

Uloga kalpaina u šećernoj bolesti i njezinim komplikacijama

Mlinac, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:848090>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**

Repository / Repozitorij:

BIotech

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA
Preddiplomski sveučilišni studij
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Laura Mlinac

Uloga kalpaina u šećernoj bolesti i njezinim komplikacijama

Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA
Preddiplomski sveučilišni studij
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Laura Mlinac

Uloga kalpaina u šećernoj bolesti i njezinim komplikacijama

Završni rad

Rijeka, 2024.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT

Undergraduate university study

"Biotechnology and drug research"

Laura Mlinac

The role of calpains in diabetes and diabetic complications

Final work

Rijeka, 2024.

Mentor of the final work: prof. dr. sc. Jasminka Giacometti

Završni rad obranjen je dana 9. rujna 2024.

pred povjerenstvom:

1. prof.dr.sc Igor Jurak
2. prof.dr.sc. Anđelka Radojčić Badovinac
3. prof.dr.sc. Jasminka Giacometti, mentor

Rad ima 49 stranica, 13 slika, 2 tablice, i 47 literaturna navoda.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasminki Giacometti na trudu, pomoći i strpljenju te uloženom vremenu tijekom izrade ovog završnog rada. Zahvaljujem se i svojoj obitelji, prijateljima i kolegama koji su mi pružali podršku tijekom studiranja.

SAŽETAK

Kalpaini su klasa koju čine 15 članova kalcijem aktiviranih nelizosomalnih neutralnih proteaza koje utječu na širok raspon staničnih funkcija. Kalpaini su obično lokalizirani u citosolu i unutar mitohondrija. Pretjerana aktivacija kalpaina povezana je s brojnim bolestima mozga, očiju, srca, pluća, gušterače, bubrega, krvožilnog sustava i skeletnih mišića. Stoga kalpain može poslužiti kao potencijalni terapijski cilj u mnogim bolestima.

Obzirom da se kalpaini povezuju s kroničnim komplikacijama šećerne bolesti (DM), kao što su dijabetička kardiomiopatija, dijabetička nefropatija i dijabetička retinopatija, ovaj pregled sadržava dosadašnja saznanja temeljena na literaturnim podacima o strukturi, aktivaciji i biološkim funkcijama kalpaina, te učinku prekomjerne aktivacije kalpaina u patogenezi neurodegenerativnih bolesti, bolesti krvožilnog sustava, autoimunih bolesti i upali.

Ključne riječi: kalpaini, dijabetička kardiomiopatija, dijabetička nefropatija, dijabetička retinopatija, kalpaini u neurodegenerativnim bolestima, kalpaini u bolesti krvožilnog sustava, kalpaini u autoimunim bolestima i upali

SUMMARY

Calpains are a class of 15 calcium-activated, non-lysosomal, neutral proteases that influence a variety of cellular functions. Calpains are normally localised in the cytosol and mitochondria. Excessive activation of calpain is associated with numerous diseases of the brain, eyes, heart, lungs, pancreas, kidneys, circulatory system and skeletal muscles. Therefore, calpain can serve as a potential therapeutic target for many diseases.

Considering that calpains are associated with chronic complications of diabetes (DM) such as diabetic cardiomyopathy, diabetic nephropathy and diabetic retinopathy, this review presents the current state of knowledge based on literature data on the structure, activation and biological functions of calpain, as well as the effects of excessive calpain activation on the pathogenesis of neurodegenerative diseases, diseases of the circulatory system, autoimmune diseases and inflammation.

Keywords: calpains, diabetic cardiomyopathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, calpains in neurodegenerative diseases, calpains in diseases of the circulatory system, calpains in autoimmune diseases and inflammation.

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Kalpaini: struktura, aktivacija i biološke funkcije kalpaina	3
2.1.	Obitelj kalpaina	7
2.2.	Mehanizam aktivacije kalpaina	13
2.3.	Fiziološke funkcije kalpaina	16
3.	Metode otkrivanja (detekcije) i određivanja kalpaina	18
4.	Kalpaini i bolesti.....	21
4.1.	Uloga kalpaina u neurodegenerativnim bolestima	21
4.2.	Kalpaini u bolestima krvožilnog sustava.....	25
4.3.	Kalpaini u autoimunim bolestima i upali.....	26
5.	Kalpaini u šećernoj bolesti.....	28
5.1.	Kalpaini u dijabetičkoj kardiomiopatiji	31
5.2.	Kalpaini u dijabetičkoj nefropatiji.....	32
5.3.	Kalpaini u dijabetičkoj retinopatiji	34
6.	Zaključak	37
7.	Kratice.....	40
8.	Literatura	42

Životopis

1. Uvod

Dijabetes mellitus (DM) povezan je s akutnim i kroničnim komplikacijama koje uzrokuju veliki morbiditet i značajan mortalitet. Kalpaini, obitelj $\text{Ca}(2+)$ -ovisnih citosolnih cisteinskih proteaza, mogu modulirati strukturu i funkciju svojih supstrata kroz ograničenu proteolitičku aktivnost. Kalpain je sveprisutna proteaza osjetljiva na kalcij koja je neophodna za normalnu fiziološku funkciju. Promjene u homeostazi kalcija dovode do patološke aktivacije kalpaina kod dijabetes mellitusa (DM). Budući da se ne zna mnogo o odnosu između kalpaina i DM, u ovom radu će se opisati doprinos kalpaina kroničnim komplikacijama DM, kao što su dijabetička kardiomiopatija, dijabetička nefropatija i dijabetička retinopatija.

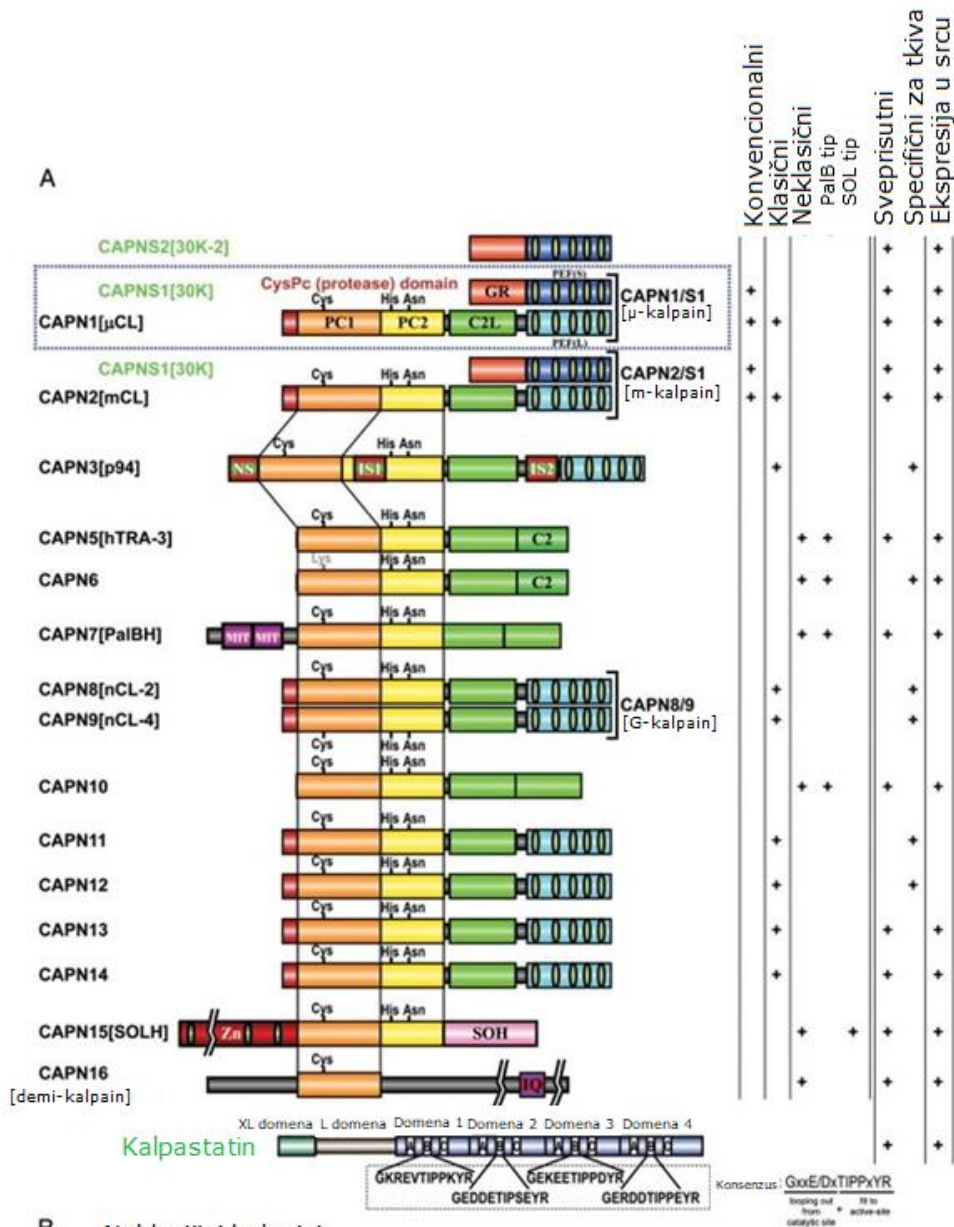
Šećerna bolest (DM) je kronični metabolički poremećaj koji zahvaća oko 6,4% odrasle populacije i pritom predstavlja velik globalni problem zbog svojih zdravstvenih, socijalnih i ekonomskih posljedica. (1) Zahvaća osobe svih dobi i spola. Veliku ulogu u diabetes mellitusu (DM) imaju genetska predispozicija, prehrana i način života. Kalpaini su cisteinske proteaze kojima su za aktivaciju potrebni ioni kalcija te stoga utječu na procese regulirane kalcijem kao što su stanična proliferacija, diferencijacija i apoptoza. Poremećaji u njihovoj aktivaciji utječu na razvoj raznih patoloških stanja poput DM te raznih komplikacija kao što su neuronska degeneracija (neurodegeneracija) i siva mrena (katarakt).(2) Prekomjerno su eksprimirani u neurološkim bolestima kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova i Huntingtonova bolest te u traumatskoj ozljedi mozga.(3) Kalpaini također sudjeluju u brojnim kardiovaskularnim bolestima, autoimunim bolestima te upalama. Obitelj kalpaina sadrži 15 članova, a najpoznatiji i najistraženiji su μ -kalpain, m-kalpain te kalpastatin. μ - i m-kalpain se često nazivaju i „sveprisutnim“, „konvencionalnim“ ili „tipičnim“ kalpainima. Razlike u strukturama pojedinih kalpaina omogućuju im cijepanje različitih supstrata kao što su su razni citoskeletni proteini, receptori, proteini povezani ili usidreni s membranom i protein fosfataze i kinaze čime uzrokuju aktivacije signalnih puteva poput MAPK signalnog

puta, BDNF signalnog puta, puta glikogen sintaza kinaze (GSK-3 β), PI3K-Akt puta i NF- κ β signalni put. U stanju stresa dolazi do povišene koncentracije intracelularnog Ca²⁺ i aktivacije kalpaina. Aktivirani kalpaini cijepaju svoje supstrate te najčešće oštećuju integritet stanica uzrokujući njihovu apoptozu. Za razliku od drugih cisteinskih proteaza, kalpaini su jedinstveni po tome što se mogu aktivirati pri neutralnom pH te mogu regulirati aktivnost supstrata djelomičnim cijepanjem.(4) Zbog velikog broja supstrata, kalpaini sudjeluju u velikom broju patoloških stanja ubrzavajući njihovu progresiju. Otkriveno je da polimorfizmi gena kalpaina-10 u DM mogu biti predispozicija za razvoj inzulinske rezistencije i povećanu razinu slobodnih masnih kiselina u dijabetesu tipa 2.(5) Hiperglikemija je jedna od najvažnijih karakteristika DM, a tijekom nje dolazi do aktivacije kalpaina u endotelnim stanicama, hepatocitima i β -stanicama gušterače. Kalpain-10 doprinosi oslobađanju inzulina iz β -stanica gušterače i olakšava prijenos glukoze unutar stanice pomoću glukoznog transportera 4 (GLUT4). Polimorfizmi gena *CAP10* utječu na otežano otpuštanje inzulina iz β -stanica gušterače. Kalpain-2, još jedan kalpain koji ima važnu ulogu u razvoju DM-ima sposobnost cijepanja β podjedinice interleukinskog receptora (IR) uz pomoć γ -sekretaze što sprječava vezanje inzulina na receptor i prijenos signala. Posljedica nemogućnosti prijenosa inzulinskog signala je nemogućnost stanice da preuzme glukozu iz okoline čime se povećava njena koncentracija u krvi (hiperglikemija), a samim time i daljnja aktivacija kalpaina koji utječu na razne signalne puteve unutar stanice i uzrokuju apoptozu.(6)

S obzirom da kalpaini djeluju na veliki broj procesa u organizmu, mogu biti potencijalna meta za liječenje raznih patoloških stanja. Do sada je otkriven relativno mali broj inhibitora kalpaina za koja su potrebna detaljnija istraživanja kako bi se odredila njihova klinička primjena i sigurnost u liječenju patoloških stanja povezanih s djelovanjem kalpaina.

2. Kalpains: struktura, aktivacija i biološke funkcije kalpaina

Kalpains su obitelj cisteinskih proteaza ovisnih o kalciju koje su uključene u razne procese u organizmu reguliranih kalcijem kao što su stanična proliferacija, progresija staničnog ciklusa, prijenos signala, fuzija membrana, diferencijacija i apoptoza stanica. Svi kalpains zajedno čine jednu superobitelj koja se sastoji od 15 proteina od kojih su najpoznatiji i najistraženiji μ -kalpain, m-kalpain te kalpastatin. μ - i m-kalpain se često nazivaju i „sveprisutnim“, „konvencionalnim“ ili „tipičnim“ kalpainima.(2,7) (slika 1).



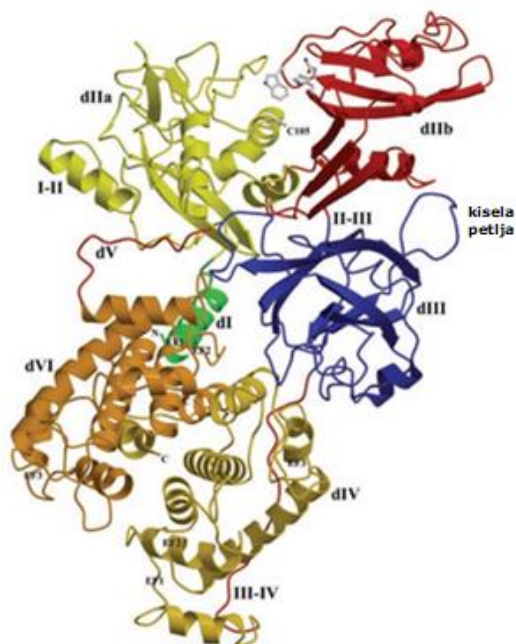
Slika 1. Ljudski kalpaini i njihove regulatorne molekule (8). (A) Shematske strukture. Razvrstavanje prema strukturi i distribuciji tkiva prikazano je u desnim stupcima. Enzimski kompleksi kalpaina (tercijarne strukture) pronađeni *in vivo* prikazani su zajedno s njihovim nazivima enzima (jednostruke zagrade). Dolje: struktura domene najduže izoforme

kalpastatina. Četiri ponavljajuće inhibitorne jedinice označene su kao domene 1-4, Simboli: PC1 i PC2, jezgrene domene proteaze 1 i 2 u domeni kalpain proteaze (CysPc); C2L, domena slična C2 domeni; PEF(L) i PEF(S), penta-EF-hand domene u većoj (L) odnosno manjoj (S) podjedinici; GR, hidrofobna domena bogata glicinom; NS/IS1/IS2, CAPN3[p94]-karakteristične sekvence; MIT, motiv interakcije mikrotubula i prometa; C2, C2 domena; Zn, domena motiva Zn-prsta; SOH, SOL-homološka domena; IQ, motiv koji je u interakciji s kalmodulinom. (B) Filogenetsko stablo ljudskog kalpaina (predstavljenog njegovim brojem), nacrtano korištenjem metode spajanja susjeda i pokretanja nakon poravnavanja svih sekvenci. Neklasični kalpaini podijeljeni su u daljnje podobitelji.

Kalpaini su otkriveni 1964., a u današnje vrijeme naziv kalpain se koristi ne samo za μ - i m-kalpain već i za same podjedinice kalpaina koje imaju proteaznu aktivnost.(1,9) Dije se na klasične i neklasične ovisno o njihovoj strukturi IV domene (slika 1), odnosno o tome koja je vrsta proteinske domene vezana za konzerviranu cisteinsku proteaznu domenu. (10,11) „Tipični“ kalpaini se sastoje od 2 podjedinice- manje i veće, koje su približno jednakih veličina unutar obitelji kalpaina. U prisutnosti Ca^{2+} „tipični“ kalpaini disociraju na svoje podjedinice. Veća (katalitička) podjedinica veličine je oko 80 kDa i sastoji se od četiri domene (I, II, III i IV), dok je manja (regulatorna) podjedinica veličine oko 30 kDa i sastoji se od dvije domene (V i VI). (1,2) Domena I je heliks koji se sastoji od 10 aminokiselinskih ostataka i važna je za regulaciju disocijacije i aktivnosti veće podjedinice.(12,13) Proteazna (katalitička) domena II(CysPc) se u odsutnosti Ca^{2+} sastoji od dvije poddomene IIa(PC1) i IIb(PC2) u čiji rascjep se veže supstrat.(2,4) Aktivno mjesto IIa poddomene (Cys-105(m-kalpain) ili Cys-115(μ -kalpain)) je odmaknuto od katalitičkih ostataka IIb poddomene (His-262(m-kalpain) ili His-272(μ -kalpain) i Asn-286(m-kalpain) ili Asn-296(μ -kalpain)) te zajedno tvore katalitičku trijadu- set tri aminokiselina koje se nalaze na aktivnom mjestu enzima.(slika 2) Poddomene IIa i IIb vežu po jedan Ca^{2+} u peptidnoj petlji koja se sastoji od

8 odnosno 9 aminokiselina. Interakcijom domene I s domenom IV s jedne strane te interakcijom poddomene IIb s domenom III s druge strane se stabilizira inaktivna konformacija domene II.(2,7) Domena III (C2 nalik domena) prividno nema podudarnost u sekvencama s drugim proteinima, ali veže kalcijeve ione i fosfolipide te ima ulogu u interakciji sa staničnim membranama.(2,7) Kalpainsi se također nalaze u obitelji penta-EF-ruka (heliks-petlja-heliks domena) koji formiraju dimere koji uključuju petu EF-ruku i povezuju se s membranama.(7) Domene IV i VI sadrže pet EF-ruka od kojih zadnji COOH-kraj pete EF-ruke IV i VI domene ne može vezati Ca^{2+} , stoga one zajedno dolaze u interakciju kako bi se formirao heterodimer.(2) NH_2 kraj V (hidrofobne) domene nije vezan za druge dijelove kalpaina zbog čega ima fleksibilnu konformaciju.(7,13) Manja podjedinica kod μ - i m-kalpaina važna je za pravilnu konformaciju veće podjedinice i za njenu katalitičku aktivnost.(2) Kod kalpaina-1,2 i 9 manja podjedinica od 30 kDa se sastoji od dvije domene V i VI koje su nalik domeni IV katalitičke podjedinice.(12)

Kalpainsi su jedinstveni po tome što se mogu aktivirati pri neutralnom pH te mogu regulirati aktivnost supstrata djelomičnim cijepanjem za razliku od tipičnih cisteinskih proteaza koje nisu ovisne o kalciju, potpuno degradiraju svoj supstrat i aktiviraju se u kiselim uvjetima.(4)



Slika 2. Kristalografska struktura ljudskog m-kalpaina (7). Različitim bojama su označene domene dI, dIIa, dIIb, dIII, dIV, dV i dVI. I-II je α -helix koji povezuje domene I i IIa. "Domena" poveziivača je crvena linija koja ide od razmaka između dIII i dIV do donjeg desnog ruba dijagram i označen je III-IV. Naznačene su lokacije predaje EF-1, EF-2 i EF-3 domene IV i VI. Aktivno središte Cys, C105, je sivo dok su His-262, Asn-286 i Trp-288 na vrhu domene IIb.

2.1. Obitelj kalpaina

Superobitelj kalpaina nalazi se u svim organizmima od mikroorganizama do ljudi te je visokokonzervirana među kralježnjacima.(2,7) Prvo pročišćavanje kalpaina 1976. godine, kojemu je kasnije utvrđen naziv m-kalpain dovela je do raznih daljnjih otkrića vezanih za ovu superobitelj. Od tada pa do danas identificirano je sveukupno 15 proteina. Strukture tih proteina razlikuju se ovisno o njihovoj funkciji.(7) Struktura „tipičnih“ kalpaina poznata je još od 1991., a u današnje vrijeme radi se i na istraživanjima struktura i funkcija drugih kalpaina koji do sada nisu bili toliko istraženi.

Tablica 1. Superobitelj kalpaina. Modificirana tablica prema (2)

Kalpain, gen	Drugi naziv	Distribucija u tkivu	Lokalizacija na kromosomu*	Proteazna aktivnost	Povezivanje s 30K
Kalpain 1 CAPN1	μ -kalpain velika podjedinica	Eksprimiran u jednjaku, koži i 24 druga tkiva	11q13.1	+	+
Kalpain 2 CAPN2	m-kalpain velika podjedinica	Eksprimiran u plućima, žučnom mjehuru i 25 drugih tkiva	1q41	+	+
Kalpain 3 CAPN3	p94, nCL-1	Eksprimiran u koštanoj srži, bubregu i 24 druga tkiva	15q15.1	+	-
Kalpain 5 CAPN5	hTRA-3, nCL-3	Eksprimiran u debelom crijevu, dvanaesniku i 19 drugih tkiva	11q13.5	+	-
Kalpain 6 CAPN6	CANPX	Najviše eksprimiran u posteljici, endometriju, želucu i manje u 27 tkiva	Xq23	-	-
Kalpain 7 CAPN7	PalBH	Eksprimiran u štitnjači, jajniku i 25 drugih tkiva	3p25.1	+	-
Kalpain 8 CAPN8	nCL-2	Eksprimiran u želucu, plućima i 2 druga tkiva	1q41	+	-
Kalpain 9 CAPN9	nCL-4	Eksprimiran u želucu, debelom crijevu i 3 druga tkiva	1q42.2	+	+
Kalpain 10 CAPN10	-	Eksprimiran u slezeni, testisima i 25 drugih tkiva	2q37.3	Nije utvrđeno	Nije utvrđeno
Kalpain 11 CAPN11	-	Eksprimiran u testisu	6p21.1	Nije utvrđeno	Nije utvrđeno
Kalpain 12 CAPN12	-	Sveprisutan, eksprimiran u	19q13.2	Nije utvrđeno	Nije utvrđeno

		masnom tkivu, debelom crijevu, žučnom mjehuru, slezeni i 25 drugih tkiva			
Kalpain 13 CAPN13	-	Eksprimiran u tankom crijevu, dvanaesniku i 6 drugih tkiva	2p23.1	Nije utvrđeno	Nije utvrđeno
Kalpain 14 CAPN14	-	Eksprimiran u jednjaku	2p23.1	Nije utvrđeno	Nije utvrđeno
Kalpain 15 SOLH	SOLH	Eksprimiran u debelom crijevu, slezeni i 25 drugih tkiva	16p13.3	Nije utvrđeno	Nije utvrđeno
<hr/>					
Mala podjedinica kalpaina, 30K					
CAPNS1	CAPNS1	Eksprimiran u jednjaku, plućima i srcu	19q13.12	-	+
CAPNS2	CAPNS2	Sveprisutan	16q12.2	-	+

* Izvor: NIH, National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Kalpaini-1, 2, 3, 8, 9, 11 i 12 se nazivaju tipičnim/klasičnim kalpainima jer sadrže četiri domene prvotno pronađene u μ - i m-kalpainima (kalpainima-1 i 2). Iako kalpains-3, 8, 11 i 12 imaju domenu sličnu kalmodulinu koja je važna za povezivanje s podjedinicom od 30 kDa, oni ne dolaze u interakciju s manjom podjedinicom dok kalpains-1, 2 i 9 asociraju s njom. Kalpains-5, 6, 7, 8b, 10a i 15 su atipični/neklasični kalpains sa zamijenjenim ili izbrisanim domenama. Atipičnim kalpainima nedostaje domena IV te ne mogu formirati dimer s podjedinicom od 30 kDa. Kalpains-1, 2, 5, 7, 10, 13 i 15 se smatraju sveprisutnim kalpainima koji su najčešće eksprimirani u citosolu dok su kalpains-3, 6, 8, 9, 11 i 12 specifični za tkiva. Kalpain-3 nalazi se u skeletnim mišićima, kalpain-6 u embrionskim mišićima i placenti, kalpain-8 u želucu, kalpain-9 u probavnom traktu, kalpain-11 u testisu te kalpain-12 u folikulima dlake. (2) Kalpains-1 i 2 dolaze u interakciju s malom regulatornom podjedinicom koja se još naziva i kalpain-S1 te tako tvore

heterodimerske proteine koje nazivamo i μ - i m-kalpaina prema njihovoj osjetljivosti na Ca^{2+} ione. μ - i m-kalpaini su najviše istraženi i sveprisutni kalpaini. (4,14) μ -kalpain za svoju aktivaciju zahtijeva koncentracije Ca^{2+} između 3 i 50 μM dok m-kalpain zahtijeva koncentracije Ca^{2+} između 0,4 i 0,8 mM. Kalpaini-1 i 2 čine veću podjedinicu, a kalpain-S1 manju.(4) Nakon aktivacije cijepaju više ključnih proteina te tako sudjeluju u regulaciji sinteze lokalnih proteina i dendritičke strukture.(9)

Kalpain-3, koji se nalazi unutar skeletnih mišića, lokalizira se uz sarkomere vežući se za protein titin te cijepa titin, filamin C, vineksin, ezrin i talin. Za razliku od drugih kalpaina, on sadrži tri jedinstvene sekvence NS (N-terminalna sekvenca), IS1 and IS2 (umetnute sekvence 1 i 2) od kojih sekvenca IS2 ujedno služi i kao inhibitor kalpaina-3. Ako kalpain-3 ne cijepa svoj supstrat pravilno, dolazi do abnormalnih sarkomera, smrti mišićnih vlakana ili slabljenja mišićne kontraktilnosti.(15)

Kalpain-4 je mala regulatorna podjedinica koja ima važnu ulogu u održavanju aktivnosti i stabilnosti kalpaina. Nedostatak kalpaina-4 dovodi do smrti u ranom embrionalnom razvoju zbog njegova utjecaja na funkciju μ - i m-kalpaina. Također ima i važnu ulogu u migraciji tumora i karcinogenezi, stoga je u više vrsta tumora uočena prekomjerna ekspresija kalpaina-4.(16) Povećana ekspresija i aktivnost kalpaina je povezana s mnogim patološkim bolestima oka kao što su ablacija retine (odljepljivanje mrežnice), retinitis pigmentosa, retinalna hipoksija i retinalna degeneracija.

Kalpain-5 je eksprimiran u više tkiva, ali kod autosomalno dominantne neovaskularne inflamatorne vitreoretinopatije je prekomjerno eksprimiran samo u oku. To je jedini retinalni kalpain za koji je poznato da direktno uzrokuje retinalnu bolest.(3)

Kalpain-6 razlikuje se ostalih kalpaina po tome što na aktivnom mjestu CysPC domene umjesto cisteina ima lizin, stoga nema proteolitičku aktivnost. U svojoj strukturi također ne sadrži penta-EF ruku koja je potrebna za vezanje za regulatornu podjedinicu zbog čega ne može imati

heterodimerski oblik. Nalazi se primarno u skeletnim mišićima i kardiomiocitima te u placenti. Stabilizira mikrotubule tako što se veže za njih svojom domenom III, promovira akumulaciju LDL kolesterola te tako utječe na razvoj ateroskleroze, a ima i moguću ulogu i u organizaciji citoskeleta.(6)

Kalpain-7 je najkonzerviraniji kalpain koji postoji u organizmima. U svojoj strukturi ne sadrži penta-EF ruku, ali sadrži dvije domene za interakciju s mikrotubulima. Smatra se da sudjeluje u degradaciji receptora epidermalnog faktora rasta(EGFR). Još uvijek mu nije identificiran fiziološki supstrat i potpuna funkcija.(17)

Kalpain-8, koji je eksprimiran u želucu, za razliku od drugih kalpaina može biti aktivan bez male regulatorne podjedinice(kalpaina-S1). Smatra se da kalpain-8 ima ulogu u prijenosu vezikula između ER i Golgijevog aparata, ali točna svojstva i fiziološke funkcije nisu još u potpunosti određene.

Kalpain-9 je eksprimiran u gastrointestinalnom traktu. Otkriveno je da je rak želuca povezan sa smanjenom ekspresijom kalpaina-9 u gastrointestinalnom traktu te da je ekspresija kalpaina-9 povezana s prognozom bolesti. Zato se smatra da bi kalpain-9 mogao biti novi tumor prigušivač(supresor) koji degradira onkogene produkte karcinogeneze u gastrointestinalnom traktu. Kristalografskom analizom strukture utvrđeno je da se funkcije domena III i IV kalpaina-9 razlikuju od sveprisutnih kalpaina što upućuje da kalpain-9 djeluje na drugačije supstrate te ima drugačiji mehanizam djelovanja. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila zaštitna uloga kalpaina-8 i 9 u želučanoj sluznici.(2,18,19)

Kalpain-10 je netipični sveprisutni kalpain koji umjesto domene IV sadrži strukturu nalik domeni III. Iako je osjetljiv na Ca^{2+} , smatra se da kalpain-10 nema vezna mjesta za Ca^{2+} u domenama II i III kakva imaju tipični kalpaini te mu proteazna aktivnost još nije određena. Otkriveno je osam varijanti kalpaina-10 od kojih u tri varijante nedostaje čitava domena II.

Poremećaji u *CAPN10* genu koji kodira za kalpain-10 povezani su sa povišenim masnim kiselinama i inzulinskom rezistencijom.(2)

O kalpainu-11 nema puno saznanja osim što je eksprimiran u testisima i uključen u prijenos signala ovisnih o kalciju tijekom mejoze i spermatogeneze.(20)

Kalpain-12 je pretežno eksprimiran u koži i folikulima dlake te ima važnu ulogu u epidermalnoj diferencijaciji i ciklusu folikula dlake vjerojatno regulirajući ekspresiju flagrina.(21)

Za kalpain-13 još uvijek nema dovoljno podataka o njegovoj funkciji. Poznato je da je većinom eksprimiran kao homodimer te njegova PEF domena ima prilično malu sličnost s IV domenom kalpaina-1 i manjom podjedinicom.(22)

Novija otkrića pokazuju da je kalpain-14 pretežno eksprimiran u jednjaku te se smatra da bi mogao imati zaštitnu ulogu očuvanja tkiva u jednjaku, a poremećaj u *CAPN14* genu može utjecati na razvoj eozinofilnog ezofagitisa.(23)

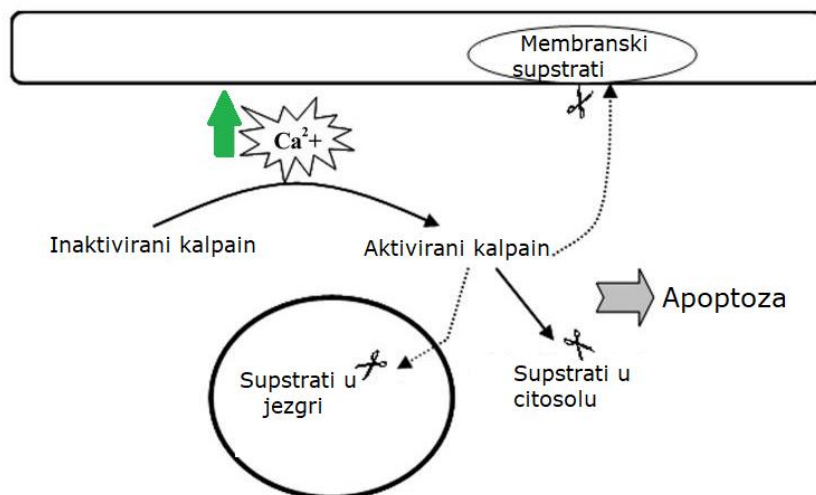
Kalpain-15 je visoko eksprimiran u mozgu i očima. Smatra se da bi mogao uzrokovati razvojne abnormalije oka kao što su anoftalmija, mikroftalmija i siva mrena(katarakta).(24)

U skupinu kalpaina spada i kalpastatin, fiziološki inhibitor kalpaina koji se nalazi u citosolu.(2) Kalpastatin je stabilan na temperaturama do 100°C i otporan je na razna denaturirajuća sredstva kao što su trikloroctena kiselina, urea i SDS. Labilan je na proteolitičku degradaciju zbog čega u SDS-PAGE dolazi do nepravilnosti tijekom određivanja molekularne mase. Do sada je otkriveno osam izoformi kalpastatina koji variraju u svojoj molekularnoj masi. Građa kalpastatina se sastoji od četiri inhibitorne domene (domena I, domena II, domena III i domena IV) koje pojedinačno imaju inhibitornu funkciju te L domene i/ili XL domene. (slika 1) Domene I, II, III i IV sadrže poddomene A, B i C. L domena je NH₂- terminalna domena

koja nema inhibitornu funkciju. XL domena sadrži tri fosforilacijska mjesta za protein kinazu A(PKA). (7)

2.2. Mehanizam aktivacije kalpaina

Unutarstanična koncentracija kalcija je u općenito između 50 i 300 nM dok je izvanstanična otprilike 2 mM. Kada dođe do stimulusa kao što su oksidacijski ili mehanički stres, izlučivanje faktora rasta ili upalnih citokina te hipoksija, Ca^{2+} se izbacuje iz unutarstanične pohrane (endoplazmatskog retikuluma(ER) i mitohondrija) ili ulazi u stanicu putem ionotropnih receptora i naponom kontroliranim kalcijevim kanalima.(4) Porastom intracelularne koncentracije Ca^{2+} kalpaini, koji se inače nalaze inaktivirani u citosolu, translociraju se do membrana gdje se aktiviraju u prisutnosti Ca^{2+} i fosfolipida (slika 3). Tijekom aktivacije dolazi do autokatalitičke hidrolize domene I zbog čega podjedinica od 80 kDa disocira od podjedinice od 30 kDa. (2)



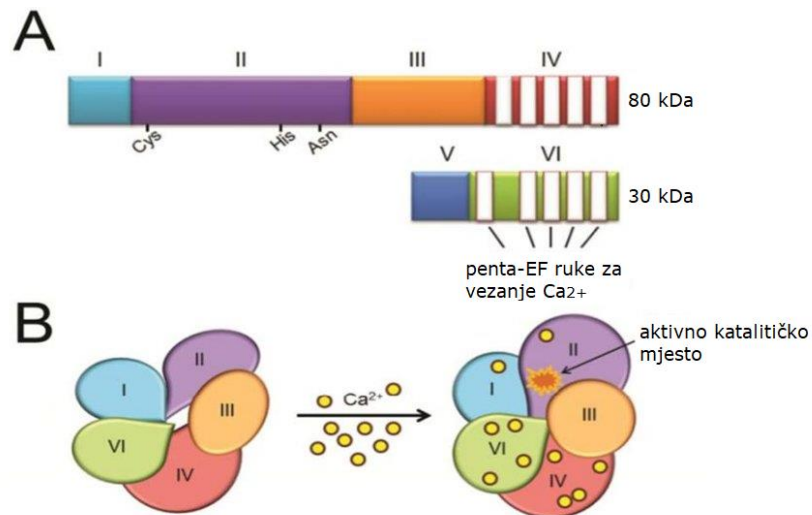
Slika 3. Aktivacija kalpaina porastom unutarstanične koncentracije Ca^{2+} . Porastom koncentracije Ca^{2+} dolazi do autokatalitičke hidrolize domene I te

posljedično do disocijacije podjedinice od 30 kDa od podjedinice od 80 kDa nakon čega kalpain postaje aktivan te hidrolizira supstratni protein. (25)

Aktivirani kalpain, odnosno podjedinica od 80 kDa dalje hidrolizira ciljani supstratni protein na membrani ili u citosolu nakon otpuštanja s membrane. U odsutnosti Ca^{2+} proteazne domene IIa i Iib se odvajaju zbog strukturnih ograničenja uzrokovanih interakcijama među domenama. Strukturne promjene uzrokovane aktivacijom Ca^{2+} su potrebne kako bi se uklonila strukturna ograničenja te za aktivaciju kako da bi se stvorilo funkcionalno katalitičko mjesto. Predloženi mehanizam za regulaciju aktivnosti m-kalpaina pomoću Ca^{2+} se sastoji od 2 faze. Prva faza uključuje uklanjanje strukturnih ograničenja uzrokovanih interakcijama među domenama. U m-kalpainu postoje bar tri različita vezna mjesta za Ca^{2+} : dvije domene nalik kalmodulinu IV i VI, regija kisele petlje u domeni III te proteazna domena II (slika 4). Vezanjem Ca^{2+} na domene IV, VI i III dolazi do otpuštanja domene I od VI i domene II od III te posljedično do disocijacije podjedinice od 30 kDa od podjedinice od 80 kDa.

Druga faza uključuje preslagivanje rascjepa aktivnog mjesta uzrokovano vezanjem po jednog Ca^{2+} za IIa i Iib poddomene proteazne domene II do čega dolazi samo ako su otpuštena ograničenja u prvoj fazi. Ovakav dvofazni mehanizam aktivacije može se primijeniti na atipične kalpaine ili kalpaine bez podjedinice od 30 kDa zato što su poddomene IIa i Iib na koje se veže Ca^{2+} konzervirane/očuvane unutar obitelji kalpaina. Kod kalpaina bez podjedinice od 30 kDa ili kalpaina bez domena III ili IV može se zaobići prva faza aktivacije te se ti kalpainsi mogu aktivirati direktno putem druge faze. Vezanjem Ca^{2+} dolazi do promjene konformacije što je potrebno kako bi se približili proteinski ostaci reaktanata i međusobno reagirali. Za translokaciju kalpaina do membrane potrebno je vezanje Ca^{2+} za domenu III. Aktivnost kalpaina najčešće je regulirana koncentracijom Ca^{2+} . Drugi načini regulacije aktivnosti kalpaina mogu biti fosforilacija kalpaina ili inhibicija pomoću njihovog fiziološkog inhibitora kalpastatina. Deregulacija aktivnosti kalpaina uzrokuje prekomjerno nakupljanje ili degradaciju

staničnih proteina što može dovesti do ozbiljnog oštećenja stanice ili patoloških stanja.(2,26)



Slika 4. Biokemijska struktura i aktivacija μ - i m-kalpaina. A) Heterodimeri povezani s 'tipičnim' kalpainima, μ - i m-kalpain raspoređeni su u veliku katalitičku podjedinicu i mali broj regulatornih podjedinica. Domena II velike podjedinice sadrži aminokiselinske ostatke koji su važni za proteolizu. Vezanje kalcija događa se pretežno na sekvencama penta-EF ruku koje se nalaze na domenama IV i VI. B) Autoliza kalcija s ekstraktom kalpaina i konformacijske promjene u proteaznoj strukturi. Specifični aminokiselinski ostaci smješteni su u domenu II za promicanje proteolize. (24)

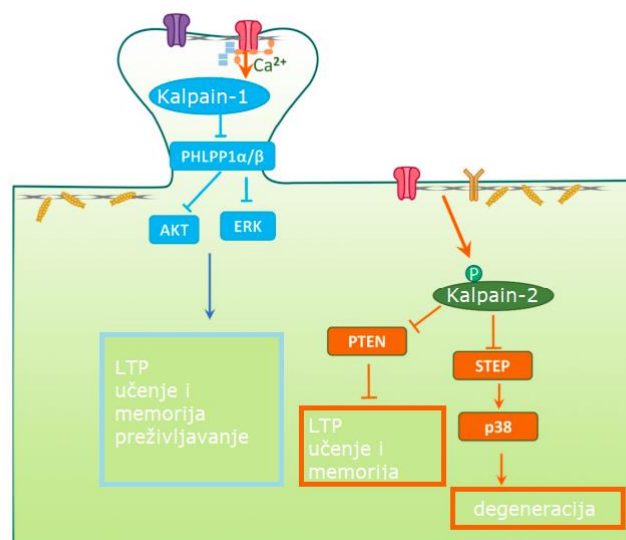
Iako je za aktivaciju μ -kalpaina potrebna je koncentracija Ca²⁺ između 5 i 50 μ M, a za aktivaciju m-kalpaina između 200 i 1000 μ M, utvrđeno je da su oba kalpaina aktivni i na koncentraciji Ca²⁺ 100-300 nM što utvrđuje da Ca²⁺ nije jedini faktor potreban za aktivaciju kalpaina *in vivo*. Postoje aktivatorski proteini koji pojačavaju osjetljivost kalpaina na koncentraciju Ca²⁺. U tom slučaju kalpainima su potrebne manje koncentracije Ca²⁺ kako bi postigli svoju aktivaciju. Takvi aktivatorski proteini se vežu na membranu te tamo sudjeluju u aktivaciji kalpaina. Postoje i molekule koje smanjuju koncentraciju Ca²⁺ potrebnu za autolizu odnosno aktivaciju proteina. Jedna

od takvih molekula su i fosfolipidi, posebice kiseli fosfolipidi u čijoj prisutnosti μ -kalpain, ali ne i m-kalpain postaje aktivan pri μ M koncentraciji Ca^{2+} .

2.3. Fiziološke funkcije kalpaina

Iako se još uvijek u potpunosti ne zna fiziološka funkcija svih kalpaina, zbog njihovih različitih struktura i različite rasprostranjenosti u stanici i organizmu možemo utvrditi kako različiti kalpainski proteini imaju različite funkcije. Kalpainski proteini cijepaju razne citoskeletne proteine, receptore, proteine povezane ili usidrene s membranom i protein fosfataze i kinaze. Aktivacija kalpaina dovodi do skraćivanja spektrina u mozgu cijepajući spektrin α II poznatiji kao α -fodrin koji je usidren za plazma membranu i veže se za mikrotubule, kalmodulin i aktin. Time se mijenja dinamička organizacija membranskih domena i prijenos kroz membranu čime se mijenja sinaptička stabilnost i integritet.(4) Povećana koncentracija Ca^{2+} apoptozom stimuliranom oksidiranim-LDL-om (lipoprotein niske gustoće) dovodi do aktivacije kalpaina. Kada stanica ulazi u apoptozu, aktivirani kalpainski proteini cijepaju agonista smrti u interakciji s BH₃ domenom (*engl.* BH3 interacting domain death agonist- Bid) zbog čega dolazi do promjena u konformacijama Bax-a i Bak-a u endoplazmatskom retikulumu (ER) i njihove oligomerizacije i lokalizacije u vanjskoj membrani mitohondrija gdje dolazi prekomjernog stvaranja slobodnih radikala i otpuštanja citokroma c i faktora izazivanja apoptoze (AIF) u citosolu. Nakon otpuštanja citokroma c dolazi do stvaranja apoptosoma vezanjem s Apaf i prokaspazom-9 čime se stimulira kaspaza-3 koja zatim aktivira kaspazu-9. AIF također uzrokuje aktivaciju kaspaze-9. Kaspaza-9 u jezgri cijepa PARP zbog čega dolazi do oštećenja DNA i naposljetku apoptoze. Uz apoptozu, kalpainski proteini utječu na brojne signalne puteve unutar stanice kao što su MAPK signalni put, BDNF signalni put koji kasnije aktivira mTOR put, put glikogen sintaza kinaze (GSK-3 β), PI3K-Akt put i NF- κ B signalni put.

Kalpaini aktiviraju MAPK signalni put unutar stanice i povećavaju ulazak Ca^{2+} u stanicu. Također kontroliraju kretanje raznih protein kinaza i fosfataza i cijepaju citoskeletne proteine čime direktno uzrokuju promjene u citoskeletu. μ - i m- kalpaini imaju suprotne funkcije unutar neuronalnih stanica. Sinaptički N-metil-D-aspartat receptori (NMDAR) mogu aktivirati kalpain-1 koji zatim cijepa PHLPP1 α i PHLPP1 β proteine čime dolazi do aktivacije Akt i MAPK/Erk signalnih puteva i naposljetku neuroprotekcije. Ekstrasinaptički NMDAR aktiviraju kalpain-2 uzrokujući degradaciju obogaćene protein tirozin fosfataze (STEP) na inaktivne fragmente na strijatalnoj kori što uzrokuje aktivaciju p38 nizvodne signalne puteve smrti te neurotoksičnost. Kalpain-2 sudjeluje i u sinaptičkoj plastičnosti tako što njegova aktivacija nakon TBS-a (theta burst stimulation), koji je vjerojatno posljedica ekstrasinaptičke ERK aktivacije posredovane BDNF-om, dovodi do skraćivanja PTEN-a i aktivacije mTOR signalnog puta, stimulacije lokalne sinteze proteina i posljedično sinteze PHLPP1 β što ograničava trajanje aktivacije ERK-a i ograničava sposobnost dugotrajne magnitude.(9,27)



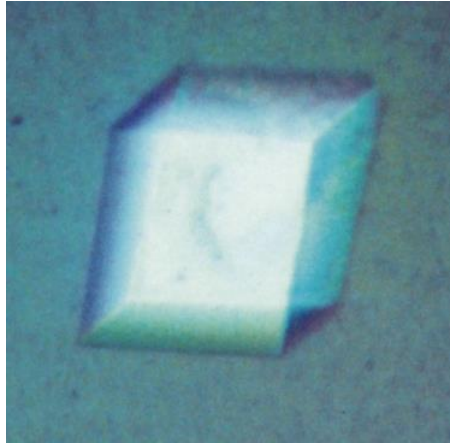
Slika 5. Različite substancične lokacije kalpaina-1 i kalpaina-2 i funkcije kalpaina-1 i -2 u ekscitatornim neuronima. Kalpain-1 je povezan sa sinaptičkim N-metil-D-aspartat (NMDA) receptorima dok se kalpain-2 nalazi nizvodno od ekstrasinaptičkih NMDA receptora u neuronima. Aktivacija sinaptičkih NMDA receptora aktivira kalpain-1, koji cijepa PHLPP1 α i

PHLPP1 β i na taj način pokreće dugotrajno potenciranje (LTP) i potiče preživljavanje neurona (neuroprotekciju). S druge strane, aktivacija ekstrasinaptičkih NMDA receptora potiče fosforilaciju i produljenu aktivaciju kalpaina-2 koji cijepa supstrate kao što su PTEN i STEP, što dovodi do smanjene LTP i neurodegeneracije. (8)

3. Metode otkrivanja (detekcije) i određivanja kalpaina

Mnogi kalpaini specifični za tkivo su otkriveni sekvenciranjem cDNA. (28) Određivanje ekspresije kalpaina moguće je imunoblot i imunohistokemijskom metodom u kojoj se koriste protutijela specifična za kalpain.(29)

Korištenjem kristalografije X zrakama omogućeno je određivanje trodimenzionalne strukture kalpaina iz njegovih kristala. Pročišćeni uzorak se kristalizira i izlaže X zrakama generiranih iz ubrzavanja elektrona u sinkrotronskom skladišnom prstenu ili iz elektrona koji udaraju u bakrenu anodu te se dobiveni difrakcijski uzorci obrađuju kako bi se dobili podaci o veličini ponavljajućih jedinica koje tvore kristal i simetriji kristala (tablica 2).(30) Za kristalografsko određivanje strukture najčešće se koriste rekombinantni proteini uzgojeni unutar *E.coli*. Protein se pročišćava gel-kromatografijom na 277 K korištenjem kolona s DEAE/sefarozum, Ni-NTA agarozom i ponekad na Ultra-gel AcA44, Reactive-Red agarozu ili FPLC na Q-sefarozi 16/10. Za kristalizaciju se najčešće provodi Sparse-Matrix screening metoda difuzije pare viseće kapi na sobnoj temperaturi. Iz kapljica prvo nastaju P1 kristali(slika 6), a zatim i P2₁ (slika 7) dodatkom 10 mM ditiotreitola.(31)



Slika 6. P1 kristal C105S-m-kalpaina. Približna veličina je $0.2 \times 0.2 \times 0.2$ mm. (30)



Slika 7. P2₁ kristal C105S-m-kalpaina. Približna veličina je $1.0 \times 0.3 \times 0.25$ mm. (30)

Tablica 2. Primjer statistike podataka sinkotronom difrakcijom, Brojevi u zagradama odnose se na ljusku najveće rezolucije. (30)

	U prirodnom obliku	U prirodnom obliku	Se-Met
Prostorna grupa	P1	P21	P21
Linija snopa	CHES-F1	CHES-F1	BNL-X4A
Valna duljina(Å)	0,91	0,91	0,979
Parametri jedinične ćelije			
a(Å)	57,64	52,25	52,11
b(Å)	79,83	157,95	156,12
c(Å)	80,88	65,073	64,35
α (°)	60,47	90	90
β (°)	70,8	95,42	95,59
γ (°)	79,3	90	90
Udio otapala(%)	~60	~45	~45
Rezolucija(Å)	25-2,6	25-2,15	25-2,8
Ukupni broj refleksija	227921	330258	228357
Broj jedinstvenih refleksija	35649	56269	25513
R_{sym}	0,041 (0,110)#	0,051 (0,272)*	0,041 (0,157)§
Potpunost(%)	97,7 (98,1)#	92,2 (85,5)*	93,0 (88,2)§
$I/\sigma(I)$	17,1 (8,8)#	10,3 (2,0)*	25,3 (4,2)§
	# 2,69-2,6 Å	* 2,23-2,15 Å	§ 2,90-2,80 Å

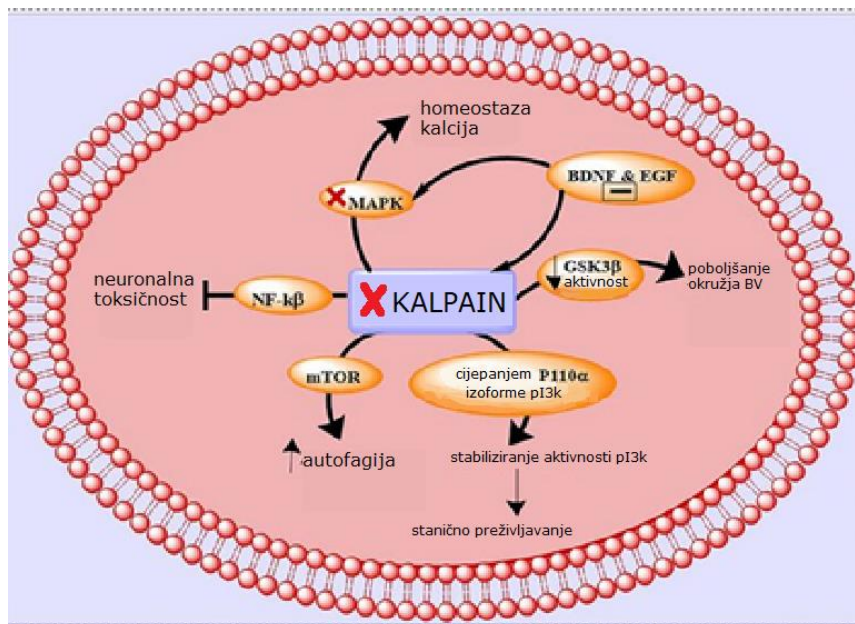
Za određivanje aktivnosti kalpaina najčešće se koriste zimografija kazeinom ili test aktivnosti baziran na Förster rezonantnom prijenosu energije (FRET). Zimografija kazeinom koristi se za detekciju aktivnosti kalpaina u lizatima tkiva ili stanica. Lizati tkiva ili stanica se unose u poliakrilamidni gel koji sadrži kazein. Enzimi se unutar lizata odvajaju gel elektroforezom. Kalpaini unutar lizata cijepaju kazein u gelu koji im služi kao supstrat te se na temelju razgradnje kazeina određuje aktivnost kalpaina. Degradacija kazeina kalpainom je vidljiva u vrpcama koje su manje obojane ako je prethodno obojano s Coomassie Brilliant Blue G-250. FRET metoda temeljena je na kontinuiranom praćenju fluorescencije iz visoko osjetljivog supstrata koji je specifičan za kalpain. (32,33)

4. Kalpaini i bolesti

Kalpaini su sveprisutni i imaju velik broj supstratnih proteina stoga imaju ulogu u patofiziologijama raznih bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, traumatska ozljedi mozga, Huntingtonova bolest, ateroskleroza, DM te u posljedicama povezanih s DM: dijabetička kardiomiopatija, dijabetička nefropatija i dijabetička retinopatija.

4.1. Uloga kalpaina u neurodegenerativnim bolestima

Kalpaini sudjeluju u patogenezi raznih neurodegenerativnih stanja kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova i Huntingtonova bolest, traumatska ozljeda mozga, cerebralna ishemija, ekscitotoksičnost i epilepsija.



Slika 8. Inhibicija kalpaina u različitim signalnim putevima (NF- $\kappa\beta$, BDNF i EGF, GSK-3 β , MAPK, PI3K, mTOR) dovodi do smanjenja neurodegeneracije. (34)

Glavni uzroci smrti neurona u Alzheimerovoj bolesti su oksidacijski stres i povišena koncentracija Ca^{2+} što dovodi do aktivacije kalpaina i smanjenja regulacije kalpastatina. U histopatološkim studijama pacijenata s Alzheimerovom bolešću utvrđeno je nakupljanje kalpaina i taloženje

amiloidnog beta ($A\beta$) proteina uz unutarstanične neurofibrilarne čvorove (NFT) i izvanstaničnu okolinu distrofičnih neuritičnih senilnih plakova (SP). Kalpaini su uključeni u MAPK put i aktivaciju neuronske kinaze 5 ovisne o ciklinu (CDK5) te induciranje formiranja NFT (koji se većinom sastoje od hiperfosforiliranih tau proteina) zbog čega dolazi do povišenog p25. Aktivacijom CDK5 cijepa se p35, regulatorni protein cdk5, čime nastaje p25. Nakupljanje p25 dovodi do stvaranja lezija u mozgu uzrokujući hiperfosforilaciju tau proteina. Tau hiperfosforilacijom pomoću p25/cdk5 smanjuje se njegov afinitet za mikrotubule čime dolazi do destabilizacije mikrotubula i do nakupljanja mikrotubula koji nisu vezani za tau. Destabilizacijom i nakupljanjem mikrotubula bez tau naposljetku dolazi do poremećaja u citoskeletu i apoptoze neuronskih stanica. BACE1 aktivacijom kalpaina aktivira put CDK5 kinaze kojim dolazi do povećane koncentracije $A\beta$ i njegovog nakupljanja. (34,35) Inhibitori kalpaina koji smanjuju cijepanje tau proteina, oštećenje sinapse i produkciju $A\beta$ daju obećavajuće rezultate u prekliničkim istraživanjima na životinjskim modelima Alzheimerove bolesti. (36)

U Parkinsonovoj bolesti razni neurotoksini utječu na smrt dopaminergičnih neuronalnih stanica, a posebice utječu na mitohondrijski kompleks 1 važan za skladištenje Ca^{2+} . Disfunkcija mitohondrija dovodi do povišenih koncentracija Ca^{2+} , stvaranja slobodnih radikala ali i otpuštanja proapoptotskih proteina kao što su citokrom c i AIF (*engl.* apoptosis inducing factor) aktivacijom kalpaina.(34,35) U Parkinsonovoj bolesti α -sinuklein, koji je inače uključen u otpuštanje neurotransmitera i regulaciju dinamike sinaptičkih vezikula, je cijepan kalpainima čime nastaju toksični fragmenti koji se nakupljaju te potiču stvaranje Lewy-evih tjelešaca.(36) Kalpaini također aktiviraju p53 koji uzrokuje oštećenje DNA i CDK5 koji fosforilira Lewyeva tjelešca i njegove komponente čime raste ekspresija p25 i p25 se nakuplja u substantia nigra. (34,35) Inhibitori kalpaina koji smanjuju agregaciju α -sinukleina, zaštićuju dopaminergične neurone i smanjuju disfunkciju mitohondrija imaju potencijal u liječenju Parkinsonove

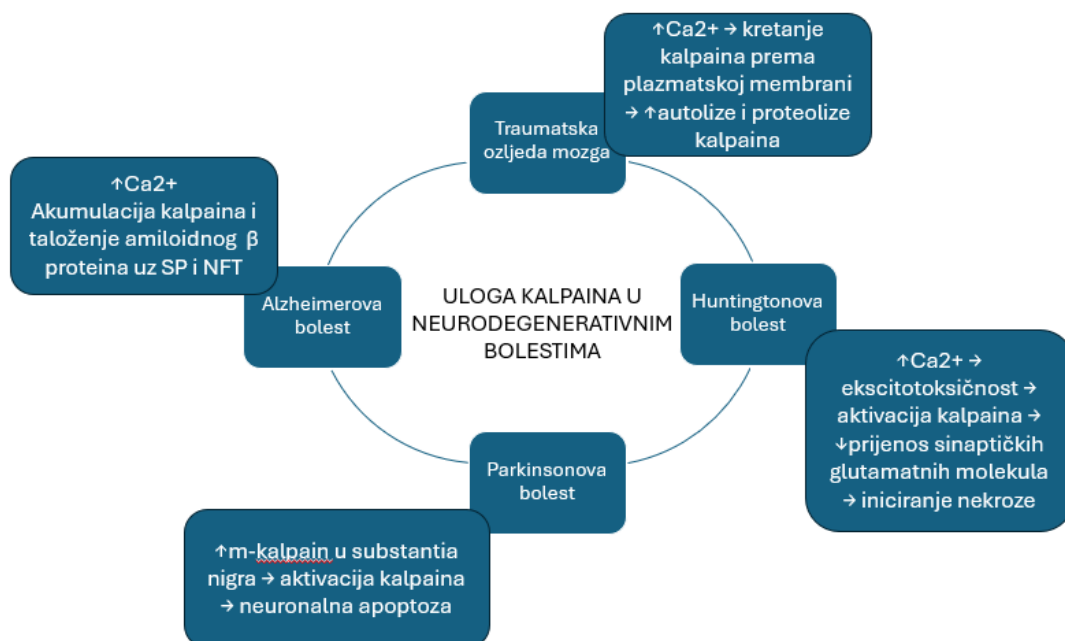
bolesti.(36) Otkriveni su inhibitori kalpaina gabadur, neurodur te kalpeptin i MDL-28170 koji bi u budućnosti mogli postati terapija za liječenje Parkinsonove bolesti.(34)

Huntingtonova bolest uzrokovana je ekspanzijom trinukleotida CAG čime dolazi do cijepanja terminalnog kraja Huntingtin gena(Htt) i deficijencije proteina. Bolest karakterizira i povećana koncentracija Ca^{2+} čime se aktiviraju kalpains i uzrokuju aktivaciju NMDAR. Povećano izlaganje polyQ, proteinskog segmenta koji se sastoji od glutamatnih proteinskih jedinica, dodatno povećava aktivaciju NMDAR čime se smanjuje prijenos sinaptičkih glutamatnih molekula, povećava koncentracija Ca^{2+} i mitohondrijski stres te naposljetku pojačava toksičnost u mozgu. Dokazano je da kalpains mogu cijepati Htt protein u strijatalnim stanicama na manje N fragmente što dovodi do njihovog nakupljanja u jezgri i doprinosi daljnjoj progresiji bolesti. Aktivacija kalpaina poprilično djeluje i na nekrozu neuronskih stanica tako što uzrokuje aktivaciju kaspaze-3. (24,25) Inhibitor kalpaina olesoxime bi u budućnosti mogao imati veliki terapijski značaj u liječenju Huntingtonove bolesti zbog svoje neuroprotektivne uloge na živčane stanice u mnogim neuronalnim poremećajima.(34)

U traumatskoj ozljedi mozga (TBI) dolazi do ozljede aksona i gubitka NF proteina u bijeloj i sivoj tvari mozga. Kalpains cijepaju tri NF proteina u bijeloj tvari: NF68, NF160 i NF200. Fragmenti spektrina koji su nastali cijepanjem spektrina kalpainom u TBI nalaze se na istoj strani tijela na kojoj je došlo do ozljede čime dolazi do raznih morfoloških promjena. Aktivacija kalpaina-1 nakon TBI je brza i prolazna dok je aktivacija kalpaina-2 odgođena i produžena. Aktivacija kalpaina-2 je blisko povezana s neurodegenerativnim posljedicama TBI-a jer svojom aktivacijom pomoću ekstrasinaptičkih NMDA receptora uzrokuje umiranje neuronalnih stanica i ekscitotoksičnost. Inhibitor kalpaina AK295 [Z-Leu-amino butirična kiselina-CONH (CH₂)₃ morfolin] pokazao je smanjeni gubitak memorije i motorike nakon TBI-a. SJA6017, također inhibitor kalpaina, nakon

administracije dokazao je smanjenu smrt neuronalnih stanica nakon TBI-a.(34)

Cerebralna ishemija je neurodegenerativno stanje karakterizirano naglim oštećenjem protoka krvi u dijelu mozga ili cijelom. U cerebralnoj ishemiji dolazi do asimetrične polarizacije stanica zbog manjka energije dostupne oštećenom području mozga i niske koncentracije iona natrija koja ometa membranski potencijal stanica u mirovanju. Povećan je transport glutamatnim receptorima zbog njihove hiperaktivacije čime dolazi do nekontroliranog otpuštanja glutamata i povećane koncentracije Ca^{2+} koja uzrokuje aktivaciju kalpaina. Aktivacija kalpaina u cerebralnoj ishemiji dovodi do cijepanja N kraja collapsing response mediator proteina 1–5 (CRMP 1–5) i ekscitotoksičnosti uzrokovane aktivacijom CDK-5. SNJ-1945, inhibitor kalpaina, ima potencijalnu ulogu u liječenju cerebralne ishemije zbog protektivne uloge u djelovanju akutne cerebralne ishemije u miševa. Veliki terapijski značaj mogli bi imati i AK295, koji je dokazao značajnu neuroprotekciju u štakorskom modelu okluzije cerebralne arterije.(34)



Slika 9. Uloga kalpaina u raznim neurodegenerativnim bolestima. (26)

Kalpain-2 ima veliku ulogu u neurodegenerativnim bolestima tako što uzrokuje degradaciju STEP na inaktivne fragmente i aktivaciju p38 nizvodne signalnih puteve smrti neurona.(27)

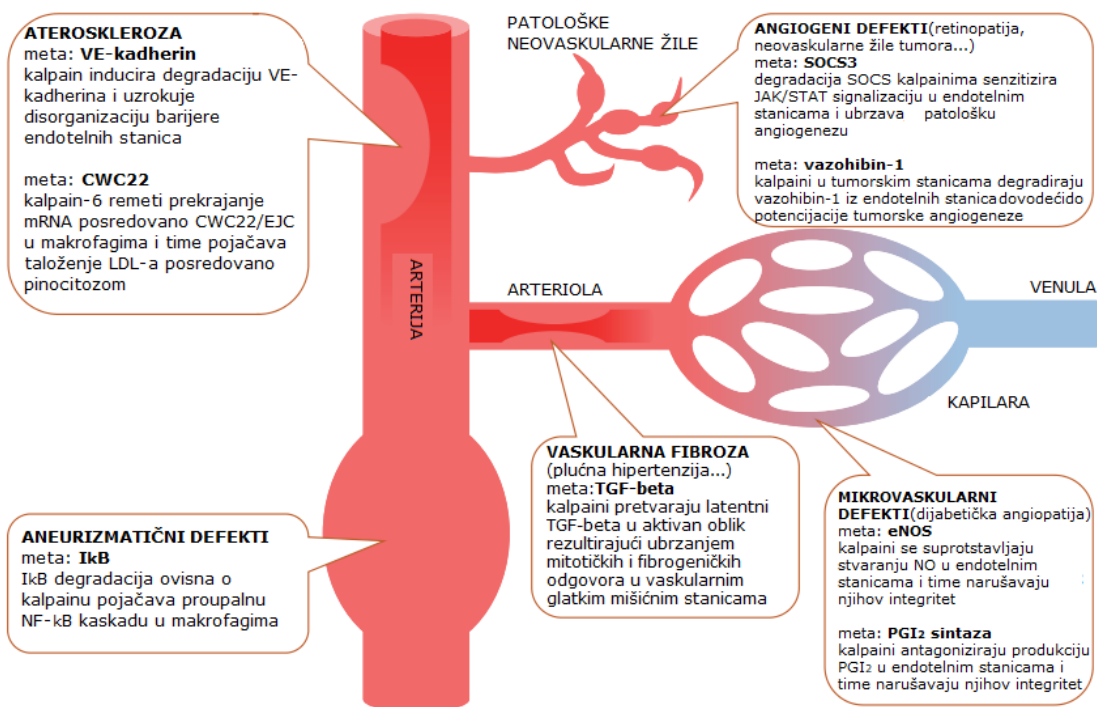
4.2. Kalpains u bolestima krvožilnog sustava

Kalpains sudjeluju u patogenezi raznih kroničnih vaskularnih bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetička angiopatija ili retinopatija i aneurizme. Do ovih stanja dolazi zbog disfunkcionalnog proteolitičkog sustava kalpaina ili defektivnog metabolizma kalpaina u krvnim žilama.(37)

Ateroskleroza karakterizira zadebljanje sistemskih arterija. Posljedični aterosklerotski plakovi zatim mogu dovesti do smrtonosnih kardiovaskularnih posljedica kao što su moždani udar i infarkt miokarda. Smatra se da je oksidativni stres potaknut reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) u aterosklerotičnim lezijama uzrok ateroskleroze jer potiče razne komponente upale (upalni citokini i kemokini, adhezijske molekule...) kroz transkripcijske faktore osjetljive na redoks reakcije. Prekomjerna ekspresija adhezijskih molekula dovodi do adhezije leukocita za endotelne stanice, a kemoatraktantski protein 1 monocita potencira pokretljivost monocita, odnosno makrofaga. Regrutirani makrofagi zatim internaliziraju LDL (low-density lipoprotein) kolesterol nakon čega slijedi njegova lizosomalna degradacija. U odgovoru na oksidirani ili enzimski modificirani LDL dolazi do induciranja kalpaina-2. Kalpain-6 se u makrofagima aktivira u odgovoru na proupalne citokine kao što je tumorski faktor nekroze α (TNF- α) i veže se za CWC22 te time sprječava njegovu pratnju exon-junction kompleksa (EJC) do jezgre. Kalpain-6 pojačava internalizaciju LDL kolesterola u makrofagima čime se još više potiče induciranje kalpaina-2. Kalpain-2 degradira vaskularno endotelni (VE-) kadherin, važni faktor u funkciji barijere epitelnih stanica, zbog čega dolazi do deorganizacije barijere. Tijekom dislipidemije kalpain se aktivira u limfnim endotelnim stanicama što dovodi do smanjene stabilnosti regulatornih T stanica proizvodnjom TGF- β 1

i smanjene imunosupresije u arterijama. U aktivaciji kalpaina ulogu ima i VEGF čime se potiče aktivacija Akt i eNOS te produkcija NO.(6,37,38)

Do početka nastanka aneurizmalnih bolesti dovodi pretjerani oksidativni stres u ateropronim (atheroprone) arterijama uzrokujući nakupljanje metaloproteinaza matriksa (MMP) i preuređenje vaskularnih tkiva. Smatra se da kalpaini imaju ulogu u aterosklerotičnim aneurizmama aorte. Kalpain-1 dovodi do vaskularne fibroze povezane sa starenjem u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama (VSMC) pojačavanjem MMP2 i ubrzavanjem arterijske kalcifikacije. (37)



Slika 10. Pregled regulacije degenerativnih vaskularnih poremećaja kalpainima. (35)

4.3. Kalpaini u autoimunim bolestima i upali

Kalpaini imaju važnu ulogu u mnogim autoimunim bolestima kao što su eozinofilični ezofagitis i autosomno dominantna neovaskularna upalna vitreoretinopatija (ADNIV).

Eozinofilični ezofagitis je kronični inflamatorni poremećaj izazvan alergijskom hipersenzitivnošću na hranu, a povezan je sa mutacijama u *CAPN14* genu koji kodira za kalpain-14. Neravnoteža u proteolitičkoj funkciji kalpaina-14 u jednjaku može biti izazvana okolišnim ili genetičkim čimbenicima i može dovesti do sklonosti za oštećenje tkiva te gubitka cjelovitosti tkiva u jednjaku. Eozinofilični ezofagitis djelomično je uzrokovan i povećanom razinom IL-13. IL-13 povećava ekspresiju kalpaina povećavanjem stresa u ER. Prekomjerna ekspresija kalpaina-14 uzrokuje smanjenu ekspresiju DSG1 koji je uključen u interakcije između stanica uzrokujući gubitak stabilnosti barijere i povećanje protoka fluorescein izotijacijanat-dekstrana kroz epitelni sloj.(23,39,40) Kalpain-14 je inhibiran raznim inhibitorima klasičnih kalpaina kao što su: E-64, acetil-CAST, PD-151746 i MDL-28170.(40)

ADNIV je nasljedna autoimuna bolest koja oponaša česte bolesti oka kao što su uveitis, retinitis pigmentosa, proliferativna vitreoretinopatija i proliferativna dijabetička retinopatija. Uzrokovana je mutacijama u genu za kalpain-5 koje mijenjaju afinitet kalpaina-5 za vezanje na membranu. Kalpain-5 u ADNIV uzrokuje oštećenje fotoreceptorskih stanica koje uz teške intraokularne upale i neovaskularizaciju naposljetku dovodi do sljepoće.(41)

Kalpaini sudjeluju u raznim procesima upale. Upala je obrambena reakcija tijela na štetne podražaje i važna je za održavanje homeostaze tijekom ozljeda ili infekcija. Kalpain degradira I κ B, inhibitor NF κ B, čime doprinosi aktivaciji NF κ B koji je važan za transkripciju raznih medijatora upale kao što su TNF- α , ciklooksigenaza-2 i IL-1 te na taj način utječu na razvoj upale. Kalpaini u makrofagima u mirovanju cijepaju selenoprotein-K čime se makrofagi održavaju u inaktivnom stanju. U infekciji lišmanijom kalpain-1 pomaže patogenu da se ubaci u stanicu inhibirajući transkripciju RNA polimeraze III i oštećujući funkciju makrofaga. Kalpaini sudjeluju u apoptozi neutrofila i njihovom prijelazu u nekrozu te sprječavaju njihovu mogućnost ingestiranja patogena. Nakon apoptoze dolazi do otpuštanja molekula

patogena iz mrtvog neutrofila u okolinu stanica gdje hidrolaze i proteaze iz neutrofila oštećuju okolno tkivo. Uključeni u regulaciju proliferacije T limfocita, kalpaini utječu na vezanje antigena-1 povezanog s funkcijom limfocita(LFA-1) za interstaničnu adhezijsku molekulu-1(ICAM-1) čime T limfociti ostaju na mjestu infekcije ili u limfnom čvoru. U infekciji lipopolisaharidima kalpaini cijepanjem pre-IL-1 α povećavaju njegov afinitet za receptor IL-1 čime se pojačava upalni odgovor. U starijoj dobnoj skupini utvrđena je manja razina kalpaina što se može povezati sa hipoimunosti starijih osoba.(39)

5. Kalpaini u šećernoj bolesti

Šećerna bolest (DM) je kompleksni metabolički poremećaj kojeg karakterizira povišena razina glukoze u krvi koja nastaje zbog smanjenog lučenja inzulina iz gušterače ili inzulinske rezistencije.(42) Većina dijabetičkih poremećaja su multifaktorijalni, odnosno uzrokovani djelovanjem više čimbenika kao što su genetska predispozicija, pretilost, način prehrane i života. Danas je DM sve češća bolest, a zahvaća osobe svih dobnih skupina.

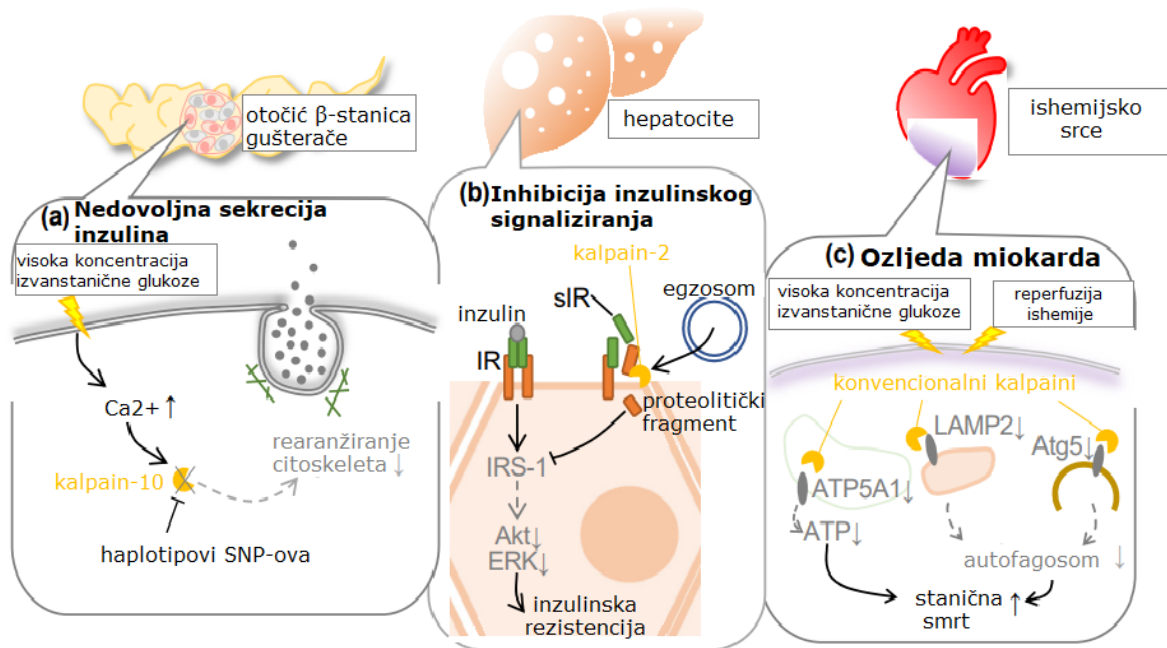
Dijabetes tipa I (T1DM) uzrokovan je autoimunim uništavanjem β -stanica gušterače što onemogućuje gušterači da stvara i izlučuje inzulin. β -stanice gušterače u Langerhansovim otočićima potaknute visokom koncentracijom glukoze u krvi otpuštaju inzulin, a kao posljedica metabolizma glukoze u njima raste koncentracija Ca^{2+} u citoplazmi zatvaranjem K_{ATP} kanala. Ca^{2+} ulazi u stanicu gdje je potreban za egzocitozu inzulinskih granula posredovanu Ca^{2+} . Inzulin se zatim veže na tirozin kinazni inzulinski receptor (IR) sastavljen od α i β podjedinica. Svojim vezanjem na β podjedinicu inzulinskog receptora uzrokuje njezinu autofosforilaciju i signalizira jetri da pretvori višak glukoze u glikogen te ostalim stanicama u tijelu da iskoriste glukozu kako bi ponovno došlo do normalne koncentracije glukoze u krvi. Kada je koncentracija glukoze u krvi niska, dolazi do

stimulacije α -stanica gušterače da otpuste glukagon koji dalje signalizira jetru da pretvori glikogen u glukozu koja se zatim otpušta u krv kako bi se postigla normalna koncentracija glukoze u krvi. (1,5,12) Imunosne stanice poput makrofaga, CD4 i CD8 T limfocita te B limfocita imaju ulogu u uništavanju β -stanica gušterače u T1DM zbog čega dolazi do proizvodnje manje količine inzulina i naposljetku povišene koncentracije glukoze u krvi (hiperglikemije) jer ona ne može ući u stanice.(42)

Dijabetes tipa II (T2DM) je uzrokovan poremećajem sekrecije i djelovanja inzulina, a karakterizira ga inzulinska rezistencija i povećana proizvodnja inzulina (hiperinulinemija) u početku bolesti. Do inzulinske rezistencije vjerojatno dolazi zbog smanjene ekspresije IR na površini stanica. Do hiperinulinemije na početku bolesti dolazi zbog pretjeranog rada β -stanica gušterače kako bi nadoknadile inzulinsku rezistenciju, a do nedostatka inzulina dolazi kada je bolest već uznapredovala zbog zamora β -stanica gušterače. U ovom tipu dijabetesa također dolazi do hiperglikemije zbog nedostatka inzulina.(5,42)

U oba tipa bolesti dolazi do oslabljenog djelovanja inzulina na što utječu nakupljanje unutarstaničnih lipida, povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina te otpuštanje raznih citokina poput TNF- α i IL-6. Oslabljenim djelovanjem inzulina dolazi do hiperglikemije koja dalje dovodi do osjećaja gladi jer stanice ne unose dovoljno glukoze, žedi te osmotske diureze i prekomjernog mokrenja. Također može doći i do dehidracije i nedostatka elektrolita ako unos hrane i tekućine ne zadovoljava potrebu za ispravljanjem gubitaka.(42) Tijekom hiperglikemije dolazi do aktivacije kalpaina u endotelnim stanicama, hepatocitima i β -stanicama gušterače. Kako je prethodno navedeno, kalpain-10 doprinosi oslobađanju inzulina iz β -stanica gušterače i olakšava prijenos glukoze unutar stanice pomoću glukoznog transportera 4 (GLUT4), dok polimorfizmi *CAPN10* gena oštećuju funkciju kalpaina-10 uslijed čega je otežano otpuštanje inzulina iz β -stanica gušterače i prijenos glukoze u stanicu putem GLUT4. Izvanstanični kalpain-2 otpušten iz egzosoma ima sposobnost direktnog cijepanja ektodomene β

podjedinice IR i olakšava cijepanje β podjedinice IR γ -sekretazom što sprječava prijenos signala inzulina IRS-1/Akt/ERK putem.(6)



Slika 8. U patogenezu dijabetesa uključeni su konvencionalni i nekonvencionalni kalpaini. (a) Kalpain-10 doprinosi oslobađanju inzulina iz otočića u kojima se nalaze β -stanica gušterače. (b) Izvanstanični kalpain-2 koji se oslobađa iz egzozoma upravlja direktnim cijepanjem ektodomene β podjedinice IR. Takvo cijepanje ometa signaliziranje inzulina IRS-1/Akt/ERK putem. (c) Konvencionalni kalpaini u dijabetesu pridonose ishemijskoj ozljedi miokarda. Mitohondrijski kalpain smanjuje stvaranje ATP-a degradacijom ATP5A1, smanjuje autofagiju degradacijom LAMP2 i Atg5 promovirajući staničnu smrt.; Atg5- protein povezan s autofagijom 5; ATP-adenozin trifosfat; ATP5A1- ATP sintaza, H^+ transportirajući mitohondrijski F1 kompleks alfa podjedinica 1; ERK- kinaza regulirana izvanstaničnim signalom; IR- inzulinski receptor, IRS-1- supstrat 1 inzulinskog receptora; LAMP2- membranski protein 2 povezan s lizosomom; sIR- topljivi inzulinski receptor; SNP- polimorfizam jednog nukleotida.(6)

Kao što je ranije navedeno DM je kompleksni metabolički poremećaj te zbog svoje kompleksnosti izaziva mnoge druge poremećaje koje možemo podijeliti na 2 skupine: mikrovaskularne i makrovaskularne poremećaje. Mikrovaskularne posljedice su neuropatija, nefropatija te retinopatija, a makrovaskularne posljedice su razne kardiovaskularne bolesti, bolesti krvnih žila te moždani udar.(42)

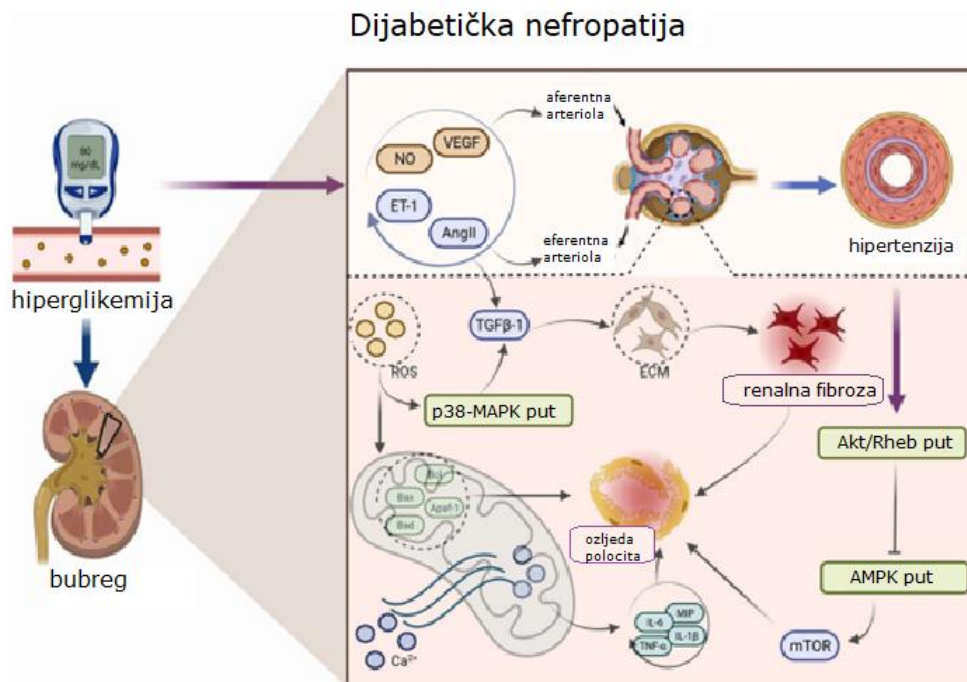
5.1. Kalpaini u dijabetičkoj kardiomiopatiji

Osobe s DM imaju veći rizik za razvoj bolesti perifernih arterija, infarkta miokarda, moždanog udara i koronarne srčane bolesti. (42) Dijabetička kardiomiopatija je ventrikularna disfunkcija na koju izravno utječu i T1DM i T2DM djelovanjem na strukturu i funkciju srčanog tkiva u odsutnosti promjena u krvnom tlaku i koronarne arterijske bolesti. Bolest je u početku karakterizirana miokardijalnom fibrozom, dijastoličkom disfunkcijom, kasnije sistoličkom disfunkcijom i naposljetku otkazivanjem rada srca. Mehanizmi koji sudjeluju u dijabetičkoj kardiomiopatiji odnose se na povećani oksidacijski ili nitrozativni stres, signalizaciju receptora angiotenzina II, pojačano djelovanje receptora za naprednu glikaciju krajnjih produkata, nakupljanje krajnjih produkata napredne glikacije te aktivaciju raznih proupalnih puteva i signalnih puteva stanične smrti. Navedeni mehanizmi djeluju uz smanjenu aktivnost Ca^{2+} -ATP-aza u sarkoplazmatskom ili endoplazmatskom retikulumu, uz promjene u sastavu izvanstaničnog matriksa s povećanom kardijalnom fibrozom i promjenu izoforme teškog lanca miozina. U odgovoru na visoku koncentraciju glukoze srčani fibroblasti prolaze značajnu hiperplaziju(povećanje broja stanica). Proliferacija fibroblasta uzrokovana je mnogim faktorima uključujući NF- κ B, koji je potreban za indukciju proupalnih citokina kao što je TNF- α koji je prekomjerno eksprimiran u srcu pacijenata s dijabetesom. Kalpaini potiču razvoj dijabetičke kardiomiopatije induciranjem stanja fibroze u srčanom tkivu aktivacijom NF- κ B signalnog puta. (12,43) Kalpaini u mitohondriju doprinose ozljedi miokarda u dijabetesu smanjujući proizvodnju ATP-a

degradacijom ATP5A1 (ATP sintaze α) i smanjenjem regulacije autofagije degradacijom LAMP2 (membranskog proteina 2 povezanog s lizosomom) i Atg5 (protein 5 povezan s autofagijom) uzrokujući staničnu smrt. (6) Mitohondrijski kalpaini cijepanjem ATP5A1 utječu na povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u mitohondriju uzrokujući oksidativni stres, disfunkciju mitohondrija i hipertrofiju (povećanje količine tkiva ili organa) u kardiomiocitima i stanicama pod stresom te sudjeluju kao glasnici u drugim signalnim putevima stanične smrti. Oksidacijski stres uzrokovan ROS dovodi i do otpuštanja proapoptotskih proteina citokroma c i AIF koji naposljetku dovode do apoptoze stanica. (43)

5.2. Kalpaini u dijabetičkoj nefropatiji

Dijabetička nefropatija je multifunkcionalna progresivna bolest koja uzrokuje kroničnu bolest bubrega u završnoj fazi. Javlja se u oba tipa DM, a karakterizirana je gubitkom naboja barijere na glomerularnoj bazalnoj membrani i ekspanzijom molekularnog matriksa te disfunkcijom podocita, specijaliziranih stanica koje formiraju filtracijsku barijeru oko glomerularnih kapilara. Disfunkcija podocita povezana je s povećanom mikroalbuminurijom, a njihovo uništenje s proteinurijom koja se pojavljuje u dijabetičkoj nefropatiji.



Slika 12. Patološki znakovi dijabetičke nefropatije. (44)

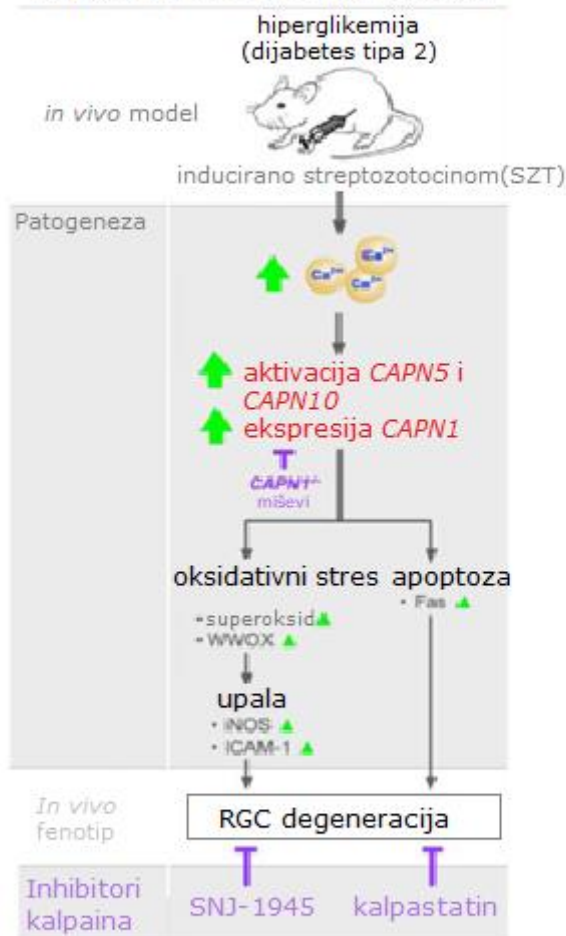
Uz dijabetičku nefropatiju se povezuju mnoga druga patološka stanja poput zadebljanja glomerularne bazalne membrane, upale te glomerularna skleroza. U bolesti dolazi do raznih strukturnih i morfoloških promjena zbog kompleksne patogeneze bolesti jer uključuje razne faktore, molekule i stanice. (12,42,45) Utvrđeno je da kalpain-10 ima važnu ulogu u renalnom metabolizmu. U kroničnom stanju povišene glukoze, smanjuje se ekspresija kalpaina-10 koji se nalazi u mitohondriju. Smanjenjem ekspresije mitohondrijskog kalpaina-10 dolazi do nakupljanja njegovih supstrata i mitohondrijske disfunkcije. (12,45) Kalpain-10 se nalazi i u citosolu i u mitohondriju stanica proksimalnih tubula te tamo regulira prolaz iona kalcija iz mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma u citoplazmu. U mitohondrijima renalnih stanica cijepa elektronski transportni lanac smanjujući mitohondrijsko disanje dovodeći do disfunkcije mitohondrija te naposljetku smrti renalnih stanica. U patološkim, odnosno stresnim stanjima, renalne stanice prolaze kroz gubitak ATP-a što dovodi do

povećanog otpuštanja Ca^{2+} iz ER i aktivacije kalpaina. Dokazano je da se njegova ekspresija smanjuje u renalnoj disfunkciji i tijekom starenja. U razvoju dijabetičke nefropatije kalpain-10 inducira apoptozu u stanicama superiornih bubrežnih kanala. (45,46) U renalnoj ishemiji tubularne epitelne stanice otpuštaju kalpaine u izvanstanični okoliš čime se povećava mobilnost epitelnih stanica i pomaže u popravku tubula. Smatra se da kalpaini imaju ulogu u ozljedi proksimalnih tubula budući da njihova prekomjerna aktivacija dovodi cijepanja talina, vinkulina i paksilina što naposljetku uzrokuje nekrozu.(46) Otkriveno je da inhibitori kalpaina PD 150606 i E-64 imaju potencijalni značaj u terapiji dijabetičke nefropatije jer smanjuju ozljedu uzrokovanu ishemijom i renalnu disfunkciju.(12)

5.3. Kalpaini u dijabetičkoj retinopatiji

Dijabetička retinopatija najčešća je mikrovaskularna komplikacija DM. Može se podijeliti u 2 kategorije: rani stadij neproliferativne dijabetičke retinopatije i kasni stadij proliferativne dijabetičke retinopatije. Bolest je karakterizirana krvarenjima u mrežnici, mikroaneurizmama, promjenama venskog kalibra te disfunkcijom retinalnih krvnih žila.(42) Smanjen protok krvi u retinalnim arterijama može dovesti do stanične smrti u štapićima i čunjićima, retinalnim pigmentnim stanicama te posljedično sljepoće. U retinalnom tkivu dolazi do ozljede zbog izlaganja ishemije kisiku i reperfuziji, ali i zbog same ishemije.

Dijabetička retinopatija



Slika 13. *In vivo* model dijabetičke retinopatije povezane s kalpainom. Hiperglikemija je izazvana *i.p.* streptozotocinom (SZT). U izazvanom DM se pokazala povećana aktivacija CAPN5 i CAPN10, kao i povećana ekspresija CAPN1. Aktivirani oksidativni stres i apoptotski putevi rezultirali su degeneracijom ganglijskih stanica retine (RGC)(47)

Neregulirani kalpaini aktiviraju razne signalne puteve ili uzrokuju neprimjerenu angiogenezu i regrutaciju imunskih stanica nakon smrti fotoreceptorskih stanica (slika 13). Kalpaini su uključeni u cijepanje α -spektrina, rhodopsina u štapićima, m-opsina u čunjićima, vimentina u

Müllerovim stanicama (vrsta glijalnih stanica u retini) i kaspaze-3. (11) Tijekom ishemijske ozljede retine aktivirani kalpaini uzrokuju smrt hipoksičnih retinalnih stanica cijepanjem α -spektrina. Tijekom hipoksije dolazi do neovaskularizacije potaknute vaskularnim endotelnim faktorom rasta A (VEGF) koja uzrokuje oštećenje retine i sljepoću. Ekspresija kalpaina u leći pacijenata s DM su viši kod pacijenata koji imaju DM duže vrijeme, dijagnozu napredne dijabetičke retinopatije ili višu razinu A1c hemoglobina. (46)

6. Zaključak

Kalpainsu su obitelj cisteinskih proteaza koja se sastoji od 15 članova, za čiju aktivaciju su potrebni ioni kalcija (Ca^{2+}) te na taj način utječu na procese regulirane kalcijem kao što su stanična proliferacija, diferencijacija i apoptoza. Klasični kalpainsu kalpain-1, 2, 3, 8, 9, 11 i 12 koji sadrže četiri domene prvotno pronađene u μ - i m-kalpainsima (kalpainsima-1 i 2). Atipični kalpainsu kalpain-5, 6, 7, 8b, 10a i 15 kojima nedostaje domena IV te ne mogu stvarati dimer s podjedinicom od 30 kDa. Do aktivacije kalpaina dolazi porastom unutarstanične koncentracije Ca^{2+} uslijed oksidacijskog ili mehaničkog stresa, hipoksije ili lučenja upalnih citokina i faktora rasta čime se kalpainsu translociraju do membrana i aktiviraju u prisutnosti Ca^{2+} i fosfolipida. Njihovom aktivacijom dolazi do autokatalitičke hidrolize domene I, podjedinica od 80 kDa disocira do podjedinice od 30 kDa.

Kalpainsu uključeni su velik broj staničnih procesa cijepajući supstrate kao što su razni citoskeletni proteini, receptori, proteini povezani ili usidreni s membranom i protein fosfataze i kinaze pritom uzrokujući aktivacije signalnih puteva poput MAPK signalnog puta, BDNF signalnog puta koji kasnije aktivira mTOR put, puta glikogen sintaza kinaze (GSK-3 β), PI3K-Akt puta i NF- κ B signalni puta koji najčešće dovode do destrukcije citoskeleta i apoptoze.

U neurodegenerativnim bolestima kalpainsu dovode do daljnje neurodegeneracije i apoptoze neurona hiperfosforilacijom tau proteina, cijepanjem α -sinukleina i Htt proteina. U ateroskleroznim bolestima kalpainsu imaju ulogu u degradaciji VE-kadherina, cijepanju CWC22, I κ B i SOCS3 uzrokujući disorganizaciju barijere endotelnih stanica, nakupljanje LDL-a i pojačavajući proupalnu NF κ B kaskadu u makrofagima. Mutacije u kalpainsima uzrokuju i razne nasljedne autoimune poremećaje poput eozinofiličnog ezofagitisa (mutacija u *CAPN14*) ili autosomno dominantne neovaskularne upalne vitreoretinopatije (ADNIV)(mutacija u *CAPN5*). U upalama kalpainsu degradiraju I κ B čime doprinose aktivaciji NF κ B koji je važan za transkripciju raznih medijatora upale kao što su TNF- α ,

ciklooksigenaza-2 i IL-1 te na taj način promovira upalno stanje. Također su uključeni i u regulaciju proliferacije T limfocita promovirajući vezanje LFA-1 za ICAM-1. U mnogim bolestima dolazi i do upalnih stanja kojima kalpaini dodatno pridonose aktivirajući upalne signalne puteve kao što je NF- κ B zbog čega dolazi do lučenja proupalnih citokina i aktivacije imunosnog odgovora.

U dijabetesu tipa 1 (T1DM) imunosne stanice poput makrofaga, B limfocita te CD4 i CD8 T limfocita, na koje kalpain utječe smanjenjem njihove stabilnosti, imaju ulogu u uništavanju β -stanica gušterače zbog čega dolazi do proizvodnje manje količine inzulina i naposljetku povišene koncentracije glukoze u krvi. Kalpaini potiču razvoj dijabetičke kardiomiopatije induciranjem stanja fibroze u srčanom tkivu aktivacijom NF- κ B signalnog puta, dijabetičke nefropatije induciranjem apoptoze u stanicama superiornih bubrežnih kanala te dijabetičke retinopatije uzrokujući neprimjerenu angiogenezu i regrutaciju imunosnih stanica nakon smrti fotoreceptorskih stanica.

Kalpaini na razne načine utječu u patogenezi i razvoju DM: smanjenjem imunosupresije, odnosno promoviranjem upalnog stanja, destrukcijom citoskeleta i cijepanjem citoskeletnih proteina, inhibicijom signala inzulina cijepanjem podjedinice inzulinskog receptora. Tijekom stanja stresa u stanici kao što je oksidacijski ili mehanički stres, izlučivanje faktora rasta ili upalnih citokina te hipoksija, dolazi do izbacivanja Ca^{2+} iz staničnih spremnika i njegove povišene unutarstanične koncentracije čime dolazi do aktivacije kalpaina. Aktivni kalpaini cijepaju supstrate i aktiviraju razne signalne puteve kojima dolazi do dodatne aktivacije kalpaina i naposljetku do apoptoze stanica.

Inhibitori kalpaina imaju potencijalan terapijski učinak u liječenju mnogih patoloških stanja u kojima su uključeni kalpaini. Veliku prepreku korištenja tih inhibitora i kliničkim liječenjima čini nespecifičnost tih inhibitora, odnosno mogućnost djelovanja na više vrsta kalpaina zbog čega bi mogli imati neželjeno toksično djelovanje. Razvojem novih metoda i specifičnih

inhibitora mogli bi se bolje istražiti supstrati kalpaina te bi se na taj način moglo doprinijeti liječenju nekih od navedenih bolesti.

7. Kratice

ADNIV - autosomno dominantna neovaskularna upalna vitreoretinopatija

AIF - faktor induciranja apoptoze (*eng.* apoptose inducing factor)

Akt - protein kinaza B

Apaf-1 - faktor 1 aktiviranja apoptotske proteaze (*eng.* apoptotic protease activating factor 1)

BDNF - neurotrofični faktor koji potječe iz mozga (*eng.* brain-derived neurotrophic factor)

Bid - BH3 interakcijski agonist smrti (*eng.* BH3-interacting death agonist)

CDK5 - kinaza 5 ovisna o ciklinu

CWC22 - protein homolog povezan s spliceosomom

DM - diabetes mellitus, šećerna bolest

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta (*eng.* epidermal growth factor receptor)

eNOS - endotelna sintaza dušikovog oksida (*eng.* endothelial nitric oxide synthase)

ER - endoplazmatski retikulum

Erk - kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (*eng.* extracellular signal-regulated kinase)

GLUT4 - transporter glukoze 4

GSK-3 β - kinaza glikogen sintaze-3 beta (*eng.* glycogen synthase kinase-3 beta)

ICAM1 - interstanična adhezijska molekula 1

IR - inzulinski receptor

LDL - lipoprotein niske gustoće (*eng.* low density lipoprotein)

LFA1 - antigen-1 povezan s funkcijom limfocita

MAPK - protein kinaza aktivirana mitogenom (*eng.* mitogen-activated protein kinase)

MMP - metaloproteinaze matriksa

mTOR - meta rapamicina kod sisavaca (*eng.* mammalian target of rapamycin)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

NFT - neurofibrilarni čvorovi

NF- κ B - nuklearni faktor kappa lakog lanca pojačivača aktiviranih B stanica (*eng.* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NMDAR - N-metil D-aspartat receptor

PARP - poli (ADP-riboza) polimeraza (*eng.* poly (ADP-ribose) polymerase)

PI3K - fosfatidilinozitol-3 kinaza (*eng.* phosphatidylinositol 3-kinase)

PTEN - homolog fosfataze i tenzina (*eng.* phosphatase and tensin homolog)

Rb - retinoblastom

ROS - reaktivne kisikove vrste

STEP - strijatalno obogaćena protein tirozin fosfataza (*eng.* striatal-enriched protein-tyrosine phosphatase)

T1DM - šećerna bolest tipa 1

T2DM - šećerna bolest tipa 2

TBI - traumatska ozljeda mozga

TGF- β - transformirajući faktor rasta β (*eng.* transforming growth factor beta)

TNF- α - tumorski faktor nekroze α (*eng.* tumor necrosis factor α)

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta

VSMC - vaskularne glatke mišićne stanice

8. Literatura

1. Kaul K, Tarr JM, Ahmad S 1, Kohner' EM, Chibber' R. INTRODUCTION TO DIABETES MELLITUS.
2. Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, Activation, and Biology of Calpain [Internet]. 2004. Available from: http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/53/suppl_1/S12/377552/zdb10204000s12.pdf
3. Schaefer KA, Toral MA, Velez G, Cox AJ, Baker SA, Borcharding NC, et al. Calpain-5 expression in the retina localizes to photoreceptor synapses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 May 1;57(6):2509–21.
4. Baudry M, Chou MM, Bi X. Targeting calpain in synaptic plasticity. Vol. 17, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013. p. 579–92.
5. Harris F, Chatfield L, Singh J, Phoenix DA. Role of calpains in diabetes mellitus: A mini review 1 2. Kluwer Academic Publishers; 2004.
6. Miyazaki T. Calpain and Cardiometabolic Diseases. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
7. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The Calpain System. 2003; Available from: <http://ag.arizona.edu/calpains/>.
8. Sorimachi H, Ono Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc Res*. 2012 Oct 1;96(1):11–22.
9. Wang Y, Liu Y, Bi X, Baudry M. Calpain-1 and calpain-2 in the brain: New evidence for a critical role of calpain-2 in neuronal death. Vol. 9, *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020. p. 1–16.

10. Cheng SY, Wang SC, Lei M, Wang Z, Xiong K. Regulatory role of calpain in neuronal death. Vol. 13, Neural Regeneration Research. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2018. p. 556–62.
11. Cheng SY, Wang SC, Lei M, Wang Z, Xiong K. Regulatory role of calpain in neuronal death. Vol. 13, Neural Regeneration Research. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2018. p. 556–62.
12. Wan T ting, Li X fen, Sun YM, Li YB, Su Y. Role of the calpain on the development of diabetes mellitus and its chronic complications. Vol. 74, Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson s.r.l.; 2015. p. 187–90.
13. Sorimachi H, Suzuki K. The Structure of Calpain [Internet]. Vol. 129, JB Review J. Biochem. 2001. Available from: <https://academic.oup.com/jb/article/129/5/653/935411>
14. Dókus LE, Yousef M, Bánóczy Z. Modulators of calpain activity: inhibitors and activators as potential drugs. Vol. 15, Expert Opinion on Drug Discovery. Taylor and Francis Ltd; 2020. p. 471–86.
15. Duguez S, Bartoli M, Richard I. Calpain 3: A key regulator of the sarcomere? Vol. 273, FEBS Journal. Blackwell Publishing Ltd; 2006. p. 3427–36.
16. Peng P, Min L, Song S, Zhao J, Li L, Yang C, et al. Elevated expression of calpain-4 predicts poor prognosis in patients with gastric cancer after gastrectomy. Int J Mol Sci. 2016 Oct 1;17(10).
17. Maemoto Y, Ono Y, Kiso S, Shibata H, Takahara T, Sorimachi H, et al. Involvement of calpain-7 in epidermal growth factor receptor degradation via the endosomal sorting pathway. FEBS Journal. 2014;281(16):3642–55.

18. Hata S, Doi N, Kitamura F, Sorimachi H. Stomach-specific calpain, nCL-2/calpain 8, is active without calpain regulatory subunit and oligomerizes through C2-like domains. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Sep 21;282(38):27847–56.
19. Peng P, Wu W, Zhao J, Song S, Wang X, Jia D, et al. Decreased expression of Calpain-9 predicts unfavorable prognosis in patients with gastric cancer. *Sci Rep*. 2016 Jul 12;6.
20. Dear TN, Möller A, Boehm T. CAPN11: A Calpain with High mRNA Levels in Testis and Located on Chromosome 6. *Genomics*. 1999 Jul 15;59(2):243–7.
21. Bochner R, Samuelov L, Sarig O, Li Q, Adase CA, Isakov O, et al. Calpain 12 Function Revealed through the Study of an Atypical Case of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017 Feb;137(2):385–93.
22. Ravulapalli R, Campbell RL, Gauthier SY, Dhe-Paganon S, Davies PL. Distinguishing between calpain heterodimerization and homodimerization. *FEBS Journal*. 2009 Feb;276(4):973–82.
23. Litosh VA, Rochman M, Rymer JK, Porollo A, Kottyan LC, Rothenberg ME. Calpain-14 and its association with eosinophilic esophagitis. Vol. 139, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc.; 2017. p. 1762-1771.e7.
24. Zha C, Farah CA, Holt RJ, Ceroni F, Al-Abdi L, Thuriot F, et al. Biallelic variants in the small optic lobe calpain CAPN15 are associated with congenital eye anomalies, deafness and other neurodevelopmental deficits. *Hum Mol Genet*. 2020 Sep 15;29(18):3054–63.
25. Momeni HR. Role of Calpain in Apoptosis.

26. Ujan JA. Reviewed paper on biology of the Calpain proteolytic system. *Pure and Applied Biology*. 2018 Jun 10;7(2).
27. Baudry M. Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekyll and Mr Hyde? *Curr Neuropharmacol*. 2019 Feb 28;17(9):823–9.
28. Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation [Internet]. Vol. 18, *The EMBO Journal*. 1999. Available from: <https://www.embopress.org>
29. Brali} M, Stemberga V. Calpain Expression in the Brain Cortex after Traumatic Brain Injury. Vol. 36, *Coll. Antropol*. 2012.
30. Smyth MS, Martin JHJ. Review x Ray crystallography. Vol. 53, *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 2000.
31. Hosfield CM, Ye Q, Simon J, Arthur C, Hegadorn C, Croall DE, et al. crystallization papers *Biological Crystallography Crystallization and X-ray crystallographic analysis of m-calpain, a Ca²⁺-dependent protease*. *Calpain Acta Cryst*. 1999;55:1484–6.
32. Biswas AK, Tandon S. Casein zymography for analysis of calpain-1 and calpain-2 activity. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 31–8.
33. McCartney CSE, Davies PL. FRET-based assays to determine calpain activity. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 39–55.
34. Khan H, Garg N, Singh TG, Kaur A, Thapa K. Calpain Inhibitors as Potential Therapeutic Modulators in Neurodegenerative Diseases. Vol. 47, *Neurochemical Research*. Springer; 2022. p. 1125–49.

35. Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallàs M. Involvement of Calpain Activation in Neurodegenerative Processes. 2006.
36. Metwally E, Al-Abbadi HA, Hussain T, Murtaza G, Abdellatif AM, Ahmed MF. Calpain signaling: from biology to therapeutic opportunities in neurodegenerative disorders. Vol. 10, *Frontiers in Veterinary Science*. Frontiers Media SA; 2023.
37. Miyazaki T, Miyazaki A. Dysregulation of calpain proteolytic systems underlies degenerative vascular disorders. Vol. 25, *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. Japan Atherosclerosis Society; 2018. p. 1–15.
38. Miyazaki T, Koya T, Kigawa Y, Oguchi T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, et al. Calpain and Atherosclerosis. Vol. 20, *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2013.
39. Ji J, Su L, Liu Z. Critical role of calpain in inflammation. Vol. 5, *Biomedical Reports*. Spandidos Publications; 2016. p. 647–52.
40. Litosh VA, Rochman M, Rymer JK, Porollo A, Kottyan LC, Rothenberg ME. Calpain-14 and its association with eosinophilic esophagitis. Vol. 139, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc.; 2017. p. 1762-1771.e7.
41. Mahajan VB, Skeie JM, Bassuk AG, Fingert JH, Braun TA, Daggett HT, et al. Calpain-5 Mutations Cause Autoimmune Uveitis, Retinal Neovascularization, and Photoreceptor Degeneration. *PLoS Genet*. 2012 Oct;8(10).
42. Krmpotić. ŠEĆERNA BOLEST I NJEZINE KOMPLIKACIJE [Internet]. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:144204>
43. Ni R, Zheng D, Xiong S, Hill DJ, Sun T, Gardiner RB, et al. Mitochondrial calpain-1 disrupts ATP synthase and induces superoxide generation in type 1 diabetic hearts: A novel mechanism

- contributing to diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2016 Jan 1;65(1):255–68.
44. Hu Q, Chen Y, Deng X, Li Y, Ma X, Zeng J, et al. Diabetic nephropathy: Focusing on pathological signals, clinical treatment, and dietary regulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023 Mar;159:114252.
 45. Wang T, Gao Y, Wang X, Shi Y, Xu J, Wu B, et al. Calpain-10 drives podocyte apoptosis and renal injury in diabetic nephropathy. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2019;12:1811–20.
 46. Potz BA, Ruhul Abid M, Sellke FW. Role of Calpain in Pathogenesis of Human Disease Processes.
 47. Vu JT, Wang E, Wu J, Sun YJ, Velez G, Bassuk AG, et al. Calpains as mechanistic drivers and therapeutic targets for ocular disease. *Trends Mol Med*. 2022 Aug;28(8):644–61.



Europass Životopis

Osobni podaci

Prezime/ Ime **Mlinac Laura**
Adresa(e) 10, Čeglje, 10450, Jastrebarsko, Hrvatska
Telefonski broj(evi) Broj mobilnog 091 762 7052
telefona:
E-mail laura.mlinac@student.uniri.hr

Državljanstvo Hrvatsko

Datum rođenja 07.10.2002.

Spol Ž

Radno iskustvo /

Obrazovanje i osposobljavanje

Datum 2021-
Ime i vrsta organizacije
Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Sveučilište u Rijeci
pružatelja Preddiplomski studij Biotehnologija i istraživanje lijekova
obrazovanja i osposobljavanja

Datum 2017-2021
Ime i vrsta organizacije
Srednja škola Jastrebarsko
pružatelja Opća gimnazija
obrazovanja i osposobljavanja

Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik(ci)	hrvatski																																										
Drugi jezik(ci)	Engleski, njemački																																										
Samoprocjena	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Razumijevanje</th> <th colspan="4">Govor</th> <th colspan="2">Pisanje</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Slušanje</th> <th colspan="2">Čitanje</th> <th colspan="2">Govorna interakcija</th> <th colspan="2">Govorna produkcija</th> <th colspan="2"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Engleski</td> <td>C1</td> <td>Iskusni korisnik</td> <td>C2</td> <td>Iskusni korisnik</td> <td>C1</td> <td>Iskusni korisnik</td> <td>C1</td> <td>Iskusni korisnik</td> <td>C2</td> <td>Iskusni korisnik</td> </tr> <tr> <td>Njemački</td> <td>B1</td> <td>Samostalni korisnik</td> <td>B1</td> <td>Samostalni korisnik</td> <td>A1</td> <td>Temeljni korisnik</td> <td>A2</td> <td>Temeljni korisnik</td> <td>B1</td> <td>Samostalni korisnik</td> </tr> </tbody> </table>	Razumijevanje				Govor				Pisanje		Slušanje		Čitanje		Govorna interakcija		Govorna produkcija				Engleski	C1	Iskusni korisnik	C2	Iskusni korisnik	C1	Iskusni korisnik	C1	Iskusni korisnik	C2	Iskusni korisnik	Njemački	B1	Samostalni korisnik	B1	Samostalni korisnik	A1	Temeljni korisnik	A2	Temeljni korisnik	B1	Samostalni korisnik
Razumijevanje				Govor				Pisanje																																			
Slušanje		Čitanje		Govorna interakcija		Govorna produkcija																																					
Engleski	C1	Iskusni korisnik	C2	Iskusni korisnik	C1	Iskusni korisnik	C1	Iskusni korisnik	C2	Iskusni korisnik																																	
Njemački	B1	Samostalni korisnik	B1	Samostalni korisnik	A1	Temeljni korisnik	A2	Temeljni korisnik	B1	Samostalni korisnik																																	
<i>Europska razina (*)</i>	(*) <u>Zajednički europski referentni okvir za jezike</u>																																										
Društvene vještine i kompetencije	Sposobnost prilagođavanju radu u timu																																										
Tehničke vještine i kompetencije	Upoznata sa osnovama rada u laboratoriju (kroz laboratorijske vježbe na fakultetu)																																										
Računalne vještine i kompetencije	Poznavanje programa paketa MS Office (Powerpoint, Word, Excel)																																										
Umjetničke vještine i kompetencije	Sviranje klavira (završeno osnovno obrazovanje u Glazbenoj školi Jastrebarsko)																																										
Vozačka dozvola	B kategorija																																										