



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**NUEVA LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA CALPAÍNA 2  
EN EL NUCLEOLO DE CÉLULAS DE CÁNCER  
COLORRECTAL SOBRE LA BIOGÉNESIS RIBOSOMAL:  
EFECTO DEL ESTADO MUTACIONAL DE KRAS**

Tesis doctoral presentada por:

**Marcelino Telechea Fernández**

Directores:

Elena Ruiz y García-Trevijano

Andrés Cervantes Ruiperez

Valencia, Julio de 2018



El trabajo realizado en este proyecto ha sido posible gracias a la subvención por el Ministerio de Ciencia e Innovación, incluyendo FEDER (BFU2017-89704-P), Instituto de Salud Carlos III (PI15/2180 y PI13/00606; PI12/02394) y Consellería de Educación (GV PROMETEO 2014/II-055 y GVPROMETEO 2013-005).



## **AGRADECIMIENTOS**

El solo hecho de estar escribiendo estas líneas ya me parece algo increíble. Por fin ha llegado el día, después de tanto tiempo y esfuerzo, en que poner punto final a este trabajo.

Por supuesto, la realización de este proyecto ha sido posible gracias a muchas personas que a lo largo de mucho tiempo me han apoyado para llegar a este momento.

A mi familia, la gran responsable de que haya llegado a esta instancia. A mis padres por todo el sacrificio hecho durante tantos años, el apoyo incondicional que me han dado siempre en los momentos difíciles y por haber sido los primeros en formarme un espíritu científico, con curiosidad por saber y no morir en el intento. En definitiva, gracias por toda la educación que me han dado que me ha permitido llegar hasta hoy y ser quien soy y como soy.

A mi pareja, mi compañera de vida por muchos años...tantísimas gracias he de darte también por todo lo que me has aguantado durante todos estos años. Desde la mudanza a Oviedo hiciste el primer sacrificio de acompañarme y luego en todo este tiempo has soportado mis horarios que a veces solo nos veíamos para cenar, me has levantado el ánimo tantas veces cuando las cosas no me salían, me has dado cariño para contrarrestar mis enfados, has sido la compañera perfecta para los momentos de descanso y diversión fuera del laboratorio. Sin duda, mi trabajo en el laboratorio estando contigo ha resultado mucho más fácil y por eso, esto también es un pedacito tuyo, gracias...

A mis directores, la doctora Elena Ruiz y García-Trevijano por haber depositado su confianza en mí desde el comienzo y las bases, las primeras herramientas con las que convertirme en un buen científico. Gracias por guiarme con paciencia a desarrollarme en esta bonita profesión. Por

supuesto, gracias al doctor Cervantes por haber confiado en mí desde aquella primera comunicación sin conocernos, motivarme y darme su apoyo para ser yo quien llevara a cabo el proyecto. Además, siempre contar con su aprobación para la participación en congresos y cursos, algo fundamental.

A mis compis de labo: Pepa, ¿qué habría sido de mí sin tu presencia en ese comienzo en el que recién daba mis primeros pasos? Gracias mil por estar siempre ahí, cercana y dispuesta a aguantar mil y una preguntas y con infinita paciencia para tranquilizarnos y ayudar con los problemas del día a día. Por supuesto, los cafés matinales, las charlas en las comidas, tantos momentos valiosos de desahogo de nuestras penas, pero también de risas, de pasarlo bien, de mantener un ambiente distendido y hasta familiar en el día a día que ha hecho estos años muy llevaderos y una gran experiencia que he disfrutado muchísimo. ¿Que digo de vos Lucía? Lo más importante que donde comenzó como una compañera de laboratorio me llevo una gran amiga por siempre. Lo que hemos pasado tenemos para escribir un libro, momentos difíciles no solo de laboratorio sino contándonos de nuestra vida fuera, con sus problemas, pero también sus buenos momentos. Siempre he podido contar contigo para todo, dudas de laboratorio, cuestiones personales y siempre has estado ahí, muchas gracias por eso de verdad. Por suerte también nos las hemos arreglado para pasarlo bien fuera, viajes, salidas, muchos lindos momentos. Entre los 2 nos hemos dado un soporte mutuo que creo nos ha facilitado las cosas para llegar al día de hoy, gracias por todo...A Ángela, mi asesora bioinformática, con la que también compartimos tantos momentos, largas charlas después del café, intercambio de opiniones, etc, también buenos momentos que pasamos juntos fuera, gracias por haber contribuido a pasarlo mejor estos años...A Paco, el último en llegar pero gran fichaje del

grupo, nos hemos echado unas buenas risas en la Dorada y lo hemos pasado bien tanto dentro como fuera del labo.

Al doctor Juan Viña por abrimme las puertas de su laboratorio, a Concha y a Rosa por su atención en los pedidos para que no nos falten cosas y en definitiva, por hacerme sentir parte del laboratorio.

A Carlos, Ray y demás gente de los laboratorios de la UCIM por estar ahí dispuestos a ayudar con algún préstamo de material, intercambio de ideas científicas y por haber pasado buenos momentos en los congresos, salidas y fiestas...A Zahara, Fernando y su grupo también por haberme sacado de más de un apuro con algún reactivo o perdiendo su tiempo en ayudarme a entender o discutir algún resultado...A Bea, también tantos años juntos, más allá de tu inestimable ayuda con el uso del citómetro, gracias por tantas charlas cortas y no tanto, en el pasillo, en el labo, la compañía de muchas tardes, los cuentos de cómo nos sentíamos cada uno, etc...A mis “chicas de máster”, Verónica, como primera fuiste mi mayor aprendizaje, me costó lo mío pero tus preguntas y dudas me hacían pensar y mejorar en mi desarrollo como científico, además por suerte generamos una muy buena relación, nos reímos mucho y lo pasamos bien...Cristina, espero haber contribuido un poquito a que entendieras mejor todo esto, gracias por tu ayuda del día a día y haber formado un buen equipo entre los 2....

En definitiva, con temor de dejarme a alguien, gracias a todos los que me han acompañado en mayor o menor medida a lo largo de tanto tiempo e hicieron posible que esta tesis sea una realidad...



## ÍNDICE

---

ABREVIATURAS .....	I
RESUMEN.....	II
INTRODUCCIÓN .....	III
1. Las calpaínas .....	7
1.1 Las calpaínas 1 y 2 en la familia de calpaínas .....	7
1.2 Estructura de las Calpaínas.....	9
1.3 Regulación de la actividad de las calpaínas clásicas .....	12
1.3.1 Regulación por $\text{Ca}^{2+}$ .....	13
1.3.2 Autólisis.....	14
1.3.3 Dimerización.....	16
1.3.4 Calpastatina.....	17
1.3.5 Modificaciones post-traduccionales y sus vías de señalización	18
1.4 Expresión de calpaínas en el cáncer .....	22
1.5 Reconocimiento de sustratos y función de calpaínas .....	26
1.5.1 <i>In Vitro</i> vs. <i>In Vivo</i> .....	26
1.5.2 Reconocimiento de sustratos por las Calpaínas.....	27
1.5.3 Localización subcelular y especificidad de reconocimiento de sustratos de las calpaínas.....	28
1.6 Función de las calpaínas y reconocimiento de sustratos en el cáncer .. .....	30
1.6.1 Calpaínas en el desarrollo y la transformación tumoral.....	31
1.6.2 Calpaínas en supervivencia celular/apoptosis.....	32
1.6.3 Calpaínas en metástasis: migración e invasión.....	32
1.6.4 Las calpaínas en la angiogénesis .....	33

## ÍNDICE

---

1.7 Valor pronóstico y beneficios terapéuticos de la inhibición de calpaínas.....	34
2. El nucleolo.....	36
2.1 Organización nucleolar.....	36
2.2 Regulación y principales vías de señalización implicadas en la biogénesis ribosomal.....	39
2.2.1 Vía RAS/RAF/MEK/ERK.....	40
2.2.2 Vía PI3K/AKT/mTOR.....	40
2.3 La biogénesis ribosomal en células tumorales.....	42
2.3.1 La biogénesis ribosomal en células tumorales: oncogenes y genes supresores de tumores.....	42
2.4 El nucleolo como regulador de la homeostásis: vías de respuesta al estrés.....	44
2.4.1 El nucleolo como regulador de la homeostásis: tipos de estrés y respuestas.....	47
2.5 El nucleolo como nueva diana de fármacos antitumorales.....	48
3. El cáncer colorrectal.....	50
3.1 Principales vías de señalización implicadas en la progresión del cáncer colorrectal.....	50
3.2 Regulación de la actividad de las vías de señalización de KRAS y PI3K.....	51
3.3 Mutaciones y resistencias a fármacos antitumorales.....	53
OBJETIVOS.....	IV
MATERIAL Y MÉTODOS.....	V
1. Reactivos y anticuerpos utilizados.....	59

## ÍNDICE

---

2. Tampones utilizados .....	60
3. Líneas celulares y mantenimiento en cultivos .....	61
4. Extracción de RNA y cuantificación .....	62
5. Knock-down de calpaína 2 .....	62
6. Análisis de la expresión de mRNA y de rRNA por RT-qPCR.....	63
7. Extracción de proteínas totales y Western Blot.....	64
8. MTT.....	65
9. Fraccionamiento subcelular: extracción de nucleolos .....	65
10. Inmunofluorescencia .....	66
11. Proximity Ligation Assay, PLA (Duolink).....	66
12. Medida de la actividad calpaína .....	67
13. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP assay).....	67
14. Análisis Estadístico .....	69
RESULTADOS.....	VI
1. Localización subcelular de las calpaínas convencionales en células de cáncer colorrectal .....	71
2. Papel de la calpaína 2 nucleolar en la biogénesis ribosomal .....	75
3. Distribución nucleolar de la calpaína 2: dependencia de su actividad . .....	77
4. Papel de la calpaína S1 y la calpastatina en la regulación de la calpaína nucleolar.....	79
5. Vías de señalización implicadas en la localización nucleolar de la calpaína 2 .....	81
5.1 Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la calpaína 2.....	83

## ÍNDICE

---

5.1.1 Efecto del estado mutacional de KRAS sobre los niveles de calpaína 2 y actividad enzimática totales. ....	84
5.1.2 Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la localización nucleolar de la calpaína 2. ....	85
5.2 Modulación de la localización nucleolar de la calpaína 2 según el estado mutacional de KRAS .....	87
6. Función de la calpaína 2 no nucleolar .....	90
7. Función de la calpaína 2 nucleolar en respuesta a la retirada de suero .....	91
8. Papel de la calpaína 2 en la síntesis de rRNA .....	94
9. Localización de la calpaína 2 en otros modelos celulares .....	97
DISCUSIÓN .....	VII
1. Localización subcelular de las calpaínas como posible determinante de su función en el cáncer colorrectal. ....	99
1.1 Localización subcelular en la familia de las calpaínas .....	99
1.2 Localización de los reguladores de la actividad calpaína: calpaína S1 y calpastatina .....	100
1.3 Localización de la calpaína 2 en otros modelos tumorales y no tumorales .....	104
2. Importancia de la localización subcelular para la función de las calpaínas. Expresión vs localización .....	105
2.1 Actividad calpaína en el nucleolo .....	105
2.2 Función de la calpaína en la biogénesis ribosomal .....	106
2.3 Función de la calpaína 2 nucleolar como sensor de suero: síntesis de rRNA y relación con el estatus mutacional de KRAS .....	109

## ÍNDICE

---

2.4 Función de la calpaína 2 no nucleolar .....	111
3. Regulación de la calpaína 2 nucleolar .....	113
3.1 Dependencia de la actividad enzimática de la calpaína 2 para su localización nucleolar.....	113
3.2 Vías de señalización que intervienen en la localización nucleolar de la calpaína 2.....	114
3.3 Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la localización de la calpaína 2 .....	115
4. Esquema representativo del sistema de la calpaína 2 nucleolar y su regulación según el estado mutacional de KRAS .....	119
CONCLUSIONES .....	VIII
BIBLIOGRAFÍA.....	IX



# **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

---

4E-BP1: *4E-binding protein 1*  
AKT: *v-akt Murine Thymoma Viral Oncogene*  
APAF: *Apoptotic protease activating factor 1*  
ARF: *alternative reading frame*  
BCA: *bicinchoninic acid*  
CAPN: *calpaína*  
CBSW: *calpain-type beta-sandwich domain*  
CCR: *cáncer colorrectal*  
CDK: *cycline-dependent kinase*  
CECE: *cáncer de esófago de células escamosas*  
CH: *cáncer hepático*  
ChIP: *chromatine immunoprecipitation*  
CK2: *casein kinase 2*  
CN: *cáncer nasofaríngeo*  
CRCC: *cáncer renal de células claras*  
DAG: *diacilglicerol*  
DC: *detention center*  
DFC: *dense fibrillar component*  
EGF: *epidermal growth factor*  
EGFR: *epidermic growth factor receptor*  
ERK: *extracellular signal-regulated kinases*  
ETS: *external transcribed spacer*  
FAK: *focal adhesion kinase*  
FBS: *fetal bovine serum*  
FC: *fibrillar center*  
FLIP: *fluorescence loss in photobleaching*  
FRAP: *fluorescence recovery after photobleaching*  
GAP: *GTPase activating protein*  
GC: *granular component*  
HDM2: *human double-minute 2*

## ABREVIATURAS

---

HIF: *hypoxia-inducible factor*  
HUVEC: *human umbilical vein endothelial cells*  
IF: *inmunofluorescencia*  
IGS: *intergenic spacer*  
IH: *inmunohistoquímica*  
IP: *inmunoprecipitación*  
ITS: *internal transcribed spacer*  
I $\kappa$ B $\alpha$ : *Inhibitor of  $\kappa$ B  $\alpha$*   
KRAS: *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
LGMD: *limb-girdle muscular dystrophy*  
MAPKs: *mitogen activated protein kinase*  
MEK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*  
MMP: *matrix metalloprotease*  
mTORC1: *mammalian target of rapamycin complex 1*  
MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*  
MYC: *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*  
ncRNA: *non-coding RNA*  
NF- $\kappa$ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
Nolo: *nucleolo*  
NoLS: *nucleolar localization signal*  
NOR: *nucleolus organizer region*  
NOX1: *NADPH oxidase 1*  
NPM: *nucleofosmina*  
PDGF: *platelet-derived growth factor*  
PDK: *Phosphoinositide-dependent kinase-1*  
PEF: *penta EF-hand*  
PI3K: *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase*  
PIC: *preinitiation complex*  
PIP2: *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*  
PIP3: *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*

## ABREVIATURAS

---

PKA: *protein kinase A*  
PKC: *protein kinase C*  
PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*  
pRB: *proteína retinoblastoma*  
PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*  
RAF: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*  
RAPTOR: *Regulatory-associated protein of mTOR*  
rDNA: *ribosomal deoxyribonucleic acid*  
RE: *retículo endoplasmático*  
ROS: *reactive oxygen species*  
RSK: *Ribosomal s6 kinase*  
S6K1: *S6 kinase 1*  
SL1: *selective factor 1*  
SNP: *single nucleotide polymorphisme*  
snRNA: *small nuclear ribonucleic acid*  
TAF: *TBP-associated factors*  
TBP: *TATA-box binding protein*  
TEM: *transición epitelio mesénquima*  
TIF: *transcription initiation factor*  
TSC: *tuberous sclerosis complex*  
UBF: *upstream binding factor*  
WB: *western blot*  
WT: *wild type*

## ABREVIATURAS

---

# **RESUMEN**



La calpaína 2 pertenece a una familia de Cys-proteasas pleiotrópicas que no son consideradas como un sistema degradativo, sino que “procesan” sus sustratos. La sobreexpresión de las calpaínas se ha relacionado con mal pronóstico en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal. Sin embargo, los mecanismos de reconocimiento de sustrato, de regulación/desregulación y las funciones específicas en el cáncer colorrectal permanecen sin resolver. En este trabajo, se estudió la distribución subcelular de la calpaína como mecanismo clave en el reconocimiento de sustratos y, en consecuencia, para la propia actividad calpaína. En concreto, demostramos una nueva localización de la calpaína 2 en el nucleolo de células de cáncer colorrectal. Observamos que la distribución nucleolar de la calpaína 2 es dependiente de su actividad enzimática y del estado mutacional de KRAS. En células KRAS WT<sup>-/-</sup>, la ausencia de suero induce la expresión de la calpaína 2, su acumulación nucleolar y un aumento de su unión al promotor del rDNA y al espaciador intergénico, al tiempo que disminuyen los niveles de pre-rRNA. La ausencia de calpaína 2 por siRNA específico previene la disminución en los niveles de 47s pre-rRNA tras la retirada de suero. Por el contrario, la biogénesis ribosomal se mantiene inalterada en células KRAS G13D<sup>-/-</sup> en las que la expresión, localización nucleolar y unión al rDNA de la calpaína 2 permanece sin cambios durante el crecimiento en ausencia de suero. Proponemos que la calpaína 2 nucleolar podría ser un sensor dependiente de KRAS para reprimir la biogénesis ribosomal en condiciones de crecimiento limitante. En condiciones de activación constitutiva de las vías de señalización como las que comúnmente se encuentran en el cáncer colorrectal, la calpaína 2 está desregulada y las células tumorales se vuelven insensibles al entorno extracelular.

Calpain-2 belongs to a family of pleiotropic Cys-proteases with modulatory rather than degradative functions. Calpain overexpression has been controversially correlated with poor prognosis in several cancer types, including colorectal carcinoma. However, the mechanisms of substrate-recognition, calpain-2 regulation/ deregulation and specific functions in colorectal carcinoma remain elusive. Herein, calpain subcellular distribution was studied as a key event for substrate-recognition and consequently, for calpain-mediated function. We describe a new localization for calpain-2 in the nucleoli of colorectal carcinoma cells. Calpain-2 nucleolar distribution resulted dependent on its enzymatic activity and on the mutational status of KRAS. In KRAS WT/- cells serum-starvation induced calpain-2 expression, nucleolar accumulation and increased binding to the rDNA-core promoter and intergenic spacer, concomitant with a reduction in pre-rRNA levels. Depletion of calpain-2 by specific siRNA prevented pre-rRNA down-regulation after serum removal. Conversely, ribosomal biogenesis proceeded in the absence of serum in unresponsive KRAS G13D/- cells whose calpain-2 expression, nucleolar localization and rDNA-occupancy remained unchanged during the time-course of serum starvation. We propose here that nucleolar calpain-2 might be a KRAS-dependent sensor to repress ribosomal biogenesis in growth limiting conditions. Under constitutive activation of the pathway commonly found in colorectal carcinoma, calpain-2 is deregulated and tumor cells become insensitive to the extracellular microenvironment.

# **INTRODUCCIÓN**



### 1. LAS CALPAÍNAS

Las calpaínas (EC 3.4.22.17, clan CA, familia C02) pertenecen a una familia de Cys-proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que actúan a pH neutro. Las calpaínas se diferencian de otros sistemas proteolíticos como el proteasoma, la autofagia y el sistema de caspasas por dos características fundamentales: 1) no son consideradas como un sistema degradativo, sino que “procesan” sus sustratos de modo que estos adquieren nueva/s funciones o formas de regulación y 2) se encargan del propio reconocimiento de sus sustratos sin necesidad de sistemas auxiliares de identificación como por ejemplo la ubiquitinación en el sistema proteasoma.

La distribución filogenética de las calpaínas es muy amplia ya que se encuentran en casi todos los eucariotas y algunas bacterias, pero no en arqueas.

#### 1.1 Las calpaínas 1 y 2 en la familia de calpaínas

Existen en humanos 15 genes que, exceptuando la subunidad reguladora o calpaína 4, codifican las calpaínas 1-16 (Tabla 1). Además, varios miembros de esta familia presentan formas de maduración alternativa con múltiples transcritos (19 en el caso de la calpaína 3) (Ono *et al.*, 2016), con lo que se pueden alcanzar más de 50 variantes (Ono, Saido and Sorimachi, 2016). Las calpaínas 1 y 2, denominadas “calpaínas convencionales”, también se conocen como  $\mu$  y  $m$  calpaína respectivamente, por la concentración molar de calcio *in vitro* que inicialmente se observó que era necesaria para su activación.

A diferencia del resto de miembros de la familia, las calpaínas convencionales forman heterodímeros compuestos de una subunidad catalítica (80 KDa), y una subunidad reguladora común a

## INTRODUCCIÓN

ambas, la calpaína 4 o S1 (*CAPNS1*, 30 KDa). Diversos estudios proponen que la calpaína 4 podría tener una función chaperona sobre las subunidades catalíticas 1 y 2, es decir, facilitarían el plegamiento y/o la estabilidad de las nuevas subunidades sintetizadas (Yoshizawa *et al.*, 1995).

**Tabla 1. Integrantes de la familia de las calpaínas en humanos.**

Gen	Principal expresión	Estructura
<i>CAPN1</i>	ubicua	clásica
<i>CAPN2</i>	ubicua	clásica
<i>CAPN3</i>	músculo esquelético	clásica
<i>CAPN5</i>	ubicuo	no clásica
<i>CAPN6</i>	placenta	no clásica
<i>CAPN7</i>	ubicua	no clásica
<i>CAPN8</i>	tracto gastrointestinal	clásica
<i>CAPN9</i>	tracto gastrointestinal	clásica
<i>CAPN10</i>	ubicua	no clásica
<i>CAPN11</i>	testículos	clásica
<i>CAPN12</i>	folículos pilosos	clásica
<i>CAPN13</i>	ubicua	Clásica
<i>CAPN14</i>	esófago	Clásica
<i>CAPN15</i>	ubicua	no clásica
<i>CAPN16</i>	testículos	no clásica
<i>CAPNS1</i>	ubicua	no aplicable

De acuerdo con esta hipótesis, los ratones *knock-out* para la calpaína S1 mueren durante la etapa de desarrollo embrionario, ya que las calpaínas 1 y 2 sufren una disminución en su expresión, lo cual indica una vital importancia de la subunidad reguladora para la estabilidad de ambas calpaínas (Arthur *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2000). Existe, además, un parólogo de la calpaína S1, la calpaína S2, cuyo papel fisiológico se desconoce.

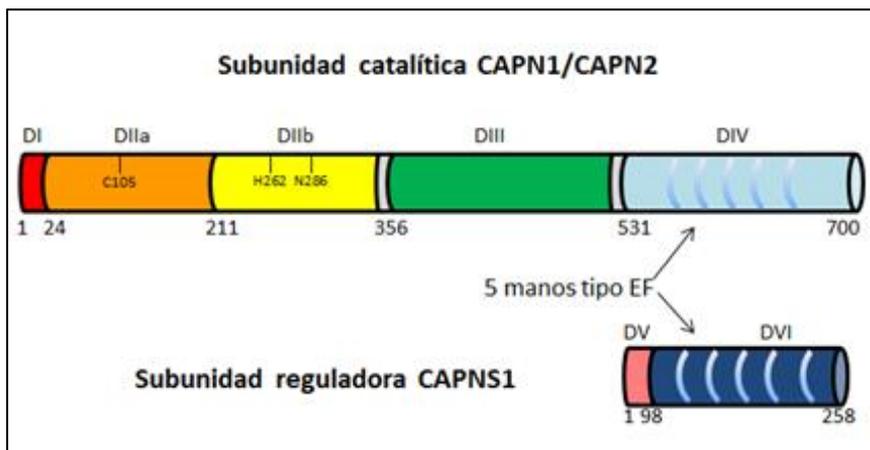
Las calpaínas 1 y 2 cuentan con un 62,4 % de homología en su estructura primaria (Goll, Thompson and Li, 2003), lo que explica en buena parte que compartan prácticamente todos los sustratos (al menos *in vitro*), los inhibidores sintéticos y el único inhibidor endógeno, la

calpastatina (CAST, 63-84 KDa según las diferentes isoformas en humanos). Las calpaínas 1 y 2 son, además, las isoformas de mayor abundancia y tienen una distribución ubicua, aunque hay otros miembros de la familia que son específicos de tejido como la 3 en músculo esquelético o la 8 y la 9 en el tracto gastrointestinal (Sorimachi, Ishiura and Suzuki, 1993) (Tabla 1). En este sentido, existe un amplio espectro de efectos fenotípicos causados por la deficiencia de las calpaínas según se trate de las convencionales o las de localización específica de tejido. Por ejemplo, se ha visto que ratones que no expresan la calpaína 2 son letales durante el desarrollo embrionario (Dutt et al., 2006), mientras que ratones que desarrollan mutaciones en calpaínas específicas de tejido (o que no las expresan) solo causan defectos asociados al tejido como una mayor susceptibilidad a úlceras gástricas en ausencia de las calpaínas 8 y 9 (Hata *et al.*, 2010).

Apartado especial merecen las conocidas como calpainopatías, es decir, aquellas enfermedades causadas por un defecto genético en algún gen de las calpaínas. La primera de estas enfermedades descubiertas fue la LGMD (del inglés *limb-girdle muscular dystrophy*) o distrofia muscular de cintura tipo 2A, donde mutaciones de la calpaína 3 provocan que la proteína no tenga su actividad proteasa (Richard *et al.*, 1995). En otros casos, la calpaína 5 es responsable de la vitreorretinopatía inflamatoria vascular (Mahajan *et al.*, 2012) o la 14 de la esofagitis eosinofílica (Sleiman *et al.*, 2014).

### **1.2 Estructura de las Calpaínas**

De acuerdo a las similitudes entre las calpaínas 1 y 2, podemos diferenciar en ambas una estructura de 4 dominios (numerados del I-IV) y de 2 dominios (V-VI) en el caso de la subunidad reguladora (Figura 1):



**Figura 1. Representación esquemática de las calpaínas convencionales.** Se muestran los dominios (DI-DVI) de las calpaínas convencionales y de las subunidades reguladoras, así como la posición del aminoácido con el que comienza cada uno de ellos. Además, se representa los aminoácidos y la posición de la tríada catalítica de la calpaína 2.

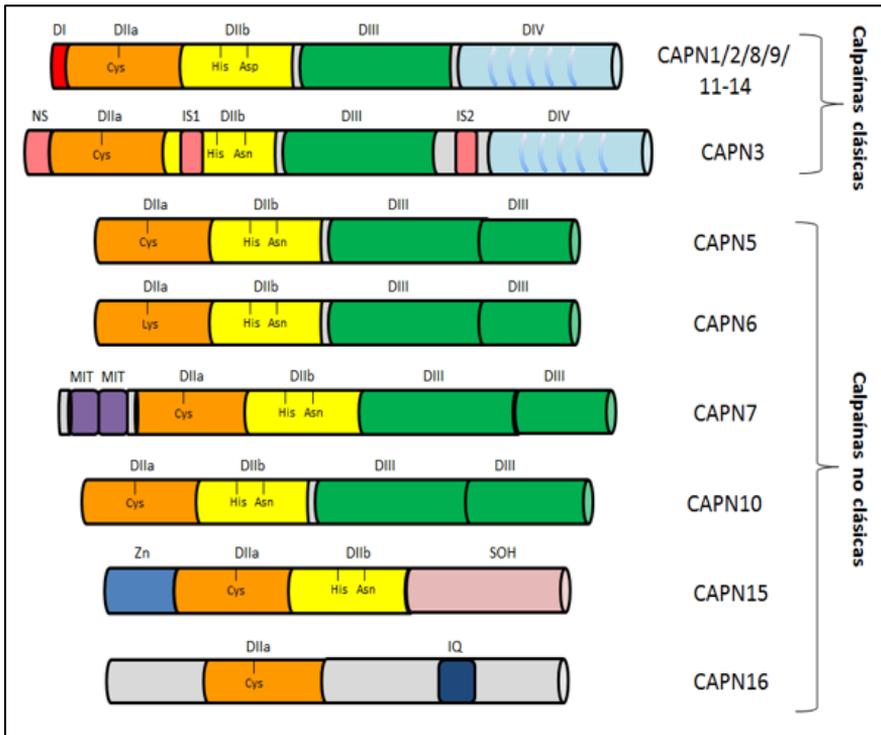
- a. El dominio I, ubicado en el extremo amino terminal de la subunidad catalítica, es una  $\alpha$ -hélice que sirve de anclaje al dominio VI de la subunidad reguladora.
- b. El dominio II, subdividido a su vez en 2 subdominios IIa y IIb, es el dominio proteasa, ampliamente conservado entre especies. En él se encuentra la tríada catalítica: Cys115, His272, Asn296 en la calpaína 1 y Cys105, His262, Asn286 en la calpaína 2 (Goll, Thompson and Li, 2003). En la conformación inactiva de la proteína se encuentran distribuidos (y distanciados) en ambas mitades del dominio proteasa.
- c. El dominio III o CBSW (*calpain-type beta-sandwich domain*) consta de 8 láminas  $\beta$  con alta homología con el dominio C2 de proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos como la proteína quinasa C o la fosfolipasa C, (Gil-Parrado et al., 2003).
- d. El dominio IV o dominio PEF (*penta EF hand*) cuenta con 5 secuencias de tipo mano EF; las 4 primeras unen iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y la quinta participa en la dimerización de la subunidad catalítica con la subunidad reguladora.

- e. El dominio V de la subunidad reguladora cuenta con múltiples residuos de Gly que le confieren una alta naturaleza hidrofóbica, lo cual apoyaría un posible papel de las calpaínas en la unión a membranas.
- f. El dominio VI, con gran homología con el dominio IV, también cuenta con 5 secuencias del tipo mano EF por medio de las cuales une 4 iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

Es importante mencionar que para considerar que una proteína pertenece a esta familia su dominio proteasa debe tener una elevada homología de secuencia con el de las calpaínas 1 y 2 (Sorimachi, Hata and Ono, 2011). Acorde a esta definición, podemos observar una familia muy diversa que, por ejemplo conserva en algunos de sus miembros el dominio PEF, lo cual clasifica las calpaínas en “clásicas” y “no clásicas” (Tabla 1). Las que pertenecen al primer grupo cuentan con el dominio proteasa, el dominio CBSW y el dominio PEF. En humanos se han encontrado 9 calpaínas clasificadas como clásicas (1, 2, 3, 8, 9, 11-14), la mayoría de las cuales están conservadas en vertebrados (Figura 2) (Ono and Sorimachi, 2012).

A pesar de ello, las posibles similitudes en secuencia no necesariamente se reflejan funcionalmente ya que, como se ha mencionado anteriormente, solo la calpaína 1 y la 2 forman heterodímeros con la subunidad reguladora. La calpaína 6 es la única que cuenta con una lisina en lugar de cisteína en los aminoácidos que componen la tríada catalítica (Dear *et al.*, 1997). Además, las calpaínas 8 y 9, para ejercer su actividad deben formar un complejo llamado “G-calpaína”, hasta la fecha el único heterodímero de subunidades catalíticas que se conoce en esta familia, en el cual ambas son imprescindibles para su funcionalidad (Hata *et al.*, 2010). Por otra parte, la calpaína 3 es la única proteasa conocida que puede ser activada por  $\text{Na}^+$  (Ono *et al.*, 2010) y que tiene 3 regiones

ausentes en el resto de integrantes de la familia, por las cuales puede sufrir un fuerte y rápido procesamiento autolítico.



**Figura 2. Dominios estructurales de la familia de las calpaínas en humanos.** Se muestran los distintos integrantes de la familia de las calpaínas en humanos y sus dominios. La presencia de los dominios tipo manos EF distingue las calpaínas en clásicas o no clásicas. NS, IS1 e IS2: secuencias de inserción específicas de la calpaína 3. MIT: dominio de transporte y de interacción con microtúbulos. Zn: dominio de dedo de Zn<sup>+</sup>. SOH: dominio homólogo del lóbulo óptico pequeño. IQ: dominio de interacción con calmodulina.

### 1.3 Regulación de la actividad de las calpaínas clásicas

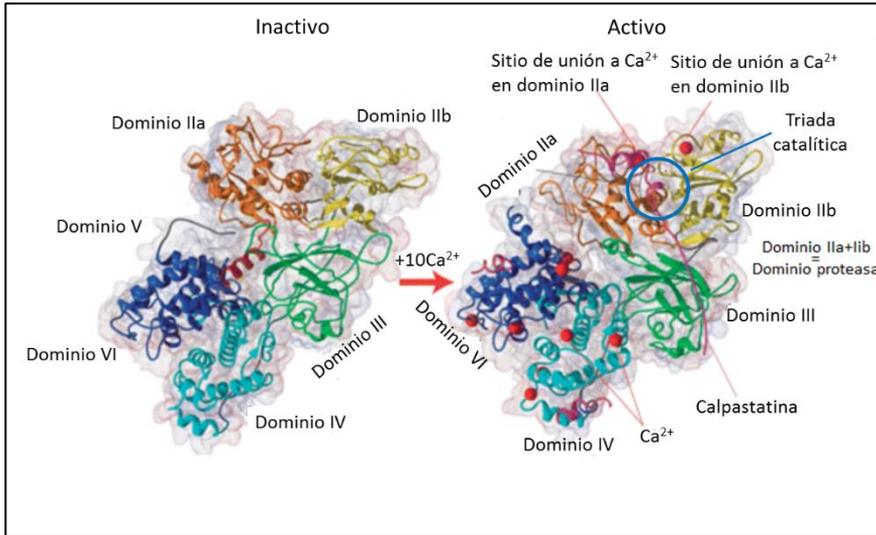
El interrogante históricamente más importante en el estudio de las calpaínas es que la activación *in vitro* de estas proteasas requiere como mínimo una concentración  $\mu\text{M}$  de calcio, cantidad que *in vivo* no está disponible y es incompatible con la viabilidad celular. Se ha sugerido

diversas hipótesis para intentar explicar esta situación, la cual desarrollaremos a continuación (Campbell and Davies, 2012).

### 1.3.1 Regulación por $\text{Ca}^{2+}$

A pesar de conocer la necesidad de  $\text{Ca}^{2+}$  de las calpaínas desde su descubrimiento en el año 1964, los mecanismos moleculares subyacentes a tal proceso habían permanecido ocultos hasta hace poco tiempo. Diversas hipótesis que intentaban explicar los cambios generados por la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  carecían de un modelo estructural de calpaínas que apoyara esas ideas. Tras la cristalización de la calpaína 2, las estructuras tridimensionales sin y con  $\text{Ca}^{2+}$  demostraron que la dependencia de este ion es intrínseca al dominio proteasa. En primera instancia se generó la estructura en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , en la cual se observó que los dominios proteasas IIa y IIb mantienen una conformación abierta e inactiva de modo que no se forma la tríada catalítica (Strobl *et al.*, 2000). Esto indicaba que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  debía producir un cambio conformacional que reorientara el dominio proteasa para formar un sitio activo (Hosfield *et al.*, 1999).

Pocos años después, se generó una novedosa explicación en un estudio donde encontraron actividad enzimática en una “mini-calpaína” recombinante que solo contaba con el dominio proteasa. Estos investigadores determinaron que en las calpaínas existen 2 sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en los dominios proteasa IIa y IIb imprescindibles para la activación de la proteasa. En concreto, la unión de 2 iones  $\text{Ca}^{2+}$  a estos 2 sitios no provoca grandes cambios estructurales en toda la molécula, pero sí en la conformación de estos dominios que causan su movimiento del uno hacia el otro (Figura 3). De este modo, pasan a formar una estructura cerrada y activa, la tríada catalítica (Moldoveanu *et al.*, 2002).



**Figura 3. Estructura 3-D de la calpaína 2 inactiva y activa.** Representación en modelo de cinta de la calpaína 2 y los cambios conformacionales inducidos por la unión del Ca<sup>2+</sup> para formar el dominio proteasa activo. El sitio activo aparece marcado con un círculo negro. Las bolas rojas representan iones Ca<sup>2+</sup>. Se señala también la interacción del inhibidor endógeno la calpastatina. (Adaptado de Sorimachi, Hata and Ono, 2011).

### 1.3.2 Autólisis

La similitud de secuencia con otras proteasas que sufren un procesamiento proteolítico como mecanismo de activación, llevó a postular que la autólisis de las calpaínas era una condición indispensable para su activación. Esto es, las calpaínas se sintetizarían como propéptidos y la unión de Ca<sup>2+</sup> (al dominio IV) promovería un cambio conformacional que a su vez generaría la autoproteólisis de una región para convertirse en funcionales (Campbell and Davies, 2012). La cristalización de la calpaína 2 también ha sido importante a la hora de comprender que la autólisis no era el mecanismo causante de la activación de las calpaínas. La escisión del dominio I (hélice de anclaje) eliminaría las restricciones de movimiento de la estructura, permitiendo el acercamiento de los dominios IIa y IIb para formar el dominio proteasa. Este mecanismo disminuiría los elevados requerimientos de Ca<sup>2+</sup> observados *in vitro*. De hecho, se

identificaron los posibles cortes proteolíticos en el extremo aminoterminal de las calpaínas 1 y 2. La calpaína 1 sufriría un primer corte de 14 aminoácidos y luego uno de 12 (Zimmerman and Schlaepfer, 1991); mientras que la calpaína 2 perdería primero 9 aminoácidos para luego sufrir una proteólisis de 10 aminoácidos (Brown and Crawford, 1993).

A pesar de estos supuestos acerca de la región amino terminal de la calpaína 2 (y por extensión la 1), el progreso en el análisis de su estructura permitió establecer varias conclusiones. En primer lugar, el dominio IV no sufre grandes cambios conformacionales tras la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hanna, Campbell and Davies, 2008). Además, tanto en la estructura sin  $\text{Ca}^{2+}$  como en la forma que sí lo tiene unido se observa con claridad que ninguno de sus dominios está lo suficientemente cerca del sitio activo como para ser proteolizado. Es más, la hélice de anclaje solo estaría expuesta a la proteólisis tras perder su interacción con el dominio VI por una previa activación de la proteína. Incluso en ese caso, se produciría una rápida proteólisis que conduciría a una rápida disminución (o incluso inactivación) de la actividad proteasa que no podría volver a activarse, lo cual sería un mecanismo de activación poco eficaz (J. S. Chou *et al.*, 2011). De hecho, se ha postulado que la autoproteólisis sería un artefacto de experimentación *in vitro*, cuando existe una alta concentración de calpaínas durante su purificación. Esta situación no ocurriría *in vivo*, ya que habría muchísimas proteínas más en las proximidades de las calpaínas como para que estas alcanzaran esas altas concentraciones.

En definitiva, existen evidencias *in vitro* de que la autoproteólisis del extremo amino terminal de las calpaínas disminuye sus requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto actuaría como mecanismo promotor de la actividad proteolítica. No obstante, esta proteólisis solo ocurriría *in vivo* como un evento intermolecular, es decir, como consecuencia de la actividad entre calpaínas previamente activadas por otro mecanismo.

### 1.3.3 Dimerización

Como se mencionó previamente, las calpaínas convencionales existen como heterodímeros formados por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Los integrantes de la familia de proteínas con dominios tipo mano EF, a la cual pertenecen las calpaínas junto con otras proteínas, suelen dimerizar con otros miembros de la familia (o con ellos mismos). El dominio PEF (dominio IV en las calpaínas convencionales) es una de las principales diferencias estructurales de las calpaínas que las distingue entre clásicas y no clásicas (Figura 2). Así, se asume que los miembros que no cuentan con este dominio actúan como monómeros mientras que los demás son capaces de formar homo o heterodímeros (Ravulapalli *et al.*, 2009). No obstante, *in vivo* solo las calpaínas convencionales forman heterodímeros con la calpaína S1. Aun así, se ha visto que el dominio PEF de la calpaína 3 forma homodímeros muy estables (Partha *et al.*, 2014; Ono *et al.*, 2016). Existe, además, el único ejemplo de heterodímero entre 2 subunidades “grandes”, la “G-calpaína”. En este caso, la región amino terminal de la calpaína 8 y los dominios tipo mano EF de las calpaínas 8 y 9 se encargan de la dimerización. En este heterodímero la calpaína 8 actúa como subunidad catalítica y la 9 ejerce una “función chaperona”, controlando su estabilidad (Hata *et al.*, 2016).

La posible formación de heterodímeros es importante porque la calpastatina, inhibidor endógeno de las calpaínas convencionales, se une a sitios en los dominios PEF de las subunidades catalítica y reguladora. En caso de ausencia de la calpaína S1, la calpastatina no tendría una asociación tan estrecha y por tanto perdería capacidad inhibitoria (Ravulapalli *et al.*, 2009).

La importancia de la formación de heterodímeros radica en la polémica disociación de los heterodímeros de las calpaínas convencionales como requisito para la activación de las mismas. En este sentido, los datos en la

literatura resultan controvertidos, mostrándose que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se produce bien una disociación (Suo *et al.*, 1999; Kitagaki *et al.*, 2000) o bien una interacción de ambas subunidades, indispensable para su actividad catalítica (Elce *et al.*, 1997; Dutt *et al.*, 1998).

Estos resultados contradictorios se fueron explicando más tarde, en gran medida por dificultades técnicas de los experimentos y sus condiciones (fuerza iónica, pH, etc) ya que el contacto del  $\text{Ca}^{2+}$  con las calpaínas provoca su agregación, autólisis y bajos niveles de recuperación de la proteína. Una vez los modelos experimentales se fueron poniendo a punto, estas dificultades de interpretación se fueron aclarando y fueron apoyando que la disociación de la subunidad reguladora no es el mecanismo que provoca la activación de las calpaínas.

### 1.3.4 Calpastatina

Por su parte, las calpaínas cuentan con un inhibidor endógeno específico y reversible que hasta la fecha es el único conocido, la calpastatina (Sorimachi, Hata and Ono, 2011). El gen de la calpastatina (*CAST*) codifica diferentes isoformas generadas por sitios de inicio de la transcripción o *splicing* alternativo. Todas estas isoformas cuentan en su región carboxilo terminal con 4 dominios de inhibición independientes y variaciones en su dominio amino terminal (Takano *et al.*, 2000; Parr *et al.*, 2001). La calpastatina es capaz de unir e inhibir de forma simultánea 4 moléculas de calpaína a través de sus 4 dominios inhibidores.

Se ha observado que la región de unión a la calpastatina está conservada en las calpaínas 1, 2, 3, 8 y 9, por lo que se piensa que en esta región podría estar la clave de la especificidad de unión calpaína-calpastatina (Ono, Saido and Sorimachi, 2016). A pesar de ello, la función inhibidora de la calpastatina solo se ha visto *in vivo* en las calpaínas 1 y 2.

La calpastatina solo se une a la calpaína activada por calcio, lo que sugiere que su función sería atenuar la activación más que prevenirla. Es más, un aspecto interesante surgido de los últimos estudios sobre la calpastatina es la hipótesis de que ésta solo sería necesaria para bloquear una activación prolongada de la calpaína en situaciones de estrés. Así, en una activación fisiológica de la calpaína no habría una actividad proteasa tan elevada que hiciera necesaria su restricción por calpastatina (Campbell and Davies, 2012). Probablemente por este motivo, tanto los ratones *knockout* de calpastatina (Takano *et al.*, 2005) como los que la sobreexpresan (Spencer and Mellgren, 2002) no exhiben ningún fenotipo evidente en ausencia de estrés. Aunque la calpastatina se expresa en exceso en la mayoría de tipos celulares (Ono, Saido and Sorimachi, 2016), existen algunas alteraciones patológicas en las que la actividad calpaína se encuentra desregulada y por tanto los niveles del inhibidor no son capaces de disminuirla (Schoch *et al.*, 2012). En general, se ha visto en diferentes modelos de enfermedades vasculares o neurológicas que la sobreexpresión de la calpastatina atenúa los síntomas de la enfermedad (Li *et al.*, 2009; Hübener *et al.*, 2013; Diepenbroek *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2018).

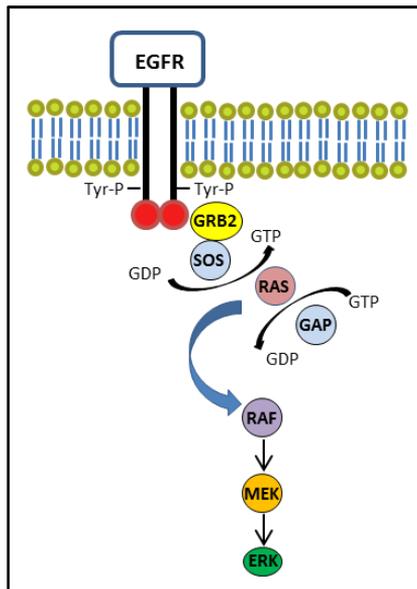
### 1.3.5 Modificaciones post-traduccionales y sus vías de señalización

De acuerdo a las últimas hipótesis, las fosforilaciones de las calpaínas controlarían su estabilidad (Leloup *et al.*, 2010) o distribución hacia la membrana para modular su activación (Glading *et al.*, 2001; Moretti *et al.*, 2014) más que tener un efecto directo sobre su actividad.

#### A. La vía de EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK

El EGFR (*epidermic growth factor receptor*), también conocido como HER1o ErbB1, es un receptor transmembrana que pertenece a la familia de receptores ErbB (Schneider and Wolf, 2008). Tras la unión del ligando, EGFR forma homodímeros y/o heterodímeros con otros miembros de la familia, lo cual promueve la autofosforilación de sus residuos Tyr. Esta

fosforilación actúa de anclaje para la unión de proteínas adaptadores (GRB2) y efectoras (SOS) a la membrana que acaban activando RAS. A su vez, RAS actúa como transductora de señales desde la membrana a partir de estímulos como factores de crecimiento, desencadenando entre otras, la vía de señalización de RAF/MEK/ERK (Figura 4).



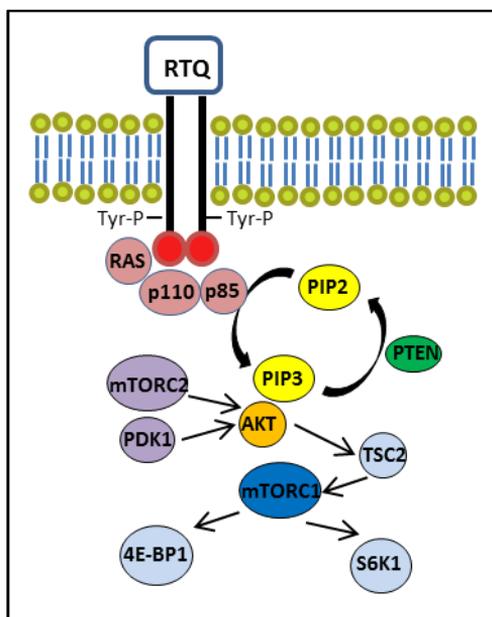
**Figura 4. Vía de señalización EGFR/RAS/MEK/ERK.** Se muestran los principales componentes encargados de la transducción de señal. La GTPasa RAS recibe estímulos como factores de crecimiento en la membrana y los transmite hacia el interior de la célula mediante consecutivas fosforilaciones, que acaban promoviendo el crecimiento y la proliferación celular. La acción de las proteínas GAP (*GTPase activating protein*) promueve la hidrólisis de GTP unido a RAS y por tanto cesa la actividad de la vía de señalización.

En el contexto de señalización de esta vía, se ha observado que tras el estímulo con EGF, ERK fosforila la Ser 50 de la calpaína 2, aumentando finalmente la actividad calpaína (Glading *et al.*, 2004). La fosforilación en Ser50 y la consiguiente activación de la calpaína 2 ha podido ser demostrada en distintos modelos experimentales o clínicos relacionados con la plasticidad sináptica (Zadran *et al.*, 2010) o con hipertensión pulmonar (Kovacs *et al.*, 2016). Además de la Ser50, se han identificado

otros residuos de Ser susceptibles de fosforilación y también implicados en la modulación de la actividad de la calpaína 2 (Ser 369) (Kovacs *et al.*, 2016) o la calpaína 3 (Ser 629) (Ojima *et al.*, 2014).

B. La vía de PI3K/AKT/mTOR

Es una vía implicada en la regulación del crecimiento celular, proliferación, apoptosis y metabolismo (Figura 5). Su activación comienza principalmente por la unión de factores de crecimiento a receptores Tyr-quinasas de membrana (o por la interacción con RAS), lo cual genera la autofosforilación de los residuos Tyr que a su vez promueve el reclutamiento de la PI3K (*phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase*) a la membrana para ser activada (Porta, Paglino and Mosca, 2014).



**Figura 5. Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR.** Representación esquemática de los principales componentes de la vía. La señal desencadena la activación de un receptor Tyr-quinasa (RTQ) que promueve la síntesis de PIP3 por la subunidad catalítica p85 de la PI3K. El PIP3 provoca la transducción de la señal activando AKT cuya consecuencia es la liberación de la inhibición de mTORC1 que fosforila y activa diversas proteínas como factores de transcripción.

La PI3K promueve la síntesis de PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*) a partir de PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*) (Aoki and Fujishita, 2017), el cual actúa como molécula señalizadora.

El PIP3 promueve la fosforilación y activación de la quinasa AKT en la membrana (Shaw and Cantley, 2006; Porta, Paglino and Mosca, 2014). AKT activa mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) que a su vez fosforila y activa varios sustratos que promueven un aumento en la síntesis de proteínas (Wu *et al.*, 2013) y en el crecimiento celular.

La influencia de esta vía sobre las calpaínas se ha observado a diferentes niveles, ya que por un lado se encontró que la expresión de la calpaína 6 era dependiente de la señalización por PI3K/AKT (Y. Liu *et al.*, 2011) y por otro, la actividad calpaína dependiente de PI3K también tenía un papel fundamental en la contracción y movimiento de células endoteliales en respuesta a estrés (Miyazaki, Honda and Ohata, 2007; Hein *et al.*, 2015).

### C. Proteín quinasa C (PKC)

Se trata de una familia de Ser/Thr quinasas que son activadas por señales como incrementos en diacilglicerol (DAG) o  $Ca^{2+}$ . Se han identificado una amplia variedad de sustratos de la PKC entre las que se encuentran las calpaínas. Así, se demostró que, las calpaínas convencionales 1 y 2 pueden ser fosforiladas *in vitro* e *in vivo* por la PKC $\epsilon$  tras un estímulo de nicotina. La nicotina también activa c-SRC, siendo uno de sus efectores la PKC $\epsilon$ . Todo este proceso provoca el aumento de la actividad calpaína que a su vez incrementa la capacidad de migración e invasión en líneas celulares de cáncer de pulmón (Xu and Deng, 2006).

### D. Proteín quinasa A (PKA)

Al igual que la PKC, cuenta con sustratos muy variados entre los que también se encuentra la calpaína. Las primeras observaciones demostraron

que el cAMP celular inhibía la activación de las calpaínas mediada por ligandos del EGFR y como consecuencia la migración de fibroblastos (Shiraha *et al.*, 1999). Posteriormente se observó que la PKA, que se activa por cAMP, fosforila la calpaína 2 en la Ser 369/Thr 370, lo cual disminuiría la actividad calpaína y la migración de fibroblastos. Esto ocurriría porque la fosforilación impediría interacciones clave del dominio III (con el dominio IV y los PIP2 de la membrana plasmática) y por tanto se “bloquearía” la conformación de la calpaína en un estado inactivo (Shiraha *et al.*, 2002).

### **1.4 Expresión de calpaínas en el cáncer**

Diversos estudios muestran que existe una desregulación en la expresión de las calpaínas en múltiples tipos de cáncer, tanto en análisis de pacientes como en líneas celulares en cultivo. No obstante, las observaciones resultan controvertidas, mostrando un sistema complejo de analizar en el cual los resultados son muy variados y dependientes del entorno celular (Tabla 2).

Sobre la calpaína 10 se han realizado numerosos estudios sobre la correlación entre polimorfismos y la susceptibilidad a padecer determinados tipos de cáncer (Frances *et al.*, 2007; Esteban *et al.*, 2008; Moreno-Luna *et al.*, 2011). Por otra parte, los estudios de la calpaína 10 en carcinoma de esófago de células escamosas (CECE) han resultado contradictorios (Chan *et al.*, 2013).

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 2. Expresión desregulada de calpaínas en diversos tipos de cáncer.**

<b>Calpaína</b>	<b>Cáncer</b>	<b>Alteración</b>	<b>Muestra</b>	<b>Consecuencia</b>
<i>Calpaína 10</i>	CCR	UCSNP-44	pacientes	protector
	laringe	UCSNP-44	pacientes	protector
		UCSNP-63	pacientes	mal pronóstico
	CECE	baja expresión	líneas celulares	aumenta apoptosis
baja expresión		pacientes	baja supervivencia	
<i>Calpaína 9</i>	gástrico	deficiencia	líneas celulares, ratones, pacientes	transformación neoplásica, mal pronóstico
	CCR	sobreexpresión	animales	protector
<i>Calpaína 6</i>	útero	sobreexpresión	pacientes	malignidad tumoral
	osteosarcoma	sobreexpresión	líneas celulares, animales, pacientes	malignidad tumoral, resistencia a fármacos
			pacientes	malignidad tumoral
<i>Calpaína 3</i>	melanoma	sobreexpresión	pacientes	malignidad tumoral
		disminución expresión	líneas celulares	progresión tumoral
<i>Calpaína S1</i>	glioma, CRCC, CH, CN	sobreexpresión	pacientes	mal pronóstico
<i>Calpastatina</i>	mama	sobreexpresión	pacientes	metástasis
	útero	sobreexpresión	pacientes	mal pronóstico
<i>Calpaínas 1/2</i>	CH	sobreexpresión	líneas celulares	metástasis
	esófago, mama	Sobreexpresión	pacientes	mal pronóstico
<i>Calpaína 1</i>	schwannoma, meningiomas y CRCC	sobreexpresión	pacientes	malignidad tumoral
<i>Calpaína 2</i>	ovario	sobreexpresión	pacientes	respuesta a quimioterapia, supervivencia
	próstata	sobreexpresión	pacientes	progresión tumoral
			pacientes	progresión tumoral
	CCR	sobreexpresión	animales, líneas celulares	resistencia a antitumorales
			líneas celulares	progresión tumoral

CCR: cáncer colorrectal, CECE: cáncer de esófago de células escamosas, CRCC: cáncer renal de células claras, CH: cáncer hepático, CN: cáncer nasofaríngeo, UCSNP: polimorfismo de nucleótido único.

La calpaína 9 se ha relacionado con un posible papel como supresor de tumores en fibroblastos NIH3T3 (Liu, Li and Cohen, 2000) y su baja expresión como marcador de mal pronóstico en pacientes con cáncer gástrico (Song *et al.*, 2016).

La calpaína 6 casi no se detecta en el adulto, siendo su expresión elevada en cáncer de útero (Skubitz and Skubitz, 2003; Lee *et al.*, 2007, 2008) y en osteosarcoma (Y. Liu *et al.*, 2011; Marion *et al.*, 2012).

Se encontró la calpaína 3 sobreexpresada en melanoma (Weeraratna *et al.*, 2004), pero otro estudio encontró su menor expresión como necesaria para la adquisición de características invasivas (Moretti *et al.*, 2009; Ruffini *et al.*, 2013).

En cuanto a la calpastatina, su sobreexpresión se asoció con mayor invasión linfovascular en muestras de pacientes con cáncer de mama (Storr, Mohammed, *et al.*, 2011), pero se observó una menor expresión en adenocarcinoma colorrectal comparado con tejido normal de colon (Lakshmikuttyamma *et al.*, 2004).

Se estableció en varios tipos de cáncer que la sobreexpresión de la calpaína S1 en pacientes es un factor de mal pronóstico (Bai *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2014; P. C. Zheng *et al.*, 2014; Zhuang *et al.*, 2014).

En el caso de las calpaínas 1 y 2, en líneas celulares de carcinoma hepatocelular se observó que eran necesarias para la invasión y metástasis (Chen *et al.*, 2013), mientras que en *microarrays* de tejidos de pacientes se asociaron con peor pronóstico en cáncer de esófago (Storr *et al.*, 2013) y de mama (Storr *et al.*, 2012). La sobreexpresión de la calpaína 1 se ha observado en distintos tipos de tumores tales como schwannomas y meningiomas (Kimura *et al.*, 1998) o en carcinoma de células renales, en las cuales se correlacionaba el nivel de sobreexpresión con el grado de malignidad (Braun, 1999). Además, en un *microarray* de cDNA de

próstata la calpaína 1 se encontraba sobreexpresada en los estadios tumorales en comparación con el tejido sano. Con respecto a la calpaína 2, varios estudios han reportado la implicación de esta en el cáncer colorrectal (CCR). Un primer estudio describió, tanto por inmunohistoquímica (IH) como por *western blot* (WB), su sobreexpresión en muestras tumorales en comparación con tejido sano de los mismos pacientes con CCR, (Lakshmikuttyamma *et al.*, 2004). Otros estudios han implicado a la calpaína 2 en procesos de resistencia a antitumorales. En un modelo murino de CCR se observó que la calpaína 2 degrada I $\kappa$ B $\alpha$ , estando este último implicado en la resistencia a irinotecan (Fenouille *et al.*, 2012). Otro estudio en líneas celulares de CCR también sugirió que la inhibición de la calpaína 2, en los casos en los que ésta esté sobreexpresada, podría tener un interesante potencial como diana terapéutica para reducir la progresión tumoral (Marciel *et al.*, 2017). Nuevamente se pudo demostrar el papel de la calpaína 2 en la progresión tumoral mediada por NF- $\kappa$ B. Finalmente, se ha postulado que la calpaína 2 participa en un mecanismo de resistencia a oxaliplatino en líneas celulares de CCR resistentes a este fármaco mediante un incremento en la actividad de NOX1 y producción de ROS (Chocry, Leloup and Kovacic, 2017).

Como vemos, en los estudios referidos, prácticamente “solo” se analizan cambios en niveles de expresión, lo cual no necesariamente se relaciona con la actividad calpaína. Además, en la mayoría de ellos no se conocen los mecanismos moleculares subyacentes a tal desregulación, ni sus efectos. Por ello, es muy importante comprender los sistemas de reconocimiento de sustratos por las calpaínas, las diferencias de su funcionamiento *in vivo* e *in vitro* e inclusive entre los diferentes miembros de la familia.

### 1.5 Reconocimiento de sustratos y función de calpaínas

#### 1.5.1 *In Vitro* vs. *In Vivo*

Como podemos observar, la regulación de la actividad de las calpaínas es un sistema muy complejo que involucra a muchos participantes, cada uno con sus características funcionales. Además, las condiciones bioquímicas del entorno son muy importantes para la actividad calpaína, de manera que se pueden marcar diferencias entre eventos que ocurran *in vitro*, pero no ocurran *in vivo*. Este es el caso, por ejemplo, de la disociación de la subunidad reguladora o la autólisis de la calpaína como supuestos mecanismos de activación de las calpaínas. Estos fenómenos tradicionalmente fueron estudiados *in vitro*, lo cual generó muchas especulaciones erróneas acerca de su función. No obstante, con las mejoras técnicas, se pudo observar que estos procesos no ocurrían como mecanismos desencadenantes de la actividad de las calpaínas *in vivo*. De manera interesante, se observó que la calpastatina era capaz de inhibir las calpaínas 8 y 9 (Lee *et al.*, 1999; Hata *et al.*, 2007) *in vitro*, pero no *in vivo*. De igual forma, la subunidad reguladora calpaína S1 parecía ser necesaria para la actividad de la calpaína 9 *in vitro* pero posteriormente se vio que no ocurría tal asociación *in vivo* (Hata *et al.*, 2007).

Las calpaínas convencionales tienen un alto porcentaje de homología en su estructura primaria, comparten mecanismos de regulación y prácticamente todos los sustratos *in vitro*. Todo esto dificulta más entender por qué tienen diferencias de expresión en algunos tipos celulares, por qué *in vivo* en algunos casos sí que son capaces de compensar su función (Subramanian *et al.*, 2013) pero en otros no (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2016) o son incluso contrarias (Prangsaengtong *et al.*, 2012). Algunas hipótesis apuntaron a que podrían participar en funciones similares pero respondiendo a diferentes estímulos (Goll, Thompson and Li, 2003) o incluso otras sugirieron que ambas

isoformas podrían tener un diferente comportamiento en el reconocimiento y proteólisis de sustratos (duVerle *et al.*, 2010).

### 1.5.2 Reconocimiento de sustratos por las Calpaínas.

Como se ha comentado, las calpaínas no degradan sus sustratos de manera aleatoria, si no que promueven la adquisición de nuevas funciones mediante una proteólisis limitada (moduladora) de estos, que mantienen dominios intactos. La explicación es que el sitio activo de las calpaínas tiene unas particularidades estructurales que obligan a que el sustrato esté en una conformación completamente extendida para su proteólisis, lo cual explica su preferencia por regiones flexibles entre dominios.

De esta relación estructura-función se desprende que la actividad proteolítica de las calpaínas depende de factores determinantes en la secuencia/estructura de sus sustratos, aunque a día de hoy éstos no están todavía del todo claros. Esta situación realza la importancia de los programas informáticos a la hora de generar predicciones sobre sitios de corte de las calpaínas en nuevos sustratos (duVerle *et al.*, 2011), ya que identificarlos de manera experimental sería muy costoso, en términos tanto temporales como económicos.

Los primeros estudios experimentales parecieron establecer ciertas preferencias en los aminoácidos del sitio de corte en base a determinados sustratos (Sasaki *et al.*, 1984). No obstante, a medida que se extendieron esa clase de estudios vieron que había sustratos que no cumplían tal correlación. Es más, se fueron generando indicios de que la proteólisis de las calpaínas dependería de estructuras más complejas presentes en proteínas intactas y no en secuencias de aminoácidos (Sakai *et al.*, 1987; Stabach *et al.*, 1997). A pesar de que se obtuvieron algunos modelos correctos, como la importancia de la secuencia contigua al sitio de corte, ninguno fue capaz de generar una predicción totalmente precisa y completa (Tomba *et al.*, 2004; Cuerrier, Moldoveanu and Davies, 2005).

A día de hoy hay identificados de manera experimental 368 sitios de proteólisis por parte de las calpaínas en 130 sustratos diferentes (Z. Liu *et al.*, 2011).

En definitiva, parece no haber una regla completamente universal para el reconocimiento y corte de todos los sustratos de las calpaínas, sino que hay “posibilidades” o “preferencias” de las calpaínas sobre los sustratos. En este contexto, la especificidad de estas proteasas en su función parece estar marcada por ciertos patrones de la estructura primaria pero sobretodo definida por estructuras superiores (Shinkai-Ouchi *et al.*, 2016). No obstante, un mecanismo todavía no comprendido y que necesita ser explorado en profundidad es la influencia del contexto celular sobre la función de las calpaínas y el reconocimiento específico de sustratos. Es más, en este sentido la localización subcelular de las calpaínas parece tener un papel muy importante en la activación de calpaínas y proteólisis de sus sustratos, lo cual no se tiene en cuenta en los estudios *in vitro* o en los estudios de cinética enzimática.

### 1.5.3 Localización subcelular y especificidad de reconocimiento de sustratos de las calpaínas

Como se ha mencionado anteriormente, la regulación de la actividad de las calpaínas es un fenómeno muy complejo que atiende a diferentes estímulos y que participa en muchas funciones ejerciendo su actividad sobre una gran variedad de sustratos. Debido a ello, se ha propuesto que la localización subcelular de las calpaínas podría ser un mecanismo que module los efectos de su actividad, limitando o promoviendo su acceso a determinados sustratos (Storr, Carragher, *et al.*, 2011). En concreto, dada la capacidad de unión a fosfolípidos de membrana de la calpaína (Tomba *et al.*, 2001), los orgánulos celulares membranosos podrían ser posibles objetivos de su localización y actividad.

- A. Membrana plasmática. Apoyaría la hipótesis más aceptada para explicar la activación de la calpaínas: sería la de estar, mediante la unión a PIP2, en la cercanía de donde ocurren los mayores flujos de calcio celulares, los canales de calcio (Leloup *et al.*, 2010). Además, las calpaínas se localizan en la membrana para promover la migración celular a través de la proteólisis de proteínas de adhesión (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2016). Por otra parte, la concentración de la calpaína 2 en la parte posterior de las células participa en el movimiento de fibroblastos inducido por la activación de EGFR (Shao *et al.*, 2006).
- B. Mitocondria. Hay diversos registros de las calpaínas con localización en el espacio intermembrana de las mitocondrias. Allí, promueven la apoptosis mediante la proteólisis de mediadores de esta tales como el factor inductor de apoptosis, AIF (Garcia, Bondada and Geddes, 2005; Smith and Schnellmann, 2012; Orrenius, Gogvadze and Zhivotovsky, 2015).
- C. Lisosoma. El sistema calpaína también ha emergido como un participante importante en la vía de muerte celular mediada por lisosomas, a través de la desestabilización de proteínas como LAMP2a (*lysosomal-associated membrane protein 2A*) (Kosenko, Poghosyan and Kaminsky, 2011; Arnandis *et al.*, 2012).
- D. Retículo endoplasmático (RE). Los estímulos que causan el estrés del RE provocan la localización en este orgánulo de las calpaínas. En este sentido, se ha demostrado que tras el estrés del retículo las calpaínas del RE proteolizan y activan la caspasa 12 induciendo la muerte celular de manera independiente del citocromo c y de APAF (Nakagawa and Yuan, 2000; Rao, Ellerby and Bredesen, 2004).
- E. Membrana nuclear. Las calpaínas también tienen un papel en la muerte celular mediada por desestabilización de la membrana nuclear y proteólisis de proteínas del complejo del poro nuclear tales como las proteínas NUP (Arnandis *et al.*, 2014).

F. Nucleoplasma. Las calpaínas pueden modular la actividad de vías de señalización a través de la proteólisis de factores de transcripción como AP1 (c-Fos/c-Jun), c-Myc o ATF/CREB, (Watt and Molloy, 1993) o de la histona H3 (Arnandis *et al.*, 2014) entre otras.

G. Nucleolo. De manera novedosa, la calpaína 3 se ha observado en este orgánulo tanto en modelos animales (Tao *et al.*, 2013) como en líneas celulares (Moretti *et al.*, 2009). En este contexto celular, los estudios sugieren que esta calpaína podría tener un papel regulador importante en la progresión del ciclo celular y por tanto de la proliferación (Guan *et al.*, 2016).

Como se puede ver, ya no solo se trata de los niveles de expresión de las calpaínas o de la actividad proteolítica, sino que también la localización subcelular donde ejercen la actividad estas proteasas parece un aspecto crucial para su función.

### **1.6 Función de las calpaínas y reconocimiento de sustratos en el cáncer**

El sistema calpaína-calpastatina puede ejercer funciones opuestas en el desarrollo tumoral. Dependiendo del contexto celular, estímulos, estadio tumoral, etc., podemos encontrar la alteración de la expresión de las calpaínas, de la calpastatina, etc., con efectos diversos.

El desconocimiento de los factores que determinan el reconocimiento específico de los sustratos por parte de las calpaínas y su procesamiento dificulta la comprensión del papel de estas proteasas en los procesos de transformación tumoral. A pesar de ello, se han identificado hasta 130 sustratos de calpaínas, lo cual explica en cierta manera la gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos en los que participa (Leloup and Wells, 2011). Estos incluyen: control del ciclo celular en ausencia de factores de crecimiento (Choi *et al.*, 1997; Jánossy *et al.*, 2004), apoptosis (Squier *et al.*, 1994), migración e invasión celular (Fan *et al.*, 2009),

angiogénesis (Su *et al.*, 2004), supervivencia y crecimiento celular bajo falta de nutrientes (Conacci-Sorrell *et al.*, 2014), proliferación inducida por factores de crecimiento como EGF o PDGF (Ma *et al.*, 2011) o respuesta a antitumorales (Del Bello *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2012) y resistencia (Libertini *et al.*, 2007).

### 1.6.1 Calpaínas en el desarrollo y la transformación tumoral

Se ha visto un incremento en la actividad calpaína durante la transformación inducida por diversos oncogenes como *v-SRC*, *v-JUN*, *v-MYC*, *k-RAS* and *v-FOS* (Carragher, Fonseca and Frame, 2004). *c-MYC* y *v-SRC* son capaces de incrementar la actividad calpaína inhibiendo la expresión y promoviendo la degradación respectivamente de la calpastatina (Carragher *et al.*, 2002; Niapour, Yu and Berger, 2008), lo cual induce la transformación tumoral. Un aumento de actividad calpaína promueve la proteólisis de sustratos como FAK (*focal adhesion kinase*), lo cual se ve reflejado en la rotura de las adhesiones focales, menor adhesión celular y mayor migración.

En cáncer de próstata o de mama la  $\beta$ -catenina es proteolizada por las calpaínas. El producto resultante tiene una mayor estabilidad y, por tanto, aumenta su actividad nuclear promoviendo la transcripción de genes promotores de la transformación oncogénica (Rios-Doria *et al.*, 2004). Curiosamente, en CCR ocurre el caso contrario, la actividad calpaína es necesaria para la degradación de la  $\beta$ -catenina (Benetti *et al.*, 2005).

El control del ciclo celular es un mecanismo importante para controlar posibles primeros pasos de transformación celular. En células de melanoma y fibroblastos transformados por citomegalovirus las calpaínas proteolizan dos inhibidores de CDKs (*cyclin-dependent kinase*), por lo que permiten la activación de las ciclinas D y E (Chen, Knutson and Kurosky, 2001; Delmas *et al.*, 2003) y por tanto la progresión del ciclo celular.

### 1.6.2 Calpaínas en supervivencia celular/apoptosis

Además de la más que establecida función de las caspasas en la apoptosis, las calpaínas juegan un papel clave en desencadenar las cascadas de muerte celular, a veces incluso colaborando antes que las propias caspasas (Del Bello *et al.*, 2007). La interacción entre ambas familias de proteasas es compleja ya que las calpaínas activan las caspasas 3, 7 y 12 pero inactivan la 8 y la 9 (Chua, Guo and Li, 2000; Gafni *et al.*, 2009; Leloup and Wells, 2011; Moretti *et al.*, 2014).

Como se ha mencionado previamente, las calpaínas actúan además en la apoptosis de células tumorales mediada por ciertos agentes quimioterapéuticos. La acción de estos agentes aumenta la actividad calpaína que acaba en la proteólisis y activación de diversas caspasas o la inhibición de vías de supervivencia (Liu, Xing and Chen, 2009; Kulkarni *et al.*, 2010). Como excepción, la inhibición de la actividad calpaína potencia la eficacia del bortezomib en líneas celulares de diversos tipos de cáncer (Li *et al.*, 2010). En condiciones de hipoxia y falta de nutrientes las calpaínas pueden proteolizar c-MYC, cuyo producto está sobreexpresado en cáncer y promueve la supervivencia celular en líneas de CCR (Conacci-Sorrell *et al.*, 2014). Curiosamente, la degradación completa de c-MYC por parte de las calpaínas también puede ser un mecanismo de defensa de las células tumorales para escapar de la apoptosis inducida por MYC en fibroblastos de rata (Small *et al.*, 2002).

### 1.6.3 Calpaínas en metástasis: migración e invasión

Esta característica tumoral es en la que probablemente esté más claro el papel de las calpaínas, ya que muchos estudios han demostrado un papel necesario en la progresión metastásica. Es más, las investigaciones han establecido una compartimentalización en la que las calpaínas 1 y 2 participan, respectivamente, en el sucesivo proceso de formación de complejos de adhesión focal en el frente migratorio de las células y

desestructuración de los mismos en la parte posterior de la célula (Glading, Lauffenburger and Wells, 2002; Franco, 2005) sobre proteínas como talina, FAK, etc. Las calpaínas son capaces de proteolizar múltiples sustratos relacionados con la remodelación del citoesqueleto y la movilidad celular como fodrina, vinculina, ezrina,  $\alpha$ -actinina, cortactina, paxilina, etc (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2016). La proteólisis de todos ellos, salvo el último caso de la paxilina, promueve la migración (Storr, Carragher, *et al.*, 2011).

Por ejemplo, en el contexto de transición epitelio-mesénquima (TEM), la calpaína 2 proteoliza la E-cadherina, lo cual facilita la invasión tumoral. Además, la sobreactivación de las calpaínas en rhabdomyosarcoma otorga al tumor una alta tasa de invasión. Pero la metástasis no solo se compone de la movilidad celular, sino que también la capacidad de invasión. Así, se ha visto que las calpaínas pueden regular la expresión y secreción de metaloproteasas, como en el caso de MMP2 y MMP9 (Fan *et al.*, 2009).

### 1.6.4 Las calpaínas en la angiogénesis

Los tumores cuando alcanzan un tamaño macroscópico necesitan un suministro extra de oxígeno y nutrientes para poder mantener sus necesidades de crecimiento. Para lograrlo, la familia de los factores inducible por hipoxia (HIF) promueve la síntesis de nuevos vasos sanguíneos. En condiciones fisiológicas, el proceso pueden ser regulado por las calpaínas convencionales a través de la proteólisis de HIF (Zhou *et al.*, 2006; Nanduri *et al.*, 2009). No obstante, en una situación de hipoxia que provoca la pérdida de este sistema de regulación, un fragmento de filamina A proteolizado por las calpaínas interacciona con HIF, facilitando su localización nuclear y la expresión de genes pro-angiogénicos (X. Zheng *et al.*, 2014).

Las calpaínas participan en la angiogénesis, además, promoviendo la migración de las células endoteliales en respuesta a factores de

crecimiento (Su *et al.*, 2006). La calpaína 6 es capaz de promover la angiogénesis mediada por VEGF en células HUVEC (Rho *et al.*, 2008).

### **1.7 Valor pronóstico y beneficios terapéuticos de la inhibición de calpaínas**

Lo expuesto hasta este momento nos arroja varias incertidumbres a la hora de establecer un posible valor pronóstico y/o potencial terapéutico de la inhibición de las calpaínas. Los mecanismos de regulación/desregulación en condiciones patológicas, así como sus dianas no son comprendidos completamente. La mayoría de los datos clínicos plantean ciertas controversias en sus resultados y se centran en expresión diferencial de las calpaínas, lo cual no necesariamente se relaciona con su actividad proteolítica (Lakshmikuttyamma *et al.*, 2004). Además, aunque existen algunos mecanismos de inhibición (inespecífica) de las calpaínas, esto puede ser benéfico y perjudicial según la isoforma de la que se trate y si se está bajo tratamiento con fármacos antitumorales.

Además de lo ya mencionado, la problemática en la inhibición de las calpaínas radica en que comparten gran similitud estructural y de funcionamiento con otras familias de proteasas como la papaína. En este contexto, el posible potencial terapéutico de bloquear las calpaínas ha tenido siempre el mismo problema: el intento de inhibición sobre el sitio catalítico altamente conservado. Esto ha generado que los múltiples inhibidores que han surgido adolezcan de especificidad ya que no solo actúan sobre las calpaínas sino también sobre algunas catepsinas, la papaína y otras Cys-proteasas. Realmente, el inhibidor endógeno calpastatina es el único absolutamente específico de las calpaínas convencionales. Esta característica ha impulsado nuevas estrategias para mejorar el diseño de estos inhibidores. Así, gracias al desarrollo de la biología estructural, actualmente se están mejorando los análogos de la calpastatina, que presentan inhibición específica pero todavía no son

buenos los parámetros de estabilidad o de disponibilidad para la célula (Storr, Carragher, *et al.*, 2011). Otro área creciente en este sentido es el desarrollo de inhibidores alostéricos, los cuales sortearían la problemática de actuar sobre el sitio catalítico y por tanto de falta de especificidad (Wang *et al.*, 1996).

Como decimos, el desarrollo clínico de nuevos fármacos destinados a la familia de las calpaínas es un área en gran expansión. Las  $\alpha$ -cetoamidas A-705239 y A-705253 han mostrado prometedores resultados en ensayos preclínicos (Lubisch *et al.*, 2003; Trumbeckaite *et al.*, 2003). Además de intentar mejorar la problemática de la especificidad de los inhibidores, una estrategia innovadora, aún en desarrollo, es la de añadir una “etiqueta molecular” para dirigir los inhibidores a sitios específicos de interés como en el músculo o sistema nervioso (Ono, Saido and Sorimachi, 2016).

Por todo ello, resultaría muy importante dilucidar los mecanismos específicos de regulación espacial y de reconocimiento de sustrato de las calpaínas para lograr generar terapias antitumorales más efectivas. En este sentido, la inhibición total de la actividad calpaína podría ser perjudicial, por lo que sería necesario inhibir tan sólo aquella función concreta responsable de un proceso. Por ejemplo, bloqueando su unión con cadherina, se podría bloquear la migración, sin que quedaran afectadas otras funciones.

En este sentido, aunque mediante un mecanismo no del todo conocido, se ha demostrado que la calpaína 3 interviene en la degradación de p53 en el nucléolo de células de melanoma de una forma independientemente del proteasoma (Tao *et al.*, 2013). La presencia de calpaínas en el nucléolo podría ser de gran relevancia para el desarrollo o progresión nucleolar.

### 2. EL NUCLEOLO

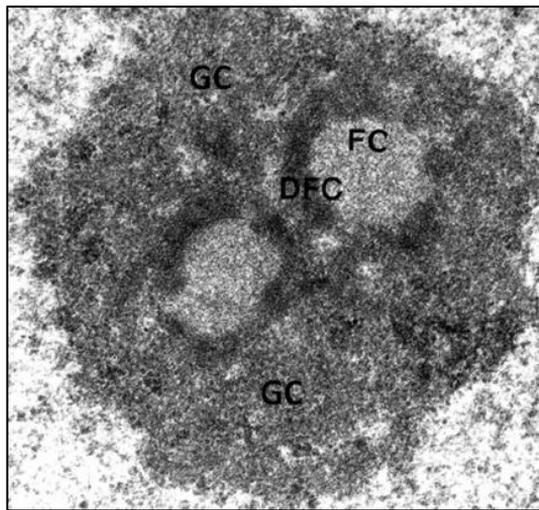
El nucleolo ha sido hasta hace poco tiempo considerado únicamente como la “fábrica de ribosomas”. Las técnicas de microscopía avanzada como el *photobleaching* en todas sus variantes (FRAP, FLIP) y la proteómica han revolucionado el estudio del nucleolo y la dinámica de las proteínas nucleares y nucleolares. En primer lugar, se ha establecido un proteoma nucleolar de más de 4.500 proteínas (Yasmeen Ahmad, Francois-Michel Boisvert, Peter Gregor and Angus, 2009). Esto ha permitido extender las funciones nucleolares más allá de la biogénesis ribosomal. Así, se trata de funciones tan variadas como: participación en exportación y degradación de mRNA, biogénesis de algunos snRNA y tRNA, secuestro de proteínas reguladoras, control de ciclo celular, sensor de estrés, daño al DNA y diana de la infección de determinados virus (Pederson, 1998; Boisvert et al., 2007; Emmott and Hiscox, 2009). Estos avances tecnológicos han permitido observar que el nucleolo es una estructura altamente dinámica (Andersen et al., 2005) con un constante transporte de proteínas, tanto residentes como no relacionadas con la biogénesis ribosomal, desde y hacia el resto de la célula (Olson and Dundr, 2005; Hernandez-Verdun, 2006).

#### 2.1 Organización nucleolar

El nucleolo es el orgánulo no membranoso donde ocurre la transcripción del rDNA, maduración del rRNA y producción de los ribosomas. La observación al microscopio electrónico del nucleolo permite distinguir 3 zonas en disposición concéntrica (Figura 6):

A. Centro fibrilar. Es la zona de localización más interna, en ella se encuentran componentes de la maquinaria transcripcional como la RNA polimerasa I o la proteína UBF.

- B. Componente fibrilar denso. Rodea la zona anterior y es dónde se encuentran las proteínas que participan en el procesado temprano del rRNA, como la metiltransferasa fibrilarina. Se cree que en la frontera de estas 2 zonas ocurre la transcripción del rDNA.
- C. Componente granular. Es la zona más externa y cuenta con multitud de gránulos de ribonucleoproteínas (Raška, Shaw and Cmarko, 2006). En ella, se produce la maduración tardía de las partículas ribosomales por proteínas como la nucleolina (Tajrishi, Tuteja and Tuteja, 2011).

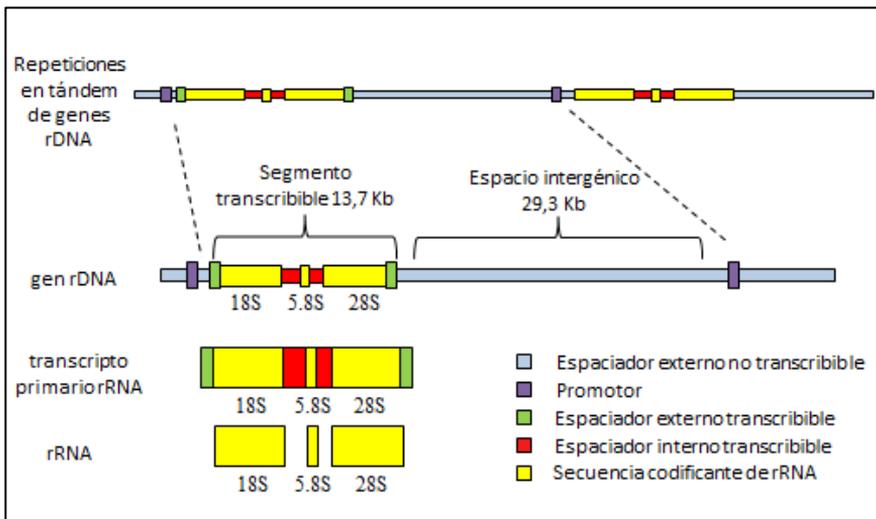


**Figura 6. Ultraestructura del nucleolo en el microscopio electrónico** (Sirri, Hernandez-Verdun and Roussel, 2002). Se distinguen los 3 compartimentos: FC= centros fibrilares, DFC= centros fibrilares densos, GC= componente granular.

La formación del nucleolo se produce por el agrupamiento de las regiones organizadoras de nucleolo (NORs) que, en el caso de los mamíferos, ocurre al final de la mitosis y se mantiene durante la interfase del ciclo celular. En humanos, las NORs se encuentran en los brazos cortos de los 5 cromosomas acrocéntricos (los números 13, 14, 15, 21 y 22), por lo que potencialmente podríamos tener hasta 10 nucleolos. No obstante, su número suele ser entre 1 y 3 tras sufrir la fusión de varias NORs o por más mecanismos desconocidos (Lam and Trinkle-Mulcahy,

2015). En las NORs se encuentran además los genes ribosomales que se distribuyen como repeticiones en tándem de aproximadamente 400 unidades ribosomales.

En la mayoría de las especies, incluidos mamíferos, cada una de estas unidades está conformada por las secuencias codificantes para el rRNA 18S, 5.8S y 28S, las secuencias transcribibles externa (*external transcribed spacers*, ETS) e interna (*internal transcribed spacers*, ITS) y por el espacio intergénico (IGS) que no se transcribe a rRNA (Figura 7). En humanos, el transcrito primario, el 47s pre-rRNA, sufre sucesivos procesamientos para generar las formas maduras de los rRNA, y su posterior ensamblaje con las proteínas ribosomales para la formación de los ribosomas.



**Figura 7. Esquema general de los genes ribosomales humanos y sus transcritos.** Cada una de las unidades repetitivas del rDNA, tras la transcripción por la RNA polimerasa I, sufre sucesivas y diversas modificaciones hasta generar los rRNA maduros definitivos que formarán parte de las subunidades ribosomales.

### 2.2 Regulación y principales vías de señalización implicadas en la biogénesis ribosomal

Dentro de la enorme variedad de procesos que ocurren en las células en fase de crecimiento y proliferación, la biogénesis ribosomal es con diferencia el más caro energéticamente para la célula. Tanto es así que la demanda de ribosomas puede alcanzar entre 1 y 2 millones de ribosomas por ciclo celular para mantener la capacidad de síntesis de proteínas (Grummt, 2010). Por ello, ante la importancia superlativa del proceso, debe existir un control que lo regule estrechamente por múltiples vías y que sea sensible a los cambios del entorno. En este sentido, está establecido que un ambiente celular con presencia de nutrientes y factores de crecimiento promueve notablemente la biogénesis ribosomal, mientras que condiciones que afectan al crecimiento y proliferación celular, como estrés, ausencia de mitógenos o daño al DNA, disminuyen o incluso paralizan el proceso (Mayer, Bierhoff and Grummt, 2005; Hoppe et al., 2009).

- A. Componentes de la maquinaria basal de transcripción. El inicio de la transcripción del rDNA requiere el ensamblaje de un complejo multiproteico formado por la RNA polimerasa I y un gran número de proteínas variadas asociadas (Kupriyanova and Ryskov, 2016). El complejo preiniciación (PIC) está formado por: el *selective factor* (SL1), el *transcription initiation factor IA* (TIF-IA) o RRN3 y el *upstream binding factor* (UBF). SL1 a su vez se compone de la *TATA-box binding protein* (TBP) y factores asociados a TBP (TAFs) (Comai, 2004; Raška, Shaw and Cmarko, 2006).
- B. Proteínas reguladoras de la transcripción. La naturaleza repetitiva del rDNA promueve que se vea sujeta a dos grandes tipos de regulaciones (solapantes) a corto y a largo plazo:

- b.1. Regulación a corto plazo. Se altera la tasa de transcripción de cada una de las unidades repetitivas (genes) mediante modificaciones reversibles de algunos de los componentes del PIC en los genes ya activos. Las modificaciones reversibles son en su amplia mayoría fosforilaciones llevadas a cabo principalmente por las vías RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR. Estas vías actúan como intermediarios entre el ambiente extracelular (disponibilidad de factores de crecimiento/nutrientes) y las necesidades de crecimiento y proliferación celular.
- b.2. Regulación a largo plazo. Se modifica el número de esas unidades transcribibles (activas) mediante cambios epigenéticos (Drygin, Rice and Grummt, 2010).

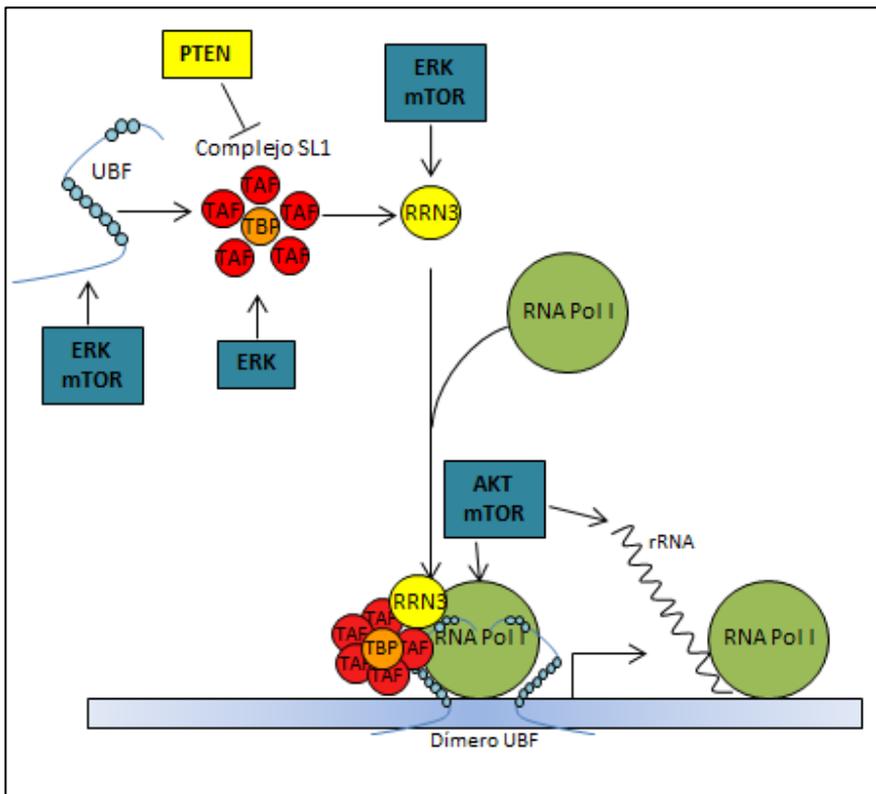
### 2.2.1 Vía RAS/RAF/MEK/ERK

Puede regular la transcripción de la RNA polimerasa I mediante fosforilaciones sobre varios de estos componentes antes mencionados. Por ejemplo, tras la activación por un mitógeno, ERK fosforila y activa UBF en las Thr 117 y 201 que promueven la transcripción (Stefanovsky et al., 2001). Además, a través de la misma estimulación proliferativa también se produce la fosforilación de TIF-IA (RRN3) en los residuos de Ser 633 y 649 por las quinasas ERK y RSK respectivamente, con el consiguiente aumento notable de la transcripción del rDNA (Zhao et al., 2003) (Figura 8).

### 2.2.2 Vía PI3K/AKT/mTOR

Esta vía tiene la capacidad de regular las necesidades de crecimiento y división celular según la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento de la célula en su entorno. Entre los diversos componentes de la vía, mTOR es a su vez el punto convergente de diversas vías que perciben el estado energético de la célula, los nutrientes del

microambiente celular, factores de crecimiento, aminoácidos, etc a partir de los cuales es capaz de tomar decisiones sobre si, entre otras, continuar o no con la biogénesis ribosomal. Por ejemplo la inhibición de mTOR por rapamicina disminuye la fosforilación de la Ser 44 y aumenta la de la Ser 199 de TIF-IA, lo cual en su conjunto puede inactivarlo y por tanto perjudica a la formación de PIC en el promotor del rDNA (Mayer et al., 2004) (Figura 8).



**Figura 8. Regulación de la transcripción ribosomal por vías de señalización.** Componentes de las vías de señalización RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR activan o inhiben la biogénesis ribosomal mediante diversas fosforilaciones en la maquinaria de transcripción.

Además, mTOR estimula la transcripción de la RNA polimerasa I, en parte por la fosforilación del extremo carboxilo terminal de UBF (Hannan et al., 2003), lo cual promueve su interacción con SL1. Otros miembros de

la vía también tienen funciones: PTEN reprime la transcripción por promover la disociación de SL1 (Zhang, Comai and Johnson, 2005) o AKT activa la RNA polimerasa I en varios niveles (Chan et al., 2011).

### **2.3 La biogénesis ribosomal en células tumorales**

Ya en 1896, el patólogo italiano Giuseppe Pianese advirtió que las células tumorales tenían nucleolos de gran volumen en comparación a las células normales. Esta observación resalta el hecho de que la estructura nucleolar es un reflejo del nivel de actividad de la biogénesis ribosomal, es decir, células con alta tasa de crecimiento y proliferación cuentan con uno o más nucleolos de gran tamaño (Raška, Shaw and Cmarko, 2006).

La principal particularidad en células tumorales es que la tasa de biogénesis ribosomal es independiente del entorno extracelular. Esto es, la activación constitutiva de las vías de regulación de la biogénesis ribosomal hace que las células tumorales se vuelvan “auto-suficientes”. La alta tasa de biogénesis ribosomal por la sobreactivación de sus vías reguladoras genera un desequilibrio que en situación de homeostasis está contrarrestado por genes supresores de tumores que disminuyen o inactivan esta función como pRB, p53, ARF, PTEN (Tsai and Pederson, 2014).

#### **2.3.1 La biogénesis ribosomal en células tumorales: oncogenes y genes supresores de tumores**

A. Oncogenes. El factor de transcripción c-MYC, sobreexpresado en varios tipos de cáncer, no pertenece estrictamente a ninguna de las vías de señalización principales que regulan la biogénesis ribosomal, pero se puede ver influido por ellas y tener claramente un papel como modulador de esta actividad. Su asociación con el complejo SL1 promueve su localización en el promotor del rDNA e incremento en la síntesis ribosomal. Además, c-MYC promueve la expresión de UBF,

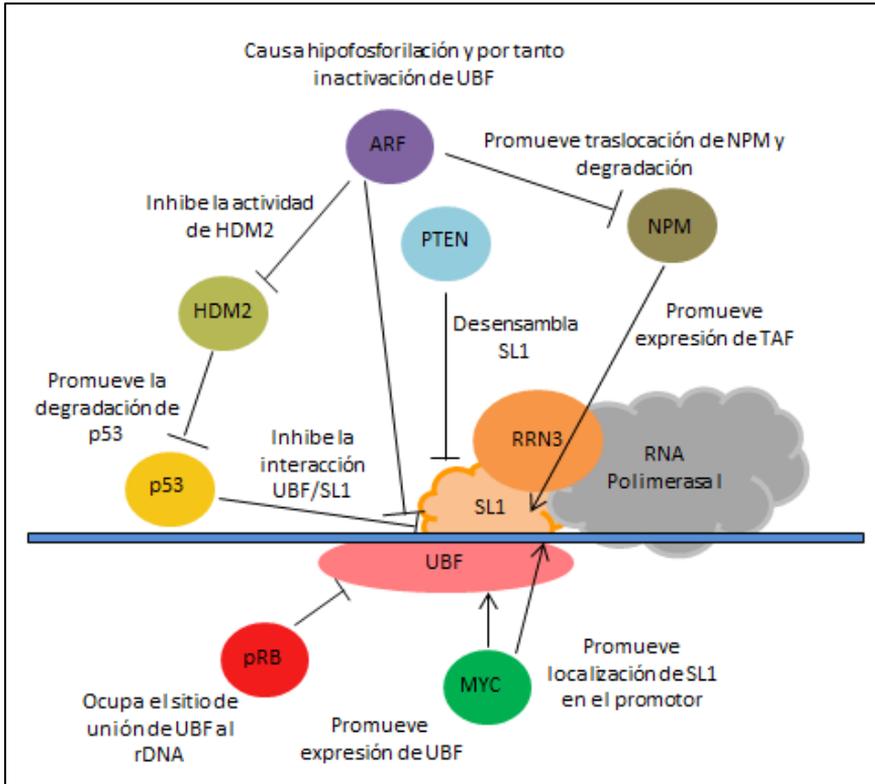
varias proteínas ribosomales y factores que participan en el procesado tardío del rRNA (Drygin, Rice and Grummt, 2010). La nucleofosmina (NPM) es una de las proteínas que participa en la maduración del rRNA y de las más abundantes del nucleolo. Se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer y se ha visto que incrementa los niveles de uno de los componentes del complejo SL, así como su capacidad de estimular la proliferación de células transformadas (Grummt, 2010) (Figura 9).

- B. Genes supresores de tumores. El llamado guardián del genoma, p53, es un actor principal como sensor del estrés nucleolar que puede incidir sobre el destino vital de la célula. No obstante, también ejerce un papel directo sobre la maquinaria de transcripción ribosomal ya que tiene una interacción directa sobre componentes del complejo SL1, de modo que interfiere con la formación de PIC. En gran cantidad de tipos de cáncer, p53 se encuentra inactivado por mutaciones (sustituciones o deleciones) por lo que la biogénesis ribosomal se ve promovida.

La acumulación del retinoblastoma (pRB) en el nucleolo de células diferenciadas o en parada de ciclo celular disminuye la síntesis de rRNA (Voit, Schäfer and Grummt, 1997) principalmente por su interacción con UBF.

PTEN bloquea la formación de PIC promoviendo el desensamblaje del complejo SL1.

El supresor de tumores ARF (*alternative reading frame*-p14 ARF en humanos), impide la fosforilación de UBF por lo que bloquea la formación de PIC, lo cual disminuye la biogénesis ribosomal (Ayrault et al., 2004) (Figura 9).



**Figura 9. Oncogenes y supresores de tumores controlando la transcripción de la RNA polimerasa I.** Los oncogenes activan la biogénesis ribosomal promoviendo expresión de factores de transcripción y su interacción con el rDNA mientras que los supresores de tumores interfieren con las interacciones necesarias para la iniciación de la transcripción. HDM2: *Human double minute 2*.

## 2.4 El nucleolo como regulador de la homeostásis: vías de respuesta al estrés

Como se ha mencionado previamente, el nucleolo es un orgánulo donde convergen muchas vías de señalización que transmiten importante información del entorno celular. Tanto es así que un nuevo papel ha surgido respecto al nucleolo en los últimos tiempos: la alteración de la homeostasis celular por varios tipos de estrés desencadenan la llamada “vía de vigilancia nucleolar”. Esta vía, según el grado y duración del estrés, en la mayoría de los casos puede provocar parada de la biogénesis

ribosomal o del ciclo celular, desintegración de la estructura nucleolar, activación de p53 y en casos más extremos, apoptosis (Rubbi and Milner, 2003; Donati, Montanaro and Derenzini, 2012; Golomb, Volarevic and Oren, 2014).

Además, existen tipos de estrés muy variados que no necesariamente se han generado en el nucléolo (Audas, Jacob and Lee, 2012a; Jacob *et al.*, 2013). De hecho, la desorganización nucleolar previa no es un requisito imprescindible para que se genere la respuesta nucleolar al estrés (Fumagalli *et al.*, 2009).

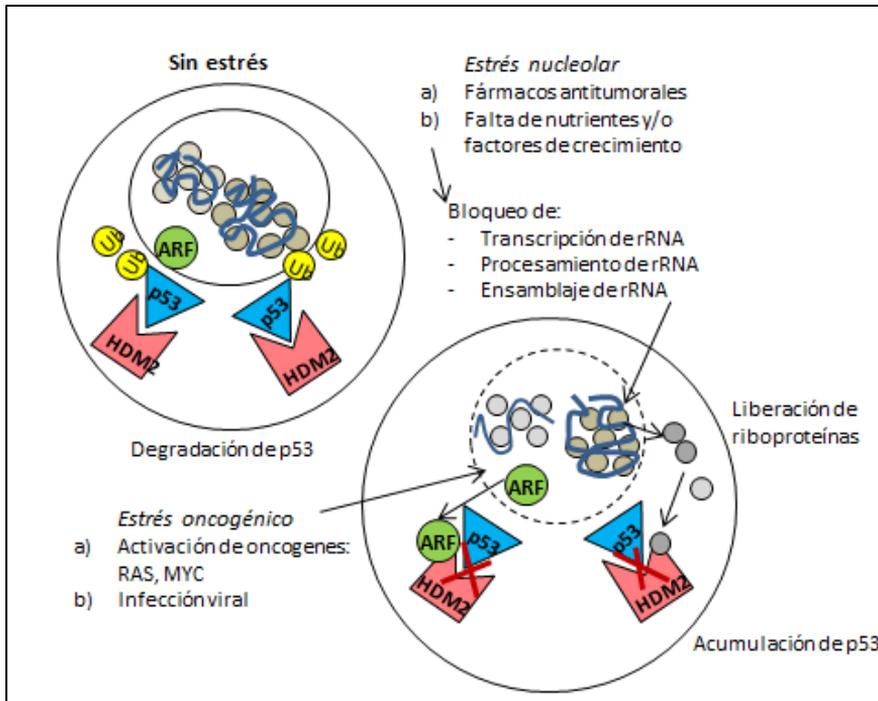
A partir de los diversos tipos de estrés a los que puede estar sometida la célula, se generan respuestas locales en el nucleolo y/o que comprometen a toda la célula. Entre estos últimos, y si el daño celular es demasiado prolongado, se puede desencadenar la muerte celular. En este caso, la mayoría de los eventos involucran al eje ARF/HDM2/p53 (Figura 10).

En condiciones normales, los niveles de p53 son bajos ya que se promueve su constante salida del núcleo y degradación. Esta acción la lleva a cabo HDM2, una E3 ligasa que promueve su poliubiquitinación para ser reconocido y degradado por el proteasoma (Lee and Gu, 2010). En esta situación, ARF se mantiene “secuestrado” en el nucleolo, lo cual es un mecanismo dependiente de una transcripción ribosomal activa.

Tras la exposición a estrés, la mayoría de los mecanismos de protección de la célula se basan en intentar interferir con esta interacción de HDM2 con p53 (Moll and Petrenko, 2003) y así permitir que éste ejecute sus funciones correctamente.

Además, la desorganización nucleolar en respuesta al estrés puede llevar a la liberación de muchas proteínas al nucleoplasma. Entre ellas se encuentra ARF, que es capaz de unirse e inhibir HDM2, con lo que

aumenta notablemente los niveles de p53 en la célula para activar la vía de apoptosis (Llanos et al., 2001). No obstante, esta interacción puede ocurrir en el nucleolo todavía ensamblado (Weber et al., 1999).



**Figura 10. Vía de estrés: el nucleolo como sensor.** En ausencia de estrés, ARF y las proteínas ribosomales (PR) se mantienen confinadas en el nucleolo, por lo que HDM2 promueve la ubiquitinación de p53 para su posterior degradación. En presencia de estrés se desencadenan mecanismos que interfieren con la actividad de HDM2. En la mayoría de los casos ocurre la desestructuración del nucleolo, lo que provoca la liberación de PR y ARF, entre otras, que se unen a HDM2 y por tanto previenen la degradación de p53. La acumulación de p53 lleva a la parada del ciclo celular y/o la apoptosis (Rubbi and Milner, 2003).

También en respuesta a estímulos de estrés, varias proteínas ribosomales se translocan al nucleoplasma y se unen a HDM2, promoviendo la acumulación de p53 e inducción de su programa de parada de ciclo o apoptosis (Russo and Russo, 2017).

### 2.4.1 El nucleolo como regulador de la homeostásis: tipos de estrés y respuestas

Los diferentes tipos de estrés que pueden actuar sobre las células, además de cambios más globales, suelen ir acompañados por cambios en la organización y composición del nucleolo (Boulon *et al.*, 2010). Así, existen básicamente dos tipos de reorganizaciones en el nucleolo:

- A. Desorganización. Se provoca una separación o “desconexión” entre los sitios de transcripción y procesado del rRNA (Louvet *et al.*, 2005). Esta situación ocurre tras la inhibición de la RNA polimerasa II o por inhibidores de algunas quinasas como CK2 y genera una estructura con forma de “collar” (Hernandez-Verdun, 2006).
- B. Segregación nucleolar. Puede ocurrir la agregación y posterior separación del FC y del GC, quedando el primero en la periferia formando los *caps* alrededor de una zona central compuesta por el segundo (Boulon *et al.*, 2010). Este último caso está bien documentado tras el daño al DNA (por ejemplo, por radiación UV) o la inhibición de la transcripción (clásicamente por dosis bajas de actinomicina D) (Assfalg *et al.* 2017).

Además, la alteración específica de la biogénesis ribosomal (por ejemplo, por la falta de expresión de alguna proteína ribosomal) promueve la desorganización del nucleolo y posterior liberación de proteínas ribosomales al nucleoplasma (Zhang and Lu, 2009).

Las infecciones víricas también provocan cambios en el proteoma y la morfología nucleolar, como un incremento en tamaño tras la infección por coronavirus (Hiscox, 2007).

El choque térmico por temperatura alta bloquea la síntesis ribosomal (Liu, Liang and Tartakoff, 1996) y genera la desorganización nucleolar. En cuanto al estrés por hipoxia, se bloquea la biogénesis ribosomal (Mekhail *et al.*, 2006) y el nucleolo sufre una reorganización (reversible)

en la que pierde su estructura tripartita. En su lugar, se genera una nueva subestructura donde son retenidas diversas proteínas citosólicas para regular su actividad. Se trata de un complejo molecular llamado centro de detención (Jacob et al., 2013), el cual es generado por la actividad del RNA derivado de la transcripción del IGS del rDNA (Audas, Jacob and Lee, 2012a).

La ausencia de nutrientes y factores de crecimiento provoca la disminución de la biogénesis ribosomal como mecanismo de ahorro de procesos metabólicamente costosos (Hoppe et al., 2009; Zhou et al., 2009; Tanaka et al., 2010).

### **2.5 El nucleolo como nueva diana de fármacos antitumorales**

Como vemos, existen importantes vías activadas por factores de crecimiento que convergen en la activación de la RNA polimerasa I. Por tanto, en caso de algún desequilibrio en los ajustados sistemas de control de la RNA polimerasa I como ocurre en diversos tipos de cáncer, puede dar lugar a una sobreactivación de la transcripción ribosomal.

Por otra parte, el “sistema de vigilancia nucleolar” controla el funcionamiento celular de manera que, en caso de estrés, se promueve la parada del ciclo celular y como medida más drástica, la apoptosis.

Por todo ello, el nucleolo ha emergido como una nueva e interesante diana terapéutica de los procesos tumorales (Tsai and Pederson, 2014; Lam and Trinkle-Mulcahy, 2015).

Existen desde hace mucho tiempo varios fármacos antitumorales que bloquean la biogénesis ribosomal. Estos son los agentes quimioterapéuticos clásicos como el cisplatino, la actinomicina D, el 5-fluoruracilo o incluso algunos más modernos como la rapamicina. El problema con estos fármacos es su falta de especificidad, utilizando

mecanismos comunes que actúan tanto sobre el DNA nuclear como sobre el nucleolar. Así, los intentos de explotar específicamente el nucleolo como diana terapéutica no fueron exitosos hasta hace muy poco tiempo con el descubrimiento de la 9-hidroxielipticina. Este es un derivado de un antiguo antitumoral inespecífico, que inhibe específicamente la actividad de la RNA polimerasa I (Andrews et al., 2013).

Dos nuevas moléculas de diseño han demostrado actividad específica inhibitoria sobre la biogénesis ribosomal: CX-3543 y CX-5461.

El CX-3543 (quarfloxin) inhibe la elongación de la transcripción del rDNA previniendo la interacción estabilizante entre la nucleonina y regiones ricas en guanina (G-quadruplex) del rDNA, lo cual lleva a la apoptosis (Drygin *et al.*, 2009).

El CX-5461 impide la unión de SL1 al promotor del rDNA y por tanto el inicio de la transcripción (Drygin et al., 2011). Este agente mostró una inhibición mucho más alta para la RNA polimerasa I que para la II y la III y para líneas tumorales que para células normales (Bywater et al., 2012).

El último de los compuestos específicos se denomina BMH-21 y se cree que se intercala en zonas ricas en GC como la actinomicina D. Además, BMH-21 inhibe la biogénesis ribosomal mediante la inducción de la degradación de RPA194, una de las subunidades de la RNA polimerasa I (Peltonen et al., 2014).

### 3. EL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer es una de las mayores causas de muerte en el mundo según la Organización Mundial de la Salud, solo tras las enfermedades cardiovasculares. Esta situación convierte el cáncer en una importante amenaza global con importantes costos tanto económicos como sociales. Teniendo en cuenta ambos géneros, el cáncer de pulmón es el de mayor incidencia en el mundo (en el año 2012), seguido del cáncer de mama y el cáncer colorrectal (CCR). Este último cuenta con una incidencia de 1.400.000 nuevos casos y es el cuarto en cuanto a mortalidad (700.000 fallecimientos).

Si observamos la estadística española (ambos géneros conjuntamente) las cifras son peores, ya que representa el tipo de cáncer con mayor incidencia y segundo en mortalidad (Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, 2013).

#### 3.1 Principales vías de señalización implicadas en la progresión del cáncer colorrectal

En el CCR se han identificado múltiples mutaciones en componentes de vías de señalización tan importantes como las de las MAPK, RAS/RAF/MEK/ERK o la vía de PI3K/AKT/mTOR (Forbes *et al.*, 2017). Entre los genes con mayor frecuencia de mutación se encuentran *PIK3CA* (18 %) y *KRAS* (30 %) que codifican para la quinasa PI3K y la GTPasa KRAS respectivamente.

Las mutaciones en la PI3K se localizan principalmente en el exón 9 (E545K, 28%) y en el exón 20 (H1047R, 21%) (Bardelli, 2015), las cuales generan un incremento en la actividad catalítica que a su vez aumenta la señalización intracelular y la transformación oncogénica (Kang, Bader and Vogt, 2005). La sobreactivación de la PI3K puede provenir tanto de mutaciones activadoras de la propia quinasa o de mutaciones

inactivadoras y deleciones del supresor de tumores PTEN (también habituales).

Las proteínas RAS oscilan en un continuo ciclo entre la forma de unión a GDP y la unida a GTP, que corresponden a los estados inactivo y activo respectivamente. Existen múltiples miembros de la familia RAS, pero únicamente mutaciones en HRAS, NRAS y KRAS se han relacionado con la aparición de cáncer. A su vez, HRAS es más frecuente en cáncer de vejiga, NRAS en leucemias mieloides y KRAS destaca muy notablemente en cáncer de páncreas y cáncer colorrectal. El 90 % de las mutaciones de KRAS en CCR son en el exón 1 (codón 12 y 13: G12D, G12V y G13D) y menos del 5% en el exón 2 (codón 61). Los estudios moleculares llevaron a identificar que las mutaciones en G12, G13 y Q61 (en las regiones *switch 1* y *2*) bloquean su capacidad de hidrólisis de GTP tanto intrínseca como mediada por GAPs, por lo que KRAS permanece constantemente en su forma activada (unida a GTP) (Rajalingam et al., 2007; Prior, Lewis and Mattos, 2012; Zenonos and Kyprianou, 2013).

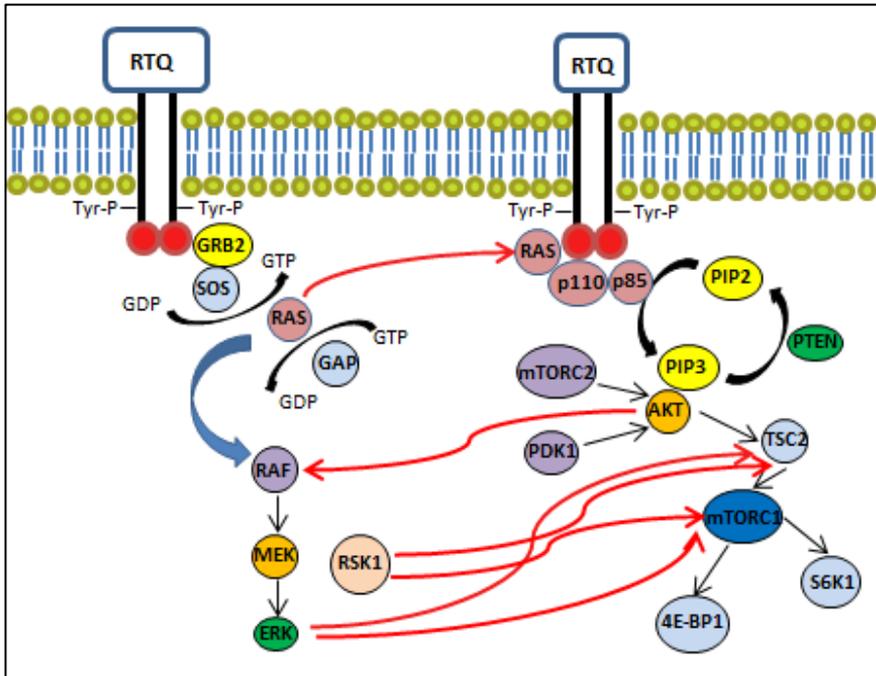
### **3.2 Regulación de la actividad de las vías de señalización de KRAS y PI3K**

La regulación de las principales vías de transformación tumoral en CCR es de gran relevancia dado las múltiples funciones celulares en las que participan como crecimiento celular, proliferación, apoptosis, etc.

Un grado de complejidad en la señalización de estas vías son los múltiples mecanismos de control de su actividad. Principalmente la vía de las MAPKs se analiza tradicionalmente como una cascada de señalización lineal y unidireccional pero realmente tiene una compleja red de interacciones con otras proteínas (fosfatasas, quinasas, adaptadoras) y otras vías (PI3K/AKT/mTOR).

## INTRODUCCIÓN

Una característica de las vías RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR es que cuentan con una regulación mutua, es decir, la señalización en uno de los módulos se entrecruza con la actividad de la otra vía (Figura 11).



**Figura 11. Entrecruzamiento de las principales vías de señalización en CCR.** Las vías de RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR cuentan con varios eventos de regulación mutua que agregan complejidad a la señalización de las vías. Las flechas negras hacen referencia a la señalización dentro de cada vía y las rojas a la que ocurre entre ellas.

La interacción más directa que tienen ambas vías es entre RAS y la subunidad catalítica p110 de la PI3K, por el cual ésta también puede ser reclutada a la membrana y activada (Zenonos and Kyprianou, 2013). Lo más común no obstante, son eventos de fosforilación como el que ejerce AKT sobre la Ser 259 de RAF-1 inhibiendo su actividad (Castellano and Downward, 2011). Además, ERK 1/2 y RSK1 (uno de sus múltiples substratos) promueven la fosforilación (Ser 664 y 1798 respectivamente) y bloqueo de la actividad inhibitora de TSC2 sobre mTORC1 por

disociación del complejo TSC1/TSC2. Ambas quinasas también son capaces de fosforilar y activar RAPTOR, una proteína esencial del complejo mTORC1 (De Luca *et al.*, 2012).

El entrecruzamiento de las vías tiene consecuencias muy importantes desde el punto de vista del desarrollo de la progresión tumoral y desde el punto de vista clínico, en la elección y éxito de los posibles tratamientos antitumorales. Gran cantidad de estudios en los últimos tiempos han demostrado que cuando hay activación de ambas vías, la inhibición de solo una de ellas desencadena mecanismos de compensación que hacen que la otra vía se vea estimulada (Temraz, Mukherji and Shamseddine, 2015). Por ello, multitud de ensayos pre-clínicos y clínicos de primera fase han comprobado que la inhibición simultánea de ambas vías es la forma más eficaz de lograr el efecto antitumoral deseado (Carracedo *et al.*, 2008; Sos *et al.*, 2009; Renshaw *et al.*, 2013; Dogan Turacli, Ozkan and Ekmekci, 2015). Inclusive, se ha visto esta respuesta más efectiva en ciertos modelos tumorales en los que coexistían 2 de las mutaciones más comunes en PI3K y KRAS (Engelman *et al.*, 2008; Wee *et al.*, 2009).

### **3.3 Mutaciones y resistencias a fármacos antitumorales**

La relevancia de la vía del EGFR en el desarrollo de distintos tipos de cáncer entre los que se encuentra el CCR, identificaron al EGFR como una importante diana terapéutica. Los ligandos de EGFR aparecen sobre-expresados en un elevado porcentaje de pacientes con CCR (Guo *et al.*, 2011). Las terapias antitumorales con anticuerpos monoclonales tales como cetuximab y panitumumab, han resultado ciertamente eficaces en el tratamiento del CCR. Estos anticuerpos bloquean la unión de los ligandos al dominio extracelular del EGFR y por tanto impiden que se desencadene la señalización pro-tumoral.

A pesar del progreso alcanzado en los últimos años en el tratamiento del CRC, con un aumento en la tasa de supervivencia media de 24-28 meses, la supervivencia a los 5 años sigue siendo bastante baja, aproximadamente un 10 %.

Múltiples ensayos clínicos observaron que solo los pacientes con KRAS tipo salvaje se beneficiaban del tratamiento con los anticuerpos anti-EGFR (Michel *et al.*, 2010). Aquellos pacientes con mutaciones en KRAS en los codones 12, 13 y 61 poseían una forma constitutivamente activa y resistente a estos antitumorales. Como consecuencia, en las guías clínicas se ha estipulado que antes de la decisión de adoptar cetuximab o panitumumab como terapia en los pacientes con CCR se debe testar el estado mutacional de KRAS.

A raíz de este hallazgo se generaron gran cantidad de estudios que intentaban determinar si otros componentes de la vía de señalización de EGFR podrían también estar relacionados con resistencias a tratamientos, pronóstico, etc. Se propusieron múltiples mecanismos como mutaciones secundarias, activación de vías de señalización alternativas, amplificación de alteraciones *downstream* de la misma vía (Tan and Yu, 2013).

Las investigaciones sobre BRAF en pacientes metastásicos con cetuximab como tratamiento no alcanzaron a ser concluyentes sobre si podría tener un papel predictor negativo (Di Nicolantonio *et al.*, 2008; Laurent-Puig *et al.*, 2009; Siena *et al.*, 2009).

Se ha intentado también vincular la sobreactivación de la PI3K con la respuesta a cetuximab o panitumumab en pacientes con CCR. Sin embargo, los resultados no han sido capaces de validar esta asociación de manera consistente (Michel *et al.*, 2010; Heinemann *et al.*, 2013).

Como vemos, solo las mutaciones en KRAS han adquirido la robustez suficiente como para confirmar su valor de predicción negativa en el

tratamiento con los fármacos anti-EGFR. Es más, estudios retrospectivos sugirieron también posibles diferencias entre las mutaciones del codón 12 y 13 en cuanto a su carácter predictivo en la respuesta al tratamiento. En algunos ensayos clínicos se observó que los pacientes con la mutación KRAS G13D tratados con cetuximab tenían mejor respuesta al tratamiento comparado con otras mutaciones de KRAS, mejorando tanto la tasa de supervivencia libre de progresión como la supervivencia global (De Roock *et al.*, 2010; Zenonos and Kyprianou, 2013).

Los resultados de estos ensayos son muy importantes porque los pacientes con esta mutación no tienen indicado en la actualidad el tratamiento con los fármacos anti-EGFR. Sin duda, estos datos obligan a revisar una mayor cantidad de estudios clínicos para poder concluir si los pacientes con esta mutación podrían beneficiarse o no de los tratamientos existentes.

Como consecuencia del importante papel de KRAS y su relevancia en la supervivencia de los pacientes con CCR, no es de extrañar que se hayan volcado enormes esfuerzos para intentar inhibir directa o indirectamente a RAS (Cox *et al.*, 2014).

Por todo ello, en el CCR es muy importante buscar mecanismos alternativos en los que converjan las principales vías de señalización para poder obtener algún beneficio terapéutico. En la búsqueda de efectores comunes en el CCR como nuestro modelo de estudio, nosotros nos hemos centrado en las calpaínas y la regulación de su localización y actividad como posibles mecanismos relacionados con la progresión tumoral.



# **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

---

Se ha descrito la participación de las calpaínas en varios tipos de cáncer incluyendo el cáncer colorrectal, aunque su papel no está del todo claro. El objetivo global de este proyecto de tesis es determinar el papel de la calpaína 2 en el cáncer colorrectal y su dependencia de su distribución subcellular y del estado mutacional de KRAS.

Para ello, se utilizarán como modelo tres líneas isogénicas de cáncer colorrectal humanas con PI3K mutada y diferente estado mutacional de KRAS: DLD1 con un alelo KRAS salvaje y otro mutado (WT/ G13D), DMUT con un alelo KRAS mutado y el otro delecionado (G13D/-), y la línea DWT7, con un alelo KRAS salvaje y el otro delecionado (WT/-).

Con este fin, se plantearon varios objetivos específicos:

1. Localización subcelular de las calpaínas convencionales en células de cáncer colorrectal: posible distribución diferencial específica de isoforma atendiendo al tipo celular.
2. Estudio de la regulación de la distribución de calpaínas dependiente del estado mutacional de KRAS: expresión, mecanismos de translocación y/o activación.
3. Relación entre la distribución y la función de calpaínas en células de cáncer colorectal: estudio de los mecanismos moleculares determinantes de su función.

## OBJETIVOS

---

# **MATERIAL Y** **MÉTODOS**



## 1. REACTIVOS Y ANTICUERPOS UTILIZADOS

Los inhibidores de la PI3K (LY294002) y la RNA polimerasa I (CX5461) se adquirieron de Calbiochem. Los inhibidores de MEK (UO126) y de las calpaínas (calpeptin) se compraron a Promega y Sigma respectivamente. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es de R&D Systems. Los anticuerpos utilizados se describen en la Tabla 3, así como sus concentraciones optimizadas en las diferentes técnicas utilizadas.

**Tabla 3. Listado de anticuerpos utilizados.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Dilución</b>	<b>Referencia</b>
Calpaína 1	WB	1/1000	ab39170, Abcam
Calpaína 1	IF	1/200	ab39170, Abcam
Calpaína 2	WB	1/1000	2539, Cell Signaling
Calpaína 2	IF	1/25	2539, Cell Signaling
Calpaína 2	IP	3 µg	2539, Cell Signaling
Fibrilarina	WB	1/2000	NB300-269, Novus Biologicals
Fibrilarina	IF	1/50	NB300-269, Novus Biologicals
α-Tubulina	WB	1/5000	ab52866, Abcam
Nucleolina	IF	1/1000	ab22758, Abcam
Histona H3	IF	1/1000	Active Motif, 39763
Calpastatina	WB	1/1000	MA3-944, Thermo Fisher
Calpastatina	IF	1/25	MA3-944, Thermo Fisher
Calpaína S1	WB	1/2000	ab28237, Abcam
Calpaína S1	IF	1/200	ab28237, Abcam

WB = *western blot*, IF = inmunofluorescencia, IP = inmunoprecipitación

### 2. TAMPONES UTILIZADOS

#### A. RIPA:

1.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, SDS 0.1 % (p/v), Tritón-X100 1 % (v/v), 0.1 M NaCl, Deoxicolato sódico 0.5 %.

#### B. Tampón de carga 5x:

50 % glicerol v/v, 10 % SDS, 25 % β-mercaptoetanol y 0.05 % de azul bromofenol en tampón Tris-HCl 0.3 M pH 6,8.

#### C. Tampón de electroforésis:

25 mM pH 8.3 Tris-HCl; 192 mM glicina, 0.1 % SDS (p/v).

#### D. Tampón de transferencia:

25 mM pH 8.3 Tris- HCl, 192 mM glicina y 20 % metanol (v/v).

#### E. Tampón de dilución ChIP:

165 mM NaCl, 0.01 % SDS, 1.1 % Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.0.

#### F. Tampón de baja salinidad ChIP:

150 mM NaCl, 0.5 % Deoxicolato Sódico, 0.1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl.

#### G. Tampón de alta salinidad ChIP:

500 mM NaCl, 0.5% Deoxicolato Sódico, 0.1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl.

#### H. Tampón LiCl:

250 mM LiCl, 0.5 % Deoxicolato Sódico, 0.1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl.

#### I. Tampón TE:

0.25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl.

#### J. Tampón de elución:

1 % SDS, 100 mM NaHCO<sub>3</sub>.

### 3. LÍNEAS CELULARES Y MANTENIMIENTO EN CULTIVOS

Las líneas celulares que constituyen nuestro modelo de estudio corresponden a tres líneas de cáncer de colon humano. Fueron adquiridas del *GRCF Biorepository and Cell Center* de la Universidad Johns Hopkins y son: DLD1 (PI3K E545K/WT, KRAS G13D/WT) y sus líneas isogénicas derivadas DMUT (PI3K E545K/WT, KRAS G13D/-) y DWT7 (PI3K E545K/WT, KRAS -/WT). El estado mutacional de las líneas fue confirmado mediante *Seqplexing (Sequencing Multiplex, Genetest)* con los kits *OncoGenBasic S1 & S1.v2* y *S2 & S2.v2* para detección de mutaciones somáticas.

La línea de cáncer de mama MCF7 (ATCC® HTB-22™) y CCD 841 CoN (ATCC® CRL-1790™) fueron adquiridas de la ATCC (*American Type Culture Collection*).

Las líneas fueron cultivadas en condiciones estándar a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> utilizando medio de cultivo de McCoy5A (Gibco), suplementado con 2 nM glutamina (Sigma-Aldrich), 1 % de los antibióticos penicilina/estreptomicina (Life Technologies) y 10 % suero bovino fetal (FBS) (Gibco).

Para los experimentos, las células fueron cultivadas 24 h en medio completo con 10 % FBS y posteriormente el medio de cultivo se cambió a medio sin FBS durante 24 h más, tras lo cual, se realizaron los respectivos experimentos en células al 80 % de confluencia. En el caso de los tratamientos se mantuvieron las células durante 24 h más en cultivo con medio sin FBS (salvo se indique otra cosa).

#### 4. EXTRACCIÓN DE RNA Y CUANTIFICACIÓN

Se extrajo el RNA total de las líneas celulares mediante el kit RNAeasy Mini Kit (Qiagen), seguido de un tratamiento de 10 min con DNasa I (RNase-Free DNase set, Qiagen). Se realizó la purificación de este RNA mediante RNAeasy Mini Kit (Qiagen) y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando el NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies). Para valorar la calidad del RNA se analizaron la pureza y la integridad de éste mediante el cociente  $A_{260}/A_{280}$  y electroforesis en gel de agarosa.

#### 5. KNOCK-DOWN DE CALPAÍNA 2

La transfección se llevó a cabo mediante Lipofectamina RNAiMAX de Life Technologies. El medio utilizado para la dilución de los siRNA y de la lipofectamina fue el Opti-MEM (Gibco) y el procedimiento se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron por separado el Opti-MEM+Lipofectamina y Opti-MEM+siRNA durante 5 min, tras lo cual la segunda mezcla se añadió sobre la primera. Tras una incubación de la mezcla de 30 min a temperatura ambiente, se realizó un vórtex de 30 s y se utilizaron 500  $\mu$ l en 2 ml de medio McCoy5A sin antibiótico en placas de 6 pocillos. Se añadieron las células de las líneas DMUT y DWT7 sobre el medio mediante una transfección transitoria reversa de  $9 \times 10^4$  células con 30 nM de esiRNA *CAPN2* (EHU025391-50UG) o Control Negativo Universal #1 siRNA (SIC001), ambos de Sigma. El tiempo de transfección fue de 24 h, tras lo cual se cambió el medio por otro sin FBS en el que las células permanecieron 24 y 48 h más, hasta ser recogidas para posteriores análisis.

## 6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE mRNA Y DE rRNA POR RT-qPCR

Los niveles de mRNA se analizaron mediante RT-qPCR. Brevemente, 1 µg (calpaína2 mRNA) o 50 ng (47s pre-RNA) de RNA total se retrotranscribió utilizando el *high-capacity RNA-to-cDNA kit* (Applied Biosystems), mediante 1 ciclo 37°C (60 min) y 95°C (5 min) en un termociclador Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems). Posteriormente, el cDNA se amplificó mediante qPCR, utilizando *Taqman Gene Expression Master Mix* (calpaína 2) o *Sybr Green PCR Master Mix* (47S pre-rRNA), ambos de Applied Biosystems. El cDNA se amplificó mediante 1 ciclo de 50°C (2 min) y 95°C (10 min) y 40 ciclos de 95°C (15 s) y 62°C (1 min) en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Los niveles de calpaína 2 y de 47s pre-rRNA fueron normalizados de acuerdo a la cuantificación del 18s y la actina respectivamente. Para el análisis de la calpaína 2 (Taqman Hs00965097\_m1) y el 18s ribosomal (Taqman 4319413E) se adquirieron sondas prediseñadas Taqman. Para el 47s pre-rRNA y actina se diseñaron las siguientes parejas de primers (Applied Biosystems) (Tabla 4):

**Tabla 4. Listado de primers utilizados para la expresión relativa de genes mediante RT-qPCR.**

	Forward	Reverse
47s pre-rRNA	GAACGGTGGTGTGTCGTTC	GCGTCTCGTCTCGTCTCACT
Actina	GTGCTATCCCTGTACGCCTC	GAGGGCATACCCCTCGTAGA

La expresión relativa (ER) de los genes de interés se realizó mediante la fórmula  $ER = 2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ , donde  $\Delta C_t = C_t$  (gen de interés) -  $C_t$  (gen *housekeeping*) and  $\Delta(\Delta C_t) = \Delta C_t$  (muestra de interés) -  $\Delta C_t$  (control).

### 7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y WESTERN BLOT

Las células se lisaron con tampón RIPA suplementado con 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 2  $\mu\text{l}/\text{mL}$  de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) y 5  $\mu\text{l}/\text{mL}$  de inhibidores de fosfatasa (Calbiochem). No se utilizaron inhibidores de proteasas en aquellos experimentos en los que se determinó la actividad calpaína. Posteriormente, las muestras se sometieron a una centrifugación a 4°C a máxima velocidad (17000 g) durante 30 min y los sobrenadantes se recogieron para su posterior cuantificación y análisis. La cuantificación de las muestras se realizó mediante el método del ácido bicíclico (BCA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific) utilizando la seroalbúmina bovina como estándar.

Se utilizaron 20  $\mu\text{g}$  de extracto proteico por muestra en tampón de carga 5X que se separaron en geles de poliacrilamida al 8 % y 1 mm de espesor (Bio Rad). A la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) se le aplicó una diferencia de potencial de 120 V.

Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Protran®, Whatman), en tampón de transferencia (Bio Rad) durante 90 min, aplicando una diferencia de potencial de 60 V. Posteriormente, dicha membrana se bloqueó con BSA o leche al 5 % diluido en TBS 1X con 0.05 % Tween 20 durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

La membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en tampón de bloqueo al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en agitación. Tras este proceso, las membranas se lavaron en la misma solución del paso previo cuatro veces durante 5 min. Posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. Según la procedencia

del anticuerpo primario, los secundarios fueron anti-ratón o anti-conejo, ambos conjugados con peroxidasa y adquiridos a Dako. Se lavaron las membranas cuatro veces con TBS 1X con 0.05 % Tween 20 y los inmunocomplejos se revelaron usando un reactivo quimioluminiscente (ECL Detection Kit. GE Healthcare). La señal luminosa es impresionada sobre una película fotográfica (Amersham Hyperfilm MP), la cual se revela con la máquina Curix60 (AGFA).

La cuantificación de la intensidad de las bandas se midió mediante densitometría usando el programa de análisis de imagen Image J.

### **8. MTT**

La tasa de viabilidad celular se determinó mediante ensayo por reducción de MTT (bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2-5-difeniltetrazólico). Las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con MTT (1mg/ml en McCoy), durante 1 h a 37°C. El MTT incorporado a las células se eluyó con N-propanol y se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm.

### **9. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR: EXTRACCIÓN DE NUCLEOLOS**

Se plaquearon  $3 \times 10^6$  células en botellas de cultivo T225 cm<sup>2</sup> como se indicó previamente. El aislamiento de los nucléolos se realizó de acuerdo a un protocolo ya descrito en la literatura (Liang *et al.*, 2012). Brevemente, las células se lavaron tres veces y se recogieron en 1.5 ml de solución I fría (0.5 M sacarosa, 3 mM MgCl<sub>2</sub> con inhibidores de proteasas y fosfatasa). Posteriormente se procedió a la lisis celular mediante sonicación en hielo a 40% de amplitud, 10 s activo y 10 s en reposo, diez veces (Sonics, VCX130). La rotura de más del 90 % de las células se confirmó al microscopio.

El lisado celular se vertió cuidadosamente sobre 1.5 ml de solución II (1.0 M sacarosa, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), y se centrifugó a 4°C, 1800 g durante 10 min. El pellet con las proteínas nucleolares se solubilizó en tampón RIPA. El sobrenadante resultante es la fracción no nucleolar, que contiene el extracto proteico de toda la célula salvo del nucleolo.

### **10. INMUNOFLUORESCENCIA**

Las células se plaquearon sobre cubre objetos de borosilicato de 13 mm Ø (VWR 631-0149). Tras realizar lavados con PBS 1X, las células se fijaron durante 10 min con una solución de formaldehído (4 %) en PBS y posteriormente se permeabilizaron durante 10 min con 0.3 % Tritón X-100 en PBS 1X. Las células previamente bloqueadas durante 1 h con 5 % suero de cabra (Dako) en 0.3 % Tritón X-100 se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa Fluor 488 anti-conejo de Invitrogen o Cy3 anti-ratón de Sigma) diluido 1:300 en una solución de 0.3% Tritón X-100. Para los análisis de colocalización, se repitió todo el proceso con anticuerpos primarios de una especie distinta a la utilizada en la primera inmunodetección. El marcaje de núcleos se realizó mediante tinción con Hoechst 33342 (Invitrogen). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Leica TCS-SP 2

### **11. PROXIMITY LIGATION ASSAY, PLA (DUOLINK)**

La tecnología de DuoLink (Sigma) se basa en el ensayo de ligación por proximidad y es capaz de detectar con una elevada sensibilidad y especificidad la proximidad *in vivo* de dos proteínas (distancia menor a 40 nm) o epítomos de una misma proteína.

Las células se fijaron, permeabilizaron y bloquearon como se ha descrito en el apartado anterior. Tras una incubación con los dos

anticuerpos primarios (a 4°C, toda la noche), las células se incubaron con sondas de detección (anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados con oligonucleótidos) a 37°C por 1 h. Los oligonucleótidos se ligaron (37°C, 30 min) y se amplificaron mediante oligonucleótidos marcados con fluorescencia.

Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje *in situ* con DAPI (para la tinción nuclear) y analizadas en un microscopio confocal Leica TCS-SP 2 de la UCIM de la Universidad de Valencia.

### **12. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CALPAÍNA**

Para medir la actividad calpaína se utilizó el Calpain activity assay kit (Calbiochem) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se solubilizaron 50 µg de extractos proteicos totales y nucleolares en tampón de lisis (CytoBuster™ Protein Extraction Reagent). Las muestras se incubaron durante 15 min en una placa de 96 pocillos con el sustrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC y con tampón de inhibición que contiene BAPTA o tampón de activación que contiene Ca<sup>2+</sup> y un agente reductor.

La fluorescencia se midió en un lector de placa fluorescente con una longitud de onda de excitación de ~360-380 nm y una longitud de emisión de ~440-460 nm.

La actividad calpaína se determinó como la diferencia entre la actividad obtenida, usando el tampón de activación, y la detectada con el tampón de inhibición.

### **13. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP ASSAY)**

Las células en cultivo se trataron con formaldehído (1 % concentración final en medio de cultivo) durante 10 min, para entrecruzar el DNA con las proteínas que estuviesen unidas a él. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo glicina a una concentración final de 0.125 M.

Inmediatamente, las células se lavaron con PBS 1X y la cromatina se extrajo siguiendo el protocolo descrito previamente (Torres *et al.*, 2009).

Posteriormente, las muestras se sometieron a una sonicación (Vibra-Cell VCX500) de 14 pulsos de 10 s al 38 % de amplitud y 50 s de descanso, obteniéndose fragmentos de cromatina en torno a un tamaño medio de aproximadamente 500 pares de bases. La concentración de la cromatina en muestras diluidas 1:200 (v/v) en SDS 1 % se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. El tamaño de los fragmentos obtenidos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, una alícuota de la cromatina sonicada y cuantificada, se incubó 30 min a temperatura ambiente con 1 µg de RNAsa seguido de una incubación con 2 µl de proteinasa k durante toda la noche. Al día siguiente se purificó mediante el kit comercial PCR purification kit QIAquick® DNA (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez comprobada la efectividad del sonificado y el tamaño correcto de los fragmentos, las alícuotas de 2 U de cromatina en tampón de dilución se incubaron con 3 µg de anticuerpo de la calpaína 2 a 4°C en rotación durante toda la noche. Otra alícuota de este sobrenadante, se trató del mismo modo, pero añadiendo un anticuerpo no relacionado (*normal serum* IgG, DAKO). Además, se guardó como *input* una alícuota del extracto total de cromatina.

Al día siguiente, las diferentes muestras se incubaron durante 4 h a 4°C en rotación con las esferas previamente bloqueadas (con 50 µg/ml λDNA, 500 µg/ml tRNA, y 10 mg/ml BSA). Posteriormente los inmunocomplejos se lavaron con diferentes tampones: dos lavados con el tampón de baja salinidad, dos con el de alta salinidad, dos con el tampón LiCl y finalmente se hicieron dos lavados con el tampón TE. La recuperación de los inmunocomplejos se realizó añadiendo 200 µl de tampón de elución y agitación fuerte durante 20 min.

Después se centrifugaron las muestras y se recogieron los sobrenadantes. Tras la elución, los inmunoprecipitados y los *inputs* se desentrecruzaron mediante incubación a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 50 µg de proteinasa k y se incubaron 1 hora a 37°C.

Finalmente, el DNA de los *input* y de los inmunoprecipitados se purificó con un kit de purificación de PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) y se analizó por qPCR con cebadores específicos y SYBR Green. Además, los productos de la amplificación se separaron según su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % y se tiñeron con bromuro de etidio. Se calculó el incremento relativo como porcentaje respecto al input. Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Listado de primers utilizados para el análisis por qPCR del ChIP.**

	Forward	Reverse
Promotor 47s pre-rRNA	GCCCCGGGGGAGGTAT	GAGGACAGCGTGTCTAGCAATAA
IGS 47s pre- rRNA	CGGGCCTTGGCAGATTC	CGCGCGTAGAGGAGAGATTT

## 14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados presentados en las gráficas corresponden a la media aritmética de los valores obtenidos en cada experimento  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas mediante la prueba t de Student para muestra única cuando  $p \leq 0.05$ .

Los experimentos fueron llevados a cabo como mínimo con tres réplicas por condición para permitir la comparación estadística.



# **RESULTADOS**

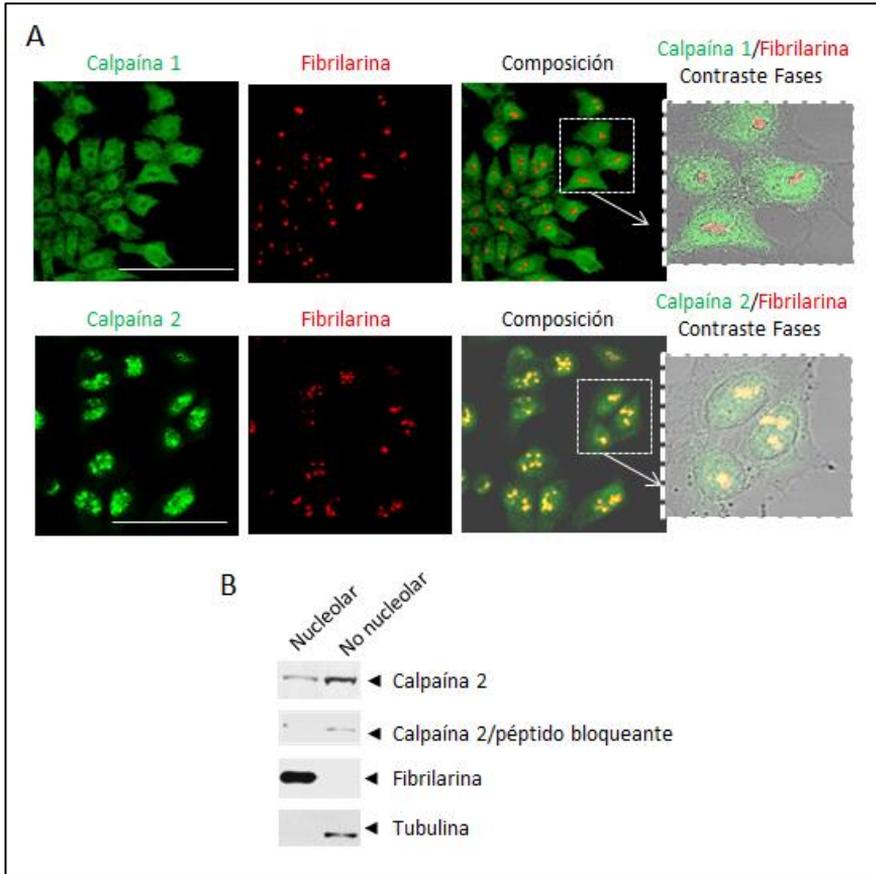


### 1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS CALPAÍNAS CONVENCIONALES EN CÉLULAS DE CÁNCER COLORRECTAL

Aunque las calpaínas son de localización predominantemente citosólica, existen antecedentes en los que las calpaínas se localizan en orgánulos celulares específicos para actuar sobre proteínas allí residentes (García, Bondada and Geddes, 2005; Nuzzi, Senetar and Huttenlocher, 2007; Singh *et al.*, 2014; Averna *et al.*, 2015; Baudry and Bi, 2016). En estas nuevas ubicaciones celulares, tendrán acceso a sustratos con funciones críticas para la célula como la apoptosis desde la mitocondria, RE o lisosomas (Smith and Schnellmann, 2012).

Por otra parte, existen varios ejemplos en la familia de las calpaínas que demuestran la insuficiencia o incapacidad de los ensayos *in vitro* para representar la realidad del funcionamiento de estas proteínas *in vivo*. La proteólisis de determinados sustratos por parte de las calpaínas *in vitro* no siempre se ha demostrado que ocurra realmente en las células. El desconocimiento de los mecanismos de reconocimiento y proteólisis de los sustratos de las calpaínas sin duda dificulta la comprensión de los factores que determinan la actividad de éstas. En este sentido, se ha postulado que la compartimentalización subcelular de las calpaínas podría tener un efecto modulador de sus funciones en los múltiples procesos biológicos en los que participan.

Para investigar si la localización subcelular es un factor determinante de la función de las calpaínas convencionales en el CCR, realizamos una IF en la línea celular de cáncer colorrectal DLD1 en la que utilizamos dos anticuerpos policlonales frente a las calpaínas 1 y 2 (Figura 12A). El resultado muestra que ambas proteasas tienen una fuerte localización nuclear, pero, aunque la calpaína 1 apenas se detecta en el nucleolo, la calpaína 2 tiene una notable presencia nucleolar, como así lo demuestra su colocalización con el marcador nucleolar fibrilarina.

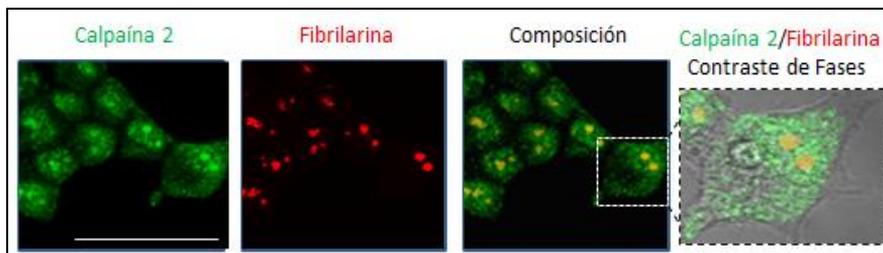


**Figura 12. Localización subcelular de calpaínas convencionales en células de cáncer colorrectal.** A) IF de calpaínas 1 y 2 (verde), fibrilarina (rojo), su composición y ampliación de imagen combinada con el contraste de fases en células DLD1 quiescentes. Escala: 75  $\mu$ m. B) WB de calpaína 2 en fracciones nucleolares y no nucleolares. La especificidad de la señal de la calpaína 2 fue confirmada mediante el uso de un péptido bloqueante. Se utilizaron la fibrilarina (nucleolar) y la tubulina (no nucleolar) como marcadores de pureza de las fracciones subcelulares.

La ubicación de la calpaína 2 en el nucleolo de las células DLD1 fue confirmada por WB en extractos nucleolares y no nucleolares (resto de la célula) (Figura 12B). El uso de un péptido bloqueante frente al anticuerpo utilizado demostró la especificidad de la señal detectada.

## RESULTADOS

Además, se vio que la calpaína 2 tenía el mismo patrón de localización nucleolar en células de cáncer de mama humano MCF-7 (Figura 13), lo cual indica que no es un fenómeno específico de un tipo de cáncer.



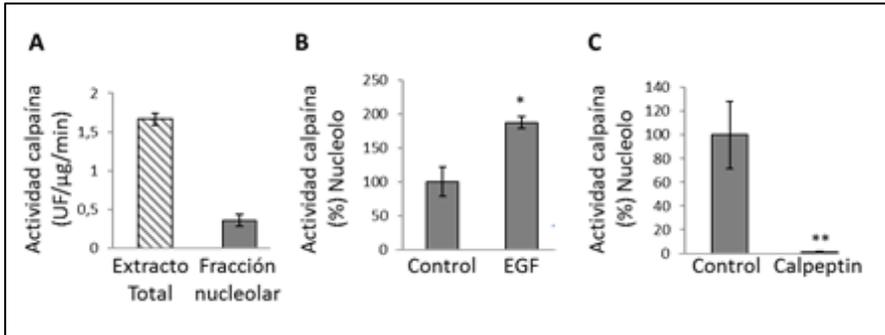
**Figura 13. Localización subcelular de la calpaína 2 en células de cáncer de mama.** IF de calpaína 2 (verde), fibrilarina (rojo), su composición, y ampliación de imagen combinada con el contraste de fases en células MCF-7 quiescentes. Escala: 25  $\mu$ m.

La localización nucleolar de la calpaína 2 es del todo novedosa y puede plantear un nuevo escenario para esta proteína respecto a su actividad y regulación. En el nucleolo, orgánulo con gran número de proteínas, la calpaína 2 activa podría tener acceso a nuevos sustratos o, por el contrario, podría estar siendo degradada por autoproteólisis para limitar su acceso a determinados sustratos.

Para determinar si la calpaína 2 nucleolar es una enzima funcional se analizó la actividad calpaína en extractos de proteínas totales o fracciones nucleolares.

Como era de esperar, la fracción nucleolar tenía unos niveles de actividad calpaína muy inferiores a los de toda la célula (Figura 14A). No obstante, es de destacar que en las fracciones nucleolares los niveles de actividad calpaína eran lo suficientemente elevados como para poder ser detectados mediante ensayo enzimático.

## RESULTADOS



**Figura 14. Actividad calpaína en células DLD-1.** Actividad calpaína en: A) Extracto total y fracción nucleolar. B) y C) Extractos nucleolares de células tratadas con EGF (5 min) o calpeptin (24 h), respectivamente. Los valores muestran las medias  $\pm$  SEM, expresados como porcentaje de actividad calpaína en relación al control. \* $p \leq 0.05$  y \*\* $p \leq 0.001$ .

Para confirmar si se trataba de calpaínas funcionales o si estábamos detectando algún tipo de actividad residual, se trataron las células DLD-1 en cultivo con un inhibidor o un estimulador de la actividad calpaína, la calpeptin y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), respectivamente.

Los resultados mostraron que la actividad calpaína nucleolar aumentaba al doble tras el tratamiento de 5 min con EGF (Figura 14B) pero se veía completamente inhibida por la calpeptin (Figura 14C).

Estos experimentos parecen sugerir que la calpaína 2, en esta nueva localización, es una proteína totalmente funcional, capaz de responder a estímulos que modifiquen su actividad proteolítica sobre nuevos sustratos nucleolares.

### 2. PAPEL DE LA CALPAÍNA 2 NUCLEOLAR EN LA BIOGÉNESIS RIBOSOMAL

Dado que la calpaína 2 se encuentra en el nucleolo y totalmente activa, esta proteasa podría estar jugando alguna novedosa función en la biogénesis ribosomal. La inhibición de la RNA polimerasa I causa la desorganización del nucleolo en subestructuras que contienen unidades de transcripción ribosomal. Estas unidades retienen elementos de la maquinaria transcripcional, como la RNA polimerasa I y la fibrilarina, proteína involucrada también en el primer paso del procesamiento del pre-rRNA (Panse *et al.*, 1999). Si la calpaína 2 participara activamente en la biogénesis ribosomal, es muy posible que estuviera estrechamente asociada a componentes nucleolares implicados en este proceso.

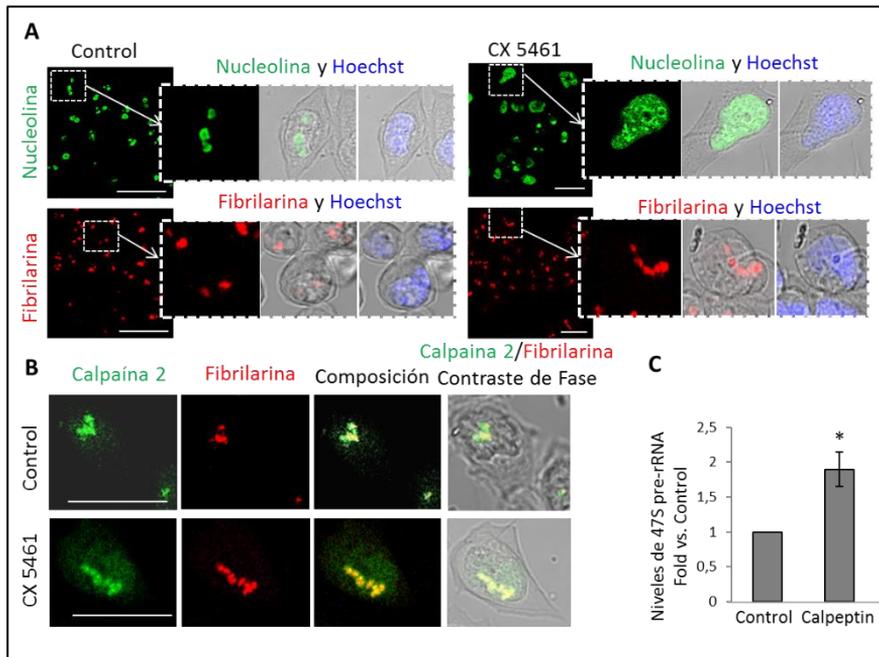
Evaluamos la asociación de la calpaína 2 con proteínas mayoritarias del nucleolo tras la desorganización del mismo por el inhibidor específico de la RNA polimerasa I, CX5461 (Drygin *et al.*, 2011).

Como ya se ha descrito anteriormente, tras el tratamiento con CX5461, la estructura del nucleolo se vio afectada de tal manera que componentes mayoritarios como la nucleolina presentaron una notable redistribución hacia el nucleoplasma (Popov *et al.*, 2013) (Figura 14A). De acuerdo con otras publicaciones (Panse *et al.*, 1999), la fibrilarina permaneció asociada a las unidades de transcripción ribosomal durante la desorganización nucleolar (Figura 15A). Respecto a la calpaína 2, vimos que tras el tratamiento con el inhibidor CX5461, colocalizaba claramente con la fibrilarina (Figura 15B).

Estas observaciones sugerían una participación activa de la calpaína 2 en la biogénesis ribosomal, la cual podría ser reprimiendo o promoviendo este proceso. Por tanto, con el objetivo de determinar el papel de la calpaína 2 en la biogénesis ribosomal, tratamos las células con el inhibidor

## RESULTADOS

químico de las calpaínas, calpeptin y analizamos los niveles del transcrito primario 47s pre-rRNA por RT-qPCR. El bloqueo de la actividad calpaína provoca un incremento de casi el doble en los niveles de 47s pre-rRNA (Figura 15C) respecto a las células control, por lo que podemos afirmar que la calpaína 2 inhibe la acumulación de rRNA.



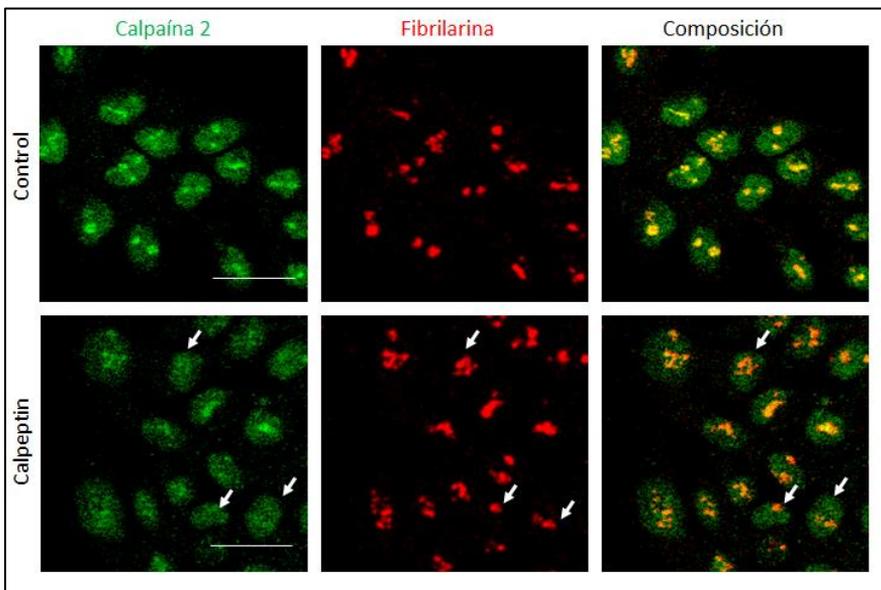
**Figura 15. Participación de la calpaína 2 en la biogénesis ribosomal en células DLD1.**

A) IF de la nucleolina (verde) y fibrilarina (rojo) en células control (izquierda) y tratadas con CX-5461 (derecha). Escala 75  $\mu\text{m}$ . Las ampliaciones corresponden a imágenes combinadas del contraste de fases con nucleolina, fibrilarina o Hoescht 33342 (azul). B) IF de la calpaína 2 (verde), fibrilarina (rojo), su composición e imagen combinada con el contraste de fases en células control y tratadas con CX-5461. Escala: 25  $\mu\text{m}$ . C) RT-qPCR del 47s pre-rRNA en células control o tratadas con calpeptin. Los resultados ( $n \geq 3$ ) se muestran como aumento relativo (*fold*) en relación al control y representan la media  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ .

### 3. DISTRIBUCIÓN NUCLEOLAR DE LA CALPAÍNA 2: DEPENDENCIA DE SU ACTIVIDAD

La participación activa de la calpaína 2 reprimiendo la biogénesis ribosomal nos hizo preguntarnos si su acumulación en el nucleolo dependía de su actividad proteolítica. Con tal objetivo, analizamos la distribución de la calpaína 2 mediante IF en células DLD1 tras el tratamiento con calpeptin.

Nuestros resultados parecen mostrar una pérdida parcial de localización nucleolar de la calpaína 2 tras la inhibición de su actividad proteasa (Figura 16). Dichas observaciones fueron confirmadas mediante WB de calpaína 2 en fracciones subcelulares (Figura 17A).

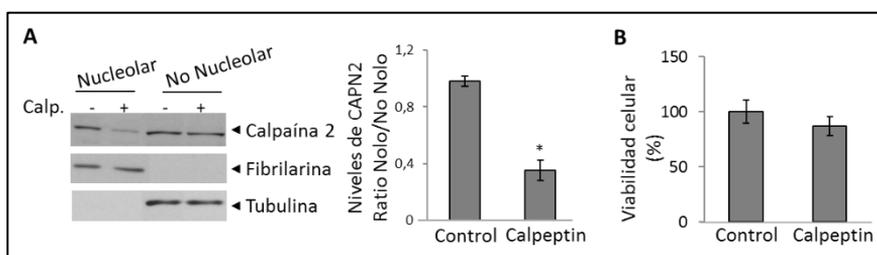


**Figura 16. Localización de la calpaína 2 nucleolar dependiente de su actividad proteolítica.** IF de calpaína 2 (verde), fibrilarina (rojo) y composición en células DLD1 control y tratadas con calpeptin. Escala: 25  $\mu$ m. Las flechas señalan células representativas con bajo nivel de colocalización de calpaína2 y fibrilarina.

## RESULTADOS

Efectivamente, los niveles de calpaína 2 disminuían claramente en las fracciones nucleolares tras la inhibición de su actividad enzimática (Figura 17A). Estos datos parecen sugerir que se trata de un fenómeno específico del compartimento, ya que el tratamiento con calpeptin no afectó a los niveles de calpaína en el resto de la célula.

Tampoco parece deberse a una posible toxicidad del largo tratamiento de 24 h con calpeptin ya que el ensayo de viabilidad celular no arrojó diferencias significativas entre las células control y las tratadas (Figura 17B).



**Figura 17. Transporte de la calpaína 2 nucleolar dependiente de la actividad enzimática en células DLD1.** A) WB de calpaína 2 en fracciones nucleolares y no nucleolares de células control y tratadas con calpeptin. Los niveles de proteínas se cuantificaron y normalizaron por los niveles de fibrilarina y tubulina. La ratio de calpaína 2 nucleolar/no nucleolar se representa como la media ( $n=3$ )  $\pm$  SEM vs. control. \* $p \leq 0,05$ . B) Ensayo MTT en células control o tratadas con calpeptin. Los resultados ( $n=3$ ) muestran la media  $\pm$  SEM expresados como porcentaje de viabilidad celular vs. control.

Los resultados obtenidos parecen sugerir que la actividad calpaína además de ser necesaria para la regulación de la biogénesis ribosomal participa en la acumulación nucleolar de la calpaína 2.

#### **4. PAPEL DE LA CALPAÍNA S1 Y LA CALPASTATINA EN LA REGULACIÓN DE LA CALPAÍNA NUCLEOLAR**

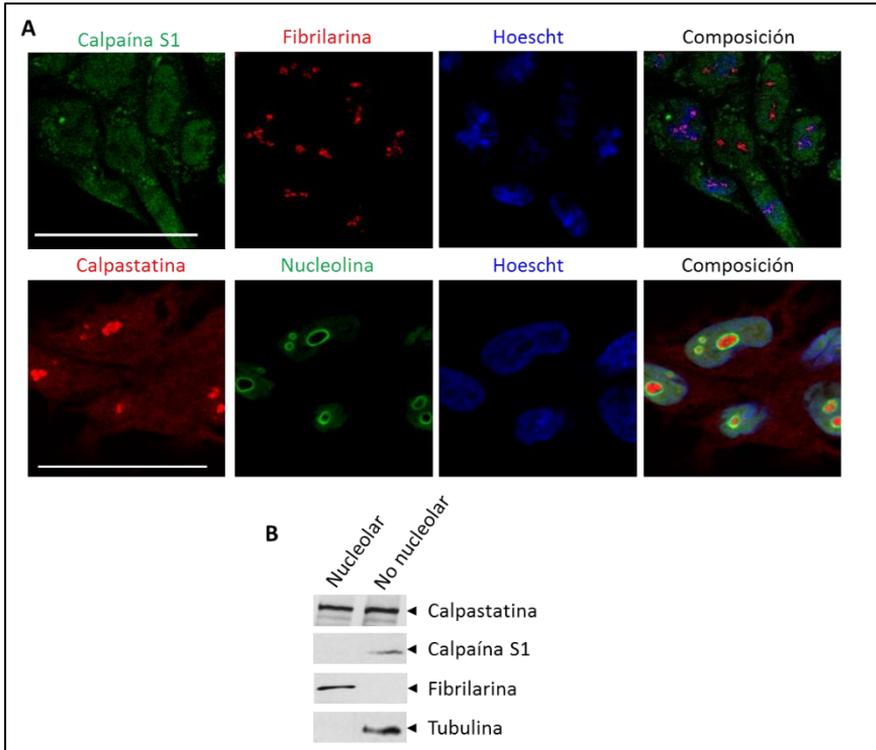
Nuestros datos parecen indicar que la actividad calpaína es necesaria para promover la acumulación y funcionalidad de la calpaína 2 en el nucleolo. No obstante, tal y como se ha citado previamente, la regulación de la actividad calpaína es un proceso complejo en el cual pueden intervenir otros factores como su inhibidor endógeno calpastatina o la subunidad reguladora de las calpaínas convencionales calpaína S1.

Por tanto, nos planteamos determinar en ambos casos qué función podrían tener estos importantes reguladores del sistema calpaína.

Para detectar la localización y los niveles de la calpaína S1 y la calpastatina en la línea DLD1 se realizó tanto una IF como WB de extractos nucleolares aislados (Figura 18).

Los resultados demostraron que la calpaína S1 cuenta con una distribución amplia por toda la célula, pero no en la región nucleolar. Por su parte, observamos que la calpastatina también cuenta con una distribución homogénea por la célula, pero en este caso, sí que se encuentra también en el nucleolo ya que colocaliza con el marcador nucleolar nucleolina.

## RESULTADOS



**Figura 18. Localización subcelular de calpastatina y calpaína S1 en células DLD1.** A) Paneles superiores IF de calpaína S1 (verde), fibrilarina (rojo), Hoescht (azul) y su composición. Paneles inferiores IF de calpastatina (rojo), nucleolina (verde), Hoescht (azul) y su composición. Escala: 75  $\mu$ m. B) WB de calpaína S1 y calpastatina en fracciones nucleolares y no nucleolares. Se utilizaron fibrilarina (nucleolar) y tubulina (no nucleolar) como marcadores de pureza de fracciones subcelulares.

Los resultados parecen indicar que los estos reguladores de la actividad calpaína podrían tener diferentes niveles de participación en la modulación de la actividad calpaína nucleolar.

### 5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA LOCALIZACIÓN NUCLEOLAR DE LA CALPAÍNA 2

Varios antecedentes señalan el efecto de la vía de las MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) sobre la actividad y la localización de las calpaínas (Glading *et al.*, 2001, 2004; Leloup *et al.*, 2010).

Por otra parte, esta vía también ejerce una estricta regulación sobre el proceso de biogénesis ribosomal a través de fosforilaciones que promueven o inhiben la síntesis de rRNA en el nucleolo (Grummt, 2010).

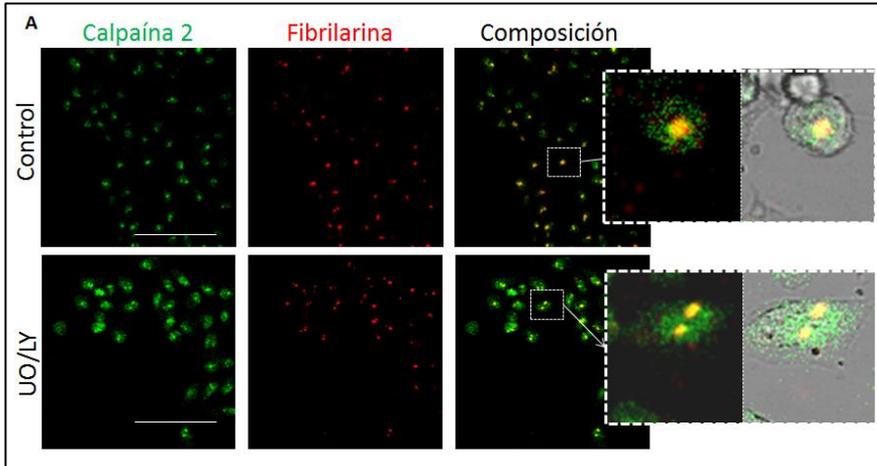
En este sentido, nuestro modelo de trabajo representa una interesante estrategia para establecer la influencia de mutaciones como KRAS G13D y PI3K E545K en la localización de la calpaína 2.

La identificación de los procesos afectados tan sólo por una de las dos vías ha resultado difícil por sus múltiples niveles de entrecruzamiento. Tal y como se señaló previamente, un creciente número de estudios en diferentes modelos tumorales ha remarcado la necesidad de una inhibición simultánea de ambas vías para lograr un bloqueo efectivo de los efectos por su señalización (Toulany *et al.*, 2006, 2016; Affolter *et al.*, 2013).

Por todo ello, analizamos la participación en la localización de la calpaína 2 nucleolar de las vías de KRAS y PI3K tras su inhibición simultánea con UO126 y LY294002 durante 24 h en las células DLD1.

El análisis de la distribución subcelular de la calpaína 2 mediante IF sugirió que las células tratadas con los inhibidores UO/LY tenían una mayor señal de la calpaína 2 en el nucléolo respecto a las células control (Figura 19).

## RESULTADOS



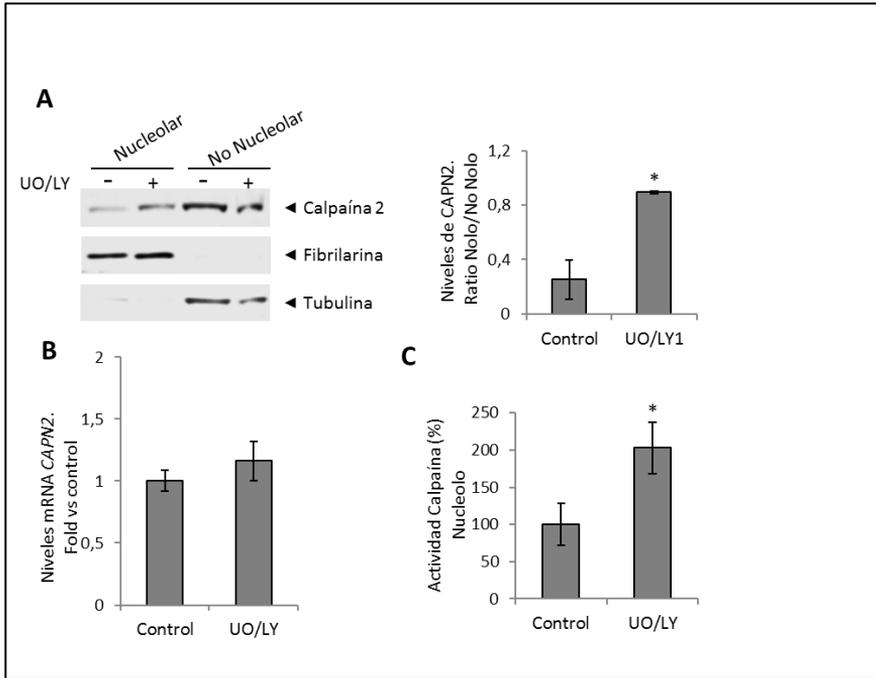
**Figura 19. Localización nucleolar de la calpaína 2 dependiente de las vías de señalización MAPK/PI3K en células DLD1.** IF de calpaína 2 (verde), fibrilarina (rojo) y composición en células control y tratadas con UO/LY (24h). Escala: 75  $\mu$ m. Ampliaciones: composiciones de las IF con el contraste de fases.

Este aumento podría tener dos posibles motivos: un incremento en la expresión o un cambio en la localización de la calpaína 2.

Los resultados por WB de extractos proteicos nucleolares demostraron claramente un incremento en la relación calpaína 2 nucleolar/calpaína 2 no nucleolar tras el bloqueo de las vías (Figura 20A). En cambio, el análisis de la expresión de la calpaína 2 por RT-qPCR demostró que el tratamiento con UO/LY no afectaba a los niveles de mRNA de la calpaína 2 (Figura 20B).

En consonancia con este aumento de calpaína nucleolar, también observamos en extractos nucleolares un aumento de la actividad calpaína tras la inhibición simultánea de la señalización de KRAS/PI3K (Figura 20C).

Estos resultados sugieren que las vías de KRAS y PI3K podrían tener una participación activa regulando el transporte y/o acumulación de la calpaína 2 en el nucleolo.



**Figura 20. Papel de las vías de señalización MAPK/PI3K en la modulación de calpaína 2 en células DLD1.** A) WB de calpaína 2 en fracciones nucleolares y no nucleolares de células control y tratadas con UO/LY (24 h). Los niveles de proteínas se cuantificaron y normalizaron por los niveles de fibrilarina y tubulina. La ratio de calpaína 2 nucleolar/no nucleolar se representa como la media ( $n \geq 3$ )  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$  vs. control. B) RT-qPCR de calpaína 2 en células control y tratadas con UO/LY (24 h). Los resultados ( $n \geq 3$ ) se muestran como incremento medio  $\pm$  SEM vs. control. C) Actividad calpaína en fracción nucleolar de células control y tratadas con UO/LY (24 h). Los resultados ( $n \geq 3$ ) muestran la media  $\pm$  SEM expresada como porcentaje de actividad calpaína vs. control. \* $p \leq 0.05$ .

### 5.1 Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la calpaína 2

Los resultados previos demostraron que las células DLD1 son sensibles tanto a estímulos de activación (EGF) como de inhibición de las vías de señalización, paradójicamente provocando en ambos casos un aumento de calpaína 2 nucleolar.

Las células DLD1 cuentan con un alelo KRAS tipo salvaje y otro con la mutación G13D. Ambos alelos responden de diferente manera a

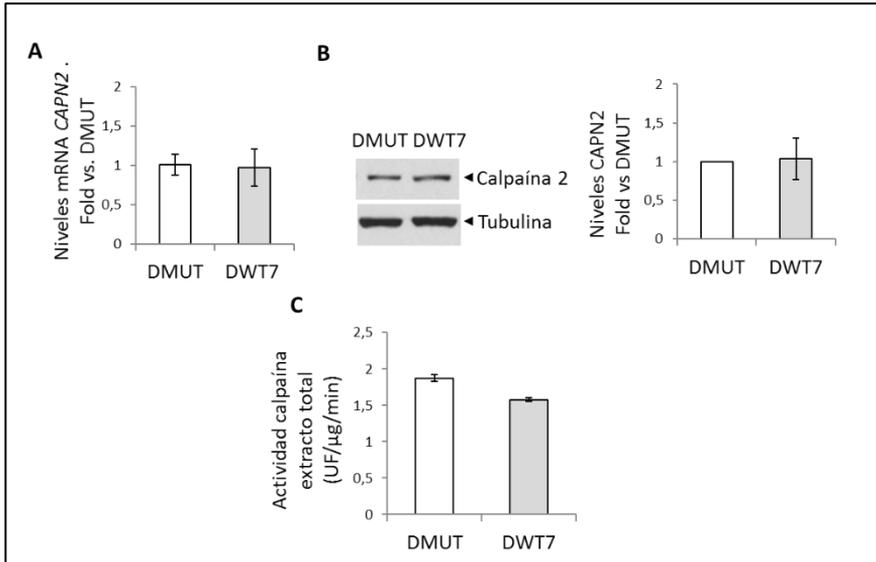
diversos estímulos, pudiendo generar efectos aparentemente contradictorios. La presencia de ambos alelos puede dificultar la comprensión de la función de KRAS en la modulación de la localización y actividad de la calpaína 2.

Para evaluar la influencia de KRAS sobre la calpaína 2 y diseccionar los efectos específicos de cada estado alélico, se utilizaron 2 líneas celulares isogénicas derivadas de DLD1. Ambas líneas mantienen la misma mutación activadora de PI3K (E545K), pero solo cuentan con un alelo KRAS, bien de tipo salvaje (DWT7) o bien con la mutación G13D (DMUT).

### 5.1.1 Efecto del estado mutacional de KRAS sobre los niveles de calpaína 2 y actividad enzimática totales.

Realizamos el análisis por RT-qPCR de la expresión de la calpaína 2 así como del nivel de la proteína por WB y la actividad proteasa en extracto total en las líneas DMUT y DWT7.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en la calpaína 2 en cuanto a expresión génica, niveles de proteína total ni en la actividad proteolítica en extractos totales entre ambas líneas celulares (Figuras 21A-21C).

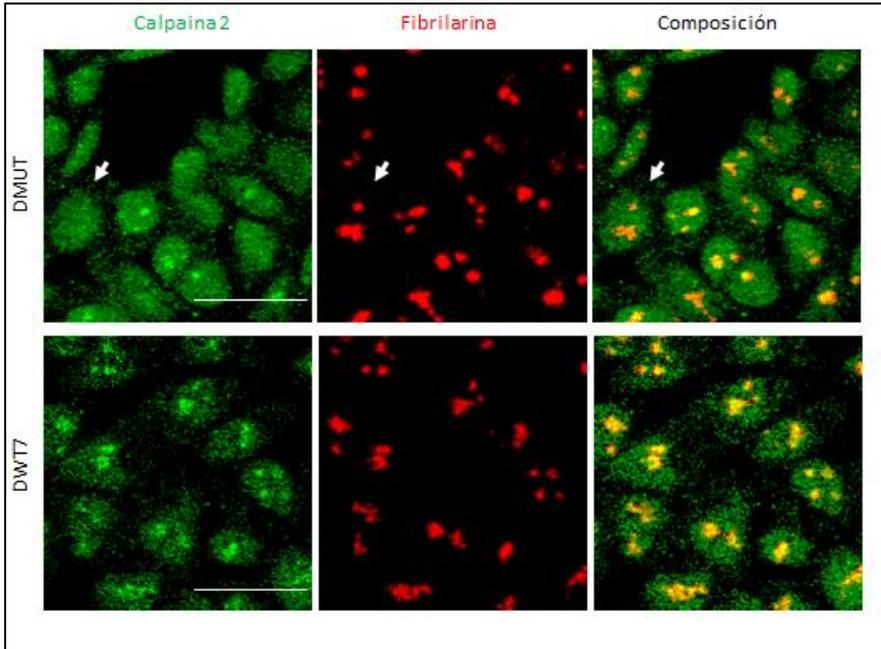


**Figura 21. Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la expresión y actividad de la calpaína 2 en células de cáncer colorrectal.** A) RT-qPCR de calpaína 2 en células DMUT y DWT7. B) WB de calpaína 2 en extracto total de células DMUT y DWT7. Los resultados se cuantificaron y normalizaron por niveles de tubulina. C) Actividad calpaína en extractos proteicos totales de células DMUT y DWT7. Todos los datos ( $n \geq 6$ ) se muestran como la media  $\pm$  SEM. vs. células DMUT.

### 5.1.2 Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la localización nucleolar de la calpaína 2.

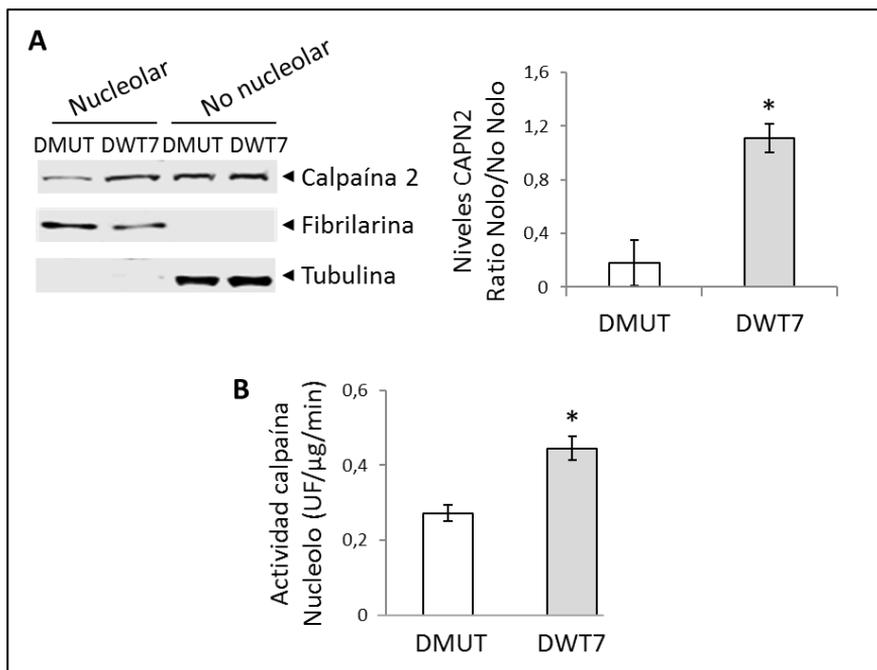
La localización de la calpaína 2 por IF demostró que ésta se concentraba, como en DLD1, en los nucléolos de ambas líneas DMUT y DWT7. No obstante, en estas últimas se podía observar el acumulo de la proteína en un mayor número de células (Figura 22).

Esta observación fue confirmada mediante WB de fracciones nucleolares donde se vio que los niveles de calpaína 2 eran mayores en la línea DWT7 comparados con DMUT (Figura 23A). De acuerdo con estos resultados, la actividad calpaína también resultó mayor en extractos nucleolares de DWT7 que en DMUT (Figura 23B).



**Figura 22. Localización de calpaína 2 en células de cáncer colorrectal con distinto estado mutacional de KRAS.** IF de la calpaína 2 (verde) y fibrilarina (rojo) en células DMUT y DWT7 e imágenes combinadas. Escala: 25  $\mu$ m. Las flechas señalan una célula representativa DMUT sin colocalización de de calpaína 2 nucleolar y fibrilarina (naranja).

Ya sea de manera directa o indirecta, estos resultados confirman la participación de la señalización de KRAS en la modulación de la localización de la calpaína 2 nucleolar. Es más, hemos podido establecer que la mutación en un solo alelo de KRAS G13D en ausencia de un alelo salvaje parece bloquear parcialmente la acumulación de la calpaína 2 en el nucleolo.



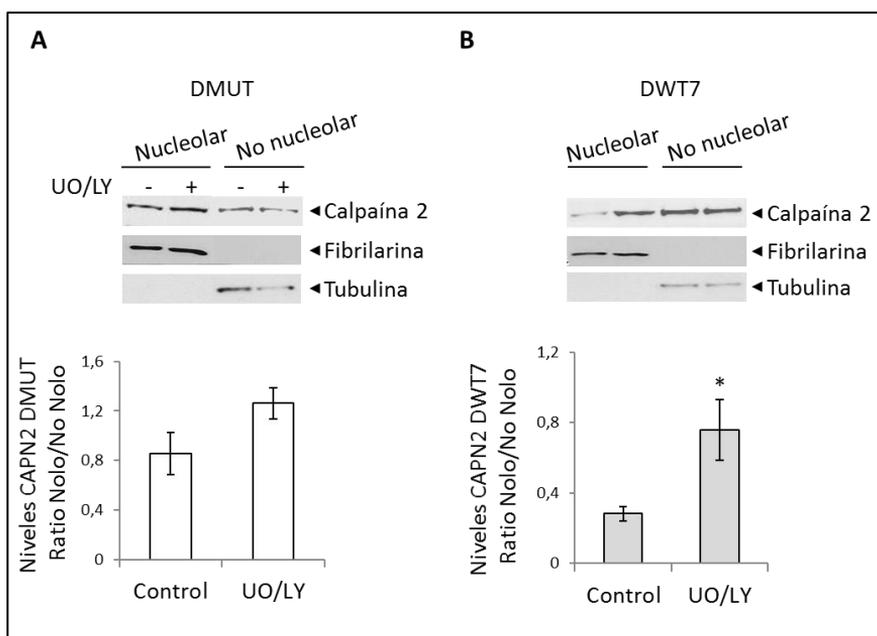
**Figura 23. Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la localización y actividad de la calpaína 2 en células DMUT y DWT7.** A) WB de calpaína 2 en fracciones nucleolares y no nucleolares. Las proteínas se cuantificaron y normalizaron por los niveles de fibrilarina y tubulina. El ratio (n≥6) de calpaína 2 nucleolar/no nucleolar se representa como la media ± SEM vs. las células DMUT. \*p≤0.05. B) Actividad calpaína en fracciones nucleolares de células DMUT y DWT7. Los resultados (n≥6) representan la media ± SEM. \*p≤0.05.

## 5.2 Modulación de la localización nucleolar de la calpaína 2 según el estado mutacional de KRAS

Los resultados previos señalan la influencia de la señalización mediada por la vía de KRAS sobre la calpaína 2 nucleolar. Concretamente se aprecia un sistema de señalización en el cual hay una localización diferencial de la calpaína 2 según la presencia o ausencia de KRAS (G13D). Para determinar el papel de KRAS (G13D) sobre la localización de la calpaína 2 en el nucleolo, analizamos su distribución subcelular por WB tras la doble inhibición de las vías de señalización en ambas líneas

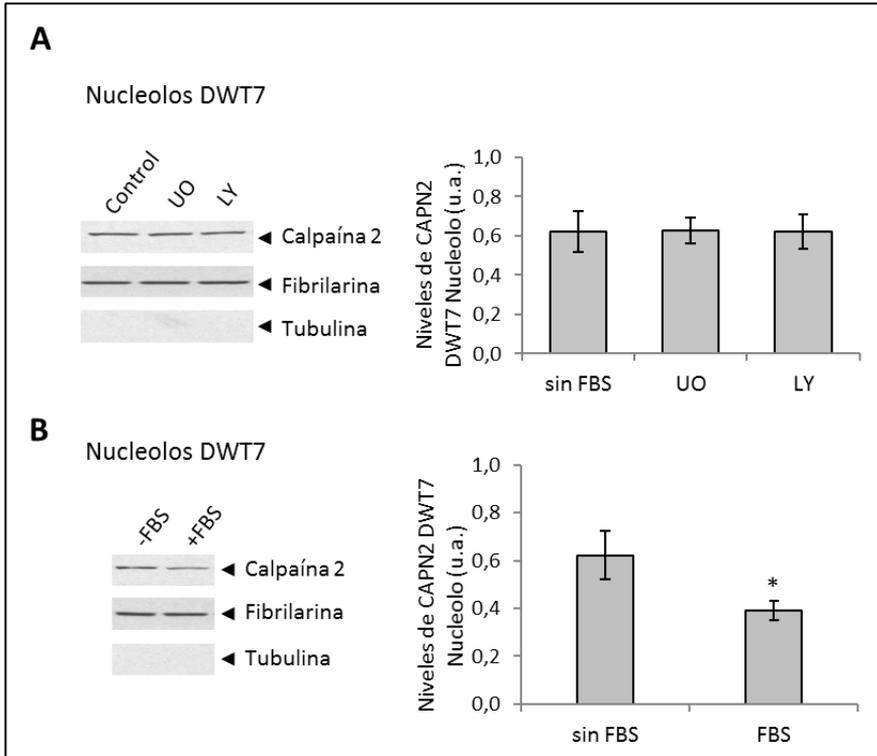
## RESULTADOS

celulares. Los resultados demostraron que la inhibición de la señalización de las vías afectaba los niveles de calpaína 2, aunque de manera diferencial (Figura 24). En la línea DMUT el tratamiento con los inhibidores no generó cambios significativos en la localización de la calpaína 2 nucleolar. No obstante, observamos que la línea DWT7 presentaba sensibilidad a la inhibición conjunta de las vías de señalización, ya que se observaba un incremento en la calpaína 2 nucleolar en las células tratadas.



**Figura 24. Regulación de la localización de la calpaína 2 en células DMUT y DWT7 dependiente del estado mutacional de KRAS.** WB de calpaína 2 en fracciones nucleolares y no nucleolares de células DMUT A) y DWT7 B), control y tratadas con UO/LY (24h). Los niveles de proteínas se cuantificaron y normalizaron por los niveles de fibrilarina y la tubulina. El ratio de calpaína 2 nucleolar/no nucleolar se representa como la media (n=3)  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$  vs. células control.

Estos datos parecen señalar que la presencia de un alelo KRAS salvaje es necesaria para la regulación de la calpaína 2 nucleolar en respuesta a los cambios del entorno.



**Figura 25. Regulación en la localización nucleolar de la calpaína 2 en células DWT7.**

A) WB de calpaína 2 en fracciones nucleolares de células control y tratadas con UO o LY. Los niveles de proteínas se cuantificaron y normalizaron por los niveles de fibrilarina. B) WB de calpaína 2 en fracciones nucleolares de células control y tratadas con FBS 20%. Los niveles de calpaína 2 en A) y B) se cuantificaron y normalizaron por los niveles de fibrilarina y se representaron como la media (n=3) ± SEM. \*p≤0.05 vs. células control. u.a.= unidades arbitrarias.

Por otra parte, como era de esperar, el tratamiento con UO126 o LY294002 por separado (figura 25A), no permitió apreciar diferencias en los niveles de calpaína 2 en los nucleolos de la línea celular DWT7. Estos datos parecen sugerir que la localización de la calpaína 2 es dependiente de la sinergia de ambas vías (Kandil et al., 2013). Efectivamente, la estimulación simultánea de MAPK/PI3K con FBS 20 % en células quiescentes provocó la disminución en los niveles de la calpaína 2 nucleolar (Figura 25B).

### 6. FUNCIÓN DE LA CALPAÍNA 2 NO NUCLEOLAR

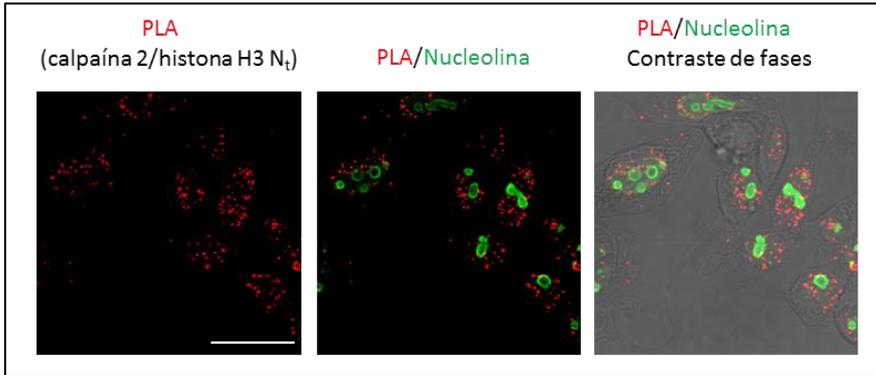
En las células DMUT parece haber una tendencia a acumular a la calpaína 2 en una localización preferentemente no nucleolar. Se desconoce si la calpaína 2 en la fracción no nucleolar podría también ejercer otras funciones dentro del programa tumoral.

En publicaciones previas de nuestro laboratorio se encontró que la calpaína se asocia y proteoliza el extremo amino terminal de la histona H3 en un modelo de involución de glándula mamaria (Arnandis *et al.*, 2014). La escisión del extremo amino se ha postulado como un posible mecanismo epigenético de regulación de la transcripción génica (Azad and Tomar, 2014).

Analizamos la interacción entre el extremo amino terminal de la histona H3 y la calpaína 2 en las células DMUT mediante *DuoLink* (PLA). En este tipo de ensayos, solamente se obtiene señal de fluorescencia cuando hay interacción entre dos proteínas.

En las imágenes se observó una fuerte señal punteada que indicaría una gran interacción entre la calpaína 2 con el extremo Nt de la histona H3 por todo el núcleo (Figura 26). Para detectar la posible interacción calpaína 2/histona H3 en el nucléolo, las muestras analizadas mediante PLA fueron sometidas a una posterior tinción por IF con anticuerpos anti-nucleolina.

Como se observa en la Figura 26, no hay colocalización de PLA con la señal correspondiente a la nucleolina, por lo que la interacción calpaína 2/histonaH3 tendría lugar tan sólo en el nucleoplasma.



**Figura 26. Interacción *in vivo* entre la calpaína 2 y el extremo amino terminal de la histona H3 en la línea DMUT.** Análisis de la interacción *in vivo* entre la calpaína 2 y el extremo Nt de la histona H3 mediante PLA (rojo). Los paneles central y derecho muestran, además, los nucleolos teñidos mediante IF con el marcador nucleolar nucleolina (verde) y la composición de PLA/nucleolina con el contraste de fases. Escala 25  $\mu$ m.

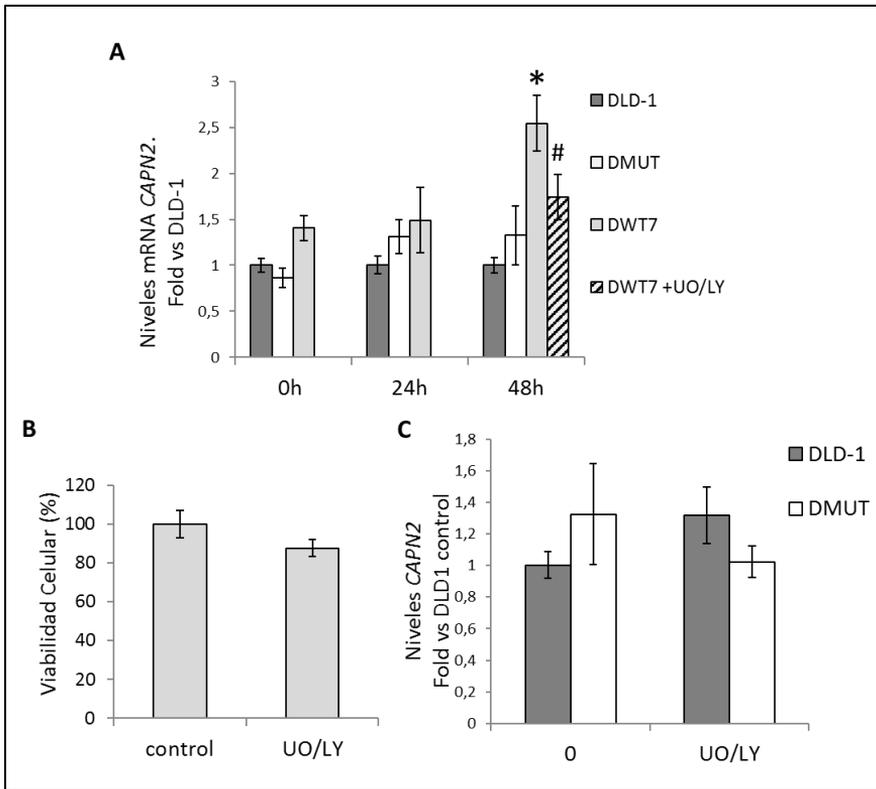
A la vista de los resultados podemos afirmar que la calpaína 2 nuclear no parece encontrarse inactiva en células DMUT, sino que también podría contar con una función dentro del programa de expresión tumoral.

## 7. FUNCIÓN DE LA CALPAÍNA 2 NUCLEOLAR EN RESPUESTA A LA RETIRADA DE SUERO

La biogénesis ribosomal es un proceso primordial en células con alta tasa de proliferación que resulta energéticamente muy costoso. Por esta razón, esta función está estrechamente ligada a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento disponibles en el entorno, de manera que la célula continúa adelante con el proceso solo si percibe las señales adecuadas que convergen en el nucleolo (Grummt and Voit, 2010). De esta manera, una de las ventajas adaptativas de las células tumorales es su independencia de los estímulos del entorno para mantener su crecimiento. Según este razonamiento, en nuestro modelo de trabajo, la activación constitutiva de KRAS impediría la acumulación nucleolar de la calpaína 2 de manera que la célula podría continuar con la biogénesis ribosomal incluso en ausencia de suero. Para comprobar tal hipótesis nos propusimos

## RESULTADOS

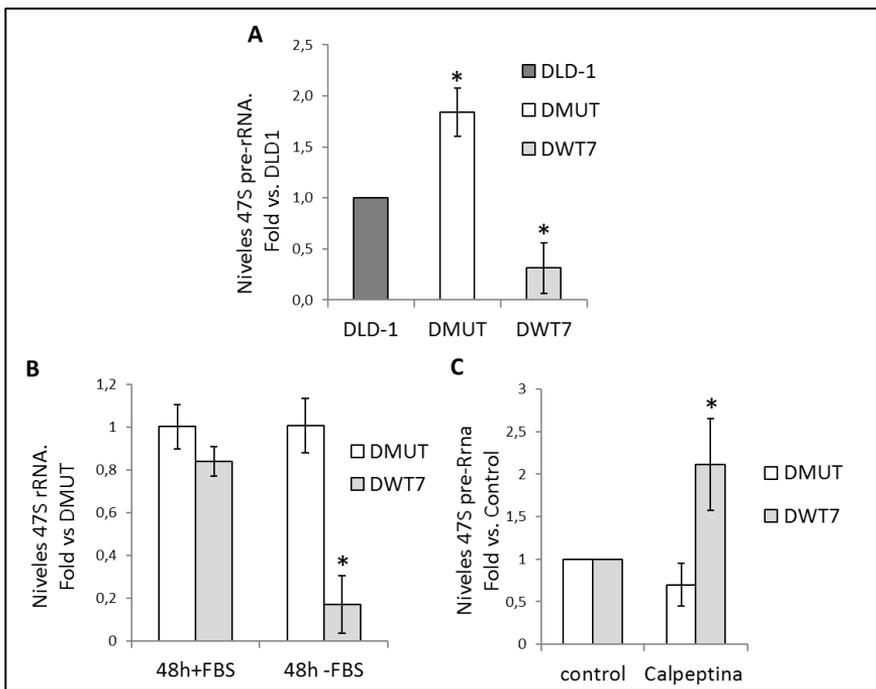
realizar una curva de tiempo de ausencia de suero en el medio celular y analizar los efectos sobre la expresión génica de la calpaína 2 en las tres líneas celulares de CCR.



**Figura 27. Expresión de la calpaína 2 en líneas celulares de cáncer colorrectal en condiciones limitantes de crecimiento.** Las células se mantuvieron por 0, 24 y 48 h en ausencia de suero. A) RT-qPCR de calpaína 2 a los tiempos indicados en DLD1 (barra gris oscuro), DMUT (barra blanca) y DWT7 (barra gris claro). Además, las células DWT7 se trataron con UO/LY durante las últimas 24 h de cultivo (barra rayada). Los resultados ( $n \geq 6$ ) se representan como incremento vs. DLD1. \* $p \leq 0.05$  vs. cualquier punto en todas las líneas celulares. #  $p \leq 0.05$  vs. células DWT7 a 48 h sin tratar. B) MTT de células DWT7 mantenidas 48 h sin suero (control) o cultivadas las últimas 24 h en presencia de UO/LY. Se muestra la media  $\pm$  SEM expresado como porcentaje de viabilidad celular vs. control. C) RT-qPCR de calpaína 2 en DLD1 (gris) y DMUT (blanco) mantenidas 48h sin suero, (control) o o tratadas en las últimas 24 h con UO/LY. Los resultados ( $n \geq 6$ ) representan el incremento medio  $\pm$  SEM vs. DLD1 control.

## RESULTADOS

Como se puede observar, los niveles de mRNA de calpaína 2 aumentaron a las 48 h tras la retirada de suero en células DWT7. En cambio, tanto en DLD1 como en DMUT, dicha expresión permaneció constante a lo largo del tiempo (Figura 27 A). La inhibición combinada de PI3K/MEK fue capaz de prevenir el aumento en la expresión de la calpaína 2 observado a las 48 h en DWT7 sin afectar la viabilidad celular (Figura 27 A-B), pero no tuvo un efecto significativo en las otras líneas celulares (Figura 27C).



**Figura 28. Relación entre la biogénesis ribosomal y la calpaína 2 en respuesta a la retirada del suero en líneas de cáncer colorrectal.** A) RT-qPCR de 47s pre-rRNA en las 3 líneas celulares tras 48 h en ausencia de suero. Los resultados ( $n \geq 9$ ) se expresan como el incremento medio  $\pm$  SEM vs. DLD1. \* $p \leq 0.05$ . B) RT-qPCR de 47s pre-rRNA en células DMUT y DWT7 cultivadas por 48 h en ausencia (-FBS) o presencia (+FBS) de suero. Los resultados ( $n \geq 3$ ) expresan el incremento medio  $\pm$  SEM vs. DMUT (+FBS). \* $p \leq 0.01$  vs. cualquier grupo. C) RT-qPCR de 47s pre-rRNA en células DMUT y DWT7 mantenidas 24 h sin suero y cultivadas 24h mas en presencia de vehículo (control) o calpeptin. Los resultados ( $n \geq 5$ ) expresan el incremento medio  $\pm$  SEM, \* $p \leq 0.05$  vs. control.

En apoyo de la hipótesis antes planteada, mediante RT-qPCR determinamos una interesante relación inversa entre los niveles de mRNA de calpaína 2 y la expresión del 47s pre-rRNA de las líneas según el estado mutacional de KRAS (Figura 28A). Esto es, la línea DWT7 que contaba con la mayor expresión de la calpaína 2 a las 48 h en ausencia de suero, tenía a su vez los menores niveles de 47s pre-rRNA. Es más, observamos que la línea DWT7 se veía dramáticamente afectada por el suero, de modo que en su ausencia los niveles de 47s pre-rRNA analizados por RT-qPCR disminuían notablemente (Figura 28B). En cambio, de acuerdo a la independencia de factores extracelulares de los tumores más agresivos, no se apreciaron cambios en los niveles de 47s pre-rRNA de la línea DMUT a lo largo de este experimento.

Como se puede apreciar, los resultados sugerían una posible función de la calpaína 2 como supresora de la biogénesis ribosomal en respuesta a baja disponibilidad de factores de crecimiento. De acuerdo a este sistema, cuando se bloquea la actividad calpaína mediante el inhibidor farmacológico calpeptin observamos que mientras que los niveles de 47s pre-rRNA analizados mediante RT-qPCR aumentaban en las células DWT7, estos permanecían sin cambios en las células DMUT (Figura 28C).

### **8. PAPEL DE LA CALPAÍNA 2 EN LA SÍNTESIS DE rRNA**

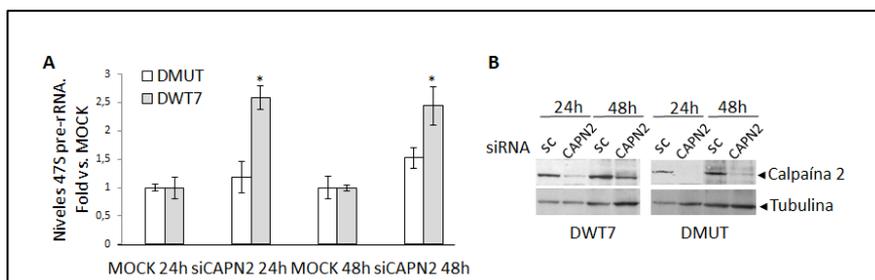
Varios de los resultados que hemos obtenido sugieren que la actividad calpaína tiene un papel modulador de la biogénesis ribosomal. El inhibidor químico, calpeptin, es específico de las calpaínas, pero no distingue la actividad entre los miembros de esta familia. Consecuentemente, no podemos afirmar rotundamente que la calpaína 2 sea la isoforma específica responsable de la modulación de la biogénesis ribosomal.

## RESULTADOS

Así, para comprobar si la calpaína 2 era la isoforma involucrada en la acumulación del pre-rRNA, analizamos los niveles del 47s pre-rRNA en células *knockdown* de la calpaína 2 tras la retirada del suero.

Como se observa en los resultados, los niveles de 47s pre-rRNA analizados por RT-qPCR se mantuvieron constantes en las células DMUT a las 24 y 48 h tras la retirada del suero. Por el contrario, en células DWT7 se observó un gran incremento de los niveles de 47s pre-rRNA a lo largo del tiempo (Figura 29). La eficiencia de silenciamiento mediante siRNA en ambas líneas celulares fue elevada, ya que la expresión de la calpaína 2 disminuyó en aproximadamente un 80 %.

Estos resultados parecen confirmar que la calpaína 2 tiene un papel regulador de los niveles del 47s pre-rRNA y que esta función es dependiente del estado mutacional de KRAS.

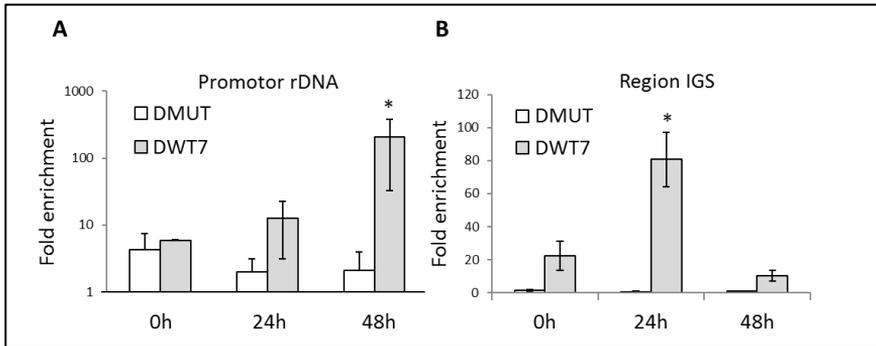


**Figura 29. Papel específico de la calpaína 2 en la síntesis de rRNA en condiciones adversas de crecimiento celular.** Se transfectaron células DMUT y DWT7 con control (*MOCK*) o siRNA de la calpaína 2 (*siCAPN2*) y tras 24 h, las células se mantuvieron en ausencia de suero por 24h y 48h. A) RT-qPCR de 47s pre-rRNA en células control y silenciadas a los tiempos indicados. Los resultados ( $n \geq 6$ ) muestran el incremento medio  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.05$  vs control de cada tiempo en cada línea celular. B) Se muestra un WB representativo de la calpaína 2 en células control y silenciadas.

La disminución de los niveles del 47s pre-rRNA, mediada por calpaína 2, podría ocurrir por dos motivos: por un lado, que disminuyera la síntesis del rRNA o por otro que aumentara la tasa de procesamiento de este rRNA primario que actúa como precursor. Para elucidar ante cuál de las

## RESULTADOS

dos situaciones nos encontrábamos, investigamos la posible unión de la calpaína 2 a diferentes regiones reguladoras del rDNA. Este objetivo lo llevamos a cabo mediante análisis por *ChIP* assay en células DMUT y DW7T a las 0, 24 y 48 h en cultivo tras la retirada de suero.



**Figura 30. Unión de calpaína 2 a regiones reguladoras del rDNA tras la retirada de suero.** La cromatina de células DMUT (barras blancas) y DWT7 (barras grises) a las 0, 24h y 48h tras la retirada del suero se inmunoprecipitó con anticuerpos contra calpaína 2 o IgG de suero normal. Los ChIPs se analizaron por qPCR con primers específicos para la región promotora A) o IGS B) y se representaron como la acumulación relativa de calpaína 2 vs. IgG. Se muestra la media ( $n=3$ )  $\pm$  SEM) \* $p \leq 0.01$  vs. cualquier muestra dentro del experimento.

Tan solo en la línea DWT7 pudimos observar un claro incremento de calpaína 2 unida a la región del promotor del rDNA a lo largo del tiempo (Figura 30A). Situación similar obtuvimos cuando analizamos la presencia de la calpaína 2 en el espaciador intergénico (IGS), ya que encontramos en DWT7 un importante acúmulo de esta proteína unida sobre todo a las 24 h (Figura 30B). Por el contrario, en la línea DMUT no pudimos apreciar cambios significativos en la unión de la calpaína 2 a la región promotora o el IGS del rDNA a ninguno de los tiempos analizados tras la retirada de suero.

Podemos por tanto finalmente concluir que la calpaína 2 parece tener una función represora en la síntesis del rRNA.

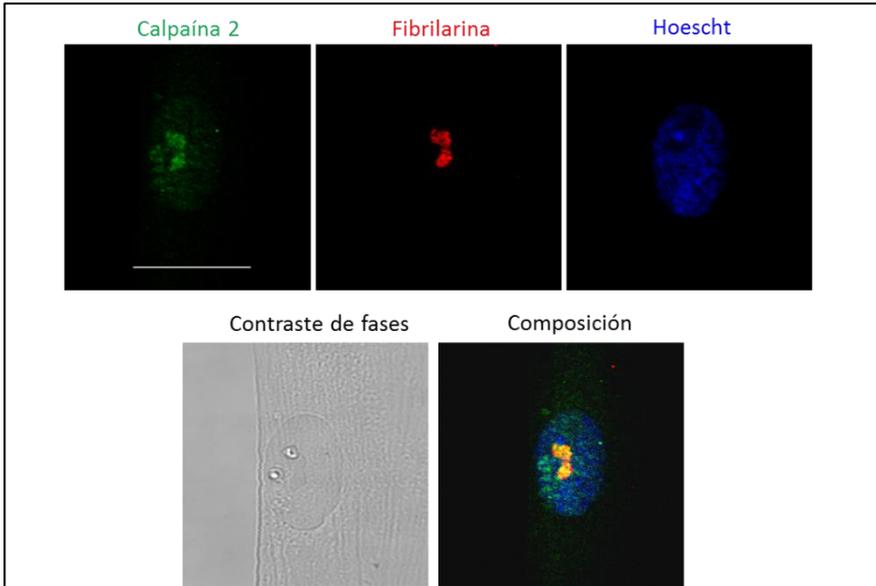
### 9. LOCALIZACIÓN DE LA CALPAÍNA 2 EN OTROS MODELOS CELULARES

Hemos demostrado en un modelo de 3 líneas isogénicas de CCR la función de la calpaína 2 como represora de un proceso tan importante como la biogénesis ribosomal. Es más, el estado mutacional de KRAS tiene una función preponderante en la regulación del sistema de modo que puede determinar que la síntesis ribosomal se vea promovida o reprimida. Ahora bien, nos encontramos ante una situación patológica cuya característica principal es su alta tasa de proliferación. Esta notable capacidad de división celular demanda un constante crecimiento celular que a su vez es dependiente de una sostenida y elevada biogénesis ribosomal. En el caso de estas líneas celulares, la gran actividad ribosomal se produce gracias a, entre otras, la activación constitutiva de las vías de KRAS y PI3K.

No obstante, no está claro qué localización podría tener la calpaína 2 en otro tipo de líneas celulares con un perfil tumoral menos agresivo o incluso en células normales con una alta tasa de proliferación donde no hubiera vías de señalización constitutivamente activadas y desreguladas.

Por tanto, decidimos utilizar la línea celular no tumoral de colon fetal CCD 841 CoN y analizar la localización de la calpaína 2 por IF tras 24 h sin suero.

Los resultados nos permitieron observar que la calpaína 2, aunque distribuida por toda la célula, también se encontraba en los nucleolos de esta línea celular (Figura 31).



**Figura 31. Localización subcelular de la calpaína 2 en la línea celular fetal CCD 841 CoN.** IF de la calpaína 2 (verde), fibrilarina (rojo), Hoescht (azul) y su composición, así como el contraste de fases. Escala 25  $\mu$ m.

De esta manera, la localización nucleolar de la calpaína 2 parece no ser un fenómeno exclusivo de determinadas células tumorales, sino que también podría representar un mecanismo de control más extendido en otros contextos celulares.

# **DISCUSIÓN**



### **1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS CALPAÍNAS COMO POSIBLE DETERMINANTE DE SU FUNCIÓN EN EL CÁNCER COLORRECTAL.**

#### **1.1 Localización subcelular en la familia de las calpaínas**

Las calpaínas son una familia de proteínas que tradicionalmente han sido consideradas de localización citosólicas, compartimento donde actúan sobre multitud de sustratos. Así, intervienen en procesos tan dispares como la migración y adhesión celular, muerte celular, regulación del ciclo celular o la diferenciación celular, procesos todos ellos que aparecen desregulados en el cáncer (Goll, Thompson and Li, 2003). En el trabajo que se presenta en esta tesis, hemos identificado por primera vez una nueva localización de la proteasa calpaína 2 en diversas líneas celulares: el nucleolo. La localización nucleolar de esta calpaína es un fenómeno muy particular que hasta el momento apenas se había visto para esta familia de proteasas. Los pocos antecedentes que se encuentran en la literatura están referidos a la única isoforma de calpaína presente en el parásito *Plasmodium falciparum* (Russo, Oksman and Goldberg, 2009), o a la calpaína 3 en líneas celulares de melanoma (Moretti *et al.*, 2009) y en el pez cebra, *Danio rerio* (Tao *et al.*, 2013).

Lakshmikuttyamma *et al* investigaron la participación de la calpaína 2 en CCR en un estudio con muestras de pacientes en el que se demostró unos mayores niveles de esta proteína y de su actividad proteasa en muestras de adenocarcinoma frente a los de la mucosa sana de los mismos pacientes (Lakshmikuttyamma *et al.*, 2004). Otros trabajos también señalan la sobreexpresión de la calpaína 2 como un factor negativo en el desarrollo tumoral (Chocry, Leloup and Kovacic, 2017; Marciel *et al.*, 2017).

No obstante, la mayoría de estudios se centran únicamente en la desregulación en la expresión de estas proteasas, pero no en los niveles de actividad enzimática o menos aún en los mecanismos moleculares implicados. Gran cantidad de estudios *in vitro* no tienen en cuenta la localización subcelular como un sistema clave en la regulación de la función de las calpaínas.

Se conoce una amplia participación de las calpaínas en cáncer, mayoritariamente de las calpaínas convencionales 1 y 2 (Leloup and Wells, 2011; Storr, Carragher, *et al.*, 2011; Moretti *et al.*, 2014; Ono, Saido and Sorimachi, 2016). Debido a tantas similitudes entre las calpaínas 1 y 2, en la mayor parte de estudios en la literatura no se alcanza a definir si existen funciones específicas de una isoforma o si son redundantes. No obstante, en las líneas celulares de CCR que constituyen nuestro modelo de trabajo, observamos que la calpaína 2, pero no la 1, cuenta con una clara agregación nucleolar, lo cual sugiere funciones no redundantes al menos en esta subestructura.

Se ha sugerido que la localización subcelular de las calpaínas podría ser un aspecto clave en los mecanismos de regulación de reconocimiento de sus sustratos, de manera que para funciones específicas de una isoforma, solo la calpaína involucrada tendría acceso a ciertas localizaciones subcelulares y por tanto a los sustratos en dichos compartimentos (Shao *et al.*, 2006; Leloup *et al.*, 2010; Arnandis *et al.*, 2012; Rodríguez-Fernández *et al.*, 2016).

### **1.2 Localización de los reguladores de la actividad calpaína: calpaína S1 y calpastatina**

Como ya se ha comentado, la actividad calpaína es una función compleja que engloba no solo la regulación de la proteasa por  $\text{Ca}^{2+}$  y otros factores, sino también la regulación de su inhibidor endógeno,

calpastatina, y de su subunidad reguladora, calpaína S1. Se podría especular con que la novedosa localización nucleolar de la calpaína 2 podría ir acompañada también con cambios en la localización de estas dos proteínas. En este sentido, se ha sugerido la importancia de la localización diferencial de la calpastatina o su disponibilidad como importante factor regulador. Efectivamente, nuestro estudio también sugiere una regulación por “localización/disponibilidad”, ya que es el primer registro conocido de que la calpastatina se acumula notablemente en el nucleolo.

Existen isoformas de la calpastatina con diferentes sitios de modificación postraducciona que repercuten en diferente localización subcelular y/o interacción con las calpaínas (Salamino *et al.*, 1997; Li and Goldberg, 2000; Averna *et al.*, 2001). Sin embargo, el mecanismo de regulación de la calpastatina sobre la actividad calpaína es un punto controvertido. La hipótesis más aceptada actualmente postula que la calpastatina actúa controlando la sobreactivación más que la actividad. No obstante, el incremento en los niveles de calcio intracelular que promueve la actividad calpaína también activa la formación (reversible) del complejo calpaína-calpastatina (Averna *et al.*, 2003). Por ello, debe haber algún sistema de control extra que permita la activación rápida y puntual de las calpaínas en la proximidad de la calpastatina (De Tullio *et al.*, 1999).

Se identificó la asociación de la calpastatina con la calpaína inactiva, lo cual sería un novedoso sistema de controlar el número de moléculas de calpaína potencialmente activables (Melloni *et al.*, 2006). Varios trabajos han postulado diferentes estrategias respecto a la localización de la calpastatina:

A. Se ha identificado la calpastatina en estructuras tipo granulares no membranosas como agregados, de manera que no están disponibles para inhibir las calpaínas.

- B. En el proceso temprano de activación, la calpastatina y la calpaína sufrirían una translocación a diferentes compartimentos, ocurriendo la interacción únicamente si la actividad calpaína persiste en el tiempo (De Tullio *et al.*, 1999). Únicamente en situaciones patológicas la calpastatina sería degradada por la calpaína (Campbell and Davies, 2012).
- C. Diferente sublocalización en los orgánulos donde se ha visto el sistema calpaína (Lane, Allan and Mellgren, 1992) como mitocondria, retículo endoplasmático o aparato de Golgi (Hood, Brooks and Roszman, 2006; Kar *et al.*, 2008).

De todos modos, respecto al análisis que realizamos hay varias posibilidades que deberían ser sujetas a futuros estudios: por un lado, la calpastatina podría estar “liberando” de las restricciones de su regulación a la calpaína citosólica, promoviendo así el programa protumoral de las células cancerosas. Por otra parte, se sugiere que el sistema calpaína/calpastatina podría funcionar en el nucleolo, con lo que la calpaína nucleolar podría ser regulada por su inhibidor. No obstante, en nuestro estudio no analizamos la interacción directa de ambas proteínas en el nucleolo, por lo que tampoco podríamos descartar que ambas estén en compartimentos diferentes de la ultraestructura nucleolar y por tanto no haya inhibición de la actividad calpaína.

Con respecto a la subunidad reguladora, en nuestro estudio encontramos que la calpaína S1 tiene una distribución únicamente citosólica y nuclear, por lo que no colocaliza con la calpaína 2 nucleolar. La subunidad reguladora calpaína S1 actúa controlando la actividad de las calpaínas convencionales, aunque no está claro los mecanismos implicados. En concreto, el histórico debate ha girado en torno a si la disociación de la subunidad reguladora sería el mecanismo de activación de las calpaínas. A pesar de haberse realizado estudios que apoyaban esta

afirmación, el escenario más aceptado actualmente es que este hecho no ocurre *in vivo* como forma de activación de estas proteasas. Ahora bien, la siguiente incógnita surgida sobre la función de la subunidad reguladora en el sistema calpaína es si se mantiene unida tras la activación de la subunidad catalítica. No está claro ya que algunos reportan que tras la activación ocurriría la autólisis intermolecular y posterior disociación de las subunidades (Nakagawa *et al.*, 2001), por lo que la autólisis y disociación serían el resultado de la activación y no la causa (J. S. Chou *et al.*, 2011). Otros análisis afirman que las subunidades mantienen la interacción (Gil-Parrado *et al.*, 2003). En este sentido, en nuestro análisis mediante WB el peso molecular aparente detectado con un anticuerpo frente al dominio V de la calpaína S1 sugiere que la subunidad reguladora no está siendo proteolizada. Nuestros resultados, en contraposición a las hipótesis establecidas por otros autores, sugerirían que, tras la activación de las calpaínas, las subunidades se disociarían, pero sin autólisis de, al menos, el dominio V. De todos modos, serían necesarios más estudios para confirmar la hipótesis de la autólisis y disociación de la calpaína S1, ya que el dominio V ha sido omitido en los estudios con calpaínas recombinantes por su elevada inestabilidad. Además, presenta una apariencia desordenada en la estructura cristalina (Campbell and Davies, 2012).

Por otra parte, en un estudio con diferentes formas truncadas de la subunidad catalítica de la calpaína 1, el dominio IV se vio indispensable para la interacción entre las subunidades. Lo más interesante fue que una de esas variantes que carecían de los dominios III y IV, además de no interactuar con la subunidad reguladora, se acumulaba en el núcleo y en el nucleolo (Gil-Parrado *et al.*, 2003). En este sentido, en el repositorio *refseq* de la base de datos del NCBI se encuentra la secuencia de una proteína reconocida como hipotética isoforma de la CAPN2 (NCBI

*Reference Sequence*: XP\_011542588.1) no confirmada experimentalmente hasta ahora. En la predicción de la secuencia codificante de dicha proteína están ausentes los dominios IV y la mitad del III de la calpaína 2. Posteriores experimentos serían necesarios para confirmar si la calpaína 2 nucleolar representaría una nueva isoforma de esta proteína de localización preferentemente nucleolar.

### **1.3 Localización de la calpaína 2 en otros modelos tumorales y no tumorales**

A pesar de la identificación inicial en células de CCR, nuestros resultados parecen sugerir que la localización nucleolar de la calpaína 2 tiene un papel más amplio en otros contextos celulares. Así lo observamos por el análisis de su distribución subcelular en una línea de cáncer de mama, comprobando que su presencia en el nucleolo es común a neoplasias con diferente base molecular y celular. Estos resultados parecerían sugerir que la calpaína 2 tendría una función reguladora del crecimiento celular/proliferación en células tumorales. Sin embargo, nuestros datos parecen indicar que el acumulo nucleolar de la calpaína 2 no está restringido únicamente a células tumorales con alta tasa de división desregulada. Así lo demuestra el análisis de la localización subcelular de la calpaína 2 en la línea normal de colon fetal CCD 841 CoN y su acumulación también en el nucleolo (además de en el resto de la célula). De hecho, podría tratarse de un sistema de regulación extendido a más tipos celulares y procesos biológicos. En este sentido, la regulación de la biogénesis ribosomal se ha visto implicada en otros procesos como la diferenciación celular (Chaillou, Kirby and Mccarthy, 2014; Hayashi *et al.*, 2014).

El aumento de la biogénesis ribosomal es imprescindible para la salida del estado de desdiferenciación de células madre embrionarias de *Drosophila melanogaster* (Sanchez *et al.*, 2016). Además, se conoce la

participación de las calpaínas en el desarrollo (proliferación y diferenciación) de diversos de linajes celulares (Shimada *et al.*, 2008; Shimada, 2013; Buffolo *et al.*, 2015). Es más, un estudio analizó la distribución de la calpaína 2 durante el desarrollo embrionario de ratones, observándose una interesante dependencia de su localización subcelular respecto al estado embrionario. Aunque los autores no estudian la colocalización de la calpaína 2 con un marcador nucleolar y ni siquiera lo mencionan, en las células madre embrionarias de este estudio se observa una fuerte acumulación de la calpaína 2 (Raynaud *et al.*, 2008) en estructuras que podrían ser nucleolos.

## **2. IMPORTANCIA DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR PARA LA FUNCIÓN DE LAS CALPAÍNAS. EXPRESIÓN VS LOCALIZACIÓN**

### **2.1 Actividad calpaína en el nucleolo**

Gracias en buena parte al desarrollo tecnológico, se ha visto que el nucleolo representa una estructura más dinámica (Olson and Dundr, 2005) y compleja (Pederson, 1998) que un simple lugar de síntesis ribosomal (Boisvert *et al.*, 2007). En él se llevan a cabo diversas funciones no relacionadas con la biogénesis ribosomal; hecho que ha puesto de manifiesto el último proteoma nucleolar realizado, capaz de identificar hasta 4500 proteínas, la mayoría de las cuales no guardaba relación con la biogénesis ribosomal (Yasmeen Ahmad, Francois-Michel Boisvert, Peter Gregor and Angus, 2008).

Nuestro modelo de estudio cuenta con un oncogén activado constitutivamente que presenta una “adicción” a una alta y constante tasa de biogénesis ribosomal (Tsai and Pederson, 2014). En fibroblastos de rata, la transformación con v<sup>12</sup>-Kras se ha demostrado que promueve la fuerte activación de la actividad calpaína (Carragher, Fonseca and Frame, 2004). Así, en el presente trabajo hemos demostrado que la calpaína 2

aparece como una fuerte agregación nucleolar en la línea celular de CCR DLD1. Entre otras funciones del nucleolo, la más novedosa es la que alude a su capacidad de retener diversas proteínas para impedir la interacción con sus efectores y por tanto así regular su función (Audas, Jacob and Lee, 2012b). Esta inmovilización parece depender de la formación de una gran estructura subnucleolar denominada centro de detención (DC). Por tanto, podría alegarse que las calpaínas son retenidas en el nucléolo para ser allí inactivadas. Sin embargo, nuestros experimentos parecen rechazar semejante hipótesis. Efectivamente, la actividad calpaína era susceptible de ser inducida o inhibida con EGF o calpeptin respectivamente. Estos datos demuestran que la calpaína presente en el nucléolo es una enzima funcional. No obstante, EGF y calpeptin podrían inducir e inhibir cualquier isoforma de calpaína, por lo que a pesar de haber detectado la presencia de la calpaína 2 en el nucleolo, no podríamos descartar que otras calpaínas tuvieran también actividad proteolítica nucleolar.

La presencia de una proteasa en un sitio que concentra tal cantidad de proteínas podría ser potencialmente perjudicial para multitud de funciones (Andersen *et al.*, 2005) hasta, como caso más extremo, comprometer la propia viabilidad celular. Por otra parte, la proteólisis de proteínas del ciclo celular, o de genes supresores de tumores (Stępiński, 2016) podría desregular el normal funcionamiento de las células (Drygin, Rice and Grummt, 2010) y promover el desarrollo tumoral. Por todo ello, resulta necesario comprender que función podría estar cumpliendo la calpaína 2 en el nucleolo.

### **2.2 Función de la calpaína en la biogénesis ribosomal**

El nucleolo actúa como punto de convergencia de vías de señalización que “informan” a la célula sobre factores del entorno como nutrientes,

factores de crecimiento, etc, que afectan al crecimiento y división celular. De este modo, el nucleolo percibe alteraciones del medio extracelular o de la propia célula que utiliza para tomar decisiones locales (parada de la biogénesis ribosomal y/o reorganización nucleolar) (Rubbi and Milner, 2003) o a nivel de toda la célula (parada del ciclo celular, muerte celular) (Boulon *et al.*, 2010). Por esto creemos que una proteasa podría provocar un desajuste en todo este sistema de “vigilancia nucleolar” que entre otros participantes depende en gran medida de p53, conocida diana de las calpaínas (Guan *et al.*, 2016).

Efectivamente, dentro de los diferentes tipos de reorganización nucleolar (Burger *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2013) obtenidos tras la inhibición de la biogénesis ribosomal, observamos que la calpaína 2 mantenía su asociación con componentes mayoritarios del nucleolo. En concreto, la calpaína 2 mantenía su colocalización con la fibrilarina, proteína de los componentes fibrilares densos (DFC) implicada en la transcripción y maduración del pre-rRNA. Se ha demostrado que tras la reorganización nucleolar que tiene lugar tras la inhibición de la RNA polimerasa I, los componentes de la maquinaria transcripcional, entre los que se encuentra la fibrilarina, permanecen unidos a esta (Shav-Tal *et al.*, 2005). En cambio observamos que otras proteínas como la nucleolina se translocaba hacia el nucleoplasma, donde se ha sugerido que pueda activar respuestas que contrarresten el daño celular (Kalousek, Otevrelva and Roselova, 2005).

El análisis de los niveles del transcrito primario tras el uso de calpeptin confirmó que la actividad calpaína tiene una función represora sobre los niveles del 47s pre-rRNA.

Vemos por tanto que la calpaína 2 podría tener un papel fundamental en la “vigilancia nucleolar” ya que el cambio en los niveles de 47s pre-rRNA es uno de los primeros pasos más frecuentes en los procesos de estrés nucleolar (Grummt and Voit, 2010). Los cambios en los niveles de

47s pre-rRNA bien podrían ser reflejo de modificación de su tasa de transcripción o de procesamiento. Un análisis mediante *ChIP* confirmó la presencia de la calpaína 2 en el promotor y en el espaciador intergénico del rDNA, sugiriendo así una función en la transcripción del rDNA.

La calpaína 2 podría tener una función importante en el promotor del rDNA, donde la presencia de un complejo de preiniciación es imprescindible para el comienzo de la transcripción. Igualmente, una multitud de proteínas son reclutadas para diversas modificaciones postraduccionales tanto a corto plazo como a nivel epigenético (Srivastava, Srivastava and Ahn, 2016), sobre el DNA o en situaciones de estrés (Tanaka *et al.*, 2015).

Se conoce desde hace mucho tiempo la participación de proteínas no ribosomales en el nucleolo para el proceso de biogénesis ribosomal. Por ejemplo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito más de 200 factores relacionados con la biogénesis ribosomal, entre los cuales se encuentran componentes de las snoRNP, enzimas modificadoras de rRNA, helicasas y endo- y exonucleasas (Kressler, Linder and de La Cruz, 1999). Es más, existe un amplio registro de proteínas cuya función y localización conocida no están en absoluto relacionadas con el nucleolo pero, en la mayoría de los casos de manera desconocida, afectan a la biogénesis ribosomal (Tafforeau *et al.*, 2013). Un estudio muy reciente identificó hasta 139 proteínas cuya falta de expresión generaba un cambio de fenotipo de 2-3 nucleolos a solo 1. Entre esas proteínas, solamente una cuarta parte eran nucleolares, lo cual revela una participación crítica de las proteínas no nucleolares en el proceso de biogénesis ribosomal (Farley-Barnes *et al.*, 2018). Es más, existen mínimos registros de proteasas en el nucleolo y por tanto poco se conocen aún sus posibles funciones sobre la biogénesis ribosomal (Yun *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015).

Finalmente, el espaciador intergénico no se transcribe para formar parte de los futuros ribosomas pero son RNA no codificante (ncRNA) con una interesante capacidad reguladora (Lafontaine, 2015). Los ncRNA modulan la expresión del rDNA mediante modificaciones epigenéticas en respuesta a estrés, falta de nutrientes o factores de crecimiento (Mayer *et al.*, 2006; Lakhotia, 2012). Esta regulación ocurre a través de interacciones de los ncRNA con proteínas reguladoras (Jacob *et al.*, 2012), otro proceso en el que la calpaína podría ejercer su control sobre la síntesis de rRNA (McStay and Grummt, 2008). En células MCF-7 en respuesta a choque térmico, se ha observado que la formación del DC depende de la expresión de un ncRNA generado del IGS, proceso que va acompañada de la redistribución de factores nucleolares y la detención de la biogénesis ribosomal (Jacob *et al.*, 2013).

### **2.3 Función de la calpaína 2 nucleolar como sensor de suero: síntesis de rRNA y relación con el estatus mutacional de KRAS**

La producción de ribosomas es uno de los principales procesos metabólicos de la célula, por lo que la función nucleolar está estrechamente unida al crecimiento celular y la proliferación. Bajo estas circunstancias, las células deben ejercer un estricto control sobre esta actividad de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento. En este sentido, las mutaciones como la de KRAS G13D confieren la ventaja selectiva de promover la proliferación independientemente de factores de crecimiento (Stolze *et al.*, 2015). Se conoce, entre otros mecanismos, la capacidad de las mutaciones de KRAS de regular el metabolismo de la glucosa, lo cual les otorga una ventaja de supervivencia frente a KRAS salvaje (Yun *et al.*, 2009).

Los resultados sugieren que la ausencia de factores de crecimiento del suero tiene una función clave regulando la biogénesis ribosomal a través

de la calpaína 2. En cuanto a nuestro sistema, nos planteamos si la calpaína 2 podría actuar, a través de KRAS, como sensor de las condiciones extracelulares para regular la biogénesis ribosomal. Nuestros datos indican que la calpaína 2 nucleolar tiene un papel represor de biogénesis ribosomal en las células tumorales de CCR. Además, sugieren que la regulación de este sistema es dependiente del estado mutacional de KRAS.

El análisis de la expresión génica, localización y ensayo de ChIP de la calpaína 2 en condiciones adversas de disponibilidad de suero mostró un comportamiento diferencial según el estado mutacional de KRAS. Únicamente en la línea DWT7 la ausencia de suero induce la expresión de la calpaína 2, su localización nucleolar y su unión al promotor del rDNA. Es más, estos niveles de calpaína 2 se relacionan de manera inversa con unos niveles mínimos de expresión del 47s pre-rRNA en comparación con las otras líneas celulares en respuesta a la depleción de suero. No obstante, ante la falta de especificidad del inhibidor utilizado en otros experimentos, se podría argumentar que otras isoformas de las calpaínas podrían contar con una función en la biogénesis ribosomal. Sin descartar la posibilidad de que otras calpaínas no analizadas pudieran participar en la biogénesis ribosomal, nuestros experimentos en células *knock-down* de la calpaína 2 definitivamente demuestran que esta última participa en la represión transcripcional de 47s pre-rRNA (Gómez-Vicente, Donovan and Cotter, 2005; Grummt and Voit, 2010; Tanaka *et al.*, 2010).

Mientras que las células DWT7 se mantienen sensibles para responder a la falta de suero, las células con KRAS mutado son independientes de las señales extracelulares y por tanto promoverían constantemente la biogénesis ribosomal. En este sentido, un estudio sobre senescencia también reconocía un mecanismo protector para las células mediante el control del crecimiento celular. En él se señalaba que la alteración de las

necesidades metabólicas tumorales es uno de los mecanismos que las células utilizan para contrarrestar la transformación promovida por oncogenes como KRAS (Li *et al.*, 2013). Además, es notorio el efecto del estado mutacional de KRAS ya que la sensibilidad a estímulo de la línea DWT7 le permite regular la biogénesis ribosomal. Esta capacidad del alelo KRAS salvaje ha sido señalada en diversos estudios en los que señalan un comportamiento como “supresor de tumores” (Zhang *et al.*, 2001; Spandidos *et al.*, 2002; Vartanian *et al.*, 2013; Zhou, Der and Cox, 2016). En cambio, la línea DMUT cuenta con autosuficiencia en cuanto al crecimiento celular, por lo que la biogénesis ribosomal no se ve afectada por la calpaína 2 en respuesta a la falta de suero.

### **2.4 Función de la calpaína 2 no nucleolar**

Los resultados indican que la calpaína 2 nucleolar tiene un papel regulador sobre la biogénesis ribosomal, disminuyendo los niveles de 47s pre-rRNA. En este sentido, a pesar de que las líneas DMUT y DWT7 presentan acumulación nucleolar de la calpaína 2, la línea DMUT parece contar con un sistema que intenta impedir esta localización ya que cuenta con un menor nivel de esta proteína (Min, Lee and Baek, 2016). Esta observación hace cuestionarse si el proceso tumoral promovido por KRAS G13D solo intenta mantener la calpaína 2 fuera del nucleolo o esta calpaína también cumple una función tumorigénica en el nucleoplasma.

Se ha mencionado a lo largo de este trabajo que se ha encontrado a las calpaínas en diferentes localizaciones subcelulares dependiendo del contexto celular y biológico. Entre todas ellas, la calpaína 1 proteoliza el extremo amino terminal de la histona H3 en el núcleo de células de glándula mamaria en involución (Arnandis *et al.*, 2014).

Nuestros datos indican una interacción directa entre la calpaína 2 y el extremo amino terminal de la histona H3 en el nucleoplasma de las células

DMUT. En estudios previos se ha podido demostrar la proteólisis de esta histona por parte de otra proteasa como la catepsina L (Duncan *et al.*, 2008; Adams-Cioaba *et al.*, 2011). Aunque la función de esta proteólisis de las colas de histonas no está del todo clara, se ha postulado que la proteólisis de la histona podría eliminar o generar marcas epigenéticas (Zhou *et al.*, 2014) o una estructura cromatínica más laxa que promueva la transcripción de genes tumorales (Azad and Tomar, 2014).

Muchas proteínas cuentan con más de una localización subcelular (Eilbracht *et al.*, 2004). Entre ellas, proteínas nucleolares mayoritarias como la nucleolina o nucleofosmina (Chen, Huang and Biology, 2001) oscilan continuamente entre nucleolo y nucleoplasma para cumplir diferentes funciones. Futuros experimentos serían necesarios para establecer los sistemas de transporte de la calpaína 2 entre los compartimentos y si cuenta con un transporte continuo o por contra tiene una cinética más estática (Chen, Huang and Biology, 2001). Dado que no cuenta con una secuencia de localización nucleolar (NoLS) establecida, es tentativo especular si podría dimerizar con otras proteínas que si la tienen para entrar al nucleolo (Emmott and Hiscox, 2009; Pederson and Tsai, 2009).

Cualquiera sea el mecanismo, la doble localización de la calpaína 2 remarca la importancia de la correcta localización de las proteínas como una función habitualmente desregulada en patologías como el cáncer (Gravina *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2014).

### 3. REGULACIÓN DE LA CALPAÍNA 2 NUCLEOLAR

#### 3.1 Dependencia de la actividad enzimática de la calpaína 2 para su localización nucleolar

Hemos observado que la actividad proteasa de la calpaína 2 cumple una función importante en la modulación de la biogénesis ribosomal. El hecho de tener un papel activo en la biogénesis ribosomal podría sugerir que la localización nucleolar de la calpaína 2 estaría condicionada a, al menos en parte, contar con una actividad proteasa completa. Nuestros resultados demuestran que, efectivamente el bloqueo de su actividad disminuye los niveles de la calpaína 2 en el nucleolo.

En experimentos *in vitro* se ha demostrado que una actividad calpaína elevada favorece el proceso de autólisis intermolecular y por tanto reduce notablemente la vida media de estas proteínas (Campbell and Davies, 2012). Sin embargo, el análisis de la distribución subcelular de la calpaína 2 permite corroborar, por el peso molecular aparente, que la calpaína 2 nucleolar corresponde a la forma completa de la proteína. Además, el tratamiento con la calpeptin debería inhibir un posible proceso de autólisis, lo cual provocaría la estabilización de los niveles de calpaína 2 nucleolar. En cambio, tras el uso de este inhibidor, los niveles de calpaína 2 nucleolar disminuyen, lo cual descartaría un proceso de autólisis. Por tanto, nuestros datos sugieren una dependencia, al menos parcial, de la actividad enzimática para la acumulación de la calpaína 2 nucleolar.

En este sentido, probablemente debido al amplio espectro de sustratos y funciones en los que se ha visto la participación de las calpaínas, se han descrito estímulos muy distintos que inciden en el movimiento/localización de las calpaínas en diversos compartimentos celulares. En el caso de la calpaína de *Plasmodium falciparum* una modificación por ácidos grasos regula su transporte hacia el nucleolo

(Russo, Oksman and Goldberg, 2009). Las especies reactivas de oxígeno promueven el transporte de la calpaína 1 hacia el núcleo para inducir apoptosis (Chang *et al.*, 2015).

Aunque pocos estudios han enfocado su interés en ver como la propia actividad calpaína repercute en la localización subcelular de estas proteínas, se ha observado que el aumento en los niveles de calcio intracelular induce el movimiento de la calpaína 2 del citosol hacia el núcleo (S. M. Chou *et al.*, 2011; Baek *et al.*, 2016) y de la calpaína 10 (Ma *et al.*, 2001).

### **3.2 Vías de señalización que intervienen en la localización nucleolar de la calpaína 2**

Como ya se ha comentado, la regulación de la actividad de las calpaínas se ve afectada por varios factores. Uno de estos procesos son las modificaciones postraduccionales que, según las últimas hipótesis, controlarían la actividad de una manera indirecta ya que regularían la localización de las calpaínas (Leloup *et al.*, 2010). Diversos estudios señalan la fosforilación y activación de la calpaína 2 tras la activación de la vía de señalización de RAS/RAF/MEK/ERK (Glading *et al.*, 2001; Leloup *et al.*, 2009). Además, las calpaínas también pueden verse reguladas por la señalización de la vía de PI3K/AKT/mTOR (Kumar *et al.*, 2013).

Las dos vías principales de activación por mitógenos también ejercen un estricto control sobre la actividad nucleolar. En condiciones de crecimiento y proliferación celular promueven notablemente la biogénesis ribosomal, así como inhiben el proceso ante diferentes tipos de estrés. Todo ello podría sugerir una posible influencia de estas vías de señalización sobre la calpaína 2 nucleolar. Con este objetivo, analizamos la distribución celular de la calpaína 2 tras la doble inhibición de las vías.

Este aspecto es importante ya que algunos estudios señalan que si coexisten mutaciones en ambas vías, se pierde la “adicción” a una de ellas y se activan dianas que integran los efectos de ambas señalizaciones (She *et al.*, 2010; De Luca *et al.*, 2012). Observamos un incremento en los niveles de calpaína 2 nucleolar tras la inhibición de ambas vías, lo que sugiere una dependencia parcial de la localización de esta proteína debido a la señalización de estas vías. El incremento en los niveles de calpaína 2 nucleolar tras la inhibición se vio además acompañado por una subida de la actividad proteolítica de la enzima.

Los resultados están en consonancia con diversos trabajos que remarcan la función de las vías de PI3K/AKT/mTOR (Byles *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2014) y RAS/RAF/MEK/ERK (Ikari *et al.*, 2010; Robitaille *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014) en dirigir la localización subcelular de diversas proteínas. Es más, diversas investigaciones han demostrado la necesidad de la señalización de estas vías para la localización nucleolar de proteínas (Gizak *et al.*, 2015) o la interacción directa de componentes de las vías con proteínas mayoritarias del nucleolo (Birchenall-Roberts *et al.*, 2006).

### **3.3 Efecto del estado mutacional de KRAS sobre la localización de la calpaína 2**

La modulación de la actividad calpaína nos genera resultados aparentemente contradictorios, ya que tanto el EGF como los inhibidores de las vías de señalización incrementan la actividad calpaína.

Ante la posibilidad de que podamos observar resultados de difícil interpretación debido a la presencia de un alelo salvaje y otro con la mutación G13D en heterocigosis, analizamos la distribución de la calpaína 2 en líneas celulares isogénicas DMUT y DWT7. Ambas mantienen la

mutación E545K para PI3K, pero solo cuentan con un alelo KRAS G13D (DMUT) o un alelo salvaje (DWT7).

En este estudio no encontramos que el alelo mutante presentara diferencias de expresión génica y niveles de proteína de calpaína 2 o de actividad proteolítica global entre ambas líneas celulares. Este último aspecto contrastaría con otro estudio donde se observó que la transformación de células con un alelo mutante del codón 12 incrementa la actividad calpaína global (Carragher, Fonseca and Frame, 2004). Además, otras investigaciones sí han observado cambios de expresión globales provocados por alelos mutantes de KRAS, teniendo inclusive cada mutación su propio “perfil tumoral” (Hammond *et al.*, 2015). Es más, estudios proteómicos realizados con la mutación G12V sugirieron la participación en múltiples procesos entre los cuales está la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  (Kim *et al.*, 2008) y en concreto, entre otras, sobre las calpaínas (Young *et al.*, 2005).

Es posible que las discrepancias entre estos datos y nuestros resultados se puedan explicar por la presencia en estos estudios de ambos alelos de KRAS, salvaje y mutado. Alternativamente, la presencia de la mutación de PI3K E545K en ambas líneas celulares, DMUT y DWT7, o las diferencias en los codones de KRAS mutados podrían también explicar las discrepancias con datos de otros autores.

En efecto, los antecedentes en la literatura han registrado que los alelos de KRAS tipo salvaje y sus diferentes mutaciones pueden tener un fenotipo oncogénico diferente. Se han encontrado diferencias en la sensibilidad de inhibidores de MEK, señalando a uno u otro alelo como el más sensible (Haagensen *et al.*, 2016; Burgess *et al.*, 2017).

También se ha argumentado que la señalización a través de la ruta de las MAPK no difiere tanto entre los alelos (niveles de fosforilación

similares) pero si en los efectores *downstream* (Vartanian *et al.*, 2013). Contrariamente, otro estudio obtiene resultados donde si cuentan con niveles de fosforilación diferentes en las MAPK (Haagensen *et al.*, 2016).

En cualquier caso, con independencia del efecto de las vías de señalización sobre la expresión y actividad de calpaína total, cuando analizamos las diferencias únicamente nucleolares si apreciamos mayor nivel de calpaína 2 nucleolar en DWT7 que en DMUT, lo cual también se reflejaba en una mayor actividad calpaína nucleolar. En este sentido, un estudio fue capaz de identificar la interesante capacidad del alelo de KRAS G13D de bloquear la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ , que puede ser un disparador de (actividad calpaína y) cascada de apoptosis (Pierro *et al.*, 2014).

Se ha visto que puede existir una preferencia de efectores entre los alelos mutantes de KRAS y el tipo salvaje que puede desencadenar diferentes consecuencias *downstream* (Ihle *et al.*, 2012). Como ejemplo, RAS mutante es capaz de afectar la localización subcelular de otras proteasas como la catepsina D (Démaz *et al.*, 1999) o en concreto la mutación G13D regula la localización de la catepsina B en células de cáncer colorrectal (Cavallo-Medved *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos sugieren que la señalización constitutiva de KRAS por la mutación G13D activa un mecanismo que previene parcialmente la localización nucleolar de la calpaína 2. Este hecho no impide una posible participación de la señalización por la vía de PI3K.

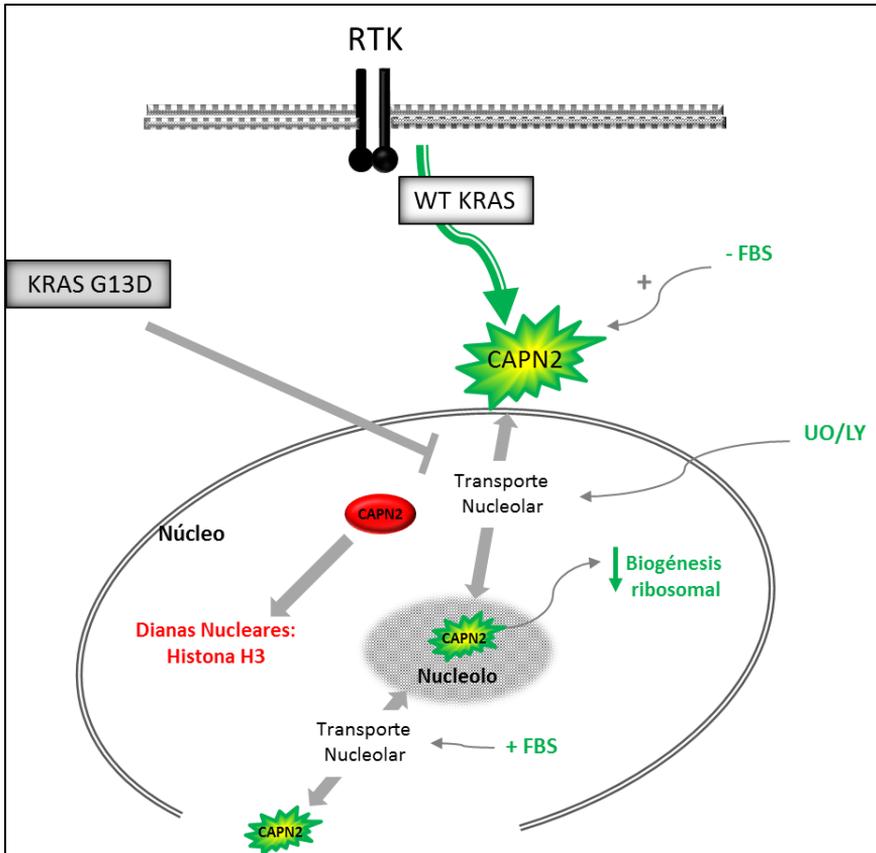
Las células tumorales pueden generar señales compensatorias por el entrecruzamiento en las vías de señalización que le permitan, por ejemplo, evadir los efectos de anti-tumorales (Aksamitiene, Kiyatkin and Kholodenko, 2012). Por otra parte, el uso de líneas celulares con un único alelo de KRAS podría permitir la identificación de una posible dependencia en exclusividad de alguna de las 2 vías desreguladas. Sin

embargo, la localización de la calpaína 2 tras inhibir ambas vías por separado en la línea DWT7 (la única que parece responder a estímulos) no demostró que la señalización de cada una de las vías por separado tuviera efecto sobre los niveles de calpaína 2 nucleolar.

Nuestros hallazgos están en consonancia con estudios previos en los cuales en diversas funciones celulares, el efecto generado por cada vía por separado no es el mismo que ambas conjuntamente (Kandil *et al.*, 2013; Ingesson-Carlsson and Nilsson, 2014; Yu *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016). Además, el fallo de ciertos inhibidores de quinasas en el tratamiento de pacientes ha realzado la importancia del entrecruzamiento de las vías como mecanismo de resistencia. La señalización cruzada puede ocurrir a diversos niveles y puede provocar que tras la inhibición de una vía, la señalización sobre los efectores pase a la otra vía (Dogan Turacli, Ozkan and Ekmekci, 2015).

La función de la calpaína 2 sobre la biogénesis ribosomal como sensor de la ausencia de suero por la señalización de las vías, podría sugerir que estímulos que activen las vías deberían promover su salida del nucleolo. Efectivamente, el resultado confirmó la sensibilidad del alelo KRAS tipo salvaje a la activación de las vías por de factores de crecimiento (Bentley *et al.*, 2013; Young, Lou and McCormick, 2013), ya que se observó un menor nivel de calpaína 2 nucleolar. Lo más interesante, esta disminución de calpaína 2 tras la activación de las vías parece sugerir un claro sistema de regulación de esta proteasa, únicamente sensible con la presencia del alelo KRAS salvaje.

4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL SISTEMA DE LA CALPAÍNA 2 NUCLEOLAR Y SU REGULACIÓN SEGÚN EL ESTADO MUTACIONAL DE KRAS



**Figura 32. Modelo de la regulación de la calpaína 2 nucleolar mediante KRAS.** En células con el alelo KRAS tipo salvaje (verde) la calpaína 2 se acumula en el nucleolo y actúa como sensor de procesos de estrés celular disminuyendo los niveles de biogénesis ribosomal. La ausencia de factores de crecimiento aumenta la expresión de la calpaína 2, mientras que la inhibición de las vías de las MAPK promueve la acumulación de la calpaína 2 en el nucleolo (aumenta la entrada o impide la salida). Finalmente, bajo abundancia de factores de crecimiento la biogénesis ribosomal puede proceder, con lo que se promueve la localización de la calpaína 2 en el nucleoplasma, ya sea por aumento de la salida desde el nucléolo o bloqueo de su entrada. La mutación KRAS G13D (rojo) previene la acumulación nucleolar de la calpaína 2, promoviendo su presencia en el nucleoplasma para actuar sobre otras dianas como la histona H3. Además, la activación constitutiva de este alelo mutante promueve la insensibilidad de la calpaína 2 a responder a estímulos como inhibición de las vías de las MAPK o ausencia de factores de crecimiento.



# **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

---

El presente proyecto de tesis ha sido capaz de elucidar una nueva localización subcelular de la calpaína 2 y su papel en la biogénesis ribosomal mediada por KRAS en células de cáncer colorrectal. En concreto, nuestras conclusiones han sido:

1. En células de cáncer colorrectal la CAPN2, y no la CAPN1, tiene una localización preferentemente nucleolar con independencia del estado mutacional de KRAS.
2. La calpaína 2 se localiza en el nucléolo de células con una activa proliferación celular independientemente del tipo celular o tipo de neoplasia.
3. El estado mutacional de KRAS afecta a los niveles de expresión, de localización y de actividad proteolítica de CAPN2 en líneas celulares de CCR.
4. La CAPN2 nucleolar, bajo el control de KRAS salvaje actúa como represor transcripcional de la biogénesis ribosomal en respuesta a condiciones limitantes de crecimiento celular.
5. En condiciones de crecimiento adversas, la presencia de KRAS G13D supone una ventaja selectiva al limitar la función de la calpaína 2 nucleolar como sensor de las señales de crecimiento del entorno.

## CONCLUSIONES

---

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Adams-Cioaba, M. A. *et al.* (2011) ‘Structural basis for the recognition and cleavage of histone H3 by cathepsin L.’, *Nature communications*. Nature Publishing Group, 2, p. 197. doi: 10.1038/ncomms1204.
- Affolter, A. *et al.* (2013) ‘Increased radioresistance via G12S K-Ras by compensatory upregulation of MAPK and PI3K pathways in epithelial cancer’, *Head and Neck*, 35(2), pp. 220–228. doi: 10.1002/hed.22954.
- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A. and Kholodenko, B. N. (2012) ‘Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance’, *Biochemical Society Transactions*, 40(1), pp. 139–146. doi: 10.1042/BST20110609.
- Andersen, J. S. *et al.* (2005) ‘Nucleolar proteome dynamics’, *Nature*, 433(7021), pp. 77–83. doi: 10.1038/nature03207.
- Andrews, W. J. *et al.* (2013) ‘Old drug, new target: Ellipticines selectively inhibit RNA polymerase I transcription’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), pp. 4567–4582. doi: 10.1074/jbc.M112.411611.
- Aoki, M. and Fujishita, T. (2017) ‘Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis’, in Hunter, E. and Bister, K. (eds) *Viruses, Genes, and Cancer*. Cham: Springer International Publishing, pp. 153–189. doi: 10.1007/82\_2017\_6.
- Arnandis, T. *et al.* (2012) ‘Calpains mediate epithelial-cell death during mammary gland involution: mitochondria and lysosomal destabilization’, *Cell Death and Differentiation*, 19(9), pp. 1536–1548. doi: 10.1038/cdd.2012.46.
- Arnandis, T. *et al.* (2014) ‘Differential functions of calpain 1 during epithelial cell death and adipocyte differentiation in mammary gland involution’, *Biochemical Journal*, 459(2), pp. 355–368. doi: 10.1042/BJ20130847.
- Audas, T. E., Jacob, M. D. and Lee, S. (2012a) ‘Immobilization of Proteins in the Nucleolus by Ribosomal Intergenic Spacer Noncoding RNA’, *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 45(2), pp. 147–157. doi: 10.1016/j.molcel.2011.12.012.
- Audas, T. E., Jacob, M. D. and Lee, S. (2012b) ‘The nucleolar detention pathway: A cellular strategy for regulating molecular networks’, *Cell Cycle*, 11(11), pp. 2059–2062. doi: 10.4161/cc.20140.

- Averna, M. *et al.* (2001) 'Changes in intracellular calpastatin localization are mediated by reversible phosphorylation.', *The Biochemical journal*, 354(Pt 1), pp. 25–30. doi: 10.1042/0264-6021:3540025.
- Averna, M. *et al.* (2003) 'Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: A new mechanism for the regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(12), pp. 2669–2678. doi: 10.1007/s00018-003-3288-0.
- Averna, M. *et al.* (2015) 'Interaction between calpain-1 and HSP90: New insights into the regulation of localization and activity of the protease', *PLoS ONE*, 10(1), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0116738.
- Ayrault, O. *et al.* (2004) 'Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes', *Oncogene*, 23(49), pp. 8097–8104. doi: 10.1038/sj.onc.1207968.
- Azad, G. K. and Tomar, R. S. (2014) 'Proteolytic clipping of histone tails: The emerging role of histone proteases in regulation of various biological processes', *Molecular Biology Reports*, 41(5), pp. 2717–2730. doi: 10.1007/s11033-014-3181-y.
- Baek, K. H. *et al.* (2016) 'Calcium influx-mediated translocation of m-calpain induces Ku80 cleavage and enhances the Ku80-related DNA repair pathway', *Oncotarget*, 7(21). doi: 10.18632/oncotarget.8791.
- Bai, D.-S. *et al.* (2009) 'Capn4 overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(2), pp. 460–470. doi: 10.1002/hep.22638.
- Baki, a *et al.* (1996) 'Autolysis parallels activation of mu-calpain.', *The Biochemical journal*, 318 ( Pt 3(February 2016), pp. 897–901. doi: 10.1042/bj3180897.
- Bardelli, A. (2015) *My Cancer Genome, PIK3CA in Colorectal Cancer*. Available at: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/pik3ca/> (Accessed: 4 January 2018).
- Baudry, M. and Bi, X. (2016) 'Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration', *Trends in Neurosciences*, pp. 235–245. doi: 10.1016/j.tins.2016.01.007.

- Del Bello, B. *et al.* (2007) 'Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: a major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status', *Oncogene*, 26(19), pp. 2717–2726. doi: 10.1038/sj.onc.1210079.
- Benetti, R. *et al.* (2005) 'The calpain system is involved in the constitutive regulation of  $\beta$ -catenin signaling functions', *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), pp. 22070–22080. doi: 10.1074/jbc.M501810200.
- Bentley, C. *et al.* (2013) 'A requirement for wild-type Ras isoforms in mutant KRas-driven signalling and transformation', *Biochemical Journal*, 452(2), pp. 313–320. doi: 10.1042/BJ20121578.
- Birchenall-Roberts, M. C. *et al.* (2006) 'K-Ras4B proteins are expressed in the nucleolus: Interaction with nucleolin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(2), pp. 540–549. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.094.
- Boisvert, F.-M. *et al.* (2007) 'The multifunctional nucleolus', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), pp. 574–585. doi: 10.1038/nrm2184.
- Boulon, S. *et al.* (2010) 'The Nucleolus under Stress', *Molecular Cell*, 40(2), pp. 216–227. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.024.
- Braun, C. (1999) 'Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type', *Int. J. Cancer*, 84, pp. 6–9. Available at: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990219\)84:1%3C6::AID-IJC2%3E3.0.CO%5Cn2-T](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990219)84:1%3C6::AID-IJC2%3E3.0.CO%5Cn2-T).
- Brown, N. and Crawford, C. (1993) 'Structural modifications associated with the change in Ca<sup>2+</sup> sensitivity on activation of m-calpain', *FEBS Letters*, 322(1), pp. 65–68. doi: 10.1016/0014-5793(93)81112-D.
- Buffolo, M. *et al.* (2015) 'A conserved role for calpains during myoblast fusion', *Genesis*, 53(7), pp. 417–430. doi: 10.1002/dvg.22870.
- Burger, K. *et al.* (2010) 'Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels', *Journal of Biological Chemistry*, 285(16), pp. 12416–12425. doi: 10.1074/jbc.M109.074211.

- Burgess, M. R. *et al.* (2017) ‘KRAS Allelic Imbalance Enhances Fitness and Modulates MAP Kinase Dependence in Cancer’, *Cell*. Elsevier, 168(5), p. 817–829.e15. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.020.
- Byles, V. *et al.* (2010) ‘Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells’, *International Journal of Biological Sciences*, 6(6), pp. 599–612. doi: 10.7150/ijbs.6.599.
- Bywater, M. J. *et al.* (2012) ‘Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53’, *Cancer Cell*, 22(1), pp. 51–65. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.019.
- Cai, J. J. *et al.* (2014) ‘Increased expression of Capn4 is associated with the malignancy of human glioma’, *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 20(6), pp. 521–527. doi: 10.1111/cns.12248.
- Cai, Y. *et al.* (2015) ‘C1q protein binds to the apoptotic nucleolus and causes C1 protease degradation of nucleolar proteins’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(37), pp. 22570–22580. doi: 10.1074/jbc.M115.670661.
- Campbell, R. L. and Davies, P. L. (2012) ‘Structure–function relationships in calpains’, *Biochemical Journal*, 447(3), pp. 335–351. doi: 10.1042/BJ20120921.
- Carracedo, A. *et al.* (2008) ‘Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer’, *Journal of Clinical Investigation*, 118(9), pp. 3065–3074. doi: 10.1172/JCI34739.
- Carragher, N. O. *et al.* (2002) ‘v-Src-Induced Modulation of the Calpain-Calpastatin Proteolytic System Regulates Transformation’, *Molecular and Cellular Biology*, 22(1), pp. 257–269. doi: 10.1128/MCB.22.1.257-269.2002.
- Carragher, N. O., Fonseca, B. D. and Frame, M. C. (2004) ‘Calpain Activity Is Generally Elevated during Transformation but Has Oncogene-Specific Biological Functions<sup>1</sup>’, *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 6(1), pp. 53–73. doi: 10.1016/S1476-5586(04)80053-8.
- Castellano, E. and Downward, J. (2011) ‘RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway’, *Genes & Cancer*, 2(3), pp. 261–274. doi: 10.1177/1947601911408079.

- Cavallo-Medved, D. *et al.* (2003) 'Mutant K-ras Regulates Cathepsin B Localization on the Surface of Human Colorectal Carcinoma Cells', *Neoplasia*, 5(6), pp. 507–519. doi: 10.1016/S1476-5586(03)80035-0.
- Chaillou, T., Kirby, T. J. and Mccarthy, J. J. (2014) 'Ribosome Biogenesis: Emerging Evidence for a Central Role in the Regulation of Skeletal Muscle Mass', *Journal of Cellular Physiology*, 229(11), pp. 1584–1594. doi: 10.1002/jcp.24604.
- Chan, D. *et al.* (2013) 'Oncogene GAEC1 regulates CAPN10 expression which predicts survival in esophageal squamous cell carcinoma', *World Journal of Gastroenterology*, 19(18), pp. 2772–2780. doi: 10.3748/wjg.v19.i18.2772.
- Chan, J. C. *et al.* (2011) 'AKT Promotes rRNA Synthesis and Cooperates with c-MYC to Stimulate Ribosome Biogenesis in Cancer', *Science Signaling*, 4(188), p. ra56 LP-ra56. Available at: <http://stke.sciencemag.org/content/4/188/ra56.abstract>.
- Chang, H. *et al.* (2015) 'ROS-Induced Nuclear Translocation of Calpain-2 Facilitates Cardiomyocyte Apoptosis in Tail-Suspended Rats', 2269(March), pp. 2258–2269. doi: 10.1002/jcb.25176.
- Chen, B. *et al.* (2013) 'Calpains are required for invasive and metastatic potentials of human hcc cells', *Cell Biology International*, 37(7), pp. 643–652. doi: 10.1002/cbin.10062.
- Chen, D. *et al.* (2014) 'Glioma cell proliferation controlled by ERK activity-dependent surface expression of PDGFRA', *PLoS ONE*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0087281.
- Chen, D., Huang, S. and Biology, M. (2001) 'Nucleolar Components Involved in Ribosome Biogenesis Cycle between the Nucleolus and Nucleoplasm in Interphase Cells', 153(1), pp. 169–176.
- Chen, Z., Knutson, E. and Kurosky, A. (2001) 'Degradation of p21 cip1 in Cells Productively Infected with Human Cytomegalovirus', *Society*, 75(8), pp. 3613–3625. doi: 10.1128/JVI.75.8.3613.
- Chocry, M., Leloup, L. and Kovacic, H. (2017) 'Reversion of resistance to oxaliplatin by inhibition of p38 MAPK in colorectal cancer cell lines: involvement of the calpain / Nox1 pathway', 8(61), pp. 103710–103730.

- Choi, Y. H. *et al.* (1997) 'Regulation of cyclin D1 by calpain protease', *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), pp. 28479–28484. doi: 10.1074/jbc.272.45.28479.
- Chou, J. S. *et al.* (2011) 'M-Calpain activation in vitro does not require autolysis or subunit dissociation', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier B.V., 1814(7), pp. 864–872. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.04.007.
- Chou, S. M. *et al.* (2011) 'Calcium-induced cleavage of DNA topoisomerase I involves the cytoplasmic-nuclear shuttling of calpain 2', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(16), pp. 2769–2784. doi: 10.1007/s00018-010-0591-4.
- Chua, B. T., Guo, K. and Li, P. (2000) 'Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases', *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), pp. 5131–5135. doi: 10.1074/jbc.275.7.5131.
- Comai, L. (2004) 'Mechanism of RNA polymerase I transcription', *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, pp. 123–155. doi: 10.1016/S0065-3233(04)67005-7.
- Conacci-Sorrell, M. *et al.* (2014) 'Stress-induced cleavage of Myc promotes cancer cell survival', *Genes and Development*, 28(7), pp. 689–707. doi: 10.1101/gad.231894.113.
- Cox, A. D. *et al.* (2014) 'Drugging the undruggable RAS: Mission Possible?', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 13(11), pp. 828–851. doi: 10.1038/nrd4389.
- Cuerrier, D., Moldoveanu, T. and Davies, P. L. (2005) 'Determination of peptide substrate specificity for  $\mu$ -calpain by a peptide library-based approach: The importance of primed side interactions', *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), pp. 40632–40641. doi: 10.1074/jbc.M506870200.
- Dear, N. *et al.* (1997) 'A New Subfamily of Vertebrate Calpains Lacking a Calmodulin-Like Domain: Implications for Calpain Regulation and Evolution', *Genomics*, 45(45), pp. 175–184. doi: 10.1006/geno.1997.4870.

- Delmas, C. *et al.* (2003) 'MAP kinase-dependent degradation of p27Kip1 by calpains in choroidal melanoma cells: Requirement of p27Kip1 nuclear export', *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), pp. 12443–12451. doi: 10.1074/jbc.M209523200.
- Démoz, M. *et al.* (1999) 'Transformation by oncogenic ras-p21 alters the processing and subcellular localization of the lysosomal protease cathepsin D', *Journal of Cellular Biochemistry*, 73(3), pp. 370–378. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19990601)73:3<370::AID-JCB8>3.0.CO;2-N.
- Diepenbroek, M. *et al.* (2014) 'Over expression of the calpain-specific inhibitor calpastatin reduces human alpha-Synuclein processing, aggregation and synaptic impairment in [A30P]αSyn transgenic mice', *Human Molecular Genetics*, 23(15), pp. 3975–3989. doi: 10.1093/hmg/ddu112.
- Dogan Turacli, I., Ozkan, A. C. and Ekmekci, A. (2015) 'The comparison between dual inhibition of mTOR with MAPK and PI3K signaling pathways in KRAS mutant NSCLC cell lines', *Tumor Biology*, 36(12), pp. 9339–9345. doi: 10.1007/s13277-015-3671-0.
- Donati, G., Montanaro, L. and Derenzini, M. (2012) 'Ribosome Biogenesis and Control of Cell Proliferation: p53 Is Not Alone', 72(16), pp. 1602–1608. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3992.
- Drygin, D. *et al.* (2009) 'Anticancer activity of CX-3543: A direct inhibitor of rRNA biogenesis', *Cancer Research*, 69(19), pp. 7653–7661. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1304.
- Drygin, D. *et al.* (2011) 'Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth', *Cancer Research*, 71(4), pp. 1418–1430. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1728.
- Drygin, D., Rice, W. G. and Grummt, I. (2010) 'The RNA Polymerase I Transcription Machinery: An Emerging Target for the Treatment of Cancer', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), pp. 131–156. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105844.
- Duncan, E. M. *et al.* (2008) 'Cathepsin L Proteolytically Processes Histone H3 During Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation', *Cell*, 135(2), pp. 284–294. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.055.Cathepsin.

- Dutt, P. *et al.* (1998) 'm-Calpain subunits remain associated in the presence of calcium', *FEBS Letters*, 436(3), pp. 367–371. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01167-3.
- duVerle, D. *et al.* (2010) 'CaMPDB: a resource for calpain and modulatory proteolysis.', *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics*, 22, pp. 202–13. doi: 10.1142/9781848165786\_0017.
- duVerle, D. A. *et al.* (2011) 'Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning', *PLoS ONE*, 6(5). doi: 10.1371/journal.pone.0019035.
- Eilbracht, J. *et al.* (2004) 'NO66, a highly conserved dual location protein in the nucleolus and in a special type of synchronously replicating chromatin.', *Molecular biology of the cell*, 15(4), pp. 1816–32. doi: 10.1091/mbc.E03-08-0623.
- Elce, J. S. *et al.* (1997) 'The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation', *Biochem. J*, 326, pp. 31–38. doi: 10.1042/BJ20020485.
- Emmott, E. and Hiscox, J. A. (2009) 'Nucleolar targeting: the hub of the matter', *EMBO reports*, 10(3), pp. 231–238. doi: 10.1038/embor.2009.14.
- Engelman, J. A. *et al.* (2008) 'Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers', *Nature Medicine*, 14(12), pp. 1351–1356. doi: 10.1038/nm.1890.
- Esteban, F. *et al.* (2008) 'CAPN10 alleles modify laryngeal cancer risk in the Spanish population', *European Journal of Surgical Oncology*, 34(1), pp. 94–99. doi: 10.1016/j.ejso.2007.02.004.
- Fan, D. G. *et al.* (2009) 'Silencing of calpain expression reduces the metastatic potential of human osteosarcoma cells', *Cell Biology International*. Elsevier Ltd, 33(12), pp. 1263–1267. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.08.014.
- Farley-Barnes, K. I. *et al.* (2018) 'Diverse Regulators of Human Ribosome Biogenesis Discovered by Changes in Nucleolar Number', *Cell Reports*. Elsevier Company., 22(7), pp. 1923–1934. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.056.

- Fenouille, N. *et al.* (2012) 'Calpain 2-dependent I $\kappa$ B $\alpha$  degradation mediates CPT-11 secondary resistance in colorectal cancer xenografts', *Journal of Pathology*, 227(1), pp. 118–129. doi: 10.1002/path.3034.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, B. F. (2013) *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]*. Available at: <http://globocan.iarc.fr> (Accessed: 4 September 2017).
- Forbes, S. A. *et al.* (2017) 'COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution', *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp. D777–D783. doi: 10.1093/nar/gkw1121.
- Frances, C. P. *et al.* (2007) 'Identification of a protective haplogenotype within CAPN10 gene influencing colorectal cancer susceptibility', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22(12), pp. 2298–2302. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.04843.x.
- Franco, S. J. (2005) 'Regulating cell migration: calpains make the cut', *Journal of Cell Science*, 118(17), pp. 3829–3838. doi: 10.1242/jcs.02562.
- Fumagalli, S. *et al.* (2009) 'Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translationdependent mechanism of p53 induction', *Nature Cell Biology*, 11(4), pp. 501–508. doi: 10.1038/ncb1858.
- Gafni, J. *et al.* (2009) 'Calpain-1 cleaves and activates caspase-7', *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), pp. 25441–25449. doi: 10.1074/jbc.M109.038174.
- García, M., Bondada, V. and Geddes, J. W. (2005) 'Mitochondrial localization of  $\mu$ -calpain', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(2), pp. 1241–1247. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.081.
- Gil-Parrado, S. *et al.* (2003) 'Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous  $\mu$ -calpain', *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), pp. 16336–16346. doi: 10.1074/jbc.M208657200.
- Gizak, A. *et al.* (2015) 'Insulin/IGF1-PI3K-dependent nucleolar localization of a glycolytic enzyme - phosphoglycerate mutase 2, is necessary for proper structure of nucleolus and RNA synthesis.', *Oncotarget*, 6(19), pp. 17237–17250. doi: 10.18632/oncotarget.4044.

- Glading, A. *et al.* (2001) 'Membrane Proximal ERK Signaling Is Required for M-calpain Activation Downstream of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), pp. 23341–23348. doi: 10.1074/jbc.M008847200.
- Glading, A. *et al.* (2004) 'Epidermal Growth Factor Activates m-Calpain ( Calpain II ), at Least in Part , by Epidermal Growth Factor Activates m-Calpain ( Calpain II ), at Least in Part , by Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Phosphorylation', *Molecular and cellular biology*, 24(6), pp. 2499–2512. doi: 10.1128/MCB.24.6.2499.
- Glading, A., Lauffenburger, D. A. and Wells, A. (2002) 'Cutting to the chase: Calpain proteases in cell motility', *Trends in Cell Biology*, 12(1), pp. 46–54. doi: 10.1016/S0962-8924(01)02179-1.
- Goll, D., Thompson, V. and Li, H. (2003) 'The calpain system', *Physiol. Rev.*, 1990(284), pp. 731–801.
- Golomb, L., Volarevic, S. and Oren, M. (2014) 'P53 and ribosome biogenesis stress: The essentials', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 588(16), pp. 2571–2579. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.014.
- Gómez-Vicente, V., Donovan, M. and Cotter, T. G. (2005) 'Multiple death pathways in retina-derived 661W cells following growth factor deprivation: Crosstalk between caspases and calpains', *Cell Death and Differentiation*, 12(7), pp. 796–804. doi: 10.1038/sj.cdd.4401621.
- Gravina, G. *et al.* (2014) 'Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer', *Journal of Hematology & Oncology*, 7(1), p. 85. doi: 10.1186/s13045-014-0085-1.
- Grummt, I. (2010) 'Wisely chosen paths - regulation of rRNA synthesis: Delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden', *FEBS Journal*, 277(22), pp. 4626–4639. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07892.x.
- Grummt, I. and Voit, R. (2010) 'Linking rDNA transcription to the cellular energy supply', 4101. doi: 10.4161/cc.9.2.10614.
- Guan, Y. *et al.* (2016) 'Phosphorylation of Def Regulates Nucleolar p53 Turnover and Cell Cycle Progression through Def Recruitment of Calpain3', *PLoS Biology*, 14(9), pp. 1–31. doi: 10.1371/journal.pbio.1002555.

- Guo, G. F. *et al.* (2011) 'Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis', *Medical Oncology*, 28(SUPPL. 1). doi: 10.1007/s12032-010-9696-8.
- Haagensen, E. J. *et al.* (2016) 'Pre-clinical use of isogenic cell lines and tumours in vitro and in vivo for predictive biomarker discovery; Impact of KRAS and PI3KCA mutation status on MEK inhibitor activity is model dependent', *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd, 56, pp. 69–76. doi: 10.1016/j.ejca.2015.12.012.
- Hamilton, G. *et al.* (2014) 'AKT regulates NPM dependent ARF localization and p53mut stability in tumors', *Oncotarget*, 5(15), pp. 6142–6167. doi: 10.18632/oncotarget.2178.
- Hammond, D. E. *et al.* (2015) 'Differential reprogramming of isogenic colorectal cancer cells by distinct activating KRAS mutations', *Journal of Proteome Research*, 14(3), pp. 1535–1546. doi: 10.1021/pr501191a.
- Hanna, R. A., Campbell, R. L. and Davies, P. L. (2008) 'Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin', *Nature*, 456(7220), pp. 409–412. doi: 10.1038/nature07451.
- Hannan, K. M. *et al.* (2003) 'mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF.', *Molecular and cellular biology*, 23(23), pp. 8862–77. doi: 10.1128/MCB.23.23.8862-8877.2003.
- Hata, S. *et al.* (2007) 'Stomach-specific calpain, nCL-2/calpain 8, is active without calpain regulatory subunit and oligomerizes through C2-like domains', *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), pp. 27847–27856. doi: 10.1074/jbc.M703168200.
- Hata, S. *et al.* (2010) 'Calpain 8/nCL-2 and Calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-Calpain, involved in gastric mucosal defense', *PLoS Genetics*, 6(7), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pgen.1001040.
- Hata, S. *et al.* (2016) 'A gastrointestinal calpain complex, G-calpain, is a heterodimer of CAPN8 and CAPN9 calpain isoforms, which play catalytic and regulatory roles, respectively', *Journal of Biological Chemistry*, 291(53), pp. 27313–27322. doi: 10.1074/jbc.M116.763912.
- Hayashi, Y. *et al.* (2014) 'Downregulation of rRNA transcription triggers cell differentiation', *PLoS ONE*, 9(5). doi: 10.1371/journal.pone.0098586.

- Hein, T. W. *et al.* (2015) 'VEGF receptor-2-linked PI3K/calpain/SIRT1 activation mediates retinal arteriolar dilations to VEGF and shear stress', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(9), pp. 5381–5389. doi: 10.1167/iovs15-16950.
- Heinemann, V. *et al.* (2013) 'Targeted therapy in metastatic colorectal cancer – An example of personalised medicine in action', *Cancer Treatment Reviews*, 39(6), pp. 592–601. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.12.011.
- Hernandez-Verdun, D. (2006) 'Nucleolus: From structure to dynamics', *Histochemistry and Cell Biology*, 125(1–2), pp. 127–137. doi: 10.1007/s00418-005-0046-4.
- Hill, R. *et al.* (2014) 'Targeting nucleocytoplasmic transport in cancer therapy.', *Oncotarget*, 5(1), pp. 11–28. doi: 10.18632/oncotarget.1457.
- Hiscox, J. A. (2007) 'RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 5, p. 119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1597>.
- Hood, J. L., Brooks, W. H. and Roszman, T. L. (2006) 'Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: An organelle transient', *BioEssays*, 28(8), pp. 850–859. doi: 10.1002/bies.20440.
- Hoppe, S. *et al.* (2009) 'AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), pp. 17781–17786. doi: 10.1073/pnas.0909873106.
- Hosfield, C. M. *et al.* (1999) 'Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation.', *The EMBO journal*, 18(24), pp. 6880–6889. doi: 10.1093/emboj/18.24.6880.
- Hübener, J. *et al.* (2013) 'Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)', *Human Molecular Genetics*, 22(3), pp. 508–518. doi: 10.1093/hmg/dd5449.
- Ihle, N. T. *et al.* (2012) 'Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: Implications for signaling and clinical outcome', *Journal of the National Cancer Institute*, 104(3), pp. 228–239. doi: 10.1093/jnci/djr523.

- Ikari, A. *et al.* (2010) 'Extracellular Mg<sup>2+</sup> regulates the tight junctional localization of claudin-16 mediated by ERK-dependent phosphorylation', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1798(3), pp. 415–421. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.11.005.
- Ingeson-Carlsson, C. and Nilsson, M. (2014) 'Dual contribution of MAPK and PI3K in epidermal growth factor-induced destabilization of thyroid follicular integrity and invasion of cells into extracellular matrix', *Experimental Cell Research*. Elsevier, 326(2), pp. 210–218. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.006.
- Jacob, M. D. *et al.* (2012) 'Where no RNA polymerase has gone before', *Nucleus*, 3(4), pp. 315–319. doi: 10.4161/nucl.20585.
- Jacob, M. D. *et al.* (2013) 'Environmental cues induce a long noncoding RNA-dependent remodeling of the nucleolus', *Molecular Biology of the Cell*, 24(18), pp. 2943–2953. doi: 10.1091/mbc.E13-04-0223.
- Jánossy, J. *et al.* (2004) 'Calpain as a multi-site regulator of cell cycle', *Biochemical Pharmacology*, 67(8), pp. 1513–1521. doi: 10.1016/j.bcp.2003.12.021.
- Jiang, Z. B. *et al.* (2016) 'Combined use of PI3K and MEK inhibitors synergistically inhibits lung cancer with EGFR and KRAS mutations', *Oncology Reports*, 36(1), pp. 365–375. doi: 10.3892/or.2016.4770.
- Kalousek, I., Otevrelova, P. and Roselova, P. (2005) 'Expression and translocation of major nucleolar proteins in relation to the transcriptional activity of the nucleolus', *Journal of Applied Biomedicine*, 3(4), pp. 175–186. Available at: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-32044433311&partnerID=40&rel=R8.2.0>.
- Kandil, E. *et al.* (2013) 'Synergistic inhibition of thyroid cancer by suppressing MAPK/PI3K/AKT pathways', *Journal of Surgical Research*. Elsevier Ltd, 184(2), pp. 898–906. doi: 10.1016/j.jss.2013.03.052.
- Kang, S., Bader, A. G. and Vogt, P. K. (2005) 'Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), pp. 802–807. doi: 10.1073/pnas.0408864102.

Kar, P. *et al.* (2008) ‘Submitochondrial localization of associated  $\gamma$ -calpain and calpastatin’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 470(2), pp. 176–186. doi: 10.1016/j.abb.2007.11.018.

Kim, S. *et al.* (2008) ‘A proteomic approach for protein-profiling the oncogenic ras induced transformation (H-, K-, and N-Ras) in NIH/3T3 mouse embryonic fibroblasts’, *Proteomics*, 8(15), pp. 3082–3093. doi: 10.1002/pmic.200800106.

Kimura, Y. *et al.* (1998) ‘The involvement of calpain-independent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas’, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 4, p. 915. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm0898-915>.

Kitagaki, H. *et al.* (2000) ‘Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain.’, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(4), pp. 689–95. doi: 10.1271/bbb.64.689.

Kosenko, E., Poghosyan, A. and Kaminsky, Y. (2011) ‘Subcellular compartmentalization of proteolytic enzymes in brain regions and the effects of chronic  $\beta$ -amyloid treatment’, *Brain Research*. Elsevier B.V., 1369, pp. 184–193. doi: 10.1016/j.brainres.2010.10.078.

Kovacs, L. *et al.* (2016) ‘Activation of calpain-2 by mediators in pulmonary vascular remodeling of pulmonary arterial hypertension’, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(3), pp. 384–393. doi: 10.1165/rcmb.2015-0151OC.

Kressler, D., Linder, P. and de La Cruz, J. (1999) ‘Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Molecular and cellular biology*, 19(12), pp. 7897–7912. doi: 10.1128/MCB.19.12.7897.

Kulkarni, S. *et al.* (2010) ‘Calpain regulates sensitivity to trastuzumab and survival in HER2-positive breast cancer.’, *Oncogene*. Nature Publishing Group, 29(9), pp. 1339–50. doi: 10.1038/onc.2009.422.

Kumar, S. *et al.* (2013) ‘Estrogen receptor  $\beta$  ligand therapy activates PI3K/Akt/mTOR signaling in oligodendrocytes and promotes remyelination in a mouse model of multiple sclerosis’, *Neurobiology of Disease*, 56, pp. 131–144. doi: 10.1016/j.nbd.2013.04.005.

- Kupriyanova, N. and Ryskov, A. (2016) 'Management of rRNA Transcription Activity in a Human Genome', *Biochemistry & Molecular Biology Journal*, 02(01), pp. 10–13. doi: 10.21767/2471-8084.100013.
- Lafontaine, D. L. J. (2015) 'Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function.', *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), pp. 11–19. doi: 10.1038/nsmb.2939.
- Lakhotia, S. C. (2012) 'Long non-coding RNAs coordinate cellular responses to stress', *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(6), pp. 779–796. doi: 10.1002/wrna.1135.
- Lakshmikuttyamma, A. *et al.* (2004) 'Overexpression of m -Calpain in Human Colorectal Adenocarcinomas Overexpression of m -Calpain in Human Colorectal Adenocarcinomas', 13(October), pp. 1604–1609.
- Lam, Y. W. and Trinkle-Mulcahy, L. (2015) 'New insights into nucleolar structure and function', *F1000Prime Reports*, 7(April). doi: 10.12703/P7-48.
- Lane, R. D., Allan, D. M. and Mellgren, R. L. (1992) 'A comparison of the intracellular distribution of  $\mu$ -calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells', *Experimental Cell Research*, 203(1), pp. 5–16. doi: 10.1016/0014-4827(92)90033-5.
- Laurent-Puig, P. *et al.* (2009) 'Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 27(35), pp. 5924–5930. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6796.
- Lee, H. J. *et al.* (1999) 'Characterization of a human digestive tract-specific calpain, nCL-4, expressed in the baculovirus system.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 362(1), pp. 22–31. doi: 10.1006/abbi.1998.1021.
- Lee, J. T. and Gu, W. (2010) 'The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination', *Cell Death and Differentiation*, 17(1), pp. 86–92. doi: 10.1038/cdd.2009.77.
- Lee, S. J. *et al.* (2007) 'Increased expression of calpain 6 in uterine sarcomas and carcinosarcomas: An immunohistochemical analysis', *International Journal of Gynecological Cancer*, 17(1), pp. 248–253. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00756.x.

- Lee, S. J. *et al.* (2008) 'Increased expression of calpain 6 during the progression of uterine cervical neoplasia: Immunohistochemical analysis', *Oncology Reports*, 19(4), pp. 859–863.
- Leloup, L. *et al.* (2009) 'Involvement of the ERK / MAP kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration', 39(2007), pp. 1177–1189. doi: 10.1016/j.biocel.2007.03.003.
- Leloup, L. *et al.* (2010) 'M-calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate', *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), pp. 33549–33566. doi: 10.1074/jbc.M110.123604.
- Leloup, L. and Wells, A. (2011) 'Calpains as potential anti-cancer targets', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(3), pp. 309–323. doi: 10.1517/14728222.2011.553611.
- Li, C. *et al.* (2010) 'Proteasome inhibitor PS-341 (Bortezomib) induces calpain-dependent I??B?? degradation', *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), pp. 16096–16104. doi: 10.1074/jbc.M109.072694.
- Li, M. *et al.* (2013) 'Oncogene-induced cellular senescence elicits an anti-Warburg effect', *Proteomics*, 13(17), pp. 2585–2596. doi: 10.1002/pmic.201200298.
- Li, S. and Goldberg, E. (2000) 'A novel N-terminal domain directs membrane localization of mouse testis-specific calpastatin.', *Biology of reproduction*, 63(6), pp. 1594–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090425>.
- Li, X. *et al.* (2009) 'Over-expression of calpastatin inhibits calpain activation and attenuates myocardial dysfunction during endotoxaemia', *Cardiovascular Research*, 83(1), pp. 72–79. doi: 10.1093/cvr/cvp100.
- Liang, Y. M. *et al.* (2012) 'Novel nucleolar isolation method reveals rapid response of human nucleolar proteomes to serum stimulation', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 77, pp. 521–530. doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.031.
- Libertini, S. J. *et al.* (2007) 'Evidence for calpain-mediated androgen receptor cleavage as a mechanism for androgen independence', *Cancer Research*, 67(19), pp. 9001–9005. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1072.

- Liu, K., Li, M. and Cohen, S. N. (2000) 'Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), pp. 31093–31098. doi: 10.1074/jbc.M005451200.
- Liu, L., Xing, D. and Chen, W. R. (2009) 'Micro-Calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis', *International Journal of Cancer*, 125(12), pp. 2757–2766. doi: 10.1002/ijc.24626.
- Liu, Y. *et al.* (2011) 'The PI3K-Akt pathway regulates calpain 6 expression, proliferation, and apoptosis', *Cellular Signalling*. Elsevier B.V., 23(5), pp. 827–836. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.01.005.
- Liu, Y., Liang, S. and Tartakoff, a M. (1996) 'Heat shock disassembles the nucleolus and inhibits nuclear protein import and poly(A)+ RNA export.', *The EMBO journal*, 15(23), pp. 6750–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Liu, Z. *et al.* (2011) 'GPS-CCD: A novel computational program for the prediction of calpain cleavage sites', *PLoS ONE*, 6(4). doi: 10.1371/journal.pone.0019001.
- Llanos, S. *et al.* (2001) 'Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 3, p. 445. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35074506>.
- Lubisch, W. *et al.* (2003) 'Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: Discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability', *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), pp. 2404–2412. doi: 10.1021/jm0210717.
- De Luca, A. *et al.* (2012) 'The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(sup2), pp. S17–S27. doi: 10.1517/14728222.2011.639361.
- Ma, H. *et al.* (2001) 'Characterization and Expression of Calpain 10: A novel ubiquitous calpain with nuclear localization', *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), pp. 28525–28531. doi: 10.1074/jbc.M100603200.

- Ma, W. *et al.* (2011) 'Calpain mediates pulmonary vascular remodeling in rodent models of pulmonary hypertension, and its inhibition attenuates pathologic features of disease', *Journal of Clinical Investigation*, 121(11), pp. 4548–4566. doi: 10.1172/JCI57734.
- Mahajan, V. B. *et al.* (2012) 'Calpain-5 Mutations Cause Autoimmune Uveitis, Retinal Neovascularization, and Photoreceptor Degeneration', *PLoS Genetics*, 8(10), pp. 2–10. doi: 10.1371/journal.pgen.1003001.
- Marciel, M. P. *et al.* (2017) 'Calpain-2 inhibitor treatment preferentially reduces tumor progression for human colon cancer cells expressing highest levels of this enzyme', *Cancer Medicine*. doi: 10.1002/cam4.1260.
- Marion, A. *et al.* (2012) 'Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma', *International Journal of Cancer*, 130(11), pp. 2514–2525. doi: 10.1002/ijc.26246.
- Mayer, C. *et al.* (2004) 'mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability', *Genes and Development*, 18(4), pp. 423–434. doi: 10.1101/gad.285504.
- Mayer, C. *et al.* (2006) 'Intergenic Transcripts Regulate the Epigenetic State of rRNA Genes', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 22(3), pp. 351–361. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.028.
- Mayer, C., Bierhoff, H. and Grummt, I. (2005) 'The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis', *Genes and Development*, 19(8), pp. 933–941. doi: 10.1101/gad.333205.
- McStay, B. and Grummt, I. (2008) 'The Epigenetics of rRNA Genes: From Molecular to Chromosome Biology', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24(1), pp. 131–157. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259.
- Mekhail, K. *et al.* (2006) 'Restriction of rRNA synthesis by VHL maintains energy equilibrium under hypoxia', *Cell Cycle*, 5(20), pp. 2401–2413. doi: 10.4161/cc.5.20.3387.
- Melloni, E. *et al.* (2006) 'Association of calpastatin with inactive calpain: A novel mechanism to control the activation of the protease?', *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), pp. 24945–24954. doi: 10.1074/jbc.M601449200.

- Michel, P. *et al.* (2010) 'Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer', pp. 1765–1772. doi: 10.1038/sj.bjc.6606008.
- Min, K. W., Lee, S. H. and Baek, S. J. (2016) 'Moonlighting proteins in cancer', *Cancer Letters*, pp. 108–116. doi: 10.1016/j.canlet.2015.09.022.
- Miyazaki, T., Honda, K. and Ohata, H. (2007) 'Requirement of Ca<sup>2+</sup> influx- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated m-calpain activity for shear stress-induced endothelial cell polarity.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 293(4), pp. C1216–C1225. doi: 10.1152/ajpcell.00083.2007.
- Moldoveanu, T. *et al.* (2002) 'A Ca<sup>2+</sup> Switch Aligns the Active Site of Calpain', *Cell*, 108, pp. 649–660. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00659-1.
- Moll, U. M. and Petrenko, O. (2003) 'The MDM2-p53 Interaction', 1(December), pp. 1001–1008.
- Moreno-Luna, R. *et al.* (2011) 'Calpain 10 gene and laryngeal cancer: A survival analysis', *Head and Neck*, 33(1), pp. 72–76. doi: 10.1002/hed.21404.
- Moretti, D. *et al.* (2009) 'Novel variants of muscle calpain 3 identified in human melanoma cells: Cisplatin-induced changes in vitro and differential expression in melanocytic lesions', *Carcinogenesis*, 30(6), pp. 960–967. doi: 10.1093/carcin/bgp098.
- Moretti, D. *et al.* (2014) 'Calpains and cancer: Friends or enemies?', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Elsevier Inc., 564, pp. 26–36. doi: 10.1016/j.abb.2014.09.018.
- Nakagawa, K. *et al.* (2001) 'Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation', *Journal of Biochemistry*, 130(5), pp. 605–611. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003025.
- Nakagawa, T. and Yuan, J. (2000) 'Cross-Talk between Two Cysteine Protease Families', *The Journal of cell biology*, 150(4), pp. 887–894. doi: 10.1083/jcb.150.4.887.

- Nanduri, J. *et al.* (2009) 'Intermittent hypoxia degrades HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), pp. 1199–204. doi: 10.1073/pnas.0811018106.
- Niapour, M., Yu, Y. and Berger, S. A. (2008) 'Regulation of calpain activity by c-Myc through calpastatin and promotion of transformation in c-Myc-negative cells by calpastatin suppression', *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), pp. 21371–21381. doi: 10.1074/jbc.M801462200.
- Di Nicolantonio, F. *et al.* (2008) 'Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 26(35), pp. 5705–5712. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0786.
- Nuzzi, P. A., Senetar, M. A. and Huttenlocher, A. (2007) 'Asymmetric Localization of Calpain 2 during Neutrophil Chemotaxis', *Molecular Biology of the Cell*, 18(3), pp. 795–805. doi: 10.1091/mbc.E06-09-0876.
- Ojima, K. *et al.* (2014) 'Muscle-specific calpain-3 is phosphorylated in its unique insertion region for enrichment in a myofibril fraction', *Genes to Cells*, 19(11), pp. 830–841. doi: 10.1111/gtc.12181.
- Olson, M. O. J. and Dunder, M. (2005) 'The moving parts of the nucleolus', *Histochemistry and Cell Biology*, 123(3), pp. 203–216. doi: 10.1007/s00418-005-0754-9.
- Ono, Y. *et al.* (2010) 'Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na<sup>+</sup>-dependent protease', *Journal of Biological Chemistry*, 285(30), pp. 22986–22998. doi: 10.1074/jbc.M110.126946.
- Ono, Y. *et al.* (2016) 'An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3', *Biochimie*. Elsevier B.V, 122, pp. 169–187. doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.010.
- Ono, Y., Saido, T. C. and Sorimachi, H. (2016) 'Calpain research for drug discovery: challenges and potential', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 15(12), pp. 854–876. doi: 10.1038/nrd.2016.212.

- Orrenius, S., Gogvadze, V. and Zhivotovsky, B. (2015) 'Calcium and mitochondria in the regulation of cell death', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 460(1), pp. 72–81. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.137.
- Pal, G. P., Elce, J. S. and Jia, Z. (2001) 'Dissociation and Aggregation of Calpain in the Presence of Calcium', *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp. 47233–47238. doi: 10.1074/jbc.M105149200.
- Panse, S. L. *et al.* (1999) '3-D organization of ribosomal transcription units after DRB inhibition of RNA polymerase II transcription.', *Journal of cell science*, 112 ( Pt 1, pp. 2145–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362544>.
- Parr, T. *et al.* (2001) 'Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 395(1), pp. 1–13. doi: 10.1006/abbi.2001.2546.
- Partha, S. K. *et al.* (2014) 'Crystal structure of calpain-3 penta-EF-hand (PEF) domain - A homodimerized PEF family member with calcium bound at the fifth EF-hand', *FEBS Journal*, 281(14), pp. 3138–3149. doi: 10.1111/febs.12849.
- Pederson, T. (1998) 'The plurifunctional nucleolus.', *Nucleic acids research*, 26(17), pp. 3871–3876. doi: 10.1093/nar/26.17.3871.
- Pederson, T. and Tsai, R. Y. L. (2009) 'In search of nonribosomal nucleolar protein function and regulation', *Journal of Cell Biology*, 184(6), pp. 771–776. doi: 10.1083/jcb.200812014.
- Peltonen, K. *et al.* (2014) 'A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity', *Cancer Cell*, pp. 77–90. doi: 10.1016/j.ccr.2013.12.009.
- Pierro, C. *et al.* (2014) 'Oncogenic K-Ras suppresses IP3-dependent Ca<sup>2+</sup> release through remodelling of the isoform composition of IP3Rs and ER luminal Ca<sup>2+</sup> levels in colorectal cancer cell lines', *Journal of Cell Science*, 127(7), pp. 1607–1619. doi: 10.1242/jcs.141408.
- Popov, A. *et al.* (2013) 'Duration of the first steps of the human rRNA processing.', *Nucleus (Austin, Tex.)*, 4(2), pp. 134–41. doi: 10.4161/nucl.23985.

- Porta, C., Paglino, C. and Mosca, A. (2014) 'Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer', *Frontiers in Oncology*, 4(April), pp. 1–11. doi: 10.3389/fonc.2014.00064.
- Prangsaengtong, O. *et al.* (2012) 'Calpain 1 and -2 play opposite roles in cord formation of lymphatic endothelial cells via eNOS regulation', *Human Cell*, 25(2), pp. 36–44. doi: 10.1007/s13577-012-0042-7.
- Prior, I. a., Lewis, P. D. and Mattos, C. (2012) 'A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer', *Cancer Research*, 72(10), pp. 2457–2467. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.
- Rajalingam, K. *et al.* (2007) 'Ras oncogenes and their downstream targets', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), pp. 1177–1195. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.01.012.
- Rao, R. V., Ellerby, H. M. and Bredesen, D. E. (2004) 'Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program', *Cell Death and Differentiation*, 11(4), pp. 372–380. doi: 10.1038/sj.cdd.4401378.
- Raška, I., Shaw, P. J. and Cmarko, D. (2006) 'New Insights into Nucleolar Architecture and Activity', *International Review of Cytology*, 255(06), pp. 177–235. doi: 10.1016/S0074-7696(06)55004-1.
- Ravulapalli, R. *et al.* (2009) 'Distinguishing between calpain heterodimerization and homodimerization', *FEBS Journal*, 276(4), pp. 973–982. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06833.x.
- Raynaud, F. *et al.* (2008) 'Calpain 2 expression pattern and sub-cellular localization during mouse embryogenesis', *The International Journal of Developmental Biology*, 52(4), pp. 383–388. doi: 10.1387/ijdb.072448fr.
- Renshaw, J. *et al.* (2013) 'Dual blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) pathways synergistically inhibits rhabdomyosarcoma cell growth in vitro and in vivo', *Clinical Cancer Research*, 19(21), pp. 5940–5951. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0850.
- Rho, S. B. *et al.* (2008) 'Calpain 6 supports tumorigenesis by inhibiting apoptosis and facilitating angiogenesis', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 271(2), pp. 306–313. doi: 10.1016/j.canlet.2008.06.020.

- Richard, I. *et al.* (1995) 'Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A', *Cell*, 81(1), pp. 27–40. doi: 10.1016/0092-8674(95)90368-2.
- Rios-Doria, J. *et al.* (2004) 'Cleavage of beta-catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells.', *Cancer research*, 64(20), pp. 7237–40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1048.
- Robitaille, H. *et al.* (2010) 'The small heat-shock protein Hsp27 undergoes ERK-dependent phosphorylation and redistribution to the cytoskeleton in response to dual leucine zipper-bearing kinase expression', *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS, 130(1), pp. 74–85. doi: 10.1038/jid.2009.185.
- Rodríguez-Fernández, L. *et al.* (2016) 'Isoform-specific function of calpains in cell-adhesion disruption: Studies in Post-lactational mammary gland and breast cancer.', *The Biochemical journal*, pp. 2893–2909. doi: 10.1042/BCJ20160198.
- De Roock, W. *et al.* (2010) 'Association of KRAS p . G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab', *Journal of the American Medical Association*, 304(16), pp. 1812–1820. doi: 10.1001/jama.2010.1535.
- Rubbi, C. P. and Milner, J. (2003) 'Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses', *EMBO Journal*, 22(22), pp. 6068–6077. doi: 10.1093/emboj/cdg579.
- Ruffini, F. *et al.* (2013) 'Platelet-derived growth factor C and calpain-3 are modulators of human melanoma cell invasiveness', *Oncol.Rep.*, p. 10. doi: 10.3892/or.2013.2791.
- Russo, A. and Russo, G. (2017) 'Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress', (Figure 1), pp. 1–16. doi: 10.3390/ijms18010140.
- Russo, I., Oksman, A. and Goldberg, D. E. (2009) 'Fatty acid acylation regulates trafficking of the unusual Plasmodium falciparum calpain to the nucleolus', *Molecular Microbiology*, 72(1), pp. 229–245. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06639.x.

- Sakai, K. *et al.* (1987) 'A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis', *Journal of Biochemistry*, 101(4), pp. 911–918. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a121959.
- Salamino, F. *et al.* (1997) 'Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 412(3), pp. 433–438. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00819-3.
- Sanchez, C. G. *et al.* (2016) 'Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 18(2), pp. 276–290. doi: 10.1016/j.stem.2015.11.004.
- Sasaki, T. *et al.* (1984) 'Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates', *Journal of Biological Chemistry*, 259(20), pp. 12489–12494.
- Schneider, M. R. and Wolf, E. (2008) 'The Epidermal Growth Factor Receptor Ligands at a Glance', pp. 460–466. doi: 10.1002/jcp.21635.
- Schoch, K. M. *et al.* (2012) 'Calpastatin overexpression limits calpain-mediated proteolysis and behavioral deficits following traumatic brain injury', *Experimental Neurology*, 236(2), pp. 371–382. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.04.022.
- Shao, H. *et al.* (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(14), pp. 5481–5496. doi: 10.1128/MCB.02243-05.
- Shav-Tal, Y. *et al.* (2005) 'Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition.', *Molecular biology of the cell*, 16(5), pp. 2395–2413. doi: 10.1091/mbc.E04.
- Shaw, R. J. and Cantley, L. C. (2006) 'Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth', *Nature*, 441(7092), pp. 424–430. doi: 10.1038/nature04869.
- She, Q. B. *et al.* (2010) '4E-BP1 Is a Key Effector of the Oncogenic Activation of the AKT and ERK Signaling Pathways that Integrates Their Function in Tumors', *Cancer Cell*. Elsevier Ltd, 18(1), pp. 39–51. doi: 10.1016/j.ccr.2010.05.023.

Shimada, M. *et al.* (2008) 'In vivo targeted deletion of calpain small subunit, Capn4, in cells of the osteoblast lineage impairs cell proliferation, differentiation, and bone formation', *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), pp. 21002–21010. doi: 10.1074/jbc.M710354200.

Shimada, M. (2013) 'Overview of Calpain-Mediated Regulation of Bone and Fat Mass in Osteoblasts', *Cell Biochemistry and Biophysics*, 66(1), pp. 23–28. doi: 10.1007/s12013-012-9393-7.

Shinkai-Ouchi, F. *et al.* (2016) 'Predictions of Cleavability of Calpain Proteolysis by Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Using Newly Determined Cleavage Sites and Catalytic Efficiencies of an Oligopeptide Array', *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(4), pp. 1262–1280. doi: 10.1074/mcp.M115.053413.

Shiraha, H. *et al.* (1999) 'IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity', *Journal of Cell Biology*, 146(1), pp. 243–253. doi: 10.1083/jcb.146.1.243.

Shiraha, H. *et al.* (2002) 'Activation of m-Calpain (Calpain II) by Epidermal Growth Factor Is Limited by Protein Kinase A Phosphorylation of Activation of m-Calpain (Calpain II) by Epidermal Growth Factor Is Limited by Protein Kinase A Phosphorylation of m-Calpain', *Molecular and cellular biology*, 22(8), pp. 2716–2727. doi: 10.1128/MCB.22.8.2716.

Siena, S. *et al.* (2009) 'Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer', *Journal of the National Cancer Institute*, 101(19), pp. 1308–1324. doi: 10.1093/jnci/djp280.

Singh, R. *et al.* (2014) 'Calpain 5 Is Highly Expressed in the central nervous system (CNS), carries dual nuclear localization signals, and is associated with nuclear promyelocytic leukemia protein bodies', *Journal of Biological Chemistry*, 289(28), pp. 19383–19394. doi: 10.1074/jbc.M114.575159.

Sirri, V., Hernandez-Verdun, D. and Roussel, P. (2002) 'Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus', *Journal of Cell Biology*, 156(6), pp. 969–981. doi: 10.1083/jcb.200201024.

- Skubitz, K. M. and Skubitz, A. P. N. (2003) 'Differential gene expression in uterine leiomyoma', *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 141(5), pp. 297–308. doi: 10.1016/S0022-2143(03)00007-6.
- Sleiman, P. M. A. *et al.* (2014) 'GWAS identifies four novel eosinophilic esophagitis loci', *Nature Communications*, 5. doi: 10.1038/ncomms6593.
- Small, G. W. *et al.* (2002) 'Evidence for involvement of calpain in c-Myc proteolysis in vivo', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 400(2), pp. 151–161. doi: 10.1016/S0003-9861(02)00005-X.
- Smith, M. A. and Schnellmann, R. G. (2012) 'Calpains, mitochondria, and apoptosis', *Cardiovascular Research*, 96(1), pp. 32–37. doi: 10.1093/cvr/cvs163.
- Song, S. *et al.* (2016) 'Decreased expression of CAPN9 predicts poor prognosis in patients with gastric cancer', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7, p. 39858. doi: 10.1038/srep39858.
- Sorimachi, H., Hata, S. and Ono, Y. (2011) 'Impact of genetic insights into calpain biology', *Journal of Biochemistry*, 150(1), pp. 23–37. doi: 10.1093/jb/mvr070.
- Sorimachi, H., Ishiura, S. and Suzuki, K. (1993) 'A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca<sup>2+</sup>-binding domain', *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), pp. 19476–19482.
- Sos, M. L. *et al.* (2009) 'Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43), pp. 18351–18356. doi: 10.1073/pnas.0907325106.
- Spandidos, D. A. *et al.* (2002) 'Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review).', *International journal of oncology*, pp. 237–241.
- Spencer, M. J. and Mellgren, R. L. (2002) 'Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology.', *Human molecular genetics*, 11(21), pp. 2645–2655. doi: 10.1093/hmg/11.21.2645.
- Squier, M. K. T. *et al.* (1994) 'Calpain activation in apoptosis', *Journal of Cellular Physiology*, 159(2), pp. 229–237. doi: 10.1002/jcp.1041590206.

- Srivastava, R., Srivastava, R. and Ahn, S. H. (2016) 'The Epigenetic Pathways to Ribosomal DNA Silencing', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), pp. 545–563. doi: 10.1128/MMBR.00005-16.
- Stabach, P. R. *et al.* (1997) 'Site-directed mutagenesis of  $\beta$ -II spectrin at codon 1175 modulates its  $\beta$ -calpain susceptibility', *Biochemistry*, 36(1), pp. 57–65. doi: 10.1021/bi962034i.
- Stefanovsky, V. Y. *et al.* (2001) 'An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF', *Molecular Cell*, 8(5), pp. 1063–1073. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00384-7.
- Stępiński, D. (2016) 'Nucleolus-derived mediators in oncogenic stress response and activation of p53-dependent pathways', *Histochemistry and Cell Biology*, 146(2), pp. 119–139. doi: 10.1007/s00418-016-1443-6.
- Stolze, B. *et al.* (2015) 'Comparative analysis of KRAS codon 12, 13, 18, 61, and 117 mutations using human MCF10A isogenic cell lines', *Scientific Reports*, 5(1), p. 8535. doi: 10.1038/srep08535.
- Storr, S. J., Mohammed, R. a a, *et al.* (2011) 'Calpastatin is associated with lymphovascular invasion in breast cancer', *Breast*. Elsevier Ltd, 20(5), pp. 413–418. doi: 10.1016/j.breast.2011.04.002.
- Storr, S. J., Carragher, N. O., *et al.* (2011) 'The calpain system and cancer', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 11(5), pp. 364–374. doi: 10.1038/nrc3050.
- Storr, S. J. *et al.* (2012) 'Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer', *Annals of Oncology*, 23(9), pp. 2289–2296. doi: 10.1093/annonc/mds176.
- Storr, S. J. *et al.* (2013) 'Expression of the calpain system is associated with poor clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinomas', *Journal of Gastroenterology*, 48(11), pp. 1213–1221. doi: 10.1007/s00535-012-0743-4.
- Strobl, S. *et al.* (2000) 'The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), pp. 588–592. doi: 10.1073/pnas.97.2.588.

- Su, H. *et al.* (2013) 'Identification of novel markers that demarcate the nucleolus during severe stress and chemotherapeutic treatment', *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0080237.
- Su, Y. *et al.* (2004) 'Cigarette smoke extract inhibits angiogenesis of pulmonary artery endothelial cells: the role of calpain', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(4), pp. L794-800. doi: 10.1152/ajplung.00079.2004 [pii].
- Su, Y. *et al.* (2006) 'Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis.', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(9), pp. 1443-51. doi: 10.1096/fj.05-5354com.
- Subramanian, V. *et al.* (2013) 'Calpain-2 Compensation Promotes Angiotensin II- Induced Ascending and Abdominal Aortic Aneurysms in Calpain-1 Deficient Mice', 8(8), pp. 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0072214.
- Sun, X.-X. *et al.* (2015) 'The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201411713. doi: 10.1073/pnas.1411713112.
- Suo, S. *et al.* (1999) 'Association and dissociation of the calcium-binding domains of calpain by Ca<sup>2+</sup>', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), pp. 63-66. doi: 10.1006/bbrc.1999.0407.
- Tafforeau, L. *et al.* (2013) 'The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of pre-rRNA processing factors', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 51(4), pp. 539-551. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.011.
- Tajrishi, M. M., Tuteja, R. and Tuteja, N. (2011) 'Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus', *Communicative and Integrative Biology*, 4(3), pp. 267-275. doi: 10.4161/cib.4.3.14884.
- Takano, J. *et al.* (2000) 'Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues', *Journal of Biochemistry*, 128(1), pp. 83-92. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022733.

- Takano, J. *et al.* (2005) 'Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: Evidence from calpastatin mutant mice', *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), pp. 16175–16184. doi: 10.1074/jbc.M414552200.
- Tan, J. and Yu, Q. (2013) 'Molecular mechanisms of tumor resistance to PI3K-mTOR-targeted therapy', *Chinese Journal of Cancer*, 32(7), pp. 376–379. doi: 10.5732/cjc.012.10287.
- Tanaka, Y. *et al.* (2010) 'JmjC enzyme KDM2A is a regulator of rRNA transcription in response to starvation', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 29(9), pp. 1510–1522. doi: 10.1038/emboj.2010.56.
- Tanaka, Y. *et al.* (2015) 'Mild Glucose Starvation Induces KDM2A-Mediated H3K36me2 Demethylation through AMPK To Reduce rRNA Transcription and Cell Proliferation', *Molecular and Cellular Biology*, 35(24), pp. 4170–4184. doi: 10.1128/MCB.00579-15.
- Tao, T. *et al.* (2013) 'Def defines a conserved nucleolar pathway that leads p53 to proteasome-independent degradation', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 23(5), pp. 620–634. doi: 10.1038/cr.2013.16.
- Temraz, S., Mukherji, D. and Shamseddine, A. (2015) 'Dual inhibition of MEK and PI3K pathway in KRAS and BRAF mutated colorectal cancers', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), pp. 22976–22988. doi: 10.3390/ijms160922976.
- Tompa, P. *et al.* (2001) 'Domain III of Calpain Is a Ca<sup>2+</sup>-Regulated Phospholipid-Binding Domain', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(5), pp. 1333–1339. doi: 10.1006/bbrc.2001.4279.
- Tompa, P. *et al.* (2004) 'On the sequential determinants of calpain cleavage', *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), pp. 20775–20785. doi: 10.1074/jbc.M313873200.
- Torres, L. *et al.* (2009) 'In vivo GSH depletion induces c-myc expression by modulation of chromatin protein complexes', *Free Radical Biology and Medicine*, 46(11), pp. 1534–1542. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.005.

- Toulany, M. *et al.* (2006) 'Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair', *Clinical Cancer Research*, 12(13), pp. 4119–4126. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2454.
- Toulany, M. *et al.* (2016) 'Dual targeting of PI3K and MEK enhances the radiation response of K-RAS mutated non-small cell lung cancer.', *Oncotarget*, 7(28), pp. 43746–43761. doi: 10.18632/oncotarget.9670.
- Trumbeckaite, S. *et al.* (2003) 'Calpain inhibitor (BSF 409425) diminishes ischemia/reperfusion-induced damage of rabbit heart mitochondria', *Biochemical Pharmacology*, 65(5), pp. 911–916. doi: 10.1016/S0006-2952(02)01610-6.
- Tsai, R. Y. L. and Pederson, T. (2014) 'Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease', *FASEB Journal*, 28(8), pp. 3290–3296. doi: 10.1096/fj.14-254680.
- De Tullio, R. *et al.* (1999) 'Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation', *Biochem. J*, 343, pp. 467–472. doi: 10.1042/0264-6021:3430467.
- Vartanian, S. *et al.* (2013) 'Identification of mutant K-Ras-dependent phenotypes using a panel of isogenic cell lines', *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), pp. 2403–2413. doi: 10.1074/jbc.M112.394130.
- Voit, R., Schäfer, K. and Grummt, I. (1997) 'Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein', *Mol Cell Biol*, 17(8), pp. 4230–4237. doi: 10.1128/MCB.17.8.4230.
- Wang, K. K. *et al.* (1996) 'An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), pp. 6687–92. doi: 10.1073/pnas.93.13.6687.
- Watt, F. and Molloy, P. L. (1993) 'Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain', *Nucleic Acids Research*, 21(22), pp. 5092–5100. doi: 10.1093/nar/21.22.5092.
- Weber, J. D. *et al.* (1999) 'Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53', *Nature Cell Biology*. Macmillan Magazines Ltd., 1, p. 20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/8991>.

- Weber, J. J. *et al.* (2018) ‘Calpastatin ablation aggravates the molecular phenotype in cell and animal models of Huntington disease’, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 133, pp. 94–106. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.01.022.
- Wee, S. *et al.* (2009) ‘PI3K pathway activation mediates resistance to MEK inhibitors in KRAS mutant cancers’, *Cancer Research*, 69(10), pp. 4286–4293. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4765.
- Weeraratna, A. T. *et al.* (2004) ‘Generation and analysis of melanoma SAGE libraries: SAGE advice on the melanoma transcriptome.’, *Oncogene*, 23(12), pp. 2264–74. doi: 10.1038/sj.onc.1207337.
- Woo, M. G. *et al.* (2012) ‘Calpain-mediated processing of p53-associated parkin-like cytoplasmic protein (PARC) affects chemosensitivity of human ovarian cancer cells by promoting p53 subcellular trafficking’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), pp. 3963–3975. doi: 10.1074/jbc.M111.314765.
- Wu, W. K. K. *et al.* (2013) ‘Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis’, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 86(3), pp. 251–277. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.11.009.
- Xu, L. and Deng, X. (2006) ‘Protein kinase C $\alpha$  promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of  $\mu$ - and m-calpains’, *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), pp. 4457–4466. doi: 10.1074/jbc.M510721200.
- Yasmeen Ahmad, Francois-Michel Boisvert, Peter Gregor, A. C. and Angus, and L. (2009) ‘NOPdb Nucleolar Proteome Database—2008 update.pdf’.
- Yoshizawa, T. *et al.* (1995) ‘A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity’, *FEBS Letters*, 358(1), pp. 101–103. doi: 10.1016/0014-5793(94)01401-L.
- Young, A., Lou, D. and McCormick, F. (2013) ‘Oncogenic and wild-type Ras play divergent roles in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling.’, *Cancer discovery*, 3(1), pp. 112–123. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0231.

- Young, T. *et al.* (2005) 'Proteomics analysis of H-RAS-mediated oncogenic transformation in a genetically defined human ovarian cancer model', *Oncogene*, 24(40), pp. 6174–6184. doi: 10.1038/sj.onc.1208753.
- Yu, H. *et al.* (2015) 'ERK1/2 and AKT are vital factors in regulation of the migration of rat Schwann cells', *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(4), pp. 427–432. doi: 10.1292/jvms.14-0555.
- Yun, C. *et al.* (2008) 'Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases', *Journal of Cell Biology*, 183(4), pp. 589–595. doi: 10.1083/jcb.200807185.
- Yun, J. *et al.* (2009) 'Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells', *Science*, 325(5947), pp. 1555–1559. doi: 10.1126/science.1174229.
- Zadran, S. *et al.* (2010) 'Brain-Derived Neurotrophic Factor and Epidermal Growth Factor Activate Neuronal m-Calpain via Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Phosphorylation', *Journal of Neuroscience*, 30(3), pp. 1086–1095. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5120-09.2010.
- Zenonos, K. and Kyprianou, K. (2013) 'RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer.', *World journal of gastrointestinal oncology*, 5(5), pp. 97–101. doi: 10.4251/wjgo.v5.i5.97.
- Zhang, C., Comai, L. and Johnson, D. L. (2005) 'PTEN Represses RNA Polymerase I Transcription by Disrupting the SL1 Complex PTEN Represses RNA Polymerase I Transcription by Disrupting the SL1 Complex †', 25(16), pp. 6899–6911. doi: 10.1128/MCB.25.16.6899.
- Zhang, Y. and Lu, H. (2009) 'Signaling to p53: ribosomal proteins find their way', 16(5), pp. 369–377. doi: 10.1016/j.ccr.2009.09.024.Signaling.
- Zhang, Z. *et al.* (2001) 'Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice', *Nature Genetics*, 29(1), pp. 25–33. doi: 10.1038/ng721.
- Zhao, J. *et al.* (2003) 'ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth', *Molecular Cell*, 11(2), pp. 405–413. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00036-4.

- Zheng, P. C. *et al.* (2014) 'Capn4 is a marker of poor clinical outcomes and promotes nasopharyngeal carcinoma metastasis via nuclear factor- $\kappa$ B-induced matrix metalloproteinase 2 expression', *Cancer Science*, 105(6), pp. 630–638. doi: 10.1111/cas.12416.
- Zheng, X. *et al.* (2014) 'Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), pp. 2560–2565. doi: 10.1073/pnas.1320815111.
- Zhou, B., Der, C. J. and Cox, A. D. (2016) 'The role of wild type RAS isoforms in cancer', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, pp. 60–69. doi: 10.1016/j.semcd.2016.07.012.
- Zhou, J. *et al.* (2006) 'Calpain mediates a von Hippel-Lindau protein-independent destruction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ .' *Molecular biology of the cell*, 17(4), pp. 1549–58. doi: 10.1091/mbc.E05-08-0770.
- Zhou, P. *et al.* (2014) 'Histone cleavage as a mechanism for epigenetic regulation: current insights and perspectives.' *Current molecular medicine*, 14(9), pp. 1164–72. doi: 10.2174/1566524014666141015155630.
- Zhou, Y. *et al.* (2009) 'Reversible acetylation of the chromatin remodelling complex NoRC is required for non-coding RNA-dependent silencing', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 11(8), pp. 1010–1016. doi: 10.1038/ncb1914.
- Zhuang, Q. *et al.* (2014) 'Capn4 mRNA level is correlated with tumour progression and clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma', *The Journal of international medical research*, 42(2), pp. 282–291. doi: 10.1177/0300060513505524; 10.1177/0300060513505524.
- Zimmerman, U. J. P. and Schlaepfer, W. W. (1991) 'Two-stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I', *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1078(2), pp. 192–198. doi: 10.1016/0167-4838(91)99009-H.

## BIBLIOGRAFÍA

---

