

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**

**FACOLTÀ DI AGRARIA –PORTICI**

**DOTTORATO DI RICERCA IN PRODUZIONE E SANITÀ DEGLI ALIMENTI DI  
ORIGINE ANIMALE  
XIX CICLO – 2003/2006**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE E  
ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI**

**TESI DI DOTTORATO**

**EFFETTO DEL SISTEMA CALPAINA/CALPASTATINA SULLA  
DEGRADAZIONE MIOFIBRILLARE DURANTE LA FASE POST-MORTEM IN 3  
MUSCOLI DELL’ARTO PELVICO DI STRUZZO  
(*STRUTHIO CAMELUS MASAICUS*)**

**DR.<sup>SSA</sup> MARIA ROSA DI PRISCO**

**RELATORE  
PROF ANTONIO CRASTO**

**CORRELATORE  
DR. SALVATORE VELOTTO**

**COORDINATORE  
CH.MA PROF.<sup>SSA</sup>  
MARIA LUISA CORTESI**

## INDICE

INTRODUZIONE	2
<i>Lo struzzo</i>	3
<i>L'allevamento</i>	5
<i>Principali riferimenti normativi sull'allevamento</i>	8
I MUSCOLI	10
<i>Costituenti del muscolo scheletrico</i>	10
<i>Struttura del muscolo scheletrico</i>	12
<i>Classificazione dei muscoli striati</i>	13
<i>Le fibre muscolari</i>	14
FAMIGLIA DELLE CALPAINE	17
<i>Struttura delle Calpaine ubiquitarie</i>	19
<i>Generalità e struttura delle Calpastatine</i>	24
TRASFORMAZIONE DEL MUSCOLO IN CARNE	28
<i>Ruolo fisiologico del sistema Calpaina-Calpastatina in relazione alla qualità della carne</i>	30
ESAME DELLA LETTERATURA	34
<i>Tipi di fibre nel muscolo scheletrico dei volatili</i>	34
<i>La sequenza genomica della m e della <math>\mu</math>-calpaina</i>	37
<i>Strutture e soluzioni cristallografiche.</i>	39
<i>Altri membri della famiglia delle calpaine: molecole simili alla calpaina</i>	48
<i>Molecole calpaina-simile nei vertebrati.</i>	53
MATERIALI E METODI	56
<i>Istologia</i>	56
<i>Istochimica</i>	57
<i>Analisi statistica</i>	59
<i>Immunoistochimica</i>	60
<i>Valutazione dell'attività enzimatica</i>	63
<i>Microscopia elettronica a trasmissione</i>	64
RISULTATI	65
<i>Istochimica del muscolo</i>	66
<i>Immunoistochimica del muscolo</i>	71
<i>Attività enzimatiche e microscopia elettronica a trasmissione</i>	77
DISCUSSIONI	79
<i>Istochimica del muscolo</i>	79
<i>Immunoistochimica attività enzimatica e microscopia elettronica</i>	81
CONCLUSIONI	84
BIBLIOGRAFIA	86

## **INTRODUZIONE**

Fino alla prima metà del secolo scorso le produzioni animali erano strettamente legate al territorio, avvenivano in contesti socio-culturali limitati mediante l'utilizzo e l'elaborazione di materie prime disponibili in quel luogo.

L'avvento dell'industrializzazione ha consentito il raggiungimento di standard di qualità capaci di soddisfare le esigenze del consumatore sempre più attento all'aspetto salutistico e alla genuinità dei cibi. Un quadro socio-economico così variato, ha rappresentato una condizione favorevole per la comparsa sul mercato nazionale di carni alternative diversificate e di alta qualità provenienti da particolari specie con elevate potenzialità produttive.

Una delle “nuove specie” più promettenti come potenziale produttivo è lo struzzo. E' fuori dubbio infatti che tale animale sia un buon utilizzatore delle risorse naturali in quanto dotato di grande capacità di adattamento all'ambiente, di spiccata resistenza alle malattie e di elevata possibilità di sopravvivenza anche in condizioni difficili.

La carne da esso ottenuta rappresenta una valida alternativa alla carne bovina sia per l'elevata digeribilità, che per il basso potere calorico e l'ottimale composizione acidica.

Molteplici sono i fattori che influenzano la qualità della carne e studi mirati all'individuazione di particolari indicatori di qualità stanno assumendo sempre più importanza.

Anche se l'allevamento dello struzzo al giorno d'oggi è relativamente ristretto tale settore è in continua crescita e sviluppi futuri sono prevedibili. La letteratura riferita allo studio di tale specie risulta tuttavia ancora lacunosa ed in particolare limitati sono gli studi di

immunolocalizzazione e/o di interpretazione circa il funzionamento di alcuni dei sistemi enzimatici coinvolti nella fase di frollatura della carne.

Obiettivo di questo studio è stato provvedere ad una descrizione dettagliata di tre muscoli dell'arto pelvico di struzzo Red Neck, valutare attraverso l'utilizzo di metodiche istochimiche le differenze istomorfometriche della fibra muscolare, immunolocalizzare il sistema calpaina/calpastatina e determinare la sua attività durante le fasi successive alla morte dell'animale.

I differenti tipi di fibre, infatti, il loro numero e la loro area presenti all'interno di un muscolo influenzano alcune caratteristiche biochimiche *ante e post-mortem*.

Il sistema calpaina/calpastatina al contempo gioca un ruolo chiave nel processo di intenerimento e quindi rappresenta un fattore rilevante nella determinazione della qualità della carne. In particolare tale sistema risulta coinvolto nella degradazione selettiva di diverse proteine intracellulari, includendo alcune proteine mifibrillari.

Comprendere quindi l'esatto funzionamento di tale sistema potrebbe contribuire a chiarire ed eventualmente migliorare il processo di d'intenerimento delle carni alimentari ed in particolare della carne di struzzo.

### ***Lo struzzo***



Lo struzzo appartiene alla famiglia degli Struthionidae ed all'ordine degli Struthioniformes. E' il più grande uccello vivente, in quanto raggiunge un peso di 150 kg e un'altezza superiore ai 2,5 metri. Ha un tronco massiccio e robusto, sorretto da zampe lunghe, nude e muscolose, ricoperte da larghe

squame. Il piede termina con due sole dita che poggiano su un largo cuscinetto plantare. Il collo, lungo e sottile, è rivestito di una lieve peluria; il capo è relativamente piccolo. Il becco breve e appiattito, rivestito di una robusta lamina cornea e munito all'estremità di una forte unghia, può aprirsi notevolmente data la particolare struttura mandibolare. Gli occhi sono grandi, sporgenti, protetti da grandi palpebre orlate di lunghe ciglia. Le ali, inadatte al volo, sono brevi ma ampie e forti e sono ornate da lunghe e soffici piume. Lo Struzzo vive oggi allo stato selvatico solo nelle zone steppose o di boscaglia dei parchi dell'Africa orientale, generalmente in piccoli gruppi. Alcune popolazioni sono presenti anche sul versante occidentale e meridionale del continente africano. E' un veloce corridore (raggiunge la velocità di 70 Km/h) ed è dotato di una vista molto acuta. Il suo habitat è caratterizzato da fortissime escursioni termiche tra il giorno e la notte (questo spiega perché lo struzzo si sia adattato bene al nostro clima).

Negli Stati Uniti la maggior parte degli struzzi allevati in cattività sono derivanti da incroci di tre principali gruppi, African Black, Red Necked e Blue Neck. Lo struzzo Red neck (*Struthio camelus camelus* e *Struthio camelus masaicus*) è conosciuto per la colorazione rosa più o meno intenso a seconda della stagione produttiva. Tra i tre gruppi di struzzo il Red Neck è il più grande, vive nella savana e nei deserti dell' Africa, richiede ampi spazi, ed anche se non è ancora considerata una specie in via di estinzione il suo numero va progressivamente diminuendo.

### ***L'allevamento***

Gli allevamenti alternativi assumono un ruolo importante nell'ambito delle produzioni zootecniche in quanto rappresentano uno strumento essenziale per la valorizzazione di alcune produzioni tipiche in numerosi comprensori italiani. La possibilità di allevare selvatici si è presentata come strategia alternativa nella diversificazione produttiva delle imprese e nelle aree marginali è stato un fatto estremamente importante, da non sottovalutare in quanto ha rappresentato una fonte di reddito e di occupazione.

L'allevamento dello struzzo ha una tradizione consolidata in Sud Africa, che detiene tuttora il primato delle produzioni di questo Ratite. Negli anni più recenti, questo tipo di produzione si è notevolmente sviluppata in diverse parti del Mondo (Israele, USA, Francia, Australia, Italia), dove le condizioni ambientali e la ricettività del mercato ne hanno reso possibile la diffusione (D'Andrea et al 2003). Tuttavia, ancora non si è pervenuti alla definizione di un'appropriata filiera di produzione, in termini di alimentazione, di management degli animali e di marketing dei prodotti (Salghetti, 2002).

In Italia l'allevamento dello struzzo è stato avviato circa 10 anni fa, quasi in sordina, per poi prendere piede negli anni successivi grazie all'affermarsi della "catena degli animali da vita" che rappresenta una tappa inevitabile che accompagna la comparsa di una nuova attività produttiva, in particolare quando si introduce una nuova specie animale da reddito. Per entrare nel ciclo produttivo è necessario infatti disporre degli animali da rimonta, animali reperibili nei pochi allevamenti che hanno avuto l'iniziativa di avviare per primi l'attività di allevamento.

L allevamento dello struzzo si è dimostrato una valida alternativa alle produzioni zootecniche tradizionali anche grazie ad alcuni aspetti peculiari che lo caratterizzano in quanto:

- è di tipo semi-estensivo (una famiglia composta da un maschio e due femmine necessita di 500 m<sup>2</sup> di spazio) ed è un vero allevamento "ecologico", caratterizzato da grandi recinti alti 2,0 m circa ben drenati e provvisti di una tettoia per il riparo durante le piogge invernali e le neviccate;
- richiede un impegno di risorse estremamente limitato, specie se al confronto con i tradizionali allevamenti bovini o suini;
- non richiede l'impiego di terreni fertili, anzi è sicuramente consigliabile l'utilizzo di terreni marginali, aridi, che meglio si adattano alle caratteristiche naturali di questo primitivo volatile;
- le condizioni di allevamento sono sicuramente più evolute rispetto a quelle di altre specie domestiche;
- il ritmo produttivo elevato: una femmina è in grado di produrre dalle 70 alle 90 uova l'anno già a 24 mesi di vita.

Secondo le rilevazioni del 5° Censimento generale del 2000 (ISTAT), il numero degli allevamenti (1.574) e quello della consistenza dei capi (38.385), sono la testimonianza della dinamicità degli imprenditori agricoli italiani, che in un decennio hanno creato dal nulla una nuova realtà produttiva.

Rispetto al 1999, secondo una precedente indagine Istat (Istituto nazionale di statistica), la consistenza degli allevamenti di struzzi sarebbe cresciuta del 10,5%, mentre il numero dei capi si sarebbe ridotto del 3,6%.

In ogni caso i risultati del Censimento mettono in evidenza la precarietà di molti allevamenti, visto che la consistenza media dei capi è di solo 24 unità, di cui 8 riproduttori, che si riducono a circa 6 oppure 4 femmine se le combinazioni vengono fatte con i tris (1 maschio e 2 femmine) oppure con le copie (1 maschio e 1 femmina).

La fase della “catena degli animali da vita” ha fatto il suo tempo e i prezzi dei riproduttori si stanno ridimensionando agli effettivi scopi della produzione di carne.

Esaurita la domanda dei riproduttori, finalizzata all’apertura di nuovi allevamenti, si è fatta avanti la vera destinazione economica degli animali, cioè la produzione di carne e di pelle, essendo marginale la produzione delle uova da consumo e delle piume.

In questi ultimi anni, gli animali da macello hanno scontato prezzi in continuo calo, per attestarsi recentemente al di sotto dei 200 euro a capo. Un prezzo analogo viene offerto sul mercato per i riproduttori a coloro che intendono chiudere l’allevamento. Di qui il ridimensionamento delle attività con la chiusura degli allevamenti di piccola dimensione e condotti in forma hobbistica.

Il mercato della carne di struzzo è ancora tutto da costruire essendo un prodotto nuovo per i consumatori e di recente introduzione. In realtà i consumi sono per la maggior parte soddisfatti dalla carne di importazione, con la quale i nostri allevatori sono chiamati a competere.

Nel 2001 si stima che siano state vendute in Italia circa 1.300 tonnellate di carne di struzzo (Fasone, 2001) delle quali oltre l’80% è di provenienza estera, prevalentemente da Israele e Sudafrica. Tuttavia, l’A.V.A.S (associazione veneta allevamenti di struzzi) ritiene che sia proprio la produzione deficitaria di carne di struzzo a livello europeo la motivazione principale per sostenere la filiera produttiva.



Gli allevamenti di struzzi che intendono proseguire l'attività ed affrontare il mercato sono chiamati a rivedere la struttura, la gestione e l'organizzazione aziendale per ottenere la carne ad un costo competitivo sul mercato.

Strettamente collegata alla produzione è la fase di commercializzazione della carne, che è ancora tutta da costruire. Le difficoltà sono legate innanzitutto alla dispersione degli allevamenti, che fanno lievitare i costi di trasporto e di macellazione, essendo ancora pochi i macelli abilitati; in secondo luogo è necessario trovare una adeguata collocazione del prodotto sul mercato. I tentativi in corso di aggregazione dell'offerta cercano proprio di affrontare le problematiche mercantili (Salghetti 2006).

### ***Principali riferimenti normativi sull'allevamento***

Con Decreto del Presidente della Repubblica del 17 maggio 1996, n. 364 è stato modificato il D.P.R. 30 dicembre 1992, n. 559 inerente l'attuazione della Direttiva 91/495/CEE relativa ai problemi sanitari e di polizia sanitaria in materia di produzione e commercializzazione di carni di coniglio e di selvaggina di allevamento.

Il D.P.R. 364/96 ha modificato, tra l'altro, la definizione di carni di selvaggina da allevamento riportata all'art. 2, comma 1, lettera d), del D.P.R. 559/92, introducendo fra le specie animali riportate anche quella degli uccelli corridori (ratiti) di allevamento. Tra gli uccelli corridori, le specie di maggiore interesse per l'allevamento e la produzione sono lo struzzo, l'emù e il nandù. Per quanto concerne gli aspetti igienici e normativi inerenti le strutture di macellazione dei ratiti, è opportuno ricordare che la normativa appena sopra richiamata rimanda a quanto previsto nella Direttiva 71/118/CEE relativa ai problemi sanitari e di

produzione delle carni avicole che è stata recepita con D.P.R. 503/82. In particolare, per quanto attiene la tecnica e l'igiene della macellazione, i ratiti, dimensioni a parte, pongono alcuni problemi di ordine igienico-sanitario e tecnologico riconducibili, per un verso, a quelli dei volatili e per altri aspetti a quelli dei grandi mammiferi da macello. Al riguardo basti pensare che nella macellazione dei ratiti è prevista la fase di spennatura, come per i volatili, ma al tempo stesso è prevista anche la fase di spellatura, come per i grossi animali da macello. Considerate pertanto le caratteristiche dei ratiti, ed in particolare dello struzzo, che risulta la specie più allevata in Italia, ci si è posti il problema di poter utilizzare non solo gli impianti ufficialmente riconosciuti ai sensi del D.P.R. 503/82 ma anche quegli impianti riconosciuti ai sensi del D.L.vo 286/94, questo al fine di dare maggiore possibilità di soluzione al problema della macellazione degli struzzi utilizzando al tempo stesso impianti che per caratteristiche strutturali e tecnologie meglio si prestano alla macellazione di detti animali, pur tenendo conto, al tempo stesso, che determinate operazioni come quella di spennatura e di spellatura debbano avvenire in settori appositi della struttura di macellazione in modo tale da impedire, o quanto meno contenere, che dette operazioni possano costituire una possibile fonte di contaminazione per le carni.

La Commissione europea con nota del 29 maggio 1997 ha chiarito che, onde evitare differenti interpretazioni e comportamenti, nelle more di una revisione della legislazione in materia di sanità pubblica veterinaria, la produzione di carni di struzzo deve avvenire negli impianti conformi alla direttiva 71/118/CEE (recepita con DPR 8 giugno 1982, n. 503) concernente la produzione di carni fresche e di volatili da cortile. Gli stati membri possono comunque riconoscere per la produzione di tali carni anche gli stabilimenti conformi alla direttiva 64/433/CEE (recepita

con D.L.vo 18.4.1994, n. 286), concernente la produzione di carni fresche, se strutturalmente adeguati per garantirne la produzione igienica.

### ***I MUSCOLI***

Il movimento del corpo comporta tre tipi di attività più o meno distinte:

l'attività riflessa e volontaria del sistema nervoso centrale gli eventi che si svolgono tra l'impulso trasmesso da un nervo motore e l'inizio della contrazione il processo contrattile stesso.

#### ***Costituenti del muscolo scheletrico***

Il muscolo scheletrico è stato oggetto di studi più approfonditi e le conoscenze su di esse sono maggiori che non quelle sul muscolo cardiaco o sul muscolo liscio.

Il muscolo scheletrico comprende le fibre, il tessuto connettivo che le circonda e che contiene vasi sanguigni e nervi, il tessuto lipidico, la mioglobina, che gli dà il colore rosso e funge da riserva di ossigeno. Presenta circa il 75% di acqua, il 20% di proteine, il 3% di lipidi (> in alcuni pesci), di cui fosfolipidi (0.3-0.1%), l' 1.2% di glucidi, lo 0.7% di sali minerali (di cui il 38% di ioni potassio intracellulari e il 7% di ioni sodio extracellulari).

Principali costituenti proteici del muscolo sono:

- Proteine sarcoplasmatiche (enzimi glicolitici , mioglobina etc.): 25-30%.
- Proteine miofibrillari ( di cui il 54% di miosina, il 27% di actina e 19% proteine minori): circa il 50% ( 65-75% nel pesce).

Le proteine miofibrillari possono essere distinte in contrattili,

regolatrici ed accessorie.

Alle proteine contrattili appartengono actina e miosina, tali proteine estratte dai tessuti muscolari e poste insieme in soluzione spontaneamente reagiscono tra loro dando luogo ad un composto, l'actomiosina, e producendo l'idrolisi enzimatica di ATP. In vivo invece, actina e miosina stabiliscono dei legami chimici solo in conseguenza dell'arrivo di un segnale elettrico lungo la membrana della fibra. E' stato dimostrato che actina e miosina non sono le uniche proteine presenti nei filamenti contrattili: esistono anche, in stretta associazione spaziale con i filamenti sottili, altre due proteine dette regolatrici in quanto svolgono una funzione chiave di controllo nella formazione di ponti trasversali: tropomiosina, troponina (TIC).

Delle proteine regolatrici fanno parte troponina e tropomiosina. La tropomiosina è una molecola filamentosa, adagiata nell'incavo tra <<due collane di perle>> che formano il filamento sottile.

La troponina, è un complesso proteico costituito da tre subunità: la troponina T, di forma allungata, in rapporto con la tropomiosina; la troponina I, collegata con l'actina e la troponina C, che presenta una grandissima affinità con gli ioni calcio.

Tra le proteine accessorie ricordiamo l' $\alpha$ -actinina, la titina, la nebulina e la desmina

La titina (3000KDa) è la proteina più grande che sia stata isolata a tutt'oggi: questa molecola si estende dalla linea Z ai filamenti spessi e, poiché ha proprietà elastiche, potrebbe agire come una molla che, variando la propria lunghezza, li mantiene in posizione del sarcomero durante lo slittamento.

La nebulina (900KDa) è formata dalla ripetizione di una unità di 35aa, è poco elastica e si associa al filamento sottile, e si pensa che

controlli il mantenimento e la lunghezza della struttura.

La proteina desmina, collega a livello della linea Z, le miofibrille adiacenti che compongono la singola fibra muscolare, mantenendole in registro in modo che esse si contraggano in sintonia.

### ***Struttura del muscolo scheletrico***

La struttura di tale muscolatura porta a distinguere vari livelli organizzativi. Le singole fibre muscolari o **miofibre**, sono cellule polinucleate molto lunghe (da 1 a 40mm) sono avvolte da una membrana detta sarcolemma; presentano internamente il citoplasma (sarcoplasma) in cui sono sospese goccioline di lipidi, granuli di glicogeno, liposomi, mitocondri, corpuscoli del Golgi, proteine (tra cui la mioglobina) e costituenti inorganici.

Ogni miofibra contiene un fascio di strutture proteiche dette **miofibrille**, ognuna di esse avvolta da una membrana detta reticolo sarcoplasmico.

Una miofibra presenta una struttura periodica (che si ripete). **Bande A** (scure) si alternano con **bande I** (chiare); queste ultime sono divise da linee sottili dette linee o **dischi Z**.

Al centro di ogni banda A si trova una **zona H**, dove c'è solo miosina. È possibile vedere al centro della zona H una **linea M** che può essere costituita dai filamenti più sottili disposti trasversalmente e può servire a tenere in posto i pesanti filamenti di miosina.

I filamenti sottili di actina si estendono in entrambe le direzioni a partire dalle linee Z interdigitandosi con i filamenti spessi di miosina. Le regioni in cui i filamenti spessi e sottili si sovrappongono, sono le bande Z (bande scure).

Le bande I (bande chiare), contengono solo filamenti sottili che si

estendono fino ai bordi della zona H, quest'ultima si trova al centro della banda A e si ritiene consista in proteine che saldano insieme i filamenti spessi.

I filamenti spessi (miosina) sono strutture bipolari costituite da code elicoidali e da propaggini dette teste che formano ponti trasversali tra i filamenti di actina e miosina.

Alla funzione contrattile del muscolo partecipano più di quattro proteine: una di queste è la tropomiosina, una proteina fibrosa che giace lungo il filamento di actina.

### ***Classificazione dei muscoli striati***

I muscoli striati, in funzione dell'attitudine alla contrazione possono essere classificati in due categorie: muscoli rossi, progettati per impieghi relativamente continui, e muscoli bianchi, utilizzati per movimenti occasionali, spesso rapidi.

La muscolatura rossa deve il suo colore a tre fattori:

- 1) è ben vascolarizzata; la densità dei capillari, infatti, è più alta nei muscoli rossi che in quelli chiari a causa di una maggiore necessità di ossigeno nei primi;
- 2) possiede molti mitocondri;
- 3) ha grandi riserve di mioglobina.

Questo tipo di muscolatura dipende strettamente dal metabolismo aerobio mitocondriale; la fonte primaria di energia nel muscolo rosso è l'ossidazione dei grassi.

La muscolatura bianca, invece, dipende dal glicogeno come fonte primaria di energia. Il glicogeno è eccellente per la produzione rapida di energia, pur non essendo capace di sostenere un'attività per lunghi periodi.

Il composto altamente energetico da cui il muscolo attinge energia per tutta la durata dell'attività muscolare è la creatina fosfato.

Questo composto è in grado di fosforilare l'ADP in modo molto efficiente catalizzato dall'enzima creatina chinasi. L'energia utilizzata dai muscoli per la contrazione muscolare, quindi, proviene dall'adenosintrifosfato (ATP).

L'ATP, è un composto fosforilato ricco di energia, liberata quando è scisso in ADP e Pi (fosfato inorganico).

Questo processo è regolato dalla miosina ATPasi e la sua funzione dipende anche dal calcio contenuto nel sarcoplasma.

Dopo la macellazione, in tutti i tipi di fibra il glicogeno è trasformato anaerobicamente in acido lattico, così il valore del pH decresce fino a 5.6-6. Il tasso di glicogeno degradato e il valore di pH del muscolo dipendono dall'attività degli enzimi glicolitici, dalle riserve di glicogeno e dalla capacità tamponante del muscolo. La fine della degradazione post-mortem può essere attribuita alla disattivazione degli enzimi glicolitici a pH basso (5.6-6).

### ***Le fibre muscolari***

Le fibre sono classificate istochimicamente sulla base delle loro attività come pure sul contenuto di lipidi e mioglobina. In base alle caratteristiche metaboliche e funzionali, le fibre possono essere divise in toniche e fasiche

Le fibre **toniche** presentano una innervazione multipla, la loro risposta elettrica alla stimolazione nervosa è di tipo graduale.

Sono a contrazione lenta con bassa attività ATPasica della miosina e quindi in grado di sviluppare e mantenere una tensione isometrica con

poco dispendio energetico. Questo tipo di fibra è presente negli uccelli, nei rettili, negli anfibi e nei muscoli dei mammiferi.

Le fibre **fasiche** sono sede di una attività elettrica propagata: la loro membrana plasmatica, cioè, risponde agli stimoli con potenziali d'azione.

Nell'ambito di questa categoria si possono distinguere diverse tipi di fibre:

1. **fibre lente a metabolismo ossidativo** (Slow Oxidative) S.O.:

tali fibre presentano una risposta contrattile che si sviluppa lentamente ed hanno un reticolo sarcoplasmatico meno sviluppato rispetto a quelle di tipo FG a cui segue un più efficiente rilascio di calcio e un meccanismo di riassorbimento che può essere relazionato alla contrazione veloce e al tasso di rilassamento. Inoltre esse ricavano la loro energia aerobicamente utilizzando acidi grassi a differenza delle FG. Le fibre S.O. contengono molti mitocondri poco glicogeno e abbondanti lipidi inoltre idrolizzano lentamente l'ATP e sono molto resistenti allo stress; sono responsabili del mantenimento della postura e della esecuzione di movimenti ripetitivi lenti; vengono anche denominate fibre di tipo I o rosse per il colore caratteristico che viene loro conferito dall'abbondanza di mitocondri e mioglobina.

2. **fibre rapide a metabolismo glicolitico** (fast glycolytic) F.G.:

si tratta di fibre che hanno un'attività ATPasica della miosina molto elevata e sono in grado di contrarsi rapidamente; ricavano la loro energia anaerobicamente dal glicogeno. Esse entrano di solito in funzione quando sono richiesti movimenti molto rapidi. La disponibilità dei mitocondri è scarsa perché probabilmente le richieste energetiche sono tanto pressanti nel tempo che il sistema mitocondriale non sarebbe comunque in grado di soddisfarle; possiedono inoltre abbondante



glicogeno e poca mioglobina e lipidi. Queste fibre vanno rapidamente incontro a fenomeni di affaticamento che ripristinano le loro riserve energetiche durante le fasi di riposo.

Sono anche denominate fibre di tipo IIB o bianche.

3. **fibre rapide a metabolismo glicolitico ossidativo** (Fast Glicolitic Oxidativ) F.O.G.:

più ricche di mitocondri rispetto alle F.G., sono mediamente meno rapide; sono più resistenti alla fatica e recuperano facilmente le riserve energetiche dopo un'intenso esercizio. Queste fibre sono anche chiamate di tipo IIA, o anche esse rosse come le S.O..

## **FAMIGLIA DELLE CALPAINE**

Durante la fase post-mortem, nel muscolo si verificano di numerosi cambiamenti, dai quali deriva la perdita dell'integrità strutturale dei tessuti.

La proteolisi delle proteine miofibrillari è la principale causa del cambiamento ultrastrutturale dei muscoli scheletrici associata all'intenerimento della carne.

Il processo degradativo è associato principalmente all'azione di diversi tipi di proteasi:

- ACIDE: catepsine
- NEUTRE: le calpaine calcio dipendenti esclusa la calpaina p94 calcio indipendente
- BASICHE e PROTEOSOMI

Le "Calpaine" costituiscono una grande famiglia di proteasi tioliche, cisteiniche, citoplasmatiche Ca<sup>2+</sup>-dipendenti attivate a pH neutro, derivanti da un unico enzima ad alto peso molecolare, presenti in diversi tipi di cellule animali, e accompagnate da un ampio numero di proteine citoscheletriche e regolatrici. Moltissime informazioni acquisite sulle proprietà del sistema delle calpaine sono state ottenute dalla purificazione della proteina successivamente chiamata m-calpaina (Dayton et al., 1976 ).

Tra il 1990 (Mellgren et al., 1986) ed il 1999 (Saido et al., 1992) sono state effettuate numerose pubblicazioni sulle proteasi Ca<sup>2+</sup>-dipendenti e sulle calpaine mentre nel 2000 è stata redatta una monografia sui metodi e sui protocolli per lo studio delle calpaine

attraverso la quale, è stato possibile definire alcune delle funzioni delle proteasi cisteiniche  $Ca^{2+}$  dipendenti:

1. funzioni fisiologiche;
2. traduzione di segnali cellulari;
3. cicli cellulari;
4. apoptosi;
5. attività proteolitica.

L'attività della calpaina, nella cellula, ha bisogno di essere strettamente regolata perché l'aberrazione delle attività proteolitiche intracellulari può portare alla scomparsa o l'accumulo di proteine cellulari e ciò è tossico per la cellula.

In vivo, il sistema delle calpaine, inizia il turnover delle proteine miofibrillari, che rappresentano il principale gruppo proteico del muscolo striato, determinando specifiche scissioni, che interessano i filamenti sottili e spessi della superficie delle miofibrille, ed inoltre frammentano un elevato numero di polipeptidi provenienti da altre proteine miofibrillari.

Le calpaine non degradano le proteine miofibrillari e non determinano la scissione globale delle proteine sarcoplasmatiche, non sono quindi direttamente coinvolte nella produzione di aminoacidi durante il turnover delle proteine muscolari, infatti le loro attività nelle cellule viventi, sono regolate dalle calpastatine e dal calcio.

Le miofibrille del muscolo dovrebbero essere infatti scisse in filamenti singoli e conseguentemente, i filamenti dovrebbero subire una frammentazione ad opera delle catepsine, che rivestono un importante ruolo nel turnover di tali proteine.

La classificazione delle calpaine in funzione alla loro distribuzione è la seguente:

- Calpaina Ubiquitarie;
- Calpaine Tessuto-specifiche.

Le “Calpaine Ubiquitarie” sono state trovate in tutti i tessuti e sulla base di una differente richiesta di Ca<sup>2+</sup> sono state ulteriormente suddivise in:

μ- calpaine                      quantità micromolari di Ca<sup>2+</sup> (5-50 μM)

m- calpaine                      quantità millimolari di Ca<sup>2+</sup> (0.2 – 0.6 mM)

Le “Calpaine Tessuto specifiche“ sono state ritrovate solo in specifici tessuti e il loro significato metabolico è ancora oggetto di studio:

Muscoli scheletrici :        n-calp-1

Stomaco :        n-calp-2, n-calp- 2'

### ***Struttura delle Calpaine ubiquitarie***

Le “Calpaine Ubiquitarie” formano un eterodimero di 110 KDa comprendente una subunità catalitica con un peso molecolare pari ad 80 KDa (“Grande subunità”) ed una subunità regolatoria (“Piccola subunità”) da 28 KDa (comune).

Solitamente nell’essere umano, la subunità di 80 kDa della μcalpaina risulta essere leggermente più grande della subunità di 80 kDa della m-calpaina (81,889 Da vs. 79,900 Da), (Andresen et al., 1991; Imajoh et al., 1988) inoltre nella forma natale si presenta sottoforma di eterodimero mentre la piccola subunità di (28 KDa), è identica nelle due specie di calpaine ed è codificata da un singolo gene a livello del cromosoma 19 (Ohno et al., 1990).

La grande Subunità, presenta qualche differenza tra le varie specie di Calpaine ed è espressa da geni differenti (rispettivamente nell’essere umano i geni sui cromosomi 11 e 1; Ohno et al., 1990) ma condivide le

sequenze omologhe per il 55-65% all'interno della specie considerata (Suzuki, 1990). La subunità di 80 kDa della  $\mu$ -e m-calpaina originariamente era divisa in quattro domini in base alla loro sequenza aminoacidica (Suzuki, 1990), ma la recente struttura cristallografica ai raggi X ha indicato che questa subunità è composta da sei domini, di cui quattro sono i domini propriamente detti "(I, II, III, IV) mentre gli altri due sono rappresentati da piccole sequenze aminoacidiche.

In particolare, una è una sequenza corta (1-18) che precede il dominio I e l'altra è una sequenza aminoacidica corta chiamata "Dominio Linker" perché funge da legante tra i domini III/IV.

DOMINIO I: è costituito dai residui aminoacidici che vanno da 1-80 ed è situato nella zona NH<sub>2</sub>-terminale. Ha forma di alfa-elica, non ha sequenza omologa con nessun polipeptide sequenziato fin ora, ha proprietà idrofobiche ed è coinvolto nel processo di attivazione della proteasi.

Il 72-86% costituisce la sequenza omologa tra le differenti specie: (uomo, pollo, topo, maiale e coniglio).

DOMINIO II: è costituito dai residui aminoacidici che vanno da 81-320 ed è denominato "Dominio Catalitico" in quanto contiene una triade catalitica caratteristica delle proteasi cisteiniche come la papaina o le catepsine B, L, S formata dai tre residui Cys-His-Asn nelle posizioni 115-105, 272-263, 296-286 rispettivamente per la  $\mu$  e la m-calpaina. Il dominio II, tuttavia divide la piccola sequenza omologa con queste altre proteasi cisteiniche ed è probabile che questo si generi da un differente gene ancestrale. E' costituito da due sottodomini, IIa e IIb, che legano ognuno un atomo di calcio in un peptide "cappio" composto da 8 (dominio IIa) o 9 (dominio IIb) aminoacidi (Moldoveanu et al., 2002).

Il dominio IIa contiene Cys mentre il dominio IIb contiene una coppia Hs – Asn e durante l'attivazione si avvicinano per interagire e costruire la triade catalitica. La sequenza omologa del dominio II tra le differenti specie è alta, variando dall' 85 al 93%.

DOMINIO III: Il dominio III ha forma  $\beta$ -sandwich. Questo dominio non ha sequenza omologa con nessun polipeptide ordinato fin ora. E' costituito dai residui aminoacidici che vanno da 321-560. Collega i domini che legano il calcio al dominio catalitico (dominio II), è coinvolto nell'attività della calpaina in base alla sua partecipazione nelle interazioni elettrostatiche (Imaioh et al., 1988; Strobl et al., 2000) e contiene il sito di interazione per specifici ligandi quali calcio e fosfolipidi. L'analisi delle sequenze amminoacidiche indicano che questo dominio contiene anche due potenziali sequenze EF-hand calcio-legante, una al confine del dominio II/III (residui 329-341, per la  $\mu$ -calpaina; i residui 318-338 per la m-calpaina; nel dominio IIb della struttura cristallografica della m-calpaina) e uno al confine del dominio III/IV (residui 554-565  $\square$ -calpaina, i residui 541-552 per la m-calpaina ; nel dominio IV della struttura cristallografica della m-calpaina;) .La sequenza al confine del dominio II/III non ha conformazione EF-hand nella struttura cristallografica della m-calpaina dell'essere umano e del topo e questa regione non sembra legare il calcio nella m- calpaina.

La sequenza EF-hand al confine del dominio III-IV nella calpaina isolata dal *Schistosoma mansoni*, tuttavia, lega il calcio. Poiché le strutture cristallografiche della  $\square$ calpaina e delle altre calpaine che sono state identificate nei 10 anni scorsi non sono ancora disponibili, è ancora poco chiaro se questa sequenza lega il calcio in queste altre calpaine.

La sequenza EF-hand al confine del dominio II/III sarà ascritta come EF-IIb con la consapevolezza che non può legare calcio in nessuna calpaina.

DOMINIO IV: E' situato nella zona C-terminale e contiene cinque motivi strutturali EF-Hand Fmano (motivo strutturale del tipo elica-ripiegamento-elica) (Ef-1, Ef-2, Ef-3, Ef-4, e Ef-5), di cui i primi legano il calcio e il quinto partecipa nel legame con la piccola subunità per formare l'interfaccia dell'eterodimero analogamente al dominio VI. Tale dominio ha un elevato grado di omologia con la calmodulina e la troponina

In questo dominio la sequenza omologa tra le specie si estende dal 65% al 93%.

La piccola subunità è costituita da due domini :DOMINIO V e VI:

DOMINIO V: è situato nella regione NH<sub>2</sub>-terminale formato da 101 residui aminoacidici (1-101). Di questi, 40 sono Gly, la prima molecola di glicina è legata al residuo 10 nella piccola subunità, 5 sono Pro, 30 sono amminoacidi idrofobi e 26 sono amminoacidi polari carichi. In aggiunta alla lunga catena di residui di glicina, c'è una regione costituita dai residui 76-83 tutti contenenti Pro (PEPPPP) e una regione localizzata tra i residui 91-97 costituita da quattro residui di Glu (EANESEE).

Il dominio V è spesso indicato come un dominio idrofobo, ed è stato suggerito che questo lega i fosfolipidi (Imajor et al., 1986). Nonostante la glicina sia vicina al centro della scala di idrofobicità (Eisenberg et al., 1982), la composizione in amminoacidi del dominio V tuttavia non è responsabile dell'elevata idrofobicità del dominio e studi recenti hanno indicato che la subunità di 80-kDa del dominio III lega il

fosfolipide (Tompa et al., 2001) ed ha un ruolo nell'interazione con le membrane cellulari (Gil-Parrado et al., 2003).

DOMINIO VI: è costituito da 167- residui (101-268) si trova nella zona C-terminale, frequentemente è considerato un dominio calmodulino simile, poiché l'analisi iniziale della sequenza aminoacidica di questo dominio ha suggerito la presenza di quattro strutture EF-hand calcio - leganti ai residui aminoacidici 152 –163, 182 –193, 217 –228 e 247 –258 (Ohno et al., 1986).

La sequenza aminoacidica del dominio VI è soltanto marginalmente omologa a quella del dominio calmodulinico (23% di identità e il 30 % di similarità per le molecole umane).

Inoltre, ai raggi X le strutture cristallografiche di questa subunità (Blattner et al., 1997; Lin et al., 1997) hanno rivelato la presenza di un quinto sito Ca<sup>2+</sup>-legante ai residui 108 –119, identificando in questo modo le calpaine come membri della famiglia delle proteine penta-EF-hand (Maki et al., 1997; Xie et al., 2001).

I membri della famiglia delle proteine penta-EF-hand formano dimeri che coinvolgono la quinta struttura EF-hand e si associano alle membrane (Xie et al., 2001), due proprietà che sono anche caratteristiche della  $\mu$  - e della m - calpaina.

Successivamente, le cinque sequenze EF-hand contenute nella subunità da 28-kDa sono suddivise in questo modo:

Ef-1, Ef-2, Ef-3, Ef-4 ed Ef-5, anche se l'Ef-5 è probabilmente l'Ef-4 sono coinvolti nella formazione dell'interfaccia dell'eterodimero.

Recentemente, gli studi effettuati sulla clonazione e sull'espressione genica hanno identificato un gene mancante di un introne presente sia nell'essere umano sia nel topo, capace di codificare un polipeptide composto da 248 amminoacidi avente una massa molecolare di 27.659



Da e il 63% delle sequenze aminoacidiche uguali alla piccola subunità (28 kDa) delle calpaine (Schad et al., 2002).

Questo polipeptide costituito da 248 amminoacidi differisce dalla classica piccola subunità 28 kDa in quanto è privo nel dominio V di due catene composte da 11 e 20 residui di glicina e, da esperimenti effettuati in vitro, sembra essere solo debolmente legato alla grande subunità 80 kDa (Schad et al., 2002). La coespressione della subunità del polipeptide composto da 248 amminoacidi con la sub-unità di 80 kDa della m-calpaina, tuttavia, produce un enzima proteoliticamente attivo, avente circa il 70% dell'attività di una m-calpaina espressa. La rottura del gene che codifica la piccola subunità 28-kDa è embrionicamente letale nel topo, anche se in questo animale è espresso il polipeptide costituito da 248 amminoacidi.

Per tale motivo il polipeptide da 248 amminoacidi non può sostituire la subunità 28-kDa nelle cellule ed inoltre la funzione di questo ultimo attualmente non è ancora chiara.

### ***Generalità e struttura delle Calpastatine***

Studi effettuati sulla purificazione della m-calpaina (Dayton et al., 1976) hanno definito la presenza nel muscolo di un inibitore rappresentato dalla "Calpastatina". Essa è l'unico inibitore endogeno specifico per la calpaina, è una proteina termo-resistente (a 100 C°) Okitani et al., (1976), ad una svariata varietà di agenti denaturanti come l'urea, SDS, o l'acido tricloroacetico (Gil-Parrado et al., 2003; Otsuka and Goll 1987) ed è distribuita, insieme ad essa, nella frazione intracellulare non lisosomiale. In presenza di  $Ca^{2+}$ , la calpastatina si associa alla calpaina e inibisce la sua attività proteolitica. È stato

riportato che una mole di calpastatina inibisce circa 3-8 moli di calpaina (Imajoh et al., 1987).

Molti studi su animali, specialmente il manzo, hanno tentato di determinare il ruolo fisiologico della calpastatina nella tenerezza, così come i componenti genetici del gene della calpastatina (Killefer and Koohmaraie, 1994).

I livelli della calpastatina variano considerevolmente fra la specie, le razze (Shackelford et al., 1994) ed i muscoli (Geesink and Koohmaraie, 1999). Nella carne esiste un rapporto inverso fra attività di calpastatina e tenerezza (Koohmaraie, 1994).

Al livello strutturale, la calpastatina è una proteina inibitoria di cinque-domini di peso molecolare di 76 kDa (Killefer and Koohmaraie, 1994) e di 786 residui aminoacidici. Inoltre, è presente in tutti i tessuti nella quale si esprimono le Calpaine e nel muscolo scheletrico.

La Calpastatina è espressa ad un livello più elevato delle Calpaine.

Dei cinque domini, quello N-terminale detto “Dominio Leader” è composto da due sottodomini XL e L e gli altri quattro sono indicati con i simboli che vanno da I-IV. Il dominio leader N-terminale (L) non sembra avere alcuna attività inibitoria sulle calpaine (Emori et al., 1987), può partecipare all'ottimizzazione o alla localizzazione intracellulare, mentre gli altri domini (I-IV) sono altamente omologhi e sono ciascuno indipendentemente capaci di inibire le calpaine (Emori et al., 1987; Cong et al., 1998). Infatti il dominio III ( residui 426-555), nonostante inibisca completamente l'attività della calpaina, si lega meno strettamente alle calpaine di come fa la molecola di calpastatina (Maki et al., 1988), permettendo le analisi cinetiche di inibizione della calpastatina. Alcune analisi indicano che il dominio III è un inibitore competitivo della  $\alpha$ -calpaina con valori di  $K_i$  di 3 nM. La forma non mutata del dominio

inibisce competitivamente anche la m-calpaina con valori di  $K_i$  8-10 mM, mostrando una maggiore sensibilità della m-calpaina all'inibizione di questo dominio calpastatinico.

I domini inibitori della calpastatina contengono tre regioni altamente conservate, A, B e C, di cui la A e la C legano la calpaina in modo rigorosamente Ca<sup>2+</sup>-dipendente ma non hanno attività inibitoria, mentre la regione B inibisce le calpaine.

Cong et al., (1998) inoltre notarono che la rimozione del dominio XI- e/o del dominio L svolge un ruolo regolatore alterando i modelli di fosforilazione sulla proteina. Infatti la calpastatina può essere fosforilata sia in vitro dalla proteina chinasi A (PKA) (Mellegren et al., 1997; Salamino et al., 1994) sia in vivo (Adachi et al., 1991; Salamino et al., 1994) dalla PKA e dalla proteina chinasi C (PKC). In vivo la fosforilazione non ha nessuno effetto sulle proprietà misurate della calpastatina (Mellegren and Carr, 1983) mentre la fosforilazione in vitro comporta un incremento nella quantità di calpastatina membrana-associata dal 6 al 30 % (Adachi et al., 1991). Non è ancora noto se il 2% della calpastatina membrana-legata nel muscolo cardiaco del bovino (Mellegren et al., 1987) è fosforilata ma questa ultima può inibire le calpaine tanto quanto la calpastatina citosolica (Mellegren et al., 1987); quindi il significato fisiologico della calpastatina membrana-associata è ancora poco chiaro. La fosforilazione in vitro della calpastatina del cervello di ratto ad opera PKA e della PKC o solo della PKC (Averna et al., 1999) comporta una diminuzione nell'efficienza di inibizione sia della m che della  $\mu$ -calpaina. Inoltre si segnala che i promotori alternativi nella calpastatina conducono alla generazione di differenti isoforme della proteina che differiscono nella zona N-terminale. Le differenze nelle sequenze dell'N-terminale dedotte hanno provocato una differente

distribuzione intracellulare e una minore efficienza delle interazioni di calpaina-calpastatina (Takano et al., 1999).

Le variazioni al gene della calpastatina potrebbero influenzare l'attività della calpastatina e quindi contribuire alla variazione nella tenerezza della carne.

L'esistenza di specie a differente peso molecolare è dovuta all'eterogeneità della regione 3' non tradotta. Infatti, le varie isoforme della calpastatina derivano da modificazioni post-traduzionali dello stesso prodotto di traduzione primaria dell'mRNA. Per esempio, la calpastatina epatica di ratto perde 79 residui aminoacidici della regione N-terminale dal prodotto di traduzione iniziale.

Dal momento che le due specie molecolari hanno un'antigenicità comune, sono indistinguibili eccetto che per la loro stechiometria d'inibizione.

p94

Alla famiglia delle calpaine, appartiene anche la p94, benché tale proteina contenga il dominio IV, la sua degradazione è calcio indipendente.

La p94, non forma un complesso con la piccola subunità della calpaina (30KDa) ma esiste come omodimero e la struttura cristallina della subunità ampia rivela quattro distinti domini (I a IV).

Tale proteina è espressa specificamente nel muscolo scheletrico e nella lingua e l'ammontare di mRNA nel muscolo scheletrico che codifica per quest'ultima è in quantità maggiore rispetto a quella che codifica per le calpaine ubiquitarie ( $\alpha$ - e m-calpaine).

### **TRASFORMAZIONE DEL MUSCOLO IN CARNE**

La conversione del muscolo in carne richiede che si realizzino cambiamenti fisici, metabolici e strutturali nel tessuto.

Con la morte dell'animale cessa il flusso ematico e quindi, il rifornimento di O<sub>2</sub> alle cellule e ai tessuti, con conseguente arresto della respirazione cellulare e caduta del potenziale di ossidoriduzione (da +250 a circa -50 mV). Il sistema enzimatico dei citocromi non può più funzionare in queste condizioni e il glicogeno, invece di essere degradato ad acqua e anidride carbonica con la successiva rigenerazione di ATP in quantità importanti, viene trasformato in acido lattico (glicolisi anaerobica).

Questo tipo di via metabolica porta alla formazione di una piccola quantità di ATP che a causa del permanere della funzionalità dell'ATP-asi sarcoplasmatica, si esaurisce, producendo ADP e Fosfato inorganico con la successiva formazione di un legame irreversibile tra actina e miosina formando l'actinmiosina provocando l'indurimento della carne.

L'acido lattico prodotto dal metabolismo anaerobico non riesce ad essere eliminato, ma si accumula nel muscolo determinando l'abbassamento del pH muscolare da 7,0 a 5,6 nel corso di 24 ore. La minore disponibilità di ATP, unitamente al basso pH, rende le proteine muscolari facilmente suscettibili alla denaturazione e per tanto, attaccabili dalle calpaine e catepsine.

Contemporaneamente la temperatura corporea inizia ad abbassarsi, e il reticolo sarcoplasmatico distruggendosi perde la capacità di recuperare gli ioni calcio e pertanto, aumenta la concentrazione di Ca<sup>2+</sup> libero.

La compartecipazione di tali fenomeni va sotto il nome di *rigor mortis* e il suo picco massimo si osserva 1-3 giorni dopo la morte. Nel

periodo *post mortem* (superamento della rigidità cadaverica detta in gergo “*maturazione*”) incomincia il processo degradativo a carico della struttura muscolare della carne nella quale si susseguono reazioni enzimatiche che provocano un’attenuazione della durezza e altre reazioni quali:

Ossidazione dei lipidi che potrebbe generare odori indesiderabili;

Formazione di nucleotidi quale l’ipoxantina, potenziatore dell’aroma.

Inoltre si ha la formazione di ammoniaca, idrogeno solforato, acetaldeide, di acetile e acetone che sono, entro certi limiti, favorevoli per il sapore.

Il processo degradativo è basato principalmente su differenti degradativo proteinasi quali Calpaine Catepsine.

Nel muscolo a riposo, la concentrazione del Ca<sup>2+</sup> libero è circa 1µM, mentre nelle condizioni *post mortem* può raggiungere 100 µM. Perché le Calpaine siano attive sono richieste concentrazioni di Ca<sup>2+</sup> libero pari a 10-50 µM e 200-300 µM rispettivamente per la µ-Calpaina e la m-Calpaina, concentrazioni più elevate rispetto a quelle osservano nel tessuto vivente.

Sono stati condotti molti studi sui cambiamenti delle proteine miofibrillari durante il periodo *post mortem*, sulle cause di questi cambiamenti e sulle relazioni tra questi cambiamenti e l’intenerimento della carne.

È stato dimostrato che le Calpaine scindono le proteine della linea Z: troponina T , troponina I, tropomiosina, alfa - actinina, titina e nebulina (koohmaraie, 1992).

I principali cambiamenti nella struttura del muscolo riguardano (Ouali 1992):

- la scomparsa o indebolimento della linea Z e della linea M;
- la perdita dell'allineamento trasversale dei dischi Z, della linea M e degli altri elementi contrattili;
- scomparsa della troponina-T e contemporanea presenza del polipeptide di peso 30KDa;
- degradazione della desmina che porta alla frammentazione delle miofibrille, probabilmente attraverso la distruzione del legame tra le miofibrille;
- degradazione della titina;
- degradazione della nebulina.

Per quanto riguarda il ruolo dei lisosomi e dei sistemi  $Ca^{2+}$ -dipendenti nel processo di intenerimento post - mortem della carne, il contenuto in calpaina e calpastatina è negativamente correlato alla velocità di contrazione del muscolo. Inoltre, nei muscoli a contrazione rapida è stato osservato un basso livello di calpastatina, una maggiore velocità di intenerimento e un alto rapporto calpaina/calpastatina.

### ***Ruolo fisiologico del sistema Calpaina-Calpastatina in relazione alla qualità della carne***

La “*Tenerezza*” è probabilmente la caratteristica organolettica più importante della carne ed è il risultato di una serie di processi interattivi che includono (Ouali, 1992):

- L'azione sinergica di calpaine e catepsine (proteasi lisosomiali);
- L'alta variabile suscettibilità delle miofibrille alla proteolisi;
- Il grande aumento di pressione osmotica che può indurre un rilascio delle proteine contrattili dalle miofibrille.

Il meccanismo d'intenerimento della carne durante la conservazione delle carcasse a temperatura di refrigerazione (0-4 gradi), non è ancora del tutto chiaro, ma evidenze sperimentali suggeriscono che un ruolo importante è svolto dalla proteolisi delle proteine miofibrillari e delle proteine associate.

Le catepsine lisosomiali erano considerate, fino agli anni '70, le principali responsabili dell'aumento di tenerezza *post mortem* nelle carni fino a quando si scoprì un nuovo sistema proteolitico il cui elemento principale era la "Calpaina". Sebbene gli esatti meccanismi non sono stati ancora del tutto chiariti, universalmente è accettato che la scissione delle proteine miofibrillari ad opera di proteasi endogene (quali le Calpaine) è almeno parzialmente, responsabile dell'aumento di tenerezza *post mortem*.

Recentemente l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sulla possibilità di utilizzare il sistema calpaina-calpastatina per migliorare la tenerezza delle carni. Una delle possibilità potrebbe essere selezionare la calpastatina in funzione dell'attività. Tale sostanza infatti è geneticamente e positivamente correlata con la forza di taglio (Wulf *et al.*, 1996) da cui, una minore età e una più bassa attività della Calpastatina determinano una maggiore tenerezza di alcuni tagli della carne di struzzo. Inoltre, l'attività della Calpastatina *post-rigor*, è inversamente proporzionale all'intenerimento *post-mortem*, il che spiegherebbe, ad esempio, l'enorme variazione della tenerezza della carne di struzzo.(circa 40%).

Ouali e Talmant (1990) suggeriscono che l'attività calpastatina/ $\mu$ -calpaina sia un buon indicatore dell'attività potenziale proteolitica del muscolo e proprio perché la calpastatina è un inibitore endogeno della  $\mu$ -calpaina, un basso rapporto indica una maggiore attività potenziale



proteolitica del muscolo che si traduce in un maggiore intenerimento *post mortem*.

Anche altri ricercatori (Ouali, *et al.*, 1990 ) affermano che il rapporto m-calpaina/calpastatina potrebbe determinare il grado di tenerezza, e successivamente Hortos *et al.* (1994) hanno suggerito che l'indice di frammentazione miofibrillare (MFI) e la proteolisi indotta dalle calpaine, fattori chiave nella valutazione della tenerezza della carne, potrebbero essere impiegati addirittura come parametri utili per distinguere carni suine Normali da carni PSE.

Non tutti i ricercatori, però, sono stati d'accordo sul ruolo e sull'importanza dei due sistemi calpaina e catepsine nel processo d'intenerimento delle carni.

Alcuni sostengono che il sistema delle calpaine sia l'unico capace di promuovere i cambiamenti *post mortem* che portano all'intenerimento delle carni (Koohmarie, 1992, 1996), altri postulano un'azione sinergica delle proteasi lisosomiali e delle calpaine (Etherington, 1984; Ouali, 1992).

I principali dubbi sul ruolo delle calpaine provengono da tali considerazioni:

La  $\mu$ -calpaina è inattivata così rapidamente che non può giustificare l'intenerimento al di là delle 24-48 ore *post mortem*;

Come potrebbe la  $\mu$ -calpaina essere ancora attiva quando il contenuto muscolare di calpastatina è circa il doppio della  $\mu$ -calpaina?

Alla prima domanda Koohmarie (1996) risponde che con i metodi sensibili (caseina marcata) è stato possibile rilevare un'espressiva attività della  $\mu$ -calpaina anche dopo 14 giorni a quattro gradi (dal 5% al 10%). Poiché autolisi e inattivazione della  $\mu$ -calpaina sono processi

intermolecolari, non andranno a completamento, e quindi la  $\mu$ -calpaina manterrà parzialmente la sua attività anche dopo ampia autolisi. Inoltre, a differenza della  $\mu$ -calpaina l'autolisi della m-calpaina è un processo intramolecolare e, pertanto, una vasta autolisi risulterà in una completa inattivazione della m-calpaina.

Riguardo all'eccesso di calpastatina nel muscolo, il rapporto calpastatina/ $\mu$ -calpaina è stato 4:1 nel bovino, 2,5:1 nell'agnello e 1,5:1 nel maiale, ma tali dati si riferiscono alla possibilità della calpastatina di inibire sia la  $\mu$ -calpaina che la m-calpaina, pertanto il reale rapporto dovrebbe essere dimezzato (2:1, 1,25:1; 0,75:1 rispettivamente).

Alla luce di ciò è evidente che l'eccesso di calpastatina non è poi così elevato come potrebbe sembrare ad una prima osservazione.

## **ESAME DELLA LETTERATURA**

### ***Tipi di fibre nel muscolo scheletrico dei volatili***

Per molti anni, la selezione del pollame si è concentrata sulla velocità di crescita delle linee riguardanti la produzione della carne al fine di ottenere un miglioramento dell'accrescimento del muscolo e della qualità della carne. Tuttavia un più veloce accrescimento del muscolo è causa di anomalie morfologiche quali: un diametro più grande della fibra, un numero più elevato di fibre glicolitiche ed un potenziale proteolitico più basso. Dopo la morte, il raggiungimento più veloce del rigor mortis, aumenta la probabilità di comparsa del colore pallido e riduce la capacità di ritenzione idrica; ciò provoca l'ottenimento di carne di scarsa qualità. (Dransfield e Sosnicki, 1999)

Hikida *et al.*, (1981) confrontando istochimicamente il muscolo *latissimus dorsi* ed il muscolo *biventer cervicis*, in funzione delle percentuali dei tipi di fibra e delle attività di adenosina trifosfato (ATPasica) e succinico-deidrogenasica (SDH); evidenziarono che i parametri considerati non subivano variazioni, per entrambi tipi di muscoli, tra gli uccelli giovani ed adulti. Wada *et al.*, (1999) studiarono la composizione del tipo di fibre del loro numero e del loro diametro in 2 muscoli scheletrici di piccione e pollo quali: *M. pectoralis superficialis* (PS) e *M. latissimus dorsi* (LD) e notarono che i muscoli oggetto di studio contenevano tutti e tre tipi di fibre: FG (fast-twitch glycolytic), FOG (fast-twitch oxidative glycolytic), ed SO ( Slow oxidative). Anche Iwamoto *et al.*, (1997), notarono l'esistenza di tre tipi di fibre confrontando tra loro le proprietà di istochimiche del m. *iliotibialis lateralis* di polli Kumamoto Cochin (una razza di origine giapponese),

incroci di polli da arrosto (KC polli da arrosto, 112 d di età) e polli da grill normali (56 d di età).

Successivamente, gli stessi autori (Iwamoto *et al.*, 1998) studiando le proprietà istochimiche di quattro galli Shamo (un uccello selvatico giapponese), incrociati con le galline White, evidenziarono caratteristiche diverse in riguardo alle proprietà istochimiche dei muscoli *iliotibialis lateralis* (ITL) e *sopracoracoideus*.

Sempre Iwamoto *et.al.*, (2002) compararono i profili istologici ed istochimici del M. *pectoralis* (PT, tipi di fibre IIB), M. *iliotibialis lateralis* (ITL, tipi di fibre IIA+IIB) e M. *puboischiofemorale pars medialis* (PIF, fibre di tipo I) di polli maschi storditi con biossido di carbonio (37% 70 s) ed elettricamente(14V, 5 s).

Essi notarono che il muscolo *pectoralis* (PT), dei polli storditi con gas mostrava, al tempo 0 h, molte fibre con un elevato contenuto in glicogeno, mentre, quelli storditi elettricamente erano caratterizzati da poche fibre con basso contenuto in glicogeno. Le fibre degli uccelli storditi con gas, in seguito alla conservazione a basse temperature, avevano perso pressoché tutto il loro contenuto in glicogeno dopo 24 h.

Nel muscolo *ilitibialis* (ITL) dei polli storditi con gas, dopo 0 h, nelle fibre di tipo IIB vi era un residuo di glicogeno. Al contrario, negli uccelli storditi elettricamente, questo residuo era contenuto nelle fibre di tipo IIA, a dimostrazione degli effetti diversi esercitati dai metodi di stordimento. Durante la conservazione alle basse temperature, il contenuto in glicogeno scompariva prima nelle fibre di tipo IIB e poi in quelle di tipo IIA.

Questi risultati indicarono che, lo stordimento con biossido di carbonio rispetto a quello elettrico, rappresentava il miglior metodo per ottenere una buona qualità della carne.

Meyers *et. al.*, (1997), analizzarono il volo planare di gabbiani California (*Larus californicus*) per determinare la presenza di fibre a contrazione lenta utilizzando la metodica istochimica m-ATPasica e con sorpresa notarono che i muscoli *metacarpi radialis*, *coracobrachibialis cranialis* e *caudialis* presentavano un numero notevolmente ridotto di fibre a contrazione lenta.

Hepple *et.al.*, (1981) attraverso alcuni studi evidenziarono, in funzione dell'altitudine, un incremento del rapporto "capillarità del muscolo per numero di fibra" (capillarità/ numero di fibre).

Torrella *et. al.*, (1998b), analizzarono morfometricamente sei muscoli di anatra mallard, (*Anas platyrhynchos*), di folaga comune (*Fulica atra*) e di gabbiano yellow-legged (*Larus cachinnans*). Essi notarono che le fibre di ossidative veloci del muscolo *pectoralis* e del tricipite di gabbiano erano più grandi rispetto alle fibre ossidative veloci dell'anatra mallard e della folaga. I maggiori valori delle aree e dei perimetri delle fibre dei gabbiani sembrarono permettere un'attività prolungata, con richieste metaboliche ridotte durante lo scivolamento. Al contrario, l'anatra mallard e le folaghe, durante il volo sostenuto richiedevano un metabolismo ossidativo elevato, il che riduceva la grandezza della fibra a spese di una diminuzione dell'attività per forza generata. I confronti con i muscoli degli arti inferiori fornirono solamente differenze in riguardo alle fibre anaerobiche del *gastrocnemius*, come importante risposta adeguata alla forza generata durante i movimenti bruschi.

Bretones *et. al.*, (1987) effettuarono uno studio istochimico e morfometrico comparato in due gruppi di muscoli omologhi di tetrapodi diversi (ratto, piccione, lucertola e rana). Sulla base dei diametri delle loro fibre e delle attività ossidative enzimatiche, osservarono, in tutti gli animali, inizialmente, una correlazione tra i tipi di fibra, anche se nei

muscoli di lucertola e di rana, evidenziarono un altro tipo di fibra, non esistente nei vertebrati più evoluti. Successivamente, usando più tecniche istochimiche, notarono un evidente mancanza di correlazione tra i diversi tetrapodi. Giungendo alla conclusione che animali diversi potevano essere distinti, in quanto, mostravano un caratteristici modelli metabolici del muscolo.

***La sequenza genomica della m e della  $\mu$ -calpaina***

Nell'arco di un decennio sono state determinate le sequenze genomiche del DNA per la subunità di 80-kDa della  $\mu$ -calpaina del topo (28 esoni, 21 Kb; Azam *et al.*, 2001), la subunità di 80-kDa del m-calpaina del ratto (21 esoni, >33 Kb), la calpaina 3<sup>°</sup>a dell'essere umano (24 esoni, 40 Kb; Richard *et al.*, 1995), la calpaina 4 dell'essere umano (11 esoni, 11 Kb; Miyake *et al.*, 1986), la calpaina 8 del topo (23 esoni; 50 Kb; Hata *et al.*, 2001), la calpaina 10 dell' essere umano (15 esoni, 31 Kb; Horikawa *et al.*, 2000), ed la calpaina 12 del topo (21 esoni, 13 Kb; Dear *et al.*, 2000).

Studi sulla regione promotore dei geni della calpaina sono stati effettuati solo per la subunità di 80kDa (Emori *et al.*, 1986; Hata *et al.*, 1989; Hata *et al.*, 1992) della m-calpaina del pollo e dell' essere umano e per la subunità di 28 kDa dell'essere umano. Il gene della subunità di 28 kDa dell'essere umano è di circa 11 Kb e contiene 11 esoni.

L'Esone 1 è una sequenza non codificante, e la traduzione inizia alla sedicesima base nell'esone 2. Ciascuna delle Ef-2, Ef-3, Ef-4 ed Ef-5 sequenze sono codificate da un solo esone, rispettivamente esoni 7, 8, 9 e 10 ma la sequenza Ef-1 si espande tra gli esoni 4 e 5. Le posizioni delle giunzioni introne/esone sono identiche nel dominio IV del gene della m-calpaina del pollo e nel dominio VI del gene della subunità di 28 kDa del essere umano. La regione 5' a monte del gene della subunità

di 28 kDa dell' essere umano manca di una sequenza-box TATA o CAAT ed è ricca di GC, contenendo tre box G-C (GGGCGG). Tali sequenze 5' - a monte sono caratteristiche dei geni "housekeeping."

Il gene per la subunità di 80 kDa della m-calpaina del pollo è circa 10 Kb e contiene 11 esoni (Emori *et al.*, 1986). La sequenza 5' a monte sia della subunità di 80-kDa della m-calpaina del pollo e dell'essere umano (solo la regione 5' a monte del gene dell'essere umano è stata sequenziata, così la forma e il numero di introni per il gene della subunità di 80 kDa dell'essere umano sono sconosciute) manca anche di un box TATA o di CAAT e sono ricche di GC, indicando che questi geni probabilmente appartengono anche alla famiglia dei geni "housekeeping".

L'analisi sull'espressione del CAT ha identificato quattro elementi negativi nel 2.500 NT posti a monte dal sito di inizio della trascrizione del gene umano della m-calpaina di 80 kDa.

La rimozione di questi elementi comporta un aumento di 13-fold nell'espressione del CTA.

I quattro elementi negativi rinforzati rispondono agli stessi o simili fattori trans-acting cellulari. Le regioni dal NT 202 al -160 e dal NT -130 - al NT 80 contengono due elementi promotori.

Sia il gene della subunità di 80-kDa della m-calpaina dell'essere umano che il gene della subunità di 28-kDa dell'essere umano contengono Ap-1 e Sp1, siti leganti la posizione superiore del sito di inizio della traduzione.

L'incubazione delle cellule Hela con il forbo tumore-promovente l'estere 12-O-tetradecanoilforbo-13-acetato (TPA), genera un alterazione dell'espressione del gene della m-calpaina di 80 kDa, invece ha un piccolo o nessun effetto sull'espressione del gene per la  $\mu$ -calpaina di 80

kDa, per la subunità di 28-kDa, o per la calpastatina (Hata *et al.*, 1992). Il saggio dei costrutti della m-calpaina-CAT dell'essere umano di 80kDa ha identificato un elemento cis-agente nella regione 202/80 posta a monte del gene della m-calpaina. Questa regione del gene umano della m-calpaina di 80 kDa contiene una sequenza TGAATCA al sito - 132 che è strettamente collegata all'elemento responsabile della TPA collagenasi. E' stato suggerito che sia l'alterazione della protein-chinasi C e l'espressione della m-calpaina dal TPA è connessa al ruolo della m-calpaina nella regolazione dell'attività della PKC nelle cellule. La limitata sequenza data non ha identificato gli ovvi chiari elementi promotori nella regione 5' a valle (UTR) del gene della  $\mu$ -calpaina umana e ha mostrato che la regione 5'-UTR regione del gene della  $\mu$ -calpaina umana è altamente omologa con le 5'-UTR regioni del gene della  $\mu$ -calpaina del bovino e del maiale.

### ***Strutture e soluzioni cristallografiche.***

Le informazioni sulla struttura cristallografica delle calpaine sono diventate disponibili nell'arco di 5 anni di sperimentazione. In primo luogo le strutture cristallografiche espresse dei polipeptidi del dominio VI sono state risolte a una risoluzione di 2.3°(39) e 1.9 Å (Lin *et al.*, 1997). Questo è seguito successivamente dalla struttura cristallografica della m-calpaina del topo (IMajoh *et al.*, 1988) e dell'essere umano (Strobl *et al.*, 2000) espressa rispettivamente a 2.6 -2.3 Å. I polipeptidi espressi del dominio VI includono gli amminoacidi Met-87/Ser-270, dalla subunità di 28 kDa del topo (Blanchard *et al.*, 1997) o amminoacidi His-84/Ser-266 dalla subunità 28 kDa del maiale (Lin *et al.*, 1997: espressa anche nel *Escherichia coli*).



Le strutture ottenute nei due studi sono essenzialmente identiche il polipeptide del dominio VI cristallizza, come un eterodimero con ogni monomero avente cinque  $\alpha$ -mano. Le strutture EF-1 (residui 108-119) e EF-2 (residui 152-163) erano accoppiate ed erano a conformazione “aperta” mentre la coppia EF-3/EF-4 (rispettivamente i residui 182-193 e i residui 217-228) era a conformazione chiusa. Studi recenti (Imajoh *et al.*, 1987; Nishimura and Goll., 1991) hanno identificato che le catene carbossiliche terminali dei domini IV e VI sono coinvolte nell’associazione non covalente delle subunità di 28 e di 80 kDa della calpaina (Hosfield *et al.*, 1999; Stobl *et al.*, 2000) e la struttura cristallografica della molecola di m-calpaina (Hosfield *et al.*, 1999; Stobl *et al.*, 2000) ha mostrato che le strutture 5EF-hand dei domini IV e VI sono responsabili di questa associazione (almeno per la m-calpaina). Né la rimozione dei residui 22 –25 dal dominio VI espresso, né il quinto EF-hand coppia e l’ottava alfa elica, ostacolano la formazione dell’eterodimero (Elce *et al.*, 1997; Minami *et al.*, 1988). Le interazioni tra monomeri del dominio VI nella struttura cristallografica sono principalmente idrofobiche e coinvolgono Ile-254, Val256, Ile-258, e l’interazione della Trp-261, Leu-262, Leu-264; Met-266, e Tyr-267 su un primo polipeptide con Phe-243, Phe-240, Met-239, Leu-236 sul secondo polipeptide.

È interessante notare che alcuni residui con solo alcune sostituzioni conservative sono presenti in corrispondenza della catena carbossilica terminale del dominio IV della subunità di 80 kDa sia della  $\mu$  che della m-calpaina (table 2). Infatti questi residui sono altamente conservati nelle calpaine che sono state sequenziale fin ora (table 2) mostrando la loro importanza nell’associazione delle subunità di 28-80 kDa sia nella  $\mu$  che nella m-calpaina.

I siti Ef1, -Ef-2, Ef-3 contengono tutti un atomo di calcio quando la cristallizzazione viene effettuata a bassa concentrazione di calcio (1mM; Blanchard *et al.*, 1997), mentre il sito Ef-4 contiene un atomo di calcio quando la cristallizzazione viene effettuata ad alta concentrazione di calcio (20 mM) Lin *et al.*, 1997 o (200 mM) Blanchard *et al.*, 1997. Inoltre l'atomo di calcio nel sito Ef-4 non è localizzato sul cappio della Ef-hand ma piuttosto alla catena carbossilica -terminale del cappio vicino al NH<sub>2</sub> -terminale della settima alfa-elica in questo dominio. Cristalli immersi nell' itterbio sono risultati al posto dell' atomo di calcio nel sito Ef-4, supportando il suggerimento che questo sito lega il calcio con un affinità non così alta come fanno i siti (Blanchard *et al.*, 1997) Ef-1 Ef-2 ed Ef-3.

La comparsa delle strutture ottenute in presenza di (calcio in Ef-1 , Ef-2 ed Ef-3 ) o in assenza di calcio mostrano che i cambiamenti strutturali calcio-indotti nei cristalli del dominio VI sono molto piccoli. I più grandi cambiamenti strutturali calcio-indotti avvengono nella regione Ef-1 della molecola (residui 98-11 Blanchard *et al.*, 1997).

Per motivi che attualmente sono ancora poco chiari, la stabilità dell'eterodimero della m-calpaina è ridotta quando la subunità di 28-kDa della molecola espressa è tagliata al residuo 115 (rimovendo EF-1 mano); possibilmente, la rimozione di questa regione del polipeptide del dominio VI altera il piegamento del restante polipeptide.

Conseguentemente le strutture cristallografiche del dominio VI suggeriscono che il legame del calcio ai siti Ef-1, Ef-2, Ef-3 in questo dominio comporta solo un piccolo cambiamento strutturale alla regione Ef-1.

Se il calcio che si lega ai siti EF-1, EF-2, EF-3 nel dominio IV comporta un simile esempio di cambiamento strutturale e se il calcio

legante ai domini IV e VI è l'innescò per l'attività proteolitica calcio – indotto delle calpaine, allora i piccoli cambiamenti strutturali nella regione NH<sub>2</sub> terminale del dominio IV vengono trasmessi dal dominio III al dominio catalitico II .

Un inibitore delle calpaine che non si lega al sito attivo e che ha un inibizione costante (ki) di 0.3 µM (un alfa-mercatoacrilato derivato) che si lega a un pacchetto idrofobico situato tra le eliche B e D ( seconda e quarta alfa-elica).

L'inibitore legante ha causato minimi cambiamenti di conformazione nella struttura cristallografica di questo dominio (Lin *et al.*, 1997). È possibile che il legame dell'inibitore "blocchi " il dominio VI (e dominio IV) in una struttura che comporta piccoli cambiamenti strutturali nella regione NH<sub>2</sub> terminale di questo dominio e per questo previene la trasmissione ed amplificazione di questo segnale al resto del molecola.

Ai raggi X la struttura cristallografica della m-calpaina del ratto (Hosfield *et al.*, 1999) o dell'essere umano (Strobl *et al.*, 2000) espressa nell'E. coli (Hosfield *et al.*, 1999) o in un sistema di espressione di baculovirus (Strobl *et al.*, 2000) è stata risolta rispettivamente a 2.6 o 2.3 Å. Le due strutture calcio – libere sono essenzialmente identiche.

Tentativi per ottenere la struttura cristallografica della µ-calpaina non hanno avuto ancora successo, sebbene, la similitudine nella sequenza aminoacidica suggerisce che le due strutture sono simili, e la struttura della  $\tilde{\square}$ calpaina è stata modellata sulla base di queste similitudini (Reverter *et al.*, 2001). La m-calpaina è una molecola allungata con dimensioni di circa 100 60 50 Å. Le misure idrodinamiche hanno indicato repentinamente che le molecole della calpaina sono

ellissoidali (Edmunds *et al.*, 1991), ma le stime idrodinamiche di 20\*76 Å sono più piccole di quelle ottenute dalla struttura ai raggi X.

La struttura cristallografica suggerisce che la subunità di 80 kDa della m-calpaina ha sei "domini" (o, come precedentemente discusso, quattro domini, con una sequenza terminale NH<sub>2</sub> e un linker) piuttosto che i quattro domini predetti dalla sequenza aminoacidica. Il dominio cristallografico I (sequenza NH<sub>2</sub> terminale) è breve,

19 amminoacidi, e messo in contatto col dominio VI ma non con alcuna altra parte della molecola di calpaina.

Il dominio II (dominio catalitico) nella struttura cristallografica è diviso in due domini, il dominio IIa e il dominio IIb che contengono rispettivamente i residui di Cys ed i residui di His/Asn, che costituiscono la triade catalitica delle calpaine.

Il dominio cristallografico III ha una sequenza aminoacidica più breve rispetto al dominio II con un'estremità legata a 18 amminoacidi che formano "un linker" con il dominio IV. La struttura del dominio IV è molto simile alle strutture del dominio VI (Blanchard *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997); infatti, la struttura del dominio della m-calpaina dell'essere umano assomiglia alla struttura calcio-legante del dominio VI molto più strettamente rispetto alla struttura del calcio-libera del dominio VI (Strobl *et al.*, 2000).

La struttura cristallografica della m-calpaina conduce a una serie di importanti conclusioni (queste conclusioni si riferiscono rigorosamente solo alla forma di calcio libero della m-calpaina):

1) Il sito attivo, non è stericamente bloccato dal dominio I (NH<sub>2</sub> - terminale, dominio con 18 amminoacidi) come è stato ampiamente sostenuto. Quindi, la rimozione del dominio I mediante autolisi non fa attivare un proenzima mediante la rimozione di un peptide che blocca

l'accesso al sito attivo come accade nell'attivazione autolitica di altri proenzimi

2) La struttura dell'enzima calcio-libero mostra che l'enzima è cataliticamente inattivo perché il sito attivo della Cys è lontano 10.5 Å dai residui di His e Asn, una distanza molto grande anche per permettere la formazione di un complesso cataliticamente funzionale. Quindi il calcio deve indurre un cambiamento di conformazione nella m-calpaina che riduce la distanza da 10.5 – a circa 3.7 Å, così che la Cys-105 possa interagire efficacemente con His-262 ed Asn-286 per formare una triade catalitica. Questo cambiamento di conformazione probabilmente coinvolge una rotazione della Trp-288 nel dominio IIb. Studi iniziali hanno mostrato che la mutazione della Trp-288 ad un residuo di Tyr riduce l'attività proteolitica della calpaina mutata al 5.5% della sua attività prima della mutazione (Arthur *et al.*, 1995).

3) La scissione autolitica del dominio I a livello degli amminoacidi 19–20 si verifica ad un punto distante 40 Å dal sito catalitico nell'enzima calcio-libero, quindi questa autolisi probabilmente non è un evento intramolecolare.

4) La struttura cristallografica della molecola di m-calpaina non si sviluppa in presenza di calcio, ma il minimo cambiamento conformazionale risultante dal legame calcio - dominio VI suggerisce che “l'interruttore del calcio” per l'inizio dell'attività proteolitica può coinvolgere alcuni siti calcio-legante ai domini IV e/o VI, domini definiti calmodulino - simili.

Un gruppo di residui acidi Glu-392, Glu-393, Glu-394, Asp-395, Glu-396, Asp-397, Glu-398, Glu-399 e Glu-401, sono altamente conservati nelle calpaine, e alcuni di questi residui formano ponti di sale con Lys-226, Lys-230, Lys-234 e Lys- 354. Lys-355, Lys-357 nella

struttura cristallografica della m-calpaina. Il calcio distrugge questi ponti di sale, e questa distruzione può permettere al dominio IIb di muoversi verso il dominio IIa giungendo alla formazione della triade catalitica (Strobl *et al.*, 2000).

Anche se questo meccanismo elettrostatico “interruttore” può avere un importante ruolo nell’attività catalitica calcio-indotta delle calpaine (Hosfield *et al.*, 1999) studi recenti hanno mostrato che il dominio IIa/IIb espresso dalla  $\mu$ -calpaina può legare ogni atomo di calcio in un peptide doppio e che questo legame induce a un cambiamento di conformazione che unisce i residui catalitici di ogni altro dominio nel dominio IIa/IIb espresso con 3.7 Å. Quindi la minima parte di calcio-interruttore per attivare le calpaine può essere presente nel dominio catalitico.

In assenza di informazioni strutturali sulle m e  $\mu$ -calpaine in presenza di calcio, la ristretta idrolisi proteolitica con la tripsina o con chimotripsina è stata usata per confrontare le strutture del completo eterodimero delle molecole di calpaina in presenza o in assenza di calcio in soluzione (Moldoveanu *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2003). (Moldoveanu *et al.*, 2001) usano una m-calpaina espressa che ha il sito attivo Cys mutato a Ser per prevenire l’autolisi in presenza di calcio, mentre Thompson ed altri (Thompson *et al.*, 2003) usano preparazioni purificate sia della m-calpaina e della  $\mu$ -calpaina e sodio tetrionato ossidato (Kapprell *et al.*, 1989) per inattivare reversibilmente le calpaine e prevenire la loro autolisi in presenza di calcio. I due differenti studi producono risultati simili:

1) Sia la digestione della tripsina o chimotripsina in assenza di calcio per periodi così lunghi come 120 minuti produce un numero limitato di frammenti del polipeptide, suggerendo che sia le molecole di  $\mu$ -calpaina e m-calpaina hanno una struttura compatta che limita il

numero dei legami del peptide accessibile per gli enzimi proteolitici in assenza di calcio. Inoltre, i frammenti proteolitici simili sono stati prodotti da queste due proteasi, che differiscono nella specificità dei sottositi.

Sia la tripsina che la chimotripsina velocemente fendono entrambe le calpaine a una regione vicina alla catena carbossilica terminale del dominio II o IIb nella struttura cristallografica (residui 245 o 266 nella  $\mu$ -calpaina; residuo 265 nella m-calpaina) e ad alcuni siti nel dominio III (residui 363 o 472 nella  $\mu$ -calpaina; i residui 383, 400 e 503 nella m-calpaina). Il dominio I è resistente alla digestione della tripsina per più di 120 minuti in assenza del calcio, anche se la chimotripsina rimuove i piccoli segmenti (6 amminoacidi dalla  $\mu$ -calpaina; 9 amminoacidi dalla m-calpaina) dalla sequenza NH<sub>2</sub> terminale del dominio I; il resto del dominio I e del dominio II è resistente alla fenditura tritica o chimotritica per 120 minuti, suggerendo che questa parte della molecola (dominio IIa mostrato nella struttura cristallografica) è in conformazione stabile in assenza di calcio.

2) Le regioni C-terminale del dominio III e di tutto il dominio IV in entrambe le calpaine ( $\mu$ -e m calpaina) sono resistenti anche alla degradazione proteolitica, suggerendo che queste regioni della molecola di calpaina sono anche in una conformazione compatta in assenza di calcio.

3) Sia il trattamento tritico o chimotritico ha diviso la subunità di 28-kDa della  $\mu$ - calpaina ai residui 59 –61 e 85 –88, in 10-20 minuti, lasciando un frammento di 24-kDa o 20-kDa che non è stato degradato per 120 minuti.

4) Il modello della digestione proteolitica della  $\mu$ -calpaina e m-calpaina ad opera della tripsina o chimotripsina cambia

significativamente in presenza di 1mM di calcio, un catione che non fa indirettamente effetto sull'attività della tripsina e della chimotripsina. Entrambe le calpaine ( $\mu$ -calpaina, m-calpaina) sono state rapidamente degradate in 5 minuti di incubazione da entrambe la tripsina e la chimotripsina piccoli polipeptidi. Soltanto i domini IV e V restano dopo 30 minuti di digestione in presenza di calcio. Effettivamente i frammenti proteolitici della subunità 28-kDa sono identici sebbene la digestione proteolitica venga effettuata in assenza o presenza di calcio.

La digestione chimotriptica sia nella m-calpaina che nella  $\mu$ -calpaina in presenza di calcio comporta soltanto una maggiore degradazione prodotta dalla subunità di 80-kDa; la sequenza NH<sub>2</sub> terminale di questo frammento ha inizio al residuo 515 ( $\mu$ -calpaina) o 503 (m-calpaina). Di conseguenza, il calcio alla concentrazione di 1 mM causa un sostanziale cambiamento nella conformazione delle molecole di calpaina e la "apre" per renderla più suscettibile alla degradazione proteolitica. Soltanto le conformazioni dei domini IV e VI sembrano non essere significamene alterate dal calcio, una conclusione che è stata raggiunta negli studi cristallografici del dominio VI cristallografici effettuati (Blanchard *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997).

In conclusione, attualmente la prova evidente mostra che il calcio si lega a moltissimi siti sulle molecole sia della m-calpaina che della  $\mu$ -calpaina e che non tutti questi siti sono nei domini IV e VI, i domini penta EF- mano (calmodulina - simile).

Poiché il calcio che si lega al dominio VI (attestazione cristallografica) ed al dominio IV (prova dalla limitata proteolisi) causa solo molti piccoli cambiamenti di conformazione in questi domini, sembra probabile che il calcio che si lega alle regioni in aggiunta a questi due domini è coinvolto nella "coda" che dà inizio all'attività proteolitica



nelle calpaine. È chiaro che il calcio che si lega ad entrambe le calpaine  $\mu$ - ed  $m$ - causa significativi cambiamenti di conformazione, questi cambiamenti implicano una perdita o una parziale apertura del dominio II (IIa ,IIb) e della parte NH<sub>2</sub>-terminale del dominio III.

***Altri membri della famiglia delle calpaine: molecole simili alla calpaina***

Le calpaine costituiscono una famiglia di enzimi e sono suddivise in calpaine propriamente dette e molecole che hanno solo una certa omologia con le calpaine definite “*Calpaine-simili*”. Le calpaine propriamente dette sono suddivise in  $\mu$ - e  $m$ -calpaina e questo termine è stato utilizzato per la prima volta nel 1989 da Cong et al.

Per quanto riguarda le calpaine-simili negli ultimi 13 anni, tramite la clonazione e il sequenziamento del DNA, si è arrivati all’identificazione di un certo numero di geni che codificano per queste molecole simili alle calpaine in organismi differenti o in tessuti specifici.

Solo le proteine espresse da una calpaina della *Drosophila* (Pintér and Friedrich, 1988; Pintér *et al.*, 1992) e da *Schistosoma mansoni*, un parassita del tratto portomesenterico degli esseri umani (Siddiqui *et al.*, 1993) non sono state isolate dai tessuti e quindi si sa pochissimo sulle loro proprietà catalitiche.

Recentemente sono state determinate le sequenze genomiche del DNA per un certo numero di organismi quali *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997), *S. cerevisiae* (Clayton *et al.*, 1997; Goffeau *et al.*, 1996), *Drosophila* (Adams. *et al.*, 2000), e essere umano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Tuttavia è difficile determinare quante sequenze codificanti ci sono e la loro omologia alle calpaine per ogni organismo.

Dear and Boehm, (2001) analizzarono la sequenza del genoma U-hand mostrando che ci sono 14 geni della grande subunità della calpaina 80 KDa.

Nella ricerca della sequenza del DNA delle calpaine-simili, è importante dare una definizione di cosa siano queste molecole e per quelle che non sono state isolate nella forma di proteina e che possono avere sequenza aminoacidica simile/identica alle calpaine ubiquitarie  $\mu$  e  $m$ .

Il dominio II delle calpaine ubiquitarie, per esempio, è quello catalitico e anche se contiene Cys, His e Asn, caratteristiche di una proteasi cisteinica, ha soltanto un'omologia di sequenza marginale alla papaina o ad altre famiglie di proteasi cisteiniche. Di conseguenza, le calpaine sono state raggruppate in una classe di peptidasi cisteiniche con il codice di CLAN CA, famiglia C2, separate dalle altre proteasi cisteiniche (Barrett *et al.*, 1998).

Anche se l'omologia di sequenza con il dominio II è usata come test per verificare l'appartenenza di un membro alla famiglia delle calpaine, è necessario scegliere quanto deve essere il livello di identità/omologia di sequenza con le calpaine ubiquitarie per identificare una molecola come membro della famiglia delle calpaine.

Recentemente, Wilson *et al.*, (2000) hanno suggerito che la percentuale delle proteine con lo stesso codice di categoria di funzione, diminuisce rapidamente quando l'identità di sequenza scende al di sotto del 35%. Usando l'omologia di sequenza con il dominio II, e come criterio di appartenenza un valore di identità <22,5% sono state identificate 14 Calpaine-simili nei *Mammiferi*, 4 nella *Drosophila*, 12 nel *C. elegans*, 2 nei *Lieviti/Fungi*, 5 nell'organismo unicellulare di

*Trypanosoma brucei* e una calpaina transmembrana in una varietà di piante (Sorimachi and Suzuki, 2001).

I geni di queste 38 calpaine-simili hanno proprietà ampiamente fuori dell'omologia del dominio II e possono essere raggruppate in due gruppi di 11 calpaine "Tipiche" (definite come quelle calpaine che hanno la struttura di dominio simile a quella della grande subunità 80Kda della  $\mu$ -o m-calpaina, comprese le sequenze EF-hand del dominio IV ) e in 27 calpaine "Atipiche" che possono essere ulteriormente suddivise in 6 gruppi.

Le calpaine *Atipiche* non hanno le sequenze Calmodulina-simile e neanche quella delle EF-hand nel dominio IV (alcune addirittura difettano del dominio IV) e quindi è poco chiaro se queste sono Ca<sup>2+</sup> dipendenti.

Sei delle calpaine *Atipiche* (5 geni in *T. brucei* e Calpaina 6) e una Calpaina *Tipica* in *Drosophila* difettano di uno o più residui di Cys, His, o di Asn al loro sito catalitico e quindi è probabile che non siano enzimi proteolitici. L'esistenza dei polipeptidi che possiedono i domini che hanno identità di sequenza del 33-37% al dominio II della  $\mu$ -calpaina, ma difettano di uno o più residui che costituiscono la triade catalitica delle calpaine, implica che questi polipeptidi delle calpaine-simili siano proteoliticamente inattivi e che le Calpaine hanno una funzione aggiunta a quella proteolitica. La sua natura però è ancora un mistero.

Per concludere, dovrebbe essere indicato esplicitamente che tutte le omologie di sequenze siano basate sull'omologia con la subunità da 80KDa (precisamente al dominio II/IIa e IIb) e che, con l'eccezione della calpaina di *Schistosoma*, si è spesso visto che le calpaine funzionino come singolo peptide più che come eterodimero. Questo presupposto non è stato dimostrato, tuttavia è possibile che ci sia la necessità di un

cofattore analogo alla piccola subunità da 28KDa della  $\mu$ - e m-Calpaina per l'attività delle Calpaine recentemente identificate.

Le proteine che hanno proprietà omologhe alle calpaine non sono ancora state individuate nei procarioti.

La proteasi proveniente da *Porphyromonas gingivalis* spiega alcune delle difficoltà incontrate quando si assegnano molecole alla famiglia delle calpaine sulla base di una sola sequenza aminoacidica cDNA-derivata. Anche se la sequenza predetta per l'enzima di *Porphyromonas gingivalis* ha il 53,1% di omologia (23,7% di identità) col dominio IIa/IIb della  $\mu$ -calpaina umana, il *P. gingivalis* ha sequenza quasi omologa a quella della papaina (22,5% di identità). La proteasi espressa non è inibita dalla leuptina, che è un inibitore della calpaina; ha il massimo dell'attività a 45 gradi, una temperatura alla quale la calpaina autolisa velocemente; degrada l'azcoll, un substrato collagene, che non è degradato da entrambe le calpaine ubiquitarie; e la proteasi espressa non è attivata da 15 mM Ca<sup>2+</sup> (*Bourgeau et al.*, 1992), sembra quindi improbabile che questo enzima sia un membro della famiglia della calpaine.

Recenti studi orientati nell'ordinare le sequenze genomiche hanno identificato una famiglia di geni transmembrana in *Arabidopsis thaliana* (*Theologis et al.*, 2000), in *Zea mays* (*Lid et al.*, 2002), ed in altre piante.

Si è visto inoltre che i polipeptidi espressi da questi geni hanno un ampio dominio transmembrana e un dominio intracellulare con omologia di sequenza con il dominio IIa/IIb della  $\mu$ - e m-calpaina. Inoltre, tutte le calpaine della pianta hanno un dominio III con sequenza omologa al dominio III delle calpaine ubiquitarie.

Una ricerca di tutti i dati disponibili ha indicato che tutte le piante hanno questo gene del dominio transmembrana e ne hanno una sola copia (Lid *et al.*, 2002). La funzione però resta ancora sconosciuta. Una proteasi Ca<sup>2+</sup>-dipendente isolata da *Arabidopsis thaliana* non è stata identificata con il Western blots da nessuno dei 5 anticorpi differenti dell'anticalpaina (Safadi *et al.*, 1997) ed è stata inibita più fortemente dalla pepstatina che dalla E-64 (Reddy *et al.*, 1994), mentre la pepstatina non ha effetto sulle calpaine (Wolfe *et al.*, 1989). Poiché non ci sono informazioni disponibili sulla sequenza dei polipeptidi studiati sia da Safadi *et al.*, (1997), che da Reddy. *et al.*, (1994), è poco chiaro con chi hanno omologia questi polipeptidi. Ci sono molti altri rapporti sull'attività proteolitica Ca<sup>2+</sup>-dipendente in piante quali *Allomyces arbuscula* Huber and Ojha, (1994); Ojha, (1989); Ojha *et al.*,(1999); Ojha and Favre, (1991); Ojha and Turian, (1985); Ojha and Fallace, (1988) o sulle alghe *Chara australis* (Moriaysu and Tazakawa, 1987).

Finora, nessuna di queste proteasi cisteiniche Ca<sup>2+</sup>dipendenti della pianta è stata clonata ed ordinata in sequenza e le loro proprietà biochimiche differiscono molto da quelle delle calpaine.

La proteasi delle alghe è stata analizzata soltanto negli estratti delle cellule e la relativa natura è sconosciuta. Due proteasi sono state purificate da *Allomyces arbuscula* (Ojha *et al.*,1999), una che fluisce a 0,07 millimetri (CPD I) e l'altra a 0,2 millimetri di NaCl (CDP II) simile al modello di eluizione delle calpaine ubiquitarie con colonne a scambio anionico. Il CDP I, tuttavia ha una massa molecolare di 39 KDa, mentre il CDP II è un dimero con subunità di 40 e 43 KDa che degrada rapidamente il collagene e lentamente la caseina (Ojha *et al.*, 1988), l'opposto del comportamento delle calpaine ubiquitarie. Inoltre il fosfatidilinositolo inibisce l'attività della proteasi dell'*Allomyces* (Ojha,

1989) mentre fa diminuire la concentrazione di Ca<sup>2+</sup> richiesta per l'attività delle calpaine (Saido *et al.*, 1991; Saido *et al.*, 1992).

Di conseguenza, attualmente è incerto se alcuni di questi sono membri della famiglia delle calpaine. Per saperlo si dovrà attendere i risultati relativi alla sequenza.

Un tentativo di isolare l'attività della calpaina da specie ricche in *actina*, come la pianta *Elodea densa*, è fallito non trovando alcuna attività simile a quelle delle calpaine nel 1989 da Wolfe *et al.*, 1989).

### ***Molecole calpaina-simile nei vertebrati.***

La prima notizia che il sistema delle calpaine contiene molecole in aggiunta alle ormai tre ben caratterizzate proteine,  $\mu$ -calpaina, m-calpaina e calpastatina giunge nel 1989 quando Sorimachi *et al.*, descrivono la presenza nel muscolo di un mRNA che codifica molecole aventi il 51/53% di sequenza omologa alle subunità di 80 kDa delle calpaine. Oltre a queste molecole sono stati identificati nei vertebrati 12 differenti m-RNAs o 12 geni che codificano sequenze omologhe alle subunità delle calpaine. Per questo motivo sarà necessario isolare queste “nuove” calpaine sotto forma di proteine, la maggior parte di queste sono state identificate solo come sequenze di DNA, e definire le loro proprietà catalitiche e quelle generali prima che la natura della famiglia delle calpaine sia pienamente compresa. Cinque delle calpaine putative che sono state identificate sin dal 1989 sembrano costituire uno specifico tessuto poiché i loro m-RNAs sono espressi principalmente nello scheletro (calpaina 3, p94; Sorimachi *et al.*, 1989) o nelle cellule del muscolo liscio (calpaina 8, calpaina 8b; Sorimachi *et al.*, 1993) nella placenta ( calpaina 6, Dear *et al.*, 1997) nei testicoli ( calpaina 11, Dear and Boehm 2001; Dear *et al.*, 2000) nella pelle durante i primi 16 giorni

dopo la nascita (Capn 12, Dear *et al.*, 2000) o nei testicoli e polmone (calpaina 13, Dear *et al.*, 2001). L'espressione del tessuto è largamente diffusa per la calpaina 5 (Melloni *et al.*, 1998), la calpaina 7 (Futai *et al.*, 2001), la calpaina 9 (Lee *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000) e la calpaina 10 (Horikawa *et al.*, 2000). L'mRNA della calpaina 14 non può essere rilevato in nessuno dei 76 tessuti esaminati (Dear *et al.*, 1999), e il significato del gene della calpaina 14 (Capn 14) è poco chiaro. La calpaina 6 è l'unica ad avere nella sequenza aminoacidica al sito attivo un solo residuo di Lis al posto del residuo di Cys, tale da non definirla un enzima proteolitico. La calpaina 5 dei vertebrati è analoga alla calpaina TRA3 nel *C.elegans*, la calpaina vertebrata 7 (Frantz *et al.*, 1999) dei vertebrati è analoga alla calpaina PAIb nel fungo *Aspergillus nidulans*, e la calpaina 15 dei vertebrati è analoga alla calpaina SOL nella *Drosophyla*, oltre alle sequenze omologhe, si conosce molto poco delle proprietà di queste apparenti calpaine. Delle sequenze DNA della calpaina-simile 14 sono state identificate nei mammiferi solo tre, m-calpaina, m-calpaina e Lp82 (calpaina 3b, sono state isolate in forma di proteina). La calpaina 9 è stata espressa in una forma proteoliticamente attiva in un sistema di espressione del baculovirus (Lee *et al.*, 1999). Esso è necessario per coesprimere la subunità di 80 kDa della calpaina 9 e la piccola subunità di 28 kDa della  $\mu$ e della m-calpaina per ottenere una forma proteoliticamente attiva della calpaina 9. L'eterodimero della calpaina 9 richiede 125  $\mu$ M di calcio per ottenere al massimo il 50 % dell'attività proteolitica, la sua attività proteolitica è inibita dalla calpastatina e dal E-64, la sua specifica attività è inferiore del 5% della specifica attività della  $\mu$  e della m-calpaina (Lee *et al.*, 1999) L'espressione del gene Capn9 nello stomaco è soppresso nelle cellule del

cancro gastrico, e la deficienza controsenso indotta della calpaina 9 comporta la trasformazione cellulare dei fibroblasti oncogeni del topo NIH3T3 (Liu *et al.*, 2000). Quindi, la calpaina 9 può avere le proprietà antitumorigeniche. Lp82 (calpaina 3b) è una variante splice del gene Capn3 che è stato prodotto dalla delezione degli esoni 6,15, e 16 che codificano le due uniche sequenze di inserzione nella calpaina 3 a e dall'uso di un differente esone 1 (Ma *et al.*, 1998) che risulta in un NH<sub>2</sub> terminale differente dalla calpaina 3a Lp82 (calpaina 3b) si trova esclusivamente negli occhi in un numero di specie d'animali ma non nell'essere umano (Ma *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1999).

Lp82 è parzialmente purificata dalla cromatografia a scambio anionico e sembra avere attività proteolitica calcio-dipendente nei zimogrammi della cisteina (Ma *et al.*, 1998). Lp82 sembra essere proteoliticamente attiva come una singola catena peptidica, tuttavia questo non è stato stabilito definitivamente a causa dell'inabilità a purificare completamente l'enzima. L'attività proteolitica della Lp82 è poco inibita dalla calpastatina (Nakamura *et al.*, 1999) ma è completamente inibita dagli inibitori delle proteasi della cisteina come E-64, suggerendo che non tutte le calpaine recentemente identificate possono essere oggetto dell'inibizione della calpastatina come sono la  $\mu$  e m-calpaina. La debole attività di inibizione della Lp82 ad opera della calpastatina può essere riferita al debole legame della calpastatina al polipeptide che manca della piccola subunità e che quindi non ha il terzo sito legante della calpastatina.



## **MATERIALI E METODI**

Lo studio è stato condotto su 14 struzzi maschi clinicamente sani di Razza Red Neck del peso di 100 Kg (+/- 10 Kg) dell'età di 14 mesi provenienti da una Azienda del potentino.

Le indagini sono state effettuate sui seguenti muscoli: iliotibialis lateralis pars preacetabularis, femorotibialis medius, fibularis longus.

I muscoli oggetto di studio sono stati sezionati seguendo gli standard della metodologia anatomica.

I campioni studiati sono stati prelevati da ogni muscolo a quattro tempi differenti dopo la macellazione (tempo 0, 2 giorni, 4 giorni e 6 giorni post-mortem).

A tempo zero i campioni oggetto d'analisi sono stati prelevati congelati rapidamente in azoto liquido (-196°C) al fine di bloccare l'attività enzimatica e conservati a - 80°C fino alle successive analisi istochimiche immunoistochimiche e di valutazione dell'attività enzimatica. Dopo 2, 4, e 6 giorni post-mortem dalle carcasse refrigerate (4°C) sono stati effettuati ulteriori prelievi al fine di valutare la presenza e l'attività delle calpaine durante la fase post-mortem.

### ***Istologia***

Sezioni trasversali di circa 8µ ottenute utilizzando un criostato sono state colorate utilizzando la metodica istologica ematossilina/eosina al fine di verificare l'aspetto morfologico dei tessuti (integrità delle fibre, alterazioni, patologie).

- Le sezioni, precedentemente conservate in frigo su appositi porta-vestrini e ricoperti con carta argentata per evitare la disidratazione,

vengono lasciati a temperatura ambiente per 20 minuti prima di procedere alla tecnica della colorazione;

- Trascorsi i 10 minuti, i vetrini vengono immersi in ematossilina per altri 10 minuti;
- Sciacquo in acqua di fonte per 10 minuti per il viraggio e per eliminare colore in eccesso;
- Risciacquo in acqua distillata per eliminare eventuale presenza di calcare;
- Immersione in eosina per 2 minuti;
- Risciacquo in acqua distillata;
- Disidratazione con rapidi passaggi in una serie crescente di alcool a 50°C- 80°C- 95°C- alcool denaturato- alcool assoluto;
- Passaggi in xilolo (per eliminare le eventuali impurità e rendere così le sezioni più chiare);
- I vetrini vengono montati con un vetrino coprioggetto, utilizzando una goccia di EUKIT un collante istologico;
- Osservazione al microscopio.

### ***Istochimica***

L'identificazione dei tipi di fibra è stata effettuata su sezioni trasversali di 8µ. La tipizzazione istochimica utilizzata permette di valutare l'attività ATPasica della miosina e succinico-deidrogenasica, consta delle seguenti fasi:

- pre - incubazione acida in una soluzione di CaCl<sub>2</sub> 0,18M a pH 4,2 acido acetico acetato di potassio per 10' per disattivare l'ATPasi presente nelle fibre acido-labili;

- incubazione con una soluzione tampone a pH 7,8 costituita da CaCl<sub>2</sub> 0,18M e Tris (triidrossimetilaminometano);
- incubazione in NBT (nitroblutetrazolio) a 37°C per 40', per rilevare l'attività Succinicodeidrogenasica [la succinico deidrogenasi è una flavo-proteina che funge da trasportatore di elettroni dei gruppi prostetici, (il FAD è una parte di tale enzima)] di ciascun tipo di fibra (indice del tipo di metabolismo: glicolitico o ossidativo); tale attività è assente nelle fibre di tipo FG, intermedia nelle FOG; ed elevata in quelle SO;
- incubazione con una soluzione a base di ATP di sodio a pH 9,4 a 37°C per 50' costituita da Sigma 221, CaCl<sub>2</sub> 0,18M, KCl, e ATP; tale soluzione rappresenta il substrato specifico per evidenziare l'enzima ATPasi localizzato nella testa della miosina;
- tre lavaggi, ognuno di circa 30'' in una soluzione costituita da CaCl<sub>2</sub> e acqua distillata; in una soluzione costituita da CaCl<sub>2</sub> e acqua distillata; tale soluzione fornisce ioni calcio che reagiscono con il fosfato inorganico, proveniente dall'attività dell'ATPasi, formando il fosfato di calcio insolubile;
- ulteriore incubazione per 3', in una soluzione contenente CoCl<sub>2</sub> e acqua distillata, con formazione di fosfato di cobalto;
- quattro lavaggi, ognuno per una tempo di circa 30'', in una soluzione tampone a pH 9,4 a base di Sigma 221 e acqua distillata
- passaggio rapido in una soluzione a base di solfuro d'ammonio con formazione del precipitato nero del solfuro di cobalto che, localizzandosi sui siti cellulari permette di evidenziarli;
- montaggio dei vetrini con gelatina glicerinata.

Al termine della colorazione le fibre FG appariranno di colore chiaro per l'assenza dell'attività succinicodeidrogenasica e la presenza di

quella ATPasica, quelle di tipo SO saranno di colore scuro per la presenza sia dell'una che dell'altra attività, infine quelle di tipo FOG avranno una colorazione intermedia alle precedenti, essendo dotate di intensa attività succinicodeidrogenasica e parziale attività ATPasica.

Sulle sezioni così preparate, è stata effettuata l'analisi morfometrica L'area, il perimetro, il diametro minimo ed il diametro massimo sono stati misurati utilizzando un microscopio binoculare collegato ad un sistema di analisi di immagine semiautomatico (Kontron, KS 300, Zeiss). Per ogni campione sono state misurate circa 200 fibre, derivanti da un numero di campi casuali compreso tra due e otto.

### *Analisi statistica*

L'analisi statistica dei dati rilevati è stata effettuata utilizzando un modello di analisi della varianza (Proc GLM; SAS Institute, 1992) in cui i fattori sono stati considerati fissi e l'effetto di ciascuno è espresso come deviazione dalla media  $\mu$ . Per i parametri istologici il modello è stato il seguente:

$$y_{ijk} = \mu + \mu_i + \tau_j + (\mu * \tau)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$y_{ijk}$  = il valore di kma osservazione relativa jmo tipo di fibra dell'imo muscolo;

$\mu_i$  = effetto fisso comune a tutte le osservazioni relative al imo muscolo (i=1,2,3);

$\tau_j$  = effetto fisso comune a tutte le osservazioni relativo al jmo tipo di fibra (k=1,2);

$(\mu * \tau)_{ij}$  = effetto fisso comune a tutte le osservazioni relative all'interazione del imo muscolo con il jmo tipo di fibra;

$\epsilon_{ijkl}$  = errore residuo casuale e/o effetti non spiegati.

La significatività delle differenze tra i valori medi è stata testata con il t di Student.

### ***Immunoistochimica***

La colorazione immunoistochimica è stata effettuata utilizzando il sistema Universal DakoCytomation Labelled Streptavidin-Biotin2 System, Horseradish Peroxidase (LSAB2 System, HRP).

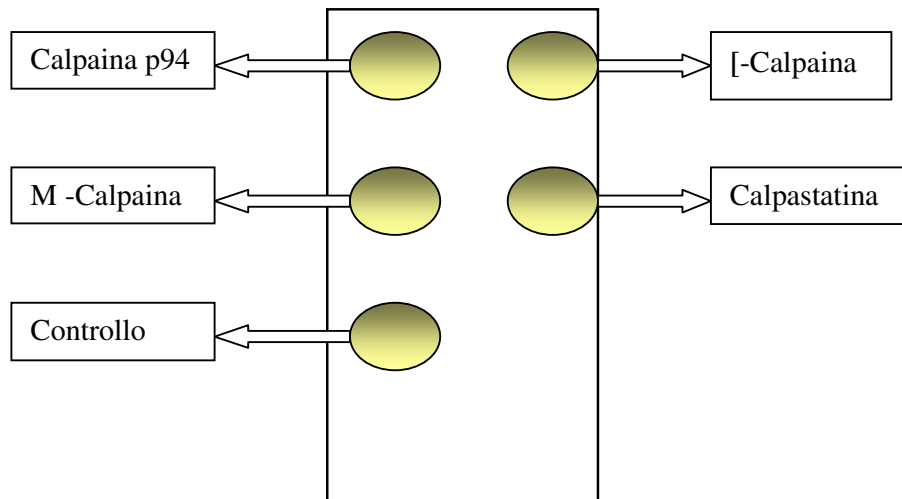
- Le sezioni, precedentemente conservate in frigo su appositi porta vetrini e ricoperti con carta argentata per evitare la disidratazione, sono state esposte a temperatura ambiente per 20 minuti.
- Ha fatto seguito la fissazione in acetone, conservato a 4 °C, disponendo i vetrini faccia a faccia in Coplin Giar (piccoli vasi) e conservati in frigo per 4 minuti. Nel frattempo sono state preparate le camere umide (capsule petri), internamente marginate con carta bibula e inumidite con soluzione fisiologica.
- Trascorsi 4 minuti i vetrini sono stati immersi per 5 minuti in PBS (phosphate buffered saline) precedentemente preparato, di cui si è misurato il pH (7.2-7.4). I vetrini singolarmente sono stati asciugati con carta bibula, per cerchiare le fette con la PAP PEN al fine di evitare che l'anticorpo trasbordi e non agisca sui preparati.
- Successivamente i vetrini, depositi nelle camere umide sono stati trattati con Perossido di Idrogeno e Metanolo per 30 minuti per consentire il blocco delle perossidasi endogene, (la soluzione è costituita da 4 parti di Perossido di Idrogeno al 3% e una parte di alcol metilico). E' stata inoculata una goccia per ogni sezione.
- Trascorsi i 30 minuti, i vetrini sono stati lavati in PBS, per 5 minuti.

- Ha fatto seguito l'inoculo degli anticorpi primari.

Gli anticorpi primari monoclonali utilizzati per il nostro lavoro sono stati:

- 1) Anti-Calpaina 94: Anti-Calpain-94 (DOMAIN I) (SIGMA). La subunità maggiore è stata rilevata nel coniglio usando un peptide sintetico corrispondente al dominio I della subunità maggiore della p94 umana (Rabbit-anti-human).
- 2) Anti-m-Calpaina: Anti-m-Calpain (DOMAIN IV) (SIGMA). E' stata rilevata nel coniglio usando un peptide sintetico corrispondente al dominio IV della subunità maggiore della [-calpaina umana (Rabbit-anti-human)
- 3) Anti-m-Calpaina: Monoclonal anti-m-calpain (Domain III/IV) mouse IgG1 (SIGMA). Prodotta immunizzando un topo e purificando la m-calpaina dal muscolo scheletrico del bovino come immunogeno (Mouse-anti-bovine).
- 4) Anti-Calpastatina: Monoclonal anti-calpastatin antibody mouse IgG1 (SIGMA). Questo anticorpo è prodotto immunizzando un topo e purificando la calpastatina dal muscolo scheletrico del bovino come immunogeno (Mouse-anti-bovine).

Lo schema per l'inoculo degli anticorpi è riportato nel vetrino:



L'anticorpo è stato preparando utilizzando sia la diluizione di 1:100 (1 parte di anticorpo e 99 parti di diluente Dako, sia 1:200

L'anticorpo è stato preparato utilizzando sia la diluizione di 1:100 (1parte di anticorpo e 99 parti di diluente Dako) che 1:200(1 di anticorpo 199 di diluente).

I vetrini sono stati disposti nelle camere umide. Su ogni sezione, tranne sul controllo sono stati inoculati 50 µl di anticorpo primario. Il tutto è stato incubato nelle camere umide ricoperte di carta argentata per 2 ore.

- Trascorse le due ore, i vetrini sono stati lavati, mediante due passaggi di 5 minuti ognuno in PBS
- E' stato inoculato l'anticorpo secondario Dako Link giallo (DAKO LSHB + system HRP) su ciascuna sezione e lasciato agire per 20 minuti.
- Sono seguiti altri due passaggi in PBS sempre di 5 minuti ciascuno.
- Sui preparati è stata, dunque, inoculata la streptavidina Dako Link rosso e lasciata ad incubare per 15 minuti. La strepdavidina è servita per formare il legame con il cromogeno.
- I vetrini sono stati rilavati nuovamente in PBS (due passaggi da 5 minuti ognuno).
- Successivamente è stato aggiunto il cromogeno DAB Dako sulle sezioni per 5 minuti. (La diamminobenzidina DAB è stata preparata utilizzando 1 ml di diluente presente all'interno del Kit con una goccia di cromogeno e agitato).
- E' seguito un rapido lavaggio in acqua di fonte per 3 minuti per disattivare la reazione innescata dal cromogeno.

- E' stato effettuato un ulteriore lavaggio dei vetrini in acqua distillata per 3 minuti per allontanare il calcare.
- I vetrini sono stati immersi in ematossilina per 5 minuti per la colorazione nucleare.
- Ha fatto seguito un lavaggio con acqua di fonte per 5 minuti e poi con quella distillata per 3 minuti.
- Infine i vetrini sono stati disidratati nella serie crescente di alcoli e chiarificati in xilolo.

Ogni vetrino è stato montato con una goccia di EUKIT (collante istologico) con un vetrino coprioggetto

#### ***Valutazione dell'attività enzimatica***

Per valutare l'attività enzimatica i campioni sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. Per l'estrazione proteica, 300mg di tessuto sono stati omogeneizzati in 0,9 mL di buffer di estrazione "postrigor" usando un Polytron (Brinkman Instruments, Westbury,NY).

In seguito, i campioni sono stati centrifugati a 8800 g per 30 min, il sovranatante (contenente le proteine solubili) è stato raccolto e utilizzando il metodo Bradford (1976), è stato determinato il contenuto proteico. Gli estratti proteici sono stati immuno-precipitati con anticorpi anti- $\mu$ -calpaina ed anti-m-calpaina a 4°C. Il giorno dopo sono stati lavati con il buffer di lisi ed è stato effettuato il saggio nel seguente modo:

- il tampone Calpain-GLoTM congelato e la luciferina liofilizzata sono stati stabilizzati a temperatura ambiente prima dell'uso;
- la luciferina è stata ricostituita in bottiglia con l'aggiunta di un appropriato volume del tampone Calpain-GloTM (10ml).



- il substrato Suc-LLVY-GloTM è stato scongelato e stabilizzato a temperatura ambiente prima dell'uso;
- il reagente Calpain-GloTM è stato preparato aggiungendo il substrato Suc-LLVY-GloTM al reagente contenente la luciferina risospesa.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu$ l del substrato Suc-LLVY-GloTM a 10ml del reagente contenente la luciferina. Il tutto è stato miscelato per ottenere omogeneità;
- successivamente la soluzione è stata incubata per 30 min a temperatura ambiente e poi sono stati aggiunti 20  $\mu$ l di 1M CaCl<sub>2</sub> a 10 ml del reagente Calpain-GloTM per attivare la calpaina;
- Infine, si è proceduto alla lettura al luminometro che da un segnale luminoso proporzionale all'attività della calpaina presente.

#### ***Microscopia elettronica a trasmissione***

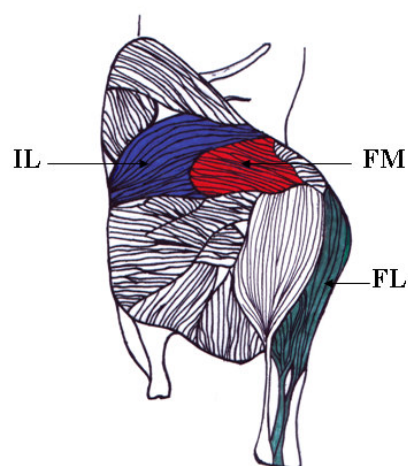
I muscoli oggetto di studio sono stati prelevati a tempo 0, a 2, 4, e 6 giorni post-mortem e sono stati fissati in gluteraldeide al 2,5 % in un tampone di cacolidato (0,1 M, pH 7.3) per 3 h a 4°C. I campioni sono stati successivamente lavati in una soluzione al 3% di saccarosio in un tampone cacolidato, e quindi dopo il fissaggio per 2 h con OsO<sub>4</sub> sono state colorate con acetato di uranile (4.5%). Ha fatto seguito una disidratazione con rapidi passaggi in una serie crescente di alcool, il lavaggio in ossido di propilene e l'inclusione in una resina epossidica (Epon 812). Sezioni trasversali di circa 1  $\mu$ m sono state ottenute utilizzando un ultramicrotomo, colorate con una soluzione di acetato di uranile e quindi visionate al microscopio elettronico a trasmissione.

## **RISULTATI**

I muscoli oggetto di studio sono stati sezionati seguendo gli standard della grossa anatomia e la nomenclatura utilizzata è quella indicata dalla Nomina Anatomica Avium. In figura 1 è possibile osservare una mezzana sinistra di struzzo, mentre la figura 2 descrive la disposizione generale dei muscoli superficiali.



**Fig. 1.** Mezzana sinistra di struzzo



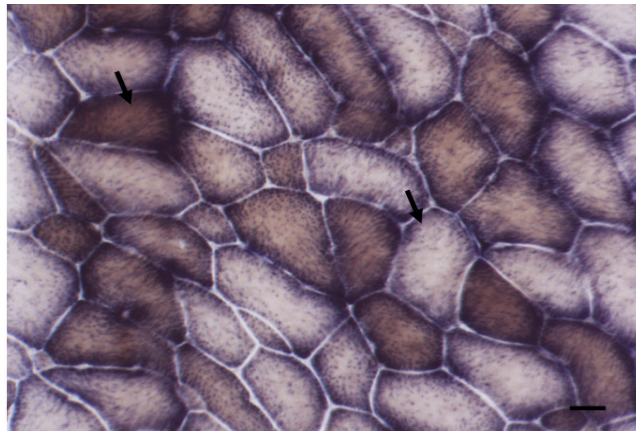
**Fig. 2.** *Struzzo Red Neck* disposizione generale dei muscoli superficiali FL: *M. Fibularis longus*; FM: *M. Femorotibialis medius*; IL: *M. Iliotibialis lateralis pars preacetabularis*

### ***Istochimica del muscolo***

I muscoli esaminati mostrano la presenza di due tipi di fibre: FOG, rosa, con moderata attività m-ATPasica ed intermedia attività ossidativa e SO, rosse, con bassa attività m-ATPasica ed alta attività ossidativa.

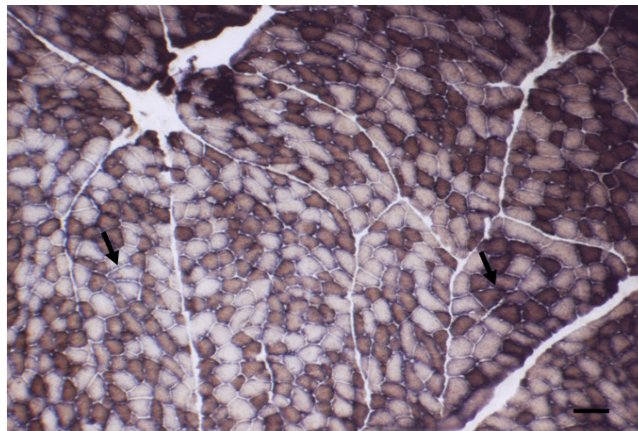
Le fibre FG sono assenti; fibre di questo tipo sono esclusivamente usate per la contrazione rapida, la loro assenza potrebbe essere attribuita ad una conversione in fibre di tipo FOG. Risultati simili sono stati ottenuti da Velotto e Crasto (2004), in uno studio effettuato su quattro differenti muscoli di struzzo di razza Blue Neck.

Il muscolo *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis* (fig. 3).si origina dall' ischio attraverso un aponeurosi e si inserisce cranio-lateralmente sul tibiatarso, tale muscolo presenta una percentuale più alta di fibre SO (56%) e più bassa di fibre FOG (44%)(Grafico 1)..



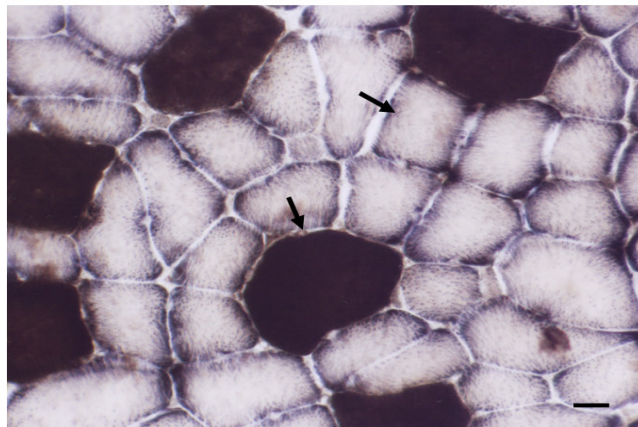
**Fig. 3** *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis* (160x) Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra le fibre SO (slow twitch-oxidative) e FOG (fast-twitch oxidative-glycolytic). Bar 62,5  $\mu$ m

Il muscolo *Femorotibialis medius*, (fig. 4) si origina dalla superficie caudale del femore e dalla superficie prossimo-laterale sul tronco del femore. Esso si inserisce sulla porzione prossimale del tibio-tarso attraverso un tendine. Tale muscolo presenta una percentuale più alta di fibre SO (58%) e più bassa di fibre FOG (42%)(Grafico 1)..



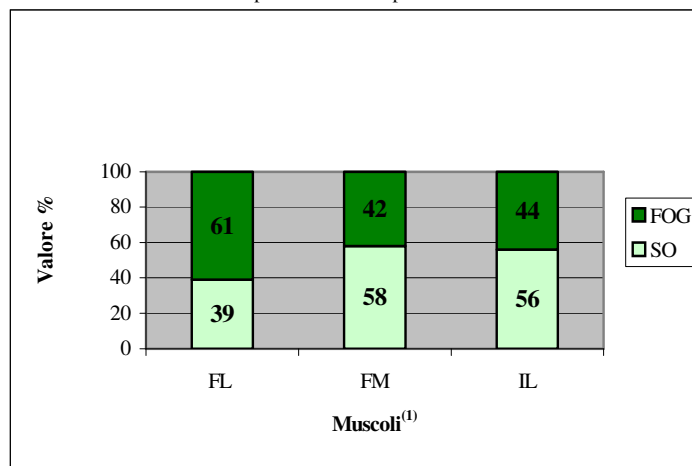
**Fig. 3 *Femorotibialis medius* (100x)** Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra le fibre SO (slow twitch-oxidative) e FOG (fast-twitch oxidative-glycolytic). Bar 100  $\mu$ m

Il muscolo *Fibularis longus* (fig. 5) si origina lateralmente sul rivestimento tendo-fasciale del ginocchio e sulla cresta cnemiale laterale del tibiotarso. Prossimalmente alla caviglia il tendine d'inserzione si divide in due tendini: Un tendine si inserisce sul tendine del muscolo flexor perforantus digiti III, l'altro forma un aponeurosis sulla cartilagine tibiale. Tale muscolo presenta una percentuale più alta di fibre FOG (61%) e più bassa di fibre SO (39%) (Grafico 1).



**Fig. 3** *Femrotibialis medius* (160x) Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra le fibre SO (slow twitch-oxidative) e FOG (fast-twitch oxidative-glycolytic). Bar 62,5  $\mu$ m

**Grafico 1.** Distribuzione percentuale dei tipi di fibra nei muscoli considerati



<sup>(1)</sup> FL: *Fibularis longus*; FM: *Femrotibialis medius*; IL: *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis*

I risultati dell'analisi della varianza mostrano interazioni significative tra muscolo e tipo di fibra (Tabella 1).

**Tabella 1.** Valore della F relativa ai parametri morfometrici delle fibre muscolari

Parametri	F <sup>(1)</sup>		
	Muscolo	Tipo di Fibra	Interazione muscolo*tipo di fibra
<b>Area</b>	183.5***	177.5***	26.3***
<b>Perimetro</b>	199.6***	213.2***	19.5***
<b>Diametro Minimo</b>	75.00***	146.3***	12.5***
<b>Diametro Massimo</b>	193.4***	161.2***	18.5***

<sup>(1)</sup>\*\*\*  $P < 0,001$

Le differenze tra il Femorotibialis medium e il Fibularis longus, in relazione all'area delle fibre sono del 9% per le fibre FOG (4572.55 vs. 4170.83  $P < 0.001$ ) è del 19% per le fibre SO (4136.6 vs. 3332.15  $P < 0.001$ ).

Le differenze tra il Femorotibialis medium e l'*Iliotibialis lateralis pars preacetabularis* sono del 29% per le fibre FOG (4572.55 vs. 3232.70,  $P < 0.001$ ) e del 24% per le fibre SO (3332.15 vs. 2536.50,  $P < 0.001$ ) (Tabella 2 e 3). Gli altri parametri morfometrici hanno mostrato andamento simile, in accordo con gli studi effettuati da Velotto e Crasto (2002) su quattro differenti muscoli dello struzzo di razza Blue Neck.

*Sistema Ca<sup>2+</sup>- dipendente Calpaine e Calpastatine*

**Tabella 2.** Valore medio (x) e coefficiente di variazione (c.v., %) dei parametri morfometrici dei tipi di fibre nei muscoli considerati

Muscolo	Tipo di Fibra			
	FOG		SO	
	x	c.v., %	x	c.v., %
	<b>Area/<math>\mu\text{m}^2</math></b>			
FL	4170.83	24	4136.6	35
FM	4572.55	27	3332.15	26
IL	3232.7	25	2536.5	33
	<b>Perimetro/<math>\mu\text{m}</math></b>			
FL	252.34	16	242.01	20
FM	325.11	16	225.28	20
IL	222.73	15	200.67	19
	<b>Diametro minimo/<math>\mu\text{m}</math></b>			
FL	60.31	19	57.85	25
FM	62.21	17	53.05	20
IL	55.05	18	49.59	20
	<b>Diametro massimo/<math>\mu\text{m}</math></b>			
FL	90.34	19	85.03	22
FM	96.6	18	79.05	22
IL	80.12	15	75.26	21

FL: *Fibularis longus*; FM: *Femorotibialis medius*; IL: *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis*

**Tabella 3.** Confronti tra i muscoli entro il tipo di fibra (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

Differenze	Tipo di fibra							
	FOG				SO			
	Area/ $\mu\text{m}^2$	Perimetro/ $\mu\text{m}$	Diametro/ $\mu\text{m}$		Area/ $\mu\text{m}^2$	Perimetro/ $\mu\text{m}$	Diametro/ $\mu\text{m}$	
			Minimo	Massimo			Minimo	Massimo
FL-FM	-401.72***	-12.77***	-1.9*	-6.26	804.45***	-16.73***	4.8***	5.98***
FM-IL	1339.85***	42.38***	7.16***	16.48***	795.65***	24.61***	3.46***	3.79***
FL-IL	938.13***	29.61***	5.26***	79.78***	1600.1***	41.34***	8.26***	9.77***

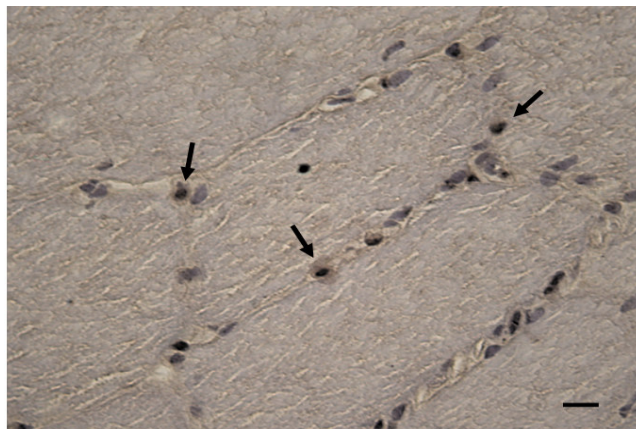
FL: *m. fibularis longus*; FM: *m. femorotibialis medius*; IL: *m. iliotibialis lateralis pars preacetabularis*

### ***Immunochimica del muscolo***

I risultati immunoistochimici hanno rivelato la presenza del sistema calpaina/calpastatina nei muscoli oggetto di studio.

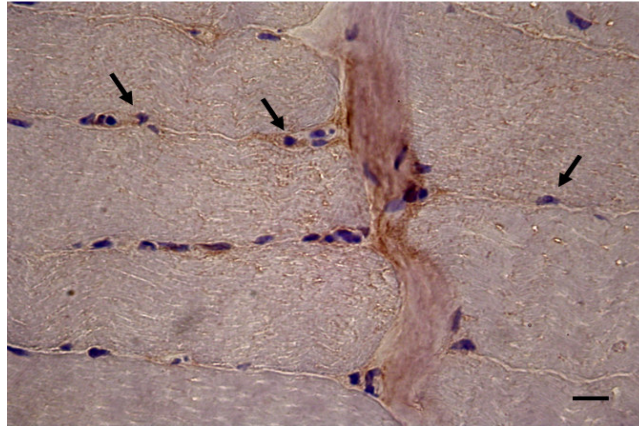
#### **Calpastatina**

A tempo 0 (fig. 6) le sezioni orientate trasversalmente risultano positive alla calpastatina e si riscontra un a discreta positività a livello perinucleare, e in prossimità del sarcolemma. Ciò concorda con il fatto che non c'è ancora stato un forte aumento della concentrazione intracellulare di calcio, che determina la defosforilazione ed una ridistribuzione della calpastatina nel citosol come proteina solubile. Infatti prolungando questa condizione, ossia spingendoci oltre le prime ore *post-mortem*, a concentrazioni di calcio sempre più elevate la quantità di calpastatina tende a diminuire suggerendo una sua degradazione. A 2gg *post-mortem* la calpastatina risulta ancora presente come a 4 e 6 gg *post-mortem*. (fig. 7)



**Fig. 6. *Fibularis longus* (250x)** Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione immunoistochimica per rilevare la presenza della calpastatina. L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della calpastatina. A tempo zero la calpastatina dà una reazione moderatamente positiva a ridosso della zona perinucleare e vicino alla membrana cellulare. Bar 40  $\mu$ m





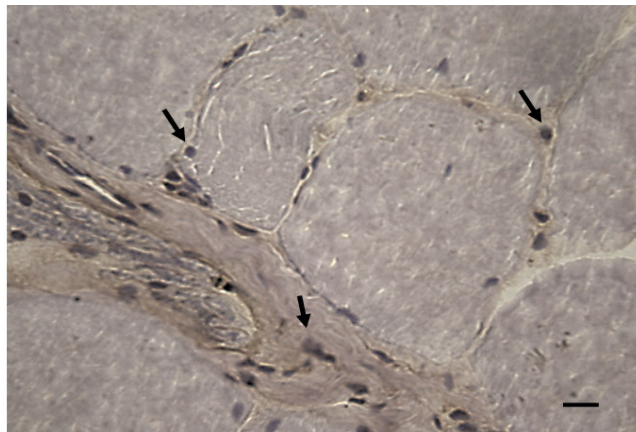
**Fig. 7. *Fibularis longus* (250x)** Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione immunostochimica per rilevare la presenza della calpastatina. L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della calpastatina. A 4 giorni la calpastatina dà reazione positiva. Bar 40  $\mu$ m

### m-Calpaina

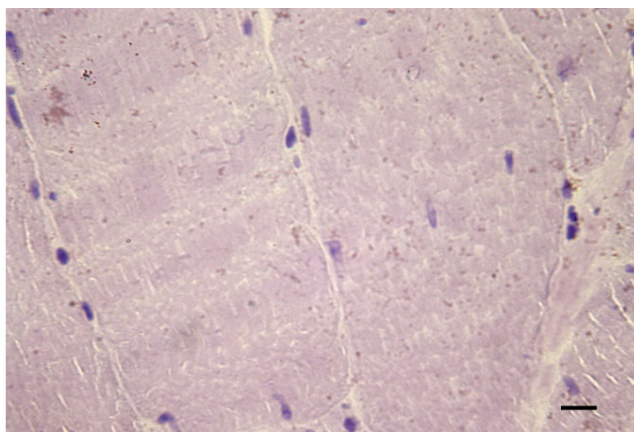
A *tempo 0* (fig. 8) in tutte le sezioni, si riscontra una discreta positività a ridosso del connettivo e del sarcolemma.

La discreta positività di questo enzima, in accordo con Koohmaraie, (1996) nelle prime ore dopo la morte, determina una completa in attivazione della m-calpaina. In questa fase è chiaramente importante anche il valore di calcio.

La m-calpaina, a 2gg è presente chiaramente localizzata lungo la linea Z in seguito all'aumento di ioni Ca<sup>2+</sup> mentre scompare del tutto a 4 e 6 gg *post-mortem*. (fig. 9)



**Fig. 8.** *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis* (250x) Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione immunostochimica per rilevare la presenza della m-calpaina (DOMAIN III/IV). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della m-calpaina. A tempo zero la m-calpaina dà una reazione



**Fig. 9. *Femorotibialis medius* (400x)** Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione immunocistochimica per rilevare la presenza della m-calpaina (DOMAIN III/IV). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. A 6 giorni la m-calpaina scompare totalmente. Bar 25  $\mu$ m

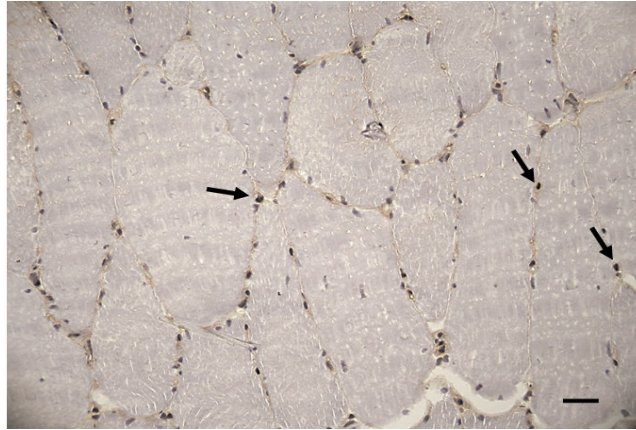
### $\mu$ Calpaina

A *tempo 0* (fig. 10) si riscontra una mancata positività diffusa in tutte le fibre muscolari e in sezioni longitudinali e trasversali è chiara la distribuzione della  $\mu$ -calpaina in prossimità delle membrane citoplasmatiche e nucleari tali da far apparire alcuni nuclei positivi.

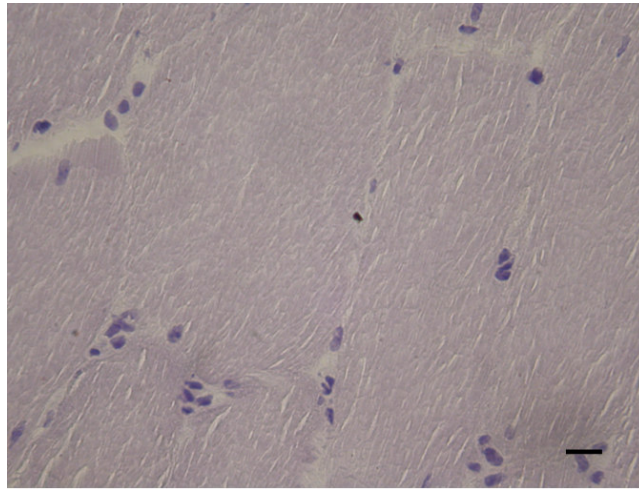
Questa positività è dovuta al fatto che l'enzima in seguito a un piccolo aumento di calcio trasloca alla membrana con successiva attivazione.

Secondo Koohmaraie, il processo autolitico e d'inattivazione della  $\mu$ -calpaina sono intermolecolari, essi non andranno a completamento e, quindi, la  $\mu$ -calpaina manterrà parzialmente la sua attività anche dopo una successiva autolisi. A 2gg è chiara la sua distribuzione in forma attiva nel citosol, mentre a 4gg e 6gg *post-mortem* scompare (fig. 11). E' possibile che tale isoforma sia attiva solo nei primi stadi dopo la morte, cioè, quando il pH è ancora ad un valore prossimo alla neutralità, la

temperatura è all'incirca di 15 °C e la concentrazione di Ca<sup>2+</sup> è compresa tra 5-65  $\mu$ M ( Kanawa et al., 2002).



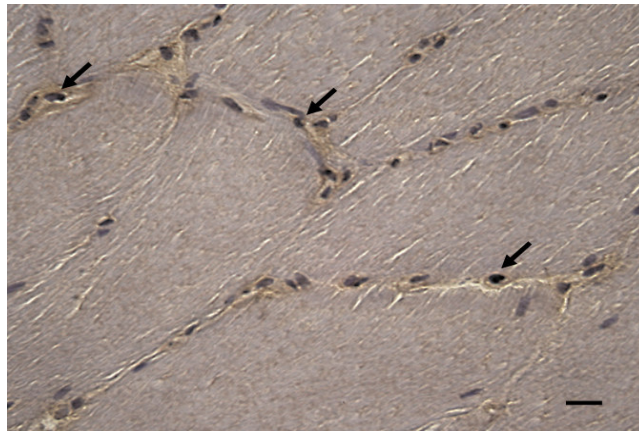
**Fig. 10. *Femorotibialis medius* (260x)** Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione immunostochimica per rilevare la presenza della  $\mu$ -calpaina (DOMAIN IV). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della  $\mu$ -calpaina. A tempo zero la  $\mu$ -calpaina dà una reazione marcatamente positiva vicino alle membrana sarcoplasmatica e nucleare. Bar 62,5  $\mu$ m



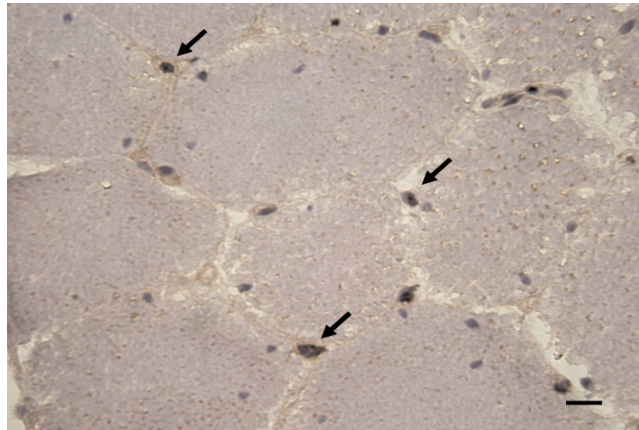
**Fig. 11. *Femorotibialis medius* (260x)** Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione immunostochimica per rilevare la presenza della  $\mu$ -calpaina (DOMAIN IV). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. A 6 giorni la  $\mu$ -calpaina scompare totalmente. Bar 25  $\mu$ m

### Calpaina p94

La calpaina p94 manifesta indipendenza dal calcio. A tempo 0 (fig. 12) è presente e a 2gg, 4gg, 6gg post-mortem, risulta chiaramente localizzata a livello della membrana perinucleare e del citosol circostante con leggere variazioni a carico del connettivo intrafibrillare. Anche se il ruolo della p94 non è stato del tutto chiarito, la sua positività potrebbe essere attribuita alla presenza di frammenti attivi della molecola. (fig. 13)



**Fig. 12. *Fibularis longus* (400x)** Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione immunostochimica per rilevare la presenza della p94 (DOMAIN I). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della p94. A tempo zero la p94 dà una reazione positiva. Bar 25  $\mu$ m



**Fig. 13.** *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis* (250x) Sezione trasversale di muscolo (8- $\mu$ m) trattata con tipizzazione immunostochimica per rilevare la presenza della p94 (DOMAIN I). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della p94. A 4 giorni la p94 dà una reazione positiva a ridosso della membrane nucleare e nel citosol, mostrando lievi variazioni a livello del connettivo intrafibrillare Bar 40  $\mu$ m.

### ***Attività enzimaticae e microscopia elettronica a trasmissione***

Dall'analisi al bioluminometro si evince che:

- la  $\mu$ -calpaina a tempo zero presenta attività massima e decresce a 2 giorni per risultare totalmente assente a 4 e 6 giorni *post-mortem* nei tre muscoli oggetto di studio;
- la m-calpaina presenta attività massima nei campioni prelevati a 2 giorni per risultare totalmente assente a 4 e 6 giorni *post-mortem* nei tre muscoli oggetto di studio. (Grafici 2, 3 e 4)

Mediante l'utilizzo della microscopia elettronica nei tre muscoli oggetto di studio è stato possibile rilevare già a 2 giorni *post-mortem* una parziale rottura della linea Z.

Grafico 2

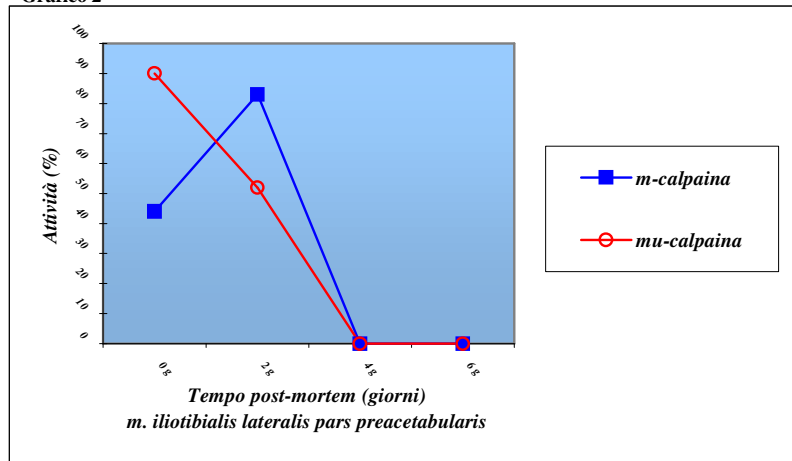


Grafico 3

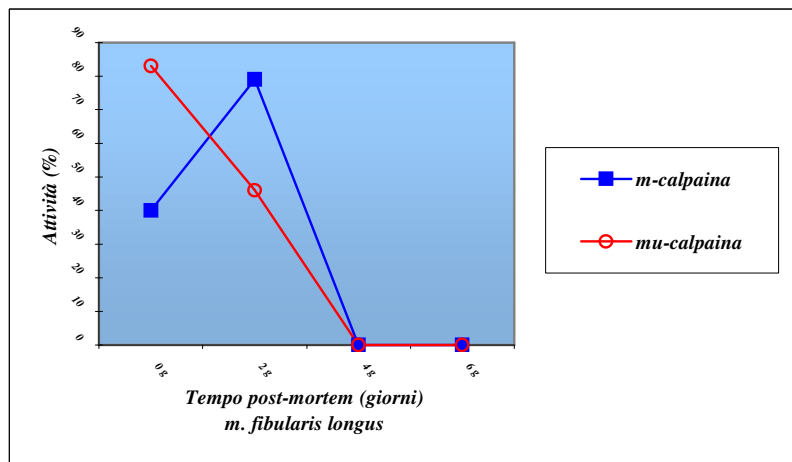
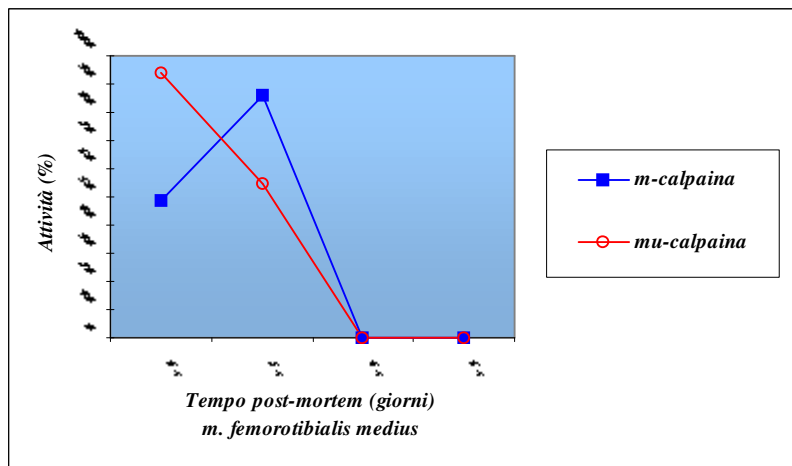


Grafico 4



## **DISCUSSIONI**

### ***Istochimica del muscolo***

Risulta difficile paragonare la muscolatura della cintura pelvica dello struzzo con gli alti ratiti in quanto la letteratura risulta lacunosa. Tuttavia in accordo allo studio di Patak e Baldwin (1998) è stato notato che la muscolatura dell'arto pelvico di differenti ratiti risulta essere simile.

In particolare similmente al nostro nel Brown Kiwi, il muscolo Iliotibialis lateralis origina dal bordo dorsale dell'ileo per la maggior parte della sua lunghezza.

Al contrario, in tale specie, il muscolo Fibularis longus non forma un tendine congiunto con quello del muscolo flexor perforatus digiti III (McGowan, 1979).

Inoltre è stato notato in accordo con Gangl et al. (2004), che nello struzzo l'origine del muscolo Femorotibialis medius appare simile a quello dell'Emu. In tale specie infatti il muscolo Femorotibialis medius, origina dalla superficie cranio-proximale del corpo del femore e dal lato mediale della cresta cnemiale laterale (Patak and Baldwin, 1998).

In accordo con lo studio di Velotto e Crasto (2004) effettuato su quattro muscoli dello struzzo di razza Blue neck, il nostro studio mostra che le fibre FG sono totalmente assenti nei muscoli *Femorotibialis medius*, *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis* e *Fibularis longus*.

Queste fibre sono principalmente riacquistate durante movimenti rapidi, quando sono richiesti alti livelli di energia (Alexander and



Goldspink, 1977). L'assenza di tali fibre nei tre muscoli considerati potrebbe essere legata alla conversione delle fibre FG in fibre FOG, caratterizzate dal metabolismo più versatile di tipo glicolitico-ossidativo e correlata con le differenze nelle domande energetiche rispettivamente durante il semplice volo ed il volo planato (Meyers, 1993). Il nostro studio mostra inoltre che i muscoli Femorotibialis medius e *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis* presentano una percentuale simile di fibre FOG (42 vs. 44) ed SO (58 vs. 56) e in particolare prevalgono le fibre SO, il cui ruolo funzionale nella gamba è mantenere la postura (Suzuki et al., 1985). Iwamoto et al. (2002) in uno studio effettuato sul muscolo di pollo hanno osservato, in disaccordo col nostro studio, che il muscolo *Iliotibialis lateralis* è composto da fibre FOG ed FG. Sakakibara et al. (2000) utilizzando polli adulti di razza Silkie and White Leghorn, hanno messo a confronto la composizione delle fibre del M. iliotibialis lateralis e M. pectoralis; essi hanno notato che il muscolo iliolibialis lateralis è composto da due tipi di fibre, IIR con forte attività della dinicotinamide adenindinucleotide dedrogenasi e IIW, con debole attività della dinicotinamide adenindinucleotide dedrogenasi. Torrella et al. (1998a) in uno studio su 6 muscoli di gabbiano (*Larus cachinnans*) hanno rilevato che i muscoli adibiti al volo (scapulotriceps, pectoralis, scapulohumeralis, extensor metacarpi) presentavano percentuali più alte di veloci fibre FOG (>70%) e percentuali più basse di fibre SO (<16%) rispetto ai muscoli coinvolti nella locomozione del "convolo" (gastrocnemius and iliotibialis). I muscoli della zampa inoltre presentavano un considerevole numero di fibre SO (>14% in molte regioni), suggerendo che essi sono adatti alle attività posturali. Le variazioni regionali e la differente distribuzione dei tipi di fibre nel muscolo Gastrocnemius, potrebbe quindi essere correlata con le

differenti richieste funzionali di questo muscolo durante la locomozione terrestre ed acquatica.

In accordo con lo studio effettuato da Velotto e Crasto (2004), il nostro studio mostra che il muscolo Fibularis longus è un buon indicatore delle fibre SO, mentre il muscolo Femorotibialis medius è un buon indicatore della zona delle fibre FOG. Tornella et al (1998 b) nel loro studio hanno affermato che differenti valori nell'area delle fibre possono influenzare le unzioni metaboliche delle stesse confermando lo studio di Gleson ed Harrison (1998) i quali notarono un inversa correlazione tra l'area della superficie trasversale dei differenti tipi de fibra e la loro attività enzimatica.

### ***Immunoistochimica attività enzimatica e microscopia elettronica***

Il nostro studio in accordo con Geensink e Koohmaraie (1999), mostra una reazione moderatamente positiva della m-calpaina durante le prime ore post-mortem dovuto ad un insufficiente concentrazione di Ca<sup>2+</sup> necessaria per la sua attivazione. La forma attiva della m-calpaina richiede infatti concentrazioni di calcio tra 0.2 e 0.6 mM troppo elevate per essere presente totalmente attiva nell'animale appena macellato, al contempo un'eccessiva autolisi, già in atto nelle prime ore dopo la morte, potrebbe determinare una totale inattivazione della m-calpaina dalle 48 ore in poi (Koohmaraie, 1996). E' stata osservata, inoltre, una marcata localizzazione della  $\mu$ -calpaina in prossimità delle membrane sarcoplasmatiche e nucleari principalmente nelle prime ore post-mortem confermando, pertanto, in accordo con Koohmaraie (1996), che la  $\mu$ -calpaina, al contrario della m-calpaina, è principalmente responsabile dell'intenerimento delle carni nei primi stadi dopo la morte quando il

valore di pH è ancora vicino alla neutralità, la temperatura è di ° C e la concentrazione di Ca<sup>2+</sup> è approssimativamente 5-6.5 μM (Kanawa et al., 2002)

L'estensione della proteolisi, indotta dalle calpaine è modulata dalla calpastatina inibitore specifico, intracellulare ed ubiquitario delle calpaine.

Dal nostro studio dimostra che la calpastatina è assente già a 2gg post-mortem.

Questa sua assenza è principalmente dovuta ad una sua degradazione a causa di un' eccessiva concentrazione di ioni Ca<sup>2+</sup>. Nelle prime ore dopo la morte dell'animale si riscontra, invece, una leggera localizzazione della calpastatina nel citosol. Ciò dovuto, in accordo con De Tullio et al., (1999) al fatto che in seguito ad un aumento di ioni di Ca<sup>2+</sup>, la calpastatina presente in forma aggregata, localizzata intorno al nucleo, subisce una defosforilazione ad opera di una fosfo-proteina fosfatasi, distribuendosi nel citosol come proteina solubile. La calpaina p94, invece, risulta presente a tutte le ore post-mortem. Questo è giustificato dal fatto che, in accordo con la letteratura, essa presenta una indipendenza dal Ca<sup>2+</sup> (Sorimachi et al., 1997).

Il nostro studio quindi mostra che anche in questa specie il sistema calpaina/calpastatina è presente ed agisce come in altri mammiferi anche se i tempi di attivazione/disattivazione sono differenti. Inoltre, in accordo con Goll et al. (1992), è stato possibile stabilire che in condizioni post-mortem, l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare induce un cambio conformazionale che provoca l'apertura del sito attivo e muta la calpaina in una proteasi attiva che si distribuisce nel citosol.

Paragonando i risultati con quelli di altri autori (Taylor et al., 1995) abbiamo rilevato che la calpaina scinde le proteine della linea Z la

cui parziale rottura risulta evidente già 2 giorni determinando l'intenerimento a livello muscolare durante le prime ore post-mortem. In particolare crediamo che tale sistema enzimatico agisce in questa specie come in altri mammiferi ma la sua attività si esaurisce un larga parte entro le prime 48 h dopo la morte. Ciò suggerisce che lo struzzo pur mostrando fibre simili (colore e diametro) a quelle di altri mammiferi, mostra tempi di attivazione e disattivazione più brevi. Tale fenomeno potrebbe spiegare un periodo di frollatura più breve della carne proveniente dalla specie oggetto di studio rispetto ad altri mammiferi.

## **CONCLUSIONI**

Dai risultati istochimici ottenuti, è stata rilevata la presenza di due tipi di fibre diversamente distribuite.

Tali fibre sono distinte in:

- SO (slow twitch oxidative) fibre lente a metabolismo ossidativo, con una risposta contrattile che si sviluppa lentamente ricavando la loro energia aerobicamente utilizzando acidi grassi;
- FOG (fast twitch glycolytic/oxidative) fibre rapide a metabolismo glicolitico /ossidativo con una risposta contrattile intermedia.

Le fibre FG sono totalmente assenti nei muscoli Femorotibialis medius, Iliotibialis lateralis pars preacetabularis e Fibularis longus .

Nei muscoli Femorotibialis medius e Iliotibialis lateralis pars preacetabularis è stata riscontrata una simile percentuale di fibre FOG (42 vs. 44) ed SO (58 vs. 56) con il prevalere delle fibre SO, giustificato dal fatto che queste fibre hanno la funzione di mantenere la postura.

- Nel Fibularis longus vi è una percentuale alta di fibre FOG (61%) fibre rapide a metabolismo glicolitico/ossidativo con una risposta contrattile intermedia.

Le prove fin a oggi pervenute indicano che il sistema proteolitico Ca<sup>2+</sup>-dipendente Calpaina/Calpastatina ha un ruolo importante nell'intenerimento *post mortem* della carne di molte specie animali (Koochmaraie, 1996; Goll DE. *et al.*, 1995; Ouali, 1990) e in particolare la Calpaina innesca una serie di processi proteolitici a cascata.

A tal proposito lo scopo primario di questo studio è stato chiarire la localizzazione intracellulare di due sistemi proteolitici Ca<sup>2+</sup> dipendenti (Calpaine e Calpastatine) utile nel capire la funzione di tali enzimi.

Gli studi fino ad oggi effettuati (Ouali, 1992; Steen *et al.*, 1997) hanno confermato che la presenza del sistema Calpaina/Calpastatina, influenza la tenerezza della carne; Ouali afferma che il rapporto m-calpaina/calpastatina determina il grado di tenerezza, mentre Steen *et al.*, hanno rilevato su bovini da carne una correlazione significativa tra Calpaina/Calpastatina a un giorno *post mortem* e la forza di taglio valutata 8 giorni *post mortem*.

Infatti, un contenuto maggiore di Calpastatina, implica una maggior inibizione della Calpaina determinandone una azione ridotta; per cui un basso rapporto Calpaina /Calpastatina è indice di una minor tenerezza del taglio (Geesink . and Koomaraie 1999; Koomaraie, 1996; Koomaraie, 1994).

Da un confronto tra i dati ottenuti con la nostra indagine immunoistochimica e quelli riportati in bibliografia, possiamo affermare che le calpaine scindono le proteine della linea Z e proteine associate:

Troponina T, Tropinina I, Tropomiosina, a-actinina, Tinina, Nebulina e costamers (Koomaraie 1999; Taylor *et al.*, 1995), determinando intenerimento a livello muscolare, già durante le prime ore di conservazione post-mortem. In particolare, riteniamo che, tale sistema enzimatico, agisca in questa specie, come nei mammiferi, solo che gran parte dell'attività enzimatica si esaurisce già a 48 ore dopo la morte. Ciò suggerisce che, pur trattandosi di animali con fibre muscolari simili (colore e diametro) a quelle dei mammiferi, i tempi di attivazione e disattivazione del sistema calpaina/ calpastatina denotano, in questa specie, una breve frollatura.

**BIBLIOGRAFIA**

**ALEXANDER, R. M., AND G. GOLDSPIK.** Mechanics and energetics of animal locomotion. Chapman and Hall, London, 1997.

**ARTHUR JSC, GAUTHIER S, AND ELCE JS.** Active site residues in m-calpain: identification by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 368: 397–400, 1995.

**AVERNA M, DE TULLIO R, SALAMINO F, MELLONI E, AND PONTREMOLI S.** Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C. *FEBS Lett* 450: 13–16, 1999.

**BEYETTE JR, MA JS, AND MYKLES DL.** Purification and autolytic degradation of a calpain-like calcium-dependent proteinase from lobster (*Homarus americanus*) striated muscles. *Comp Biochem Physiol B Biochem* 104: 95–99, 1993.

**BLANCHARD H, GROCHULSKI P, LI Y, ARTHUR JSC, DAVIS PL, ELCE JS, AND CYGLER M.** Structure of a calpain Ca<sup>2+</sup>-induced conformational changes. *Nature Struct Biol* 4: 532-538, 1997.

**BLATTNER FR, PLUNKETT G III, BLOCK CA, PERNA NT, BURLAND V, RILEY M, COLLADO-VIDES J, GLASNER JD, RODE CK, MAYHEW GF,**

**GREGOR J, DAVIS NW, KIRKPATRICK HA, GOEDEN MA, ROSE DJ, MACE B, AND SHAO Y.** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1474, 1997.

**BOURGEAU G, LAPOINTE H, PELLOQUIN P, AND MAYRAND D.** Cloning, expression, and sequencing of a protease gene (*tpr*) from *Porphyromonas gingivalis*, W83, in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60: 3186–3192, 1992.

**CHI X-J, HIWASA T, MAKI M, SUGAYA S, NOMURA J, KITAKAWA K, AND SUZUKI N.** Suppression of okadaic acid-induced apoptosis by overexpression of calpastatin in human UVr-1 cells. *FEBS Lett* 459: 391–394, 1999.

**CLAYTON RA, WHITE O, KETCHUM KA, AND VENTER JC.** The first genome from the third domain of life. *Nature* 387: 459–462, 1997.

**CONG J, THOMPSON VF, AND GOLL DE.** Immunoaffinity purification of the calpains. *Prot Express Purif* 25: 283–290, 2002.

**D'ANDREA G, PACELLI C, SURIANELLO F, BRAGHIERI A, GIROLAMI A.** Influenza dell' alimentazione su alcune caratteristiche quanti-qualitative della carne di struzzo. *Convegno Nazionale "Parliamo di allevamenti alternativi e valorizzazione del territorio" Cuneo 25 settembre 2003*



**DAYTON WR, GOLL DE, ZEECE MG, ROBSON RM, AND REVILLE WJ.** A Ca<sup>2+</sup> activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 15: 2159-2167, 1976.

**DEAR TN AND BOEHM T.** Diverse mRNA expression patterns of the calpain genes Capn5, Capn6, and Capn 11 during development. *Mech Dev* 89: 201-209, 1999.

**DEAR TN, MATENA K, VINGRON M, AND BOEHM T.** A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* 45: 175–184, 1997.

**DEAR TN, MEIER NT, HUNN M, AND BOEHM T.** Gene structure, chromosomal localization, and expression pattern of Capn12, a new member of the calpain large subunit gene family. *Genomics* 68:152–160, 2000.

**DEAR TN, MOLLER A, AND BOEHM T.** CAPN11: a calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. *Genomics* 59: 243-247, 2000.

**DE TULLIO R., M. PASSALACQUA, M. AVERNA, F. SALAMINO, E. MELLONI, AND S. PONTREMOLI.** Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. *Biochemical Journal* **343**, 467-472, 1999.

**EDMUNDS T, NAGAINIS PA, SATHE SK, THOMPSON VF, AND GOLL DE.** Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1077: 197–208, 1991.

**EISENBERG D, WEISS RM, TERWILLIGER TC, AND WILCOX W.** Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symp Chem Soc* 17 : 109-120, 1982.

**ELCE JS, DAVIES PA, HEGADORN C, MAURICE DH, AND ARTHUR JSC.** The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation. *Biochem J* 326: 31–38, 1997.

**EMORI Y, OHNO S, TOBITA M, AND SUZUKI K.** Gene structure of calcium-dependent protease retains the ancestral organization of the calcium-binding protein gene. *FEBS Lett* 194: 249–252, 1986.

**EMORI Y., KAWASAKI H., IMAJOH S., IMAHORI K., AND SUZUKI K.** Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 3590–3594, 1997.

**ETHERINGTON D. J., TAYLOR M. A. J. AND DRANSFIELD E.** Conditioning of meat from different species, relationship between tenderising and the levels of Cathepsin B, Cathepsin L, Calpain I, Calpain II and  $\beta$ -glucuronidase. *Meat Science* **20**, 1-18, 1987.

**FASONE V.** Lo struzzo in Calabria oggi. Riv. “Struzzo e dintorni”, n. 28. 2001.

**FRANTZ T, VINGRON M, BOEHM T, AND DEAR TN.** Capn7: a highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain *Mamm Genome* 10: 318–321, 1999.

**FUTAI E, KUBO T, SORIMACHI H, SUZUKI K, AND MAEDA T.** Molecular cloning of PalB, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim Biophys Acta* 1517: 316–319, 2001.

**GANGL, D., WEISSENGRUBER, G.E., EGERBACHER, M. AND FORSTENPOINTER, G.** Anatomical description of the muscles of the pelvic limb in the ostrich (*Struthio camelus*). *Anat. Histol. Embryol.* **33** (2), 100-114, 2004.

**GEESINK GH. AND KOOHMARAIE M.** Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by  $\mu$ -calpain under postmortem conditions. *J Anim Sci* **77**, 2685–2692, 1999.

**GEESINK, G.H. AND KOOHMARAIE, M.** Post-mortem proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended post-mortem storage. *J. Anim. Sci.* **77** (6), 1490-1501, 1999.

**GIL-PARRADO S, POPP O, KNOCH TA, ZAHLER TA, BESTVATER F, FELGENTRAGES M, HOLLOSCHI A,**

**FERNANDEZ –MONTALAVAL A, AUERSWALD E, FRITZ H, FLUENTES-PRIOR P, MACHLEIDT W, AND SPIESS. E.** Subcellular localization and vivo subunit interactions of ubiquitous  $\mu$ -calpain. *J Biol Chem* 278, 2003.

**GOLL D. E., V. F. THOMPSON, R. G. TAYLOR, AND T. ZALEWSKA.** Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays* **14** (8), 549-456, 1992.

**GOFFEAU A, BARRELL BG, BUSSEY H, DAVIS RW, DUJON B, FELDMANN H, GALIBERT F, HOHEISEL JD, JACQ C, JOHNSTON M, LOUIS EJ, MEWES HW, MURAKAMI Y, PHILIPPSSEN P, TETTELIN H, AND OLIVER SG.** Life with 6000 genes. *Science* 274: 546–567, 1996.

**GOLL DE, KLEESE WC, SLOAN DA, SHANNON JD, AND EDMUNDS T.**

Properties of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases and their protein inhibitor. *Cienc Biol* 11: 75–83, 1986.

**HATA A, OHNO S, AKITA Y, AND SUZUKI K.** Tandemly reiterated negative enhancer-like elements regulate transcription of a human gene for the large subunit of calcium-dependent protease. *J Biol Chem* 264: 6404–6411, 1989.

**HATA A, OHNO S, AND SUZUKI K.** Transcriptional activation of the gene for the large subunit of human m-calpain by 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *FEBS Lett* 304: 241–244, 1992.

**HATA S, NISHI K, KAWAMOTO T, LEE H-J, KAWAHARA H, MAEDA T, SHINTANI Y, SORIMACHI H, AND SUZUKI K.**

Transcriptional activation of the. Both the conserved and the unique gene structure of stomach-specific calpains reveal processes of calpain gene evolution. *J Mol Evol* 53: 191–203, 2001.

**HEPPLE, RT. , PJ. AGEY, L. HAZELWOOD, JM. SZEWEZAK, RE. MACMILLEN, AND O. MATHIEU-COSTELLO O, 1998:**

Increased capillarity in leg muscle of finches living at altitude. *J Appl Physiol.*, 85(5): 1871-6.

**HIKIDA, RS. , CW. CURTIS, WALRO JM.** Absence of changes in fiber type with aging in avian muscle. *Cell Tissue Res.*, 217(1):43-7, 1981.

**HORIKAWA Y, ODA N, COX NJ, LI X, ORHO-MELANDER M, HARA M, HINORI Y, LINDER TH, MASHIMA H, SCHWARZ PEH, DEL BOSQUE-PLATA L, HORIKAWA Y, ODA Y, YOSHIUCHI I, COLILLA S, POLONSKY KS, WEI S, CONCANNON P, IWASAKI N, SCHULZE J, BAIER LJ, BOGARDUS C, GROOP L, BOERWINKLE E, HANIS CL, AND BELL GI.** Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet* 26: 163–175, 2000.

**HORTOS M., GIL, M. AND SARRAGA C.** Effect of calpain and cathepsin activities on myofibrils from porcine longissimus muscle

during conditioning of normal and exudative meat. *Sciences des aliments*, **14**, 50, 1994.

**HOSFIELD CM, ELCE JS, DAVIES PL, AND JIA Z. CRYSTAL.** Structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and novel mode of enzyme activation. *EMBO J* 18: 6880-6889, 1999.

**HUBER D AND OJHA M.** Immunocytochemical localization of Ca<sup>2+</sup>-dependent protease from *Allomyces arbuscula*. *FEBS Lett* 341: 268–272, 1994.

**IMAJOH S, KAWASAKI H, AND SUZUKI K.** The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J Biochem* 99: 1281–1284, 1986.

**IMAJOH S, KAWASAKI H, AND SUZUKI K.** The COOH-terminal E-F hand structure of calcium-activated neutral protease (CANP) is important for the association of subunits and resulting proteolytic activity. *J Biochem* 101: 447–452, 1987.

**IMAJOH S, KAWASAKI H, AND SUZUKI K.** The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J Biochem* 99: 1281-1284, 1986.

**IWAMOTO, H. , Y. FUKUMITSU, M. MATSUZAKI, Y. TAKEMOTO, S. MORITA, AND H. TAKAHARA.** Comparative studies on the histochemical properties of M. iliotibialis lateralis from Kumamoto Cochin crossbred roaster and broiler chickens. *Br Poult Sci.*, 38(3): 258-62, 1997:

**IWAMOTO, H. , F. KATOH, F. GOTOH, T. NISHIMURA, S. ONO, Y. NISHIO, Y. FUKUHARA, AND E. MURAKAMI** Effects of parent Shamo cocks on the histochemical properties of M. iliotibialis lateralis and M. supracoracoideus on their crossbred broilers. *Br Poult Sci.*, 39(5): 589-95, 1998.

**IWAMOTO, H. , T. OOGA, T. MORIYA, H. MIYACHI, M. MALSUZAKI, S. NISHIMURA, AND S. TABATA.** Comparison of the histological and histochemical properties of skeletal muscles between carbon dioxide and electrically stunned chickens. *Br Poult Sci.* 43(4):551-9, 2002,

**INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921, 2001.

**ISTAT** La consistenza degli allevamenti di struzzi in Italia, anno1999.

**ISTAT** 5° Censimento generale dell'agricoltura, anno 2000.

**KANAWA R., J. R. JI, AND K. TAKAHASHI.** Inactivity of m-Calpain Throughout Post-mortem Aging of Meat. *J. Food. Sci.* **67** (2), 635-638, 2002.

**KAPPRELL H-P AND GOLL DE.** Effect of Ca<sup>2+</sup> on binding of calpain to calpastatin. *J Biol Chem* 264: 17888–17896, 1989.

**KOOHMARAIE M.** The role of Ca<sup>2+</sup> -dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, **74**, 239-245, 1992.

**KOOHMARAIE M.** Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science* **36**, 93-104, 1994

**KOOHMARAIE M.** Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat. Sci.* **43**, 193-201, 1996.

**LEE H-J, TOMIOKA S, KINBARA K, MASUMOTO H, JEONG S-Y, SORIMACHI H, ISHIURA S, AND SUZUKI K.** Characterization of a human digestive tract-specific calpain, nCL-4, expressed in the baculovirus system. *Arch Biochem Biophys* 362: 22–31, 1999.

**LID SE, GRUIS D, JUNG R, LORENTZEN JA, ANANIEV E, CHAMBERLIN M, NIU X, MEELEY R, NICHOLS S, AND OLSEN OA.** The *defective kernal 1 (dek1)* gene required for aleurone cell development in the endosperm of maize grains encodes a membrane protein of the calpain gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5460–5465, 2002.



**LIN G-D, CHATTOPADHYAY D, MAKI M, WANG KKW, CARSON M, JIN L, YUEN P, TAKANO E, HATANAKA M, DELUCAS LJ, AND NARAYANA SVL.** Crystal structure of a calcium bound domain VI of calpain at 1.9 angstrom resolution and its role in enzyme assembly. *Nature Struct Biol* 4: 539–547, 1997.

**LU T, XU Y, MERICLE MT, AND MELLGREN RL.** Participation of the conventional calpains in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1590:16–26, 2002.

**LYN G-D, CHATTOPADHYAY D, MAKI M, WANG KKW, CARSON M, JIN L, YUEN P, TAKANO E, HATANAKA M, DELUCAS LJ, AND NARAYANA SVL.** Crystal structure of a calcium bound domain VI of calpain at 1.9 angstrom resolution and its role in enzyme assembly. *Nature struct Biol* 4: 539-547, 1997.

**LIU K, LI L, AND COHEN SN.** Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. *J Biol Chem* 275: 31093–31098, 2000.

**MA H, SHIH M, HATA I, FUKIAGE C, AZUMA M, AND SHEARER TR.** Protein for Lp82 calpain is expressed and enzymatically active in young rat lens. *Exp Eye Res* 67: 211–229, 1998.

**MAKI M, TAKANO E, OSAWA T, OOI T, MURACHI T, AND HATANAKA M.** Analysis of structure-function relationship of pig

calpastatin by expression of mutated cDNAs in Escherichia coli. *J Biol Chem* 263:

*Mech Dev* 89: 201–209, 1999.

**MCGOWAN, C.** The hind limb musculature of brown kiwi, *Apteryx australis mantelli*. *J. Morphol.* **160**, 33-74, 1979.

**MELLGREN RL AND CARR TC.** The protein inhibitor of calcium-dependent proteases: purification from bovine heart and possible mechanisms of regulation. *Arch Biochem Biophys* 225: 779–786, 1983.

**MELLGREN RL, LANE RD, AND CARR TC.** The protein inhibitor of calcium-dependent proteases: purification from bovine heart and possible mechanisms of regulation. *Arch Biochem Biophys* 225: 779–786, 1983.

**MELLGREN RL, LANE RD, AND KAKAR SS.** A sarcolemma-associated inhibitor is capable of modulating calcium-dependent proteinase activity. *Biochim Biophys Acta* 930: 370–377, 1987.

**MELLGREN RL, MERICLE MJ, AND LANE RD.** Proteolysis of the calciumdependent protease inhibitor by myocardial calcium-dependent protease. *Arch Biochem Biophys* 246: 233–239, 1986.

**MELLONI E, MICHETTI M, SALAMINO F, AND PONTREMOLI S.** Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for-isoforms. *J Biol Chem* 273: 12827–12831, 1998.

**MEYERS, R.A.** Gliding flight in the American kestrel (*Falco sparveirus*): an electromyographic study. *J. Morphol.* **215**, 213-224, 1993.

**MEYERS, RA. AND E. MATHIAS.** Anatomy and histochemistry of spread-wing posture in birds. 2. Gliding flight in the California gull, *Larus californicus*: a paradox of fast fibers and posture. *J Morphol.*, 233(3): 237-47, 1997

**MINAMI Y, EMORI Y, IMAJOH-OHMI S, KAWASAKI H, AND SUZUKI K.** Carboxyl-terminal truncation and site-directed mutagenesis of the EF hand structure-domain of the small subunit of rabbit calciumdependent protease. *J Biochem* 104: 927–933, 1988.

**MIYAKE S, EMORI Y, AND SUZUKI K.** Gene organization of the small

**MOLDOVEANU T, HOSFIELD CM, JIA Z, ELCE JS, AND DAVIES PL.** Ca<sup>2+</sup>-induced changes in rat m-calpain revealed by partial proteolysis. *Biochim Biophys Acta* 1545: 245–254, 2001.

**MOLDOVEANU T, HOSFIELD CM, LIM D, ELCE JS, JIA Z, AND DAVIES PL.** A Ca<sup>2+</sup> switch aligns the active site of calpain. *Cell* 108: 649-660, 2002 mouse calpain genes *Capn5*, *Capn6*, and *Capn 11* during development. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81: 27–40, 1995.

**MOLDOVEANU T, HOSFIELD CM, LIM D, ELCE JS, JIA Z, AND DAVIES PL.** A Ca<sup>2+</sup> switch aligns the active site of calpain. *Cell* 108: 649–660, 2002.

**MORIYASU Y AND TAZAWA M.** Calcium-activated protease in the giant alga *Chara australis*. *Protoplasma* 140: 72–74, 1987.

**MURAKAMI T., M. HATANAKA, AND T. MURACHI.** The cytosol of human erythrocytes contains a highly Ca<sup>2+</sup>-sensitive thiol protease (calpain I) and its specific inhibitor protein (calpastatin). *J. Biochem.* **90** (6), 1809-1816, 1981.

**MORIYASU Y AND TAZAWA M.** Calcium-activated protease in the giant alga *Chara australis*. *Protoplasma* 140: 72–74, 1987.

**NAKAMURA Y, FUKIAGE C, MA H, SHIH M, AZUMA M, AND SHEARER TR.** Decreased sensitivity of lens-specific calpain Lp82 to calpastatin inhibitor. *Exp Eye Res* 69: 155–162, 1999.

**NISHIMURA T AND GOLL DE.** Binding of calpain fragments to calpastatin. *J Biol Chem* 266: 11842–11850, 1991.

**OHNO S, EMORI Y, AND SUZUKI S.** Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease. *Nucleic Acids Res* 14: 5559, 1986.

**OHNO S, MINOSHIMA S, KUDOH J, FUKUYAMA R, SHIMUZU Y, OHMI IMAJOH S, SHIMIZU N, AND SUZUKI K.** Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 33: 225–229, 1990.

**OJHA M.** *Allomyces* Ca<sup>2+</sup> activated neutral protease: interaction with phospholipids and plasma membranes. *Plant Sci* 59: 151–158, 1989.

**OJHA M, CATTANEO A, AND SCHWENDIMANN B.** Comparative studies of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (CDP I and CDP II) from *Allomyces arbuscula*. *Biochimie* 81: 765–770, 1999.

**OJHA M AND FAVRE B.** In vitro and in vivo phosphorylation of calpain-like protease of *Allomyces arbuscula*. *Plant Sci* 74: 35–44, 1991.

**OJHA M AND TURIAN G.** Developmentally regulated proteases in *Allomyces arbuscula*. *Plant Sci* 39: 151–155, 1985.

**OKITANI A, GOLL DE, STROMER MH, AND ROBSON RM.**  
Intracellular  
inhibitor of a Ca<sup>2+</sup> activated protease involved in myofibrillar protein turnover. *Federation Proc* 35: 1746, 1976.

**OTSUKA Y AND GOLL DE.** Purification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase. *J Biol Chem* 262: 5839–

**OUALI A. AND TALMANT A.** Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Sci.* **28**, 331, 1990.

**OUALI A.** Proteolytic and physiochemical mechanism involved in meat texture development. *Biochimie*, **74**, 251, 1992.

**PATAK, A., AND J. BALDWIN.** Pelvic limb musculature in the Emu *Dromaius novaehollandiae* (Aves: Struthioniformes: Dromaiidae): Adaptations to high-speed running. *J. Morphol.* **238**, 23-37, 1998.

**PINTE'R M AND FRIEDRICH P.** The calcium dependent proteolytic system calpain-calpastatin in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* **253**: 467–473, 1988.

**REDDY ASN, SAFADI F, BEYETTE JR, AND MYKLES DL.** Calcium-dependent proteinase activity in root cultures of Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1089–1095, 1994.

**REVERTER D, STROBL S, FERNANDEZ-CATALAN C, SORIMACHI H, SUZUKI K, AND BODE W.** Basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains. *Biol Chem* **382**: 753–766, 2001.

**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, ZATZ M, TISCHFIELD JA, FERDEAU M, JACKSON CE, COHEN D, AND BECKMANN JS.** Mutations in the proteolytic

enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81: 27–40, 1995.

**SAFADI F, MYKLES DL, AND REDDY ASN.** Partial purification and characterization of a Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase from *Arabidopsis* roots. *Arch Biochem Biophys* 348: 143–151, 1997.

**SAIDO TC, MIZUNO K, AND SUZUKI K.** Proteolysis of protein kinase C by calpain: effect of acidic phospholipids. *Biomed Biochim Acta* 50: 485–487, 1991.

**SAIDO TC, NAGAO S, SHIRAMINE M, TSUKAGUCHI M, SORIMACHI H, MUROFUSHI H, TSUCHIYA T, ITO H, AND SUZUKI K.** Autolytic transformation of  $\mu$ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms. *Biochem* 111: 81–86, 1992.

**SAIDO TC, SHIBATA M, TAKENAWA T, MUROFUSHI H, AND SUZUKI K.**

Positive regulation of  $\mu$ -calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 267: 24585–24590, 1992.

Sakakibara, K., Tabata, S., Shiba, N., Gotoh, T., Nishimura, S. and Iwanoto, H. (2000): Myofibre composition and total collagen content in M. iliotibialis lateralis and M. pectoralis of Silkie and White Leghorn chickens. *Br. Poult. Sci.* **41** (5), 570-574.

**SALAMINO F, DE TULLIO R, MICHETTI M, MENGOTTI P, MELLONI E, AND PONTREMOLI. S.** Modulation of calpastatin

specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1326–1332, 1994.

**SALGHETTI A.** Limiti e possibilità di sviluppo dell'allevamento dello struzzo. *Ann. Fac. Medic.Vet. Parma*, Vol. XXII 175-203. 2002

**SCHA'D E', FARKAS A, JE'KELY G, TOMPA P, AND FRIEDRICH P.** A novel small subunit of the calpains. *Biochem J* 362: 383–388, 2002.

**SIDDIQUI AA, ZHOU Y, PODESTA RB, KARCZ SB, TOGNON CE, STREJAN GH, DEKABAN GA, AND CLARKE MW.** Characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, *Schistosoma mansoni*. *Biochim Biophys Acta* 1181: 37–44, 1993.

**SHACKELFORD, S. D., KOOHMARAIE M., CUNDIFF L. V., GREGORY K. E., ROHRER G.A. AND SAVELL J.W.** Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor Calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner Bratzler Shear Force, retail product yield and growth rate. *J. Anim. Sci.*, **72**, 857-863, 1994.

**SORIMACHI H, IMAJOH-OHMI S, EMORI Y, KAWASAKI H, OHNO S, MINAMI Y, AND SUZUKI K.** Molecular cloning of a novel mammalian calciumdependent protease distinct from both m- and -types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 264: 20106–20111, 1989.



**SORIMACHI H, ISHIURA S, AND SUZUKI K.** A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two

alternative splicing products with and without Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J Biol Chem* 268: 19476–19482, 1993.

Sorimachi, H., Ishiura, S. and Suzuki, K. (1997): Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* **328**, 721-732.

**SORIMACHI H AND SUZUKI K.** Sequence comparison among muscle specific calpain, p94, and calpain subunits. *Biochim Biophys Acta*

1160: 55–62, 1992.

**STROBL S, FERNANDEZ-CATALAN C, BRAUN M, HUBER R, MASUMOTO H, NAKAGAWA K, IRIE A, SORIMACHI H, BOURENKOW G, BARTUNIK H, SUZUKI K, AND BODE W.** The crystal structure of calcium-free human mcalpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 588–592, 2000.

**SUZUKI K.** The structure of the calpains and the calpain gene. In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, edited by Mellgren RL and Murachi T. Boca Raton, FL: CRC, 1990.

**SUZUKI, A., T. TSUCHIYA, S. OHWADA, AND H. TAMATE.** Distribution of myofiber types in thigh muscles of chickens. *Journal of Morphology* **185**, 145-154, 1985.

**SZPACENKO A, KAY J, GOLL DE, AND OTSUKA Y.** A different form of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase activated by micromolar levels of Ca<sup>2+</sup>.

In: *Proceedings of Symposium on Proteinases and Their Inhibitors: Structure, Function, and Applied Aspects*, edited by Turk V and Vitale LJ. Oxford, UK: Pergamon, 1981.

**TAKANO J, KAWAMURA T, MURASE M, HITOMI K, AND MAKI M.** Structure of mouse calpastatin isoforms: implications of species-common and species-specific alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 339–345, 1999.

**TAYLOR RG, CHRISTIANSEN JA, AND GOLL DE.** Immunolocalization of the calpains and calpastatin in human and bovine platelets. *Biomed Biochem Acta* 50: 491–498, 1991.

Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F., Koohmaraie, M. and Goll, D.E. (1995): Is Z-disk degradation responsible for post-mortem tenderization? *J. Anim. Sci.* **74** (12), 2935-2942.

**THEOLOGIS A, ECKER JR, PALM CJ, FEDERSPIEL NA, KAUL S, WHITE O, ALONSO J, ALTAFI H, ARAUJO R, BOWMAN CL, BROOKS SY, BUEHLER E, CHAN A, CHAO A, CHEN H, CHEUK RF, CHIN CW, CHUNG MK, CONN L, CONWAY AB, CONWAY AR, CREASY TH, DEWAR K, DUNN K, ETGU P, FELDBLYUM TV, FENG J-D, FONG B, FUJII CY, GILL JE, GOLDSMITH AD, HAAS B, HANSEN NF, HUGHES B, HUIZAR L, HUNTER JL, JENKINS J, JOHNSON-HOPSON C, KHAN S, KHAYKIN E, KIM CJ, KOO HL, KREMENETSKAIA I, KURTZ**

**DB, KWAN A, LAM B, LANGIN-HOOPER S, LEE A, LEE JM, LENZ CA, LI JH, LI Y-P, LIN X, LIU SX, LIU ZA, LUROS JS, MAITI R, MARZIALI A, MILITSCHER J, MIRANDA M, NGUYEN M, NIERMAN WC, OSBORNE BI, PAI G, PETERSON J, PHAM PK, RIZZO M, ROONEY T, ROWLEY D, SAKANO H, SALZERG SL, SCHWARTZ JR, SHINN P, SOUTHWICK AM, SUN H, TALLON LJ, TAMBUNGA G, TORIUMI MJ, TOWN CD, UTTERBACK T, VAN AKEN S, VAYSBERG M, VYSOTSKAIA VS, WALKER M, WU D, YU G, FRASER CM, VENTER JC, AND DAVIS RW.** Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant, *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 816–820, 2000.

**THOMPSON VF AND GOLL DE.** Purification of  $\mu$ -calpain, m-calpain, and calpastatin from animal tissues. In: *Methods in Molecular Biology. Calpain Methods and Protocols*, edited by Elce JS. Totowa, NJ: Humana, 2000.

**THOMPSON VF, LAWSON KR, BARLOW J, AND GOLL DE.** Digestion of  $\mu$ - and m-calpain by trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta*. 1648, 140-153, 2003.

**TOMPA P, EMORI Y, SORIMACHI H, SUZUKI K, AND FRIEDRICH P.** Domain III of calpain is a Ca<sup>2+</sup>-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1333–1339, 2001.

**TORRELLA, J.R., FOUCES, V., PALOMEQUE, J. AND VISCOR, G.** Capillarity and fibre types in locomotory muscles of wild yellow-legged gulls (*Larus cachinnans*). *Physiol. Zool.* **71** (4), 425-434, 1998*a*.

**TORRELLA, J.R., FOUCES, V., PALOMEQUE, J. AND VISCOR, G.** Comparative skeletal muscle fibre morphometry among wild birds with different locomotor behaviour. *J. Anat.* **192**, 211-222, 1998*b*

**VELOTTO, S., AND A. CRASTO.** Histochemical and morphometrical characterization and distribution of fiber types in four muscles of Ostrich (*Struthio camelus*). *Anat. Histol. Embryol.* **33** (5), 251-256, 2004.

**WADA, N., H. MIYATA, R. TOMITA, S. OZAWA, M. TOKURIKI** Histochemical analysis of fiber composition of skeletal muscles in pigeons and chickens. *Arch. Ital. Biol.*, 137 (1), 75-82, 1999.

**WILSON CA, KREYCHMAN J, AND GERSTEIN M.** Assessing annotationtransfer for genomics: quantifying the relations between protein sequence, structure and function through traditional and probabilistic scores. *J Mol Biol* 297: 233–249, 2000.

**WULF, J. D., TATUM, J. D., GRENN, R. D., MORGAN, J. B., GOLDEN, B. L., SMITH, G. C.** Genetic influences on beef longissimus palatability in charolais and limousin sired steers and heifers. *J. Anim. Sci.*, **74**, 239, 1996.

**WOLFE FH, SATHE SK, GOLL DE, KLEESE WC, EDMUNDS T, AND DUPERRET SM.** Chicken skeletal muscle has three Ca<sup>2+</sup> dependent proteinases. *Biochim Biophys Acta* 998: 236–250, 1989.

**XIE X, DWYER MD, SWENSON L, PARKER MH, AND BOTFIELD MC.** Crystal structure of calcium-free human sorcin: a member of the penta-EFhand protein family. *Protein Sci* 10: 2419–2425, 2001.