



Doctoral Thesis

"In vivo" detection of calpain and its structure-activity relationship

Author(s):

Calderara, Silvio

Publication Date:

1998

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002015918> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 12955

**«*In vivo*» detection of calpain and its structure-activity
relationship**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH (ETHZ)

for the degree of
Doctor in Natural Sciences

Presented by

Silvio Calderara



Dipl. Natw. ETH
Born the 20th June 1970
Citizen of Campo-Blenio (TI)

Prof. E. Carafoli, examiner
Prof. J. Brunner, co-examiner
PD Dr. D. Guerini, co-examiner

Zurich 1998

Summary

The calcium activated neutral protease, referred to as calpain or CANP, is a dimeric enzyme belonging to the class of cysteine proteases, composed of a catalytic subunit of 80 kDa and a regulatory subunit of 30 kDa. It is activated upon increase in the cellular Ca^{2+} concentration and it probably finds in the membrane and in the cytoskeleton its preferred substrates. The protease is present in the cytosol of the cells of every tissue examined so far in two isoforms, differing in their Ca^{2+} requirements for activity. Calpain-I (or micro calpain, μ -CANP or CANP-I) is active at micromolar, calpain-II (or milli calpain, m-CANP or CANP-II) at millimolar Ca^{2+} concentrations, according to «in vitro» experiments. Recently, other calpain isoforms and calpains in lower organisms have been either isolated or predicted after DNA sequence analysis.

Despite more than two decades of intensive work on calpain, many questions are still unanswered. Among them are the functions of the protease, «in vivo» detection of calpain activity and the structure of the enzyme and the role of Ca^{2+} -binding. In the present work we developed systems to give an answer to some of these open questions. In the first part, we developed a synthetic substrate to detect calpain activity «in vivo» upon Ca^{2+} increase in the cell. We were able to positively test this substrate, particularly concerning its stability within the cell, its specificity to calpain and its easiness to handle. In the second part, we constructed a chimeric calpain whose Ca^{2+} -binding site was replaced by calmodulin, a well-known Ca^{2+} -binding protein, with homologies to the calpain domain IV. The Ca^{2+} sensitivity of the chimeric protein was dramatically decreased, but maximal activity of the chimeric protease was only about 75% of the wild type. This suggests that other factors are involved in the full activation of calpain and that the wild type Ca^{2+} -binding domain modulates best the Ca^{2+} -signalling for calpain activation. In the last part, we investigated the role of Ca^{2+} -binding on the dynamic of the calpain small subunit. A fluorescent labelled small subunit of CANP-II was prepared. The protein was first modified by site-directed mutagenesis to increase the likelihood that the fluorescent label could be introduced at the N-terminal portion of the protein. The

Summary

mutated labeled protein showed a Ca^{2+} -dependent increase of fluorescence. The affinity of the recombinant protein was in the low mM range. The conformational changes associated with the binding of Ca^{2+} were very fast and were complete 20-30 milliseconds after the addition of the ion.

Zusammenfassung

Die Kalzium aktivierbare neutrale Protease Calpain (CANP) ist ein dimeres Enzym, welches zu der Klasse der Cysteinproteasen gehört. Es besteht aus einer katalytischen Untereinheit von 80kDa und einer regulatorischen Untereinheit von 30kDa. Das Enzym wird durch eine Erhöhung der zellulären Kalziumkonzentration aktiviert und findet wahrscheinlich in der Zellmembran und dem Zytoskelett seine bevorzugten Substrate. Die Protease existiert im Zytosol jeglicher bisher untersuchten Gewebe in zwei Isoformen, die sich bezüglich der zur Aktivierung benötigten Kalziumkonzentration unterscheiden. Calpain-I (oder auch micro-Calpain, μ -Calpain oder CANP-I) ist aktiv bei micromolaren, Calpain-II (oder milli calpain, m-calpain oder CANP-II) bei millimolaren Ca^{2+} Konzentrationen, was bei «in vivo» Experimenten festgestellt werden konnte. In letzter Zeit konnten weitere Calpain Isoformen und Calpain in tieferen Organismen isoliert oder konnte mittels DNA Sequenzanalyse vorhergesagt werden.

Trotz schon seit zwei Jahrzehnten andauernder Forschungsarbeiten, sind noch viele Fragen wie die Funktion der Protease ungeklärt. Ebenso ist die «in vivo» Detektion der Calpainaktivität, sowie die Struktur des Enzyms und die Rolle der Ca^{2+} Bindung noch unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde ein System entwickelt, um eine Antwort auf noch offene Fragen zu geben. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein synthetisches Substrat entwickelt, um die Calpain Aktivität «in vivo» nach einem Ca^{2+} Anstieg zu untersuchen. Es war möglich, das Substrat positiv zu testen, besonders bezüglich seiner Stabilität in der Zelle, seiner Spezifität bezüglich Calpain und seiner leichten Einsetzbarkeit. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein chimäres Calpain eingesetzt, dessen Ca^{2+} Bindungsstelle durch Calmodulin, ein bekanntes Ca^{2+} bindendes Protein, ersetzt worden ist. Calmodulin besitzt eine grosse Homologie zur Calpaindomäne IV. Die Ca^{2+} Sensitivität wurde hierdurch deutlich erniedrigt, jedoch war die maximale Aktivität nur noch 75% des Wildtyps. Dies suggeriert, dass noch weitere Faktoren zur vollen Aktivierung von Calpain notwendig sind und dass die ursprüngliche Wildtypdomäne den

besten modulatorischen Einfluss bezüglich des Ca^{2+} Signals zur Calpain Aktivierung besitzt. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der Ca^{2+} Bindung auf die Dynamik der der kleinen Calpain Untereinheit untersucht. Hierzu wurde eine Fluoreszenzmarkierung der kleinen Untereinheit von CANP-II vorbereitet. Das Protein wurde zunächst durch *site directed mutagenesis* so modifiziert, damit der Fluoreszenzlabel besser N-terminal eingeführt werden konnte. Das mutierte und markierte Protein zeigte dann eine Ca^{2+} -abhängigen Anstieg an Fluoreszenz. Die Affinität des rekombinaten Proteins war im tiefen mM Bereich. Die Konformationsänderungen verbunden mit der Ca^{2+} Bindung waren sehr schnell und waren schon nach 20-30 Millisekunden nach Zugabe der Ionen vollzogen.

Riassunto

La calpaina è un enzima dimerico appartenente alla famiglia delle cisteine proteasi formato da una sottounità catalitica di 80 kDa e da una sottounità regolatrice di 30 kDa. Viene attivata in risposta all'innalzamento della concentrazione cellulare di Ca^{2+} . I suoi substrati preferenziali si trovano probabilmente nella membrana e nel citoscheletro. È presente nel citoplasma di tutte le cellule di tessuto umano e due isoforme sono state descritte, una attiva a concentrazioni micromolari di Ca^{2+} , chiamata CANP-I o μ -CANP ed una attiva a concentrazioni millimolari di Ca^{2+} (CANP-II o m-CANP). Recentemente altre isoforme sono state caratterizzate con l'aiuto di tecnologie del DNA ricombinante. Questo tipo di approccio ha dimostrato la presenza di calpaina anche in animali inferiori. Malgrado che la calpaina sia stata studiata da più di un ventennio, molti aspetti di questa proteina rimangono da risolvere. Primo fra tutti la sua funzione all'interno della cellula, e poi il ruolo del Ca^{2+} nell'attivazione dell'enzima ed infine la struttura terziaria della proteina stessa.

Lo scopo di questo lavoro era di tentare di dare una risposta ad alcuni di questi problemi. La prima fase è stata dedicata allo sviluppo di un substrato sintetico per rilevare l'attività della calpaina «*in vitro*». I risultati ottenuti hanno mostrato una grande affidabilità nella specificità del substrato per la calpaina. Questo substrato è facile da utilizzare ed è molto stabile all'interno della cellula.

La seconda parte di questa tesi riassume esperimenti fatti per determinare il ruolo del dominio della sottounità catalitica che lega ioni Ca^{2+} . Usando tecniche di DNA ricombinante, una calpaina "ibrida" è stata costruita in cui il dominio che lega lo ione Ca^{2+} è stato rimpiazzato dalla calmodulina, una proteina con una struttura simile al dominio legante il calcio, ma con un'affinità più alta per lo stesso. La concentrazione di Ca^{2+} necessaria per attivare la protease ricombinante si è abbassata di 1 ordine di grandezza. La calpaina ibrida aveva un'attività pari a circa il 75% della forma nativa. Questo implica che il dominio legante Ca^{2+} è importante per la trasmissione del segnale al

centro attivo, che questo dominio può essere scambiato con domini simili, benchè una piccola perdita di efficienza sia stata misurata.

La parte finale di questa tesi è stata dedicata alla preparazione di una sottounità regolatrice (piccola sottounità) marcata con un gruppo fluorescente. La proteina è stata modificata geneticamente in modo da aumentare la probabilità che il reagente fluorescente si fosse legato all`N-terminale. La proteina così modificata presenta un cambio di fluorescenza dipendente da Ca^{2+} . L`affinità per lo ione Ca^{2+} è stata determinata ed è attorno ai 2-3 mM. Infine si è dimostrato che il cambio di conformazione dipendente da Ca^{2+} è molto veloce ed è completo dopo 20-30 millisecondi.