

Diss. ETH No. 12172

# **Functional Properties of the Catalytic Subunit of the Ca<sup>2+</sup>-activated Neutral Proteinase Calpain**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH (ETHZ)  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

**Edy M. Vilei**

Dipl. Natw. ETH  
born the 24<sup>th</sup> November 1969  
in Locarno, Ticino  
citizen of Italy

Accepted on the recommendation of  
Prof. E. Carafoli, examiner  
Prof. J. Brunner, co-examiner

Zurich 1997

## RIASSUNTO

La prima descrizione di un'attività proteolitica  $Ca^{2+}$ -dipendente e localizzata nel citoplasma cellulare risale ad una trentina di anni fa (Guroff, 1964). Nel corso degli anni questa attività è stata riscontrata in vari tessuti di diverse specie animali e si è scoperto che essa svolge un ruolo in molti processi cellulari. Si sa ora che l'attività proteolitica dipendente da  $Ca^{2+}$  è esercitata da almeno due diversi enzimi. Questi enzimi sono regolati dal legame con il  $Ca^{2+}$  e vengono modificati mediante un processo di autoproteolisi. Il ruolo fisiologico di queste proteinasi cisteiniche dipendenti da  $Ca^{2+}$  (calpaine, EC 3.4.22.17) non è ancora chiaro. Esse risultano però coinvolte in un numero consistente di processi fisiologici, così come in stati patologici legati ad un alterato metabolismo proteico e/o ad una alterata omeostasi del  $Ca^{2+}$ . Ad esempio nella memoria (LTP), nel rimodellamento delle sinapsi, nella mitosi, nell'ischemia cellulare e nell'apoptosi.

La calpaina (CANP) è un enzima dimerico composto da una grande sottounità catalitica di 80 kDa e da una piccola sottounità regolatrice di 30 kDa. Viene considerata come proteinasi citosolica, sebbene sia stata anche riscontrata nel liquido extracellulare, e trova i suoi substrati preferenziali nel citoscheletro e nella membrana cellulare. Tra essi figurano per esempio la spettrina (o la forma non-eritroide fodrina) e la  $Ca^{2+}$ -ATPasi della membrana plasmatica. A differenza di altre proteasi, la CANP presenta una stretta specificità verso i substrati che è del tutto inusuale. Difatti recide spesso solo uno o due legami all'interno di proteine che hanno invece centinaia di siti potenzialmente sensibili all'attività proteolitica. Anziché la sequenza amminoacidica, sembra che le strutture secondaria e terziaria del substrato attorno al sito di taglio siano le peculiarità che definiscono la suscettibilità all'azione della CANP.

Due sono le forme di CANP che è stato possibile isolare:  $\mu$ CANP (attiva *in vitro* a concentrazioni di  $Ca^{2+}$   $\mu$ M) e mCANP (richiede concentrazioni di  $Ca^{2+}$  mM per essere attiva *in vitro*). Questi due enzimi vengono considerati come calpaine ubiquitarie, mentre di recente grazie all'esame di librerie di cDNA è stato possibile identificare nuovi isoenzimi specifici di determinati tessuti. Tra questi, la p94 è stata caratterizzata unicamente in tessuti muscolari.

Esistono evidenze contrastanti per quanto riguarda la regolazione dell'attività della CANP nelle cellule. Una prima considerazione è il fatto che sussiste una differenza considerevole tra la concentrazione di  $Ca^{2+}$  necessaria all'attivazione dell'enzima *in vitro* e quella misurata nel citoplasma delle cellule ( $10^{-7}$  M). Questo paradosso ha portato alla proposta di diverse ipotesi

## Riassunto

---

che, in alcuni casi, sono anche state contraddette da altri gruppi di ricerca. Per esempio, è stato pubblicato che il  $\text{Ca}^{2+}$  necessario per l'attivazione della CANP nelle cellule può essere diminuito dalla presenza di agenti stimolanti l'attività enzimatica (e.g., isovalericarnitina o un attivatore naturale ancora sconosciuto), da particolari sequenze localizzate nei substrati (e.g., sequenze PEST), o dall'associazione dell'enzima con i fosfolipidi delle membrane. Ma è anche stato dimostrato che le sequenze PEST o i fosfolipidi non svolgono questo ruolo. Un altro dissenso riguarda l'affermazione di alcuni che la CANP si autolizza prima di diventare attiva. Al momento non è ancora chiaro se l'autolisi precede veramente l'attivazione. Infatti, ci sono altre pubblicazioni che riferiscono di attivazioni non precedute da autolisi. Come se tutto ciò non dovesse bastare, la CANP possiede anche un inibitore endogeno nelle cellule, la calpastatina (CALST), che interagisce con la CANP sotto il controllo del  $\text{Ca}^{2+}$ . Ora, è difficile comprendere come la CANP possa essere attivata dal  $\text{Ca}^{2+}$  dato che quest'ultimo favorisce anche l'associazione dell'inibitore con la proteinasi.

E' evidente che tutti questi aspetti non chiariti rendono il sistema CANP-CALST un interessante soggetto per ulteriori ricerche. Difatti il numero di articoli che appaiono in letteratura riguardanti questa proteinasi sono in continuo e costante aumento. Sono invece carenti studi riguardanti le funzioni dei domini strutturali della sottounità catalitica della CANP. E' pur vero che molte caratteristiche di questi domini sono conosciute da parecchio tempo, ma di recente nessun progresso è stato fatto per comprendere a fondo la loro importanza.

Questo lavoro di ricerca è stato intrapreso essenzialmente per cercare di completare quanto già si sa su questi domini. In particolare sono stati studiati i ruoli dei domini III e IV usando tecniche di mutagenesi. I risultati suggeriscono che il dominio III, non essenziale per l'attività catalitica, può amplificare il segnale di attivazione conseguente al legame del  $\text{Ca}^{2+}$  con il dominio IV. Si è altresì confermato il ruolo del dominio IV che è simile alla calmodulina, e un mutante mancante questo dominio è risultato attivo anche in assenza di  $\text{Ca}^{2+}$ . Comunque, è stato anche scoperto che la minor affinità per il  $\text{Ca}^{2+}$  della mCANP non è dovuto direttamente alle proprietà del suo dominio IV.

A parte questo, un nuovo metodo di purificazione della CANP è stato sviluppato. L'enzima attivo è stato isolato mediante una cromatografia di affinità usando due peptidi di CALST immobilizzata. Questi peptidi corrispondono ai prodotti degli esoni 1B e 1C della CALST e legano il sito attivo della CANP o il dominio IV' della piccola sottounità regolatrice, rispettivamente. La proteinasi si lega alla colonna cromatografica in presenza

di  $\text{Ca}^{2+}$  e viene eluita ad un grado di purezza elevato con un tampone contenente EGTA.

Come spiegato prima, esiste una forma di CANP (precisamente la p94) di cui si è scoperto il cDNA nei tessuti muscolari. Però, a livello proteico tale enzima non è stato riscontrato. Siamo riusciti a clonare l'intero cDNA della p94 umana, ma abbiamo constatato che il ricombinante espresso si degrada molto rapidamente.

Nella prima parte di questo lavoro di dottorato un lungo periodo è stato dedicato nello studio dell'attivazione della CANP nelle cellule. Lo scopo era quello di determinare i substrati preferenziali *in vivo* e sono state usate diverse colture cellulari. Purtroppo ciò non è stato possibile. Anzi, nessuno dei substrati presi in considerazione presentava prodotti di degradazione dovuti all'azione della CANP dopo la stimolazione delle cellule con agonisti o con lo ionoforo del  $\text{Ca}^{2+}$  A23187. Un effetto è però stato osservato sul substrato fluorogenico che era stato precedentemente liberato nel citoplasma delle cellule. L'attività idrolitica risultava stimolata dall'aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico. E' possibile che solo poche molecole dei substrati vengano proteolizzate e ciò è chiaramente difficile da monitorare con immunoblots. Potrebbe tuttavia essere sufficiente per promuovere i processi fisiologici e patologici osservati con l'attivazione della CANP nelle cellule.

## SUMMARY

It has been more than 30 years since the first description of a soluble  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral proteolytic activity (Guroff, 1964). Since that time this activity has been identified in a wide variety of tissues and species and has been implicated in many cellular functions.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral proteolytic activity is now known to be accounted for by at least two different enzymes. It is generally agreed that these enzymes are regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  binding and autoproteolytic modification. The physiological roles of these  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral cysteine proteinases (calpains, EC 3.4.22.17) are not clear. However, they have often been implicated as participants in an array of physiological processes and pathologies associated with altered protein metabolism and/or altered calcium homeostasis, including long term potentiation, synaptic remodelling, cell division, signal transduction, ischemic cellular injury and apoptosis.

Calpain (CANP) is a dimeric enzyme composed of a catalytic 80 kDa subunit and a regulatory 30 kDa subunit. It is considered as a cytosolic proteinase (though it has also been found extracellularly) which finds its preferred substrates in the cytoskeleton and in the cell membrane. Good calpain substrates are, for example, spectrin (or its non-erythroid form fodrin) and the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Unlike most proteases, calpain displays unusually strict substrate specificity, often cleaving only one or two bonds in proteins with hundreds of potential sites. It seems that secondary and tertiary conformational features surrounding the cleavage site, rather than the linear sequence itself, dominate the determinants that define the calpain susceptibility of substrates.

There are two major isoforms of calpain:  $\mu$ CANP (activated *in vitro* at  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  concentrations) and mCANP (requires mM  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations for activation *in vitro*). These two enzymes are referred to as ubiquitous calpains, while, more recently, novel tissue-specific CANP isoforms have been discovered. Among them, p94 has been characterized at the cDNA level only in muscle tissues.

There are several controversies in the explanation of CANP regulation in the cell. A first consideration is that there is a remarkable difference between the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration needed for the activation of the calpains *in vitro* and that present intracellularly ( $10^{-7}$  M). This paradox has led to the proposition of a number of hypotheses which, in some cases, have also been contradicted by other research groups. For instance, it is reported that the  $\text{Ca}^{2+}$  needed for

CANP activation in the cell could be lowered by the presence of activating factors (*e.g.*, isovalerylcarnitine or an unknown activator protein), by particular sequences on target proteins (*e.g.*, PEST sequences), or by association of the enzyme with membrane phospholipids. But it has also been demonstrated that PEST sequences or phospholipids don't play such a role. Another controversy concerns the proposition that CANP undergoes autoproteolysis before activation (proenzyme theory). At present, it is still unclear whether or not this autoproteolytic process precedes CANP activation. In effect, there are also many reports describing that activation is not determined by autoproteolysis. As if all this were not enough, CANP also has an endogenous inhibitor in cells, calpastatin (CALST), which interacts with CANP in a  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated manner. Now, it is hard to understand how CANP can be activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , since the latter also induces the association of the inhibitor with the proteinase.

It is evident that all these obscurities make the CANP-CALST system an interesting source for laboratory investigations. Indeed, the number of appearing articles concerning this proteinase is increasing progressively and regularly. However, studies on the functions of the structural domains of the catalytic subunit of CANP are lacking. It is true that some features of these domains are known since many years, but no further progresses have been made recently in this field.

Hence, this work was undertaken above all in order to fill this gap. Especially, the roles of domain III and IV of the catalytic subunit were studied by using mutagenesis techniques. The results suggested that domain III, which is not essential to the catalytic activity, may amplify the triggering signal consequent upon  $\text{Ca}^{2+}$  binding to domain IV. They have confirmed the role of domain IV in the binding of  $\text{Ca}^{2+}$ , and a truncated mutant lacking this domain was fully active in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . However, it was found that the much lower  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of native mCANP is not directly due to the  $\text{Ca}^{2+}$  binding properties of its domain IV.

Apart that, a new CANP purification method was developed, in which active CANP was purified from crude preparations by affinity chromatography on immobilized CALST peptides. Two peptides corresponding to the products of exons 1B and 1C were used, because of their ability to bind selectively to the CANP active site or to the domain IV' of the small regulatory subunit, respectively. The crude preparations were loaded onto the peptide column in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and CANP was eluted with an EGTA-containing buffer. The yielded product was of a high degree of purity.

As mentioned previously, there is a form of CANP (p94) whose cDNA has been found in muscle tissues. However, the protein has never been rescued.

## Summary

---

We were able to clone the entire cDNA of human p94, but we found that the expressed recombinant enzyme rapidly degraded.

In the first part of this Ph.D. work, a long period was spent in the study of the CANP activation in cells. We were looking for the preferred CANP substrate(s) *in vivo* by using several cell cultures. This assay was unsuccessful. Indeed, none of the studied substrates presented CANP-mediated degradation products on immunoblots after stimulation of the cells with agonists or with the  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore A23187. An effect could only be observed when cells were transfected with a fluorescent peptide substrate. This led to the conclusion that intracellular CANP was effectively activated by the increased  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the cytosol, but probably only few molecules of the substrate proteins were proteolyzed. This is evidently difficult to detect with immunoblots, but even a modest number of degraded substrate molecules may be enough to promote the physiological or pathological processes evoked by CANP activation in intact cells.