

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Obecná biologie



**PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

Šimon Bartoš

Úloha kalpainových proteáz při buněčné migraci a invazivitě
Role of calpain proteases during cell migration and tumour invasivity

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Tomáš Vomastek Ph.D.

Praha, 2017

Poděkování: Chtěl bych poděkovat svému školiteli Ing. Tomášovi Vomastkovi Ph.D. za vstřícný přístup při vedení práce a trpělivost při její korekci. Dále pak Mgr. Josefu Čáslavskému za uvedení do problematiky a pomoc při orientaci v odborné literatuře. Mé poděkování patří také celému kolektivu Laboratoře buněčné signalizace AV ČR, který byl vždy ochoten poradit.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24.8.2017

Podpis:

Obsah

1. Abstrakt	8
2. Abstract	9
3. Seznam zkratk	10
4. Úvod	11
5. Proteázy	11
5.1. Katalytická triáda	12
5.2. Cysteinové proteázy	13
6. Kalpain	14
6.1. Struktura kalpainu	15
6.2. Lokalizace kalpainu	16
6.3. Regulace kalpainu	16
6.3.1. Regulace vápenatými ionty	17
6.3.2. Regulace malou podjednotkou	17
6.3.3. Regulace endogenními proteiny	17
6.3.4. Regulace post-translačními modifikacemi	18
6.3.5. Fosforylace	18
6.3.6. Sumoylace	19
6.3.7. Autoproteolýza	19
7. Substráty kalpainu-1 a kalpainu-2 zahrnuté v buněčné migraci	19
7.1. Buněčná migrace	19
7.2. Malé Rho GTPázy	20
7.3. Substráty kalpainu regulující funkci malých GTPáz z rodiny Rho	21
7.3.1. RhoA	21
7.3.2. Rac1	21
7.3.3. Tiam-1	21
7.4. Substráty regulující fokální adheze	22
7.4.1. FAK (focal adhesion kinase)	22
7.4.2. Integriny	24
7.4.3. Paxillin	24
7.4.4. Talin	25
7.4.5. Vinculin	26
8. Závěr:	27
9. Reference	29
Použité internetové zdroje	31

1. Abstrakt

Kalpainové proteázy jsou cysteinové proteázy účastnící se limitní proteolýzy funkčně různorodých proteinů. Mezi substráty patří mimo jiné i proteiny fokálních adhezí, dále pak proteiny signálních drah rodiny Rho, proteinfosfatázy, fosfolipázy a transmembránové integrínové receptory.

Štěpením těchto substrátů, se kalpain podílí na remodelaci aktinového cytoskeletu a reorganizaci fokálních adhezí. Působení kalpainu je striktně regulováno na několika úrovních, zejména pak pomocí vápenatých iontů, endogenními proteinovými inhibitory, post-translačními modifikacemi, autoproteolýzou a jeho malou (regulační) podjednotkou. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o dvou nejlépe prostudovaných izoformách této proteázy, kalpainu-1 a kalpainu-2, popsat jejich strukturu, způsoby regulace, interakci se substráty a jejich následný vliv na stabilitu fokálních adhezí a buněčnou migraci.

Klíčova slova: Kalpain, Proteáza, Fokální adheze, Buněčná migrace, Paxillin, Talin, Vinculin, Integrin, FAK, Rho GTPázy, Limitní proteolýza

2. Abstract

Calpain proteases are cysteine proteases which are participating in limited proteolysis of functionally divergent proteins. Calpains substrates include focal adhesion proteins, proteins of Rho family signal pathways, protein phosphatases, phospholipases and transmembrane integrin receptors. By cleaving these substrates calpain regulates actin cytoskeletal remodeling and reorganization of focal adhesion and thus allows him to regulate cell migration. Calpain is strictly regulated on several levels and by several mechanisms. Calpains are regulated especially by calcium ions, endogenous protein inhibitors, post translational modifications, autoprolysis and by its small regulatory subunit. Objective of this work is to summarize existing knowledge about the most studied isoforms of calpain proteases, calpain-1 and calpain-2, describe their structure, mechanisms of regulation, interaction with substrates and how their cleavage affects cell migration.

Keywords: Calpain, Protease, Focal adhesion, Cell migration, Paxillin, Talin, Vinculin, Integrin, FAK, Rho GTPases, Limited proteolysis

3. Seznam zkratek

cAMP	cyclic- adenosin-monophosphate
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
ERK	extracellular signal regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
FAT	Focal adhesion targeting
FERM	F4.1 protein, E- ezrin, R- radixin, M moesin
FRNK	FAK related non kinase
GAP	GTPases activating protein
GDP	Guanosin diphosphate
GEF	Guanonine Exchange factor
GTP	Guanosin triphosphate
ILK	Integrin linked kinases
KDa	Kilodalton
LD	Leu-Asp motiv
LIMK	Lim domain kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MLCK	Myosin light chain kinase
PAK	protein kinase A
PEF	penta EF-hand
PIP2	Fosfatidil inositol bisfosfát
PIP _{Y661}	Phosphatidylinositol phosphate kinases gamma 661
PKC	Protein kinase C
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rho A	Ras homolog gene family
SOS	Son of sevenless
Sumo	Small ubiquitin-like modifier
TIAM	T-lymphoma invasion and metastasis

4. Úvod

Proteolytické štěpení pomocí proteáz představuje důležitý děj ve fyziologii organismů, neboť umožňuje buňkám, mimo rozštěpení a následné recyklace nežádoucích proteinů, také regulovat specifické buněčné děje, jako je transkripce, buněčná signalizace nebo migrace. Mechanismus proteolytického štěpení je evolučně konzervovaný a vyskytuje se od bakterií až po vyšší živočichy. V eukaryotických buňkách se různé typy proteolytických enzymů vyskytují ve většině buněčných kompartmentů, zejména pak v lyzosomech a proteasomech, kde dochází zpravidla k degradaci proteinů. Jiné se mohou vyskytovat v cytosolu, endoplasmatickém retikulu či semiautonomních organelách. Nicméně ne všechny proteázy štěpí proteiny uvnitř buněk. Existuje také celá řada proteolytických enzymů sekretovaných do mezibuněčného prostoru. Příkladem mohou být matrixové proteázy patřící do skupiny metaloproteáz, které štěpí proteiny extracelulární matrix a tím významně usnadňují buněčnou invazivitu. Dalším příkladem mohou být endopeptidázy, sekretované do lumen gastrointestinálního traktu, podílející se na štěpení proteinů na jednotlivé aminokyseliny.

U nižších organismů je funkce proteáz spojená hlavně s úplnou degradací proteinu, nicméně během evoluce získaly proteázy další více specializované funkce. U vyšších organismů se vnitrobuněčné proteázy podílí kromě degradace proteinů také na procesu, souhrnně označovaném jako limitní proteolýza. Jedná se o děj, během kterého jsou substráty proteáz specificky štěpeny v konkrétním místě, což zpravidla vede k modifikaci struktury a funkce příslušného substrátu. To může být doprovázeno změnou lokalizace, změnou aktivity či odlišnou schopností substrátu asociovat se svými interakčními partnery. Proteázy díky své schopnosti podílet se na modifikaci struktury a funkce svých substrátů získaly široké spektrum nových uplatnění v buněčných procesech jako je regulace lokalizace a distribuce proteinů nebo buněčná signalizace.

Důležitou skupinou proteáz kontrolující specifické buněčné pochody uvnitř buněk pomocí limitní proteolýzy představuje rodina cysteinových proteáz zvaná kalpainy. Tyto proteázy regulují celou řadu buněčných pochodů, od vývoje svalů až po buněčnou motilitu. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o dvou nejlépe prostudovaných kalpainových izoformách, kalpainu-1 a kalpainu-2 v regulaci specifické buněčné odpovědi, kterou je buněčná migrace a invazivita.

5. Proteázy

Proteázy jsou enzymy, které se podílí na proteolytickém štěpení cílových proteinů pomocí hydrolýzy peptidové vazby. Zpravidla je rozdělujeme na exopeptidázy, které štěpí protein od jeho konců, a endoproteázy štěpící protein uvnitř peptidového řetězce.

Sekvenční specifita

Většina proteolytických enzymů vykazuje sekvenční specifitu, tedy štěpí proteiny v závislosti na jejich primární struktuře. Avšak u některých proteáz není přítomnost specifické sekvence striktně vyžadována. Příkladem mohou být kalpainové proteázy, které pro štěpení preferuje oblasti, kde převládají hydrofobní aminokyseliny (Cuerrier, Moldoveanu and Davies 2005). Mezi jejich nejvýznamnější substráty patří zejména proteiny fokálních adhezí, dále pak malé GTPázy, fosfatázy, fosfolipázy a membránové receptory.

Substrátová specifita

Proteázy s vysokou a nízkou substrátovou specifitou se liší tvarem aktivního místa. U proteáz s vysokou sekvenční specifitou je struktura aktivního místa zpravidla ve formě úzké rýhy, nebo i tunelu, čímž je substrát selektován již na základě prostorového uspořádání, jako je tomu například u kalpainu. Naopak proteázy s nízkou substrátovou specifitou mají aktivní místo dobře přístupné pro široké spektrum různých substrátů, typickým tvarem je pak mělká prohlubeň.

5.1. Katalytická triáda

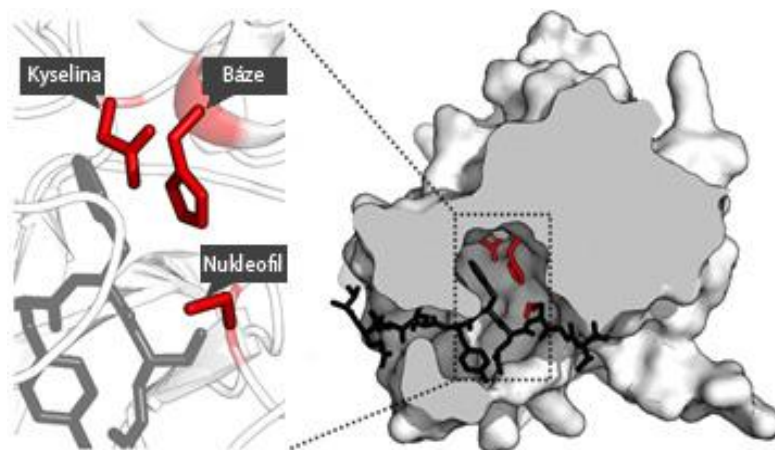
Aktivní místo proteáz obsahuje tzv. katalytickou triádu. Jedná se o tři aminokyselinové zbytky,

kyselý, bazický a nukleofilní, které leží v aktivním místě enzymu a umožňují kovalentní katalýzu substrátu (Obr. 1).

Reaktivita nukleofilního zbytku v aktivním místě je zvýšená přítomností funkčních zbytků dalších členů katalytické triády.

Zatímco báze napomáhá polarizaci a orientaci nukleofilu, kyselý zbytek celou polarizovanou strukturu stabilizuje. V některých

proteázách se mohou jednotlivé složky katalytické triády vyskytovat ve velkých vzdálenostech od sebe, správnou konformaci zauímají až po aktivaci enzymu (Gupta et al. 2010). Triádový motif s kyselým, bazickým a nukleofilním aminokyselinovými zbytky je obecně konzervovaný. Nicméně, na místě jednotlivých aminokyselinových zbytků může dojít k nekonzervovaným záměnám, kdy je např. kyselý zbytek zaměněn za neutrální nebo i bazický (tabulka 2).



Obrázek 1. Katalytická triáda proteázy TEV. Katalytická triáda se skládá kyseliny, báze a nukleofilního zbytku (vyznačeno červeně), umožňujících kovalentní katalýzu substrátu. Černě je vyznačena vazba substrátu. Převzato upraveno z (Thomas, Shafee, 2014. "Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity". PhD Thesis. University of Cambridge.)

Proteázy můžeme také dělit do 7 skupin. Jednotlivé skupiny jsou charakterizovány přítomností specifické aminokyseliny/kovu v aktivním místě (Tabulka 1). Na rozdíl od ostatních proteáz však asparaginové lyázy působí nehydrolyticky, ale za vzniku dvojně vazby dochází k eliminační reakci. Jejich zařazení do skupiny proteáz je tedy diskutabilní (Rawlings, Barrett and Bateman 2011).

Proteáza	Aktivní místo
Serinová proteáza	Serin
Cysteinová proteáza	Cystein
Threoninová proteáza	Threonin
Asparagová proteáza	Asparagová kyselina
Glutamátová proteáza	Glutamátová kyselina
Metaloproteáza	Kov, nejčastěji zinek
Asparaginová lyáza	Asparagin

Tabulka 1. Typy proteáz a jejich aktivní místo

5.2. Cysteinové proteázy

Cysteinové proteázy jsou proteolytické enzymy obsahující v aktivním centru aminokyselinové zbytky cystein a histidin. Cysteinové proteázy fungují nejlépe ve slabě kyselém, až slabě bazickém prostředí. Příkladem cysteinových proteáz jsou kalpainové proteázy, kaspázy, katepsiny, papain či bromelain. V savčích buňkách se vyskytují nejen v lyzosomech, kde katepsinové proteázy představují největší skupinu cysteinových proteáz, ale i v cytosolu, kde jsou zastoupeny především kalpainovými proteázami a kaspázami (Verma, Dixit and Pandey 2016).

Mechanismus funkce cysteinových proteáz

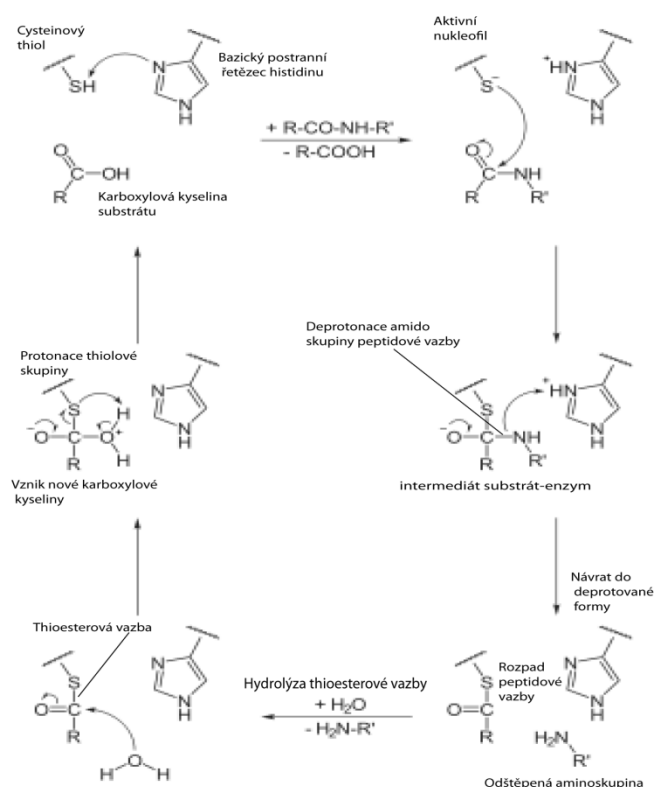
Cysteinové proteázy katalyzují hydrolyzu peptidové vazby mechanismem kovalentní katalýzy, které se účastní cysteinová a histidinová skupina. Katalýza peptidové vazby cysteinovými proteázami

Katalýza peptidové vazby cysteinovými proteázami je vícekrokový proces. Nejprve dochází k deprotonaci thiolu v aktivním místě enzymu přilehlým histidinovým zbytkem s bazickým postranním řetězcem. Deprotonovaná thiolová skupina se stává aktivovaným nukleofilem, který interaguje s uhlíkem karbonylové skupiny peptidové vazby substrátu. Dochází k tvorbě intermediátu substrát-enzym propojeného kovalentní thioesterovou vazbou. Následně histidin protonuje amido skupinu peptidové vazby což vede ke vzniku alfa aminoskupiny následně k oddělení fragmentu substrátu s N koncem a histidinový zbytek v proteáze je obnoven do

deprotonované formy. Thioesterová vazba je následně hydrolyzována, čímž vzniká nová C-koncová karboxylová skupina substrátu a dochází k regeneraci proteázy (Verma et al. 2016).

6. Kalpain

Kalpainové proteázy byly poprvé popsány v roce 1964 jako cysteinové proteázy, které vyžadují pro svou aktivitu vápenaté ionty (Storr et al. 2011, Guroff 1964). Funkční závislost na vápenatých iontech a strukturní podobnost kalpainových proteáz s proteázou papainem vedla k ustanovení názvu kalpain (anglicky calpain, calcium and papain). Genom savců kóduje 15 izoforem, z čehož devět je exprimovaných ve všech tkáních a u šesti izoforem je exprese tkáňově specifická (Tabulka 3) (Sorimachi and Suzuki 2001)



Obrázek 2. Katalýza substrátu cysteinovými proteázami. Převzato a upraveno z (Wikipedia contributors. [https://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine_protease.](https://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine_protease))

Kalpain	Zkratka	Alternativní název/názvy	PEF	Tkáňová specifita	Nevyšší exprese
Kalpain-1	CAPN1	μ-Kalpain, Kalpain I, μCANP	A	U	Placenta, průdušnice
Kalpain-2	CAPN2	m-Kalpain, Kalpain II, mCANP	A	U	Průdušnice, plíce, ledviny
Kalpain-3	CAPN3	p94, nCL-1 (Lp82, Lp85, Rt88)	A	TS	Kosterní svalovina
Kalpain-5	CAPN5	nCL-3, htra-3, CAPN5	N	U	Mozek, ledviny, játra
Kalpain-6	CAPN6	CAPN6	N	TS	Placenta
Kalpain-7	CAPN7	CAPN7, palBH	N	U	
Kalpain-8	CAPN8	CAPN8, nCL-2	A	TS	Trávicí soustava
Kalpain-9	CAPN9	CAPN9, nCL-4	A	TS	Trávicí soustava, srdce
Kalpain-10	CAPN10	CAPN10	N	U	Srdce
Kalpain-11	CAPN11	CAPN11	A	TS	Varlata

Kalpain-12	CAPN12	CAPN12	A	TS	Vlasové folikuly
Kalpain-13	CAPN13	CAPN13	A	U	Plíce, varlata
Kalpain-14	CAPN14	CAPN14	A	U	
Kalpain-15	CAPN15	CAPN15, SoIH	N	U	Mozek
Kalpain – malá podjednotka 1 (small subunit 1)	CAPNS1	CAPN4, CPNS1*	A	U	Srdce, slinivka, ledviny

PEF (penta EF-hands) přítomnost pěti proteinových motivů, schopných vázat vápník, nebo stabilizovat strukturu. **A**- Ano **N**-Ne

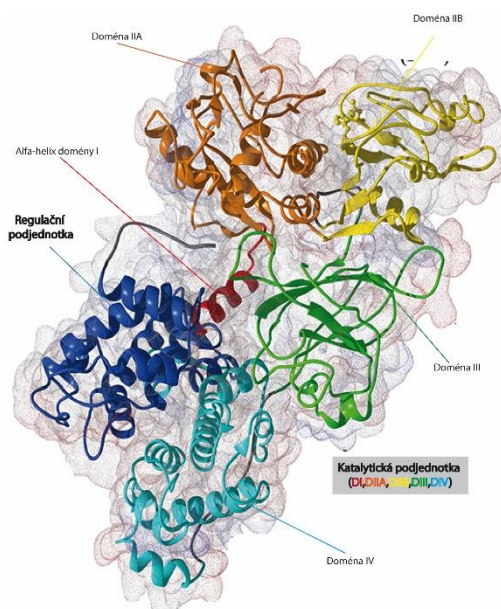
U (ubiquitous) vyskytuje se ve všech tkáních **TS**- tkáňově specifická exprese,

Tabulka 1. Seznam jednotlivých kalpainových izoforem, jejich tkáňová exprese a přítomnost proteinového motivu „EF ruka“. Upraveno z (Sorimachi and Suzuki 2001)

Nejlépe prostudovanými izoformami kalpainu jsou kalpain-1 (CAPN1) a kalpain-2 (CAPN2). Pro správnou funkci organismu je zřejmě nutná přítomnost obou těchto izoforem, ale pouze inaktivace genu kódující kalpain-2 (tzv. genový knock-out) je letální (Dutt et al. 2006). Knock-out genu pro kalpain-2 je letální v 15. dnu embryonálního vývoje, kdy dochází k fragmentaci DNA v placentárním trofoblastu (Takano et al. 2011). Dojde - li k inaktivaci genu pro kalpain-1, nedojde k žádným viditelným fenotypovým projevům (Azam et al. 2001). Nicméně, přítomnost kalpainu-1 je nutná pro některé fyziologické děje. Studie (Nakajima et al. 2008), která srovnávala reakce na různé podmínky u myši s deletovaným genem a kontrolní skupinou došla k závěru, že nepřítomnost kalpainu-1 vedla ke zhoršené motorické funkci jedinců a pomalejší reakci na stresový podnět. Kalpain-1 je také vyžadován pro správnou funkci krevních destiček a správný vývoj mozku (Azam et al. 2001). Důvodem, proč absence kalpainu-1 nemá žádný charakteristický fenotypový projev, může být určitá schopnost redundance kalpainu-2

6.1. Struktura kalpainu

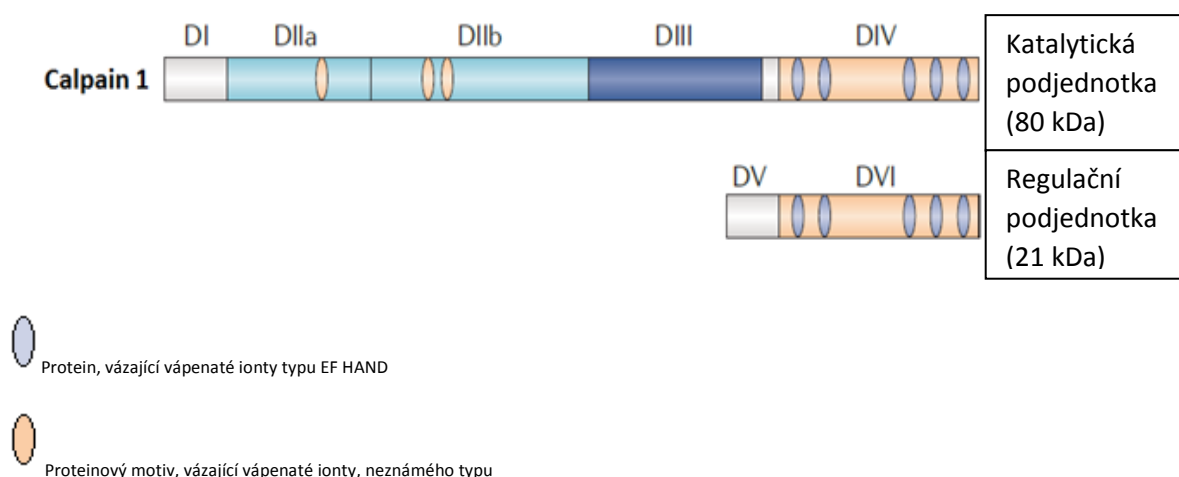
Kalpainové izoformy kalpain-1 (CAPN1) a kalpain-2 (CAPN2) tvoří heterodimery s regulační podjednotkou (28kDa) CAPNS1, kódovanou genem CAPN4 (Campbell and Davies 2012). Izoformy CAPN1 resp. CAPN2, v dimeru označované jako katalytická podjednotka, se skládají ze čtyř domén (DI-DIV). Oproti tomu regulační podjednotka je výrazně kratší a skládá se ze dvou domén (DV-DVI)



(Obrázky 3 a 4).

Obrázek 3. 3D Struktura kalpainu 2 (neaktivní). Stabilizace malé a velké podjednotky je zprostředkována pomocí alfa helixu domény DI (červeně) a interakcí EF hand motivy mezi doménou IV (tyrkysově) a doménou VI (fialově) (převzato a upraveno z Calpain research portal, <http://calpain.net/3dstructure/index.html>).

Doména I, je alfa-helix, který hraje důležitou roli pro stabilitu konformace kalpainu. Doména II je u kalpainu 1 rozdělená do dvou subdomén, IIa a IIb. Obě tyto subdomény obsahují vazebná místa pro vápenaté ionty (rozdílný od typického vápník vazacího motivu „EF-hand“), jejichž vazba vede ke zvýšení aktivity enzymu. DII má také proteolytickou funkci, jelikož obsahuje katalytický cysteinový zbytek. Doména III se pravděpodobně podílí na strukturní změně molekuly kalpainu po navázání vápenatých iontů. Doména IV obsahuje vápník vazací proteinový motiv (EF hand) složený ze dvou alfa helixů, který společně s doménou DII a DVI váže vápenaté ionty (Obrázky 3 a 4). Malá a velká podjednotka je v neaktivním stavu spojená alfa helixem domény I a pomocí vazby domén DIV a DVI. Každá tato doména má 5 proteinových motivů typu „EF hand“, schopných vázat vápenaté ionty, ale aktivní jsou pouze 4. Páté motivy obou domén spolu asociují a tím stabilizují výslednou strukturu (Obrázek 3) (Sorimachi and Suzuki 2001).



Obrázek 4. Doménová struktura kalpainu 1: Kalpain je složen z regulační a katalytické podjednotky. Katalytická podjednotka se skládá ze 4 domén: stabilizační domény DI, domény DII dělenou do dvou subdomén schopných vázat vápenaté ionty a po aktivaci tvořících aktivní místo enzymu, domény DIII a DIV, což jsou domény obsahující motiv EF hand. Motiv EF hand domén DIII a DIV je schopný kromě vázání vápenatých iontů i stabilizovat vazbu malé a velké podjednotky interakcí se stejným motivem na doméně VI regulační podjednotky. Malá regulační podjednotka se skládá z domén DV a DVI. DV je flexibilní a bohatá na glycin, DVI je strukturně podobná DIV, obsahuje také 5 motivů EF-hand.

6.2. Lokalizace kalpainu

Neaktivní forma kalpainu, se vyskytuje difúzně v celé cytoplasmě buňky, vyjma jádra. Dojde-li k aktivaci kalpainu, dochází k jeho migraci do buněčných periférií, zejména do cytoplasmatické membrány. Nejhojněji je pak aktivní kalpain lokalizován v zadní části buňky na ventrální straně cytoplasmatické membrány (Shao et al. 2006).

6.3. Regulace kalpainu

Aberantní regulace či exprese kalpainových proteáz s sebou často nese fatální následky, převážně spojené s vážnými onemocněními. Známým příkladem je korelace mutace v genu pro

kalpain-3, s výskytem Limb-Girdlovy svalové dystrofie typu 2A (Huang and Zhu 2016). Zvýšená exprese kalpainu-1 je spojována s výskytem nádorů ledvin a zvýšená exprese kalpainu-2 pak s nádory mozku, jako jsou schwannomy a meningiomy (Storr et al. 2011). Proto je aktivita kalpainových proteáz striktně regulována hned několika mechanismy. Mezi nejvýznamnější patří regulace vápenatými ionty, regulace malou podjednotkou, regulace endogenními proteinovými inhibitory a regulace pomocí různých post-translačních modifikací jako je fosforylace, sumoylace či auto-proteolytické štěpení.

6.3.1. Regulace vápenatými ionty

Aktivace kalpainu vápenatými ionty je zásadním a nejlépe prostudovaným mechanismem aktivace kalpainu. Koncentrace vápenatých iontů, nutná pro aktivaci kalpainu se u jednotlivých izoform liší. Zatímco kalpain-1 (alias μ -kalpain) vyžaduje k aktivaci mikromolární koncentraci vápenatých iontů, kalpain-2, neboli m-kalpain, je aktivovaný milimolární koncentrací vápenatých iontů. Označení μ -kalpain a m-kalpain však není úplně přesné, protože aktivační koncentrace u m-kalpainu se pohybuje od 400 do 800 μ M, zatímco u μ -kalpainu je zhruba desetkrát menší (Khorchid and Ikura 2002). Aktivační koncentrace vápenatých iontů je navíc možné snížit několika mechanismy, například řízenou autolýzou.

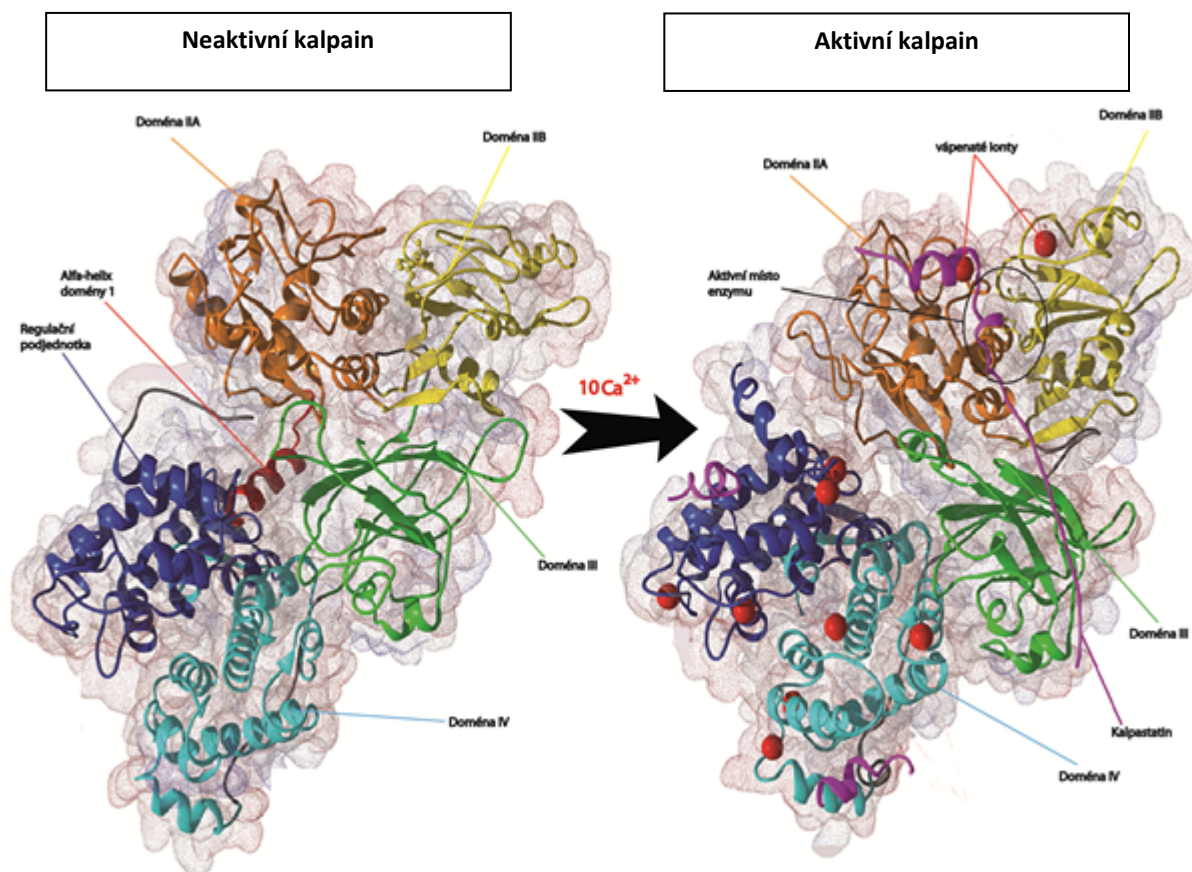
Bylo popsáno, že heterodimer kalpainu-1 a malé podjednotky potřebuje k plné aktivaci navázat deset vápenatých iontů. Jejich vazbou dochází ke konformační změně aktivního místa enzymu, přiblížení jednotlivých aminokyselinových zbytků katalytické triády a tím umožní hydrolýzu peptidové vazby daného substrátu (Sorimachi, Hata and Ono 2011).

6.3.2. Regulace malou podjednotkou

Regulační podjednotka, která asociuje s izoformami kalpain-1 a kalpain-2, zajišťuje stabilitu a aktivitu celého enzymu. Regulační podjednotka funguje jako tkáňově specifický chaperon velké podjednotky, pravděpodobně ji pomáhá sbalit do aktivní konformace (Schad et al. 2002)

6.3.3. Regulace endogenními proteiny

Kalpain může být dále regulován endogenními proteiny. Příkladem je kalpastatin, což je reversibilní inhibitor kalpainu 1 a 2. K jeho uvolnění do cytosolu dochází zároveň s vyplavením vápenatých iontů z endoplasmatického retikula (Storr et al. 2011). Inhibice je možná jen u kalpainu, který je aktivován vápenatými ionty. Při aktivní konformaci kalpainu jsou exponovány aminokyseliny Gly27, Leu28 v aktivním místě, které jsou klíčové pro vazbu kalpastatinu do aktivního místa. (Franco and Huttenlocher 2005).



Obrázek 5. Aktivace kalpainu-1 vápenatými ionty. Při aktivaci kalpainu vápenatými ionty dochází ke konformační změně, která se projevuje zejména v oblasti domény DIIA a DIIB, ve které dojde k obnažení aktivního místa enzymu a umožňuje tím také vazbu regulačních proteinů, jako je kalpastatin. Celá struktura je ve srovnání s neaktivním kalpainem prostorově více rozvolněná a dochází v ní k přemístění hydrofobních částí na povrch proteinu (převzato a upraveno z Calpain research portal. <http://calpain.net/3dstructure/index.html>).

6.3.4. Regulace post-translačními modifikacemi

Další možností regulace kalpainu, jsou post-translační modifikace, jako je fosforylace, sumoylace a autoproteolytické štěpení.

6.3.5. Fosforylace

Důležitou modifikací regulující aktivitu kalpainu je fosforylace. Zatímco fosforylace pomocí proteinkinázy PKC ϵ , či proteinkinázy ERK, vede ke zvýšení aktivity kalpainu, fosforylace proteinkinázou A jeho aktivitu inhibuje.

PKC ϵ je izoformou proteinkinázy C. Tato serin/threoninová proteinkináza asociuje s kalpainem 1 a 2 v cytoplasmě a přímo ho zde fosforyluje. Knock-out genu pro PKC ϵ vedl k významnému snížení fosforylace i následné aktivace obou izoform kalpainu (Xu and Deng 2006).

Bylo popsáno, že proteinkináza ERK fosforyluje kalpain-2 na serinovém zbytku v pozici 50, což vede k jeho aktivaci (Glading et al. 2004). Tato fosforylace má také za následek asociaci domény III kalpainu s PIP2 a jeho následnou lokalizaci do cytoplasmatické membrány (Storr et al. 2011).

Proteinkináza A je protein, složený ze dvou katalytických a dvou regulačních podjednotek. Její aktivita je indukovaná asociací s cyklickým-adenosin-monofosfátem (cAMP). PKA fosforyluje doménu III (Ser369 and Thr370) v kalpainu-2, což vede k inhibici aktivity kalpainu tím, že mu neumožní přechod do aktivní konformace (Franco and Huttenlocher 2005).

6.3.6. Sumoylace

Další z post-translačních mechanismů, kterými může být kalpain aktivován je sumoylace.

Sumoylace je proces, při kterém dochází ke kovalentnímu připojení proteinu SUMO (Small ubiquitin-like modifier) na jiný protein, a tím se zpravidla mění jeho konformace či funkce. Bylo popsáno, že kalpain-2 je sumoylován na lysinovém zbytku v pozici 390, a že tato modifikace vede k jeho aktivaci (Wang et al. 2009).

6.3.7. Autoproteolýza

K autolýze kalpainu dochází štěpením dvou peptidových vazeb mezi Ser15, Ala16 a mezi Gly27, Leu28, za přítomnosti vápenatých iontů. Toto štěpení má za následek vznik dvou různých forem o velikosti 75kDa a 78kDa, které vykazují nižší aktivační koncentraci vápenatých iontů, než neautolyzovaná forma (Melloni et al. 1996).

7. Substráty kalpainu-1 a kalpainu-2 zahrnuté v buněčné migraci

Kalpainové proteázy své substráty pravděpodobně rozeznávají podle jejich terciální struktury, přičemž při štěpení preferují oblasti, kde převládají hydrofobní aminokyseliny (Cuerrier et al. 2005). Mezi jeho nejvýznamnější substráty patří zejména proteiny fokálních adhezí, dále pak malé GTPázy, fosfatázy, fosfolipázy a membránové receptory. Štěpením těchto substrátů se kalpain-1 a 2 podílejí na regulaci buněčné migrace.

7.1. Buněčná migrace

Buněčná migrace je sekvenční sled několika kroků, který ovlivňuje řadu elementárních fyziologických procesů, jako je embryonální morfogeneze, hojení a regenerace tkání. Buněčná migrace také hraje důležitou roli v progresi různých patologických jevů, jako jsou autoimunitní a nádorová onemocnění, ateroskleróza nebo mentální retardace (Ridley et al. 2003, 2005, Wedlich 2005).

Mechanismus buněčné migrace

Buněčná migrace v planárním „2D“ prostředí je ve zjednodušené podobě proces čtyř kroků. Před zahájením migrace nejprve dochází k buněčné polarizaci. Ta zahrnuje formování protrudujícího předního konce buňky a neprotrudujících oblastí, kde se ustavuje buněčná zád' (Ridley 2003; Klímová 2016). Celý proces buněčné polarizace je také doprovázen reorganizací cytoskeletu a vnitrobuněčných organel. Polarizované buňky pak zaujímají polarizovaný kónický tvar, pro který je

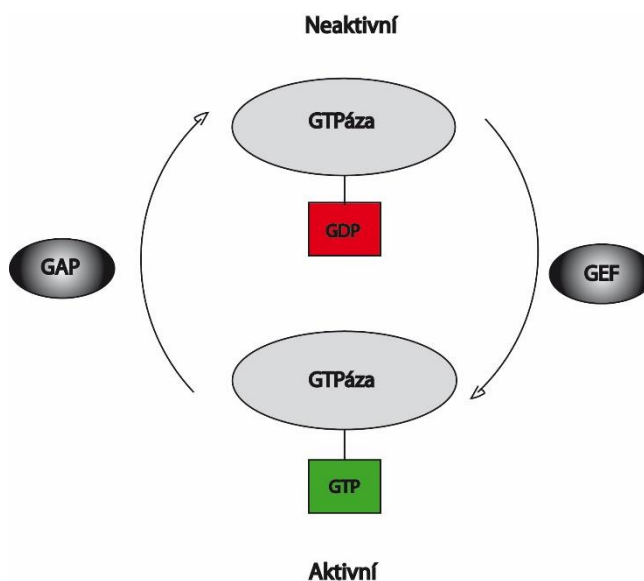
charakteristická přítomnost tlustých kontraktálních aktinových vláken na stranách a konci buňky, zatímco přední okraj buňky obsahuje především polymerizující větvená aktinová vlákna.

Migrační cyklus v planárním „2D“ prostředí je pak ve zjednodušené podobě opakování několika procesů. Na předním (či vedoucím) okraji buňky dochází k formování aktinových filament, jejich polymerizaci a větvení. Aktinová polymerizace vede k tvorbě protruzí, které jsou stabilizované buněčnou adhezí k proteinům extracelulární matrix pomocí transmembránových receptorů z rodiny integrinů. Aktivace integrinů vede k jejich oligomerizaci, rekrutování celé řady signálních a strukturálních proteinů a následně k tvorbě fokálních adhezí. Fokální adheze stabilizují adhezi buněk k substrátu, ale pomáhají generovat trakční síly, které zajišťují translokaci buňky. V závěrečném kroku dochází k rozpadu fokálních adhezí v oblasti buněčné zádi a jejímu přitažení k protrudující přední části buňky (Ridley et al. 2003).

V regulaci buněčné migrace se uplatňují především malé Rho GTPázy, které hrají důležitou roli v regulaci aktinového cytoskeletu. Dalším faktorem je pak rychlost rozpadu fokálních adhezí, který může být limitujícím faktorem pro rychlost migrace. Proteolytická aktivita kalpainu se uplatňuje jak při regulaci Rho GTPáz, přičemž RhoA je kalpainem přímo štěpen a u Rac1 reguluje jeho aktivaci, tak i při proteolýze proteinů fokálních adhezí.

7.2. Malé Rho GTPázy

Malé Rho GTPázy patří do skupiny signálních proteinů vazajících guaninové nukleotidy (GTP nebo GDP). Tyto GTPázy regulují dynamiku aktinu a buněčný pohyb pomocí regulace aktinové polymerace a aktinomyosinové kontraktility (Friedl, Wolf and Zegers 2014). Malé Rho GTPázy se v buňkách vyskytují ve dvou základních konformacích – aktivní konformace s navázaným GTP a neaktivní konformace vázající GDP (Hodgson 2014). Přechod z neaktivní na aktivní



Obrázek 6: Mechanismus aktivace a inaktivace monomerních g-proteinů pomocí GEF a GAP. GEF (guanine nucleotide–exchange) stimuluje výmenu GDP za GTP, čímž dochází k aktivaci Rho GTPáz. GAP (GTPase activating protein) stimuluje hydrolyzu GTP na GDP a tím dochází k inaktivaci Rho GTPáz.

formu je regulován pomocí guaninových nukleotidových výměnných faktorů (z angl. *guanine nucleotide–exchange factors*, GEFs), který stimuluje výměnu GDP za GTP. Naopak inaktivace malých Rho GTPáz je zprostředkována prostřednictvím GTPase aktivačních proteinů (z. angl. *GTPase-activating proteins*, GAPs), které stimuluji GTPázovou aktivitu malých GTPáz a hydrolyzu

GTP na GDP (Obr.5) (Ridley 2015). Mezi nejvýznamnější malé Rho GTPázy regulující aktinový cytoskelet patří RhoA, Rac1 a CDC42. CDC42 je primárně zodpovědná za tvorbu aktinových filoopodií, Rac1 indukuje polymerizaci větvených aktinových filament a RhoA pak indukuje tvorbu tlustých kontraktálních stresových vláken.

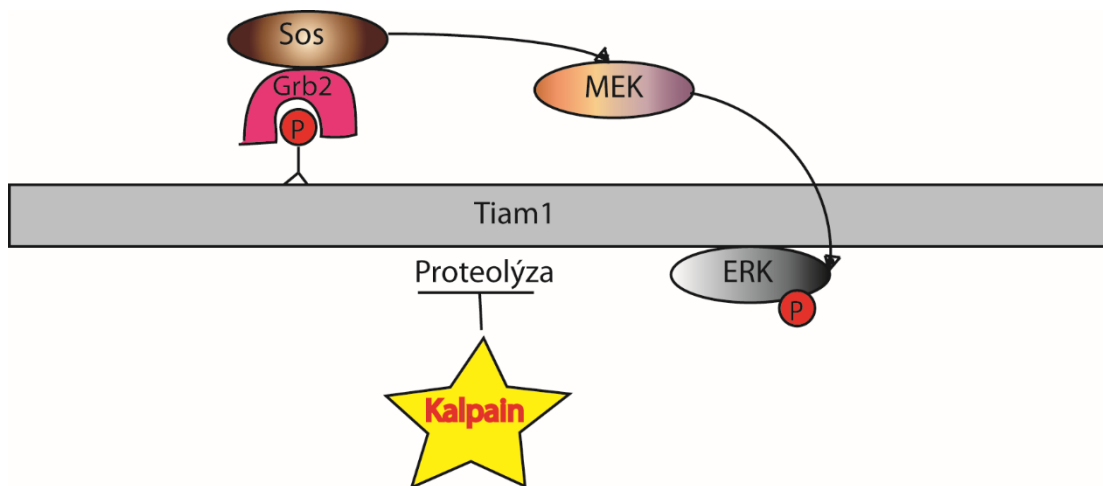
7.3. Substráty kalpainu regulující funkci malých GTPáz z rodiny Rho

7.3.1. **RhoA (Ras homolog gene family, member A)** je malý G-protein ovlivňující regulaci cytoskeletu, zejména pak tvorbu stresových vláken a aktinomyosinovou kontrakci. Studie Kulkarni et al. (Kulkarni, Goll and Fox 2002) ukázala, že RhoA může být přímým substrát kalpainu-1. Po aktivaci integrinových receptorů kalpain-1 odštěpuje peptid blízko C-konci o velikosti 13 aminokyselinových zbytků. N-koncový Rho-A fragment o velikosti cca. 20 kDa inhibuje aktivitu nezkrácené endogenní formy Rho-A (Kulkarni et al. 2002). Ztráta aktivity RhoA vede k potlačení tvorby stresových vláken indukovaných integriny, nicméně vliv na rychlost buněčné migrace nebyl v této studii testován.

7.3.2. **Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)** je dalším příkladem malé signální GTPázy, jejíž funkce se uplatňuje při buněčné migraci. Zejména se podílí na polymerizaci větvených aktinových vláken, které jsou kritické pro tvorbu lamellipodia v přední části migrujících buněk (Kato, Hiramoto and Negishi 2006). Přímé štěpení proteinu Rac1 kalpainem sledované nebylo, nicméně funkce Rac1 může být však nepřímo ovlivněna štěpením Tiam1, což je aktivátor Rac1 GTPázy.

7.3.3. Tiam-1

Tiam1 je GEF protein pro malé GTPázy Rac1 a CDC42. Tiam-1 se podílí na přenosu signálů z extracelulárního prostředí a jeho přítomnost je důležitá pro správnou funkci mezibuněčných spojů a fokálních adhezí (Shepherd et al. 2010). Kalpain-2 štěpí Tiam-1 a mechanismus hydrolyzy je poměrně dobře popsán. Tiam-1 asociuje s proteinkinázou Src, která Tiam-1 fosforyluje na tyrosinovém zbytku v pozici 384 (Woodcock et al. 2009). Tato fosforylace vede k rekrutování proteinů signální dráhy ERK signalizace na Tiam-1. Je-li proteinkináza ERK aktivní, může fosforylovat dostupný kalpain-2 v pozici Ser50 a lokálně ho aktivovat. Aktivovaný kalpain-2 následně štěpí Tiam-1, čímž vzniká až pět C-koncových fragmentů o velikostech 85-170 kDa. Zatímco, N-koncový fragment je normálně lokalizován v mezibuněčných spojích, popřípadě ve fokálních adhezích, c-koncový fragment zůstává v cytoplasmatické membráně. Přítomnost c-terminálních zkrácených forem potlačuje aktivitu zbývajících, neštěpených forem. Štěpení Tiamu1, vede k rozvolnění jak fokálních adhezí, čímž umožní buněčnou migraci, tak i mezibuněčných spojů. (Serrels and Frame 2012, Woodcock et al. 2009).



Obrázek 7: Vliv aktivace proteinkinázy Src na Tiam1 v mezibuněčných spojkách. Po aktivaci proteinkinázy Src, dochází k fosforylaci Tiam1 a následnému rekrutování komplexu adaptorových proteinů Grb2-Sos. To vede k aktivaci proteinkinázy ERK, přes MEK kinázu a tím k aktivaci kalpainu-2 a štěpení Tiam-1 (převzato z (Woodcock et al. 2009))

7.4. Substráty regulující fokální adheze

Fokální adheze

Fokální adheze jsou proteinové komplexy, tvořící fyzické spojení mezi cytoskeletem a proteiny extracelulární matrix. Tyto spoje obsahují více než sto různých proteinů, které mají kromě upevňovací funkce i funkci signální, díky nimž buňka může přijímat signály z extracelulárního prostředí. Štěpení těchto proteinů často vede ke změnám v buněčné migraci a signalizaci.

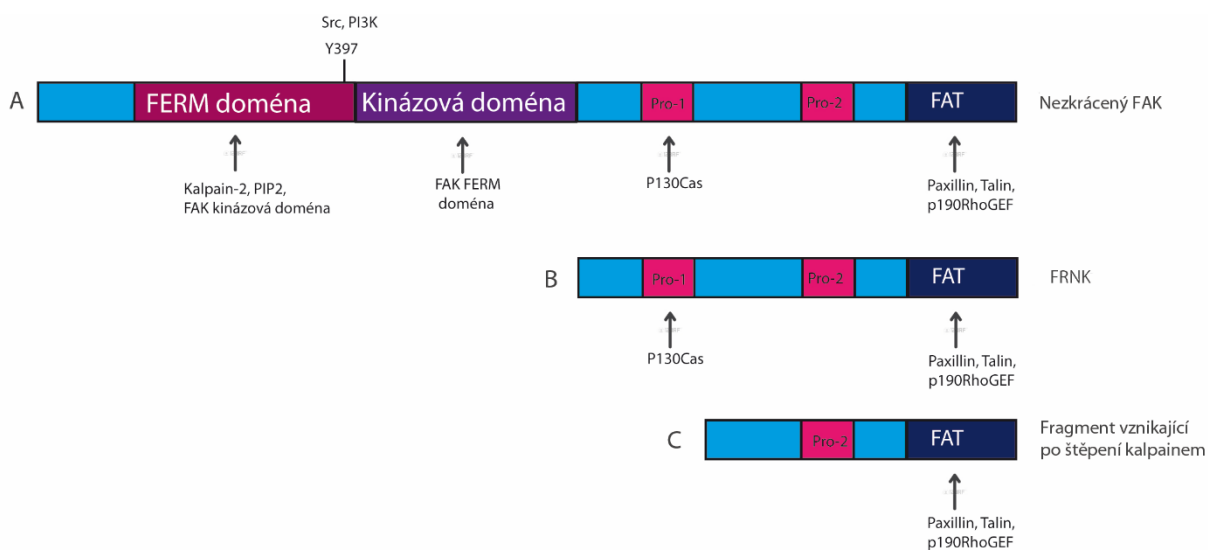
Kalpainové proteázy se evidentně podílejí na regulaci fokálních adhezí, jelikož fibroblasty ošetřené kalpainovými inhibitory mají větší fokální adheze a prodloužený konec (Huttenlocher et al., 1997).

Vliv kalpainů byl potvrzen i na molekulární úrovni identifikací rady proteinů fokálních adhezí, které jsou štěpeny kalpainem.

7.4.1. FAK (focal adhesion kinase)

FAK je tyrozin-kináza lokalizovaná ve fokálních adhezích, která se významně podílí na regulaci jejich stability, jelikož se podílí na integraci signálů mezi růstovými faktory a integriny. Společně s proteinkinázou Src tvoří komplex FAK-Src, který je aktivován přes integrinové receptory (Zhao and Guan 2011). Aktivace komplexu FAK/Src je klíčová pro regulaci celé řady buněčných procesů. Fosforylaci p130CAS dochází k asociaci tohoto proteinu s několika proteiny obsahujícími SH2 doménu, zejména s adaptorovým proteinem Crk za vzniku komplexu Crk/CAS. Tento komplex reguluje skrze další proteiny buněčnou migraci a stabilitu cytoplasmatické membrány. Podobný efekt má i fosforylace paxillinu na tyrozinových zbytcích 31 a 118. Opět zde dochází k rekrutování proteinu Crk a následně ke zvýšení buněčné migrace. Paxillin také tvoří multiproteinový komplex, obsahující mimo jiné proteinkinázu PAK a GEF (Pix/Cool) pro Rho GTPázy Rac/Cdc42.

FAK fosforyluje GEF, čímž dochází k aktivaci Rho GTPáz, které aktivují proteinkinázu PAK, jejíž downstreamové cíle (LIMK,MLCK) regulují buněčnou migraci (Zhao and Guan 2011). FAK má také roli v cílení kalpainu-2 do fokálních adhezí. Při pokusu s buňkami s deletovaným genem kódující FAK se kalpain-2 vyskytoval pouze v cytoplasmě, což naznačuje, že FAK interaguje s FAK (Carragher et al. 2003). Asociace kalpainu- 2 s proteinkinázou FAK je podmíněna fosforylací proteinu FAK pomocí proteinkinázy Src v oblasti za Ser₇₄₅. Kalpain-2 následně štěpí FAK mezi 741-750 aminokyselinou, čímž vzniká c-terminální fragment o velikosti 35 kDa, velikostně podobný proteinu FRNK (angl. FAK related non kinase). FRNK je autonomně exprimovaná C-terminální část proteinkinázy FAK. FRNK postrádá katalytickou doménu a funguje jako FAK inhibitor kompetující s nezkráceným proteinem FAK o vazebná místa ve fokálních adhezích (Bolos et al. 2010). Dá se předpokládat, že kalpainem štěpená forma má podobnou funkci jako tato c-terminální zkrácená forma. Obě tyto formy postrádají kromě kinázové domény také FERM doménu (obr.8), což znemožňuje asociaci s proteinkinázou Src, fosfolipidem PIP2 a dalšími významnými interakčních partnery. Štěpení a následná deaktivace FAK, vede ke snížení rychlosti formování a rozpadu fokálních adhezí, čímž dochází ke snížení buněčné migrace (Chan, Bennin and Huttenlocher 2010, Serrels and Frame 2012, Ren et al. 2000).



Obrázek 8. Srovnání zkrácených a nezkrácených forem proteinkinázy FAK. A. Nezkrácená forma FAK, se skládá ze tří základních domén: FERM domény, kinázové domény, FAT domény a ze dvou oblastí bohatých na prolin (Pro-1,Pro-2). FERM doména přímo interaguje s kalpainem a PIP-2. Na doméně FAT dochází k vazbě proteinů jako je paxillin, talin a p190RhoGEF. B. Schéma FRNK (FAK related nonkinase), autonomně exprimované C terminální části FAK. C. fragment vznikající po štěpení kalpainem postrádá jak FERM, tak a kinázovou doménu.

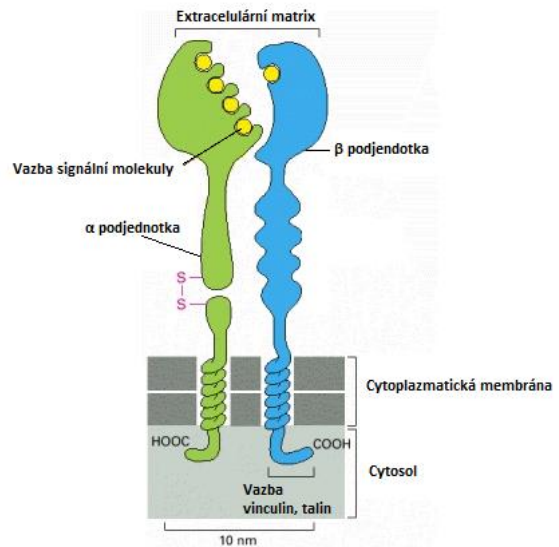
7.4.2. Integriny

Důležitou součástí fokálních adhezí jsou integriny, což jsou transmembránové receptory, které fyzicky propojují buněčný cytoskelet a proteiny extracelulární matrix. Integriny svojí signální funkcí regulují aktivitu mnoha různých proteinů, které se podílí na buněčné migraci. Například aktivace PKA zprostředkována integriny je jeden z prvních kroků řízené buněčné migrace (Katoh et al. 2006). Integrinové receptory se skládají ze dvou podjednotek α a β (Campbell and Humphries 2011). Štěpení integrinu kalpainem bylo popsáno na 5 různých místech cytoplazmatické domény β_3 podjednotky, což je podjednotka vyskytující se zejména

v buňkách krevního řečiště, interagující s fibrinogenem a několika dalšími proteiny (Pfaff, Du and Ginsberg 1999). Štěpení kalpainem může být indukováno trombinem nebo agregací krevních destiček. Má za následek odštěpení částí důležitých pro připojení integrinu na buněčný cytoskelet a pravděpodobně má za následek i změnu v interakci integrinu se svými vazebnými partnery a ke ztrátě asociace fokálních adhezí s aktinovým cytoskeletem. Ta je klíčová pro jejich stabilizaci. Fokální adheze maturují pod tenzí, která je generovaná právě aktinem. Pokud fokální adheze nejsou napojeny na aktin, nedochází k tenzi, ani k jejich maturaci, v případě, že maturované již jsou, tak dochází k jejich destabilizaci (Du et al. 1995).

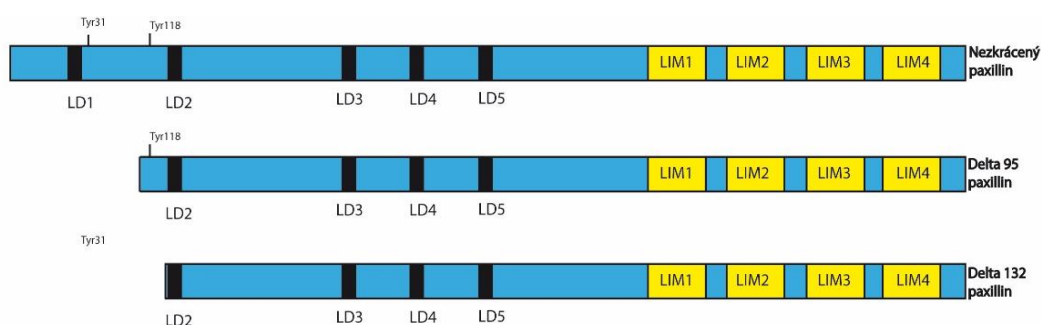
7.4.3. Paxillin

Paxillin je protein, který je integrální součástí fokálních adhezí. Plní roli multidoménového adaptorového proteinu, který do oblasti fokálních adhezí rekrutuje celou řadu strukturních a signálních molekul. Podílí se tak na integraci signálů přicházejících z extracelulárního prostředí a na jejich transformaci na signály mechanické, které ovlivňují strukturu a stabilitu aktinového cytoskeletu (Tumbarello et al. 2005). Paxillin existuje ve 4 různých izoformách označovaných jako $\alpha, \beta, \gamma, \delta$. α -paxillin je nejhojněji exprimovanou formou (Tumbarello et al. 2005). Skládá se z celkem 5 LD (leucin-asparagová kyselina) motivů, které jsou klíčové pro asociaci s interakčními partnery a 4 LIM domén, sloužících k cílení paxillinu do fokálních adhezí (Brown, Curtis and Turner 1998). LIM domény pravděpodobně přímo interagují s β -podjednotkou integrinu (Smith et al. 2013). Místo štěpené kalpainem se nachází mezi LD1 a LD2 motivem. Toto štěpení probíhá za Ser_{96} , čímž vzniká



Obrázek 9. Struktura integrinu. Integriny se skládají ze dvou podjednotek α a β , přijímajících signály z extracelulárního prostředí a regulujících aktivitu proteinů, ovlivňujících buněčnou migraci. Převzato a upraveno z (Rituparnas. <https://rituparnas.wordpress.com/2016/03/14/cell-junctions-and-cell-adhesion/>)

c-koncový fragment (Cortesio et al. 2011), strukturou podobný δ -paxillinu (Obr. 10). δ -paxillin má původ ve stejné mRNA jako α -paxillin. Vzniká díky přítomnosti alternativního iniciačního startu translace na methioninu v pozici 132 vykazuje schopnost antagonistizovat funkci α -paxillinu a inhibovat migraci. δ -paxillin ani fragment vznikající po štěpení kalpainem neobsahuje důležitá fosforylační místa jako je Tyr31 a Tyr118, na kterých je paxillin fosforylován pomocí komplexu FAK/Src, ani LD1 motiv, na který se váže např. actopaxin či ILK kináza (Tumbarello et al. 2005). Přítomnost LIM domén u obou zkrácených forem paxillinu jim stále umožňuje asociovat s fokálními adhezemi. Pokud byl v buňkách exprimován paxillin se zanesenými mutacemi v oblasti místa štěpení kalpainem-2 (serin 95, prolin 100), paxillin se stal částečně imunní vůči proteolýze kalpainu a tyto buňky vykazovaly významně větší schopnost migrace (Cortesio et al. 2011). Tyto výsledky naznačují, že štěpení paxillinu kalpainem může negativně regulovat migraci.



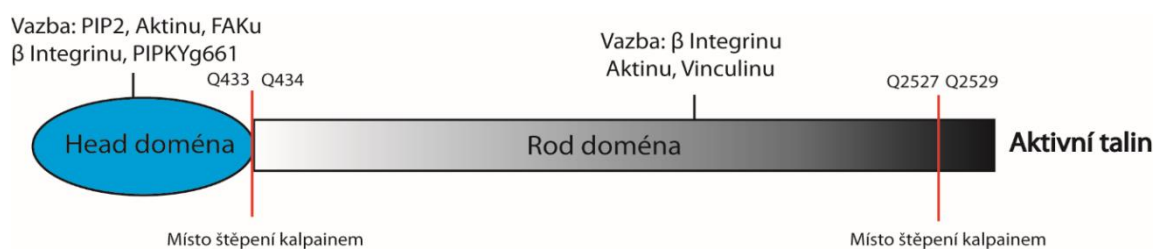
Obrázek 10. Schematické porovnání izoformy paxillinu. Obě zkrácené formy nemají LD1 doménu, čímž nedochází k vazbě interakčních partnerů. Výsledná zkrácená forma (Delta 95 paxillin) po štěpení kalpainem, se od formy delta 132 liší přítomností fosforylačního místa Tyr118 pro Src/FAK. Obě tyto zkrácené formy jsou si funkčně podobné, tedy svojí přítomností inhibují aktivitu nezkrácené formy paxillinu, čímž se podílejí na regulaci rozpadu fokálních adhezí.

7.4.4. Talin

Talin je dalším proteinem fokálních adhezí, který je zodpovědný za přímé i nepřímé propojení integrinů a aktinového cytoskeletu. Zároveň je schopný integriny stabilizovat a aktivovat. Má nezastupitelnou roli v maturaci fokálních adhezí (Frame and Norman 2008). Talin se skládá se ze 47 kDa „head“ domény, která slouží jako vazebné místo pro FAK, PIPK_{61a} a PIP2, dále pak z 220 kDa „rod“ domény, která obsahuje vazebné místo pro integriny, aktin a vinculin. Vazba „rod“ domény talinu k „head“ doméně vinculinu vede ke konformační změně vinculinu, která mu umožní stabilizovat fokální adheze jejich napojením na aktinový cytoskelet. Funkce talinu se také uplatňuje při tvorbě PIP2. Tento fosfolipid má kromě funkce signalizační, také schopnost regulovat interakce mezi aktinem, vinculinem a talinem.

Talin je štěpen kalpainem-2, což bylo dokázáno při knockoutu genu pro kalpain-2 nejen výrazným poklesem proteolýzy talinu, ale také mutací vazebného místa talinu pro kalpain (Leu 432), která zabránila proteolýze talinu (Franco et al. 2004).

Proteolytické štěpení talinu kalpainem probíhá v oblasti glutaminových zbytků 433 a 434, čímž dojde k rozdělení „head“ a „rod“ domény. Oddělením těchto domén je nejen znemožněna fosforylace pomocí FAK a tím následná asociace talinu s PIP2, ale také dochází ke snížení afinity vazby talinu s PIPKY₆₆₁ (focal adhesion-targeted type I phosphatidylinositol phosphate kinase isoform 661), což je enzym, který asociací s talinem migruje do fokálních adhezí, kde se podílí na vzniku PIP2 (Ling et al. 2002). Oddělená hlavová doména nemá s funkcí nezkráceného talinu nic společného. Jejím působením dochází ke zvýšení buněčné migrace a protruzivitě buněk prostřednictvím aktivace Src dráhy. Oddělená celá „rod“ doména na fokální adheze, ani buněčnou migraci vliv nemá (Huang et al. 2009). Dále také dochází ke štěpení talinu v oblasti glutaminových zbytků 2527 a 2529. Toto štěpení v „rod“ doméně generuje c-terminální fragment, fungující pravděpodobně jako inhibitor nezkrácených forem talinu (Bate et al. 2012). Vícečetné štěpení talinu kalpainem-2 tak vede ke ztrátě schopnosti talinu asociovat s interakčními partnery stabilizujícími fokální adheze, k zastavení tvorby fosfolipidu PIP2, a k inhibici ostatních, nezkrácených forem talinu a následnému úplnému rozpadu fokálních adhezí.



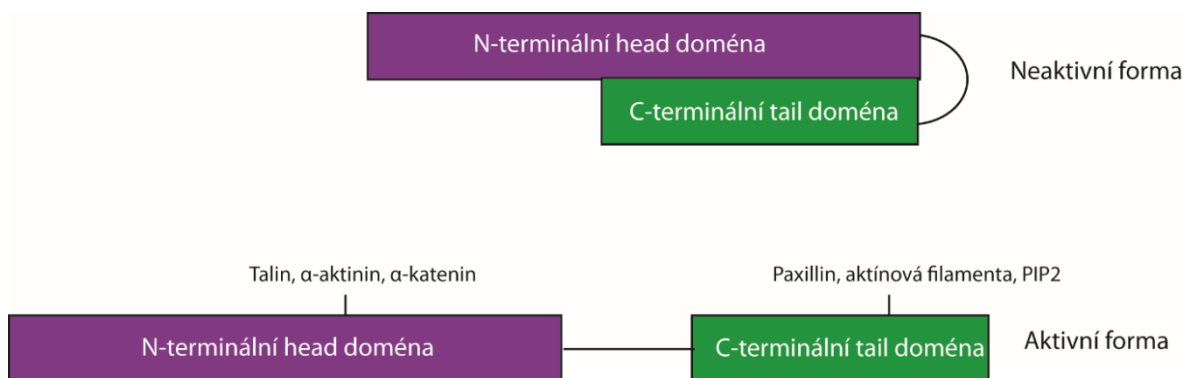
Obrázek 11. Struktura talinu. Talin se skládá ze 47kDa head domény a 220kDa rod domény. Štěpení kalpainem probíhá pravděpodobně na dvou místech a to mezi Q433 a Q434, čímž dochází k rozdělení head a rod domény a v oblasti Q2527 a Q2529, za vzniku c terminálního fragmentu. Zatímco c terminální fragment, funguje pravděpodobně jako inhibitor nezkrácených forem talinu, tak rozdělení head a rod domény má za následek ztrátu asociace s interakčními partnery.

7.4.5. Vinculin

Vinculin je 117 kDa velký protein lokalizující do fokálních adhezí a mezibuněčných spojů (Case et al. 2015), které stabilizuje a napomáhá jejich maturaci. Vinculin svým N-koncem asociuje s talinem a upevňuje jeho vazbu k integrinům, dále pak s α-katenin a s α-aktinem. Na c-terminu váže paxillin, fosfolipidy a aktinová filamenta, z čehož vzniká komplex, který kotví aktinová filamenta do cytoplasmatické membrány (Ezzell et al. 2008). Vazebná místa pro talin a α-katenin jsou přístupná, pokud ve fokálních adhezích dochází k tenzi, což je také důvod, proč je tenze k maturaci nativních fokálních adhezích důležitá .

Štěpení vinculinu kalpainem generuje několik zkrácených forem o velikosti 91kDa, jejíž schopnost interakce s vazebnými partnery, zejména pak talinem, je výrazně snižena, čímž dochází k destabilizaci fokálních adhezí. Fokální adheze nejsou schopny pod tenzí maturovat jako za normálních podmínek. U buněk, ve kterých docházelo k proteolýze vinculinu kalpainem, bylo pozorováno snížení buněčné adhezivity jak v mezibuněčných spojích, tak mezi substrátem a

buňkou, dále pak ke snížení integrity a k rozrušování stresových vláken a následné změny jejich lokalizace pouze do buněčných periferií, což vede ke zvýšení buněčné migrace (Dourdin et al. 2001).



Obrázek 12. Schématické zobrazení konformace vinculinu. Neaktivovaný vinculin, který se skládá z N-terminální „head“ domény a C-terminální „tail“ domény propojené flexibilním prolinovým řetězcem, se vyskytuje v cytoplasmě. Při rekrutování do fokálních adhezí dochází ke změně konformace z uzavřené na otevřenou, a tím k jeho následné aktivaci.

8. Závěr:

Rodina kalpainových proteáz, která má 15 členů, představuje nelyzosomální proteázy vyskytující se všudypřítomně u savců a u mnoha dalších organismů. Tyto proteázy regulují celou řadu fyziologických pochodů, od embryonálního vývoje přes vývoj a regulaci svalů, mozku až po funkci hematopoietického systému. Všechny fyziologické funkce kalpainových proteáz nejsou dodnes přesně známy. Z dosavadních výsledků vyplývá, že na buněčné úrovni jsou kalpains také významnými regulátory aktinového cytoskeletu, mezibuněčných spojů a fokálních adhezí, a podílejí se tak významným způsobem na regulaci buněčné migrace a invazivity. Zatímco základní mechanismy, kterými jsou kalpains aktivovány jsou relativně dobře popsány, mechanismy, kterými tyto proteázy regulují buněčnou motilitu, jsou z velké části neznámé.

Otázkou zůstává, jakou roli hraje kalpain v buněčné migraci. Migrace ve 2D prostředí je několikakrokový proces zahrnující sekvenčně seřazené události – vznik protruze na vedoucím konci buňky (lamelipodium) a přichycení k podkladu pomocí fokálních adhezí, kontrakce buněčného cytoskeletu a přitažení zadní části buňky, která je doprovázena lokální destabilizací fokálních adhezí. Bylo popsáno, že kalpainové proteázy po své aktivaci lokalizují do buněčných periferií, nejvíce pak do zadní části migrující buňky. Zde díky své schopnosti destabilizovat fokální adheze pravděpodobně usnadňují migraci a invazivitu tím, že napomáhají k přerušení fokálních kontaktů a přitažení zadního konce buňky ve směru migrace. Tuto hypotézu podporuje fakt, že nádorové a vysoce invazivní buňky mají zvýšenou hladinu kalpainových proteáz.

Intuitivně by se dalo předpokládat, že funkce kalpainu v regulaci migrace bude spočívat v jeho schopnosti degradovat klíčové „proti-migrační“ proteiny. Štěpením proteinů jako jsou talin, paxilin nebo vinculin podporující maturaci, integritu a stabilitu fokálních adhezí může kalpain fokální adheze destabilizovat a tak ovlivňovat rychlost migrace. Kalpain ale, na rozdíl od většiny proteáz, své substráty nedegraduje, ale štěpení substrátů vede zpravidla ke vzniku zkrácených forem, které mohou disponovat jinými funkcemi než původní substrát. Příkladem může být štěpení talinu mezi „head“ a „rod“ doménou. Oddělená N-koncová „head“ doména získává unikátní schopnost aktivovat proteinkinázu Src, což vede ke zvýšení migrace a protruzivity buněk. Štěpení pomocí kalpainu, mohou vznikat také zkrácené formy, které ztrácejí schopnost asociovat s některými interakčními partnery a fungují jako inhibitory neštěpených forem.

V předchozích kapitolách byly popsány všeobecně exprimované a také nejlépe prostudované proteázy kalpain-1 a kalpain-2. Důraz byl kladen a na popis substrátů, jejichž štěpením kalpain-1 a 2 regulují buněčnou migraci. Štěpením těchto substrátů kalpain dokáže regulovat aktivitu malých GTPáz rodiny Rho a také štěpit komponenty fokálních adhezí. Lze ale předpokládat, že množina substrátů kalpainů 1 a 2 podílejících se na regulaci migrace bude daleko větší a různorodější. Lze například spekulovat, že α -actinin, který asociuje se aktinovými vlákny a fokálními adhezemi a který je štěpen kalpainem-3 ve svalové tkáni (Huang and Zhu 2016), bude také substrátem kalpainu 1 a 2. Dále je nutno podotknout, že do této bakalářské práce nebyly zahrnuty proteiny jako E-kadherin, který zajišťuje integritu mnohobuněčného epitelu a zabraňuje migraci jednotlivých buněk.

Zajímavým poznatkem se jeví, že kalpains vstupují do regulace migrace na několika úrovních a v některých případech i s antagonistickými účinky, kdy jeden štěpený substrát migraci inhibuje, zatímco jiný ji aktivuje. Důvod, proč vstupuje kalpainová signalizace do regulace buněčné migrace tolika způsoby a na tolika úrovních, není zcela objasněn. Na následujících řádcích jsou navrženy některé možné důvody. Rozdílnou lokalizací substrátů v rámci jedné buňky by mohl kalpain na jednom místě dynamiku fokálních adhezí aktivovat a na jiném zase inhibovat. Dalším možným důvodem by mohla být tkáňově či buněčně specifická expresní hladina jednotlivých substrátů, kdy by za těchto podmínek mohl převládnout buď „pro-migrační“ nebo „proti-migrační“ efekt štěpených substrátů. Komplexita celé regulace migrace pomocí kalpainových proteáz je tak s velkou pravděpodobností daleko větší, než je v současné době popsáno. Identifikace nových substrátů se pak zdá být primárním prostředkem, který napomůže pochopení fyziologické funkce těchto proteáz.

9. Reference

- Azam, M., S. S. Andrabi, K. E. Sahr, L. Kamath, A. Kuliopulos & A. H. Chishti (2001) Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 2213-2220.
- Bate, N., A. R. Gingras, A. Bachir, R. Horwitz, F. Ye, B. Patel, B. T. Goult & D. R. Critchley (2012) Talin Contains A C-Terminal Calpain2 Cleavage Site Important In Focal Adhesion Dynamics. *Plos One*, 7.
- Bolos, V., J. M. Gasent, S. Lopez-Tarruella & E. Grande (2010) The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Oncotargets and Therapy*, 3, 83-97.
- Brown, M. C., M. S. Curtis & C. E. Turner (1998) Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains. *Nature Structural Biology*, 5, 677-678.
- Campbell, I. D. & M. J. Humphries (2011) Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3.
- Campbell, R. L. & P. L. Davies (2012) Structure-function relationships in calpains. *Biochemical Journal*, 447, 335-351.
- Carragher, N. O., M. A. Westhoff, V. J. Fincham, M. D. Schaller & M. C. Frame (2003) A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: Regulation by p42 ERK and Src. *Current Biology*, 13, 1442-1450.
- Case, L. B., M. A. Baird, G. Shtengel, S. L. Campbell, H. F. Hess, M. W. Davidson & C. M. Waterman (2015) Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nature Cell Biology*, 17, 880-892.
- Chan, K. T., D. A. Bennis & A. Huttenlocher (2010) Regulation of Adhesion Dynamics by Calpain-mediated Proteolysis of Focal Adhesion Kinase (FAK). *Journal of Biological Chemistry*, 285, 11418-11426.
- Cortasio, C. L., L. R. Boateng, T. M. Piazza, D. A. Bennis & A. Huttenlocher (2011) Calpain-mediated Proteolysis of Paxillin Negatively Regulates Focal Adhesion Dynamics and Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 9998-10006.
- Cuerrier, D., T. Moldoveanu & P. L. Davies (2005) Determination of peptide substrate specificity for mu-calpain by a peptide library-based approach - The importance of promed side interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 40632-40641.
- Dourdin, N., A. K. Bhatt, P. Dutt, P. A. Greer, J. S. C. Arthur, J. S. Elce & A. Huttenlocher (2001) Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 48382-48388.
- Du, X. P., T. C. Saido, S. Tsubuki, F. E. Indig, M. J. Williams & M. H. Ginsberg (1995) CALPAIN CLEAVAGE OF THE CYTOPLASMIC DOMAIN OF THE INTEGRIN BETA(3) SUBUNIT. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 26146-26151.
- Dutt, P., D. E. Croall, J. S. C. Arthur, T. De Veyra, K. Williams, J. S. Elce & P. A. Greer (2006) m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *Bmc Developmental Biology*, 6.
- Ezzell, R. M., W. H. Goldmann, N. Wang, N. Parashurama & D. E. Ingber (2008) Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton (vol 231, pg 14, 1997). *Experimental Cell Research*, 314, 2163-2163.
- Frame, M. & J. Norman (2008) A tal(in) of cell spreading. *Nature Cell Biology*, 10, 1017-1019.
- Franco, S. J. & A. Huttenlocher (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of Cell Science*, 118, 3829-3838.
- Franco, S. J., M. A. Rodgers, B. J. Perrin, J. W. Han, D. A. Bennis, D. R. Critchley & A. Huttenlocher (2004) Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature Cell Biology*, 6, 977-+.
- Friedl, P., K. Wolf & M. M. Zegers (2014) Rho-directed forces in collective migration. *Nature Cell Biology*, 16, 208-210.

- Glading, A., R. J. Bodnar, I. J. Reynolds, H. Shiraha, L. Satish, D. A. Potter, H. C. Blair & A. Wells (2004) Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation (vol 24, pg 2499, 2004). *Molecular and Cellular Biology*, 24, 6116-6116.
- Gupta, V., N. A. U. Prakash, V. Lakshmi, R. Boopathy, J. Jeyakanthan, D. Velmurugan & K. Sekar (2010) Recognition of active and inactive catalytic triads: A template based approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 317-323.
- Guroff, G. (1964) NEUTRAL CALCIUM-ACTIVATED PROTEINASE FROM SOLUBLE FRACTION OF RAT BRAIN. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 149-&.
- Hodgson, L. (2014) Regulation of RhoGTPases in motility: A fine balancing act. *Cell Adhesion & Migration*, 8, 525-525.
- Huang, C., Z. Rajfur, N. Yousefi, Z. Z. Chen, K. Jacobson & M. H. Ginsberg (2009) Talin phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration. *Nature Cell Biology*, 11, 624-U404.
- Huang, J. R. & X. P. Zhu (2016) The Molecular Mechanisms of Calpains Action on Skeletal Muscle Atrophy. *Physiological Research*, 65, 547-560.
- Katoh, H., K. Hiramoto & M. Negishi (2006) Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *Journal of Cell Science*, 119, 56-65.
- Khorchid, A. & M. Ikura (2002) How calpain is activated by calcium. *Nature Structural Biology*, 9, 239-241.
- Kulkarni, S., D. E. Goll & J. E. B. Fox (2002) Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 24435-24441.
- Ling, K., R. L. Doughman, A. J. Firestone, M. W. Bunce & R. A. Anderson (2002) Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature*, 420, 89-93.
- Melloni, E., M. Michetti, F. Salamino, R. Minafra & S. Pontremoli (1996) Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229, 193-197.
- Nakajima, R., K. Takao, S. M. Huang, J. Takano, N. Iwata, T. Miyakawa & T. C. Saido (2008) Comprehensive behavioral phenotyping of calpastatin-knockout mice. *Molecular Brain*, 1, 15.
- Pfaff, M., X. P. Du & M. H. Ginsberg (1999) Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains. *Febs Letters*, 460, 17-22.
- Rawlings, N. D., A. J. Barrett & A. Bateman (2011) Asparagine Peptide Lyases A SEVENTH CATALYTIC TYPE OF PROTEOLYTIC ENZYMES. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 38321-38328.
- Ren, X. D., W. B. Kiosses, D. J. Sieg, C. A. Otey, D. D. Schlaepfer & M. A. Schwartz (2000) Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *Journal of Cell Science*, 113, 3673-3678.
- Ridley, A. J. (2015) Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 103-112.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons & A. R. Horwitz (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302, 1704-9.
- Schad, E., A. Farkas, G. Jekely, P. Tompa & P. Friedrich (2002) A novel human small subunit of calpains. *Biochemical Journal*, 362, 383-388.
- Serrels, B. & M. C. Frame (2012) FAK and talin: Who is taking whom to the integrin engagement party? *Journal of Cell Biology*, 196, 185-187.
- Shao, H. S., J. Chou, C. J. Baty, N. A. Burke, S. C. Watkins, D. B. Stolz & A. Wells (2006) Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 5481-5496.

- Shepherd, T. R., S. M. Klaus, X. Liu, S. Ramaswamy, K. A. DeMali & E. J. Fuentes (2010) The Tiam1 PDZ Domain Couples to Syndecan1 and Promotes Cell-Matrix Adhesion. *Journal of Molecular Biology*, 398, 730-746.
- Smith, M. A., E. Blankman, N. O. Deakin, L. M. Hoffman, C. C. Jensen, C. E. Turner & M. C. Beckerle (2013) LIM Domains Target Actin Regulators Paxillin and Zyxin to Sites of Stress Fiber Strain. *Plos One*, 8.
- Sorimachi, H., S. Hata & Y. Ono (2011) Calpain chronicle-an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*, 87, 287-327.
- Sorimachi, H. & K. Suzuki (2001) The structure of calpain. *Journal of Biochemistry*, 129, 653-664.
- Storr, S. J., N. O. Carragher, M. C. Frame, T. Parr & S. G. Martin (2011) The calpain system and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11, 364-374.
- Takano, J., N. Mihira, R. Fujioka, E. Hosoki, A. H. Chishti & T. C. Saido (2011) Vital Role of the Calpain-Calpastatin System for Placental-Integrity-Dependent Embryonic Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 31, 4097-4106.
- Tumbarello, D. A., M. C. Brown, S. E. Hetey & C. E. Turner (2005) Regulation of paxillin family members during epithelial-mesenchymal transformation: a putative role for paxillin delta. *Journal of Cell Science*, 118, 4849-4863.
- Verma, S., R. Dixit & K. C. Pandey (2016) Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in Pharmacology*, 7.
- Wang, H. C., Y. S. Huang, C. C. Ho, J. C. Jeng & H. M. Shih (2009) SUMO modification modulates the activity of calpain-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384, 444-449.
- Wedlich, D. (2005) Cell Migration in Development and Disease Preface. *Cell Migration in Development and Disease*, XV-XVII.
- Woodcock, S. A., C. Rooney, M. Lontos, Y. Connolly, V. Zoumpourlis, A. D. Whetton, V. G. Gorgoulis & A. Malliri (2009) Src-Induced Disassembly of Adherens Junctions Requires Localized Phosphorylation and Degradation of the Rac Activator Tiam1. *Molecular Cell*, 33, 639-653.
- Xu, L. J. & X. M. Deng (2006) Protein kinase C iota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of mu- and m-calpains. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 4457-4466.
- Zhao, X. & J. L. Guan (2011) Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 610-615.

Použité internetové zdroje

Calpain Research Portal: Kalpain Structure and Nomenclature. Kalpain Research Portal: Kalpain Structure and Nomenclature [online] <http://calpain.net/3dstructure/index.html>

Wikipedia, The Free Encyklopedia Wikipedia contributors, 8 August 2017, Catalytic triad, https://en.wikipedia.org/wiki/Catalytic_triad

Wikipedia, The Free Encyklopedia Wikipedia contributors, 16 August 2017, cystein proteases, https://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine_protease

Cell junctions and cell adhesion – rituparnas. Rituparnas – THE MICROBIOLOGIST [online].: <https://rituparnas.wordpress.com/2016/03/14/cell-junctions-and-cell-adhesion/>