

Calpaínas

*Esparza-Jiménez Morán Martha María **

Resumen.

Las calpaínas constituyen una superfamilia de proteasas no lisosomales dependientes de calcio con una cisteína en su sitio catalítico, codificadas por alrededor de 14 genes independientes. Se les han atribuido diversas funciones como el anclaje de proteínas de membrana, cascadas de señalización, remodelamiento del citoesqueleto y apoptosis. Desde la década de los 60's se sospechaba sobre la existencia de un sistema enzimático que participaba en diversas funciones proteolíticas dependientes del calcio, en 1974 se purificó la proteína con actividad de tipo papaína que sería llamada después m-calpaína, por la combinación de los vocablos "calcio" y "papaína". La familia de calpaínas de forma inicial estaba formada por la μ -calpaína (calpaína 1), la m-calpaína (calpaína 2) y la calpastatina. Han sido implicadas en enfermedades como diabetes, cataratas, esclerosis múltiple, cáncer, distrofia muscular de Duchenne, Alzheimer y por lo menos un desorden de carácter autosómico recesivo donde participa la calpaína 3, la distrofia muscular limb-girdle tipo 2A, (LGMD2A *Online Mendelian Inheritance in Man* número 253600) siendo ésta la primer calpainopatía descrita ampliamente. El descubrimiento de las calpaínas ha representado un avance enorme en el conocimiento de la homeostasis celular y los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se da lugar a una enfermedad establecida.

Palabras clave: *Enzimas proteolíticas no lisosomales, calpainopatías, proteasas de cisteína, calpastatinas.*

Introducción.

Desde la década de los 60 se sospechaba sobre la existencia de un sistema enzimático que participaba en diversas funciones proteolíticas dependientes del calcio, en 1974 se purificó la proteína con actividad de tipo papaína que sería llamada después m-calpaína, por la combinación de los vocablos "calcio" y "papaína".¹ Este tipo de actividad y su ubicación intracelular no lisosomal les permitió diferenciarse rápidamente de otros sistemas enzimáticos conocidos, como el de las catepsinas.² A partir de entonces surgió una gran cantidad de estudios por el interés

* Alumna de quinto semestre de la Facultad de Medicina, Centro Universitario de Ciencias de la Salud CUCS, Universidad de Guadalajara UdeG. Miembro del equipo de investigación del Instituto de Genética Humana "Enrique Corona Rivera" del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, CUCS UdeG.

de conocer su función, ubicación y estructura, libros dedicados a las proteasas dependientes de calcio fueron publicados en 1990 y 1999, y una monografía sobre métodos y protocolos de las calpaínas en el 2000.¹ Después fueron identificadas otras dos proteínas: la μ -calpaína (calpaína 1), y un polipéptido encargado de la inhibición de ambas, cuyo origen y activación intrínseca no era bien conocida, la calpastatina.¹

Número 2, Volumen 1, Julio-Agosto 2009

REVISTA MÉDICA MD

La familia de calpaínas estaba constituida entonces por; la μ -calpaína (calpaína 1), la m-calpaína (calpaína 2) y la calpastatina.

Usando cDNA, Ohno y colaboradores (1989, 1990) lograron mapear los genes CAPNL 1 y CAPNL 2, mediante una combinación de hibridación blot-spot y Southern e identificaron en el cromosoma 11 y el cromosoma 1 respectivamente.³ Este hecho abrió la puerta a investigaciones que dieron a conocer la estructura molecular de las calpaínas, así como su posible intervención en el funcionamiento celular. La clonación de estos genes permitió ubicar a las calpaínas en infinidad de tejidos y junto a la cristalografía finalmente se identificó su conformación en dos subunidades, una de 80kD y otra de 30kD, cada una constituida por diferentes dominios.

Se dedicaron conferencias enteras sobre calpaínas, por ejemplo las FASEB Summer Research Conferences, la primera en Copper, Mountain, en 1999 y la segunda en 2001 en Whitefish, durante ésta última se constituyó la nomenclatura actual aceptada para las calpaínas que distinguió 14 calpaínas diferentes de la 1 a la 15, recalándose la ausencia de la calpaína 4, que pasó a ser una subunidad, ya que carecía de función catalítica.¹ Innumerables artículos de revisión han sido presentados, así como diversos estudios donde se han implicado a las calpaínas en enfermedades como diabetes, cataratas, esclerosis múltiple, cáncer, distrofia muscular de Duchenne, Alzheimer y por lo menos un desorden de carácter autosómico recesivo donde se encuentra implicada la calpaína 3, la distrofia muscular limb-girdle tipo 2A, LGMD2A (*Online Mendelian Inheritance in Man* número 253600) siendo ésta la primer calpainopatía descrita ampliamente.²

Y aunque mucho se sabía sobre las calpaínas en los seres humanos poco se había explorado en otros organismos, ya se empezaban a estudiar vertebrados menores, cuando en el 2007 fueron purificadas la μ -calpaína, la m-calpaína y la calpastatina en la trucha de río *Oncorhynchus mykiss*, por secuencia de aminoácidos se encontró que la m-calpaína de la trucha era 65% idéntica a la subunidad de 80kD del humano, y la secuenciación de la calpastatina de la trucha compartía aún mayor homología con la calpastatina humana. Éste es el primer reporte de dos isoformas de la m-calpaína en una sola especie,⁴ lo que muy probablemente permitirá ahondar en su estudio para en un futuro no lejano lograr una correlación de las calpaínas con el medio celular y por tanto, su participación en los procesos patológicos antes mencionados que significarían un avance extraordinario.

Naturaleza y estructura de las calpaínas.

Las calpaínas constituyen una superfamilia de proteasas no lisosomales dependientes de calcio con una cisteína en su sitio catalítico, codificadas por alrededor de 14 genes independientes.¹ Se les han atribuido diversas funciones en la homeostasis celular tales como, anclaje de proteínas de membrana, participación en cascadas de señalización intracelulares, remodelamiento del citoesqueleto y apoptosis, de donde se desprende su importante participación en ciertos procesos patológicos cuando éstas no funcionan de forma adecuada o son hiperfuncionantes.^{1,2}

Las calpaínas 1 y 2 (μ y m-calpaína) han sido las más estudiadas. Están compuestas por dos subunidades polipeptídicas, una idéntica de 30kD cuya función es reguladora y otra de 80kD que presenta entre 55-65% de homología entre las dos proteasas¹, que se diferencian en sus requerimientos de calcio², de ahí el término μ y m, por requerimientos micromolares y milimolares respectivamente.⁵

La subunidad mayor, de 80kD es la que posee actividad catalítica, y está formada a su vez por 4 dominios, el primero o dominio I es amino-terminal de anclaje tipo α hélice el cual es importante en la regulación y en la disociación de la subunidad, el dominio II es el de la actividad catalítica, el III se une al Ca²⁺ y a fosfolípidos y es llamado *calmodulin-like* por su similitud con la calmodulina,⁵ y el dominio IV, es también llamado *penta-EF-hand domain* el cual consiste en dos hélices peptídicas conectadas por un puente de Ca²⁺, el cual es importante para la formación de dímeros² (Figura 1). Esta subunidad de 80kD en las calpaínas 3, 8a, 11, 12 y 13 no interactúa con la de 30kD, a pesar de que cuentan con el dominio IV.² La subunidad reguladora 30kD en las calpaínas 1, 2 y 9 está formada por dos dominios, el dominio V amino terminal y el dominio VI *penta-EF-hand domain* muy similar al dominio IV de la subunidad 80kD.¹

Las calpaínas 5, 6, 7, 8b, 10 y 15 son consideradas atípicas, ya que carecen del domino IV y por esto se cree que no interactúan con la subunidad 30kD.

Clasificación.

Las calpaínas pueden clasificarse según su localización en:

- Calpaínas ubicuas (presentes en todos los tejidos) son; 1, 2, 5, 7, 10, 13 y 15
- Calpaínas tejido-específicas: 3, 6, 8, 9, 11 y 12 que se encuentran sólo o principalmente en ciertos tejidos.² (Tabla 1).

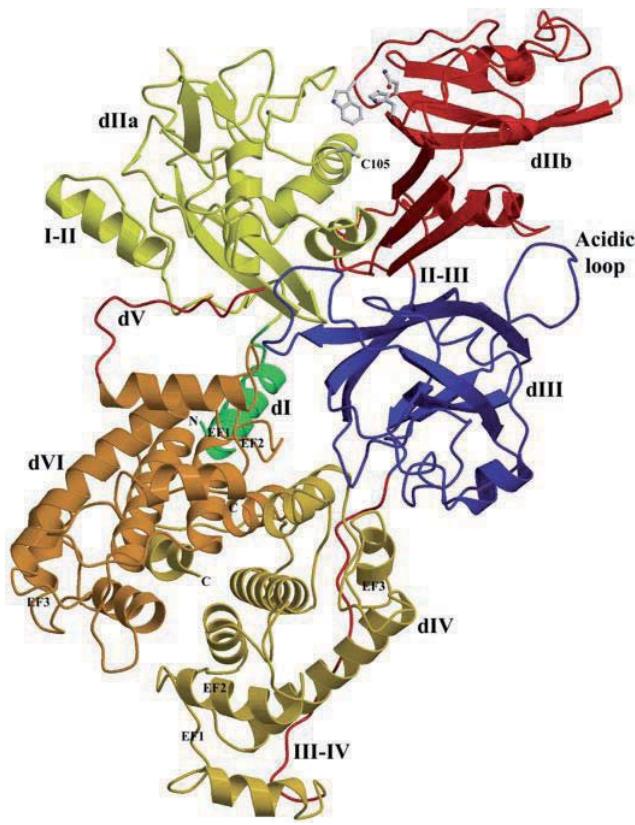


Fig 1 - Estructura por cristalografía de la m-calpaína humana. Los dominios en diferentes colores, están señalados como dI, dIIa, dIIb, dIII, dIV, dV y dVI. I-II, el dominio de unión α -hélice I y IIa. El dominio de unión es la línea roja entre dIII y dIV de la parte derecha del diagrama y está marcada como III-IV. Los dominios EF-1, EF-2 y EF-3 están indicados en IV y VI. El sitio activo Cys, C105 está en gris como también His-262, Asn-286 y Trp-288 en la parte superior del dominio IIb. 1.

Activación y respuestas.

El proceso por el cual las calpaínas identifican a su sustrato y se activan no está claramente entendido, sin embargo debe ser necesario todo un mecanismo intrínseco que controle su actividad dado que son enzimas citoplasmáticas abundantes e intervienen en múltiples acciones, como el anclaje de diversas proteínas a la membrana y la participación en cascadas de señalización tan importantes como la de apoptosis. 2 La mayoría de las características que se describen a continuación son referentes a la μ -calpaína y la m-calpaína siendo estas las únicas en las que se ha estudiado la actividad catalítica como tal y en las que más se han descrito otras funciones y acciones celulares. 1

Tabla 1 - Principal ubicación de las calpaínas tejido-específicas 1,2

CALPAÍNA	TEJIDO
Calpaína 3	Músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado
Calpaína 6	Placenta, músculo liso (útero)
Calpaína 8	Estómago
Calpaína 9	Estómago e intestino delgado
Calpaína 11	Testículos
Calpaína 12	Piel, durante los primeros 16 días después del nacimiento
Calpaína 13	Testículo, pulmones

El estudio a fondo de la activación específica de las calpaínas ha sido complicado, dadas las dificultades para purificarlas, aislarlas y poder asegurar que los inhibidores que se utilizan realmente están actuando en la calpaína y no en cualquier otra enzima, y por otra parte porque la adición de calcio para el estudio de la actividad catalítica resulta casi inmediatamente en la inactivación y destrucción por autolisis, aunque este proceso juega un rol importante en la activación y no es poco común para este tipo de enzimas, incluyendo a las catepsinas y a la papaína 1. Las calpaína llevan a cabo este proceso con características muy especiales, debe saberse que los eventos de autolisis son eventos proteolíticos, donde las subunidades que forman a la calpaína van perdiendo aminoácidos y reorganizándose, la subunidad 80kD llega hasta 76kD y la de 30kD a 16kD 1 , esta reconformación estructural se cree que termina por activar a la enzima, es decir, éste sería el proceso de transformación desde una proenzima hasta una enzima madura y activada, aunque es un proceso muy rápido está formada por distintos pasos en orden desde la subunidad mayor que posee la actividad catalítica hasta la menor de 30kD que posee la misma

secuencia de aminoácidos en ambas calpaínas, μ y m , el significado fisiológico de esta autolisis es aún controversial; los requerimientos de calcio para la inactivación son similares, apenas un poco superiores que para la actividad catalítica, pero aún así mayores que los niveles de Ca^{+2} libre para los demás procesos celulares.^{1,2} Una respuesta a esta paradoja se resolvió al encontrar que la presencia de fosfolípidos con fosfatidilinositol disminuye los requerimientos de calcio para la autolisis de las μ y m -calpaínas.² Es por esto que la manipulación del Ca^{+2} para el estudio *in Vitro* de la actividad catalítica debe ser altamente preciso, ya que en la mayoría de las ocasiones lo que inicia con una activación de la enzima acaba irremediablemente en la autolisis.

La ubicación de la enzima en la membrana citoplasmática también forma parte de una regulación en su activación, se creía que pasaban inmediatamente por el proceso de autoproteólisis e iniciaban su actividad catalítica, sin embargo investigaciones recientes han demostrado que tanto μ -calpaína como la m -calpaína son ya enzimas capaces de activarse antes de la autolisis y que su interacción con la membrana citoplasmática las une a su sustrato más que inducir su destrucción. Una vez activada en la membrana la calpaína presumiblemente difunde al citosol y se vuelve resistente a la acción de las calpastatinas, las proteínas sustrato son digeridas ya sea en membrana o en citosol.

La posibilidad de expresar calpaínas activadas catalíticamente representa un enorme avance en su estudio, y trae la posibilidad de mutar distintos dominios, observar las modificaciones que resultarían para así comprobar su función, en 1994 logró ser expresada una m -calpaína de rata catalíticamente activada en una *E.coli*, lo que arrojó datos de gran importancia para este sistema.¹

Las calpaínas han mostrado tener una especificidad de sustrato variable, pueden unirse a distintas enzimas, citoesqueleto y proteínas receptores de membrana, la activación catalítica mediada por proteína cinasa C y transglutaminasa podrían representar algunas de las vías fisiológicas de las calpaínas.⁶

Regulación.

La activación de las calpaínas está dada por el contacto con el sustrato, por tanto de manera contrarreguladora tiene que haber un sistema que impida su activación exagerada, estado y evitar daño celular, este proceso se ha visto implicado en ciertas patologías.

Existen más de 50 inhibidores exógenos y endógenos de las calpaínas, entre ellos algunas proteínas intra y extracelulares, además de fármacos como idoacetato, idoacetamida y N-metil-maleimida, los cuales son inhibidores de proteasas de cisteína.²

El sistema endógeno se encuentra representado por las calpastatinas, las cuales son proteínas inhibidoras específicas, contienen 4 dominios repetitivos, un solo dominio o inclusive uno truncado o fragmentado tiene actividad inhibitoria potente contra las calpaínas.⁶ Los niveles intracelulares de calpastatinas son directamente proporcionales a los niveles de activación de las calpaínas, la afinidad de la calpastatina hacia las formas activas de las calpaínas es mucho mayor que la que puede tener por las proenzimas, esto indica que tanto los cambios en la conformación estructural, como el camino hacia la autolisis facilita la formación del complejo enzima-inhibidor.²

De acuerdo con Gil Parrado y colaboradores la actividad de las calpaínas es regulada no sólo por las calpastatinas sino también por su ubicación intracelular.⁷

La subunidad 30kD, conocida también como css1, juega un papel de tipo regulador en la actividad proteolítica de las calpaínas uniéndose al sitio activo de la unidad 80kD, aunque otros estudios de desnaturalización, renaturalización y expresión han demostrado que css1 es más una chaperona que interviene en la reorganización de toda la enzima, otros estudios también concluyeron que la autolisis de esta subunidad hace más sensible al Ca^{+2} a la enzima promoviendo por tanto su activación.⁸

Cualquiera que sea el mecanismo exacto de interrelación, se sabe que es indispensable para la actividad y función de las calpaínas *in vivo*, se documentaron experimentos en donde se alteró la expresión del gen de la subunidad de una calpaína murina, esta intervención abolió la actividad de las calpaínas y fue letal para el desarrollo temprano en el feto, esta observación apoya el hecho de que la calpaína e inclusive la subunidad 30kD per se son esenciales para la vida.⁹

En el 2002 Shád y su equipo de trabajo describieron otra subunidad con actividad reguladora y fue llamada css2, codificada por el gen capns2 presente en el cromosoma 16, presenta un 75% de homología con la css1, su expresión parece ser tejido-específica en contraste con la css1 que es ubicua, en el humano se encontró en cerebro, piel, vejiga, pulmón, laringe y corazón fetal, mientras que en ratón fue identificada en piel, cabeza, lengua, vagina y testículos.⁸

La regulación de la actividad de las μ y m -calpaínas tiene que estar estrechamente vigilada ya que tienen diversas funciones de suma importancia como la regulación del ciclo celular, intervención en vías de señalización, remodelamiento del citoesqueleto, diferenciación celular, apoptosis y necrosis, así como en el desarrollo embrionario. La relación calpaína-calpastatina y su regulación en células vivas aún no es

comprendida, y con seguridad queda mucho por dilucidarse.

Calpaínas y su intervención en algunas enfermedades.

a) Distrofia muscular limb-girdle tipo 2A (LGMD2A). El primer reporte sobre la existencia de moléculas adicionales en el sistema de calpaínas además de las 3 ampliamente descritas; μ -calpaína, m-calpaína y calpastatina fue en 1989 cuando Sorimachi y colaboradores describieron la presencia en músculo de un mRNA que permitía la transcripción de una proteína de 821 aminoácidos que fue llamada p94, la cual presentaba 51-54% de homología con la secuencia de la subunidad 80kD de las calpaínas y fue llamada calpaína-3.¹⁰ Después en 1995 se identificó el gen CAPN3 y mediante clonación posicional se ubicó en el cromosoma 15q, mutaciones en este gen causan distrofia muscular limb-girdle tipo 2A (LGMD2A) demostrando así que la proteína que codifica es importante en la función muscular.¹¹ La calpaína-3 se encuentra en el citosol y en el núcleo de la célula muscular y requiere niveles de Ca⁺² extremadamente bajos para su activación, se cree que el mecanismo molecular por el cual se origina el daño al músculo está relacionado con apoptosis celular, la calpaína-3 se une a la titina, una enorme proteína del músculo que interviene en la contracción, y que en condiciones normales brinda estabilidad e inhibe la autolisis, al existir una mutación en el gen CAPN-3 se pierde esta interacción y se originan una serie de eventos que llevan a la distrofia muscular, sin embargo los mecanismos específicos no están bien definidos. De acuerdo con otros estudios la deficiencia de CAPN-3 lleva a la apoptosis mio-nuclear (muerte del núcleo de las células musculares).²

En 2008 Blazquez et al. identificaron 4 diferentes transcriptos de mRNA de CAPN3 en células blancas en sangre humana. El análisis secuencial mostró que el exón 15 siempre estaba ausente, el 6 y 16 podían estar o no, y sólo uno de estos transcriptos fue encontrado en músculo.¹²

b) Diabetes mellitus tipo 2.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) se ha convertido en una de las entidades más prevalentes alrededor del mundo. La determinación de los factores de riesgo genéticos que incrementan la susceptibilidad de padecer DM-2 nos permiten ahondar en la comprensión de los mecanismos que enmascaran este desorden y probablemente lograr mejores terapias.² Horikawa y colaboradores reportaron por primera vez

la asociación de la calpaína-10 y mutaciones en el gen que la transcribe, el CAPN10 localizado en el cromosoma 2q37.3, con la DM-2 en mexicanos residentes en E.U.A y poblaciones del norte de Europa.¹³ Esta enzima de la familia de las calpaínas es ubicua en los tejidos fetales y adultos, es conocida como atípica, ya que como se mencionó anteriormente carece del dominio IV y por tanto se cree que no interactúan la subunidad 80kD y la 30kD. Han sido identificadas 8 variantes por splicing alternativo, de las cuales 3 no tienen actividad catalítica.²

Con base en lo anterior se sugirió una nueva vía involucrada en la fisiopatología de la diabetes, que podría incluir además de la calpaína-10, sus sustratos, inhibidores y activadores. La calpaína-10 podría representar el tercer ejemplo de una proteasa que participa en el desarrollo de la diabetes.¹³ Un polimorfismo en CAPN10 afecta su traducción en RNA mensajero (mRNA), la disminución del mRNA lleva a un incremento en la actividad de la proteína kinasa C, y ya que una baja actividad de ésta es importante para la fosforilación adecuada de los receptores de insulina, este polimorfismo podría causar resistencia a la insulina², esto aunado a alteraciones de otras moléculas como los PPAR γ , que son receptores nucleares involucrados en la acción de la insulina, los canales de potasio Kir6.2 que regulan la secreción de insulina, podrían precipitar la aparición de la DM-2.¹⁴ También se ha relacionado la elevación de los niveles de ácidos grasos libres con algunas variantes de la CAPN10, y se les ha atribuido un probable rol en la traslocación del receptor estimulado por insulina transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) del adipocito, todos estos hechos nos hablan de una conexión entre la calpaína-10 y la DM-2.² Más recientemente Johnson y colaboradores estudiaron el papel de la calpaína-10 y su relación con el receptor de riadonina tipo 2 (RyR2), el cual es un canal liberador de Ca⁺² ubicado en el retículo sarocoplásmico, que podría ser una molécula clave en el control de la muerte celular programada, estos investigadores sugirieron que la calpaína-10 mediaba la vía de apoptosis de las células β del páncreas y que los RyR2 participaban de manera esencial en la supresión de esta vía. De acuerdo a sus conclusiones una nueva vía de apoptosis es iniciada cuando la liberación de Ca⁺² desde los RyR2 es bloqueada.² Este hallazgo claramente define un rol fisiológico de la calpaína-10 en un tejido específico.

En un estudio comparativo realizado en el 2008 entre personas con algunos factores de riesgo genéticos, específicamente alelos alterados tanto en los genes que codifican para los PPAR γ como para los que codifican para la calpaína-10 (CAPN10) contra personas que no presentaba dichas alteraciones; se encontró un mayor riesgo de desarrollar DM-2 en

aquellas personas que contaban con un genotipo positivo para tales alelos.¹⁸

c) Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es caracterizada por un daño neuronal progresivo que lleva a la pérdida de múltiples funciones. Se ha encontrado en tejido cerebral de pacientes con esta enfermedad niveles de Ca+2 y de m-calpaína elevados, además de una autolisis incrementada de la μ -calpaína hasta las formas de 76 y 78kD. La proteína reguladora p35 que interviene en el desarrollo de tejido nervioso es fragmentada por las calpaínas en tejidos de pacientes enfermos, hasta 25kD (p25) activando la ciclina dependiente de kinasa 5. De acuerdo a Selkoe, p25 es responsable de la hiperfosforilación de la proteína tau, una proteína asociada a los microtúbulos abundante en las neuronas que interactúa con la tubulina para estabilizar los microtúbulos y promover su ensamblaje^{16, 17}. Esta hiperfosforilación hace a la proteína tau altamente resistente a la degradación por la μ -calpaína 2, además de llevar a la formación de PEF (*paired helical filaments*) que son aglomerados de la proteína tau hiperfosforilada que cuando forman depósitos son llamados *neurofibrillary tangles*, los cuales están implicados en la enfermedad de Alzheimer además de otros desórdenes neurodegenerativos.¹⁸ Finalmente dado que las proteínas de los neurofilamentos son sustratos excelentes para las calpaínas estas contribuyen importantemente a la necrosis neuronal que acompaña a la enfermedad de Alzheimer.²

d) Cataratas.

En más del 75% de los casos de cataratas se involucran niveles elevados de Ca+, la activación de las calpaínas mediada por estos altos niveles ha sido sugerida como mecanismo en la formación de cataratas. Actualmente 5 calpaínas han sido encontradas en el cristalino, entre ellas la calpaína 1 (μ -calpaína), expresada sólo en bajos niveles, m-calpaína y la calpaína-10. El papel de las calpaínas en la formación de cataratas en humanos lamentablemente no está tan bien documentado como lo está en ratas, en estos modelos animales de la génesis de cataratas parece estar mediada por la actividad de la m-calpaína. Esta es la única calpaína activa en el cristalino humano, y el cristalino humano es sustrato de la m-calpaína in Vitro.²

Conclusiones.

Hablar del estudio de las calpaínas es hablar de futuro, el conocer sus funciones, mecanismos de activación e inhibición permitirá ubicarlas como parte de un sistema interrelacionado dentro de la homeostasis celular y así podremos conocer los mecanismos por los cuales al estar alteradas causan ciertas

enfermedades, y no sólo eso, tendremos la capacidad de ofrecer una alternativa terapéutica. Ya se ha estudiado la posibilidad de administrar un inhibidor enzimático en ciertas calpaínaopatías, como en la distrofia muscular, donde se está empezando a utilizar un inhibidor sintético de calpaínas llamado leupeptin que hasta el momento en ratones ha demostrado prevenir la pérdida de masa muscular y otros estudios han sugerido su utilización en procesos neurodegenerativos. Los hallazgos sobre la calpaína 10 y su relación con la diabetes mellitus tipo 2 íntimamente ligada a la raza mexicana podría significar el comienzo de un estudio a fondo en nuestro país que pudiera determinar a futuro factores de riesgo genéticos importantes para desarrollo de la enfermedad y tal vez obtener una probable alternativa que mejorara la resistencia a la insulina ya cuando la diabetes se encuentra establecida. En el año 2002 algunos estudios asociaron también a la calpaína 10 con el síndrome de ovario poliquístico y a partir de esto han resurgido innumerables datos sobre el tema que han permitido conocer un poco más sobre los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla esta entidad. Cada día sabemos un poco más y también nos damos cuenta de lo mucho que falta por estudiar y ser dilucidado, pero cada pequeño avance significa un enorme paso en nuestro afán científico de mejorar la calidad de vida del ser humano.

Bibliografía.

1. Goll D. E. , Thompson V. F. , Li H. , Wei, W. y Cong J. The calpain system. Physiol Rev; 2003, 83(3): 731-801.
2. Zatz M y Starling A. Calpains and diseases. N Engl J Med 2005; 352: 2413-23.
3. Ohno S., Minoshima S., Kudoh J., Fukuyama R., Shimizu Y., OhmImajoh S., Shimizu N., Suzuki K. Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. Cytogenet Cell Genet. 1990, 53: 225-229,
4. Saito M, Li H, Thompson VF, Kunisaki N, Goll DE. Purification and characterization of calpain and calpastatin from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2007 Apr;146(4):445-55. Epub 2006 Nov 24.
5. Nishimura T, Goll DE.J Binding of calpain fragments to calpastatin. Biol Chem. 1991 Jun 25;266(18):11842-50
6. Murachi T., Calpain and calpastatin. Rinsho Byori. 1990 Apr;38(4):337-46
7. Gil-Parrado S, Popp O, Knoch TA, et al. Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. J Biol Chem 2003;278:16336-46.
8. Schád E., Farkas A., Jékely G., Tompa P., Friedrich P. A novel human small subunit of calpains. Biochem. J. 2002 362: 383±388
9. Arthur, J. S., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K. and Greer, P. A. Disruption of the murine calpain small subunit gene, Capn4 : calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. Mol. Cell Biol.2000, 20, 4474±4481
10. Sorimachi, H.; Imajoh-Ohmi, S.; Emori, Y.; Kawasaki, H.; Ohno, S.; Minami, Y.; Suzuki, K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types: specific expression of the mRNA in skeletal muscle. J. Biol. Chem.1995, 264: 20106-20111.
11. Richard, I.; Broux, O.; Allamand, V.; Fougerousse, F.; Chiannilkulchai, N.; Bourg, N.; Brenguier, L.; Devaud, C.; Pasturaud,

- P.; Roudaut, C.; Hillaire, D.; Passos-Bueno, M.-R.; Zatz, M.; Tischfield, J. A.; Fardeau, M.; Jackson, C. E.; Cohen, D.; Beckmann, J. S. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995, 81: 27-40.
- 12.** Blazquez, L.; Azpitarte, M.; Saenz, A.; Goicoechea, M.; Otaegui, D.; Ferrer, X.; Illa, I.; Gutierrez-Rivas, E.; Vilchez, J. J.; Lopez de Munain, A. Characterization of novel CAPN3 isoforms in white blood cells: an alternative approach for limb-girdle muscular dystrophy 2A diagnosis. *Neurogenetics* 2008, 9: 173-182.
- 13.** Horikawa, Y.; Oda, N.; Cox, N. J.; Li, X.; Orho-Melander, M.; Hara, M.; Hinokio, Y.; Lindner, T. H.; Mashima, H.; Schwarz, P. E. H.; del Bosque-Plata, L.; Horikawa, Y., et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 2000, 26: 163-175, 2000. Note: Erratum: *Nature Genet.* 26: 502
- 14.** Kenneth S. Polonsky, M.D.Retinol-Binding Protein 4, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2006, 354:2596.
- 15.** Meigs JB, Shrader P, Sullivan LM, McAtee JB, Fox CS, Dupuis J, Manning AK, Florez JC. Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008, 359:2208, November 20
- 16.** Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes,proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81:741-66.
- 17.** Weingarten, MD., Lockwood, AH., Hwo, SY., Kirschner, MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *PNAS* 1975, (72) 1858-1862
- 18.** Deutsch SI, Rosse RB, Lakshman RM. Dysregulation of tau phosphorylation is a hypothesized point of convergence in the pathogenesis of alzheimer's disease, frontotemporal dementia and schizophrenia with therapeutic implications. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2006 Dec 30;30(8):1369-80. Epub 2006 Jun 21
- 19.** Gonzalez, A.; Abril, E.; Roca, A.; Aragon, M. J.; Figueroa, M. J.; Velarde, P.; Royo, J. L.; Real, L. M.; Ruiz, A. CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocr. Metab* 2002, 87: 3971-3976.
- 20.** Ehrmann, D. A.; Schwarz, P. E. H.; Hara, M.; Tang, X.; Horikawa, Y.; Imperial, J.; Bell, G. I.; Cox, N. J. Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2002, 87: 1669-1673.
- 21.** Lee, H.-J.; Sorimachi, H.; Jeong, S.-Y.; Ishiura, S.; Suzuki, K. Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in digestive tract. *Biol. Chem* 1998, 379: 175-183.