina ostati aktivno područje istraživanja u nadolazećim godinama (Goll i sur, 2003).

3.2.Regulacija kalcijem

Utemeljeno na trenutnom znanju o katalitičkim svojstvima kalpaina, čini se da je kalpainska aktivnost u stanicama regulirana i promjenama koncentracije Ca^{2+} potrebnih za njenu proteolitičku aktivnost. Još od prve djelomične karakterizacije *m*-kalpaina bilo je jasno da su koncentracije Ca^{2+} potrebne za proteolitičke i druge aktivnosti puno veće od koncentracija Ca^{2+} koje se nalaze u živim stanicama. Samo su koncentracije Ca^{2+} potrebne za autolizu μ-kalpaina u fiziološkom rasponu (Maravall i sur, 2000).

Postoje brojni pokušaji da se identificira mehanizam za smanjivanje potrebnih Ca^{2+} za dva najčešća kalpaina. Ti su se pokušaji fokusirali na dva područja. Prvo, pronalaženje mehanizma za smanjenje koncentracije Ca^{2+} potrebnih za indukciju autolize s pretpostavkom da se autolizirani enzimi mogu aktivirati s fiziološkim koncentracijama Ca^{2+}. Drugo, brojna istraživanja su opisala molekule koje smanjuju potrebu kalpaina za Ca^{2+} u *in vitro* testovima (Goll i sur, 2003). Endogeni spojevi prisutni u mišićnim stanicama mogu reagirati s *m*-kalpainom reducirajući njegovu potrebu za kalcijem. Tako je zabilježena interakcija *m*-kalpaina s fosfolipidima te smanjenje koncentracije kalcija

potrebnog za autolizu (Arthur i Crawford, 1996; Cong i sur, 1989). Otkriveni su i proteinski aktivatori enzima kalpaina koji povećavaju katalitičku aktivnost kalpaina bez utjecaja na koncentracju Ca^{2+} potrebnu za proteolitičku aktivnost (Goll i sur, 2003).

Nadalje, brojni pokušaji da se odredi broj i afiniteti vezanja Ca^{2+} naišli su na nekoliko poteškoća. Prvo, kalpaini brzo autoliziraju u prisutnosti Ca^{2+} pa se moraju pronaći načini za spriječavanje autolize. Drugo, kalpaini se talože iznad određenih koncentracija Ca^{2+} te to taloženje utječe na mjerenja vezanja Ca^{2+} (Dutt i sur, 2000).

3.3. Regulacija vrlo specifičnim područjem aktivnog mjesta

Početne su studije pokazale da *m*-kalpaini razgrađuju tropomiozin, troponine i C protein, ali ne razgrađuju miozin i aktin, dva glavna proteina u mišićnom skeletu, što implicira da kalpaini imaju ograničeno i vrlo specifično područje u aktivnom mjestu (Dayton i sur, 1975). Kalpaini cijepaju proteine na ograničenom broju mjesta i stvaraju velike fragmente polipeptida, a ne male fragmente ili aminokiseline (Goll i sur, 1999).

3.4. Regulacija kalpastatinom

Poznato da je Ca^{2+} potreban kalpastatinu za vezanje i inhibiciju kalpaina pri čemu koncentracije Ca^{2+} potrebne za vezanje kalpaina na kalpastatin ovise o kalpainskoj molekuli (naime, ne postoje dokazi da kalpastatin veže kalcij). Također se zna da je inhibicija kalpastatinom povratna i da se vezani kalpain može otpustiti u nerazgrađenom obliku keliranjem Ca^{2+} s EDTA. U svim slučajevima osim kod neautoliziranog μ-kalpaina, koncentracija Ca^{2+} potrebna za vezanje kalpaina s kalpastatinom je znatno manja nego ona potrebna za pokretanje proteolitičke aktivnosti. Vezanje autolitičkih fragmenata kalpaina za kalpastatin prvo je ukazivalo na to da se kalpastatin veže za domene IV i VI kalpainske molekule. Daljnja istraživanja su pokazala da se poddomena A specifično veže za domenu IV kalpaina na Ca^{2+} ovisan način te da se poddomena C kalpastatina specifično veže za domenu VI kalpaina. Kalpastatinski peptidi koji sadrže samo poddomenu B ne blokiraju vezanje kalpaina za stanične membrane iako reduciraju stopu autolize kalpaina. Izraženi

kalpastatinski fragmenti koji sadrže samo poddomene A i C a ne i poddomenu B, blokiraju vezanje kalpaina za stanične membrane, ali ne utječu na brzinu autolize.

Budući da su koncentracije Ca^{2+} potrebne za vezanje kalpastatina s kalpainima manje nego one potrebne za pokretanje njihove proteolitičke aktivnosti, stanice moraju posjedovati neki mehanizam koji bi omogućio kalpainsku aktivnost u prisutnosti kalpastatina. U suprotnom bi rastuća koncentracija Ca^{2+} uzrokovala vezanje kalpastatina prije nego su kalpaini u mogućnosti započeti proteolitičku aktivnost. Ovaj mehanizam može uključivati pomicanje kalpaina od kalpastatina ili smanjenje koncentracije Ca^{2+} potrebne za proteolitičku aktivnost kalpaina bez utjecaja na koncentraciju Ca^{2+} potrebnu za vezanje kalpastatina, ili obje ove mogućnosti. Trenutno dostupne informacije dovode do nekoliko zaključaka o inhibiciji kalpaina kalpastatinom i postavljaju nekoliko pitanja.

1) Učinkovita inhibicija kalpaina kalpastatinom zahtjeva vezanje kalpastatina na kalpaine na tri mjesta u kalpainskoj molekuli: Ca^{2+} ovisno vezanje poddomene A kalpastatina za domenu IV kalpaina i poddomene C kalpastatina za domenu VI kalpaina, kao i vezanje poddomene B kalpastatina za područje blizu aktivnog mjesta kalpaina.
2) Vezanje fragmenata kalpastatina koji sadrže poddomene A i C za kalpaine spriječava vezanje kalpaina za membrane iz čega se zaključuje da vezanje kalpaina za membrane uključuje domene IV i VI kalpainske molekule. Nije jasno je li vezanje kalpaina za stanične membrane povezano uz vezanje fosfolipida za kalpaine.
3) Budući da najučinkovitija inhibicija kalpaina kalpastatinom zahtjeva sve kalpastatinske poddomene (A, B, C) vjerojatno je da se za maksimalnu inhibitorsku učinkovitost sve tri poddomene moraju vezati za kalpain istovremeno. Kalpastatin se ne može učinkovito vezati na kalpain kojemu nedostaju domene IV i VI ili ako kapastatinu nedostaju poddomene (Goll i sur, 2003).

4. Uloga kalpaina

U posljednjih se pedeset godina povećao interes za izučavanjem uloge kalpaina u fiziološkim i patološkim procesima. Posljednja istraživanja fokusirana su na povezanost kalpaina s procesima na razini tkiva i organa poput ozljeda mozga i ishemije (Vanderklish i Bahr, 2000), mišićne distrofije (Sorimachi i Suzuki, 2000) i dijabetesa (Horikawa i sur, 2000). Uzrok bolesti vezanih za kalpain je porast koncentracije Ca^{2+} unutar stanice kao posljedica razgradnje proteina ili polipeptida koji su poznati kao supstrati kalpaina. Uloga kalpaina 3 u mišićnoj distrofiji udova, moguća uloga kalpaina 9 u tumorima, te uloga kalpaina 10 u dijabetesu tipa II su iznimke, jer je uzrok bolesti mutacija gena za kalpain (Goll i sur, 2003). Mišićna distrofija je bila prva bolest povezana s aktivnošću kalpaina. Gotovo sve vrste mišićnih distrofija uključuju gubitak Ca^{2+}. Najčešće distrofije, Duchenneova i Becherova, uzrokovane su mutacijom gena koji kodira protein distrofin. Gubitak distrofina dovodi do omekšavanja plazmatske membrane stanica skeletnh mišića i dolazi do ulaza izvanstaničnog Ca^{2+} u mišićne stanice. Stanična koncentracija Ca^{2+} raste, što aktivira kalpaine (Jacquemond, 1997). Alzheimerova bolest, stvaranje mrena, infarkt miokarda, multipla skleroza, ishemija, traumatske ozljede mozga i cijeli niz drugih bolesti povezani su s kalpainima ili neodgovarajućom aktivnošću kalpaina. Očit dokaz je povećana količina *m*-kalpaina u citosolnoj, ali ne i membranskoj frakciji (Tsuji i sur, 1998) te u neurofibrilarnim snopićima (Grynspan i sur, 1997) u mozgu kod Alzheimerove bolesnika. Omjer autoliziranih prema neautoliziranim μ-kalpainima je trostruko veći i količina kalpastatina je niža u prednjem dijelu mozga kod Alzheimerove bolesti nego kod normalnog mozga (Nixon i Mohan, 1999). Dominantni kalpain u leći oka, m-kalpain, aktiviran je injektiranjem Ca^{2+} u koncentracijama od 1000 μM što uzrokuje cijepanje α- i β-kristala. Nastali fragmenti kristala se spajaju pri čemu tvore mrene (Goll i sur, 2003). U ishemijskim područjima raste stanična koncentracija Ca^{2+}, pokretajući neprikladnu kalpainsku aktivnost. Dezmin i α-spektrin su razgrađeni u ishemijskim srcima, a razgradnja se pojavljuje nakon povećanja Ca^{2+} (Tsuji i sur, 2001) i inhibirana je sintetičkim kalpainskim inhibitorima. Pronađeno je da koncentracije *m*-kalpaina, a zatim i μ-kalpaina rastu nakon infarkta miokarda (Sandmann i sur, 2001).

Iako je fiziološka uloga kalpaina još uvijek slabo razumljiva i neistražena, pokazalo se da kalpaini imaju ulogu u važnom području stanične biologije, u staničnoj mobilnosti i staničnim ciklusima (Glading i sur, 2002). Posebno očit dokaz o ulozi kalpaina u staničnom ciklusu je uloga u mitozi i mejozi. Inaktivni oblik kalpaina inaktivira citostatički faktor (CSF) koji je važan za otpuštanje jajnih stanica iz metafaze. Pri fertilizaciji, povećana koncentracija Ca^{2+} bi aktivirala kalpain i ne bi došlo do otpuštanja jajnih stanica. Najdirektniji dokaz o ulozi kalpaina u mejozi je injektiranje *m*-kalpaina u jezgru. Kada se injekcija obavlja u interfazi, dolazi do brzog prijelaza u metafazu, a kada se injekcija kalpaina obavlja u metafazi, dolazi do brzog prijelaza u anafazu (Carafoli i Molinari, 1998). Pod određenim fiziološkim uvjetima, kalpaini reguliraju i zgrušavanje krvi, igraju važnu ulogu u pamćenju te su upleteni u apoptozu. Apoptoza može biti inducirana na nekoliko načina, a jedan od njih uključuje Ca^{2+}. To, zajedno s ulogom proteolize u razgradnji povezanoj sa smrti stanica vodi do moguće uloge kalpaina. Ove pretpostavke su utemeljene na brojnim otkrićima da je cijepanje supstrata kalpaina pronađeno u apoptozi. Iako kalpaini ne razgrađuju proteine u potpunosti, cijepaju ih na male, dobro definirane fragmente, što onda aktivira proces apoptoze (Nath i sur, 1996). Razgradnja ključnih miofibrilarnih proteina inducirana kalpainima uzrok je postmortalne proteolize, a aktivnost kalpaina odgovorna je za promjenu mekoće mišića (Koohmaraie i Geesink, 2006).

Glavni problem u određivanju fiziološke uloge je mala količina supstrata kalpaina *in vivo*. Nadalje, većina pretpostavki o ulozi kalpaina temelji se na istraživanjima pomoću inhibitora, a jedini apsolutni inhibitor kalpaina je kalpastatin koji ne može ući u stanice te se ne može koristiti za pokuse *in vitro* (Carafoli i Molinari, 1998).

4.1. Kalpaini u postmortalnoj proteolizi mišićnog tkiva

Mnogi faktori, uključujući kapacitet zadržavanja vode, boju, te nutritivnu vrijednost i sigurnost, određuju kvalitetu mesa. Važnost ovih parametara varira s obzirom na proizvodnju i profil korisnika. Miris, okus, sočnost i mekoća utječu na kvalitetu mesa. Od ovih svojstava mekoća se neprestano ističe kao jedan od najvažnijih svojstava mesa (Miller i sur, 2001). Brojna istraživanja pokazuju da je velika količina mesa namjenjena za maloprodaju tvrda. Pokazano je da potrošači znaju razliku između tvrdog i mekog mesa (Huffman i sur, 1996). Tradicionalne metode za određivanje promjena mekšanja mesa nisu efikasne zbog čega su učinjeni veliki napori za razvijanje sustava za klasificiranje mekoće. To uključuje vidljivu i blisku-infracrvenu spektroskopiju (Byrne i sur, 1998; Park i sur, 1998), metode analize tekstura (Li i Shatadal, 2001), te marbling ili mjerenja sile smicanja (Shackelford i sur, 1999). Uspoređivanjem ovih metoda, postaje jasno da jedino metoda mjerenja sile smicanja točno određuje mekoću mesa (Wheeler i sur, 2002). U industriji se najčešće koristi spektroskopija iako je manje točna od metode mjerenja sile smicanja (Koohmaraie i Geesink, 2006).

Postoje tri faktora koja određuju omekšavanje mesa: žilavost, faza učvršćivanja i faza omekšavanja. Dok se faze učvršćivanja i omekšavanja odvijaju tijekom perioda pohrane, početna žilavost postoji tijekom klanja i ne mijenja se tijekom perioda pohrane (Koohmaraie i Geesink, 2006). Žilavost se definira kao otpornost na pomicanje neskraćenih mišića (Marsh i Leet, 1966).

Mrtvačka ukočenost je prvi korak pretvorbe mišića u meso. Biokemijski je karakterizirana količinom energetski bogatih spojeva, uključujući ATP, kreatin-fosfat i glikogen, zajedno s aktivnošću ATP-aze, kinaze i glikolitičkih enzima u mišiću. U živom mišiću ili neposredno nakon smrti, ATP, koji se kontinuirano hidrolizira staničnom ATP-azom ili miozinom, resintetizira se pomoću kreatin-kinaze ili glikolitičkom razgradnjom glukoze. U ranoj postmortalnoj fazi, količina ATP-a ostaje konstantna dok je koncentracija kreatin-fosfata dovoljno visoka (Suyama i Konosu, 1987). Kontrakcije u živim mišićima inicirane su otpuštanjem Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma. Tijekom kontrakcije mišića, ATP se razgrađuje na ADP uz otpuštanje energije, dok miozin ostaje čvrsto vezan za aktin te uzrokuje vlaknaste pokrete. Glave miozina koje su još vezane za aktin, mogu se odvojiti

ako su nove molekule ATP-a dostupne za vezanje. Kad se mišić pretvori u meso, glave miozina su vezane za aktin i klizanje vlakana je onemogućeno (Swatland. 1994). Kada je pH mišića oko 6, što je optimalni pH za aktivnost miozinske ATP-aze, ATP brzo opada do razine koja je nedovoljna za odvajanje osnovnih kontrakcijskih proteina. Aktin i miozin se ireverzibilno vežu i formiraju aktomiozin što se prikazuje kao mrtvačka ukočenost (Lawrie, 1992).

Razlike u žilavosti mesa nastaju tijekom klanja ili tijekom postmortalne pohrane. Učvršćivanje tijekom prvih 24 sata postmortem uzrokovano je promjenom u interakciji aktin/miozin iz slabo vezanog stanja u čvrsto vezano stanje. To povećanje žilavosti i čvrstoće može biti, ali i ne mora, uzrokovano skraćivanjem (Goll i sur, 1995).

Faza učvršćivanja uzrokovana je skraćivanjem sarkomera tijekom razvoja ukočenosti (Koohmaraie, 1996). Taj proces se uglavnom odvija postmortalno u prvih 24 sata (Wheeler i Koohmaraie, 1999). Dok je faza učvršćivanja gotovo jednaka kod svih organizama pod istim uvijetima, faza omekšavanja je vrlo varijabilna (Koohmaraie i sur, 2006). Ponekad i poslije smrti i tijekom pohrane počinje proces omekšavanja (Jiang, 1998). Postoje velike razlike u brzini i stupnju postmortalnog omekšavanja. Poznato da je za omekšavanje mesa odgovorna postmortalna proteoliza miofibrilnih proteina. Ti su proteini uključeni u inter- i intramiofibrilne veze ili u povezivanju miofibrila kao i u povezivanju mišićnih stanica s osnovnim lamelama. Funkcija ovih proteina je održavanje strukturnog intergriteta miofibrila. Njihova razgradnja uzrokuje slabljenje miofibrila i omekšavanje. Iako se mogu mijenjati tijekom godina, princip funkcije spomenutih proteina ostaje isti. Proteoliza ključnih miofibrila i povezanih proteina odgovorna je za postmortalno omekšavanje (Koohmaraie i Geesink, 2006).

Postoji niz dokaza za upletenost sustava kalpaina u postmortalnu proteolizu i omekšavanje:

1) inkubacija miofibrila s kalpainima daje istu proteolitičku strukturu kao ona nađena u postmortalnim mišićima (Geesink i Koohmaraie, 1999);

2) injekcija ili infuzija kalcija u mišiće ubrzava postmortalnu proteolizu i omekšavanje (Koohmaraie i sur, 1988), dok infuzija ili injekcija inhibitora kalpaina inhibira postmortalnu proteolizu i omekšavanje (Koohmaraie, 1990);

3) razlika u brzini proteolize i omekšavanja između raznih vrsta može se objasniti različitom aktivnosti kalpastatina (Koohmaraie i sur, 1991);

4) efekt učvršćivanja se može objasniti porastom aktivnosti kalpastatina (Garsen i sur, 1995).

Iz navedenih istraživanja i mnogih drugih jasno je da sustav kalpaina ima važnu ulogu u postmortalnoj proteolizi i omekšavanju (Koohmaraie i Geesink, 2006).

No, iako su vrlo dojmljivi dokazi da je kalpainski proteolitički sustav temeljni mehanizam omekšavanja mesa, postoje i sumnje u to. Jedna od takvih spoznaja je da se μ-kalpaini tako brzo inaktiviraju da se ne može računati na njihovo sudjelovanje pri omekšavanju između 24 i 48 sati. U tom periodu mišići imaju dvostruko veću aktivnost kalpastatina od aktivnosti kalpaina, pa se *m* i μ-kalpaini autoliziraju. Jedan od argumenata je da 24-48 sati nakon smrti nema dovoljno μ-kalpaina dostupno za omekšavanje. Ovi podaci su, međutim, dobiveni koristeći manje osjetljivu metodologiju za određivanje aktivnosti μ-kalpaina. Drugi važan argument protiv sudjelovanja kalpaina u postmortalnom omekšavanju je višak kalpastatina u odnosu na μ-kalpain, prema čemu μ-kalpain nikada ne može biti aktivan (Jiang, 1998).

5. Metode za mjerenje aktivnosti kalpaina

Iako izražavanje katalitički aktivnih proteaza može smanjiti potrebu pročišćavanja kalpaina, u početku nije bilo moguće dobiti mjerljive količine katalitički aktivnog *μ*-kalpaina. Katalitički aktivni *m*-kalpain se može dobiti u većim količinama iz E.coli samo ako je 28-kDa podjedinica skraćena na 85. aminokiselini (Graham-Siegenthaler i sur, 1994). Pročišćavanje *m*-kalpaina je prvi put opisano prije 25 godina (Dayton i sur, 1976). Pročišćavanje *μ*-kalpaina bilo je i još je uvijek teže od pročišćavanja *m*-kalpaina. Neka tkiva ili stanice, poput ljudskih eritrocita i trombocita, sadrže više *μ*-kalpaina, dok ostala tkiva poput glatkih mišića želuca i krvnih žila sadrže uglavnom *m*-kalpain (Taylor i sur, 1991). Skeletni mišići i bubrezi većine sisavaca sadrže jednake količine *μ*-kalpaina i *m*-kalpaina. Razlog različitih udjela *μ*- i *m*-kalpaina u različitim tkivima i stanicama je nepoznat, no puno je lakše pročistiti značajne količine *μ*-kalpaina iz eritrocita ili trombocita nego iz jetre ili glatkih mišića (Thomson i sur, 2000).

U mnogim slučajevima kalpaini i kalpastatin izdvajaju se iz malih uzoraka tkiva tako da zahtjevni i složeni višestupanjski postupci separacije nisu odgovarajući. U razvijanju metoda pogodnih za pročišćavanje kalpaina iz malih uzoraka tkiva, važna je brzina ekstrakcije i separacije, kako bi se izbjegle postmortalne promjene, autoliza ili razgradnja enzima. Postoji općenita metoda koja koristi relativno jednostavnu i jeftinu opremu i reagense. Postupak uključuje brzo polijevanje tkiva sa EDTA prije samog homogeniziranja uzorka (Karlsson, 2000), jer prisutnost Ca^{2+} rezultira brzom autolizom kalpaina. Nužna je prisutnost EDTA ili nekog drugog kompleksa koji veže Ca^{2+} u otopinama za homogenizaciju stanica ili tkiva i u puferima za pročišćavanje kako bi koncentracija slobodnih Ca^{2+} bila što niža (Goll, 2003). Sljedeći koraci su homogeniziranje i centrifugiranje (Karlsson, 2000). Homogenat se direktno nanosi na kolonu ili se može isoljavati amonijevim sulfatom pri čemu se kalpaini isoljavaju 30-45% -tnim zasićenjem amonijevim sulfatom, a kalpastatin 40-50% -tnim zasićenjem amonijevim sulfatom. Prve dvije kromatografske metode pročišćavanja kalpaina su anionsko-izmjenjivačka kromatografija i hidrofobna kromatografija (Goll i sur, 2003). Ovom metodom odvajaju se *μ*-kalpain i *m*-kalpain jedan od drugoga te od inhibitora kalpastatina i potreban je samo mali uzorak. U toj fazi moguće je odrediti aktivnost *μ*-kalpaina, *m*-kalpaina i kalpastatina pojedinačno. Frakcije *μ*-kalpaina i kalpastatina i dalje sadrže i mnoge druge proteine, dok

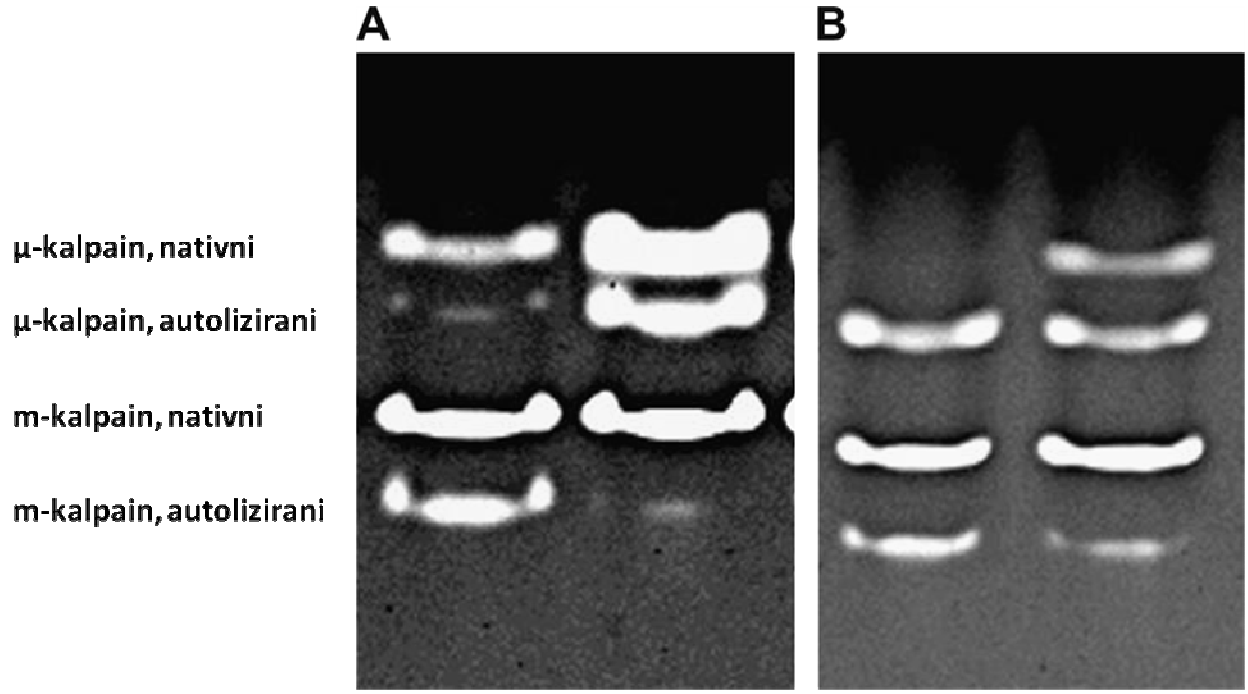
je *m*-kalpain relativno čist. Daljnje pročišćavanje μ-kalpaina i *m*-kalpaina provodi se ionoizmjenjivačkom kromatografijom na Mono Q koloni. Ovom metodom dobiju se elektroforetski čisti preparati μ-kalpaina i *m*-kalpaina (Karlsson, 2000).

Najčešće korišten supstrat za mjerenje aktivnosti kalpaina je kazein. Analize koje uključuju razgradnju kazeina kalpainima često zahtijevaju naknadno uklanjanje supstrata od hidrolizata, taloženjem pomoću trikloroctene kiseline (TCA). Nakon taloženja, u TCA-topivom hidrolizatu se mjeri apsorbancija pri 278 nm (Waxman, 1981) metodama koje uključuju vezanje fluoreskamina (Melloni i sur, 1984) ili boje (Jiang i sur, 1991). Jiang i suradnici su 1997. razvili nešto pojednostavljenu metodu za analizu razgradnje kazeina kalpainom, u odnosu na predhodno navedene. Metoda uključuje inkubaciju kalpaina s kazeinom te izravno mjerenje apsorbancije pri 500 nm. Metoda se temelji na zamućenju reakcijske smjese koje je uzrokovano agregacijom hidrolizata tijekom reakcije. Za razliku od prethodno navedenih metoda, ovom metodom nije potrebno odvajati supstrat od hidrolizata, te se aktivnost kalpaina može kontinuirano pratiti u vidljivom dijelu spektra. Aktivnost kalpaina se izražava maksimalnom brzinom reakcije (ΔA_{500}/min) na 25 ˚C.

Metode za analiziranje enzimske aktivnosti nakon elektroforeze u poliakrilamidnom gelu opisane su za različite proteine uključujući i proteaze (Arhtur i Mykles, 2000). Dokazana je uspješnost primjene kazeinske zimografije za određivanje aktivnosti kalpaina u nekoliko laboratorija. Ukratko, uzorci se, u prisutnosti EDTA koji stabilizira kalpaine, nanose u nedenaturirajućim uvjetima na poliakrilamidni gel u kome je kopolimeriziran kazein. Nakon elektroforeze gelovi se inkubiraju preko noći u puferu koji sadrži Ca^{2+} i redukcijska sredstva za aktiviranje kalpaina. Za to vrijeme se kazein, u području aktivne kalpainske zone, razgrađuje u male fragmente koji difundiraju izvan gela, a sam kalpain se također razgrađuje. Gel se zatim boji u otopini Coomassie briljant plavo, pri čemu μ-kalpain i *m*-kalpain daju čistu zonu na tamnoplavom gelu. Količina kalpaina je proporcionalna osvjetljenju čiste zone, a zbog svoje veće pokretljivosti u gelu, *m*-kalpain se može lako razlikovati od μ-kalpaina (Raser i sur, 1995) (Slika 4). Ovi gelovi se ne mogu lako fotografirati, a korisna zamjena je korištenje fluorescentnog izotiocijanat kazeina (FITC) umjesto kazeina u gelovima. FITC-kazein sustav je osjetljiviji. U ovom slučaju, gelovi su promatrani i fotografirani ultraljubičastim svjetlom, te se aktivnost kalpaina vidi kao tamna (nefluorescentna) zona na svijetloj podlozi. Kazeinska zimografija ima i prednosti i nedostatke u usporedbi sa standardnom metodom za kalpaine. Za razliku od mnogih istraživanja kalpaina u otopini, zimogrami nisu pod utjecajem kalpastatina ili drugog reverzibilnog inhibitora kalpaina, budući da se ovi inhibitori ne vežu u odsutnosti

Ca^{2+} te se odvajaju od kalpaina tijekom elektroforeze. Zimografijom se stoga može određivati ukupna aktivnost kalpaina u tkivu ili stanicama u kojima bi kalpastatin u normalnim okolnostima djelomično ili potpuno prekrio aktivnost kalpaina (Arhtur i Mykles, 2000). Kazeinska zimografija ima veliku sposobnost razlučiti aktivnost μ-kalpaina i *m*-kalpaina u jednom koraku iz sirovog ekstrakta, pa je zbog toga ova metoda vrlo popularna za određivanje aktivnosti μ-kalpaina i *m*-kalpaina u stanici ili ekstraktu tkiva (Zhao i sur, 1998). Kalpaini, čije su male podjedinice prošle autolizu prije postavljanja na gel, funkcioniraju normalno, te se mogu detektirati kazeinskom zimografijom. To se pripisuje mobilnosti malih podjedinica veličine 28 do 20 kDa. Za razliku od toga, kalpaini čije su velike podjedinice prošle autolizu prije stavljanja na gel, nisu bili stabilni u gel sustavu te se nisu mogli odrediti. Osnovni nedostatak kazeinske zimografije je neprikladnost za preciznu kvantifikaciju jer je proces mnogo duži nego standardna kazeinska metoda, a i broj uzoraka koji se istovremeno određuju ograničen je brojem uzoraka koje je moguće nanjeti na isti gel (Arhtur i Mykles, 2000).

Određivanje kalpaina zimografijom pomoću nedenaturiranog kazeina kojeg sadrže poliakrilamidni gelovi izvorno je razvijena za *in vitro* istraživanja (Raser i sur, 1995). Od nedavno se primijenjuje na *in vivo* istraživanja akutne ozljede središnjeg živčanog sustava (Zhao i sur, 2000). Ova tehnika omogućava istovremeno mjerenje dva glavna oblika kalpaina, *m*-kalpaina i μ-kalpaina te pruža priliku za analiziranje proteazne aktivnosti citosolnih i ukupnih membranskih frakcija, što je važno uzeti u obzir jer kalpainska translokacija može biti odlučujuća za njegov napad na membranu citoskeleta proteina (Saido i sur, 1994).



Slika 4. Kazeinski zimogram *μ*-kalpaina i *m*-kalpaina, nativnog i autoliziranog. Aktivnost je mjerena, u mišićima: (A) *M.longissimus dorsi* i (B) *M. Semimembranosus*, 72 sata nakon smrti dviju svinja. [Preuzeto od Pomponio i sur, 2008.]

6. Zaključak

Tekstura i mekoća smatraju se najvažnijim kvalitativnim svojstvima mesa jer određuju odobravanje potrošača te plasiranje konačnog proizvoda na tržište. Biološki i ostali faktori koji određuju mekoću mesa predmet su intenzivnih biokemijskih istraživanja. Postoje tri važna faktora koji određuju omekšavanje mesa, a to su žilavost, faza učvršćivanja i faza omekšavanja. Dokazano je da je postmortalna proteoliza mesa povezana s djelovanjem kalpaina. Kalcij ima ključnu ulogu u aktivaciji kalpaina što dovodi do proteolize miofibrilarne strukture mesa iako je ona regulirana i brojnim drugim mehanizmima. Zbog velike važnosti mekoće mesa učinjeni su značajni napori kako bi se osigurala mekoća odgovarajuća za tržište. Postmortalna aktivnost kalpaina može se koristiti kao indikator konačne kvalitete mesa. Aktivnost kalpaina najčešće se određuje spektrofotometrijskim i fluorometrijskim metodama uz supstrat kazein, te u novije vrijeme metodom kazeinske zimografije. Pronalaženje cjelokupnog mehanizma aktivacije kalpaina u ranoj postmortalnoj fazi i metode za aktivaciju kalpaina unutar određenih ograničenja, značajno bi utjecalo na sposobnost industrije mesa za proizvodnju proizvoda konzistentne mekoće.

7. Popis literature

1. J. S. C. Arthur, D. L. Mykles, *Calpain Zymography with Casein or Fluorescein Isothiocyanate Casein (J.C. Elce),*Totowa, NJ: Humana, 2000, 109-116
2. J. S. C. Arthur i C. Crawford, *Biochim. Biophys. Acta* **1293** (1996), 201-206.
3. N. Brown i C. Crawford, *FEBS Lett.* **323** (1993), 65-68.
4. C. E. Byrne, G. Downey, D. Troy, D. Buckley, *Meat Sci.* **49** (1998), 399-409.
5. E. Carafoli and M. Molinari, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **247** (1998), 193-203.
6. J. Y. Cong, D. E. Goll, A. M. Peterson, H. P. Kapprell, *J. Biol. Chem.* **264** (1989), 10096-10103.
7. W. R. Dayton, D. E. Goll, M. G. Zeece, R. M. Robson, W. J. Reville, *Biochem.* **15** (1976), 2150-2158.
8. P. Dutt, J. S. C. Arthur, P. Grochulski, M. Cygler, J. S. Elce, *J. Biochem.* **348** (2000), 37-43.
9. T. Edmunds, P. A. Nagains, S. K. Sathe, V. F. Thompson, D. E. Goll, *Biochim. Biophys. Acta* **1077** (1991)
10. G. J. Garssen, G. H. Geesink, A. H. Hoving-Bolink, J. C. Verplanke, *Meat Sci.* **40** (1995), 337-350.
11. G. H. Geesink i M. Koohmaraie, *J. Anim. Sci.* **77** (1999), 2685-2692.
12. A. Glading, D. A. Lauffenburger, A. Wells, *Trends Cell Biol.* **12** (2002), 46-54.
13. D. E. Goll, G. H. Geesink, R. G. Taylor, V. F. Thompson, *Proc. Int. Cong. Meat Sci. Technol.* **41** (1995), 537
14. D. E. Goll, V. F. Thompson, H. Li, W. Wei, J. Cong, *Physiol. Rev.* **83** (2003), 731-801.
15. D. E. Goll, V. F. Thompson, R. G. Taylor, J. A. Christiansen, *Biochimie* **74** (1992), 225-237.
16. D. E. Goll, V. F. Thompson, R. G. Taylor, A. Quali, R-G. R. Chou, *The calpain system in muscle tissue, Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease (K.K.W. Wang i P-W. Yeun),* PA, Taylor and Francis, Philadelphia, 1999, 127-160
17. K. Graham- Siegenthaler, S. Gauthier, P. L. Davies, J. S. Elce, *J. Biol. Chem.* **269** (1994), 30457- 30460.

18. F. Grynspan, W. R. Griffin, A. Cataldo, S. Katayama. R. A. Nixon, *Brain Res.* **763** (1997), 145-158.
19. Y. Horikawa i sur, *Nat. Genet.* **26** (2000), 163–175.
20. C. M. Hosfield, J. S. Elce, P. L. Davies, Z. Jia, *EMBO J* **18** (1999), 6880–6889.
21. E. Huff-Lonergan i S. M. Lonergan, *Postmortem mechanisms of meat tenderisation, The roles of the structural proteins and the calpain system, Quality attributes of muscle food (Y.L.Xiong, C.-T. Ho, F. Shahidi),* New York: Kluwer Academic/Plenum publishers, 1999, 229-251
22. E. Huff-Lonergan, T. Mitsuhashi, D.D. Beekman, F.C. Parrish, D.G. Olson, R.M. Robson, *J. Anim. Sci.* 7**4** (1996), 993-1008
23. K. L. Huffman, M. F. Miller, L. C. Hoover, C. K. Wu, H. C. Brittin, C. B. Ramsey, *J. Anim. Sci.* 7**4** (1996), 91-97.
24. V. Jacquemond, *Biophys. J.* **73** (1997), 920-928.
25. S. T. Jiang, *Life Sci.* **22** (1998), 97-107.
26. S. T. Jiang, J. H. Wang, C. S. Chen, *J. Agric. Food Chem.* **39** (1991), 237-241.
27. J. O. Karlsson, *A Simple Protocol for Separation and Assay of μ-Calpain, m-Calpain and Calpastatin From Small Tissue Samples Methods in Molecular Biology. Calpain Methods and Protocols (J.C. Elce),*Totowa, NJ: Humana, 2000, 17-23
28. Kawasaki, Y. Emori, S. Imajoh-Ohmi, Y. Minami, K. Suzuki, *J. Biochem.* **106** (1989), 274-281.
29. M. Koohmaraie i sur, *Biochim.* **74** (1992), 239-245.
30. M. Koohmaraie, *J. Anim. Sci.* **68** (1990), 1476-1483.
31. M. Koohmaraie, A. S. Babiker, A. L. Schoeder, R. A. Merkel, T. R. Dutson, *J. Food Sci.* **53** (1988), 1638-164.
32. M. Koohmaraie, M. E. Doumit, T. L. Wheeler, *J. Anim. Sci.* **74** (1996), 2935-2942.
33. M. Koohmaraie, G. H. Geesink, *Meat Sci.* **74** (2006), 34-43.
34. M. Koohmaraie, M. P. Kent, S. D. Shackelford, E. Veisheth, T. L. Wheeler, *Meat Sci.* 62 (2002), 345-352.
35. M. Koohmaraie, G. Wripple, D. H. Kretchmar, J. D. Crouse, H. R. Mersmann, *J. Anim. Sci.* **69** (1991), 617-624.
36. M. Krvavica, A. Lukić, M. Vrdoljak, *Meso* **3** (2007), 158-162.
37. R. A. Lawrie, *The Chemistry of Muscle-Based Food (D.E. Johnston, M.K.Knight, D.A. Ledward),* The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992, 43
38. J. Li i P. Shatadal, *Meat Sci.* **57** (2001), 341-346.

39. F. B. Luciano, A. A. Anton, C. F. Rosa, *Arch. Zootec.* **56** (2007), 1-8.
40. M. Maravall, Z. F. Mainen, Bl. Sabatini, K. Svoboda, *Biophys. J.* **78** (2000), 2655-2667.
41. B. B. Marsh, N. G. Leet, *J. Food Sci.* **31** (1966), 450-459.
42. R. L. Mellgren, *FASEB J* **1** (1987), 110-115.
43. R. L. Mellgren, M. T. Mericle, R. D. Lane, *Arch. Biochem. Biophys.* **246** (1986), 233-239 **.**
44. E. Melloni, S. A. Pontremoli, F. Salamino, B. Sparatore, M. Michetti, B. L. Horecker, *Arch. Biochem. Biophys.* **232** (1984), 505-512.
45. M. F. Miller, M. F. Carr, C. B. Ramsey, K. L. Crockett, L. C. Hoover, *J. Anim. Sci.* **79** (2001), 3062-3068.
46. R. Nath, K. J. Raser, D. Stafford, I. Hajimohammadreza, I. Posner, H. Allen, R. V. Talanian, P. Yuen, R. B. Gilbertsen, K. K. W. Wang, *Biochem. J.* **319** (1996), 683-690.
47. R. A. Nixon i P. Mohan, *Calpains in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease (K.K.W. Wang i P-W. Yeun),* PA, Taylor and Francis, Philadelphia, 1999, 267-291
48. B. Park, Y. R. Chen, W. R. Hruschka, S. D. Shachelford, M. Koohmaraie, *J. Anim. Sci.* **76** (1998), 2115-2120.
49. B. J. Perrin and A. Huttenlocher, *Int. J. Biochem. Cell B.* **34** (2002), 722-725.
50. L. Pomponio, R. Lametsch, A. H. Karlsson, L. N. Costa, A.Grossi, P. Ertbjerg, *Meat Science* **80** (2008), 761-764.
51. K. J. Raser, A. Posner, K. K. W. Wang, *Arch. Biochem. Biophys.* **319** (1995), 211-216.
52. T. C. Saido, H. Sorimachi, K. Suzuki, *FASEB J.* **8** (1994), 814822.
53. S. Sandmann, M. Yu, T. Unger, *Br. J. Pharmacol.* **132** (2001), 767-777.
54. S. D. Shachelford, T. L. Wheeler, M. Koohmaraie, *J. Anim. Sci.* 77 (1999), 1474-1481.
55. H. Sorimachi and Y. O. K. Suzuki, *Adv. Exp. Med. Biol.* **481** (2000), 383–395.
56. S. Strobl, C. Fernandez Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Moto, K. Nakagawa, A. Irie, H. Sorimachi, G. Bourenkow, H. Bartunik, K. Suzuki, W. Bode, *Proc. Natl. Acad. Sci. **97*** (2000), 588–592.
57. M. Suyama i A. Konosu, Suisan Shokuhin Gaku (Marine Food Science), Kosheisha, Koseikaku, Tokyo, 1987, 93-107

58. K. Suzuki, H. Sorimachi, T. Yoshizawa, K. Kinbara, S. Ishiura, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376** (1995), 523-529.
59. H. J. Swatland, Structure and Development of Meat Animals and Poultry, Technomic Pub. Co. Inc. Lancaster, USA,1994, 495
60. R. G. Taylor, J. A. Christiansen, D. E. Goll, *Biomed. Biochem. Acta* **50** (1991), 491-498.
61. V.F. Thomson i D.E. Goll, *Purification of μ-calpain, m-calpain and calpastatin from animal tissues, Methods in Molecular Biology. Calpain Methods and Protocols (J.C. Elce),*Totowa, NJ: Humana, 2000, 3-16
62. V. F. Thompson, K. Lawson, D. E. Goll, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **267** (2000), 495-499.
63. T.Tsuji, Y. Ohga, Y.Yoshikawa, H. Kohzuki, K. I. Yoshida, H. Suga, S. Kitamura, S. Taniguchi, M. Takaki, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281** (2001), 1286-1294.
64. T. Tsuji, S. Shimohama, J. Kimura, K. Shimizu, *Neurosci. Lett.* **248** (1998), 109-112.
65. P. Vanderklish and B. Bahr, *Int. J. Exp. Pathol.* **81** (2000), 323–339.
66. L. Waxman, *Methods Enzymol.* **80** (1981), 664-680.
67. A. Wendt, V. F. Thompson, D. E. Goll, *Biol. Chem.* **385** (2004), 465-472.
68. T. L. Wheeler, M. Koohmaraie, *J. Anim. Sci.* **77** (1999), 2444-2451.
69. T. L. Wheeler, D. Vote, J. M. Leheska, S. D. Shachelford, K. E. Belk, D. M. Wulf, *J. Anim. Sci.* **80** (2002), 3315-3327.
70. T. Zalewska, V. F. Thompson, D. E. Goll, *Biochim. Biophys. Acta* **1693** (2004), 125–133.
71. F. Zamora, C. Tassy, J. Canistro, J. Lapetit, A. Lebert, E. Dransfield, A. Ouali, *Meat Sci. **13*** (1996), 3-4.
72. X. Zhao, J. K. Newcomb, B. R. Pike, R.L. Hayes, *Casein Zymogram of μ-Calpain Activity After Traumatic Brain Injury in the Rat In Vivo (J.C. Elce),*Totowa, NJ: Humana, 2000, 117-120
73. X. Zhao, R. Posmantur, A.Kampfl, S.J. Liu, K.K.W. Wang, J.K.Newcomb, B. R. Pike, G. L. Clifton, R.L. Hayes, *J. Cerebr. Blood F. Met.* **18** (1998), 161-167.