

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	2
<i>I MUSCOLI</i>	6
<i>Struttura delle fibre muscolari striate</i>	9
<i>Classificazione dei muscoli striati</i>	10
<i>Fibre fasiche e fibre toniche</i>	12
<i>Fibre Toniche</i>	12
<i>Fibre Fasiche</i>	12
<i>Proprietà fisico - chimiche dei muscoli striati</i>	14
<i>FAMIGLIA DELLE CALPAINE</i>	16
<i>Struttura delle Calpaine ubiquitarie</i>	17
<i>Generalità e struttura delle Calpastatine</i>	22
<i>TRASFORMAZIONE DEL MUSCOLO IN CARNE</i>	26
<i>Ruolo fisiologico del sistema Calpaina-Calpastatina in relazione alla qualità della carne</i>	28
<i>ESAME DELLA LETTERATURA</i>	32
<i>La sequenza genomica della m e della μ-calpaina</i>	32
<i>Strutture e soluzioni cristallografiche.</i>	34
<i>Altri membri della famiglia delle calpaine: molecole simili alla calpaina</i>	43
<i>Molecole calpaina-simile nei vertebrati.</i>	48
<i>MATERIALI E METODI</i>	51
<i>Istologia</i>	52
<i>Istochimica</i>	52
<i>Analisi statistica</i>	54
<i>Immunoistochimica metodo DAKO</i>	55
<i>La purificazione delle calpaine delle calpastatine</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
<i>RISULTATI</i>	57
<i>Istochimica del muscolo</i>	57
<i>Immunochimica del muscolo</i>	60
<i>DISCUSSIONI</i>	62

<i>Istochimica del muscolo</i>	62
<i>CONCLUSIONI</i>	66
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	69
<i>FOTO</i>	93
<i>TABELLE E GRAFICI</i>	99

INTRODUZIONE

Nel quadro dei notevoli cambiamenti nella struttura dei consumi e delle abitudini alimentari, l'espansione del reddito spinge i consumatori alla ricerca di prodotti sempre più ricchi di gusto, sapore e varietà con maggiore attenzione verso l'aspetto salutistico e la genuinità dei cibi.

In questa prospettiva si inserisce coerentemente la carne di struzzo che rappresenta per il mercato un prodotto nuovo ed alternativo con peculiari requisiti di salubrità e di qualità nutrizionale.

Il modello dei consumi alimentari degli italiani, in questi ultimi anni, ha subito dei forti mutamenti a seguito di una serie di fattori quali la destrutturazione del pasto tradizionale, la riduzione graduale dell'importanza del pranzo, la crescita dei consumi extra domestici, l'attenzione crescente ai problemi della salute fisica e la riaffermazione della dieta mediterranea.

Le motivazioni suddette, unite all'andamento crescente dei redditi familiari e all'innalzamento del livello d'istruzione della popolazione, hanno rappresentato una condizione favorevole alla comparsa sul mercato nazionale di carni alternative.

Tali carni provengono da particolari specie, che presentano elevate potenzialità sia per quanto concerne le tecniche di allevamento e sia per le caratteristiche organolettiche e nutrizionali.

Negli ultimi decenni in particolare si è cercato di valutare e di sfruttare opportunamente le potenzialità di alcune specie esotiche, con lo scopo di utilizzare le innate capacità d'adattamento alle malattie ed al clima delle regioni di cui sono originarie e non dover dipendere, così, da farmaci, vaccini e costose infrastrutture necessarie per l'allevamento delle specie importate.

In questa prospettiva si inserisce coerentemente la carne di struzzo che rappresenta per il mercato un prodotto nuovo ed alternativo con peculiari requisiti di salubrità e di qualità nutrizionale. Il consumo pro-capite italiano attuale di tale tipo di carne si aggira intorno ai 10 Kg/anno anche se è in continuo aumento.

Tale incremento, tuttavia, non va a discapito delle altre produzioni nazionali, ormai ben consolidate, e rappresenta una conquista per questa tipologia di carne che le ha consentito di ottenere una nicchia di mercato ben definita e selezionata.

Scopo di questo lavoro è stato fornire una descrizione dettagliata di tre muscoli dell'arto pelvico di struzzo African Black, analizzare le loro caratteristiche istochimiche e morfometriche, e esaminare l'attività del sistema calpaina/calpastatina attraverso l'utilizzo di metodiche immunoistochimiche.

L'azione del sistema calpaina calpastatina è stato infatti fonte di interesse per diversi autori, in quanto, oltre a partecipare attivamente alla regolazione di diversi meccanismi intracellulari, risulta fondamentale nell'intenerimento delle fibre muscolari e quindi nella produzione delle carni. In letteratura, non risultano lavori di immunolocalizzazione e/o di interpretazione circa il funzionamento post-mortem di tale sistema in muscoli di struzzo, pertanto, abbiamo ritenuto importante poter evidenziare, l'azione specifica di ciascun enzima componente il sistema proteasico Ca²⁺ dipendente anche nelle fibre muscolari di struzzo. Comprendere l'esatto funzionamento di tale sistema contribuisce a chiarire ed eventualmente migliorare il processo di d'intenerimento delle carni alimentari. Poiché da un punto di vista organolettico la tenerezza è uno dei parametri qualitativi più ricercati dal consumatore, essa, rappresenta il fattore di maggiore importanza commerciale nella

valutazione delle carni. Riteniamo necessario, pertanto, verificare le funzioni del sistema calpaina/calpastatina, ritenuto il maggiore responsabile della degradazione delle proteine miofibrillari in post-mortem per considerare il ruolo svolto dal sistema stesso nella gestione delle carni.

Anche la valutazione della distribuzione dei diversi tipi di fibre all'interno di un muscolo, del loro numero e del loro diametro e/o della loro area sono fattori importanti per la qualità della carne in quanto hanno influenza su alcuni processi biochimici muscolari peri- e post-mortem.

LO STRUZZO



Lo struzzo appartiene alla famiglia dei Ratiti, ha lo sterno privo di carena, è inetto al volo ma ottimo corridore, proprio delle steppe e delle savane dell'Africa, è il più grande fra gli uccelli viventi, e può raggiungere un'altezza di 2,5m. Ha collo lungo quasi nudo, lunghe zampe nude, robuste, adatte alla corsa, con piedi forniti di sole due dita, una delle quali armata di un temibile unghione; le penne, di color bruno nella femmina e nero nel maschio, sono particolarmente ricercate per ornamento.

Lo struzzo African Black o Black Neck: è il risultato di vari incroci, iniziati alla fine dell'Ottocento, in Sud Africa, specialmente per la produzione di piume, prima, e poi di pelle. Il collo e le zampe sono corte e la pelle grigio scura. La pelle è ricoperta da numerosi follicoli ravvicinati. I maschi si colorano di rosso solo nella parte frontale del metatarso e sul piede. Il becco e le zampe delle femmine hanno zone più chiare. Depongono, mediamente, 65 uova del peso di 1.100-1.600

grammi. Raggiungono un peso di circa 100-120 kg; di solito sono animali abbastanza tranquilli.

L'allevamento

L'allevamento dello struzzo ha avuto inizio tra la fine del 1989 e il 1990 nell'Europa settentrionale, in particolare in Danimarca, in Belgio e in Olanda, in seguito si sono avuti allevamenti in Italia e Spagna dove l'incremento è stato notevole soprattutto nelle regioni a clima temperato o mediterraneo.

In queste ultime, dove la zootecnica tradizionale è quasi scomparsa per la concorrenza delle regioni a clima temperato-umido, l'allevamento dello struzzo può rappresentare una idonea e redditizia produzione.

La diffusione di questa specie, oltre che alla indiscussa capacità imprenditoriale degli agricoltori di questi Paesi, è da imputare anche al sostegno e all'attenzione di cui gode questo allevamento da parte delle istituzioni pubbliche.

In Danimarca, ad esempio, molti allevamenti suini hanno ricevuto sovvenzioni per la riconversione in allevamenti di struzzi.

L'allevamento dello struzzo in Italia come nel resto d'Europa, in meno di dieci anni dalla sua comparsa ha ampiamente dimostrato di essere la più valida alternativa alla produzioni zootecniche tradizionali in termini di qualità e quantità di prodotti che ne derivano.

Le motivazioni a supporto di tale affermazione sono legate agli aspetti peculiari di questo allevamento in quanto:

- è di tipo semi-estensivo 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 nevicate
- 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.

Secondo le rilevazioni del 5° Censimento generale dell'agricoltura del 2000, il numero degli allevamenti di struzzo (1.574) e la consistenza dei capi (38.385) sono la testimonianza della dinamicità degli imprenditori agricoli italiani, che nell'arco di un decennio (1995- 2005) hanno creato dal nulla una nuova realtà produttiva. 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 coppie (1 maschio e 1 femmina). Infatti, caratteristica peculiare degli allevamenti di struzzi è la loro dispersione sul territorio, che comporta maggiori difficoltà di incontro e di conoscenza, con una lievitazione dei costi di trasporto e di macellazione essendo ancora molto pochi i macelli specializzati. Se a questo aggiungiamo la dimensione ridotta delle mandrie, l'alimentazione modificata in maniera innaturale e l'inadeguata collocazione del prodotto sul mercato; infatti si stima che nel 2001 siano state vendute in Italia circa 1.300 tonnellate di carne di struzzo (Fasone 2001) delle quali oltre l'80% di provenienza estera, prevalentemente da Israele e Sudafrica, ci rendiamo conto delle difficoltà incontrate nell'organizzazione del comparto.

L'A.V.A.S (associazione per la valorizzazione dell'allevamento di struzzo) ritiene che sia proprio la produzione deficitaria di carne di

struzzo a livello europeo la motivazione principale per sostenere la filiera produttiva.

A questo si aggiunge la necessità di rilanciare le attività zootecniche nei Paesi del Bacino Mediterraneo, anche per evitare un ulteriore impoverimento del territorio, dovuto all'abbandono delle attività agricole da parte degli attuali addetti all'allevamento bovino, che ogni giorno vedono diminuire sempre più il valore della propria attività e stanno cercando valide alternative.

I MUSCOLI

I muscoli sono formati da complessi di fibrocellule muscolari la cui principale proprietà è la contrazione.

Nell'organismo animale si distinguono tre tipi di muscolo: liscio, striato e cardiaco.

Il muscolo liscio è costituito da fibrocellule muscolari fusiformi, mononucleate capaci di contrazione lenta, graduale ma duratura. Questi elementi formano tuniche più o meno complete nella parete di gran parte dei visceri cavi; la loro attività è regolata dal sistema nervoso vegetativo.

Il muscolo striato è composto da fibrocellule di notevoli dimensioni, spesso nastriformi, con più nuclei e miofibrille dotate di una caratteristica striatura trasversale. Costituiscono i muscoli scheletrici e sono in grado di compiere poderose contrazioni, ma limitate nel tempo, regolate dal sistema nervoso della vita di relazione.

Il muscolo cardiaco è un particolare muscolo striato in quanto, pur presentando molte caratteristiche morfologiche di questo, esplica la sua funzione sotto il controllo di un complesso regolatore autonomo su cui si interpone il sistema nervoso vegetativo.

Struttura delle fibre muscolari striate

La fibra muscolare striata ha in genere forma cilindrica allungata e presenta nel suo citoplasma (sarcoplasma) numerosi nuclei disposti in periferia, quasi a ridosso della membrana plasmatica o sarcolemma.

Nel sarcolemma si riscontra una notevole quantità di esili fibrille, tra loro parallele, denominate miofibrille. Queste, nel loro insieme, conferiscono alla fibra una striatura longitudinale.

Nel sarcoplasma, oltre ai nuclei e le miofibrille, si osservano i costituenti comuni a tutte le cellule. Tra questi, in particolare, sono numerosi i mitocondri, più abbondanti in vicinanza dei nuclei, un reticolo sarcoplasmatico che si spinge ad avvolgere le singole miofibrille e sostanze, quali il glicogeno e la mioglobina, legate al metabolismo della cellula. Dalla quantità di mioglobina dipende in parte il colore del muscolo.

Le miofibrille, che costituiscono la parte fondamentale del sarcoplasma, presentano una striatura trasversale per l'alternarsi di segmenti rifrangenti, più scuri (dischi scuri), con segmenti meno rifrangenti, chiari (dischi chiari).

A luce polarizzata i dischi scuri sono birifrangenti e anisotropi (bande A), mentre i chiari sono isotropi (bande I). Ogni disco chiaro appare diviso in due da una sottile linea scura detta linea o disco Z. Il disco scuro (banda A) è attraversato a sua volta da una zona molto ristretta più chiara e quindi meno rifrangente, la banda H; questa al centro porta una sottile linea scura (linea M), la quale viene perciò ad occupare la parte centrale dell'intera banda A.

La porzione di miofibrilla compresa tra i due dischi Z è denominata sarcomero. L'estrema vicinanza delle miofibrille e l'apparente continuità dei rispettivi dischi A, I e della stria Z, danno l'impressione che le singole striature interessino trasversalmente l'intera fibra muscolare. Quando i dischi sono in questa posizione di continuità si dicono a registro. Le osservazioni a microscopio elettronico e gli studi fisiologici hanno chiarito meglio la costituzione molecolare delle miofibrille. Esse sono formate da un complesso di filamenti di due tipi differenti: i primi, fatti di miosina, sono spessi e si rinvengono nell'ambito dei dischi A; i secondi, più sottili sono di actina e appaiono localizzati nella banda I, ma si spingono tra quelli di miosina alla periferica della banda A.

Nella banda H vi sono molti filamenti spessi, mentre nelle porzioni laterali del disco A i filamenti spessi sono alternati con quelli sottili di actina che, da soli occupano la banda I. In una sezione trasversale delle estremità della banda A i miofilamenti spessi vengono a trovarsi al centro di un esagono i cui angoli sono occupati dai miofilamenti sottili di actina.

Durante la contrazione muscolare i miofilamenti di actina si spingono più profondamente tra quelli di miosina sino a toccarsi con le estremità. Ne consegue che, nel muscolo a riposo, la banda H è più ampia mentre si riduce fino a scomparire in quello in contrazione.

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).

Il muscolo, quindi, è essenzialmente un dispositivo per la conversione dell'energia libera chimica rilasciata dall'idrolisi dell'ATP in lavoro meccanico.

Sulla base della loro attitudine ad idrolizzare ATP, sul contenuto lipidico e di mioglobina, le fibre sono classificate in:

Fibre fasiche e fibre toniche

Fibre Toniche

Le fibre toniche, presentano una innervazione multipla e la loro risposta elettrica alla stimolazione nervosa è di tipo graduale, cioè crescente o decrescente, rispettivamente all'aumentare o al diminuire della frequenza di stimolo.

Tali fibre hanno una bassa attività ATP-asica della miosina, motivo per il quale necessitano di poca energia per sviluppare o mantenere una buona tensione isometrica, risulta quindi che sono responsabili dei movimenti lenti degli animali. Questo tipo di fibra è presente negli uccelli, nei rettili, negli anfibi e nei muscoli dei mammiferi.

Fibre Fasiche

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

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

fibre lente a metabolismo ossidativo

(Slow-twitch Oxidative) SO:

presentano una risposta contrattile che si sviluppa lentamente ed hanno un reticolo sarcoplasmatico meno sviluppato rispetto alle fibre di tipo FG a cui segue un più efficiente rilascio di calcio e un meccanismo di riassorbimento che può essere relazionata alla contrazione veloce e al tasso di rilassamento.

Inoltre ricavano la loro energia aerobicamente, attraverso l'utilizzo di acidi grassi. 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 Ia o rosse per il colore caratteristico che viene loro conferito dall'abbondanza di mitocondri e mioglobina.

fibre rapide a metabolismo glicolitico

(Fast-twitch Glycolytic) FG:

Si tratta di fibre che mostrano un'attività ATPasica della miosina molto elevata e sono in grado di contrarsi rapidamente. L'energia necessaria alla loro contrazione, la ricavano dal glicogeno in modo anaerobico. 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 d'affaticamento.

Sono anche denominate fibre di tipo IIb o bianche.

fibre rapide a metabolismo glicolitico ossidativo

(Fast-twitch Glycolytic Oxidative) FOG:

più ricche di mitocondri rispetto alle FG, 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, rosse come le SO o rosa.

Proprietà fisico - chimiche dei muscoli striati

I muscoli sono organi molli, notevoli nel loro colore rosso più o meno carico. Questa colorazione varia con le specie e in ciascuna specie seguendo l'età, la regione, e lo stato di salute degli animali. Con la dissecazione i muscoli diventano duri e bruni, in seguito a ripetute lavature, si arriva a comunicare loro una tinta giallo-pallida.

I muscoli sono estensibili, elastici e tenaci; lo loro tenacità è più pronunciata durante la vita che dopo la morte. Da vari studi è emerso che il succo impregnante il tessuto muscolare possiede una reazione acidissima, quando viene estratto dagli organi che hanno funzionato attivamente. Tiene in soluzione delle quantità variabili di albumina, di caseina; contiene anche grasso, un po' di creatina, di creatinina e una grande porzione di acido sarco - lattico.

Una porzione della sostanza solida del muscolo, si può trasformare in gelatina con l'ebollizione in acqua. Ma la maggior parte di questa sostanza è costituita da una materia azotata, attaccabile dall'acido

cloridrico diluito, detta miosina o fibrina muscolare; questa miosina differisce poco dalla fibrina del sangue.

FAMIGLIA DELLE CALPAINE

Le “*Calpaine*” sono state caratterizzate come una grande famiglia di proteasi tioliche, cisteiniche, citoplasmatiche Ca²⁺-dipendenti presenti in diversi tipi di cellule animali. 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 (Mellegren *et al.*, 1986) ed il 1999 (Saido *et al.*, 1992) sono stati pubblicati libri sulle proteasi Ca²⁺- 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 Ca²⁺ dipendenti:

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

Classificazione in funzione della loro distribuzione:

- *Ubiquitarie*;
- *Tessuto-specifiche*.

Le “*Calpaine Ubiquitarie*” sono state trovate in tutti i tessuti e sulla base di una differente richiesta di Ca²⁺ sono state ulteriormente suddivise in:

<i>μ-calpaine</i>	quantità micromolari di Ca ²⁺ (5-50 μM)
<i>m-calpaine</i>	quantità millimolari di Ca ²⁺ (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 appartenenti alla famiglia delle “*Calpaine Ubiquitarie*”, sono costituite da due subunità denominate in base al loro peso molecolare, “*Grande subunità*” (di massa molecolare 80 KDa) e “*Piccola subunità*” (di massa molecolare di 28 KDa).

Solitamente nell'essere umano, la subunità di 80 kDa della \square -calpaina 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 sopra il 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 data specie (Suzuki, 1990). La subunità di 80 kDa della \square -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) e gli altri due sono 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 NH₂-terminale. Ha forma di alfa-elica, non ha sequenza omologa con nessun polipeptide sequenziato fin ora 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 μ 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: 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 critiche interazioni elettrostatiche (Imaioh *et al.*, 1988; Strobl *et al.*, 2000) e contiene anche specifici ligandi per i 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 α -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 α -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 $\tilde{\alpha}$ 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 (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.

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 NH₂-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 (EANESSE).

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 Ca²⁺-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 μ - 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 e 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 Ca²⁺, 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 α -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 Ca²⁺-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 μ -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.

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 O₂ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ libero è circa 1µM, mentre nelle condizioni *post mortem* può raggiungere 100 µM. Perché le Calpaine siano attive sono richieste concentrazioni di Ca²⁺ 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 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;
- 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 Ca²⁺-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/ μ -calpaina sia un buon indicatore dell'attività potenziale proteolitica del

muscolo e proprio perché la calpastatina è un inibitore endogeno della μ -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 μ -calpaina è inattivata così rapidamente che non può giustificare l'intenerimento al di là delle 24-48 ore *post mortem*;

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

Alla prima domanda Koohmarie (1996) risponde che con i metodi sensibili (caseina marcata) è stato possibile rilevare un'espressiva attività

della μ -calpaina anche dopo 14 giorni a quattro gradi (dal 5% al 10%). Poiché autolisi e inattivazione della μ -calpaina sono processi intermolecolari, non andranno a completamento, e quindi la μ -calpaina manterrà parzialmente la sua attività anche dopo ampia autolisi. Inoltre, a differenza della μ -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/ μ -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 μ -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

La sequenza genomica della μ e della \square -calpaina

Nell'arco di un decennio sono state determinate le sequenze genomiche del DNA per la subunità di 80-kDa della μ -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^oa 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 μ -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 μ -calpaina umana e ha mostrato che la regione 5'-UTR regione del gene della μ -calpaina umana è altamente omologa con le 5'-UTR regioni del gene della μ -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) espresa 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: espresa 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 -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 cappio 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 α che della m-calpaina (table 2). Infatti questi residui sono altamente conservati nelle calpaine che sono state sequenziate fin ora (table 2) mostrando la loro importanza nell’associazione delle subunità di 28-80 kDa sia nella α 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 NH₂ -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 98-111 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-indotta delle calpaine, allora i piccoli cambiamenti strutturali nella

regione NH₂ 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 (k_i) 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 NH₂ 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 □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 NH₂ e un linker) piuttosto che i quattro domini predetti dalla sequenza aminoacidica. Il dominio cristallografico I (sequenza NH₂ 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 (NH₂ - 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-indotto delle calpaine (Hosfield *et al.*, 1999) studi recenti hanno mostrato che il dominio IIa/IIb espresso dalla μ -calpaina può legare ogni atomo di calcio in un peptide coppia 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 μ -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 μ -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 μ -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 μ -calpaina; residuo 265 nella m-calpaina) e ad alcuni siti nel dominio III (residui 363 o 472 nella μ -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 μ -calpaina; 9 amminoacidi dalla m-calpaina) dalla sequenza NH₂ 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 (μ -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 μ - 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 μ -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 (μ -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 μ -calpaina in presenza di calcio comporta soltanto una maggiore degradazione prodotta dalla subunità di 80-kDa; la sequenza NH₂ terminale di questo frammento ha inizio al residuo 515 (μ -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 μ -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 μ - ed m- causa significativi cambiamenti di conformazione, questi

cambiamenti implicano una perdita o una parziale apertura del dominio II (IIa ,IIb) e della parte NH₂-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 μ - 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 μ 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 μ -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 Ca²⁺ 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 μ -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 μ - 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 μ -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 collageno, che non è degradato da entrambe le calpaine ubiquitarie; e la proteasi espressa non è attivata da 15 mM Ca²⁺ (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 μ - 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 Ca²⁺-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 Ca²⁺-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 Ca²⁺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 Ca²⁺ 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, μ -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 \square e della m-calpaina per ottenere una forma proteoliticamente attiva della calpaina 9. L'eterodimero della calpaina 9 richiede 125 \square 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 \square 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 NH₂ 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 α e m-calpina. 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 di Razza African Black del peso di 90 Kg (+/- 10 Kg) dell'età di 12 mesi provenienti da una Azienda del potentino.

Le indagini sono state effettuate sui seguenti muscoli: *Tibialis cranialis caput tibiale*, *Tibialis cranialis caput femorale*, *Gastrocnemius pars externa*.

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

Figura 1



I campioni studiati (Fig. 1): sono stati prelevati durante la macellazione in momenti diversi della fase di *rigor - mortis* (0, 2, 4 e 6 giorni) congelati rapidamente in azoto liquido (-196°C) al fine di bloccare l'attività enzimatica e conservati a -80°C fino alle successive analisi istochimiche ed immunoistochimiche.

Su sezioni trasversali di muscolo di 8 µ, ottenute al criostato, sono state effettuate:

tipizzazioni istologiche con ematossina - eosina per l'identificazione dell'aspetto morfologico (integrità delle fibre, alterazioni patologiche);

caratterizzazioni istochimiche per valutare l'attività ATPasica della miosina (indice del tipo di contrazione rapida o lenta), l'attività succinico-deidrogenasica (indice del tipo di metabolismo: glicolitico o ossidativo) e la presenza di proteine miofibrillare minori quali calpaine e calpastatine;

analisi morfometriche eseguite attraverso un sistema d'analisi d'immagine (Kontron, KS 300, Zeiss) per valutare la misura dell'area, del perimetro del diametro minimo e massimo.

Per ogni muscolo sono state misurate circa 200 fibre, derivanti da un numero di campi casuali compreso tra due e otto.

Il numero del miofibre è stato determinato a partire dalle stesse sezioni utilizzate per lo sviluppo delle caratterizzazioni istochimiche.

Istologia

I campioni prelevati, sono stati fissati nel liquido di Bouin e inclusi in paraffina per rendere possibile il taglio al microtomo.

Sezioni di 5µm, sono state colorate con Ematossilina di Mayer + Eosina, per valutare, rispettivamente, la presenza di nuclei e lo sviluppo cellulare e consta delle seguenti fasi:

- passaggio dei campioni, per 10 min nell'ematossilina di Mayer, per evidenziare i nuclei;
- viraggio in acqua di fonte per 10 min;
- passaggio in eosina per creare un colore di contrasto e poter sfruttare tale colorazioni per gli scopi previsti.

Istochimica

La tipizzazione istochimica che permette di valutare l'attività ATPasica della miosina e succinico-deidrogenasica, consta delle seguenti fasi:

- pre - incubazione acida in una soluzione di CaCl₂ 0,18M a pH 4,2- acido acetico acetato di potassio – per 10' per disattivare l'ATPasi presente nelle fibre acido-labile;
- incubazione con una soluzione tampone a pH 7,8 – costituita da CaCl₂ 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 – CaCl₂ 0,18M – KCl – ATP; tale soluzione rappresenta il substrato specifico per evidenziare l'enzima ATPasi localizzato nella testa della miosina;
- lavaggio, per tre volte (ognuno di circa 30'') in una soluzione costituita da CaCl₂ e acqua distillata;– tale soluzione fornisce gli ioni calcio necessari per reagire con il fosfato inorganico proveniente dall'idrolisi dell'ATP in ADP provocata dall'ATPasi, formando il fosfato di calcio solubile;
- incubazione per 3', in una soluzione costituita da CoCl₂ e acqua distillata, con formazione di fosfato di cobalto;
- lavaggio per quattro volte (ognuno per un 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.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati rilevati è stata effettuata utilizzando un modello di analisi della varianza in cui i fattori sono stati considerati fissi e l'effetto di ciascuno è espresso come deviazione dalla media μ . Per i parametri istologici il modello è stato il seguente:

$$y_{ijk} = \mu + Mu_i + TF_j + (Mu * TF)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

y_{ijk} = il valore di k^{ma} osservazione relativa j^{mo} tipo di fibra dell'i^{mo} muscolo;

Mu_i = effetto fisso comune a tutte le osservazioni relative al i^{mo} muscolo (i=1,2,3);

TF_j = effetto fisso comune a tutte le osservazioni relativo al j^{mo} tipo di fibra (k=1,2,3);

$(Mu * TF)_{ij}$ = effetto fisso comune a tutte le osservazioni relative all'interazione del i^{mo} muscolo con il j^{mo} tipo di fibra;

ϵ_{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 metodo DAKO

La tecnica utilizzata per la localizzazione delle Calpaine (μ - e m-) e della Calpastatina consta delle seguenti fasi :

- le sezioni, precedentemente conservate nel congelatore ($- 80^{\circ}\text{C}$) apposte su appositi vetrini, sono state esposte a temperatura ambiente per circa 20 min;
- i vetrini disposti faccia a faccia in piccoli vasi sono fissati con l'acetone (mantenuto a 4°C) e conservati in frigo per 4 minuti;
- trascorsi i 4 min i vetrini vengono immersi per 5 min in PBS (phosphate buffered saline) a pH (7.2-7.4) precedentemente preparato;
- i vetrini sono asciugati singolarmente con carta bibula, e le fette sono cerchiare con la PAP PEN al fine di evitare che l'anticorpo trasbondi e non agisca sui preparati;
- successivamente i vetrini, depositi nelle camere umide vengono trattati con il Perossido di idrogeno e Metanolo per 30 min con lo scopo di bloccare le ossidasi endogene.(la soluzione è composta da 4 parti di Perossido di Idrogeno al 3% e una parte di alcool metilico);
- trascorsi 30min, i vetrini sono lavati con PBS per 5 minuti e poi trattati con anticorpi primari.

Gli anticorpi monoclonali solitamente utilizzati sono:

Anti-calpaina94: Anti-calpaina94 (DOMINIO I) (SIGMA).

La subunità maggiore è stata rivelata nel coniglio usando un peptide sintetico corrispondente al dominioI della subunità maggiore della p94 (Rabbit-anti-human).

Anti- μ calpaina: Anti- μ -calpaina (DOMINIO IV) (SIGMA).

E' stata rivelata nel coniglio usando un peptide sintetico corrispondente al dominio IV della subunità maggiore della μ -calpaina umana (Rabbit-anti-human).

Anti- m-calpaina: anti m-calpaina monoclinale (DOMINIO III/IV) del IgGI del topo (SIGMA). Prodotta immunizzando un topo e purificando la m-calpaina dal muscolo scheletrico del bovino come immunogeno (Mouse-anti-bovine).

Anti-calpastatina: anti-calpastatina monoclinale del IgGI del topo (SIGMA). Questo anticorpo è prodotto immunizzando un topo e purificando la calpastatina dal muscolo scheletrico del bovino come immunogeno (Mouse-anti-bovine).

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 (1 di anticorpo 199 di diluente).

- i vetrini vengono disposti in camere umide ed incubati ricoperti da carta argentata per 2 ore;
- trascorse le due ore, i vetrini sono lavati, mediante due passaggi di 5 minuti ognuno con PBS;
- è stato inoculato l'anticorpo secondario Dako Link giallo su ciascuna sezione per 20 min;
- sono seguiti altri due passaggi in PBS sempre di 5min ciascuno;
- sui preparati è stata incolata la streptavidina Dako Link rosso ed incubata per 15 min. La streptavidina è servita per formare il legame con il cromogeno;
- i vetrini sono nuovamente lavati con PBS;
- successivamente è stato aggiunto il cromogeno DAB Dako sulle sezioni per 5 min;

- è eseguito un lavaggio in acqua di fonte per 3 min con il fine di disattivare la reazione innescata dal cromogeno;
- è stato eseguito un altro lavaggio dei vetrini in acqua distillata per 3 min per allontanare il calcare;
- i vetrini vengono immersi in ematossilina per 5 min per la colorazione nucleare;
- sono poi in seguito lavati con acqua di fonte per 5 min e con acqua distillata per 3 min;
- i vetrini sono stati disidratati e chiarificati in xilolo e poi montati con una goccia di EUKIT (collante istologico) ciascuno, con un vetrino copri oggetto.

RISULTATI

Istochimica del muscolo

Dall'osservazione dei preparati istochimici si evidenzia nel muscolo *Gastrocnemius pars externa* (Fig. 2) la presenza di tre tipi di fibra: FG (fast-twitch glycolytic) bianca, con un' elevata attività m-ATPasica (indice del tipo di contrazione: rapida o lenta) e bassa attività ossidativa, FOG (fast-twitch oxidative glycolytic) rosa, con moderata attività m-ATPasica ed intermedia attività ossidativa, SO (slow-twitch oxidative) rossa, con bassa attività m-ATPasica ed elevata attività succinico-deidrogenasica (indice del tipo di metabolismo: glicolitico o ossidativo).

Lo stesso non si può affermare per gli altri muscoli oggetto di indagine nei quali, infatti, si nota l'assenza delle fibre di tipo FG; queste ultime sono associate esclusivamente ad una contrazione rapida e ad un metabolismo di natura glicolitico. La loro assenza, negli altri due muscoli oggetto di indagine quali: *Tibialis cranialis caput femorale*, (Fig. 3) *Tibialis cranialis caput tibiale* (Fig. 4)e, potrebbe essere imputata ad una conversione di fibre di tipo FG in fibre di tipo FOG, pressoché totale nei muscoli di questi soggetti.

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 *Tibialis cranialis* mostra due origini separate: il capo femorale ed il capo tibiale. Il muscolo *Tibialis cranialis caput femorale* origina attraverso un tendine a livello del condilo laterale del femore, corre lungo l'incisura tibiale. Il muscolo *Tibialis cranialis caput tibiale* origina dalla cresta cnemiale craniale e laterale. Entrambi i capi e a livello del terzo prossimale del tibiotarso si fondono formando un sottile tendine terminale. Dal grafico 1, in cui si riporta la percentuale dei tipi di fibra nei muscoli considerati, si evidenzia un'incidenza più elevata di fibra SO rispetto a quelle FOG nel muscolo *Tibialis cranialis caput femorale* (54 vs 46) e nel muscolo *Tibialis cranialis caput tibiale* (52 vs 48).

Il muscolo Gastrocnemius pars externa origina sull'aponeurosi finale del muscolo Iliotibialis lateralis e dal condilo lateale del femore, alla fine del terzo prossimale del tibiotarso si fonde alla Pars intermedia formando un tendine.

Nel muscolo Gastrocnemius pars externa, che mostra la presenza di tutti e tre i tipi di fibra, prevalgono le FG (38%) seguite dalle SO (35%) e dalle FOG(27%).

Dall' analisi della varianza (Tabella 1) risulta la presenza di un'interazione significativa ($P < 0,001$) del "muscolo x tipo di fibra" per tutte le caratteristiche morfometriche che sono state oggetto di valutazione. Nel muscolo Tibialis cranialis caput tibiale entrambi i tipi di fibra presentano un'area con sezione trasversale più piccola, rispetto al muscolo Tibialis cranialis caput femorale (Tabella 2), tale differenza risulta essere del 25% (3451,06 vs 4639,37 $P < 0,001$) per le FOG e del 19% (2790,72 vs 3452,22 $P < 0,001$) per le SO. Gli altri parametri morfometrici considerati mostrano andamento simile in accordo con gli studi di Velotto e Crasto (2004) sui quattro differenti muscoli dello struzzo di razza Blue Neck, (Velotto et al., 2002).

Per quanto riguarda il muscolo Gastrocnemius pars externa (Tabella 3), le dimensioni delle fibre FG e FOG simili mentre le fibre SO sono significativamente più piccole ($P < 0,001$).

Immunoistochimica del muscolo

L'indagine al microscopio ottico dei campioni immunoistochimici ha reso evidente la localizzazione del sistema calpaina/calpastatina in post-mortem.

Calpastatina

A tempo 0 (fig. 5a) le sezioni orientate trasversalmente risultano positive alla calpastatina e si riscontra un a discreta positività a livello perinucleare, e in prossimità delle membrane. 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. 5b)

m-Calpaina

A tempo 0 (fig. 6a) 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) 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 per essere attiva ha bisogno di una concentrazione di Ca²⁺ di circa 0.2-0.6 mM, concentrazione troppo elevata per essere

presente a tempo 0 (Muratami *et al.*, 1981). Essa, infine a 2gg è presente chiaramente localizzata lungo la linea Z in seguito all'aumento di ioni Ca²⁺ mentre scompare del tutto a 4 e 6 gg *post-mortem*. (fig. 6b)

μ-Calpaina

A tempo 0 (fig. 7a) si riscontra una mancata positività diffusa in tutte le fibre muscolari e in sezioni longitudinali e trasversali è chiara la distribuzione della μ-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 μ-calpaina sono intermolecolari, essi non andranno a completamento e, quindi, la μ-calpaina manterrà parzialmente la sua attività anche dopo una successiva autolisi. A 2gg è chiara la sua distribuzione in forma attiva nel citosol e verosimilmente lungo le linee Z, mentre a 4gg e 6gg *post-mortem* scompare (fig. 7b). 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 Ca²⁺ è compresa tra 5-65 μM (Kanawa *et al.*, 2002).

Calpaina p94

La calpaina p94 manifesta indipendenza dal calcio. A tempo 0 (fig. 8a) è presente e a 2gg, 4gg, 6gg *post-mortem*, risulta chiaramente localizzata a livello della linea Z risultando anche positiva la membrana perinucleare e il 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. 8b)

DISCUSSIONI

Istochimica del muscolo

Risulta difficile paragonare la muscolatura della cintura pelvica dello struzzo con gli alti ratiti in quanto la letteratura è ancora poco conosciuta. Nell'Emu (Patak e Baldwin 1998) il muscolo *Tibialis cranialis caput tibiale* ha un'origine carnosa cranialmente, sulla parte prossimale del tibiotarso mentre il muscolo *tibialis cranialis caput feorale* è multipennato e origina attraverso un sottile tendine dal condilo laterale del femore. Questi muscoli si uniscono e il loro tendine di inserzione si inserisce prossimamente sul tarsometatarso.

Nel Kiwi (McGowan 1979) il muscolo Gastrocnemius pars externa, similmente al nostro studio origina dalla superficie laterale del femore.

In accordo con lo studio di Velotto e Crasto (2004) effettuato sui quattro muscoli dello struzzo di razza Blue neck, il nostro studio mostra che le fibre FG sono totalmente assenti nei muscoli *Tibialis cranialis caput tibiale* e *tibialis cranialis caput femorale*.

Queste fibre sono principalmente durante movimenti rapidi (Alexander and Goldspink, 1977). L'assenza di tali fibre nei due muscoli considerati può essere legata alla conversione delle fibre FG in fibre FOG, caratterizzate dal metabolismo glicolitico-ossidativo più versatile e correlate con le differenze nelle domande energetiche durante il volo (Meyers, 1993). Velotto e Crasto 2004, mostrano che i muscoli

Femorotibialis medius e *Iliotibialis lateralis pars preacetabularis* hanno una percentuale simile di fibre FOG (42 vs. 44) ed SO (58 vs. 56) e in particolare prevalgono le fibre SO, il loro ruolo funzionale nella gamba è mantenere la postura (Suzuki et al., 1985). Iwamoto et al. (2002) in uno studio effettuato sul muscolo di pollo è stato osservato che il muscolo *Iliotibialis lateralis* è composto da fibre FOG ed FG. Sakakibara et al. (2000) usando i 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 *iliotibialis lateralis* è composto da due tipi di fibre, IIR and IIW, mostrando rispettivamente le forti e le deboli ridotte attività della dinicotinamide adenindinucleotide dedrogenasi. Torrella et al. (1998b) hanno notato che i quattro muscoli dell'ala dei selvaggi gabbiani dalle gambe-gialle (*Larus cachinnans*) (scapulotriceps, pectoralis, scapulohumeralis, and extensor metacarpi) mostrano le più alte percentuali di veloci fibre glicolitico-ossidative (>70%) e le più basse percentuali di lente fibre ossidative (<16%) rispetto ai muscoli coinvolti nella locomozione del non volo (gastrocnemius and iliotibialis). I muscoli della zampa studiati includono una considerevole popolazione delle lente fibre ossidative (>14% in molte regioni), suggerendo che essi sono adatti alle attività posturali. Le variazioni regionali e le conseguenti distribuzioni dei tipi di fibre nel muscolo Gastrocnemius, può riflettere le differenti richieste funzionali, disposte su questo muscolo durante la locomozione terrestre ed acquatica.

Immunoistochimica del muscolo

Dai risultati ottenuti sull'immunolocalizzazione delle calpaine e della calpastatina durante la conservazione post-morte, risulta chiaro che la discreta positività della m-calpaina nelle prime ore post-mortem, in accordo con Koohmaraie *et al.*, (1999), è dovuta all'insufficiente concentrazione di Ca²⁺ necessaria per la sua attivazione. Essa, infatti, richiede concentrazioni di catione 0.2-0.6 mM troppo elevate per essere presente in vivo nell'animale appena macellato. La sua assenza dalle 48 ore in poi, invece, è dovuta ad una eccessiva presenza di ioni Ca²⁺ che la rende completamente inattiva. E' stata osservata, inoltre, una marcata localizzazione della m-calpaina in prossimità delle membrane sarcoplasmatiche e nucleari principalmente nelle prime ore *post-mortem* e una localizzazione sulla linea Z fino a 48-52 ore, confermando, pertanto, in accordo con Koohmaraie (1997), che la μ -calpaina, al contrario della m-calpaina, è principalmente responsabile dell'intenerimento delle carni nei primi stadi dopo la morte. L'estensione della proteolisi, indotta dalle calpaine è modulata dalla calpastatina inibitore specifico, intracellulare ed ubiquitario delle calpaine. Dal nostro studio si riscontra 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 Ca²⁺. 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 Ca²⁺, 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 chiaramente localizzata a livello della linea Z ed è presente a tutte le ore *post-mortem*. Questo è giustificato dal fatto che, in accordo con la letteratura, essa presenta una indipendenza dal Ca²⁺

CONCLUSIONI

Dai risultati istochimici ottenuti, si è vista 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.

Dai risultati ottenuti si evince che le fibre FG sono totalmente assenti nei muscoli *Tibialis cranialis caput tibiale e tibialis cranialis caput femorale*.

In seguito alla macellazione avvengono, nei muscoli, una serie di trasformazioni biochimiche e biofisiche ad opera di alcuni enzimi, che porteranno via ad un abbassamento del pH del muscolo, favorendo la coagulazione delle proteine. In questo periodo sparirà gradualmente la fase di *rigor mortis*, durante la quale la carne non è adatta all'alimentazione. Dopo la scomparsa del *rigor mortis*, inizierà la fase di frollatura, che rende la carne adatta al consumo.

Le prove fin a oggi pervenute indicano che il sistema proteolitico Ca²⁺-dipendente formato dalla Calpaine ed il loro inibitore endogeno Calpastatina, hanno 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 Ca²⁺ 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 immunostochimica e quelli riportati in bibliografia, possiamo affermare che le calpaine scindono le proteine della linea Z e proteine associate:

Troponina T, Troponina I, Tropomiosina, α -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 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 Ca²⁺-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, KITA 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.

DAYTON WR, GOLL DE, ZEECE MG, ROBSON RM, AND REVILLE WJ. A Ca²⁺ activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification characterizazion 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 β -glucuronidase. *Meat Science* **20**, 1-18, 1987.

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.

GEESINK GH. AND KOOHMARAIE M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *J Anim Sci* **77**, 2685–2692, 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 μ -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 Ca²⁺-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.

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 Ca²⁺-dependent protease activity and novel mode of enzyme activation. *EMBO J* 18: 6880-6889, 1999.

HUBER D AND OJHA M. Immunocytochemical localization of Ca²⁺-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.

IMAYOH 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.

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

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 Ca² on binding of calpain to calpastatin. *J Biol Chem* 264: 17888–17896, 1989.

KOOHMARAIE M. The role of Ca²⁺ -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.

MINAMI Y, EMORI Y, IMAJOH-OHMI S, KAWASAKI H, AND SUZUKI K. Carboxyl-terminal truncation and site-directed mutagenesis of theEF 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. Ca²⁺-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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺-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* Ca²⁺ 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 Ca²⁺-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 Ca²⁺ activated protease involved in myofibrillar protein turnover. *Federation Proc* 35: 1746, 1976.

OTSUKA Y AND GOLL DE. Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-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, HILLAIRES 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 Ca²⁺-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 α -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 α -calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 267: 24585–24590, 1992.

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.

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

Ca²⁺ -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 Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 268: 19476–19482, 1993.

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 Ca²⁺-dependent proteinase activated by micromolar levels of Ca²⁺.

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.

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 μ -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 μ - 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 Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1333–1339, 2001.

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.

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 Ca²⁺ 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.

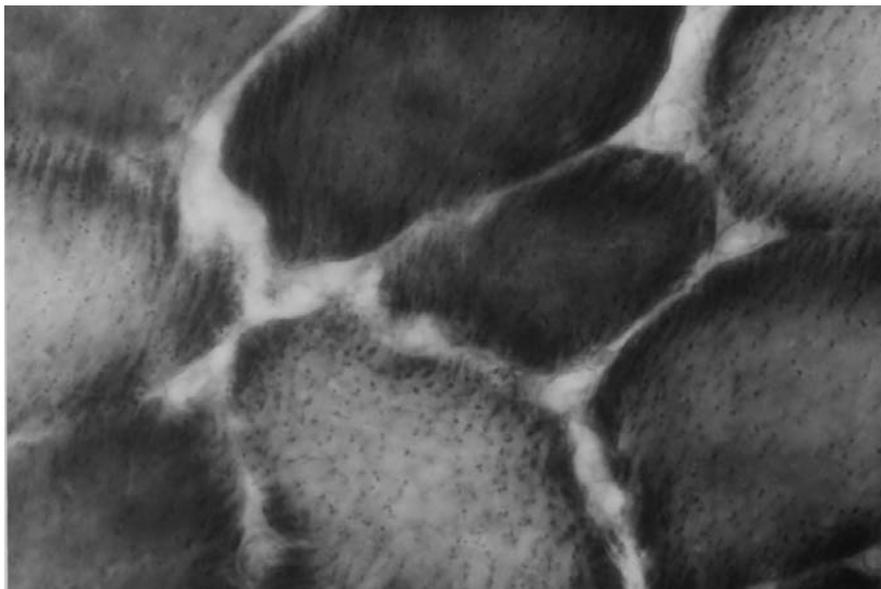


Fig. 2 *Gastrocnemius pars externa* (400x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra le fibre SO (slow twitch-oxidative) e FOG (fast-twitch oxidative-glycolytic)

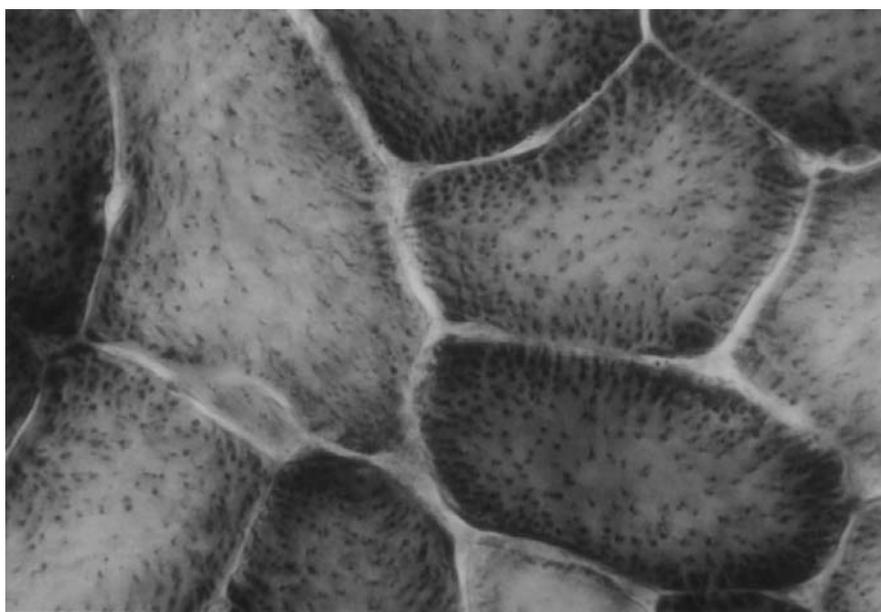


Fig. 3 *Tibialis cranialis caput tibiale* (400x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra le fibre SO (slow twitch-oxidative) e FOG (fast-twitch oxidative-glycolytic)

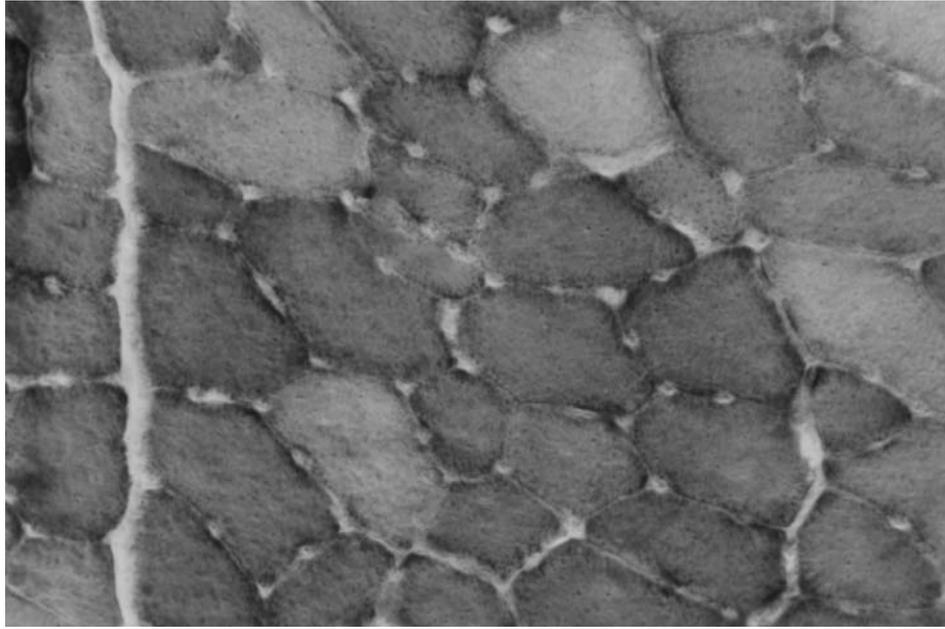


Fig. 4 *Tibialis cranialis caput femorale* (160x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra le fibre SO (slow twitch-oxidative) e FOG (fast-twitch oxidative-glycolytic)

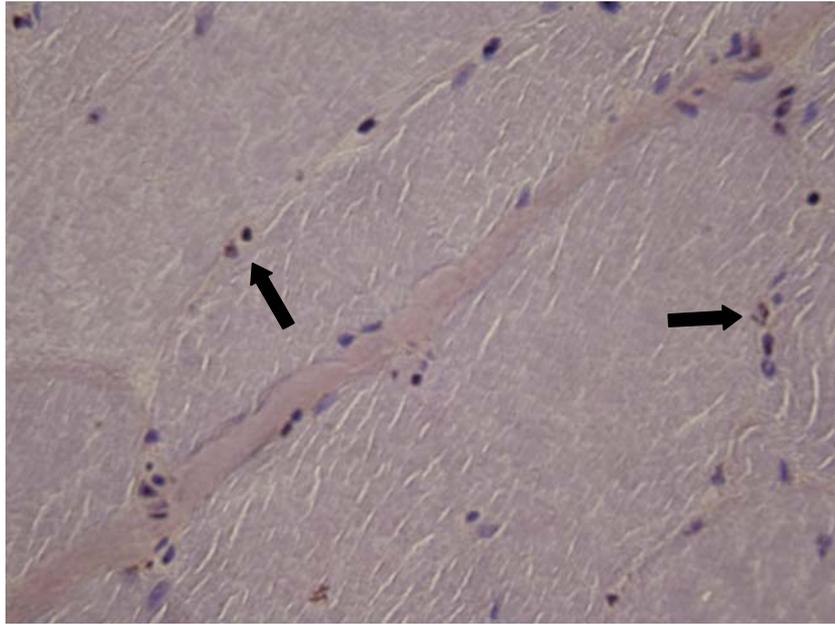


Fig. 5a. *Gastrocnemius pars externa* (250x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione immunocistochimica per rilevare la presenza della calpastatina. L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della calpastatina. A tempo 0 la calpastatina dà una reazione moderatamente positiva a ridosso della zona perinucleare e vicino alla membrana cellulare.

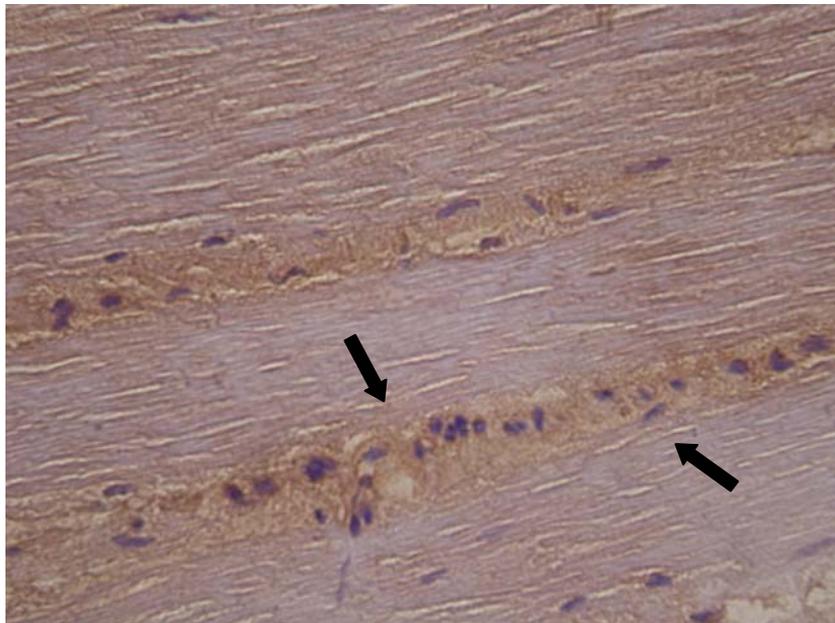


Fig. 5b. *Gastrocnemius pars externa* (250x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione immunocistochimica per rilevare la presenza della calpastatina. L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della calpastatina. A 4 giorni la calpastatina dà reazione positiva.

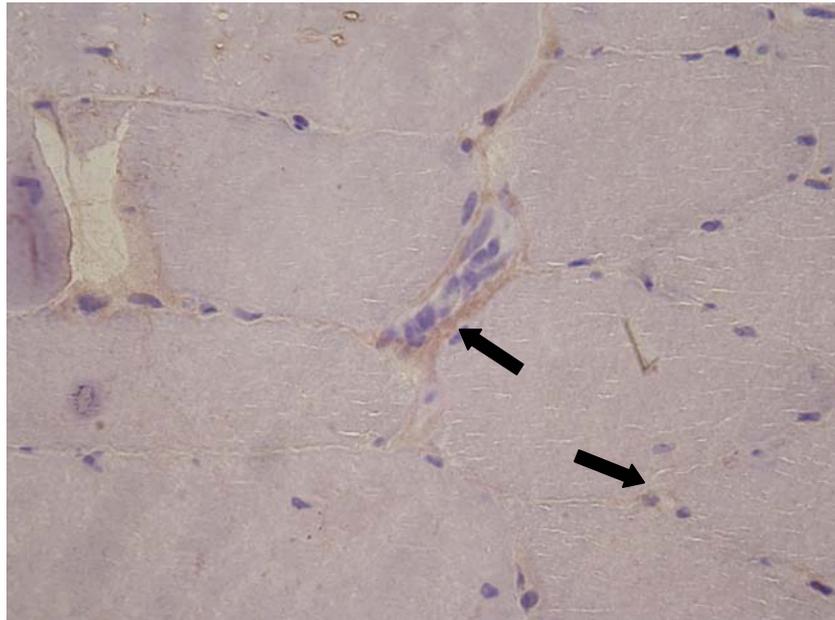


Fig. 6a. *Tibialis cranialis caput tibiale* (250x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione immunostochimica per rilevare la presenza della m-calpaina (DOMAIN III/IV). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della m-calpaina. A tempo 0 la m-calpaina dà una reazione positiva a ridosso del connettivo e del sarcolemma.

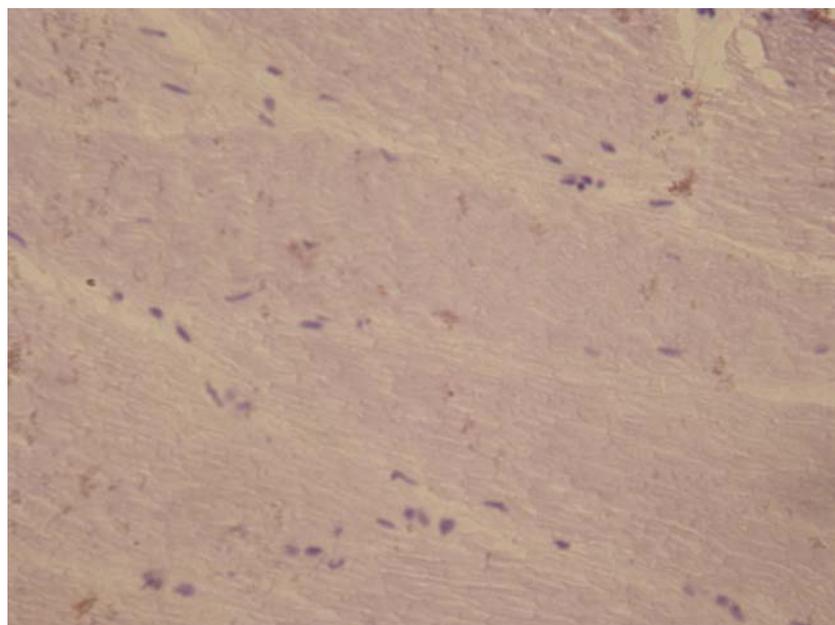


Fig. 6b. *Tibialis cranialis caput tibiale* (400x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione immunostochimica per rilevare la presenza della m-calpaina (DOMAIN III/IV). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. A 6 giorni la m-calpaina scompare totalmente.

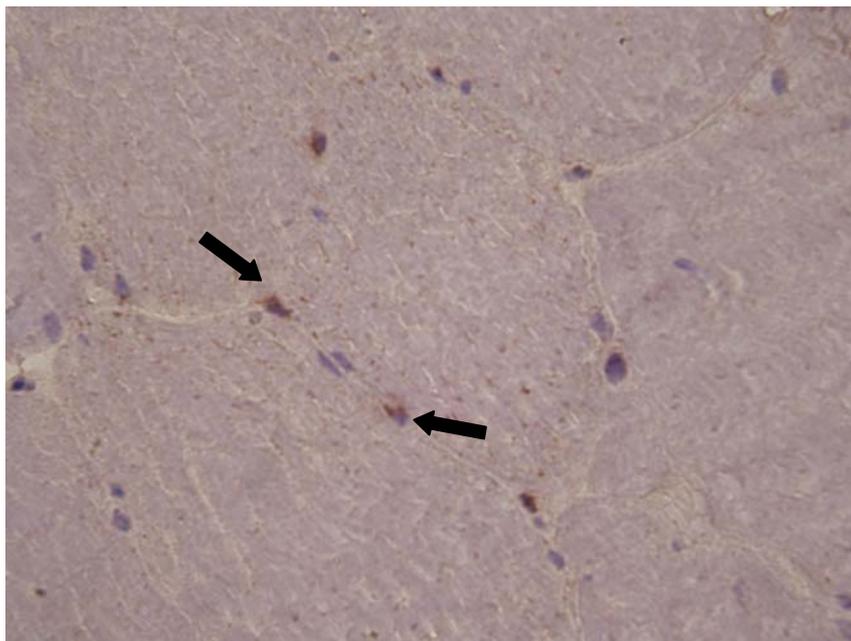


Fig. 7a. *Tibialis cranialis caput femoralis* (250x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione immunocistochimica per rilevare la presenza della μ -calpaina (DOMAIN IV). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della μ -calpaina. A tempo 0 la μ -calpaina dà una reazione positiva vicino alle membrane sarcoplasmatica e nucleare.

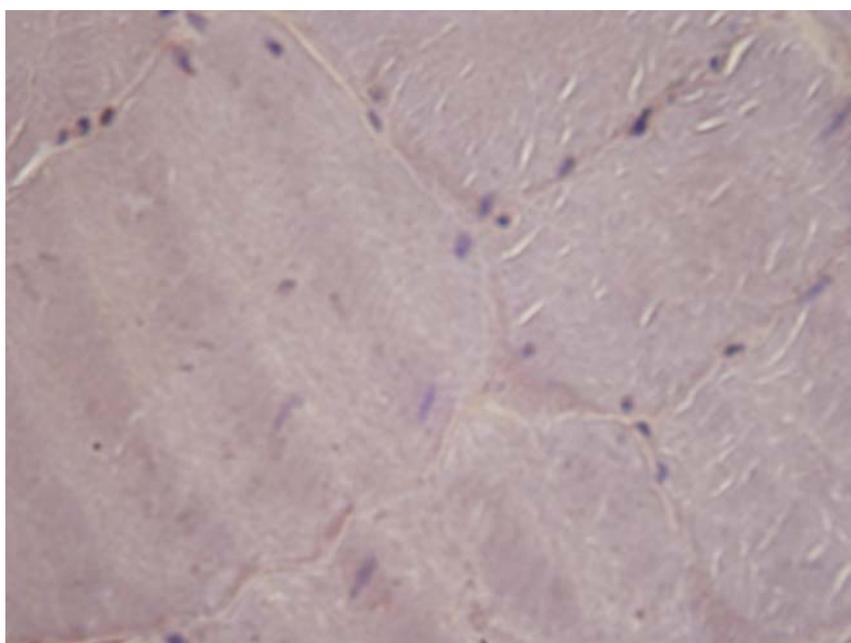


Fig. 7b. *Tibialis cranialis caput femoralis* (400x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione immunocistochimica per rilevare la presenza della μ -calpaina (DOMAIN IV). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. A 6 giorni la μ -calpaina scompare totalmente.

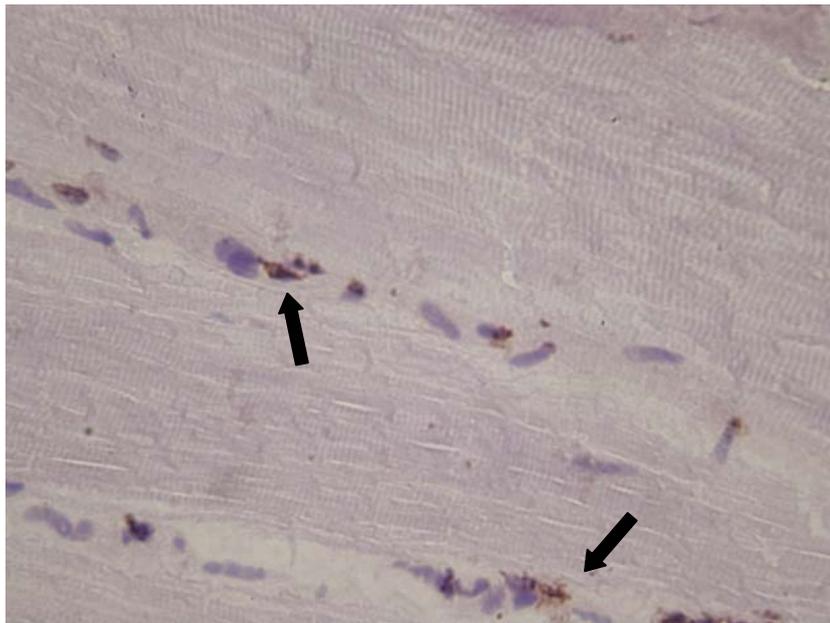


Fig. 8a. *Gastrocnemius pars externa* (400x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione immunohistochimica per rilevare la presenza della p94 (DOMAIN I). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva della p94. A tempo zero la p94 dà una reazione positiva.

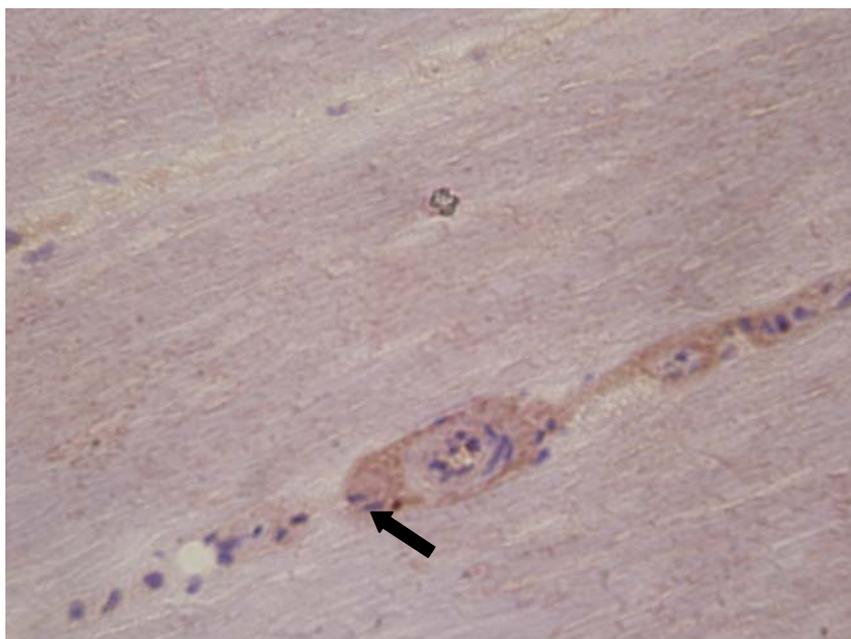
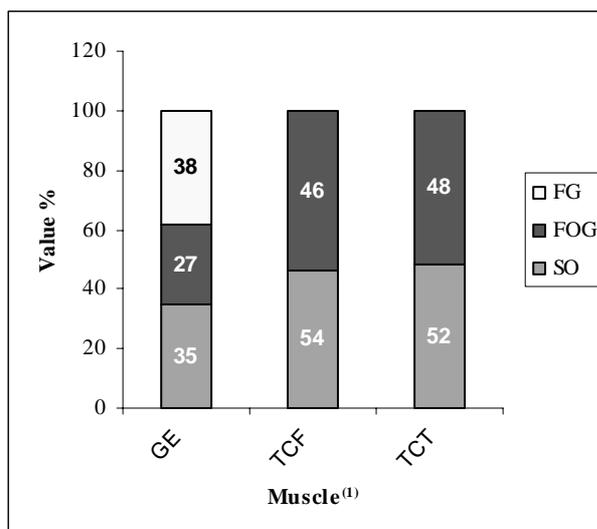


Fig. 8b. *Gastrocnemius pars externa* (400x) Sezione trasversale di muscolo (8- μ m) trattata con tipizzazione immunohistochimica per rilevare la presenza della p94 (DOMAIN I). L'integrità delle fibre è stata verificata mediante la colorazione ematossilina-eosina. La freccia indica la reazione positiva 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.

Grafico 1



GE: *Gastrocnemius pars externa*; TCF: *Tibialis cranialis caput femorale*; TCT: *Tibialis cranialis caput tibiale*

Tab. 1 Valori della F relativi ai parametri morfometrici delle fibre muscolari			
	F ⁽¹⁾		
parametro	muscolo	tipo di fibra	Interazione muscolo* fibra
area	164,3***	178,22***	27,55***
perimetro	190,66***	212,72***	20,98***
⁽¹⁾ *** P < 0,001			

Sistema Ca²⁺ - dipendente Calpaine e Calpastatine

Tab. 2 valore medio e coefficiente di variazione delle caratteristiche morfometriche dei tipi di fibra nei muscoli considerati				
Tipo di Fibra				
Muscolo	FOG		SO	
	x	c.v., %	x	c.v., %
	Area/m ²			
TCF	4639,37	29	3452,22	37
TCT	3451,06	32	2790,72	32
Perimetro/m				
TCF	261,34	16	223,51	19
TCT	221,28	16	198,25	17

TCF: Tibialis cranialis caput femorale; TCT: Tibialis cranialis caput tibiale

Tab. 3 Gastrocnemius pars externa. Valori medi (x) e coefficiente di variazione						
Tipi di Fibre						
Parametri	FG		FOG		SO	
	x	c.v., %	x	c.v., %	x	c.v., %
Area/m²	3542,1	32	3576,88	33	3134,8	30
Perimetro/m	226,01	17	225,79	17	211,44	15