



ENZIM CALPAIN

Penulis:

LAILAN SAFINA NASUTION

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH JAKARTA
2023**

HALAMAN PENGESAHAN TULISAN ILMIAH

Judul: Enzim Calpain

Penulis: Dr. dr. Lailan Safina Nasution, M.Si.Med

NIDN : 0308087003

Prodi : Kedokteran

Cirendeu, 21 Agustus 2023

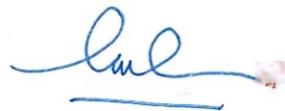
Menyetujui,

Ketua Program Studi Kedokteran FKK UMJ



Dr. dr. Tri Ariguntar W, Sp.PK
NIDN 0020077006

Penulis



Dr. dr. Lailan Safina Nasution, M.Si.Med
NIDN 0308087003

Mengetahui,

Ketua UPT Penelitian dan Pengabdian Masyarakat



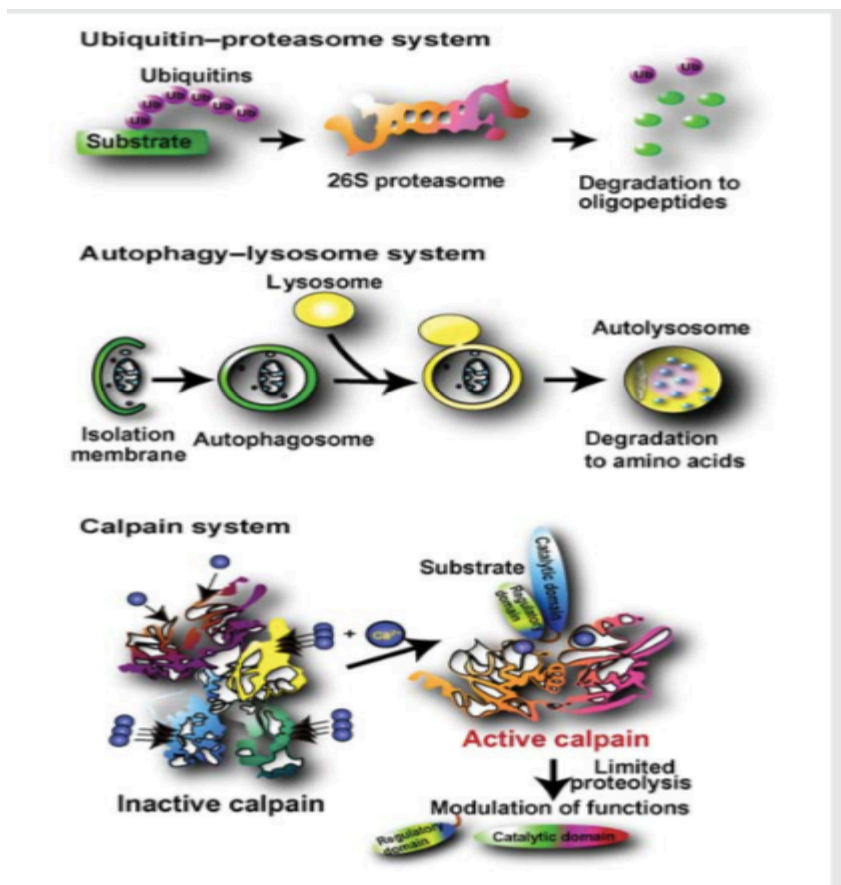
Rike Syahniar, SKM, M.Biomed
NIDN 0316019102

ENZIM CALPAIN

Calpain, adalah suatu enzim proteolitik, yaitu enzim yang mengkatalisis pemecahan protein melalui hidrolisis ikatan peptida. *Calpain* termasuk ke dalam kelompok enzim sistein protease, di sitosol dijumpai dalam bentuk tidak aktif dan memerlukan ion kalsium untuk aktivasinya.

Enzim protease, berdasarkan mekanisme reaksi dan residu situs aktif yang terlibat dalam mekanisme reaksinya diklasifikasikan menjadi serin protease, sistein protease, aspartat protease dan *zinc* (metallo) protease. Sistein protease dapat diklasifikasikan menjadi tiga keluarga besar, yaitu keluarga enzim yang berhubungan dengan *interleukin 1 β converting enzyme* (ICE), *calpain* dan keluarga papain (*cathepsin*).¹

Calpain berbeda dari kelompok proteolitik lainnya seperti sistem *proteasome-ubiquitin* dan sistem *autophagy-lysosome* yang mengeliminasi dan mendaur-ulang substratnya dengan cara degradasi. *Calpain* melakukan proses proteolitik, sama dengan aktivasi protein kinase C (PKC) konvensional. *Calpain* bersifat unik karena secara langsung mengenali substratnya, sementara proteasome dan autofagi menandai substratnya dengan cara ubiquitilasi dan pembentukan autofagosom, (Gambar 1).²



Gambar 1. Sistem Proteolitik Utama Intraseluler

Terdapat beberapa sistem proteolitik utama intraseluler, sebagai berikut:

1. Sistem *proteasome ubiquitin*, yang mendegradasi dan mengeliminasi protein substrat spesifik menjadi beberapa oligopeptida dengan sistem “*ubiquitin-tagging*”, terdiri dari >1000 *ubiquitin ligase*
2. Sistem *autophagy-lysosome*, mendegradasi komponen-komponen sel non-spesifik, termasuk protein dan mikroorganisme menjadi beberapa asam amino, dengan membentuk membran isolasi.
3. Sistem *caspase*, dengan mekanisme apoptosis.
4. Sistem *calpain*, proses proteolitik bukan secara degradasi, tetapi melalui proses signaling yang memodulasi atau memodifikasi aktivitas, spesifisitas, lama hidup (*longevity*), lokalisasi dan struktur substratnya (*limited proteolysis*)²

1. Sejarah penemuan *Calpain*

Calpain pertama kali diidentifikasi pada tahun 1964, ketika aktivitas proteolitik dari protease syaraf yang diaktivasi ion kalsium (*calcium-activated neural protease/CANP*) yang terdeteksi di otak, lensa mata dan jaringan tubuh lain. Pada akhir tahun 1960-an, enzim ini berhasil diisolasi dari otak dan otot rangka tikus. Aktivitas ini disebabkan oleh suatu protease sistein intraseluler yang tidak berasosiasi dengan lisosom dan mempunyai aktivitas optimum pada pH netral, yang secara jelas membedakannya dengan protease dari keluarga *cathepsin*. Peran *calpain* sebagai regulator dapat terlihat dari aktivitasnya yang tergantung kalsium, lokasinya yang di dalam sel, dan substratnya yang diproteolisis secara spesifik, sehingga terlihat jelas bahwa *calpain* bukanlah suatu protease pencernaan. Penamaan *calpain* diberikan ketika sekuens enzim ini berhasil diketahui, dan merupakan gabungan dari 2 protein yang dikenal baik pada waktu itu, yaitu *calmodulin* (suatu protein pen-signal) dan *papain* (protease sistein dari papaya).³

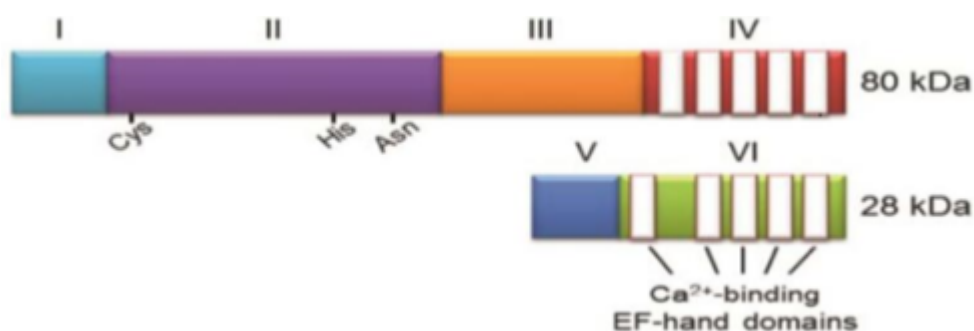
2. Sistem *Calpain*

Sistem *calpain* terdiri dari keluarga *calpain* (15 gen *calpain*), *calpastatin* (inhibitor *calpain* 1 dan 2), dan 2 subunit kecil regulatori yang mengandung tangan EF, yaitu *calpain* S1 dan S2. Dari 15 anggota keluarga *calpain*, yang paling banyak dipelajari adalah *calpain 1* dan *calpain 2*, yang dikenal sebagai *calpain* klasik atau konvensional. *Calpain S1* berinteraksi dengan *calpain 1* dan *calpain 2* membentuk heterodimer yang disebut μ -*calpain*

dan *m-calpain*. Keduanya dibedakan berdasarkan jumlah kalsium yang dibutuhkan untuk mengaktivasi, dimana μ -*calpain* membutuhkan Ca^{2+} 5-15 μM dan *m-calpain* 0,2-0,5 mM. Subunit regulatori diperlukan untuk memastikan pelipatan heterodimer dilakukan dengan benar, juga untuk regulasi aktivitasnya. Peran subunit S2 belum diketahui secara pasti.⁴⁻⁶

Calpain memiliki substrat dengan spektrum yang luas, mulai dari protein sitoskeleton (seperti talin, *vinculin*) sampai faktor-faktor transkripsi (p53, c-fos) dan berbagai enzim (PKC, kaspase, RhoA/Rac). Proses proteolisis oleh *calpain* bukan secara degradasi, tetapi *signaling* di fragmen-fragmen yang dihasilkan yang bekerja sebagai elemen positif atau negatif. Sehingga inhibisi *calpain* dapat dianalogikan sebagai penghentian jalur *signaling*.⁴

Struktur *calpain* terdiri dari dua sub unit, yaitu sub unit katalitik (sub unit besar, 80 kDa) dan sub unit regulatori (sub unit kecil, 28 kDa. Subunit katalitik besar 80 kDa terdiri dari 4 domain (dI-dIV) sedangkan subunit kecil mempunyai 2 domain (dV dan dVI). Domain I dan II merupakan domain fungsi protease, domain III merupakan C2 domain yang juga ditemukan pada protein kinase C dan fosfolipase, berinteraksi dengan kalsium dan fosfolipid. Domain dIV dan dV dikarakterisasi merupakan domain pengikatan kalsium yang masing-masing terdiri dari lima motif tangan EF. Domain tersebut bertanggungjawab untuk heterodimerisasi dari subunit besar dan kecil melalui interaksi unik antara kelima motif tangan EF. Domain dV subunit kecil terdiri dari sekelompok residu glisin (Gly) dalam regio N terminal yang tidak dapat dilihat dalam struktur kristalnya karena konformasinya yang *mobile*.⁵⁻⁷



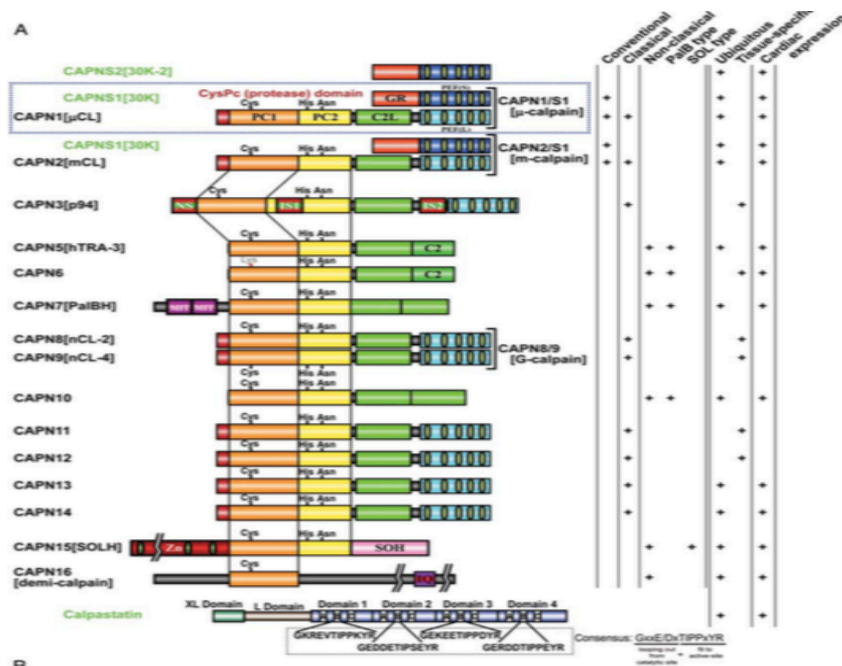
Gambar 1. Struktur *Calpain*^{5, 8}

Calpastatin dapat dijumpai pada semua kompartemen sel berbagai jaringan tubuh. *Calpastatin* mengandung domain berulang, yang masing-masing memiliki sekuens spesifik untuk berikatan dengan *calpain*. Telah diidentifikasi 2 bentuk isoform dari *calpastatin*.

Calpastatin dapat dihancurkan oleh *calpain 2* aktif (tapi tidak *calpain 1*). Kepentingan fisiologi dari degradasi ini belum diketahui pasti, tetapi diduga bahwa *calpain 2* berperan dalam regulasi sistem proteolitik *Ca-dependent*, terutama selama siklus sel.⁹

2.1. Nomenklatur dan Domain *Calpain*

Nomenklatur produk gen *Calpain* mammalia telah dirumuskan oleh *Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee*, untuk menghindari kompleksnya sistem penamaan akibat perkembangan berbagai penelitian tentang *calpain*, seperti yang terlihat pada Gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2. *Calpain* manusia²

2.2. Homologs *Calpain*

Gen *calpain* dijumpai pada hampir semua eukariota dan beberapa bakteri, dan telah diketahui genom manusia memiliki 15 gen *calpain*, terdiri dari 6 gen *calpain* spesifik jaringan (*tissue-specific*) dan sisanya, termasuk *calpain* konvensional dapat ditemukan dimana-mana (*ubiquitous*). *Calpain* spesifik jaringan terdiri dari CAPN3 di otot skeletal, CAPN6 di plasenta dan otot embrio, CAPN8 dan CAPN9 di saluran gastrointestinal, CAPN11 di testis, dan CAPN12 di folikel rambut. Diasumsikan bahwa *calpain ubiquitous* memiliki peran dasar di dalam sel, sementara *calpain* spesifik jaringan terlibat dalam fungsi sel spesifik. Defek pada *calpain ubiquitous* dapat bersifat *lethal*, sementara defek pada *calpain* spesifik jaringan dapat

menyebabkan fenotip spesifik jaringan, seperti *muscular dystrophy* akibat mutasi *CAPN3*.² Di antara 15 anggota *calpain*, yang paling banyak dipelajari adalah *calpain* 1 dan 2. Heterodimer μ - dan *m-calpain* yang dibentuk oleh *calpain* 1 dan 2 diketahui meregulasi bahkan diperlukan dalam berbagai proses fisiologis. Keterlibatannya dalam regulasi siklus sel dan apoptosis, adhesi, migrasi, invasi, dan angiogenesis merupakan hal yang sangat penting untuk pembentukan, progresifitas dan pertumbuhan sel kanker.⁴

3. Regulasi Sistem *Calpain*

Aktivitas *calpain* diatur secara ketat dan diregulasi secara temporal dan spasial. Hal ini sangat penting karena *calpain* merupakan suatu protease dengan jumlah yang sangat banyak di sitoplasma sel sehingga dapat memotong banyak protein struktural maupun sinyal intraseluler, walaupun bagaimana regulasi tersebut terjadi *in vivo* masih merupakan kontroversi. Bukti kuat mengatakan bahwa *calpain* diregulasi dengan ketat secara post-transkripsional oleh beberapa mekanisme, termasuk oleh inhibitor endogennya (*calpastatin*), jumlah kalsium, dan proses autoproteolitik.⁵

Calpain mengandung banyak situs fosforilasi yang relevan dengan fungsi fisiologinya dan meregulasi aktivitas *calpain*. Bukti terakhir dari relevansi kemampuan fisiologi dari fosforilasi *calpain* adanya laporan yang menggambarkan aktivasi *calpain* oleh jalur *epidermal growth factor* (EGF) yang mengaktifasi *calpain* melalui jalur sinyal ERK/MAP kinase.⁵ Fosforilasi *m-calpain* oleh ERK mungkin meningkatkan aktivitas proteolitik *m-calpain*. Pada sisi lain, bukti lain menduga bahwa *interferon inducible chemokine* IP-10 mungkin menghambat aktivitas *m-calpain* melalui jalur fosforilasi PKA-dependent. Dari hal-hal tersebut di atas, diketahui bahwa adanya suatu mekanisme regulasi *calpain* oleh growth factor-dependent phosphorylation, dan diduga bahwa fosforilasi dan kalsium saling berkoordinasi meregulasi aktivitas *calpain in vivo*.⁵

Calpain bentuk aktif ditemukan terutama di membran plasma dan lokalisasi membran tersebut mungkin merupakan mekanisme yang penting terkait regulasi aktivitas *calpain*. Salah satu contoh dari pembatasan spasial, adanya pembatasan dari *calpain* aktif ke fraksi membran di sel T yang distimulasi oleh fibronektin atau PMA. Analisis biokimia lebih lanjut dari sel T yang distimulasi dengan fibronektin mengindikasikan bahwa *calpain* berada dalam suatu kompleks dengan β 1-integrin, talin dan protein-protein terkait membran lainnya. Bukti lain terkait pentingnya lokalisasi *calpain* aktif di fibroblast ditunjukkan oleh pengamatan

bahwa peristiwa pengiriman sinyal dari reseptor EGF yang menyebabkan aktivasi *calpain* terikat ke membran plasma. Penemuan-penemuan ini menimbulkan dugaan adanya faktor-faktor di sitoplasma seperti *calpastatin* atau faktor-faktor tambahan lain diperlukan untuk aktivasi *calpain* terlokalisasi di membran plasma.⁵

Semua enzim protease dari sistem *calpain* merupakan enzim yang membutuhkan kalsium (*Ca-dependent*) yang diaktivasi secara maksimal pada pH netral. Sistem *calpain* terdiri dari 2 kelompok enzim yang berbeda sensitivitasnya terhadap kalsium, yaitu *calpain 1* (μ -*calpain*), yang membutuhkan konsentrasi mikromolar Ca^{2+} , dan *calpain 2* (*m-calpain*) yang membutuhkan konsentrasi milimolar Ca^{2+} .¹⁰ Selain itu, terdapat pula protease *Ca-dependent* yang dijumpai pada jaringan spesifik, contoh protease spesifik otot nCI-1 (*calpain 3* atau p94) dan protease spesifik gaster nCI-2 (*calpain 4*).⁹

Di dalam sel, *calpain* berlokasi di sitosol dan di berbagai struktur membran, distribusinya tergantung tipe sel atau tipe *calpain*. Contoh, sel glia dari C6 tikus lebih mengandung *calpain 2* daripada *calpain 1*. Tujuh puluh persen aktivitas *calpain 2* berasosiasi dengan membran, sementara aktivitas *calpain 1* 80% berlokasi di sitosol.⁹

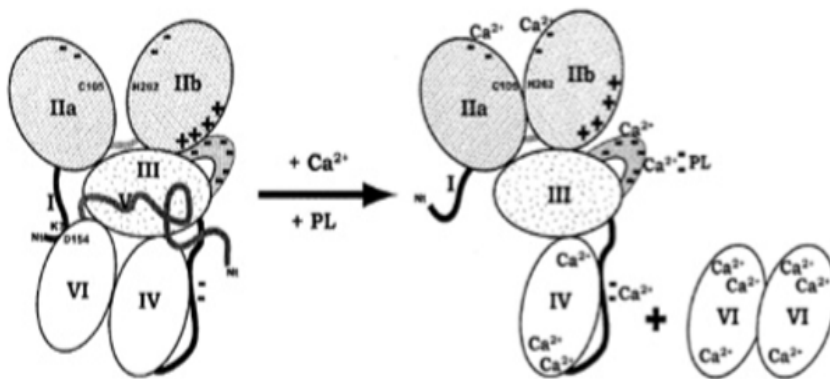
Calpain 2 juga ditemukan di luar sel. Studi *in vitro* dengan kultur *myoblast* tikus menunjukkan antibodi *calpain 2* berikatan dengan matriks ekstraseluler. Pada konsentrasi rendah (0,01 mg/mL) *calpain 2* menginduksi fusi dari *myoblast*, sementara *calpastatin* (inhibitor *calpain*) dan leupeptin menekan proses ini hingga 70%, sehingga, *calpain* ekstraseluler memiliki peran dalam regulasi interaksi antar sel.⁹

Deregulasi aktivitas *calpain* menyebabkan degradasi berlebihan atau akumulasi protein yang ada sehingga menyebabkan kerusakan seluler dan masalah patologis⁷

4. Mekanisme Aktivasi *Calpain*

Calpain berada dalam sitosol dalam bentuk enzim yang tidak aktif dan bertranslokasi ke membran sel sebagai respon terhadap peningkatan kadar kalsium intraseluler. Di membran, *calpain* diaktifkan oleh kalsium dan fosfolipid. Hidrolisis autokatalitik dari domain I terjadi selama aktivasi yang menghasilkan disosiasi 30kDa dari 80kDa. *Calpain* yang teraktivasi menghidrolisis protein substrat pada membran atau dalam sitosol setelah lepas dari membran. Ketika tidak ada kalsium, subdomain IIa dan IIb saling terpisah secara struktural. Pengikatan kalsium dan fosfolipid menyebabkan perubahan konformasi protease yang menyebabkan domain IIa dan IIb berinteraksi membentuk situs katalitik fungsional. Terdapat tiga situs pengikatan kalsium pada *m-calpain*, yaitu dua domain IV dan VI seperti

calmodulin, daerah lengkung asam pada domain III, serta domain II protease. Mekanisme regulasi aktivasi kalsium pada *m-calpain* terjadi dalam 2 tahap (gambar 2). Tahap pertama, terjadi interaksi domain IIa dan IIb. Pengikatan kalsium pada domain IV, VI dan III melepaskan domain I dari VI dan domain II dari III yang menyebabkan disosiasi 30K dari 80K. Tahap kedua yaitu pembentukan lengkung situs aktif yang disebabkan oleh pengikatan dua atom kalsium pada domain protease (salah satunya pada domain IIa dan IIb).¹



Gambar 3. Mekanisme Aktivasi *Calpain* oleh Kalsium.

Pada sel normal, konsentrasi Ca^{2+} lebih rendah dari 0,05 mM. Pada kondisi ini, *calpain* bekerja sebagai biomodulator dari peristiwa-peristiwa yang bergantung pada Ca^{2+} , seperti transduksi sinyal, proliferasi sel, proses siklus sel, diferensiasi sel, dan apoptosis. Adapun jumlah Ca^{2+} yang dibutuhkan untuk mengaktivasi *calpain in vivo* belum diketahui pasti, tetapi kebutuhan paruh maksimum Ca^{2+} *in vitro* sekitar 3-50 mM dan 400-800 mM.

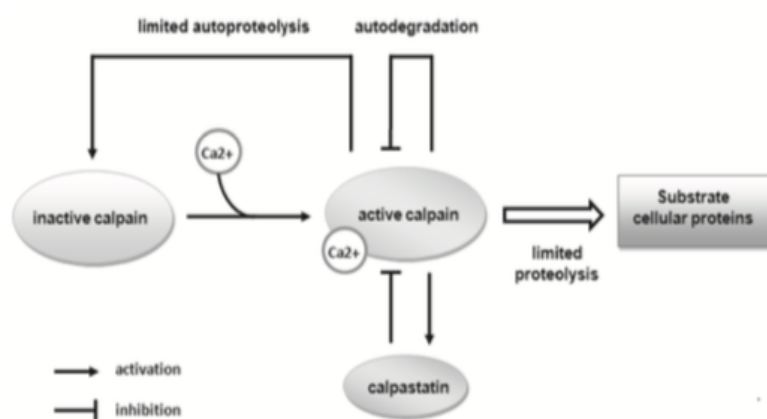
Calpain 2 memerlukan konsentrasi 0,75 mM kalsium bebas untuk aktivitas proteolitik maksimumnya, dimana jumlah ini lebih tinggi dari konsentrasi fisiologis kalsium bebas intrasel (0,2-0,8 mM) sehingga dibutuhkan suatu mekanisme untuk menurunkan batas sensitivitas *calpain* terhadap Ca^{2+} . Diduga *calpain* berinteraksi dengan berbagai struktur membran untuk selanjutnya dikonversi menjadi suatu bentuk yang diaktivasi oleh konsentrasi Ca^{2+} yang lebih rendah dan dekat dengan kadar intrasel. Telah diketahui suatu mekanisme kaskade aktivasi *calpain*, dimana peningkatan aktivitas *calpain 1* dapat meningkatkan sensitivitas *calpain 2* terhadap Ca^{2+} sehingga menginduksi aktivasinya.⁹

Ion logam juga dapat mengaktivasi sistem *calpain*, contoh Mg^{2+} dan Al^{3+} . Pada konsentrasi milimolar kalsium, *calpain 1* dan *2* diisolasi dari otot polos tikus yang diaktivasi oleh Al^{3+} . Pada konsentrasi submilimolar Ca^{2+} , *calpain 2* (tetapi tidak *calpain 1*) diaktivasi oleh Al^{3+} dengan konsentrasi milimolar, dan reaksi ini diinhibisi oleh *calpastatin*. *Calpain 2* yang diaktivasi oleh aluminium, melakukan proteolisis terhadap substrat (protein desmin

sitoskeletal) di situs yang sama dengan protein yang diaktivasi kalsium. Reaksi ini disertai dengan perubahan konformasional subunit *calpain 2*.⁹

Carnosin, anserin dan metil histidin diduga sebagai regulator *calpain*. Dipeptida-dipeptida ini dijumpai pada otot skelet dengan konsentrasi cukup tinggi dan terbukti dapat mengaktivasi *calpain*. Pada saat yang sama, *carnosin* meningkatkan efek inhibisi dari *calpastatin*.⁹

Laju autolisis meningkat dengan penurunan pH dari 7,0 ke 5,8. Pada kondisi asam di medium intraseluler, aktivasi sistem *calpain* mungkin berperan dalam degradasi komponen protein sel. Selain itu, autolisis menurun pada penurunan suhu dari 25°C menjadi 5°C.⁹



Gambar 4. *Calpain* diaktivasi oleh peningkatan kadar kalsium, yang selanjutnya melakukan aktivitas proteolisisnya. Aktivitas ini dibatasi oleh mekanisme autodegradasi (autoproteolisis) dan adanya efek inhibisi dari *calpastatin*.

5. Fungsi *Calpain*

Walaupun fungsi fisiologis *calpain* belum dimengerti sepenuhnya, namun *calpain* diketahui berperan dalam berbagai macam proses seluler yang tergantung kalsium seperti transduksi sinyal, proliferasi sel, tahapan siklus sel, diferensiasi sel, fusi membran, apoptosis dan aktivasi platelet. Akibat *calpain* dapat memotong berbagai substrat, *calpain* terlibat dalam berbagai fenomena fisiologis maupun patologis, mulai embriogenesis sampai adhesi sel, berbagai penyakit seperti diabetes, Alzheimer, kardiovaskuler sampai perkembangan tumor. *Calpain* terlibat di dalam migrasi sel dengan mempengaruhi arsitektur dari adhesi sel dan komponen sitoskeletal. Inhibisi terhadap *calpain* menurunkan laju migrasi dan kemampuan invasif sel.^{4,5}

Calpain dapat berfungsi baik di dalam sel maupun di matriks ekstraseluler, dijumpai dalam keadaan larut maupun terikat ke membran, yang merupakan lokasi aktif utama dari *calpain*. *Calpain* diketahui berperan dalam pembelahan sel dan fungsi-fungsi sel spesifik seperti potensiasi neuron jangka panjang dan fusi sel pada myoblast. *Calpain* menginduksi degradasi sel pada beberapa keadaan patologis. Pada apoptosis, sistem proteolitik dirangsang dalam beberapa tahapan. Contoh, pada apoptosis yang dipicu radiasi, sistem *calpain* diaktivasi dalam waktu 15 menit, sementara sistem kaspase dirangsang hanya setelah 2 jam. Pada waktu yang bersamaan, kaspase menghasilkan suatu efek destruktif kuat pada calpastatin, suatu inhibitor *calpain*, dengan mempertahankan aktivitas sistem proteolitik.⁹

Mekanisme apoptosis oleh *calpain* belum dimengerti sepenuhnya. *Calpain* berperan dalam kontrol kematian sel baik secara fisiologis maupun patologis, terutama pada penyakit keganasan dan imunitas. Selain itu juga terlibat pada peristiwa apoptosis pada penyakit sistem syaraf, kardiovaskuler, dan lain-lain.⁶

Calpain, ibarat pedang bermata dua, sangat diperlukan di berbagai aspek fisiologi sel, tetapi aktivasinya juga cenderung bersifat destruktif yang dapat menyebabkan kondisi patologi.²

Aktivitas *calpain* konvensional diperlukan untuk fungsi kardiovaskuler yang normal.

Peningkatan aktivitas *calpain* konvensional telah terbukti sebagai salah satu faktor yang memperburuk penyakit kardiovaskuler dan kondisi patologis lainnya.²

Deregulasi aktivitas *calpain* menyebabkan degradasi berlebihan atau akumulasi protein yang ada sehingga menyebabkan kerusakan seluler dan masalah patologis.⁷

Walaupun demikian, fungsi *calpain in vivo* belumlah dipahami sepenuhnya. Belum dipahami bagaimana akibat proteolisis oleh *calpain* menyebabkan modifikasi pada substrat yang selanjutnya dapat bekerja meregulasi berbagai proses dinamis, seperti proses migrasi sel. Demikian juga, bagaimana proteolisis yang diperantarai *calpain* berperan dalam jalur-jalur sinyal intrasel belum dipahami dengan baik, begitu pula dengan regulasi aktivitas *calpain* secara temporal dan spasial di dalam sel.^{5, 9} Pengetahuan tentang pola aktivasi dan interaksi lebih lanjut ke jalur apoptosis sangat penting untuk diketahui lebih lanjut.⁶

6. Aplikasi industrial dan medis dari *Calpain*

Calpain tampaknya sangat potensial sebagai target terapi berbagai kondisi patologis. Pengetahuan tentang peran *calpain* dalam berbagai proses penting terkait perkembangan dan progresifitas tumor, seperti transformasi sel, migrasi dan penyebaran tumor, apoptosis/survival, dan angiogenesis menjadikan *calpain* potensial sebagai target pengobatan kanker. Jika aktivitas *calpain* dapat dikendalikan, maka kemampuan invasif dari sel juga

dapat dikendalikan. Hal ini sangat penting dalam penghambatan perkembangan sel tumor maupun peradangan kronis.⁴

DAFTAR PUSTAKA:

1. Hardiany NS. Cathepsin dan Calpain: Enzim Pemecah Protein dalam Sel. *eJournal Kedokteran Indonesia*. 2013; 75-83.
2. Sorimachi H and Ono Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovascular research*. 2012; 96: 11-22.
3. Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisaragi M and Suzuki K. Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature*. 1984; 312: 566.
4. Leloup L and Wells A. Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011; 15: 309-23.
5. Perrin B and Huttenlocher A. Calpain. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002; 34: 722-5.
6. Łopatniuk P and Witkowski JM. Conventional calpains and programmed cell death. *Acta Biochimica Polonica*. 2011; 58.
7. Suzuki K, Hata S, Kawabata Y and Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*. 2004; 53: S12-S8.
8. Ujan JA, Jumani S, Memon SW and Narejo M. 2. Reviewed paper on biology of the Calpain proteolytic system. *Pure and Applied Biology (PAB)*. 2018; 7: 603-9.
9. Sazontova TG, Matskevich AA and Arkhipenko YV. Calpains: physiological and pathophysiological significance. *Pathophysiology*. 1999; 6: 91-102.
10. Glass JD, Culver DG, Levey AI and Nash NR. Very early activation of m-calpain in peripheral nerve during Wallerian degeneration. *Journal of the neurological sciences*. 2002; 196: 9-20.