





**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA**



**LA CALPAÍNA-2 EN EL NÚCLEO  
DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA:  
DE LA IDENTIFICACIÓN DE DIANAS NUCLEARES  
A LA FUNCIÓN**

**TESIS DOCTORAL**

**PRESENTADA POR:**

Sonia Company Hernández

**DIRIGIDA POR:**

Dra. Elena Ruiz García-Trevijano  
Dra. Rosa Zaragoza Colom

**VALENCIA,  
FEBRERO 2022**





**INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS**

**Director (es) / Codirector (es):**

1.- Apellidos y nombre: Ruiz García-Trevijano, Elena, N.I.F. 25124592J, Departamento/Instituto: Bioquímica y Biología Molecular, Centro: Facultad de Medicina. Universitat de València

2.- Apellidos y nombre: Zaragoza Colom, Rosa, N.I.F. 45633817T, Departamento/Instituto: Anatomía y Embriología Humana, Centro: Facultad de Medicina. Universitat de València

Directores/as de la tesis doctoral: **“La calpaína-2 en el núcleo de células de cáncer de mama: De la identificación de dianas nucleares a la función.”**

de D/Dña. Sonia Company Hernández,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: Valencia, 10 de febrero de 2022

Fdo.:

Fdo.:

Director/a

Director/a

**ESCUELA DOCTORAL  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

La presente tesis doctoral ha sido subvencionada por la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana (GVPROMETEO2018-167).

# AGRADECIMIENTOS

No te das cuenta de lo duro, pero a la vez gratificante, que es una tesis doctoral hasta que la haces. Me habían hablado de los contratiempos que van surgiendo, de pensar las 24 horas del día en ella, de los momentos difíciles que sin duda me tocaría vivir. Desde luego, ha sido una etapa realmente intensa, incrementando hasta el límite esa sensación, la pandemia que nos está tocando sufrir. Pero todo esfuerzo tiene su recompensa. Llevo soñando con este día mucho tiempo; el día en el que escribo estas palabras. Estoy muy feliz por haber cumplido un reto más en mi vida.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Juan Viña por confiar en mí y ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación. A mis directoras de tesis, la Dra. Elena Ruiz y la Dra. Rosa Zaragoza por guiarme a través de este duro a la par que emocionante camino. Gracias por vuestros consejos y por fomentar mi desarrollo profesional. Gracias a Concha por orientarme en el laboratorio durante los primeros meses de mi estancia.

Sin duda, esta tesis no habría sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres. Gracias por creer en mí y por estar ahí siempre, en los momentos malos y en los buenos. Gracias por vuestro cariño y por la educación que me habéis dado. No podéis ser mejor, os quiero. Gracias a toda mi familia, a mis abuelas, que tanto habéis hecho por mí; a mis tíos por vuestros ánimos y a mis primos, que los considero mis hermanos. Por supuesto no me olvido de mis chiquitines, que, aunque estén lejos, los quiero con locura. Familia sois geniales. ¡Esto va por vosotros!

A todos mis amigos, que tanto habéis aguantado. En especial, gracias por vuestra paciencia Marta, Richard, Eva, José, África y Luis. Gracias por sacarme una sonrisa en mis peores momentos. Marta, mi hermana, gracias por darme fuerza con tan solo una mirada y por animarme cuando más lo necesito. Richard, gracias

por escucharme, por los buenos momentos, las risas y, simplemente por estar ahí siempre. Mi grupo de escape, de la locura a la corrección, nos complementamos a la perfección. No sabéis lo importante que sois todos para mí. Me alegro de teneros cerca.

A Carmen Picher, mi Carmen. No sé qué hubiera hecho sin ti. Todo lo que te tengo que decir, ya lo sabes. Nunca olvidaré los primeros meses juntas. Fue muy duro, íbamos muy perdidas, pero eso consiguió unirnos aún más y sacar esto a flote. Esas comidas, meriendas, las cervecitas e incluso conciertos. Sin duda, en lo personal, lo mejor que me llevo de este periodo, es tu amistad.

A mis compis y amigas Rocío y Ana. Rocío la súper mami que puede con todo y más. Gracias por tus consejos, por transmitirme paz y por tu sonrisa, siempre de oreja a oreja. Ana, gracias por traer al laboratorio esa alegría y frescura. Eres un encanto de persona. Conseguirás todo lo que te propongas. ¡Os veo fuera chicas!

A Bea, Zahara y Toni. Gracias por estar dispuestos a ayudar en cualquier momento. Gracias por las risas en los pasillos y por hacer más ameno mi paso por el departamento. Carmen, campeona, gracias por alegrarme todas las mañanas. Tienes el don de hacer feliz a las personas que te rodean.

Ich möchte meinen Kollegen in München danken. Vielen Dank für euer Ausbildung und euer Beitrag zu meiner Entwicklung. Vielen Dank, dass euch mir geholfen hast, persönlich und beruflich zu wachsen. Es war eine schöne Etappe in meinem Leben. Ich werde sie nie vergessen. An meine Freunde und Familie, die mir so sehr geholfen haben. Zum Schluss danke an meine Omi und Andrea. Ich hatte das Glück, euch kennenzulernen und werde euch immer mitnehmen.

*En algún lugar algo increíble  
está esperando ser descubierto*

**Carl Sagan**



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>1. GENERALIDADES DE LAS CALPAÍNAS</b>	<b>23</b>
1.1 ESTRUCTURA DE LAS CALPAÍNAS CONVENCIONALES	24
1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS	27
1.3 REGULACIÓN DE LAS CALPAÍNAS	29
1.3.1 Unión a calcio	30
1.3.2 Subunidad reguladora CAPNS1	31
1.3.3 Inhibición por la calpastatina	32
1.3.4 Autoproteólisis	33
1.3.5 Proteólisis recíproca de la CAPN1 y la CAPN2	34
1.3.6 Unión a fosfolípidos	35
1.3.7 Fosforilación	35
1.4 ESPECIFICIDAD DE RECONOCIMIENTO DE SUSTRATO	36
<b>2. FUNCIONES DE LAS CALPAÍNAS</b>	<b>37</b>
2.1 MIGRACIÓN CELULAR	37
2.2 SUPERVIVENCIA Y MUERTE CELULAR	38
2.3 DIFERENCIACIÓN CELULAR	39
2.4 CICLO CELULAR	40
2.5 PROLIFERACIÓN CELULAR Y DESARROLLO	41
<b>3. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LAS CALPAÍNAS</b>	<b>42</b>
3.1 MECANISMOS DE DISTRIBUCIÓN	43
3.1.1 Membrana plasmática	44
3.1.2 Citoplasma	44
3.1.3 Mitocondria	45
3.1.4 Lisosoma	45
3.1.5 Aparato de golgi	46
3.1.6 Retículo endoplasmático	46
3.1.7 Núcleo	47

3.2 MECANISMOS REGULADORES .....	49
3.2.1 Secuencias específicas .....	49
3.2.2 Dominios PDZ: interacciones proteína-proteína .....	50
<b>4. CALPAÍNAS Y CÁNCER .....</b>	<b>51</b>
4.1 CÁNCER DE MAMA .....	52
4.1.1 Clasificación .....	52
4.1.2 Papel de las calpaínas en cáncer de mama .....	54
4.1.3 Distribución subnuclear de las calpaínas en líneas celulares de cáncer de mama .....	55
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
<b>1. CULTIVO CELULAR .....</b>	<b>67</b>
<b>2. INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD CALPAÍNA .....</b>	<b>67</b>
<b>3. SILENCIAMIENTO DE CAPN2 Y LIMK1 .....</b>	<b>68</b>
<b>4. SOBREENPRESIÓN DE LA CAPN2 .....</b>	<b>69</b>
<b>5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES .....</b>	<b>70</b>
<b>6. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR .....</b>	<b>71</b>
6.1 EXTRACCIÓN DE LAS FRACCIONES NÚCLEO/CITOSOL .....	71
6.2 EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN NUCLEOLAR .....	71
<b>7. WESTERN BLOT .....</b>	<b>73</b>
<b>8. INMUNOPRECIPITACIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>9. INMUNOFLUORESCENCIA .....</b>	<b>76</b>
<b>10. ENSAYO <i>IN VITRO</i> DE PROTEÓLISIS DE LIMK1 MEDIADA POR CAPN2 ..</b>	<b>77</b>
<b>11. ANÁLISIS PROTEÓMICO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL     (2D-DIGE) .....</b>	<b>78</b>
<b>12. EXTRACCIÓN DEL RNA Y CUANTIFICACIÓN .....</b>	<b>78</b>
<b>13. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA POR RT-qPCR .....</b>	<b>79</b>
<b>14. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS MULTINUCLEADAS .....</b>	<b>80</b>
<b>15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>81</b>



<b>1. LA ABUNDANCIA DE LA CAPN2 COMO POSIBLE DETERMINANTE DE SU LOCALIZACIÓN NUCLEOLAR</b> .....	<b>85</b>
1.1 ANÁLISIS EN LAS CÉLULAS MCF-7 .....	85
1.2 ANÁLISIS EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231 .....	88
1.3 ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE LA CAPN2 ENTRE LA FRACCIÓN NUCLEOLAR Y EL RESTO CELULAR .....	92
<b>2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEOLARES DEPENDIENTES DE CAPN2</b> .....	<b>93</b>
2.1 LAS PROTEÍNAS NUCLEOLARES COMO DIANAS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA CAPN2.....	96
2.2 LA CFL1 COMO POSIBLE DIANA DIRECTA DE LA ACTIVIDAD CAPN2 .	98
<b>3. PAPEL DE LA CAPN2 EN LA MODULACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA CFL1</b> .....	<b>100</b>
3.1 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA CFL1 .....	100
3.2 PAPEL DE LA CAPN2 EN LA FOSFORILACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA CFL1 .....	103
<b>4. POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA CAPN2 EN LA ACTIVACIÓN DE LIMK1</b> ....	<b>108</b>
4.1 LA CFL1 COMO SUSTRATO DE LIMK1 .....	108
4.2 PAPEL DE LA CAPN2 EN LA ACTIVACIÓN INDIRECTA DE LIMK1.....	109
4.3 POSIBLE PAPEL DE LA CAPN2 EN LA ACTIVACIÓN DIRECTA DE LIMK1 .....	112
4.4 LIMK1 COMO POSIBLE DIANA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA CAPN2.....	117
4.5 PAPEL DE LA CAPN2 EN LA REGULACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LIMK1.....	122
<b>5. PAPEL DE LA CAPN2 EN LA FOSFORILACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA CFL1 DURANTE EL CICLO CELULAR.</b> .....	<b>123</b>

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>131</b>
<b>1. DISTRIBUCIÓN SUBNUCLEAR DE LA CAPN2</b>	<b>134</b>
<b>2. RELACIÓN ENTRE LA DISTRIBUCIÓN NUCLEAR Y LA FUNCIÓN DE LA CAPN2 EN LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA</b>	<b>136</b>
2.1 LA CFL1 COMO DIANA DE LA CAPN2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA: RELEVANCIA	138
2.2 LA CFL1 COMO DIANA INDIRECTA DE LA CAPN2: FOSFORILACIÓN/DISTRIBUCIÓN	140
2.2.1 Fosforilación de la CFL1	140
2.2.2 Relación fosforilación/distribución de la CFL1	145
<b>3. LA CAPN2 COMO NODO REGULADOR DEL INTERACTOMA NUCLEAR: PERSPECTIVAS</b>	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>149</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO</b>	<b>195</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura de las CAPNs convencionales (CAPN1, CAPN2 y CAPNS1). . . . .	27
<b>Figura 2:</b> Clasificación de las CAPNs según su estructura. . . . .	28
<b>Figura 3:</b> Activación de la CAPN2 por unión a calcio. . . . .	30
<b>Figura 4:</b> Estructura de la calpastatina. . . . .	33
<b>Figura 5:</b> Representación esquemática del papel de las calpaínas en el control del ciclo celular. . . . .	41
<b>Figura 6:</b> Distribución subcelular de la CAPN1 en líneas celulares de cáncer de mama. . . . .	57
<b>Figura 7:</b> Distribución subcelular de la CAPN2 en líneas celulares de cáncer de mama. . . . .	59
<b>Figura 8:</b> Colocalización de las CAPN1 y CAPN2 en la línea celular MDA-MB-231. . . . .	60
<b>Figura 9:</b> Expresión ectópica de CAPN2 en células MCF-7. . . . .	86
<b>Figura 10:</b> Análisis intranuclear de DYK-CAPN2 en células MCF-7. . . . .	87
<b>Figura 11:</b> Localización nucleolar de DYK-CAPN2 en células MCF-7. . . . .	88
<b>Figura 12:</b> Eficiencia de silenciamiento de CAPN2 en células MDA-MB-231. . . . .	89
<b>Figura 13:</b> Distribución de la CAPN2 en células MDA-MB-231. . . . .	90
<b>Figura 14:</b> Análisis intranuclear de la CAPN2 en células MDA-MB-231. . . . .	91
<b>Figura 15:</b> Distribución subnuclear de la CAPN2 en células MDA-MB-231. . . . .	92
<b>Figura 16:</b> Ratio Nucleólo/No-nucleólo de CAPN2 en células de cáncer de mama. . . . .	93
<b>Figura 17:</b> Proteoma nucleolar dependiente de CAPN2 en células MDA-MB-231. . . . .	94
<b>Figura 18:</b> Efecto del silenciamiento de la CAPN2 sobre proteínas diferencialmente representadas en el proteoma nucleolar de células MDA-MB-231. . . . .	97
<b>Figura 19:</b> Niveles totales de CFL1 en las líneas de cáncer de mama. . . . .	99

<b>Figura 20:</b> Efecto del silenciamiento de CAPN2 sobre los niveles de la CFL1 en células MDA-MB-231. ....	100
<b>Figura 21:</b> Papel de la CAPN2 sobre la distribución de la CFL1 en células MDA-MB-231. ....	101
<b>Figura 22:</b> Efecto del silenciamiento de la CAPN2 sobre la distribución subcelular de la CFL1 en células MDA-MB-231. ....	102
<b>Figura 23:</b> Tasa de fosforilación de la CFL1 en células de cáncer de mama. .	103
<b>Figura 24:</b> Correlación entre la ratio pCFL1/CFL1 y los niveles de CAPN2 en células de cáncer de mama. ....	104
<b>Figura 25:</b> Papel de la actividad calpaína sobre la fosforilación de CFL1 en células TNBC. ....	105
<b>Figura 26:</b> Efecto de la depleción de CAPN2 sobre la distribución de pCFL1 en células MDA-MB-231. ....	106
<b>Figura 27:</b> Distribución subnuclear de CFL1 y pCFL1 en células MDA-MB-231 knock-down de CAPN2. ....	107
<b>Figura 28:</b> Fosforilación de CFL1 mediada por LIMK1 en células MDA-MB-231. ....	109
<b>Figura 29:</b> Fosforilación de LIMK1 en células MCF-7 con expresión ectópica de CAPN2. ....	110
<b>Figura 30:</b> Papel de la CAPN2 sobre la ratio de fosforilación de LIMK1 en células MDA-MB-231. ....	111
<b>Figura 31:</b> Papel de la CAPN2 sobre la distribución de pLIMK1 en células MDA-MB-231. ....	112
<b>Figura 32:</b> Interacción directa entre CAPN2 y LIMK1 en células MDA-MB-231. ....	113
<b>Figura 33:</b> Representación gráfica del vector DYK-CAPN2 y DYK-ΔCAPN2. .	114
<b>Figura 34:</b> Localización subnuclear de CAPN2 truncada en células MCF-7. .	115
<b>Figura 35:</b> Localización nucleolar de las formas completa o truncada de CAPN2 exógena en células MCF-7. ....	116
<b>Figura 36:</b> Unión de LIMK1 al extremo Ct de CAPN2 en células MCF-7. ....	117
<b>Figura 37:</b> Estructura de LIMK1. ....	118

<b>Figura 38:</b> Proteólisis de LIMK1 mediada por CAPN2. ....	119
<b>Figura 39:</b> Efecto de la expresión de CAPN2 sobre los niveles de LIMK1 en células MDA-MB-231. ....	120
<b>Figura 40:</b> Análisis de los productos de la proteólisis de LIMK1 mediada por CAPN2. ....	121
<b>Figura 41:</b> Efecto de la expresión de CAPN2 sobre la distribución de LIMK1 en células MDA-MB-231. ....	122
<b>Figura 42:</b> Papel de la expresión de CAPN2 sobre la distribución de CFL1/pCFL durante el ciclo celular. ....	125
<b>Figura 43:</b> Papel de la CAPN2 sobre la multinucleación de células MDA-MB-231. ....	127
<b>Figura 44:</b> Efecto de la expresión de CAPN2 sobre la progresión del ciclo celular. ....	129
<b>Figura 45:</b> Hipotéticos mecanismos de activación de LIMK1 por la CAPN2. ....	144
<b>Figura 46:</b> Representación esquemática del papel de la CAPN2 sobre la CFL1 durante el ciclo celular de células de cáncer de mama. ....	146



# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clasificación de las calpaínas en humanos según su expresión. . . .	29
<b>Tabla 2:</b> Desregulación de las calpaínas en cáncer. . . . .	51
<b>Tabla 3:</b> Condiciones usadas para la transfección reversa en células MDA-MB-231. . . . .	69
<b>Tabla 4:</b> Condiciones usadas para la transfección directa en células MCF-7.	70
<b>Tabla 5:</b> Anticuerpos primarios y condiciones de incubación empleados en el Western Blot. . . . .	74
<b>Tabla 6:</b> Anticuerpos primarios y su dilución utilizados en Inmunofluorescencia. . . . .	76
<b>Tabla 7:</b> Anticuerpos secundarios y su dilución usados en Inmunofluorescencia. . . . .	77
<b>Tabla 8:</b> Proteínas diferencialmente representadas en el proteoma nucleolar de células MDA-MB-231 knock-down de CAPN2. . . . .	95





# INTRODUCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

## 1. GENERALIDADES DE LAS CALPAÍNAS

Las calpaínas (CAPNs) son una familia de proteasas calcio dependientes (clan CA, familia C02, EC 3.4.22.17) con un dominio cisteín-proteasa bien conservado llamado CysPC [1–4]. Se encuentran en eucariotas y en algunas bacterias y nematodos [5, 6].

Las primeras descripciones sobre las CAPNs se dieron en 1964 por Guroff, quien observó una proteína activada por calcio en extracto soluble de cerebro de rata [7]. En 1968, Huston y Krebs las identificaron en tejido del músculo esquelético [8]. En 1978, Imahori consiguió purificar la enzima a partir de músculo esquelético de pollo, a la que denominó, proteasa neutra activada por calcio [9]. Es en 1980 cuando Murachi usó, por primera vez, el término calpaína para referirse a una enzima similar a la papaína dependiente de calcio [10]. En 1984, gracias a la secuenciación del cDNA de las CAPNs, se pudo determinar el origen de las mismas a partir de la combinación de una cisteín-proteasa con una proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  [11]. A partir de ese momento, los análisis de estructura, función y localización de estas enzimas tomaron auge.

La actividad de las CAPNs se encuentra muy regulada, como ocurre en otras muchas proteasas como las caspasas, metaloproteasas o catepsinas. Sin embargo, estas enzimas no degradan a su sustrato, sino que realizan una proteólisis limitada del mismo, transformándolo y modificando su función, por lo que se conocen como proteasas moduladoras [12]. De hecho, se ha publicado que incluso en situación de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuando la actividad CAPN debería ser máxima, menos de un 5% de los sustratos son diana de las CAPNs [13], lo que es indicativo de esta función reguladora de sus sustratos.

## INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios han permitido identificar más de 160 sustratos de las CAPNs *in vitro* [14], lo que las relaciona con una gran variedad de funciones fisiológicas y patológicas: proliferación celular, invasión y migración celular o diferenciación, entre otras [15–19]. En este sentido, una regulación precisa del sistema CAPN es crucial para el buen funcionamiento celular. Alteraciones en los niveles de expresión de las CAPNs o en el funcionamiento de las mismas, pueden causar defectos en el desarrollo de los tejidos y los organismos. Por ejemplo, se ha visto que los embriones de ratones *knockout (KO)* de CAPN2 son letales [20]. También se ha descrito que el déficit de alguna CAPN o su desregulación están implicadas en numerosas patologías como la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer [21–25].

### 1.1 ESTRUCTURA DE LAS CALPAÍNAS CONVENCIONALES

Las CAPNs se encuentran presentes en la mayoría de tejidos y tipos celulares de los mamíferos. Las isoformas mayoritarias y ubicuas, que fueron las primeras en descubrirse, se denominaron  $\mu$ -calpaína y m-calpaína [2]. Dicha terminología se usó por primera vez en 1989 para referirse a las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  requeridas para su activación *in vitro* (micromolar y milimolar respectivamente) [26]. Hoy en día, se sabe que estas concentraciones oscilan siempre en el orden de magnitud micromolar. En concreto, entre 2-75 $\mu\text{M}$  para la  $\mu$ -calpaína y 200-500 $\mu\text{M}$  para la m-calpaína [4, 27]. Actualmente, se denominan CAPN1 y CAPN2, respectivamente y son conocidas como CAPNs convencionales.

Estas CAPNs convencionales son heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica de 80kDa codificada por el gen CAPN1 o CAPN2, y una subunidad reguladora de 30kDa codificada por el gen CAPNS1 (también denominado CAPN4). Las subunidades catalíticas presentan entre sí una homología del 62.4% en su secuencia aminoacídica, hecho que explica que ambas tengan sustratos e inhibidores similares [1, 12]. A pesar de su similitud y de su expresión ubicua,

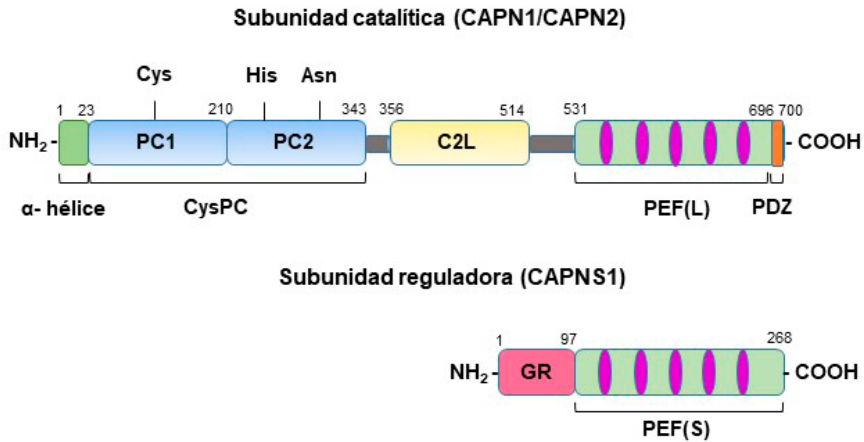
nuestro grupo demostró que existen diferencias en la distribución subcelular de la CAPN1 y la CAPN2 y que estas diferencias determinan la función específica de cada isoforma en condiciones fisiológicas y patológicas [28].

Los primeros estudios de cristalografía de las CAPNs en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitieron estudiar su estructura y describir los dominios que la componen [29]. La subunidad catalítica de las CAPNs convencionales se divide en cinco dominios, mientras que la subunidad reguladora, lo hace en dos. Ambas presentan un dominio PEF que permite la interacción y dimerización entre las dos subunidades. La figura 1 muestra la estructura de las CAPN1 y CAPN2 y la CAPNS1. A continuación se describen los dominios que las componen:

- Dominio N-terminal: se trata de una  $\alpha$ -hélice presente en la subunidad catalítica que sirve de anclaje al dominio PEF de la subunidad reguladora CAPNS1 [2].
- Dominio CysPc (*cysteine protease core domain*): dominio proteasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  altamente conservado entre especies [30]. En él, se localiza la tríada catalítica: Cys-115, His-272, Asn-296 en el caso de la CAPN1 y Cys-105, His-262, Asn-286 en la CAPN2 [4]. CysPc se subdivide a su vez en dos centros catalíticos PC1 y PC2 (*protease core 1 y 2*) que, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se encuentran separados e inactivos [31].
- Dominio C2L (*C2-like*): formado por ocho láminas  $\beta$  que presentan gran homología con el dominio C2 de la proteína quinasa C (PKC) que interactúa con el  $\text{Ca}^{2+}$  o con los fosfolípidos de membrana. Por ello, se piensa que podría participar en los mismos procesos [32, 33].
- Dominio PEF(L) (*penta-EF-hand*): presente en el extremo C-terminal de la subunidad catalítica. Posee 5 secuencias del tipo mano EF, las cuatro primeras unen  $\text{Ca}^{2+}$  y, la última, participa en la formación del heterodímero con la subunidad reguladora CAPNS1 [34, 35].

## INTRODUCCIÓN

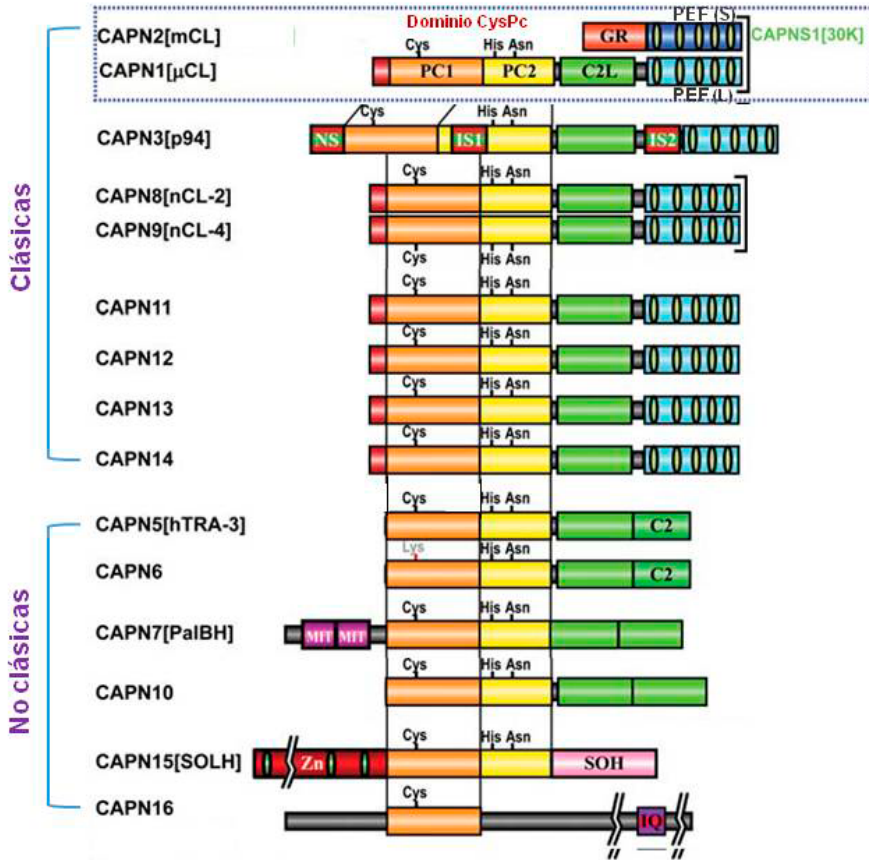
- Dominio PDZ (denominado por la primera letra de las tres proteínas en las que se descubrió el dominio; proteína de densidad postsináptica (**P**SD95), proteína supresora de tumores en *Drosophila* (**D**lgA), y la proteína zonula occludens-1 (**z**o-1)): es un módulo de unión a proteína formado por 4 aminoácidos (aa) muy conservados en vertebrados. Se encuentra contiguo al dominio PEF(L) en el extremo C-terminal. En la CAPN2, constituye el dominio PDZ típico tipo I y en la CAPN1, el atípico tipo II [23].
- Dominio GR (*glycin rich*): presente en el extremo N-terminal de la subunidad reguladora CAPNS1. La presencia de un gran número de residuos de Gly, le confiere características hidrofóbicas; permitiéndole participar en la unión de las CAPNs a las membranas [5].
- Dominio PEF(S): presente en el extremo C-terminal de CAPNS1. Muestra gran homología con el dominio PEF(L) de la subunidad catalítica. Cuenta con 5 secuencias del tipo mano EF, las cuatro primeras unen  $\text{Ca}^{2+}$  y, la última, participa en la formación del heterodímero con la  $\alpha$ -hélice de la subunidad catalítica [2].



**Figura 1: Estructura de las CAPNs convencionales (CAPN1, CAPN2 y CAPNS1).** Comenzando por la subunidad catalítica, en el extremo N-terminal se encuentra la  $\alpha$ -hélice, seguida de los centros catalíticos PC1 y PC2 que componen el dominio cisteín-proteasa. En él, se encuentra la triada catalítica. A continuación, el dominio C2L y PEF con las 5 secuencias tipo mano EF seguido por el dominio PDZ en el extremo C-terminal. La subunidad reguladora, a su vez, está compuesta por el dominio GR en el extremo N-terminal seguido del dominio PEF con las 5 secuencias tipo mano EF. Figura modificada de Moretti D. et al.(2014) [22].

## 1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS

El genoma humano contiene 15 genes que codifican para las diferentes subunidades catalíticas de las CAPNs y un gen (CAPNS1) que codifica para su subunidad reguladora [3]. Las CAPNs se pueden clasificar por su estructura o por su expresión en el organismo. Atendiendo a su estructura, se dividen en clásicas y no clásicas. Las primeras se encuentran bien conservadas en vertebrados, mientras que las segundas se han descrito también en nematodos, tripanosomas, plantas, hongos y levaduras [5]. En humanos, las CAPNs clásicas están codificadas por nueve genes y se caracterizan por la presencia de un dominio PEF en el extremo C-terminal, además de un dominio C2L y CysPc. Las no clásicas, están codificadas por seis genes, carecen de dominio PEF y presentan dominios adicionales que les permiten dividirse en diferentes subfamilias (Figura 2) [6].



**Figura 2: Clasificación de las CAPNs según su estructura.** Estructura de las diferentes CAPNs en humanos. CysPc, dominio cisteín-proteasa; C2L, dominio C2-like; PEF(L) y PEF(S), dominios con 5 secuencias tipo mano EF; GR, dominio rico en glicina; NS, secuencia N-terminal; IS, secuencia de inserción; MIT, secuencia de transporte y de interacción con microtúbulos; Zn, dedo de cinc; SOH, dominio homólogo del lóbulo óptico pequeño; IQ, dominio de interacción con calmodulina. Figura modificada de Sorimachi H. et al. (2011) [1].

Por otro lado, atendiendo a su expresión en el organismo, estas proteasas pueden ser ubicuas cuando se encuentran en todos los tipos celulares o específicas de tejido u órganos (Tabla 1).



**Tabla 1:** Clasificación de las calpaínas en humanos según su expresión. En la tabla se muestra el nombre del gen que codifica para la CAPN, el tejido u órgano en el que se expresan mayoritariamente y la estructura que presentan.

Gen	Tejido/órgano mayoritario	Estructura
CAPN1	ubicua	clásica
CAPN2	ubicua	clásica
CAPN3	músculo esquelético	clásica
CAPN5	ubicuo	no clásica
CAPN6	placenta	no clásica
CAPN7	ubicua	no clásica
CAPN8	tracto gastrointestinal	clásica
CAPN9	tracto gastrointestinal	clásica
CAPN10	ubicua	no clásica
CAPN11	testículos	clásica
CAPN12	folículos pilosos	clásica
CAPN13	ubicua	clásica
CAPN14	esófago	clásica
CAPN15	ubicua	no clásica
CAPN16	ubicua	no clásica
CAPNS1	ubicua	no aplicable

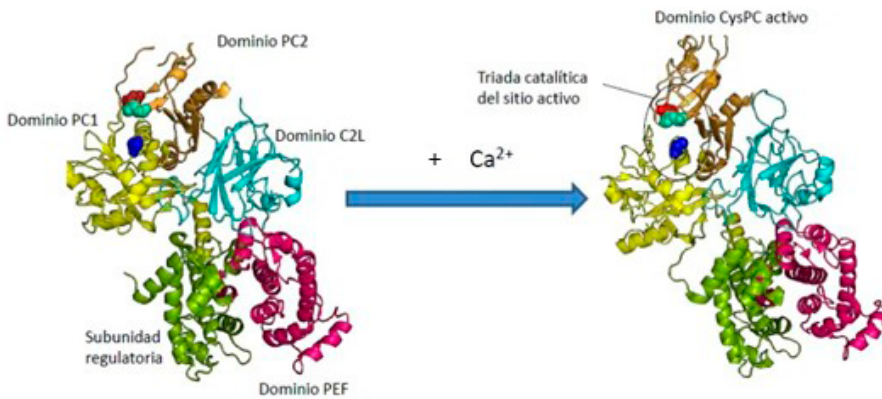
### 1.3 REGULACIÓN DE LAS CALPAÍNAS

Debido a la complejidad del sistema CAPN, se requiere de una regulación muy precisa del mismo para el correcto funcionamiento de la célula. Cualquier alteración de las CAPNs, puede ocasionar problemas en la división celular, en la diferenciación e incluso la muerte celular [36]. A pesar de la homología entre secuencias de las diferentes isoformas, no todas se rigen por los mismos mecanismos de activación ni de regulación. Se han descrito los siguientes mecanismos de regulación de las CAPNs:

## INTRODUCCIÓN

### 1.3.1 Unión a calcio

La obtención de la primera estructura en 3D de la CAPN2, proporcionó información muy relevante sobre el sistema CAPN [29]. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , los dominios PC1 y PC2 presentan una estructura abierta que impide la formación de la triada catalítica [31]. Mediante ensayos con una ‘mini-calpaína’, que cuenta con tan solo el dominio proteasa de la CAPN1, se demostró que, dos moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  se unían de forma cooperativa a los sitios de unión específicos en los dominios PC1 y PC2. La unión provocaba un cambio conformacional en el centro catalítico que reorientaba y conectaba los dominios PC1 y PC2 entre sí; formando a su vez, una estructura cerrada y activa, la triada catalítica (Figura 3) [37, 38].



**Figura 3: Activación de la CAPN2 por unión a calcio.** Representación en 3D del cambio conformacional de la CAPN2 mediado por la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a los dominios PC1 y PC2. La reorientación de los dominios, permite que conecten entre sí para formar la triada catalítica activa. Figura modificada de Sorimachi H. et al (2011) [1].

En un principio se pensaba que los sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  del dominio PEF eran esenciales para la activación de la CAPN. Sin embargo, publicaciones de la literatura describieron que, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  requerida para activar a la mini-calpaína, que carece de los dominios PEF, era similar a la requerida por la enzima

completa [2]. Por ello, se piensa que los dominios PEF no son reguladores primarios de la actividad CAPN, sino que confieren un nivel adicional de seguridad ante la activación espontánea de la proteasa [39]. La estructura en 3D de la CAPN2 unida a  $\text{Ca}^{2+}$  reveló que, el dominio proteasa es estabilizado por contacto directo con los dominios C2L, PEF(L) y PEF(S). Parece que estos dominios restringen los movimientos del dominio proteasa en ausencia del  $\text{Ca}^{2+}$  evitando activaciones innecesarias de la CAPN [2].

Por otro lado, se ha descrito en la literatura que las CAPNs requieren una gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para su activación *in vitro*. Sin embargo, dichas cantidades no se encuentran en condiciones fisiológicas, siendo incompatible con la viabilidad celular [27]. La CAPN se activa en espacios cortos de tiempo y en áreas muy localizadas. Esto es posible gracias a flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  concentrados cerca de canales y de bombas, que proveen de cantidades suficientes del ion en un determinado instante. Una vez que el ion difunde, la CAPN regresa a su estado inactivo [2]. Precisar de elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , no es más que una medida de seguridad interna para prevenir sobreactivaciones en condiciones fisiológicas [27].

### 1.3.2 Subunidad reguladora CAPNS1

Una de las características de las CAPNs convencionales, es la capacidad de formar heterodímeros *in vivo* entre una subunidad catalítica (CAPN1 o CAPN2) y una subunidad reguladora (CAPNS1). La 'G-calpaína' en el tracto gastrointestinal, es el único ejemplo conocido de un heterodímero formado a partir de dos subunidades catalíticas. En este modelo, participan el extremo N-terminal de la CAPN8 y los dominios PEF de la CAPN8 y la CAPN9. La CAPN8 actuaría como subunidad catalítica y la CAPN9 como reguladora [40].

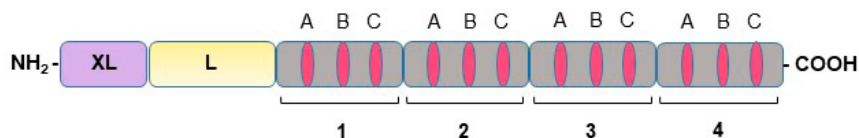
Diferentes ensayos describen que la subunidad reguladora se disocia de la catalítica durante el proceso de activación o directamente como mecanismo de activación de la CAPN favoreciendo el cambio conformacional del centro catalítico [41, 42]. No obstante, hay cierta controversia al respecto puesto que ciertos

## INTRODUCCIÓN

autores postulan que la CAPN permanece unida a la CAPNS1 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  [43, 44], basándose en los siguientes supuestos: i) el leve cambio conformacional que se produce en la enzima tras la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  no sería capaz de permitir la disociación entre los dominios PEF de ambas subunidades [45]. ii) se ha hipotetizado que la CAPNS1 actúa como una chaperona que proporciona estabilidad a las CAPNs convencionales [46]. Su disociación provocaría una desregulación de las subunidades catalíticas. De hecho, los embriones de ratón  $\text{CAPNS1}^{-/-}$  son letales [47]. iii) diversos estudios de cromatografía, no encuentran homodímeros de la CAPNS1 pero sí heterodímeros entre los dominios PEF(L) y PEF(S), indicando que las subunidades catalítica y reguladora permanecen unidas durante el proceso catalítico [48].

### 1.3.3 Inhibición por la calpastatina

La calpastatina (CAST) es la única proteína endógena con capacidad de inhibir específicamente a las CAPNs [49]. La CAST está codificada por un único gen. Las ocho isoformas conocidas hasta la fecha, son producto del *splicing* alternativo [50]. Como se observa en la figura 4, la proteína está compuesta por un dominio XL en el extremo N-terminal que es susceptible de fosforilación. Algunas isoformas no presentan esta región. Le sigue un dominio L, de gran heterogeneidad entre las diferentes isoformas debido a que el gen que lo codifica posee múltiples sitios de *splicing*. Finalmente, presenta cuatro dominios independientes, cada uno de ellos compuesto por tres subdominios A, B y C [51]. El subdominio B es el único con actividad inhibitoria y, puesto que la CAST presenta cuatro subdominios B, ésta es capaz de inhibir a cuatro CAPNs simultáneamente [52]. A su vez, los subdominios A y C estabilizan el complejo CAST-CAPN [45, 53].



**Figura 4: Estructura de la calpastatina.** En el extremo N-terminal se encuentra el dominio XL. Le sigue el dominio L y 4 dominios idénticos capaces de inhibir cada uno de ellos a una CAPN. Estos 4 dominios se componen, a su vez, de 3 subdominios A, B y C. Figura modificada de Kiss R. et al (2008) [49].

La CAST se une a la CAPN solo cuando esta última se encuentra activada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ello, se le atribuye una función atenuadora de la actividad CAPN más que preventiva [45]. Diversos estudios ponen de manifiesto que, en condiciones fisiológicas, la CAPN no se activaría el tiempo suficiente como para necesitar de la inhibición por la CAST. Bajo condiciones de estrés celular, la CAPN se sobreactivaría e intervendría la CAST para bloquear activaciones prolongadas de la enzima y evitar que se produzcan daños celulares [54–56]. Tanto la capacidad inhibitoria de la CAST como su localización, se pueden regular de manera reversible por fosforilación. Las proteínas quinasas A y C (PKA y PKC) activan o inhiben a la CAST por fosforilación de su dominio XL [57, 58]. La fosforilación por la PKA, aumenta los niveles de la CAST asociada a membrana de un 6% a un 30%, *in vivo* [59]. Por tanto, será más probable que aquellas isoformas que contengan el dominio XL, se localicen e inhiban a la CAPN en la membrana plasmática [60].

### 1.3.4 Autoproteólisis

Durante muchos años se había pensado que las CAPNs se activaban *in vivo* a partir del mismo mecanismo descrito para otras proteasas como las catepsinas o las papaínas [26]. De ese modo, las CAPNs se sintetizarían como una pro-enzima inactiva que requiere de la proteólisis y la liberación del propéptido inhibitorio del sitio activo para su funcionalidad [61]. La liberación del dominio N-terminal facilitaría la reorientación de los dominios PC1 y PC2 y la formación de la triada

## INTRODUCCIÓN

catalítica. De acuerdo con estos estudios, se postuló que la autoproteólisis de la  $\alpha$ -hélice de la CAPN1 y la CAPN2 reducía considerablemente los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  requeridos para su activación *in vitro* [62, 63].

A pesar de que existe cierta controversia al respecto, los grandes avances en el estudio de la estructura en 3D de la CAPN parecen indicar que, la autoproteólisis del extremo N-terminal de la proteasa no es un mecanismo válido de su activación, basándose en: i) la  $\alpha$ -hélice de anclaje de la CAPN no es suficientemente extensa como para llegar a bloquear el sitio activo de la enzima [2, 29]. ii) la estructura en  $\alpha$ -hélice protege a la forma inactiva de la enzima de la digestión por otras proteasas o por la misma CAPN [48]. iii) la autólisis es un proceso irreversible. En cambio, si durante la activación de la enzima no se eliminara el extremo N-terminal, las CAPNs podrían retornar al estado inactivo inicial, formando parte de ciclos de activación e inactivación en respuesta a señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mucho más fácilmente regulables [2, 48].

### 1.3.5 Proteólisis recíproca de la CAPN1 y la CAPN2

Estudios recientes han descrito que las CAPNs convencionales sufren autólisis una vez se encuentran activas y proteolizando a sus sustratos. Los productos de la autólisis de ambas isoformas difieren, siendo el de la CAPN2, el que mayor actividad proteolítica posee y, por tanto, el que más rápido proteoliza a sus sustratos [64]. A su vez, la CAPN1 y la CAPN2 presentan una actividad proteolítica recíproca. La CAPN1, puesto que requiere menores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , se activa antes que la CAPN2. Una vez activada, la CAPN1 proteoliza a la CAPN2 generando unos péptidos diferentes de los generados por el proceso de su autólisis. Estos péptidos permiten que disminuya el requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  para la activación de la CAPN2. Una vez activada, la CAPN2 proteoliza a la CAPN1 por varios puntos, disminuyendo su actividad en un 40%. Se ha descrito que la CAPN2 proteoliza a la CAPN1 entre los aa 126 y 127 y en el extremo N-terminal del fragmento de 76kDa (producto de la autólisis de la CAPN1), desestabilizando su dominio CysPC [64]. En este sentido, parece que la CAPN2 podría estar ejerciendo un control para evitar la sobreactivación del sistema CAPN.

### 1.3.6 Unión a fosfolípidos

En 1984, se observó que la unión del dominio C2L de la CAPN a fosfolípidos con fosfatidilinositol, producía una disminución considerable de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  requeridos para su activación [65]. Estudios posteriores demostraron que, aquellos fosfolípidos con fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), disminuían aún más los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  requeridos para activar a la CAPN1 y la CAPN2 [26].

Investigaciones más recientes atribuyen a los fosfolípidos una función reguladora de la distribución de las CAPNs. La interacción fosfolípido-CAPN permite que la enzima se localice en la membrana plasmática cerca de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  donde tiene acceso a elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  [66] o en algunos orgánulos como el retículo endoplasmático (RE) o el aparato de Golgi (AG) [67].

### 1.3.7 Fosforilación

Además de los mecanismos de regulación descritos, las CAPNs también son susceptibles de fosforilación [22]. La CAPN1 se fosforila en nueve residuos de aa y la CAPN2 en ocho. Sin embargo, no todos los residuos se fosforilan por igual ni con la misma frecuencia [4]. Si bien todavía no se ha determinado el significado fisiológico de esta modificación, se piensa que el patrón de fosforilación de las CAPNs podría modular la actividad, la distribución o la función de las mismas [4].

Existen diferentes publicaciones en las que se ha demostrado la fosforilación de alguna de las CAPNs convencionales y cómo esta modificación puede activarlas o inhibirlas. En este sentido, factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), inducen la activación de la CAPN2 mediante su fosforilación en el residuo Ser-50, vía MAPK/ ERK. Esta fosforilación es posible gracias a la unión de la CAPN2 a los  $\text{PIP}_2$  en la cara interna de la membrana plasmática [68]. Del mismo modo, se ha demostrado que la PKA fosforila a la CAPN1 en los residuos de Ser-255, 256 y 476, promoviendo su activación [69]. Por el contrario, la fosforilación de la CAPN, también puede inhibir su función. La PKA

## INTRODUCCIÓN

fosforila a la CAPN2 en los residuos de Ser-369 y Thr-370 restringiendo el cambio conformacional del dominio C2L de la CAPN2 y manteniendo a la enzima en su estado inactivo [70, 71]. Igualmente, la fosforilación de la CAPN1 por parte de la PKA, incrementa el efecto inhibitorio de CAST [72].

### 1.4 ESPECIFICIDAD DE RECONOCIMIENTO DE SUSTRATO

Como se ha comentado, las CAPNs realizan una proteólisis limitada de su sustrato, modificando su estructura, función, especificidad o su localización [12]. En la actualidad, se han llevado a cabo muchos estudios para identificar los puntos de corte de las CAPNs en sus sustratos [73, 74]. Sin embargo, los resultados son muy dispares. Se ha descrito en la literatura que el centro activo del dominio CysPc de las CAPNs difiere al de otras cisteín-proteasas, obligando a sus sustratos a presentar una conformación más flexible y extendida, para acceder al centro catalítico de la enzima [45].

El desarrollo de programas informáticos que generan predicciones sobre puntos de corte de las CAPNs en sus sustratos, ha puesto de manifiesto que, la especificidad de las CAPNs por su sustrato no depende de su estructura primaria o de modificaciones postraduccionales, sino de mecanismos más complejos [75]. A pesar de que se han conseguido grandes avances, la información obtenida sobre los puntos de corte no es totalmente precisa. Esta situación realza la importancia del avance en la investigación y desarrollo de programas bioinformáticos de predicción de sitios de corte más exactos.

La elevada homología entre las estructuras primarias de las CAPNs convencionales, sugería que ambas isoformas reconocían los mismos sustratos y realizaban funciones redundantes [76]. Sin embargo, los experimentos con ratones *KO* para la CAPN1 o la CAPN2 rechazan esta hipótesis. Se demostró que ratones *KO* para la CAPN1 eran viables y fértiles, mientras que ratones *KO* para la CAPN2 no eran viables [20], luego no realizan funciones redundantes, aunque pueden proteolizar a los mismos sustratos.



Actualmente se sabe que las funciones de la CAPN1 y la CAPN2 dependen del sustrato al que se unen en un determinado tipo celular y contexto biológico [28].

## 2. FUNCIONES DE LAS CALPAÍNAS

El sistema CAPN, a diferencia de otros sistemas proteolíticos interactúa directamente con los sustratos sin necesidad de que estos estén marcados previamente como ocurre, por ejemplo, con el sistema ubiquitín-proteosoma [22]. Además, las CAPNs proteolizan específicamente sus sustratos modificando algunas de sus propiedades como su actividad, especificidad, estructura o localización [12]. Entre las dianas mejor estudiadas, encontramos proteínas del citoesqueleto [77], de membrana [28], quinasas [15] y factores de transcripción [18]. Debido a la gran variedad de sustratos, las CAPNs están implicadas en numerosas funciones fisiológicas, así como en determinadas patologías cuando el sistema CAPN se encuentra desregulado [14]. Algunas de las funciones más destacadas se describen a continuación:

### 2.1 MIGRACIÓN CELULAR

Una de las funciones más conocidas de las CAPNs es la migración celular. Durante este proceso, se produce una remodelación del citoesqueleto, en donde los complejos de adhesión focal, que conectan el citoesqueleto de la célula con la matriz extracelular, se organizan y desorganizan de forma dinámica [25]. Para que se produzca la migración celular, las uniones celulares o los complejos de adhesión focal deben ensamblarse y desensamblarse a la vez que avanza la célula. En ese sentido, las CAPNs juegan un papel muy importante. Estas promueven la adhesión participando en la formación de lamelipodios, adherencias focales y fibras de estrés a través de la vía Rho GTPasas [70]. Además, promueven el desensamblaje al proteolizar proteínas que forman parte de las uniones celulares como la E-cadherina, el p120, la  $\beta$ -catenina o la talina-1, a través de las cuales el citoesqueleto se conecta, bien con células adyacentes, o con la matriz extracelular [17, 77].

## INTRODUCCIÓN

Es más, determinados estudios relacionan a las CAPNs con la migración celular en procesos tumorigénicos como, por ejemplo, en cáncer de mama, colon, pulmón o rhabdomyosarcoma [28, 78–80]. Durante la metástasis, las CAPNs convencionales organizan complejos de adhesión focal y favorecen la migración proteolizando a proteínas de adhesión celular. Además, las CAPNs regulan la expresión y la secreción de metaloproteasas de matriz (MMP), como la MMP2, la MMP7 y la MMP9. Estas enzimas degradan la matriz extracelular promoviendo la invasión celular [81, 82].

## 2.2 SUPERVIVENCIA Y MUERTE CELULAR

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso crucial para la homeostasis del organismo. La interacción entre las CAPNs y las caspasas es vital en este proceso [36]. La CAPN1 y la CAPN2 intervienen en la muerte celular, al activar a determinadas caspasas (caspasa-3,-7,-12) o inactivarlas (caspasa-9) [83–87]. Además de la conocida vía de las caspasas, las CAPNs promueven la muerte celular activando a quinasas o promoviendo la síntesis de factores de transcripción que inducen la apoptosis. Por ejemplo, actúan sobre la  $\beta$ -catenina en las neuronas generando un producto truncado que induce la transcripción de genes que desencadenan la apoptosis neuronal [88]. También se ha visto que las CAPNs proteolizan a la proteína p35 produciendo un fragmento que se une a la quinasa dependiente de ciclina-5 (CDK5) y generando un complejo que induce la apoptosis neuronal [89]. Además, las CAPNs promueven la apoptosis mitocondrial actuando sobre miembros de la familia BCL-2 como BAX o BID que inducen la liberación del citocromo c y con ello, la muerte celular [90]. Bajo un estímulo de ácido úrico, la CAPN1 induce la apoptosis de los cardiomiocitos activando la vía de estrés del RE [91].

Por otro lado, la CAPN1 participa en la supervivencia celular. Se ha descrito que la proteólisis de c-Myc mediada por las CAPNs en condiciones de hipoxia o falta de nutrientes promueve la supervivencia de células de cáncer de colon

(CRC) [92]. A su vez, la CAPN3 regula la supervivencia celular de los astrocitos proteolizando factores que protegen de la apoptosis [93]. Las CAPNs favorecen la supervivencia de células tumorales en condiciones de hipoxia al proteolizar al factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  [22]. La CAPN2 protege a los cardiomiocitos de la muerte celular al disminuir la fosforilación y activación de la quinasa p38 [94].

## 2.3 DIFERENCIACIÓN CELULAR

Las CAPNs son necesarias en el proceso de diferenciación de células madre a neuronas [16], mioblastos [95], osteoblastos [96] y adipocitos [19, 97]. Se ha visto que las CAPNs ejercen funciones opuestas en la diferenciación de células madre neuronales. Mientras que la CAPN1 reprime su diferenciación, la CAPN2 promueve la diferenciación de las células gliales [16]. Las CAPNs convencionales se encuentran implicadas en la diferenciación de la línea celular de mioblastos L8 al disminuir los niveles de PKC y con ello, los niveles de la miogenina fosforilada durante la diferenciación de mioblastos. Como consecuencia de ello, se activan los genes específicos de músculo que promueven la diferenciación [95].

Resultados previos de este laboratorio señalaron que, durante la involución de la glándula mamaria tras la lactancia, la CAPN1 induce la expresión de genes adipogénicos en los adipocitos del estroma mamario y la diferenciación de los mismos, debido probablemente a la proteólisis del extremo N-terminal de la histona H3 [19]. También se demostró que tanto la CAPN1 como la CAPN2 participan en el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1 en adipocitos. Se observó cómo la expresión de ambas isoformas se inducía tras el estímulo de diferenciación e incrementaba progresivamente en la fase temprana y la terminal del proceso de diferenciación. Una vez los adipocitos se habían diferenciado completamente, disminuían los niveles de ambas proteasas [98]. Además, se ha descrito que la subunidad reguladora de la CAPNs (CAPNS1) participa en el proceso de diferenciación de los osteoblastos [96].

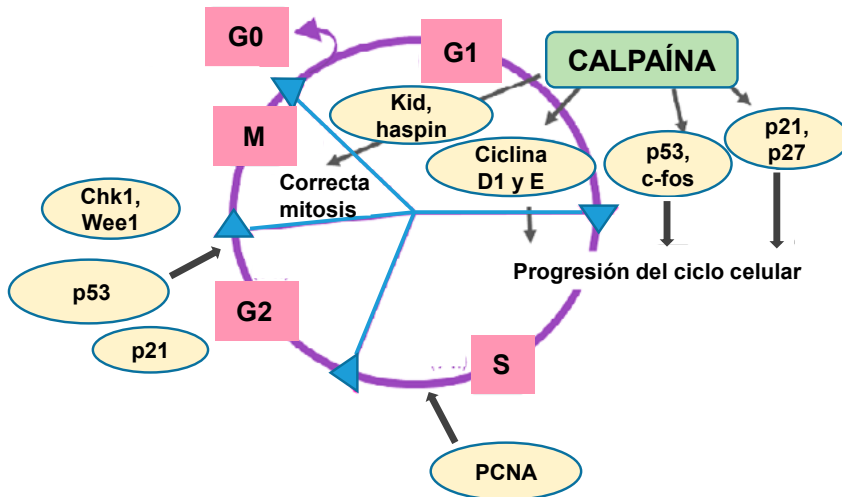
### 2.4 CICLO CELULAR

El sistema CAPN forma parte de la maquinaria de control del ciclo celular. La actividad CAPN es necesaria para que la célula pueda atravesar los diferentes puntos de restricción del ciclo celular [18].

De hecho, diferentes estudios han demostrado la implicación de las CAPNs convencionales en prácticamente todas las fases del ciclo celular (Figura 5). La CAPN2 promueve la progresión entre las fases  $G_0/G_1$  en mioblastos mediante la activación de la proteína MyoD en la fase  $G_0$  [15]. Además, las CAPNs favorecen el paso de la fase  $G_1$  a la fase S proteolizando factores de transcripción como c-Myc, c-Fos, p53 o c-Jun, ciclinas como la ciclina D1 y E, así como inhibidores de CDKs como p21 o p27 [15, 18]. Las CAPNs permiten la progresión a través de la fase S regulando la vía pRb/PCNA que favorece la síntesis de DNA y la progresión de la fase  $G_2/M$  vía p53, p21[18]. No solo las CAPNs convencionales, sino otras CAPNs como la CAPN3 y la CAPNS1 también intervienen en la regulación del ciclo celular. Estudios en células de hígado durante la organogénesis, describen como la vía Def-CAPN3 promueve la degradación de p53 en el nucléolo de las células permitiendo la progresión del ciclo celular en las fases  $G_1/S$  y  $G_2/M$  [99, 100]. Recientemente se ha descrito que la CAPN3 permite la entrada de células en mitosis mediante la inactivación de Chk1 y Wee1 durante la regeneración de hígado [101]. En ausencia de CAPNS1 se bloquea la progresión de la fase  $G_1/S$  en condrocitos, ya que no se produce la proteólisis de la ciclina D, ciclina E y del inhibidor de la CDK p27<sup>Kip1</sup>[102].

Una vez la célula entra en división, se ha visto que la CAPN2 participa en la alineación de los cromosomas en la placa metafásica. La CAPN2, a través de la inactivación de la proteína Kid, genera fuerzas de eyección polar que permiten la alineación de los cromosomas [103]. Además, la CAPN2 está implicada en el mantenimiento de la cohesión de las cromátidas hermanas durante la mitosis. La proteasa promueve que las cromátidas permanezcan unidas hasta la segregación de los cromosomas en la anafase, mediante la activación de la quinasa haspin, que fosforila a la histona H3T3 en los centrómeros [104]. Se ha descrito que el

silenciamiento de la CAPN2 en las células C2.7 de ratón, produce defectos en el alineamiento de los cromosomas, una separación prematura de las cromátidas hermanas, una división celular aberrante y multinucleación [103, 104].



**Figura 5: Representación esquemática del papel de las calpaínas en el control del ciclo celular.** Las CAPNs favorecen la progresión del ciclo celular a través de la proteólisis de dianas específicas: G1/S) Proteólisis de factores de transcripción (c-Myc, c-Fos, p53, c-Jun), ciclinas (ciclina D1 y E) e inhibidores de CDKs (p21, p27); S) vía pRB/PCNA; G<sub>2</sub>/M) proteólisis de p53, p21 e inactivación de Chk1 y Wee1; M) la CAPN2 participa en la alineación de los cromosomas en la placa metafásica y en el mantenimiento de la cohesión de las cromátidas hermanas mediante la inactivación de la proteína Kid y la activación de la quinasa haspin respectivamente. Figura modificada de Eiffler K. et al (2015) [105].

## 2.5 PROLIFERACIÓN CELULAR Y DESARROLLO

Además, el sistema CAPN interviene en la proliferación celular y el desarrollo. Estudios en células de cáncer de mama (BCC), han descrito que la CAPN2 media la proliferación celular a través de la vía Akt-FoxO-p27<sup>Kip1</sup>. El silenciamiento de la CAPN2 reduce la proliferación celular al disminuir los niveles de la proteína Akt activa. La disminución de pAkt promueve la activación y transporte del factor

## INTRODUCCIÓN

de transcripción FoxO3 al núcleo, donde se une con p27<sup>Kip1</sup> reduciendo la proliferación celular [106]. Existen evidencias de que la CAPN2 media la remodelación vascular en pacientes con hipertensión arterial pulmonar. Elevados niveles de lactato activan a la CAPN2, vía fosforilación del residuo Ser-50 mediada a través de la ERK1/2, promoviendo la síntesis de colágeno y proliferación de las células musculares lisas de la arteria pulmonar [107]. Además, la CAPN2 favorece la angiogénesis de células tumorales al generar un fragmento de la proteína filamina A, una proteína del citoesqueleto de unión a actina, que interacciona con HIF-1 $\alpha$  promoviendo la expresión génica en condiciones de hipoxia [22].

Por otro lado, la CAPN2 es crucial en el desarrollo embrionario preimplantacional [20]. El patrón de expresión y distribución de la CAPN2 varía a lo largo del proceso de embriogénesis. El desarrollo embrionario precisa de niveles elevados de expresión de la CAPN2 nuclear y una mitosis activa tanto en células madre como en embriones de 8 células [108]. A medida que avanza el desarrollo del embrión, la CAPN2 se expresa en células con una gran proliferación, o con intensa migración u organogénesis como son las somitas o células del corazón. En etapas más avanzadas, los niveles de la CAPN2 aumentan en el núcleo de células diferenciadas en proliferación, como es el caso de los osteoblastos, y en el citoplasma de células quiescentes diferenciadas, como las neuronas [108].

### 3. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LAS CALPAÍNAS

La localización subcelular de las CAPNs promueve o limita su acceso a diferentes sustratos y por tanto, su participación en diversas rutas de señalización [109]. El tipo y el contexto celular influyen en la distribución de las CAPNs y, por tanto en su participación en diferentes funciones. En el caso del tipo celular, nuestro equipo demostró que en el tejido de la glándula mamaria tras el proceso de lactancia, la CAPN1 se encuentra en la periferia de la membrana nuclear de células epiteliales

proteolizando a diferentes nucleoporinas (NUPs) e induciendo la pérdida de integridad de membrana nuclear y la apoptosis. Sin embargo, en los adipocitos, la CAPN1 se internaliza en el núcleo induciendo la diferenciación de los mismos a través del remodelado de la cromatina y la activación de genes específicos de la adipogénesis [19].

El contexto biológico también determina la localización de las CAPNs en la célula. Se ha visto que durante el proceso de diferenciación de los adipocitos, la CAPN1 se localiza en el nucléolo y la periferia nuclear de fibroblastos 3T3-L1 mientras que la CAPN2, aunque también se localiza en el núcleo, lo hace principalmente en el citosol. Sin embargo, en adipocitos completamente diferenciados ya no encontramos ninguna de las dos isoformas en el núcleo; la CAPN1 se encuentra prácticamente restringida a la membrana celular, mientras que la CAPN2 se localiza exclusivamente en el citosol [98]. Del mismo modo, se ha descrito que la distribución de la CAPN2 depende de la fase del ciclo celular; encontrándose en el núcleo de células desdiferenciadas en proliferación [15, 93, 108] y en el citosol de células quiescentes diferenciadas [15]. Además, nuestro grupo describió que, en un modelo fisiológico de involución de la glándula mamaria, la CAPN2 se encuentra en la membrana plasmática proteolizando complejos de adhesión de células epiteliales. Sin embargo, en un modelo patológico de cáncer de mama, la CAPN1 es la que se localiza en la membrana plasmática de las células proteolizando proteínas de adhesión y promoviendo la migración e invasión celular [28].

### 3.1 MECANISMOS DE DISTRIBUCIÓN

La localización de las CAPNs en la célula es un factor determinante de la regulación de sus funciones fisiológicas y patológicas. Bajo ciertos estímulos, se ha observado que las CAPNs se transportan de un compartimento celular a otro. De ese modo se consigue acotar la variedad de proteínas con las que interaccionan y regular su función. Se ha encontrado actividad CAPN en:

## INTRODUCCIÓN

### 3.1.1 Membrana plasmática

Existen numerosos estudios en los que se ha descrito la presencia de las CAPN1 y CAPN2 en la membrana plasmática. La CAPN2 se localiza en la membrana de fibroblastos gracias a su interacción con los PIP2, lo que permite su activación vía ERK/MAP quinasa y su participación en el proceso de regulación de la migración celular [68]. Durante la migración celular, los PIP2 se concentran específicamente en la parte posterior o anterior de la célula polarizando la distribución de la CAPN2 en la misma y promoviendo su migración [66]. Por otro lado, la localización en la membrana plasmática de las CAPN1 y CAPN2 promueve la migración al proteolizar proteínas de adhesión celular [28] y proteínas que favorecen el desensamblaje celular [17, 77].

La localización de las CAPNs en la membrana plasmática podría estar implicada en procesos patológicos como la neurodegeneración. Las CAPNs actúan regulando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática de las neuronas mediante la proteólisis de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática. Dicha proteólisis reduce la capacidad de la célula para mantener la homeóstasis causando neurodegeneración. Además, las CAPNs ejercen su actividad sobre los receptores NMDA. El producto de proteólisis del receptor mGluR-1 $\alpha$  es incapaz de activar la vía neuroprotectora de PI<sub>3</sub>K-Akt contribuyendo a la degeneración neuronal [110].

### 3.1.2 Citoplasma

Un gran número de sustratos de las CAPNs se encuentran en el citosol como son las caspasas, implicadas en la apoptosis celular [36], o proteínas que promueven la diferenciación celular [111]. Las CAPNs intervienen en la muerte celular al proteolizar caspasas en el citosol y activarlas (caspasa-3,-7,-12) o inactivarlas (caspasa-9) [83–87]. Además, las CAPNs, actuando sobre dianas citosólicas, pueden modular procesos como la diferenciación celular. Se ha descrito que las CAPNs proteolizan a c-Myc en el citoplasma, escindiendo su señal de localización nuclear (NLS) y su



dominio de unión a DNA. El producto de c-Myc quedaría retenido en el citosol, promoviendo la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina y la diferenciación muscular [111].

### 3.1.3 Mitocondria

La CAPN1 actúa sobre miembros de la familia BCL-2 como BAX o BID en la mitocondria promoviendo la apoptosis de células de melanoma y de cáncer de mama y pulmón, a través de la liberación del citocromo c [90]. La proteólisis de BAX en la membrana externa mitocondrial, genera un fragmento pro-apoptótico de 18kDa que induce la apoptosis de células de CRC [112]. No solo la CAPN1 se localiza en la mitocondria sino que se ha detectado la presencia de ambas isoformas en la mitocondria del cerebro de ratas neonatales [113]. En este orgánulo, las CAPNs actúan de manera coordinada para proteolizar el factor inductor de la apoptosis (AIF) y liberar el producto truncado (tAIF) al citosol. En concreto, la CAPN1 proteoliza a AIF en el espacio intermembrana de la mitocondria y la CAPN2 media la liberación de tAIF a través de los poros mitocondriales. Una vez en el citosol, tAIF se dirige al núcleo donde induce la neuroapoptosis [113].

Además, se ha observado que las CAPNs son capaces de intercambiar el destino celular de autofagia a apoptosis. Al actuar sobre la proteína que induce la formación de autofagosomas (ATG5), las CAPNs cambian su localización del citosol a la mitocondria donde se asocian con Bcl-xL desencadenando la liberación del citocromo c, de AIF y de otras proteínas proapoptóticas [114].

### 3.1.4 Lisosoma

Los lisosomas contienen hidrolasas, entre las cuales se encuentran las catpsinas y enzimas digestivas que degradan gran cantidad de macromoléculas para su posterior reutilización [115]. Durante la involución de la glándula mamaria tras la lactancia, la CAPN1 se trasloca a los lisosomas de las células epiteliales desencadenando la muerte celular. Es allí, donde actúa sobre la proteína 2 de membrana asociada al lisosoma (LAMP2A) y la subunidad B2 de la ATPasa tipo V

## INTRODUCCIÓN

(VATB2), provocando la permeabilización de la membrana lisosomal. La liberación del contenido lisosomal con las catepsinas y las enzimas digestivas, desencadena la muerte celular por la vía lisosomal [116, 117]. Un estudio reciente en células del conducto colector de riñón con depleción de Policistina-1, describe una sobreactivación de las CAPNs por un elevado flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  [118]. De ese modo, la CAPN provoca la pérdida de la integridad lisosomal al proteolizar proteínas que promueven la permeabilización de la membrana lisosomal de las células de riñón.

### 3.1.5 Aparato de golgi

Como ya se ha comentado, las CAPNs han sido ampliamente estudiadas en neurodegeneración. De hecho, un estudio reciente demuestra que la CAPN actúa sobre la GTPasa Rap1 en el AG promoviendo la degradación neuronal [119]. En condiciones basales de  $\text{Ca}^{2+}$ , la CAPN1 se encuentra inactiva al estar unida junto a CAST en la membrana interna del AG. Cuando se produce un daño neuronal, la excitotoxicidad inducida por una sobreactivación de los receptores NMDA, produce un incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , y con ello, la activación de la CAPN1 que induce neurodegeneración al procesar componentes de la vía Rap1 asociados al AG [119].

### 3.1.6 Retículo endoplasmático

Las CAPNs están implicadas en el proceso de muerte celular en respuesta al estrés del RE. Tras el estímulo de estrés, se incrementa el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE favoreciendo la unión y activación de la CAPN2 en la membrana del RE. A su vez, la CAPN2 proteoliza y activa a la caspasa-12 induciendo la apoptosis [87, 120]. También se ha descrito, que las CAPNs convencionales proteolizan a la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplasmático/ER (SERCA), una proteína que secuestra iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE mediante un proceso que requiere energía. En presencia de elevados niveles de radicales libres, SERCA se encuentra en su estado oxidado, incrementando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol que activan a las CAPNs. La proteólisis de SERCA en la membrana del RE mediada por las CAPNs desencadenan isquemia cardiaca [121].

### 3.1.7 Núcleo

Un gran número de estudios se han centrado en la actividad CAPN en diversos orgánulos o compartimentos celulares; siendo el núcleo uno de los menos estudiados. Como ocurre con otros compartimentos, las CAPNs pueden actuar indirectamente sobre el núcleo celular, escindiendo proteínas citosólicas que, una vez proteolizadas se traslocan al núcleo donde desempeñan una función concreta [110]. Es el caso de la  $\beta$ -catenina que se encuentra en el citosol de las neuronas. Tras su proteólisis por la CAPN1, el producto se trasloca al núcleo donde induce la transcripción de genes que promueven la apoptosis neuronal [88]. Las CAPNs también median la muerte celular activando a CDK5. En respuesta al estrés del RE, las CAPNs proteolizan a p35 produciendo un fragmento más estable llamado p25 que se une a CDK5. El complejo citosólico CDK5-p25 se trasloca al núcleo induciendo la apoptosis neuronal [89]. Recientemente se ha descrito la proteólisis de junctofilina-2 (JPH2) mediada por CAPN2 produciendo un péptido de 25kDa que se trasloca al núcleo de cardiomiocitos durante la insuficiencia cardíaca [122]. Por otro lado, las propias CAPNs pueden relocalizarse en las diferentes subestructuras nucleares:

#### **i) Membrana nuclear**

Las CAPNs tienen un papel importante en la muerte celular por la pérdida de integridad de la membrana nuclear. Al proteolizar proteínas del complejo del poro nuclear como Nup62, Nup98 y Nup153, alteran el transporte nuclear desencadenando la apoptosis [19, 123].

#### **ii) Nucleoplasma**

Las CAPNs participan en la regulación de procesos fisiológicos en el nucleoplasma. Anteriormente se ha citado que intervienen en el control del ciclo celular al proteolizar ciclinas [109, 124], inhibidores de quinasas dependientes de ciclina [18], así como de factores de transcripción [125, 126] en el nucleoplasma. También se ha visto que, durante la involución de la glándula mamaria, la CAPN1 induce la expresión génica y diferenciación de los adipocitos proteolizando el extremo N-terminal

## INTRODUCCIÓN

de la histona H3 en la cromatina [19]. Además, la administración de fármacos como el isoproterenol y la angiotensina II, promueven el transporte de la CAPN2 al núcleo induciendo la apoptosis de cardiomiocitos vía  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina proteína quinasa II (CaMKII $\delta$ B) [127, 128].

Por otro lado, las CAPNs intervienen en procesos patológicos modulando proteínas en el nucleoplasma. Se ha observado que las CAPNs promueven la neurodegeneración al disminuir la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina proteína quinasa IV (CaMKIV) en el núcleo de las neuronas granulares del cerebelo [129]. Además, promueven la muerte celular de neuronas del cerebelo proteolizando y sobreactivando a poli ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP) [130]. Un estudio en células de cáncer de colon puso de manifiesto que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la activación y la traslocación de la CAPN2 del citosol al nucleoplasma. Es allí, donde proteoliza a la DNA topoisomerasa-1, confiriendo protección a la célula frente a la citotoxicidad producida tras la administración de camptotecina, fármaco usado para tratar el cáncer de colon [131]. Recientemente se ha publicado actividad CAPN en el núcleo de células de glioblastoma inhibiendo la migración celular. El factor nuclear-1 tipo B (NFIB) promueve la activación de la CAPN1 al favorecer su autólisis y posterior traslocación al núcleo, donde ejercerá su actividad proteolítica suprimiendo la migración celular [132].

### iii) Nucléolo

El nucléolo es una subestructura nuclear, libre de membrana, formado por proteínas, DNA y RNA [133]. Su principal función es la biogénesis ribosomal [134-135] pero se le ha relacionado con otras funciones, no menos relevantes, como la muerte celular [136] o la regulación del ciclo celular y proliferación [137]. Se ha descrito en la literatura, la desregulación de las funciones nucleolares durante la progresión tumoral [138–143].

La CAPN3 fue la primera isoforma descrita en el nucléolo de células de melanoma [144]. La localización nucleolar de la CAPN3 se debe a la presencia de una

señal de localización nucleolar (NoLS) en dos variantes alternativas de la proteasa [144] y a su interacción con la proteína nucleolar Def, que permite su internalización [99]. La fosforilación de la proteína Def en 5 residuos de serina en su extremo N-terminal, permite que se pueda unir y reclutar a la CAPN3 en el nucléolo donde proteoliza a p53, permitiendo la progresión del ciclo celular [99, 100].

La CAPN3 era la única isoforma identificada en el nucléolo hasta que nuestro grupo descubrió la presencia de la CAPN2 en el nucléolo de CRC [134]. El estudio describió que la CAPN2 nucleolar suprimía la biogénesis ribosomal en condiciones de falta de nutrientes. Observaron que, en ausencia de suero, la distribución nucleolar de la CAPN2 dependía del estado mutacional del gen KRAS. En las células KRAS<sup>WT/-</sup> cultivadas en ausencia de suero, se inducía la expresión de la CAPN2, su acumulación nucleolar y su unión al promotor de rDNA y las regiones intergénicas; todo ello desencadenaba una reducción de los niveles de pre-RNA 47S. Sin embargo, en células tumorales KRAS<sup>G13/-</sup> con un único alelo de KRAS mutado, se reducía la expresión de la CAPN2, su acumulación nucleolar y su unión al rDNA; mostrándose unos niveles de pre-RNA 47S invariables en respuesta a la falta de suero [134].

## 3.2 MECANISMOS REGULADORES

Además de la fosforilación, la unión a fosfolípidos o la interacción con la CAST o la CAPNS1 descritos anteriormente, existen otros mecanismos que pueden modular la distribución subcelular de las CAPNs:

### 3.2.1 Secuencias específicas

Determinadas secuencias específicas de la enzima, pueden influir en su localización. Se ha publicado que, tanto la subunidad catalítica de la CAPN1 como la reguladora se encuentran en los espacios intermembrana de la mitocondria. Esto es debido a una secuencia de localización mitocondrial de 26 aa presente en la región N-terminal de la subunidad catalítica de la enzima [145].

## INTRODUCCIÓN

La CAPN2 se encuentra en el nucléolo de células de cáncer de colon y de cáncer de mama en proliferación [98, 134]. Nuestro grupo describió la presencia de una NoLS no reconocida, rica en lisina y arginina en la secuencia de aa de la CAPN2, que podría mediar su internalización nucleolar [98]. En ese sentido, se sabe que las moléculas con secuencias cargadas positivamente interactúan con el rDNA o los rRNAs acumulándose en el nucléolo. Teniendo en cuenta estos aspectos, nuestro grupo demostró, mediante análisis bioinformático, que la CAPN2 contiene una secuencia que cumplía con todos los parámetros para ser reconocida como una NoLS: es rica en lisina y arginina, está cargada positivamente y solapa con una NLS y una región desorganizada de la CAPN2 [98].

### 3.2.2 Dominios PDZ: interacciones proteína-proteína

Los dominios PDZ de una proteína son unos módulos de interacción con otras proteínas. Están compuestos por unos pocos aa que, generalmente, reconocen el extremo C-terminal de la proteína diana [146–148]. Sin embargo, en algunos casos pueden reconocer una secuencia interna de su diana [149–151]. Normalmente, las proteínas que contienen un dominio PDZ se localizan en compartimentos celulares específicos, participando en múltiples rutas de señalización celular [152, 153]. De ahí la importancia en caracterizar las interacciones entre los dominios PDZ, así como su regulación.

Las CAPNs convencionales poseen en su extremo C-terminal diferentes dominios PDZ muy conservados en vertebrados. La CAPN1 contiene un dominio PDZ atípico de clase II y la CAPN2 un dominio PDZ típico de clase I. Esta característica le conferiría a ambas isoformas la capacidad de unirse a distintas proteínas y de participar en rutas de señalización separadas [23]. Determinados estudios en neuronas exponen que las diferencias entre los dominios PDZ de la CAPN1 y la CAPN2, permiten que las proteasas se localicen en distintos compartimentos subcelulares y participen en diferentes vías de señalización; la CAPN1 en la vía neuroprotectora y la CAPN2 en la neurodegenerativa [24].

## 4. CALPAÍNAS Y CÁNCER

Se ha citado anteriormente que las CAPNs participan en procesos fisiológicos tan relevantes como la migración [17], la apoptosis [109], la división y proliferación celular [134], o la diferenciación [19]. Alteraciones o mutaciones en diferentes CAPNs pueden desencadenar patologías como el alzheimer [154], la distrofia muscular de cintura [155], la úlcera gástrica [156], la diabetes tipo 2 [157] o el cáncer [22, 36, 109, 158]. En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos en los que las CAPNs se encuentran desreguladas en cáncer y el tipo de alteración que desencadena la enfermedad.

**Tabla 2:** *Desregulación de las calpaínas en cáncer.*

GEN	ALTERACIÓN	CÁNCER
CAPN1	Sobreexpresión	Cáncer de mama [159]
		Carcinoma renal [160]
CAPN2	Sobreexpresión	Cáncer de mama [161]
		Cáncer de colon [162]
CAPNS1	Sobreexpresión	Cáncer de ovario [163]
		Glioma [164]
CAPN3	Sobreexpresión	Melanoma [165]
		Cáncer urotelial [166]
CAPN6	Sobreexpresión	Cáncer de hígado [167]
		Cáncer uterino [168]
CAPN9	Disminución de la expresión	Cáncer gástrico [169]
CAPN10	Polimorfismos que influyen en la susceptibilidad al cáncer	Cáncer de laringe [170]
	Sobreexpresión	Cáncer de mama [171]

Como ya se ha descrito, una desregulación del sistema CAPN puede resultar en un proceso oncogénico al incrementar la proliferación de células tumorales, su supervivencia y su capacidad de migración e invasión [22, 36, 109, 158]. Una de las

## INTRODUCCIÓN

características de las células tumorales, además de las mencionadas anteriormente, es la de estimular la angiogénesis. Las CAPNs intervienen en este proceso al modular la proliferación de las células endoteliales [172]. El crecimiento del tumor crea unas condiciones de hipoxia que promueven la activación de las CAPNs. El procesado de filamina-A por parte de las CAPNs produce un incremento de la expresión de proteínas que favorecen la angiogénesis como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el EGF y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) [172, 173].

### 4.1 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres de todo el mundo. Alrededor de 1.7 millones de mujeres son diagnosticadas de cáncer de mama al año, convirtiendo esta enfermedad en una prioridad global. Muchas de las investigaciones en cáncer de mama basan sus esfuerzos en encontrar nuevas dianas moleculares y estrategias de tratamiento [174].

#### 4.1.1 Clasificación

Los marcadores moleculares más usados para la detección del cáncer de mama son los receptores que expresan las células tumorales en su membrana: el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR) o el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) [174]. Mediante técnicas inmunohistoquímicas y *microarrays* que miden los niveles de expresión de los receptores, se ha establecido una clasificación molecular de los subtipos de cáncer de mama; los subtipos Luminal A (ER+, PR±, HER2-) y Luminal B (ER+, PR±, HER2±) son los que presentan un mejor pronóstico; aunque debido a la menor tasa proliferativa del subtipo Luminal A, su tasa de supervivencia es mayor que el subtipo Luminal B [175–177]. El subtipo HER2+, (ER-, PR-, HER2+) presenta una buena respuesta a la quimioterapia pero un peor pronóstico debido al elevado riesgo a una recaída [175, 176, 178]. El subtipo triple negativo (TNBC) que se caracteriza por la falta de expresión de los tres receptores, es el más agresivo y con peor pronóstico [179].



Este subtipo se subdivide a su vez, en tumores basales, tumores con expresión tipo normal o tumores de baja expresión de claudina [180]. Los primeros, se expresan en células epiteliales y mioepiteliales de mama y son positivos para citoqueratinas y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Los segundos, se expresan en células epiteliales y, a diferencia de los anteriores, no expresan citoqueratinas ni EGFR. Sin embargo, poseen un mejor pronóstico. Los últimos, se expresan en las células madre y se caracterizan por la baja expresión de proteínas de unión célula-célula como la E-cadherina o la claudina. A pesar de incluirse en el subtipo TNBC, no todos los tumores basales o de baja expresión de claudina presentan un perfil TNBC. Alrededor del 25% de los tumores basales y entre el 15-25% de baja expresión de claudina son HER2+ [180, 181].

El análisis del patrón de expresión de los marcadores de cáncer de mama ha permitido predecir la respuesta a un determinado tratamiento [178]. Los tumores del tipo Luminal A, responden a la terapia hormonal (tamoxifen o inhibidores de la aromatasas). Los del tipo Luminal B, son tratados con terapia hormonal y, en el caso de los Luminal B HER2+, con terapia hormonal y trastuzumab. Los pacientes HER2+, son tratados con trastuzumab en combinación con paclitaxel, gemcitabina, vinorelbina o carboplatina. En aquellos pacientes con resistencia a trastuzumab, da resultado el uso de lapatinib [178].

Los avances en los métodos de detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama han conseguido mejorar el resultado clínico. Estos avances han sido posibles gracias a los estudios *in vivo* o *in vitro* con líneas celulares de cáncer de mama [182]. Estas líneas, además de ser un modelo representativo de los diferentes subtipos de cáncer de mama, poseen la ventaja de ser una fuente ilimitada de material de estudio. Hasta la fecha, se han caracterizado 84 líneas de BCC que reflejan el perfil molecular observado en tumores de mama [183]. A su vez, estas se dividen en diferentes categorías que se corresponden con la clasificación de los tumores de mama. Cabe remarcar la necesidad de escoger el tipo celular adecuado para el experimento a realizar [175, 182, 183].

### 4.1.2 Papel de las calpaínas en cáncer de mama

Las CAPNs están implicadas en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama [25]. Ensayos sobre la progresión tumoral en cáncer de mama indican que, ratones con cáncer de mama *KO* condicionales para la CAPN2, resultan en una reducción de la tasa de proliferación del tumor y un aumento en la expresión del gen supresor de tumores p27 [184]. Además, la inhibición de la actividad CAPN en modelos de ratón con cáncer de mama HER2+, reduce el tamaño del tumor [185]. Los niveles de expresión de las CAPNs se han intentado asociar con la tasa de supervivencia del paciente. En ese sentido, unos niveles elevados de expresión de la CAPN2, comúnmente se han relacionado con un resultado adverso en tumores de mama con fenotipo triple negativo. Sin embargo, se ha visto que tumores TNBC con bajos niveles de expresión de la CAPN2, presentan la misma tasa de supervivencia que los tumores luminales o HER2+ [25].

A su vez, los niveles de expresión de las CAPNs se han intentado utilizar sin éxito como un factor con valor pronóstico frente al tratamiento del cáncer de mama con anti-tumorales. La sobreexpresión de la CAPN2 en tumores de mama no inflamatorios que se han tratado con quimioterapia y son operables, parecía mejorar la tasa de supervivencia [186]. Por el contrario, niveles elevados de CAPN1 se relacionaron con una mayor tasa de recaída en tumores HER2+ tratados con trastuzumab y quimioterapia [187]. Sin embargo, estudios recientes asocian unos niveles elevados de CAPN1 con una mejora de la tasa de recaída en los pacientes con cáncer de mama y con un incremento en la supervivencia de pacientes TNBC [188]. Estos datos contradicen a los anteriores, incitando a pensar que, el papel de las CAPNs en la progresión, pronóstico y respuesta al tratamiento de cáncer de mama no depende únicamente de sus niveles de expresión.

Se ha sugerido que las CAPNs podrían intervenir en la resistencia de la célula ante determinados tratamientos contra el cáncer de mama. La literatura ha descrito que la CAPN1 confiere resistencia a trastuzumab regulando la activación de HER2 y PTEN/Akt en líneas celulares HER2+ de cáncer de mama [189]. La

sobreexpresión de la CAPN2 induce resistencia a doxorubicina en BCC mediante la acumulación citoplasmática de la topoisomerasa II $\alpha$  truncada que reduce la eficacia del tratamiento [190]. Existen evidencias de que la CAPN1 permite que las BCC adquieran resistencia a la terapia hormonal con fulvestrant al promover la metástasis celular [191]. Estos estudios remarcan la dificultad de desarrollar fármacos para modular la actividad calpaína como tratamiento frente al cáncer, puesto que la inhibición de ésta podría tener tanto efectos beneficiosos como perniciosos en los pacientes oncológicos.

Como se ha mencionado, a pesar de que la CAPN1 y la CAPN2 se encuentran sobreexpresadas en varios tipos de cáncer, la relación entre la expresión de las CAPNs y la progresión tumoral o la resistencia a terapias es controvertida. Esto plantea que no es la expresión global de las CAPNs, sino más bien un conjunto de factores como el tipo celular, la distribución subcelular de la proteasa o la fase en la que se encuentra el tumor, los implicados en el proceso de desregulación de las CAPNs durante la progresión tumoral y la respuesta a terapias.

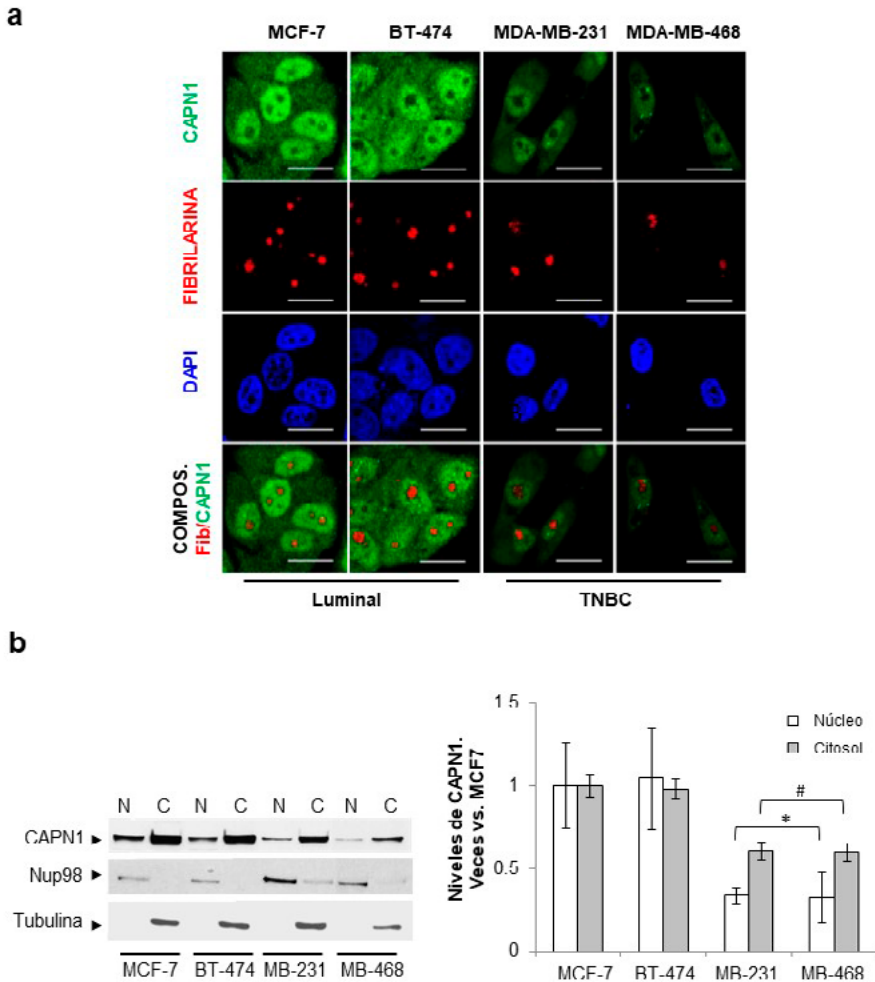
#### 4.1.3 Distribución subnuclear de las calpaínas en líneas celulares de cáncer de mama

Como se ha venido comentando, en nuestro laboratorio ya se había descrito la presencia de CAPNs en diferentes modelos *in vitro* de CRC y en adipocitos en diferenciación, en los que se había estudiado la localización subcelular de estas proteasas y más concretamente su presencia en el núcleo y nucléolo de la célula [19, 134]. El nucléolo es una subestructura nuclear libre de membrana [133]. La composición del nucléolo puede verse afectada por el fenómeno de separación de fases líquido-líquido (LLPS) [192]. Este fenómeno biofísico, le permite concentrar determinadas moléculas en una zona específica y excluir otras [193]. La ausencia de membrana, favorece que el nucléolo se ensamble y se disuelva en respuesta a determinados estímulos o fases del ciclo celular; punto importante en el mantenimiento de la integridad celular y la homeostasis [192, 194]. Este ensamblaje y

## INTRODUCCIÓN

desensamblaje permite que determinados componentes de la estructura subnuclear cambien su ubicación de manera temporal a otras subestructuras donde son modificados, retenidos y/o liberados [193, 194]. El constante tráfico de proteínas entre el nucléolo y el nucleoplasma contribuye a los cambios dinámicos en las interacciones entre los componentes del núcleo. Estos procesos son cruciales para el correcto desarrollo de funciones celulares como la proliferación o la muerte celular [193]. La CAPN2 podría modular estos cambios mediante el procesado de las proteínas que participan en las interacciones entre componentes nucleares.

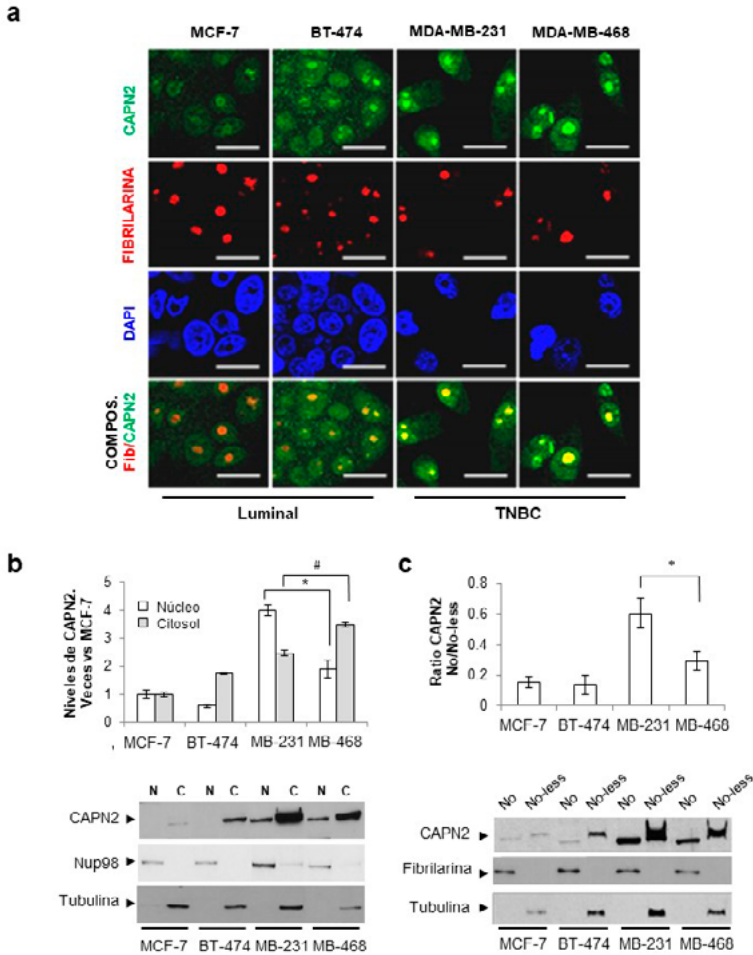
En ese sentido, estudios posteriores del grupo en líneas celulares de cáncer de mama mostraron que los niveles de expresión de ambas CAPNs dependían del tipo de cáncer. Sin embargo, la localización subnuclear de las CAPNs no era dependiente del tipo de cáncer, sino más bien del proceso biológico. Los datos mostraron que las líneas luminales (MCF-7 y BT-474) expresaban elevados niveles de CAPN1 y bajos de CAPN2. Sin embargo, ocurría lo contrario en las líneas TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) [28]. El análisis de la distribución subcelular de CAPN1 en las diferentes BCC, detectó la presencia de la proteína en el nucleoplasma de todos los subtipos, sin acumularse en ninguna región concreta (Figura 6) [98].



**Figura 6: Distribución subcelular de la CAPN1 en líneas celulares de cáncer de mama.** a) Tinción de inmunofluorescencia (IF) de la CAPN1 (verde), fibrilarina (rojo) en células luminales y TNBC. El núcleo se tiñó con DAPI (azul). Escala de 25  $\mu$ m. b) Western blot (WB) de los niveles de CAPN1 en fracciones citosólicas (C) y nucleares (N). Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y normalizaron con Nup98 (N) y tubulina (C). La gráfica muestra los niveles de CAPN1 representados como la media de veces  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.01$  vs. núcleo de células MCF-7 y # $p \leq 0.01$  vs. citosol de células MCF-7 [98].

## INTRODUCCIÓN

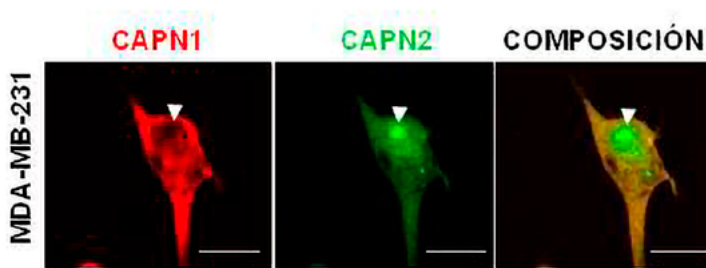
El análisis de la distribución subcelular de CAPN2, detectó también la presencia de CAPN2 en el nucleoplasma de todos los subtipos a estudio. Sin embargo, como se observa en la figura 7 a, la colocalización de la CAPN2 con el marcador nucleolar fibrilarina, indica una fuerte acumulación de la CAPN2 en el nucléolo y la región perinucleolar, tanto en células luminales como TNBC. El ensayo parecía mostrar que las líneas TNBC, con mayores niveles de expresión de la CAPN2, presentaban mayores niveles nucleares y nucleolares de la CAPN2 que las líneas luminales (Figura 7 b y c) [98].



**Figura 7: Distribución subcelular de la CAPN2 en líneas celulares de cáncer de mama.** a) IF de CAPN2 (verde) y fibrilarina (rojo) en células luminales (MCF-7 y BT-474) y TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala de 25  $\mu$ m. b) Niveles de CAPN2 analizados mediante WB en fracciones citosólicas (C) y nucleares (N). Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y normalizaron con Nup98 (N) y tubulina (C). La gráfica muestra los niveles de CAPN2 representados como la media de veces  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.01$  vs. núcleo de células MCF-7 y # $p \leq 0.01$  vs. citosol de células MCF-7. c) WB de los niveles de CAPN2 en las fracciones nucleolar (No) y no nucleolar (No-less). Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y normalizaron con fibrilarina (No) y tubulina (No-less). La ratio de la CAPN2 Nucleolar/No-Nucleolar se representa como la media  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.01$  vs. células MCF-7 [98].

## INTRODUCCIÓN

Además, las CAPN1 y CAPN2 presentaban una colocalización limitada en las células MDA-MB-231, siendo la CAPN2 la que se acumulaba fuertemente en el nucléolo y la región perinucleolar (Figura 8). Estos datos parecían indicar que ambas proteínas tenían funciones no redundantes en el núcleo de la célula, atribuyendo un posible papel específico de la CAPN2 en dicho compartimento. Además, el estudio sugirió que la abundancia nuclear y nucleolar de la CAPN2 podría depender de sus niveles de expresión en cada subtipo de BCC [98].



**Figura 8:** Colocalización de las CAPN1 y CAPN2 en la línea celular MDA-MB-231. Análisis de colocalización de la CAPN1 (rojo) y la CAPN2 (verde) por IF con  $\alpha$ -CAPN1 de ratón y  $\alpha$ -CAPN2 de conejo en células MDA-MB-231. Escala de 15  $\mu$ m. Imagen representativa. La punta de flecha muestra una región subnuclear sin colocalización de ambas CAPNs [98].



# OBJETIVOS



# OBJETIVOS

En esta tesis, planteamos como objetivo global, determinar el papel iso-forma-específico de la CAPN2 nuclear en el desarrollo y/o progresión tumoral. Análisis funcionales que nos proponemos abordar mediante aproximaciones proteómicas, moleculares y de microscopía confocal en líneas celulares de cáncer de mama humanas atendiendo a los diferentes subtipos más representativos. En concreto, proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación del mecanismo de retención de la CAPN2 en el nucléolo de células tumorales en proliferación: Estudio de la abundancia de la CAPN2 como factor determinante de su acumulación nucleolar y peri-nucleolar en líneas celulares de cáncer de mama.
2. Identificación del proteoma nucleolar dependiente de CAPN2.
  - 2.1 Validación de datos derivados del análisis proteómico en células MDA-MB-231.
  - 2.2 Selección de una posible diana nucleolar de la CAPN2 y estudio de la relación entre el subtipo de cáncer de mama y la expresión/actividad de la CAPN2 sobre dicha diana.
3. Estudio del mecanismo molecular por el cual la CAPN2 regula la función de la diana nucleolar seleccionada: relación entre la expresión de la CAPN2 y su efecto sobre la célula.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. CULTIVO CELULAR

Los experimentos realizados se llevaron a cabo *in vitro* usando líneas celulares de cáncer de mama. Se escogieron dos subtipos luminales y dos TNBC como modelos representativos de cáncer de mama atendiendo a las diferencias de expresión de la CAPN2 y estatus hormonal. Se usaron las líneas luminales, MCF-7 (ATCC HTB-22) y BT-474 (ATCC HTB-20) y las líneas TNBC, MDA-MB-231 (ATCC HT-26) y MDA-MB-468 (ATCC HT-132). Todas las líneas celulares fueron adquiridas de *American Type Culture Collection* (ATCC) y cultivados en *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM) (22320-022, Gibco) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (16140-017, Gibco), penicilina/estreptomicina al 1.0% (K952, Amresco) y L-glutamina al 1.0% (G7513, Sigma). Las células se mantuvieron bajo condiciones estándar de humedad en un incubador a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2. INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD CALPAÍNA

La actividad CAPN se inhibió en las células de las líneas TNBC administrando un inhibidor específico, calpeptina (CAS 117591-20-5, Calbiochem) a una concentración final de 50µM. La calpeptina se había reconstituido previamente en DMSO (D2650, Sigma), por lo que a las células control se les administró el mismo volumen de vehículo. El efecto de la inhibición de la actividad CAPN se analizó mediante WB a partir de extractos proteicos totales obtenidos de los lisados celulares a las 24 horas del tratamiento con calpeptina.

### 3. SILENCIAMIENTO DE CAPN2 Y LIMK1

Las células MDA-MB-231 fueron transfectadas con diferentes RNAs de interferencia humanos para silenciar las proteínas CAPN2 o LIMK1. Dependiendo del experimento a realizar, se usó siCAPN2 (EHU025391, Sigma) o siLIMK1 (EHU073301, Sigma). Como control de la transfección (scrRNA), se usó un control negativo universal #1 siRNA (SIC001, Sigma).

Para el silenciamiento en las células MDA-MB-231, se llevó a cabo una transfección reversa. Brevemente, se realizó una dilución del siRNA a una concentración final de 30nM en medio Opti-Mem (31985070, Gibco). Por separado, se diluyó el mismo volumen del reactivo de transfección lipofectamina (L3000-008, Invitrogen) que de siRNA en Opti-Mem y se incubaron ambas diluciones 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió gota a gota el siRNA diluido sobre la mezcla de la lipofectamina y se incubó 5 minutos más a TA.

Posteriormente esta mezcla se agitó 20 segundos con un vortex y se incubó 20 minutos a TA. Seguidamente, se añadió la mezcla de la transfección sobre una placa de cultivo que contenía DMEM sin antibióticos y sobre ello, se sembraron las células MDA-MB-231. Las cantidades de los reactivos usados, así como el número de células sembrado dependiendo del tamaño de la placa de cultivo, se indican en la tabla 3.

Las células se incubaron con la mezcla de la transfección en DMEM sin antibióticos durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio a DMEM con antibióticos. La eficiencia del silenciamiento se analizó a las 72 horas de la transfección midiendo los niveles del mRNA de la CAPN2 mediante RT-qPCR en el extracto de RNA en células control o silenciadas, o mediante WB con los anticuerpos anti-CAPN2 o anti-LIMK1 en el extracto de proteínas de células control o silenciadas.



**Tabla 3: Condiciones usadas para la transfección reversa en células MDA-MB-231.**

Placa de cultivo	siRNA/ Lipofectamina ( $\mu$ l)	Opti-Mem ( $\mu$ l)	Número células	V final (ml)
150mm (151cm <sup>2</sup> )	23	1300	3 x 10 <sup>6</sup>	16
100mm (56.7cm <sup>2</sup> )	9	500	8 x 10 <sup>5</sup>	6
60mm (21.5cm <sup>2</sup> )	3	250	3.7 x 10 <sup>5</sup>	2
35mm (9.6cm <sup>2</sup> )	2.25	125	1.8 x 10 <sup>5</sup>	1.5

#### 4. SOBREENPRESIÓN DE LA CAPN2

Para sobreexpresar la CAPN2 en células MCF-7 se usaron constructos de CAPN2 (OHu23853C, GenScrip) y su versión truncada (OHu56639C, GenScrip) clonados en el vector de expresión pcDNA3.1(+) con un epítipo DYKDDDDK en el extremo N-terminal. El constructo DYK-CAPN2 expresa la CAPN2 completa (1-700 aa) y el constructo DYK- $\Delta$ CAPN2 expresa la CAPN2 truncada (1-447 aa), de la que se ha eliminado la porción C-terminal con el motivo PDZ. Como control, se usó un vector vacío MSCV (Mock).

En este caso, para la sobreexpresión de la CAPN2 se realizó una transfección directa. Las células se sembraron en DMEM con antibióticos de tal modo que, a las 24 horas se encontraran entre el 70-80% de confluencia (ver tabla 4). Para la transfección, se diluyó el cDNA y el reactivo P3000 a una concentración de 2 $\mu$ l por  $\mu$ g de cDNA (L3000-008, Invitrogen) en Opti-Mem (ver tabla 4). Por separado, se diluyó el mismo volumen de lipofectamina que de cDNA en Opti-Mem y se incubaron ambas diluciones 5 minutos a TA. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió gota a gota el cDNA diluido sobre la mezcla de lipofectamina.

La mezcla se incubó 5 minutos a TA seguido de 20 segundos de agitación con el vortex y posterior incubación de 20 minutos a TA. Mientras tanto, a las

## MATERIALES Y MÉTODOS

células que estaban creciendo al 70-80% se les cambió el medio a DMEM sin antibióticos y, por último, se añadió la mezcla de transfección sobre ellas. A las 24 horas se les cambió el medio a DMEM con antibióticos y, a las 48 horas se analizó la eficiencia de la sobreexpresión mediante WB con  $\alpha$ -CAPN2 y  $\alpha$ -DYK.

**Tabla 4:** Condiciones usadas para la transfección directa en células MCF-7.

Placa de cultivo	cDNA ( $\mu$ g)	Opti-Mem ( $\mu$ l)	Número células	V final (ml)
60mm (21.5cm <sup>2</sup> )	5	250	2.8 x 10 <sup>6</sup>	2
35mm (9.6cm <sup>2</sup> )	3	125	9 x 10 <sup>5</sup>	1.5

## 5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Previo a la extracción de proteínas, las células se lavaron con tampón fosfato salino 1x (PBS) suplementado con el inhibidor de fosfatasa 1 $\mu$ l/ml, para poder analizar posteriormente fosforilaciones. Las proteínas totales se extrajeron con tampón RIPA a 4°C (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.4mM, SDS 0.1% (p/v), Tritón-X100 1.0% (v/v), NaCl 0.1M) suplementado con deoxicolato sódico 0.5% (p/v) (2061327, Fluka), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1mM (PMSF, P7626, Sigma), inhibidor de proteasas 2 $\mu$ l/ml (P8340, Sigma) e inhibidor de fosfatasa 5 $\mu$ l/ml (524627, Calbiochem). Tras recoger las muestras con ayuda de raspadores, se agitaron con el vortex y se incubaron 30 minutos a 4°C. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 14000g durante 30 minutos a 4°C. La fracción sobrenadante con el extracto proteico se recogió y congeló a -80°C. Las proteínas se cuantificaron con el kit BCA Protein assay (23225, ThermoFisher), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

## 6. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

### 6.1 EXTRACCIÓN DE LAS FRACCIONES NÚCLEO/CITOSOL

Las fracciones nucleares y citoplasmáticas de células MDA-MB-231 ( $8 \times 10^5$ ) control y silenciadas para la CAPN2 se extrajeron usando el kit *Nuclear Extract* (40010, Active Motif) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. De forma descriptiva, las células transfectadas con scRNA y siCAPN2 (ver tabla 3) se tripsinizaron y recogieron en PBS y se centrifugaron 5 minutos a 200g a 4°C, para recoger las células intactas. Seguidamente, las células se lisaron con el tampón hipotónico 1x suplementado con inhibidor de fosfatasa 50µl/ml e inhibidor de proteasas 1µl/ml durante 15 minutos a 4°C. Tras esta incubación, se centrifugaron las muestras 30 segundos a 14000g a 4°C, recogiendo el sobrenadante con la fracción citoplasmática. El pellet nuclear se resuspendió en tampón de lisis suplementado con DTT 10mM, inhibidor de fosfatasa 50µl/ml e inhibidor de proteasas 1µl/ml y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a 4°C. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 14000g a 4°C para recoger el sobrenadante con la fracción nuclear.

Para cuantificar las proteínas contenidas en las fracciones nucleares y citoplasmáticas se usó el reactivo Bradford (500-0006, Bio-Rad) en lugar del BCA puesto que el DTT presente en el tampón de lisis interfiere con el reactivo BCA. La pureza de la fracción citoplasmática se comprobó con el marcador  $\alpha$ -tubulina mientras que como marcador nuclear se usó la fibrilarina.

### 6.2 EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN NUCLEOLAR

La extracción de los nucléolos se llevó a cabo siguiendo un protocolo previamente publicado con ciertas modificaciones [134]. Las células MDA-MB-231 ( $3 \times 10^6$ ) transfectadas con scRNA/siCAPN2 en placas de 150mm (ver tabla 3) se lavaron 3 veces con la Solución I fría (Sacarosa 0.5M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, inhibidor de

## MATERIALES Y MÉTODOS

fosfatasas 50µl/ml e inhibidor de proteasas 1µl/ml) y se recogieron con ayuda de rascadores. Seguidamente, se sonicaron en hielo (VCV130, Sonics) 10 pulsos a 40% de amplitud, 10/50 segundos *on/off* y se comprobó que más del 90% de las células se habían lisado mediante observación al microscopio óptico Olympus CKX41 de la Facultad de Medicina.

Para separar la fracción nucleolar (*No*) de la fracción con el resto del contenido celular (*No-less*), al lisado se le añadió el mismo volumen de Solución II (Sacarosa 1.0M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, inhibidor de fosfatasas 5µl/ml, inhibidor de proteasas 2µl/ml y PMSF 1mM) y se centrifugó a 1800g durante 10 minutos a 4°C obteniendo un sobrenadante y un pellet. Por un lado, el sobrenadante se volvió a centrifugar a 14000g durante 10 minutos a 4°C y se recogió como fracción *No-less* conteniendo el extracto total celular a excepción del nucléolo. Por otro lado, el pellet inicial con la fracción *No* se resuspendió en tampón RIPA suplementado con PMSF 1mM, inhibidor de proteasas 2µl/ml e inhibidor de fosfatasas 5µl/ml. El pellet resuspendido se sonicó (4 pulsos a 40% de amplitud, 10/50 segundos *on/off*) en hielo y centrifugó a 14000g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante con la fracción *No*, se recogió y almacenó a -80°C. Para comprobar la pureza de la fracción nucleolar se usó el marcador fibrilarina mientras que se descartaron contaminaciones por parte de la fracción *No-less* con el marcador α-tubulina.

## 7. WESTERN BLOT

Una cantidad suficiente de proteína (entre 10-20 $\mu$ g) de cada muestra se diluyó en tampón de carga 5x (SDS-Laemmli Buffer: Tris-HCl 0.3M pH 6.8, glicerol 50% (v/v), SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 25% y azul de bromofenol 0.05%) y se calentó 5 minutos a 95°C. Las muestras se cargaron y separaron en geles de acrilamida de distinto porcentaje según el peso molecular de la proteína de interés. La electroforesis (SDS-PAGE) con geles verticales mini (BIORAD) tuvo lugar en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25mM pH 8.3, glicina 192mM, SDS 0.1% (p/v), 1610772, Bio-Rad) a 100V.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (88018 Protran® Whatman, Kent, UK) en tampón de transferencia (Tris-HCl 25mM pH8.3, glicina 192mM, metanol 20% (v/v) durante 90 minutos, aplicando una diferencia de potencial de 60V. Para comprobar la efectividad de la transferencia así como empelar un primer control de carga, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (P7170, Sigma).

Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche en polvo al 5% (A08300500, PanReac) o albúmina de suero bovino al 5% (BSA) (10735094001, Roche) diluido en tampón salino Tris pH 7.5 (1706435, Bio-Rad) y Tween20 al 0.1% (TBST) durante 2 horas a TA en agitación. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en leche en polvo o BSA al 1% en TBST. Las diluciones de los anticuerpos, así como los tiempos de incubación, la referencia y la casa comercial se indican en la tabla 5.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 5: Anticuerpos primarios y condiciones de incubación empleados en el Western Blot.**

Anticuerpo	Dilución	Incubación	Referencia
CFL-1	1/5000 leche	1h TA	5175, Cell Signalling
P(S3)-CFL-1	1/1000 BSA	1h TA	3313, Cell Signalling
CAPN2	1/1000 BSA	18/24h 4°C	2539, Cell Signalling
DYKDDDDK-tag	1/5000 leche	1h TA	A00187-100, GenScript
Nt-LIMK-1	1/1000 BSA	18/24h 4°C	PA5-14938, Invitrogen
Ct-LIMK-1	1/1000 leche	18/24h 4°C	3842, Cell Signalling
P(T508)-Limk1	1/1000 BSA	18/24h 4°C	PA5-37629, Invitrogen
$\beta$ -Actina	1/2500 leche	1h TA	Ab8227, Abcam
Fibrilarina	1/1000 leche	1h TA	NB300-269, Novus
$\alpha$ -Tubulina	1/5000 leche	1h TA	Ab52866, Abcam
GAPDH	1/60000 leche	1h TA	Ab8245, Abcam
APOA1	1/500 BSA	18/24h 4°C	Ab64308, Abcam
PPIA	1/8000 leche	1h TA	Ab58144, Abcam
LMNA/C	1/2000 leche	1h TA	Ab68417, Abcam
STMN1	1/1000 leche	1h TA	PA5-28092, ThermoFisher

Seguidamente, se lavó la membrana con leche o BSA al 1% en TBST tres veces y se incubó con el anticuerpo secundario HRP *anti-rabbit* (P0448, Dako) o *anti-mouse* (P0447, Dako), dependiendo de la especie del anticuerpo primario, a una dilución 1/5000. Tras una hora de incubación a TA, se lavaron las membranas con TBST cinco veces. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación.

Los inmunocomplejos formados se revelaron con un reactivo quimioluminiscente ECL Detection Western Blotting Reagent (RPN2209, GE Healthcare). La señal luminosa se recogió sobre una película fotográfica High performance autoradiography film (28906844, GE Healthcare) y se reveló con la máquina Curix60 (AGFA). En el caso de realizar una cuantificación de la intensidad de las bandas, se procedió a la digitalización de la película fotográfica y posterior cuantificación por densitometría mediante el programa de análisis de imagen Image J.

## 8. INMUNOPRECIPITACIÓN

Las inmunoprecipitaciones (IP) se realizaron con el extracto total (200µg) de células MDA-MB-231 ( $8 \times 10^5$ ) transfectadas con scRNA y siCAPN2 y de células MCF-7 ( $2.8 \times 10^6$ ) transfectadas con los vectores DYK-CAPN2, DYK-ΔCAPN2 y Mock. El silenciamiento y la sobreexpresión de las células, así como la extracción de proteínas, se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos anteriormente.

Se incubó el anticuerpo Ct-LIMK1 (3842, Cell Signalling) diluido 1/50 en tampón RIPA (sin deoxicolato sódico ni inhibidores) junto con 50µl de proteína G unida a *beads* (*Dynabeads*, #10004D, Invitrogen) durante 10 minutos en rotación a TA. Como control negativo de la IP, se usó una IgG diluida 1:150 en RIPA. Tras la incubación, se realizó un lavado con RIPA. Después se incubaron las *beads* con 200µg de proteína durante 20 minutos en rotación a TA. Se lavaron las muestras con RIPA tres veces para eliminar impurezas y uniones no específicas. Después de los lavados, los inmunocomplejos se resuspendieron con 20µl de tampón de elución (glicina 50mM pH 2.8) y se calentaron a 95°C con tampón de carga 5x durante 10 minutos, para separar las *beads* de las proteínas inmunoprecipitadas. Los sobrenadantes se cargaron en un gel de acrilamida y se analizaron mediante WB. Un 1% (20µg) de los extractos de proteínas utilizados para la IP, se cargaron como controles positivos o *Inputs*.

## 9. INMUNOFLUORESCENCIA

Se realizaron tinciones de IF en las células MDA-MB-231 ( $1.8 \times 10^5$ ) transfectadas con scRNA y siCAPN2 o las células MCF-7 ( $9 \times 10^5$ ) transfectadas con Mock, DYK-CAPN2 o DYK- $\Delta$ CAPN2. Los protocolos de transfección ya se han descrito en apartados anteriores.

Las células fueron transfectadas en placas de 35mm sobre lamelas de borosilicato de 13mm (631-0149 VWR) previamente autoclavadas. A las 48 horas (en el caso de las MCF-7) o 72 horas (MDA-MB-231) de la transfección, se retiró el medio con cuidado y se lavó con PBS atemperado. A continuación, se fijaron las células con paraformaldehído (28908, Thermo Fisher) al 4% en PBS durante 10 minutos. Después de tres lavados con PBS, las células se permeabilizaron durante 10 minutos con PBS con Tritón X-100 al 0.3%. Seguidamente, las lamelas se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con *Normal Goat Serum* (X0907, Dako) al 5% en PBS con Tritón X-100 al 0.3% durante 1 hora a TA. Tras el bloqueo, las lamelas se incubaron con diferentes anticuerpos primarios, diluidos en PBS con Tritón X-100 al 0.3% (Véase la tabla 6). La incubación tuvo lugar en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche.

**Tabla 6:** Anticuerpos primarios y su dilución utilizados en Inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Dilución	Referencia
CFL-1	1/400	5175, Cell Signalling
P(S3)-CFL-1	1/100	3313, Cell Signalling
CAPN2	1/50	2539, Cell Signalling
DYKDDDDK	1/100	A01190, GenScript
Nt-LIMK-1	1/250	PA5-14938, Invitrogen
P(T508)-Limk1	1/100	PA5-37629, Invitrogen
Fibrilarina	1/100	NB300-269, Novus



Posteriormente, las lamelas se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS con Tritón X-100 al 0.3% según se indica en la tabla 7. La incubación tuvo lugar en una cámara húmeda a TA durante 1 hora en oscuridad. Con el objetivo de minimizar las uniones inespecíficas del anticuerpo, se incubó una lamela únicamente con el anticuerpo secundario, usándose como control negativo del experimento.

**Tabla 7: Anticuerpos secundarios y su dilución usados en Inmunofluorescencia.**

Anticuerpo Secundario	Dilución	Referencia
Alexa Fluor 488 <i>anti-rabbit</i> IgG	1/200	A11008, Invitrogen
Alexa Fluor 594 <i>anti-mouse</i> IgG	1/200	A11005, Invitrogen

Tras 1 hora de incubación, se lavaron las lamelas tres veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje que incluía DAPI (DUO82040, Sigma) para teñir los núcleos de las células. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal *Olympus* FV1000 ubicado en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

## 10. ENSAYO *IN VITRO* DE PROTEÓLISIS DE LIMK1 MEDIADA POR CAPN2

Se extrajeron las proteínas totales de las células MDA-MB-231 con RIPA sin inhibidores siguiendo el protocolo descrito anteriormente. A continuación, se incubaron cantidades crecientes (1, 5 y 10U) de calpaína-2 recombinante o rCAPN2 (208718, Calbiochem) con 25µg del extracto total de las células en presencia y ausencia de Ca<sup>2+</sup> 5mM y del inhibidor calpeptina 50µM durante 20 minutos a 37°C. La reacción se paró tras la adición de tampón de carga 5x y calentamiento 5 minutos a 95°C. LIMK1 completa y sus fragmentos se analizaron mediante WB con α-Ct-LIMK1. Como marcador de especificidad de corte se usó GAPDH.

## 11. ANÁLISIS PROTEÓMICO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D-DIGE)

El estudio de proteómica 2D-DIGE se llevó a cabo en el extracto nucleolar de células MDA-MB-231 ( $3 \times 10^6$ ) transfectadas con scRNA o siCAPN2. Las muestras se marcaron con Cy-3 o Cy-5 indistintamente, para asegurarse de que el marcaje no influía sobre las muestras, y con Cy-2 para la normalización de los niveles proteicos. A continuación, 20 $\mu$ g de proteína se separaron según su punto isoeléctrico, gracias al uso de tiras de gradientes de pH *Immobiline DryStrips* (pH 3-11). Posteriormente, las tiras se colocaron sobre geles de acrilamida al 12.5% para separar las proteínas según su tamaño. Los geles se escanearon con *Typhoon™ 9400 Variable Mode Imager* y se analizaron con los programas *DeCyder* (v7.0) y *SameSpots* (v5.0.1.0) en el departamento de proteómica SCSIE de la Universidad de Valencia. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas mediante la prueba t-Student cuando  $p \leq 0.05$ . Los *spots* diferencialmente representados se examinaron mediante la técnica de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS) en el SCSIE. Se identificaron un total de 14 *spots* que correspondían a 11 proteínas. Posteriormente, algunas de estas dianas fueron comprobadas de forma independiente por WB.

## 12. EXTRACCIÓN DEL RNA Y CUANTIFICACIÓN

Las células MDA-MB-231 ( $3.7 \times 10^5$ ) se transfectaron con scRNA y siCAPN2 siguiendo el protocolo previamente descrito. A continuación, se recogieron con ayuda de raspadores y se centrifugaron a 500g durante 5 minutos a 4°C. Las muestras se lavaron con PBS frío y se realizó la extracción de RNA con el kit *RNeasy Minikit* (74104, Qiagen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El RNA se cuantificó mediante espectrofotometría a 260nm utilizando el *NanoDrop ND-2000* (NanoDrop Technologies). La contaminación de las muestras por fenoles, carbohidratos y proteínas afecta de forma significativa a la sensibilidad

y especificidad del resultado. Para valorar la pureza del RNA, se analizó el valor de los cocientes 260/280nm y 260/230nm de forma que los valores comprendidos entre 1.8-2.0 y 2.0-2.2 para el primer y el segundo cociente respectivamente, se corresponden a un RNA de calidad.

### 13. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA POR RT-qPCR

Los niveles de mRNA se analizaron mediante RT-qPCR. Para ello, primero se realizó la transcripción reversa de 0.5µg de RNA a cDNA usando el kit *High-Capacity RNA-to-cDNA* (4387406, Applied Biosystems) en el termociclador *GeneAmp PCR system 2700* (Applied Biosystems). Las condiciones de retrotranscripción fueron las siguientes: 37°C durante 60 minutos seguido de 95°C durante 5 minutos.

El cDNA se amplificó por triplicado usando la *GeneAmp Fast PCR Master Mix* (4362070, Applied Biosystems) en el equipo 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) siguiendo las condiciones: 1 ciclo de 50°C (2 minutos) y 95°C (10 minutos) y 40 ciclos de 95°C (15 segundos) y 62°C (1 minuto). Se estudió la expresión de la CAPN2 con *primers* prediseñados (Hs00965097\_m1, Taqman). Los resultados se normalizaron con los niveles del *housekeeping* 18S (4319413E, Taqman). Una vez obtenido el valor de Ct (*Threshold cycle* o ciclo umbral), la expresión relativa del gen de interés se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

donde  $\Delta Ct = Ct(\text{gen CAPN2}) - Ct(\text{gen } 18S)$  y  $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct(\text{siCAPN2}) - \Delta Ct(\text{control})$ .

## 14. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS MULTINUCLEADAS

La multinucleación de las células MDA-MB-231 se analizó monitorizando la morfología celular mediante microscopia confocal. Se transfectaron las células MDA-MB-231 ( $1.8 \times 10^5$ ) con scRNA y siCAPN2 sobre cristales de borosilicato, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado de IF, pero en este caso, solo se tiñeron los núcleos con DAPI. Las imágenes de los núcleos obtenidas por IF y de la morfología celular por contraste de fases, se usaron para evaluar y cuantificar la multinucleación. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio confocal FV1000 en el SCSIE.

El ciclo celular y la multinucleación de las células MDA-MB-231 también se analizaron por citometría de flujo en el servicio de citometría de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM) de la Universidad de Valencia. Las células ( $8 \times 10^5$ ) se transfectaron con scRNA y siCAPN2 siguiendo el protocolo descrito anteriormente. A las 72 horas de la transfección, se tripsinizaron y contaron para obtener una suspensión celular con una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. A continuación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 500g durante 5 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió con 0.5ml de etanol al 70% y se incubó durante una hora a -20°C. Transcurrida la hora de incubación, las células se lavaron con PBS y el pellet se resuspendió con 0.5ml de yoduro de propidio (PI, P4170, Sigma). Tras 18 horas de incubación a 4°C, las células se analizaron en el citómetro de flujo BD FACS Vosse usando el programa FACSuite. El porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular, así como los agregados celulares (células multinucleadas), se examinaron con el programa ModFit LT (v4.1.7).

## 15. 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). Todos los experimentos fueron llevados a cabo con un mínimo de tres réplicas por condición para permitir el análisis estadístico.

Las comparaciones de los valores entre las muestras se analizaron con la prueba t-Student con el programa estadístico SPSS v.9. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0.05$ . Aquellos grupos de datos en los que existían diferencias significativas se indican como # $p \leq 0.05$ , \* $p \leq 0.01$  y \*\* $p \leq 0.0001$ .

Para analizar la correlación entre pares de muestras (Figura 25), se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman o test rho. Aquellos grupos con valores de rho comprendidos entre 0.8 y 1 indican una fuerte correlación entre los pares de muestras analizados.



# RESULTADOS





# RESULTADOS

## 1. LA ABUNDANCIA DE LA CAPN2 COMO POSIBLE DETERMINANTE DE SU LOCALIZACIÓN NUCLEOLAR

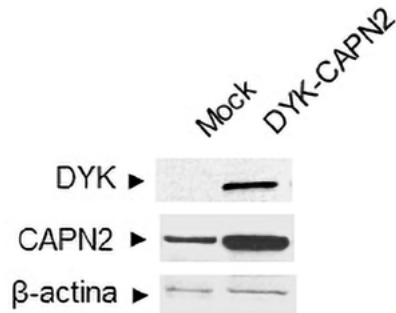
Estudios previos sobre la distribución de la CAPN2 en el núcleo de las diferentes líneas de cáncer de mama, detectaron una fuerte acumulación de la CAPN2 en el nucléolo y la región perinucleolar en las líneas luminales, MCF-7 y BT-474 y las líneas TNBC, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (Figura 7). Se estableció una correlación positiva entre los niveles nucleares y nucleolares de la CAPN2 y los niveles de expresión de la CAPN2. Las líneas celulares TNBC, con mayores niveles de expresión de la CAPN2, presentaban mayores niveles nucleares y nucleolares de la CAPN2 que las líneas luminales [28, 98].

Estos estudios plantearon la hipótesis de que la abundancia de la CAPN2 podría ser un factor determinante de su localización nucleolar.

### 1.1 ANÁLISIS EN LAS CÉLULAS MCF-7

Para estudiar dicha hipótesis, se transfectaron las células MCF-7, con menor CAPN2 basal, con el vector vacío MSCV (Mock) o DYK-CAPN2. Este último expresa la CAPN2 completa marcada con una etiqueta N-terminal DYK. En primer lugar, se analizó la eficiencia de la sobreexpresión de la CAPN2 mediante WB en extracto total de células Mock y DYK-CAPN2 con los anticuerpos  $\alpha$ -DYK y  $\alpha$ -CAPN2. Como cabría esperar, DYK se detectaba solo en las células MCF-7 transfectadas con DYK-CAPN2 (Figura 9). Los niveles de la CAPN2 eran mayores en las células transfectadas con DYK-CAPN2 con respecto a las células control, en las que solo se detectaba la CAPN2 endógena. Estos datos, junto a los niveles del marcador de carga  $\beta$ -actina, que no variaban en el ensayo, indican una buena eficiencia de sobreexpresión de la CAPN2.

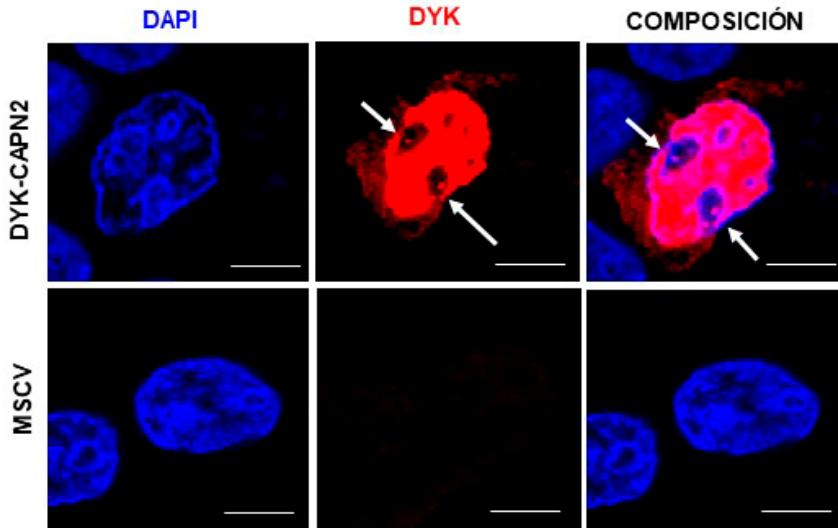
## RESULTADOS



**Figura 9: Expresión ectópica de CAPN2 en células MCF-7.** Niveles de CAPN2 analizado mediante WB con  $\alpha$ -DYK y  $\alpha$ -CAPN2 en extracto total de células MCF-7 transfectadas con el vector vacío MSCV (Mock) o con DYK-CAPN2. El anticuerpo  $\beta$ -actina se usó como control de carga. Imagen representativa ( $n \geq 6$ ).

Una vez comprobada la eficiencia de la sobreexpresión, se evaluó la distribución de DYK-CAPN2 sobreexpresada ectópicamente en la línea celular MCF-7 mediante IF (Figura 10). Al igual que ocurría en el WB, únicamente se detectaba señal de DYK en las células con sobreexpresión ectópica de la CAPN2. En la figura 10 se observa que la proteína DYK-CAPN2 se detecta en el compartimento citosólico y nuclear de las células.

Debido a que la señal de fluorescencia de DYK era tan intensa en el núcleo de la célula, se redujo la intensidad del láser del microscopio confocal para poder analizar la localización subnuclear de DYK-CAPN2. Como consecuencia, se comprometió la detección de la misma en el citosol. En cualquier caso, se observó una acumulación de DYK-CAPN2 en el nucléolo de las células MCF-7 con la CAPN2 ectópica (flechas).

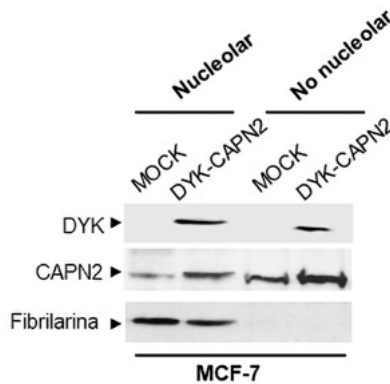


**Figura 10: Análisis intranuclear de DYK-CAPN2 en células MCF-7.** Localización de CAPN2 exógena mediante inmunotinción con  $\alpha$ -DYK en células MCF-7 transfectadas con MSCV y DYK-CAPN2. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestra una célula representativa ( $n=6$ ). Las flechas señalan la presencia de DYK-CAPN2 en el nucléolo. Escala de 20  $\mu$ m.

Para validar los resultados obtenidos mediante IF, se valoró la distribución subnuclear de DYK-CAPN2 en el extracto de proteínas de las fracciones nucleolar (*No*) y no nucleolar (*No-less*) de las células MCF-7 Mock y DYK-CAPN2 mediante WB. Puesto que el nucléolo es una subestructura sin membrana, la fracción nucleolar contiene tanto proteínas nucleolares como de la región perinucleolar, mientras que la fracción no nucleolar contiene todos los componentes de la célula a excepción del nucléolo. En la figura 11 se observa que la señal de DYK se detecta en las dos fracciones *No* y *No-less*, pero únicamente en las células con sobreexpresión ectópica de la CAPN2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por microscopía confocal, en los que observábamos señal nucleolar de DYK tan solo en las células sobreexpresadas con DYK-CAPN2.

## RESULTADOS

Con respecto a los niveles de CAPN2, se pudo comprobar que sus niveles aumentaban en ambas fracciones en las células transfectadas con DYK-CAPN2 con respecto a las células control. La fibrilarina, una proteína de localización nucleolar, se empleó como control para determinar la pureza de ambas fracciones, quedando restringida a la fracción nucleolar. Los resultados del experimento sugieren que la abundancia de la CAPN2 podría ser un factor determinante de su localización nucleolar.

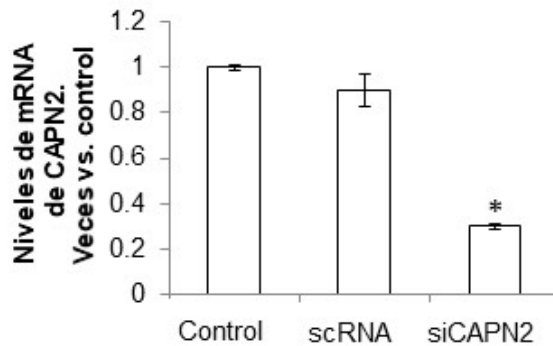


**Figura 11:** Localización nucleolar de DYK-CAPN2 en células MCF-7. Niveles de CAPN2 en las fracciones nucleolar y no nucleolar de células MCF-7 transfectadas con el vector Mock y DYK-CAPN2 analizados por WB con  $\alpha$ -DYK y  $\alpha$ -CAPN2. Como marcador de pureza de la fracción nucleolar se usó la fibrilarina. Imagen representativa ( $n \geq 6$ ).

## 1.2 ANÁLISIS EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231

Se transfectaron las células de la línea MDA-MB-231, con mayores niveles de expresión de la CAPN2, con scRNA y siCAPN2. A continuación, se analizó la eficiencia del silenciamiento midiendo los niveles del mRNA de la CAPN2 en células MDA-MB-231 sin transfectar (control) y transfectadas con scRNA o con siCAPN2 mediante RT-qPCR. Los niveles del mRNA de la CAPN2 disminuyeron un 70% en

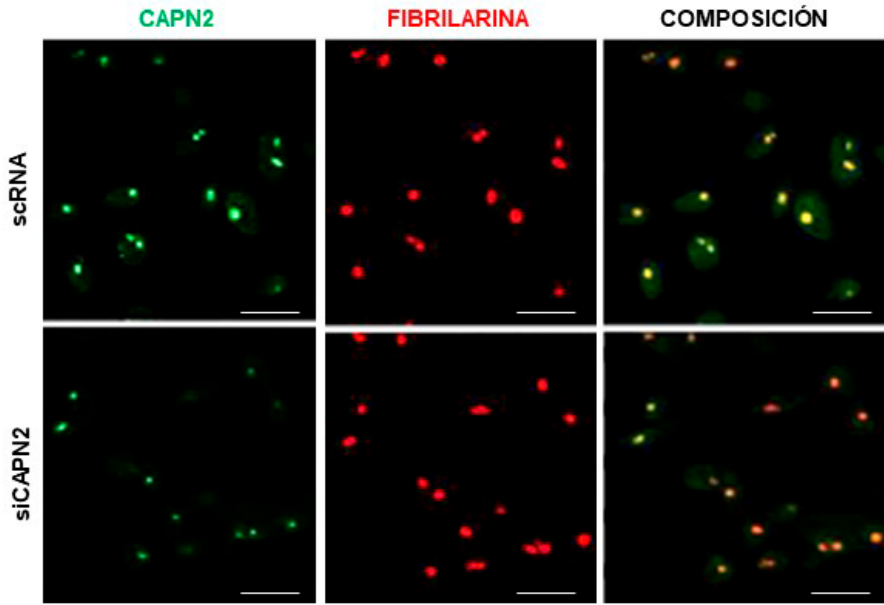
las células siCAPN2 con respecto a las células scRNA y control (Figura 12). Estos datos indican una buena eficiencia del silenciamiento de la CAPN2.



**Figura 12: Eficiencia de silenciamiento de CAPN2 en células MDA-MB-231.** Análisis de los niveles del mRNA de la CAPN2 en las células MDA-MB-231 sin transfectar o transfectadas con scRNA o siCAPN2 mediante RT-qPCR. Los datos ( $n \geq 6$ ) se normalizaron con el 18S y se representaron como la media de veces  $\pm$  SEM vs células control \* $p \leq 0.01$ .

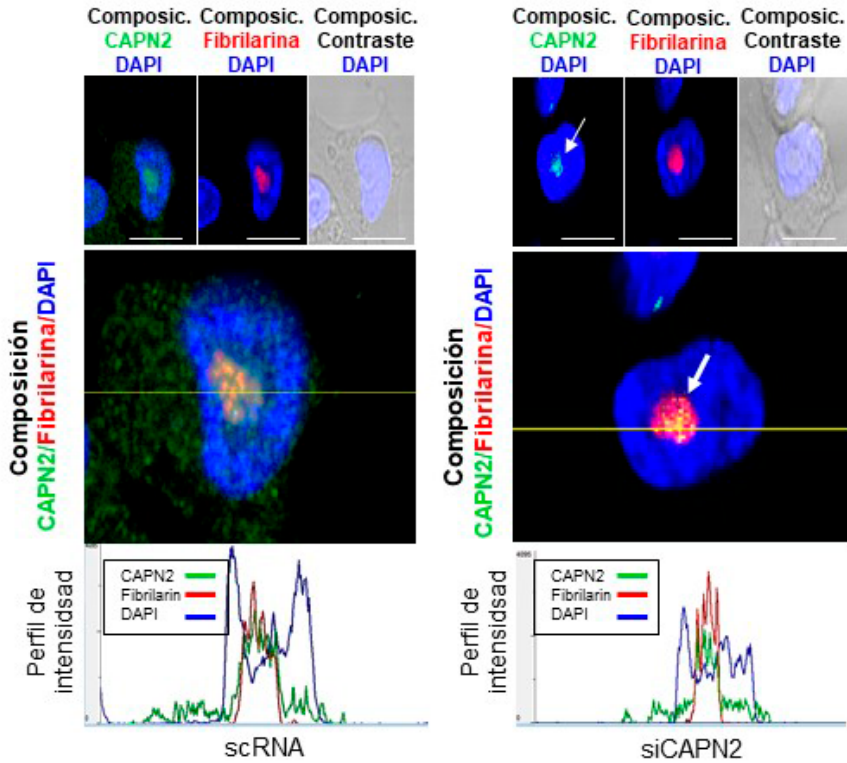
Una vez comprobada la eficiencia del silenciamiento, se analizó la distribución subnuclear de la CAPN2 en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 mediante inmunotinción. Tal y como ya se había observado mediante RT-qPCR, los niveles de la CAPN2 disminuían drásticamente en las células silenciadas para la CAPN2 con respecto a las células control (Figura 13). Para estudiar la distribución subnuclear de la proteína se analizó la colocalización de la CAPN2 con el marcador nucleolar fibrilarina. Como se observa en la composición de la figura 13, la señal amarilla en el nucléolo de las células scRNA, indica que la CAPN2 colocaliza con la fibrilarina. En cambio, la señal naranja en el nucléolo de las células siCAPN2 indica una baja colocalización.

## RESULTADOS



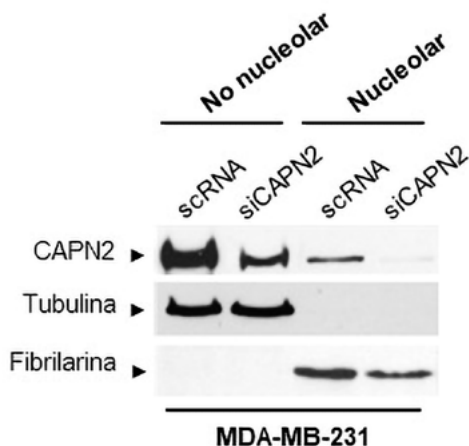
**Figura 13: Distribución de la CAPN2 en células MDA-MB-231.** Inmunotinción fluorescente de CAPN2 (verde) y fibrilarina (rojo) en células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. Se muestra la composición de ambas imágenes. El color amarillo indica una mayor colocalización CAPN2/fibrilarina. Escala de 25  $\mu\text{m}$ . Datos  $n \geq 6$ .

Si nos fijamos con más detalle en la composición de la CAPN2 y la fibrilarina en las células silenciadas, podremos observar que existe un pequeño porcentaje de células en las que sí que se produce colocalización de las dos proteínas. No obstante, a pesar de que se detectó la presencia de la CAPN2 en el nucléolo de las células transfectadas con siCAPN2, la eficiencia del silenciamiento fue muy buena. Al comparar la imagen aumentada de las células siCAPN2, se apreció un notable descenso de la intensidad de la CAPN2 en toda la célula (Figura 14). Es más, como muestra el perfil H, la señal citosólica desaparece por completo, y aunque se detectan trazas de la CAPN2 en el nucléolo (flecha), sus niveles disminuyen drásticamente. De nuevo, de los resultados obtenidos tras el silenciamiento de la CAPN2 podemos inferir que la abundancia de la CAPN2 podría ser crucial para su localización nucleolar.



**Figura 14:** Análisis intranuclear de la CAPN2 en células MDA-MB-231. IF de CAPN2 (verde) y fibrilarina (rojo) en células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. Se muestra la composición del DAPI (que tiñe los núcleos) con cada anticuerpo o con el contraste de fases en una célula representativa. Escala de 20  $\mu\text{m}$ . La imagen aumentada y el perfil de intensidad H muestran la presencia residual de CAPN2 nucleolar (flecha) en células siCAPN2.

Por otro lado, también se evaluó la distribución subnuclear de la CAPN2 en las fracciones *No* y *No-less* de las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 mediante WB. Como cabría esperar, la CAPN2 disminuía sus niveles en las fracciones *No* y *No-less* de las células siCAPN2 con respecto a las células control (Figura 15). Puesto que la pureza de las fracciones *No* y *No-less* resultó elevada, los resultados del experimento validan los resultados obtenidos mediante tinción IF.

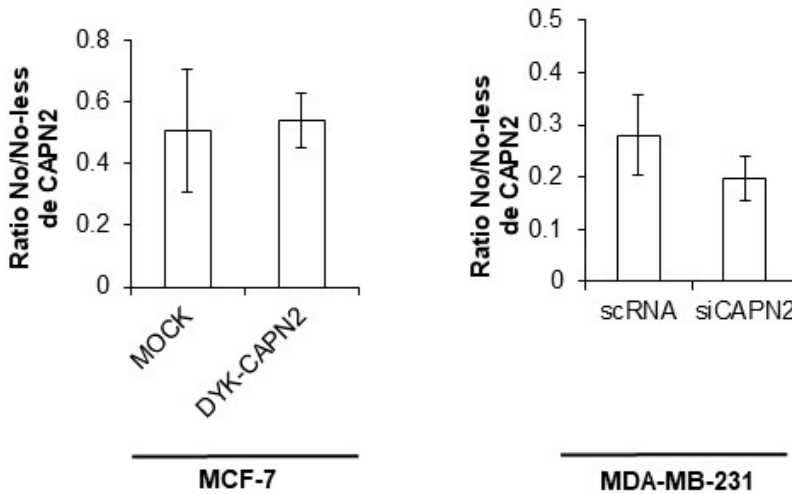


**Figura 15: Distribución subnuclear de la CAPN2 en células MDA-MB-231.** Expresión de CAPN2 en las fracciones nucleolar y no nucleolar de células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA o siCAPN2 analizada mediante WB (n≥6). La fibrilarina y la tubulina se usaron como marcadores de pureza de las fracciones nucleolar y no nucleolar respectivamente.

### 1.3 ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE LA CAPN2 ENTRE LA FRACCIÓN NUCLEOLAR Y EL RESTO CELULAR

En el caso de que la abundancia de la CAPN2 fuera un factor determinante para su acumulación nucleolar, la ratio de la CAPN2 entre las fracciones *No/No-less* debería permanecer constante, tanto en las células MCF-7 transfectadas con Mock y DYK-CAPN2 como en las MDA-MB-231 silenciadas con scrRNA/siCAPN2. Para comprobar este extremo, los resultados de los WB en las fracciones No y No-less (Figuras 11 y 15) se cuantificaron y se representó gráficamente la ratio de la CAPN2 en ambas fracciones en las células MCF-7 sobreexpresadas y en las células MDA-MB-231 silenciadas (Figura 16). No se observaron diferencias significativas en la ratio de la CAPN2 *No/No-less* entre las células control y sobreexpresadas con DYK-CAPN2 o silenciadas con siCAPN2.





**Figura 16:** Ratio Nucleólo/No-nucleólo de CAPN2 en células de cáncer de mama. Representación gráfica de la ratio No/No-less de CAPN2 en células MCF-7 transfectadas con el vector Mock o DYK-CAPN2 ( $n=3$ ) y células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA o siCAPN2 ( $n=6$ ). La ratio se representa como la media de grupos estudiados  $\pm$  SEM.

Estos datos, junto con los resultados anteriores, demuestran que la abundancia de la CAPN2 es un factor determinante de su acumulación nucleolar en las células en proliferación de cáncer de mama.

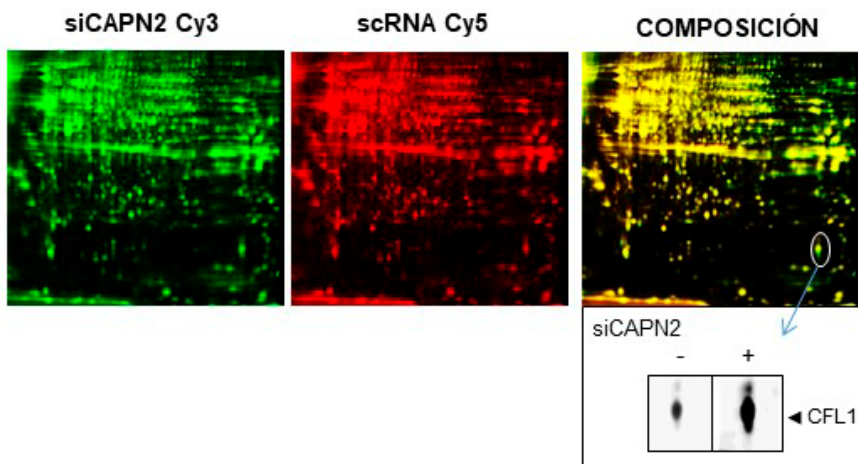
## 2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEOLARES DEPENDIENTES DE CAPN2

Como previamente se ha citado, el nucléolo carece de membrana [133]. Además, durante cada ciclo celular, el ensamblaje y desensamblaje del nucléolo contribuye al constante tráfico de proteínas entre el nucléolo, la región perinucleolar y el nucleoplasma [192, 194]. Esto permite que se produzcan cambios dinámicos en las interacciones entre los componentes del núcleo, hecho vital en cualquier proceso molecular [193]. La acumulación de la CAPN2 en el nucléolo

## RESULTADOS

de las BCC, podría ser crucial en la regulación de las funciones de determinadas proteínas nucleares. La actividad proteolítica de la CAPN2, podría modular los cambios dinámicos entre las interacciones de los componentes nucleares. Desvelar las dianas directas o indirectas de la CAPN2 implicadas en estas interacciones, ayudaría a identificar la función de la CAPN2 nucleolar en las BCC.

Con el fin de detectar las dianas nucleolares de la CAPN2, se analizó el proteoma del extracto nucleolar de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 mediante 2D-DIGE. Los *spots* diferencialmente representados se examinaron mediante LC-MS/MS (Figura 17).



**Figura 17: Proteoma nucleolar dependiente de CAPN2 en células MDA-MB-231.** Análisis mediante 2D-DIGE de extractos nucleolares de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 y marcadas con Cy3 y Cy5 alternativamente. Los datos ( $n=4$ ) se normalizaron con Cy2. La imagen muestra un gel representativo en cada canal y la superposición de ambos canales con la posición de la cofilina-1(CFL1). En la ventana se muestra la abundancia de la CFL1 en cada canal.

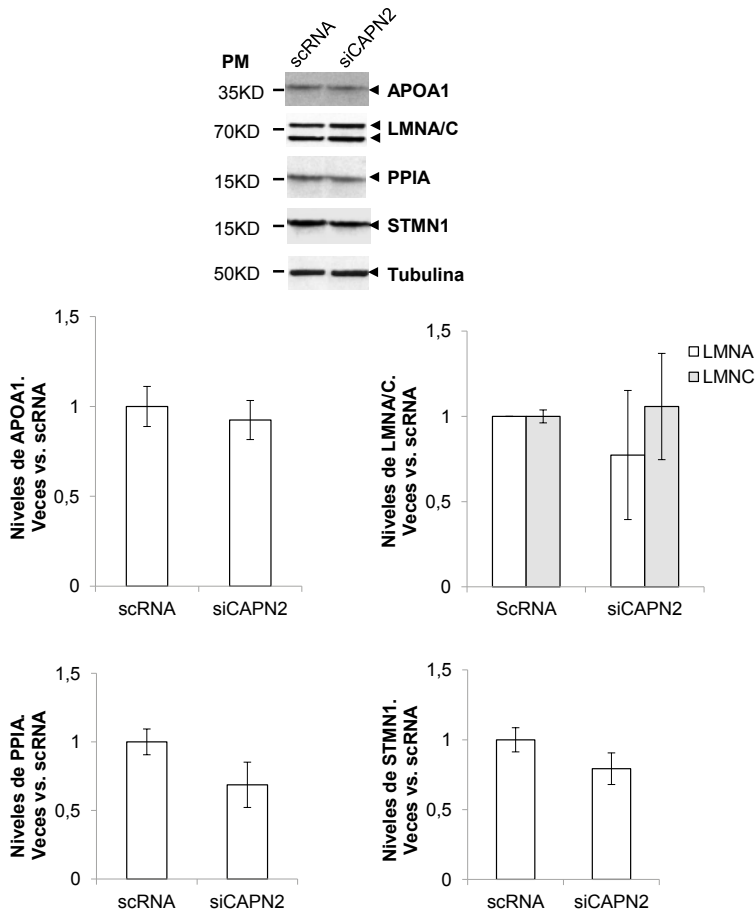
Se identificaron un total de 14 *spots* que correspondían a 11 proteínas diferentes que aumentaban o disminuían significativamente sus niveles nucleolares al silenciar la CAPN2 con respecto a las células control (Tabla 8). La apolipoproteína A-1 (APOA1), la prelamina-A/C (LMNA/LMNC) y la ciclofilina-A (PPIA) presentaban dos *spots* con diferente punto isoeléctrico y peso molecular, lo que sugiere que podrían ser productos de la actividad proteolítica de CAPN2.

**Tabla 8: Proteínas diferencialmente representadas en el proteoma nucleolar de células MDA-MB-231 knock-down de CAPN2.** Se indica el incremento o la disminución de los niveles de proteína nucleolar tras silenciar la CAPN2 con respecto a las células control ( $p \leq 0.05$ ). (\*) indica la detección de varios *spots* que pertenecen a la misma proteína.

PROTEÍNA	SÍMBOLO	siCAPN2
Apolipoproteína A-I (*)	APOA1	↓
Defensina neutrófila 3	DEFA3	↓
Sistema de antígeno leucocitario humano clase I	HLA-C	↓
Prelamina-A/C (*)	LMNA/LMNC	↓
Ciclofilina-A (*)	PPIA	↑
Subunidad B de la ATPasa tipo V, isoforma del cerebro	ATP6V1	↑
Aldehído deshidrogenasa X, mitocondrial	ALDH1B	↓
Fosfoglicerato mutasa 1	PGAM1	↑
Estatmina	STMN1	↑
Nucleósido difosfato quinasa B	NME2	↑
Cofilina-1	CFL1	↑

### 2.1 LAS PROTEÍNAS NUCLEOLARES COMO DIANAS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA CAPN2

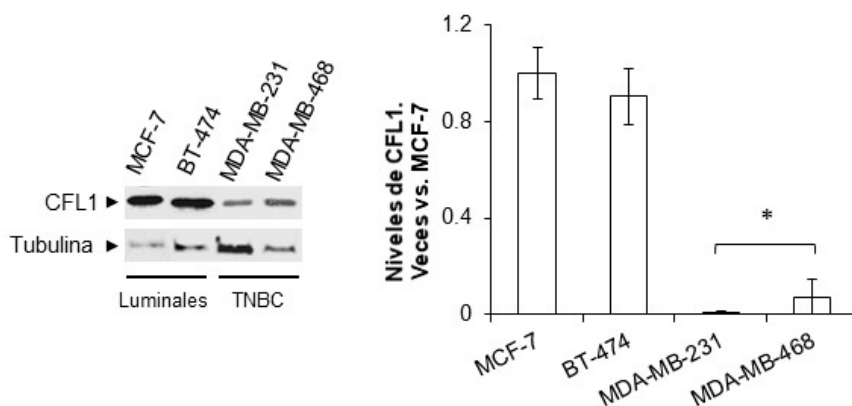
El aumento de los niveles de las proteínas nucleolares observado en las células silenciadas para la CAPN2 así como la presencia de varios *spots* en algunas de las proteínas, sugerían que estas proteínas podrían ser dianas de la CAPN2. Para confirmar estos resultados obtenidos mediante el ensayo de proteómica, se evaluaron los niveles de cuatro de las proteínas cuyos niveles nucleolares variaban al silenciar la CAPN2 en células MDA-MB-231 con respecto a las células control. La APOA1 y la LMNA/LMNC disminuían sus niveles nucleolares y la PPIA y la STMN1 aumentaban sus niveles nucleolares tras el silenciamiento de la CAPN2 (Tabla 8). Se han seleccionado estas cuatro proteínas por tener un destacado papel en la transformación neoplásica y desarrollo tumoral [195–201]. Se analizaron los niveles de APOA1, LMNA/LMNC, PPIA y STMN1 mediante WB en el extracto total de proteínas de células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2. No se detectaron diferencias significativas al silenciar la CAPN2, ni tampoco fragmentos de las mismas, que hicieran pensar que estas proteínas son dianas directas de la actividad proteolítica de CAPN2 (Figura 18).



**Figura 18:** Efecto del silenciamiento de la CAPN2 sobre proteínas diferencialmente representadas en el proteoma nucleolar de células MDA-MB-231. Análisis de los niveles de APOA1, LMNA/C, PPIA y STMN1 en extracto total de proteínas de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 mediante WB. Los datos (n=6) se cuantificaron y normalizaron con tubulina y se representaron como la media de veces  $\pm$  SEM vs. scRNA. No se encontraron diferencias significativas.

### 2.2 LA CFL1 COMO POSIBLE DIANA DIRECTA DE LA ACTIVIDAD CAPN2

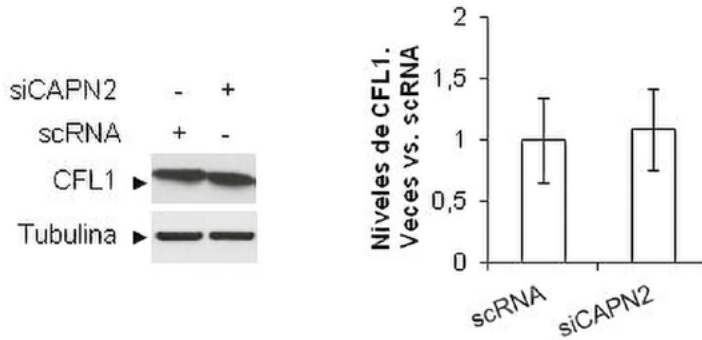
En el 2D-DIGE, se detectó que la CFL1 aumentaba sus niveles nucleolares en las células silenciadas para la CAPN2 (Figura 17). La CFL1 es una proteína moduladora del estado de polimerización/despolimerización de la F-actina [202]. Interviene en la correcta reorganización del citoesqueleto de actina [203], así como en un gran número de procesos fisiológicos y tumorigénicos [202, 204]. Se sabe que participa en el proceso de la invasión y metástasis en cáncer de mama [205]. Si la CFL1 fuera una diana directa de la actividad proteolítica de CAPN2, cuánto mayores fueran los niveles de CAPN2, menores deberían ser los de CFL1. Como ya se ha comentado en la introducción, estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que las líneas de cáncer de mama tipo luminal expresaban menores niveles de CAPN2 que las TNBC [28]. Para estudiar la relación entre los niveles de CFL1 y los de CAPN2, se analizaron mediante WB los niveles de CFL1 en el extracto proteico total de las líneas luminales, MCF-7 y BT-474 y las líneas TNBC, MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Las líneas luminales expresaban mayores niveles de CFL1 que las líneas TNBC, siendo las células MDA-MB-231 las que menores niveles de CFL1 presentaban con respecto a las demás líneas celulares (Figura 19). Estos resultados indicaban que existe una correlación inversa entre los niveles de CAPN2 y CFL1 en las distintas líneas celulares de cáncer de mama, por lo que parece que la CFL1 podría ser una diana directa de la actividad CAPN2.



**Figura 19: Niveles totales de CFL1 en las líneas de cáncer de mama.** Expresión de CFL1 en el extracto total de células luminales (MCF-7 y BT-474) y TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) analizada por WB. Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y normalizaron con la tubulina. La gráfica representa los niveles de la CFL1 como la media de veces  $\pm$  SEM \* $p < 0.01$  vs. células MCF-7.

Si la CFL1 fuera una diana de la CAPN2, al silenciar la CAPN2 en aquellas células donde más se expresa, los niveles de CFL1 deberían incrementar. Sin embargo, como se observa en la figura 20 no se detectan diferencias significativas en los niveles de CFL1 en las células transfectadas con siCAPN2 con respecto a las células scRNA, ni fragmentos de la misma. Esto mismo ya lo habíamos observado con las cuatro proteínas nucleolares analizadas previamente tras el ensayo de proteómica. Los resultados parecen indicar que la CFL1 no es una diana directa de la actividad proteolítica de la CAPN2.

## RESULTADOS



**Figura 20: Efecto del silenciamiento de CAPN2 sobre los niveles de la CFL1 en células MDA-MB-231.** Análisis de CFL1 en el extracto total de células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2 mediante WB. Los datos ( $n=6$ ) se cuantificaron y normalizaron con el marcador de carga tubulina y se representaron como la media de veces  $\pm$  SEM vs. scrRNA. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

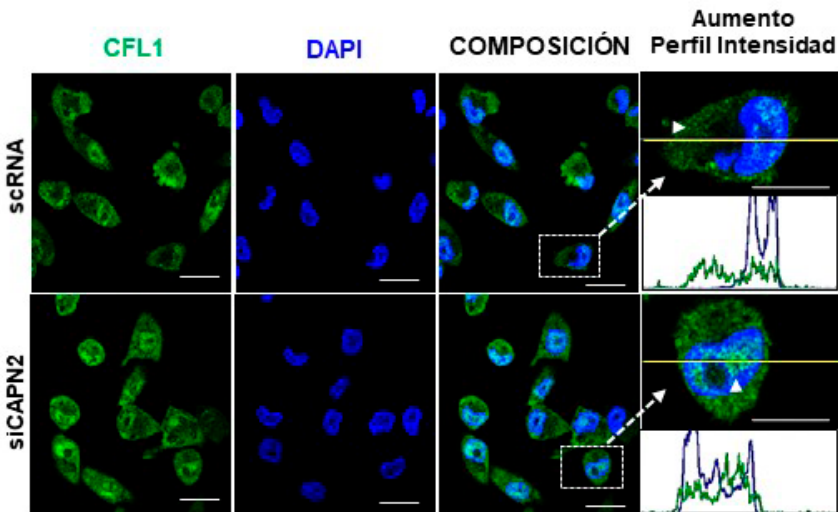
### 3. PAPEL DE LA CAPN2 EN LA MODULACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA CFL1

#### 3.1 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA CFL1

Puesto que los resultados de los experimentos anteriores sugerían que la CFL1 no es una diana directa de la CAPN2, se planteó la hipótesis de que la CAPN2 podría presentar una función moduladora de su distribución. Para evaluarlo, se analizó la distribución de la CFL1 mediante IF en las células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2. En la imagen de microscopia confocal se observa que la CFL1 se localiza en el citoplasma y el nucleoplasma de las células MDA-MB-231 control (Figura 21). El perfil de intensidad H detectó un fuerte acúmulo de CFL1 en la membrana de las mismas (punta de flecha de células scrRNA), que se extendía  $\sim 1\text{-}2\mu\text{m}$  hacia el interior celular, seguido por una extensa región de baja intensidad de señal.



En las células silenciadas para la CAPN2, se detectó señal de CFL1 en el citosol y el núcleo. Sin embargo, cabe destacar una pequeña concentración de CFL1 en el nucléolo (perfil H) y una fuerte acumulación de la proteína en los espacios intercromatínicos de la región perinucleolar en ~ 45% de las células siCAPN2 (punta de flecha de células siCAPN2). Estos datos parecen indicar que la CAPN2 podría regular la distribución de CFL1 en las BCC, ya que en ausencia de CAPN2, aumentan los niveles del CFL1 en el núcleo.

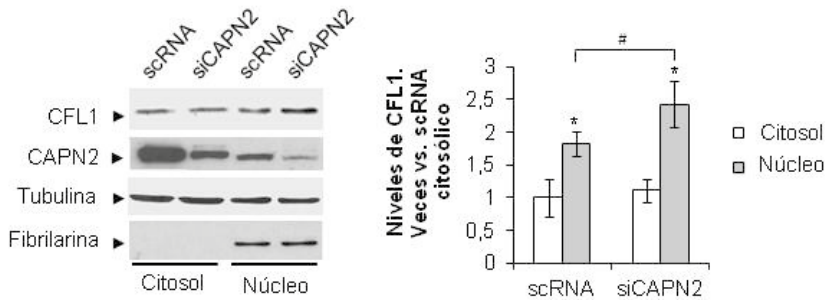


**Figura 21: Papel de la CAPN2 sobre la distribución de la CFL1 en células MDA-MB-231.** IF de CFL1 (verde) en células MDA-MB-231 transfectadas con scrNA y siCAPN2 (n=6). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestra la imagen aumentada y el perfil de intensidad H de una célula representativa. Ambos indican un fuerte acúmulo de CFL1 en la membrana de las células scrNA y en los espacios intercromatínicos de la región perinucleolar de las células siCAPN2 (puntas de flecha). Escala de 20  $\mu$ m.

Con el fin de validar los resultados obtenidos por IF, se evaluaron los niveles de CFL1 en el extracto de proteínas citosólico y nuclear de células MDA-MB-231 transfectadas con scrNA y siCAPN2 mediante WB. Como se puede observar en la figura 22, no se detectan cambios en los niveles de CFL1 citosólica en

## RESULTADOS

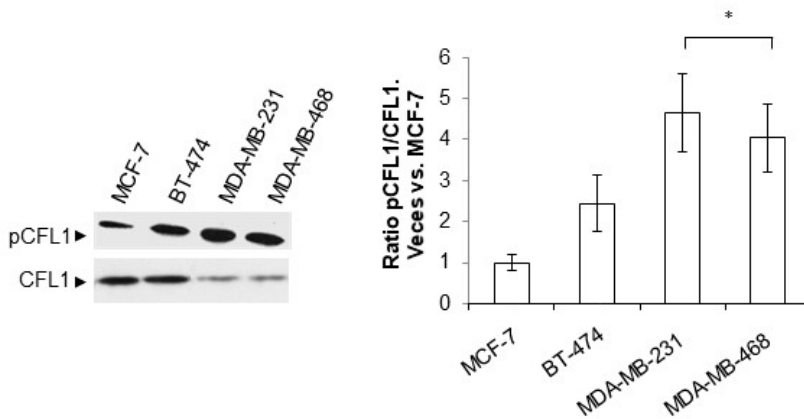
las células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA o siCAPN2. Únicamente se observan diferencias en el extracto nuclear, detectando un incremento significativo de los niveles de CFL1 en las células silenciadas para la CAPN2 con respecto a los controles. Puesto que la eficiencia del silenciamiento y la pureza de las fracciones citosólica y nuclear fueron adecuadas, los resultados confirman lo observado por IF. Parece que el silenciamiento de la CAPN2 promueve la acumulación de la CFL1 en el núcleo, sugiriendo que la CAPN2 podría modular la distribución nuclear de la CFL1 en las BCC.



**Figura 22: Efecto del silenciamiento de la CAPN2 sobre la distribución subcelular de la CFL1 en células MDA-MB-231.** Niveles de CFL1 en el extracto de proteínas citosólico y nuclear de células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2 analizados por WB. La eficiencia del silenciamiento se evaluó con los niveles de CAPN2. Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y normalizaron con la tubulina (citosol) o la fibrilarina (núcleo) y se representaron como la media de veces  $\pm$  SEM vs. scrRNA de la fracción citosólica. \* $p \leq 0.01$  vs. scrRNA de la fracción citosólica y # $p \leq 0.05$  vs. scrRNA de la fracción nuclear.

### 3.2 PAPEL DE LA CAPN2 EN LA FOSFORILACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA CFL1

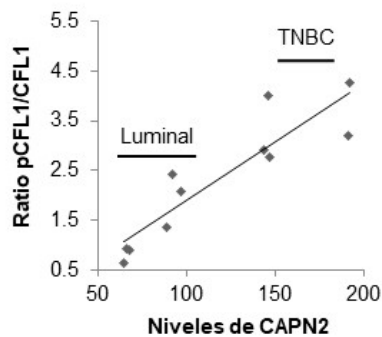
La fosforilación de la CFL1, inhibe su actividad despolimerizadora de la F-actina y promueve cambios en su distribución subcelular [202]. La ratio pCFL1/CFL1 es fundamental en el proceso de tumorigénesis [205]. Se ha relacionado al aumento de la misma con un mayor potencial de invasión y metástasis en las células tumorales [202, 204, 206]. Estos datos plantean la hipótesis de que la CAPN2 podría modular la distribución de la CFL1 a través de su fosforilación. Para estudiar esta posibilidad, primero se analizaron los niveles de la fosforilación de CFL1 en el extracto total de las proteínas de los subtipos luminales y TNBC de cáncer de mama mediante WB con los anticuerpos pCFL1 y CFL1. En la figura 23 se observa que las líneas celulares TNBC presentan mayor ratio pCFL1/CFL1 que las líneas luminales. Dado que estas líneas son también las que presentan mayores niveles de CAPN2, la fosforilación de la CFL1 podría ser dependiente de los niveles de expresión de la CAPN2.



**Figura 23: Tasa de fosforilación de la CFL1 en células de cáncer de mama.** Análisis de los niveles de pCFL1 y CFL1 en el extracto total de proteínas de células luminales (MCF-7 y BT-474) y TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) mediante WB. Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y la ratio pCFL1/CFL1 se representó como la media de veces  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.01$  vs. células MCF-7.

## RESULTADOS

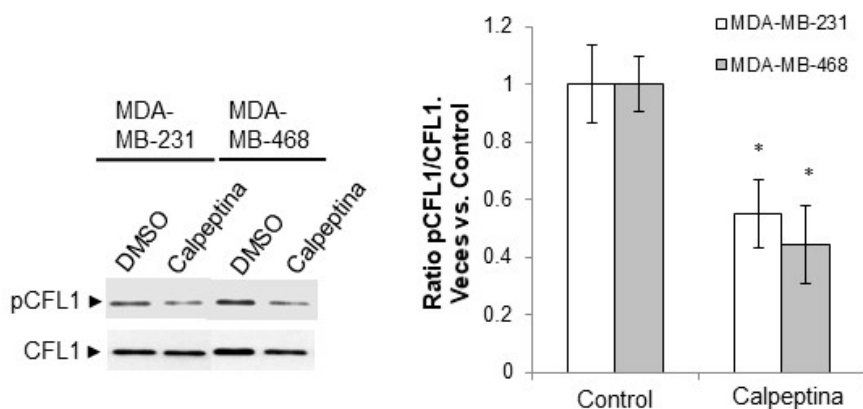
Se realizó un test de Spearman o test rho para analizar la correlación entre la ratio pCFL1/CFL1 y los niveles de la CAPN2 en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Valores de rho comprendidos entre 0.8 y 1, se corresponden con una fuerte correlación entre los pares de muestras analizadas. El valor de rho obtenido en el ensayo fue de 0.8159, con un nivel de significación de  $p=0.02$ . Como se observa en la representación gráfica, la ratio pCFL1/CFL1 es directamente proporcional a los niveles de la CAPN2 en las diferentes líneas de cáncer de mama (Figura 24). Las líneas celulares TNBC, son las que mayor ratio y mayores niveles de expresión de la CAPN2 presentan. Estos resultados sugieren que la CAPN2 podría estar implicada en la regulación de la vía de fosforilación de la CFL1.



**Figura 24:** Correlación entre la ratio pCFL1/CFL1 y los niveles de CAPN2 en células de cáncer de mama. Se analizó la correlación entre los niveles de expresión de la CAPN2 y la ratio pCFL1/CFL1 en células luminales (MCF-7 y BT-474) y TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) mediante el test de correlación de Spearman.

Para evaluar si la fosforilación de CFL1 depende de la actividad CAPN, se analizaron los niveles de pCFL1 en presencia y ausencia de calpeptina, un inhibidor de la actividad CAPN. Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468, con mayores niveles de expresión de la CAPN2, se trataron durante 24 horas con calpeptina, mientras que las células control se trataron con el vehículo (DMSO).

Transcurrido el tiempo de tratamiento, se analizó la ratio pCFL1/CFL1 mediante WB en el extracto total de las proteínas de las líneas celulares TNBC. Como cabía esperar, la ratio pCFL1/CFL1 decrecía hasta el 55% en las células MDA-MB-231 tratadas con calpeptina con respecto a las células control y el 45% en las MDA-MB-468 (Figura 25). El bloqueo de la actividad CAPN disminuía la tasa de fosforilación de la CFL1.

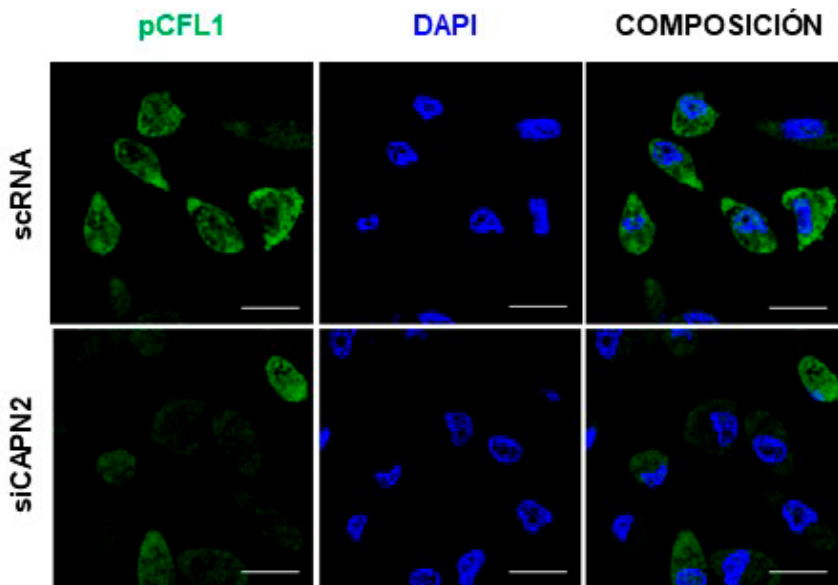


**Figura 25: Papel de la actividad calpaína sobre la fosforilación de CFL1 en células TNBC.** Análisis de los niveles de pCFL1 y CFL1 total mediante WB en el extracto total de proteínas de células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 en presencia o ausencia de calpeptina. Previamente las células se incubaron durante 24 horas con calpeptina 50µM o DMSO. Los datos (n≥3) se cuantificaron y la ratio pCFL1/CFL1 se representó como la media de veces ± SEM \*p≤0.01 vs. células tratadas con DMSO.

Una vez evaluado el papel de la CAPN2 en la fosforilación de la CFL1, se analizó la posible implicación de la CAPN2 en la modulación de la distribución de la CFL1 a través de su fosforilación. Se estudió la distribución de la pCFL1 mediante tinción IF en las células MDA-MB-231 transfectadas con scrNA y siCAPN2.

## RESULTADOS

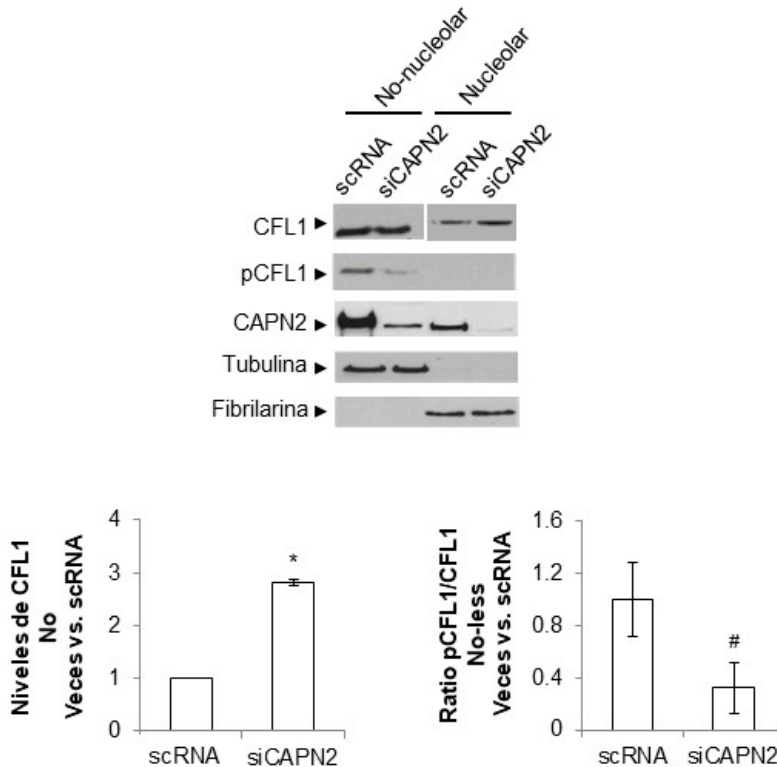
En la figura 26 se observa que, tanto en células scrRNA como siCAPN2, la pCFL1 es más abundante en el citosol que en el núcleo celular, como previamente se había descrito en la literatura [207]. Al igual que ya habíamos observado en las células tratadas con calpeptina, la pCFL1 disminuye notablemente en  $\sim 77\%$  de las células transfectadas con siCAPN2 con respecto al control. Podemos concluir que el silenciamiento de la CAPN2 disminuye la tasa de fosforilación de la CFL1.



**Figura 26:** Efecto de la depleción de CAPN2 sobre la distribución de pCFL1 en células MDA-MB-231. IF de pCFL1 (verde) en células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2 ( $n=6$ ). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Escala de 20  $\mu\text{m}$ .

Para verificar el posible papel de la CAPN2 en la distribución de la CFL1 a través de la modulación de su vía de fosforilación, se estudió la distribución subnuclear de la CFL1 y la pCFL1 por WB. A pesar de que no se detectaron trazas de la pCFL1 en la fracción No, se observó un aumento de la CFL1 nucleolar en las células siCAPN2 con respecto a las células control. Como se observa en la figura 27, tanto la eficiencia del

silenciamiento como la pureza de las fracciones resultaron elevadas. El silenciamiento de la CAPN2 promueve la acumulación de la CFL1 en el nucléolo y una disminución de la pCFL1 en el resto de la célula. Estas observaciones parecen indicar que la CAPN2 podría modular la distribución de la CFL1 mediante la regulación de su vía de fosforilación.



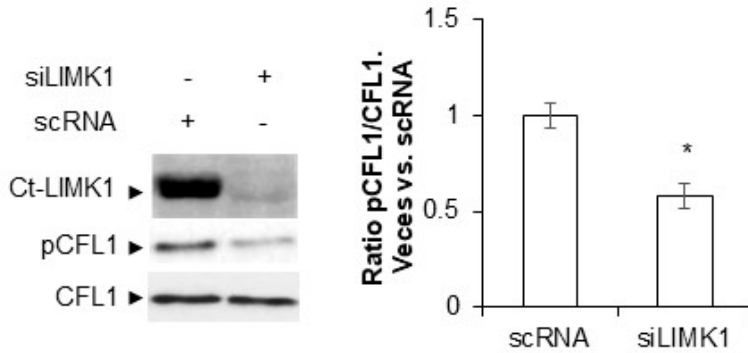
**Figura 27: Distribución subnuclear de CFL1 y pCFL1 en células MDA-MB-231 knock-down de CAPN2.** Análisis de los niveles de CFL1 y pCFL1 en extractos nucleolares y no nucleolares de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA o siCAPN2 mediante WB. Los niveles de CAPN2 se usaron para comprobar la eficiencia del silenciamiento. La fibrilarina y la tubulina se usaron como marcadores de carga y de pureza de las fracciones nucleolar y no nucleolar respectivamente. Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y se representaron como la media de veces de CFL1 nucleolar  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.01$  vs. scRNA (gráfica izquierda), o como la media de veces del ratio pCFL1/CFL1 en la fracción no nucleolar  $\pm$  SEM # $p \leq 0.05$  vs. scRNA (gráfica derecha).

## 4. POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA CAPN2 EN LA ACTIVACIÓN DE LIMK1

### 4.1 LA CFL1 COMO SUSTRATO DE LIMK1

Se ha descrito que tanto LIMK1 como LIMK2 fosforilan e inactivan a la CFL1 [202, 208]. Sin embargo, también se ha señalado a LIMK1 como la principal quinasa implicada en la fosforilación de la CFL1 en las células MDA-MB-231 [209]. Para comprobarlo, se analizó la ratio pCFL1/CFL1 mediante WB en extracto total de proteínas de células transfectadas con scrRNA y siLIMK1. Como se observa en la figura 28, los niveles de LIMK1 disminuyen bruscamente al silenciar LIMK1, indicativo de una muy buena eficiencia del silenciamiento. El silenciamiento de LIMK1 inhibe de forma drástica la fosforilación de CFL1 y en cambio los niveles de CFL1 no se ven afectados. En la representación gráfica se aprecia que la ratio pCFL1/CFL1 disminuye la mitad en las células siLIMK1 con respecto a las células control. Sin embargo, no se detectaron cambios en la ratio pCFL1/CFL1 asociados a la actividad fosfatasa de las proteínas *Slingshot* (SSH) y Cronofina (CIN) (datos no mostrados), conocidas por desfosforilar a la CFL1 [210]. Estos datos indican que LIMK1 es la principal quinasa implicada en la fosforilación de la CFL1 en las células MDA-MB-231.



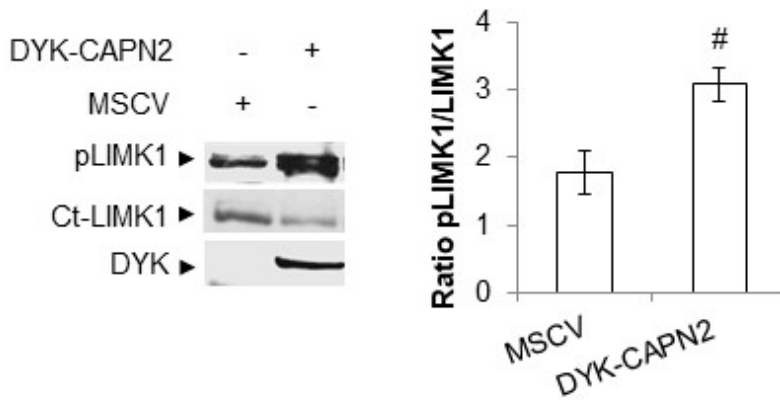


**Figura 28: Fosforilación de CFL1 mediada por LIMK1 en células MDA-MB-231.** Análisis de los niveles de pCFL1 y CFL1 en extracto total de proteínas de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siLIMK1 mediante WB. Los niveles de LIMK1 se usaron para determinar la eficiencia del silenciamiento. Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y la ratio pCFL1/CFL1 se representó como la media de veces  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.01$  vs. scRNA.

## 4.2 PAPEL DE LA CAPN2 EN LA ACTIVACIÓN INDIRECTA DE LIMK1

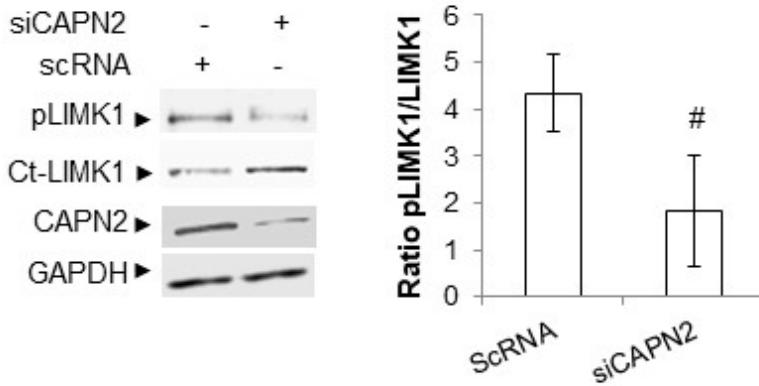
Son varias las publicaciones que describen la activación de LIMK1 a través de la fosforilación de su residuo Thr-508 vía Rho GTPasas [211–213]. Se conoce que la CAPN2 promueve de forma indirecta la fosforilación del residuo Thr-508 de LIMK1 mediante la activación de la vía ROCK-RhoA [214]. Con el objetivo de estudiar el papel de la CAPN2 en la activación indirecta de LIMK1, se analizó la ratio pLIMK1/LIMK1 por WB en el extracto de proteínas totales de células MCF-7 transfectadas con MSCV y DYK-CAPN2. Tras comprobar con  $\alpha$ -DYK que la eficiencia de la sobreexpresión de la CAPN2 fue elevada, se observó un aumento de los niveles de pLIMK1. Sorprendentemente, al analizar los niveles totales de LIMK1, se detectó una drástica disminución de los mismos en las células transfectadas con DYK-CAPN2 con respecto a los controles. Como consecuencia, la ratio pLIMK1/LIMK1 aumentaba un 50% en las células con expresión ectópica de CAPN2 (Figura 29). Parece que el aumento de los niveles de CAPN2 promueve la fosforilación de LIMK1.

## RESULTADOS



**Figura 29: Fosforilación de LIMK1 en células MCF-7 con expresión ectópica de CAPN2.** Niveles de pLIMK1 y LIMK1 en extracto de proteínas totales de células MCF-7 transfectadas con MSCV y con DYK-CAPN2 analizados por WB. Se usó  $\alpha$ -DYK para determinar la eficiencia de sobreexpresión. Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y se representaron como la media de la ratio pLIMK1/LIMK1  $\pm$  SEM # $p \leq 0.05$  vs. MSCV.

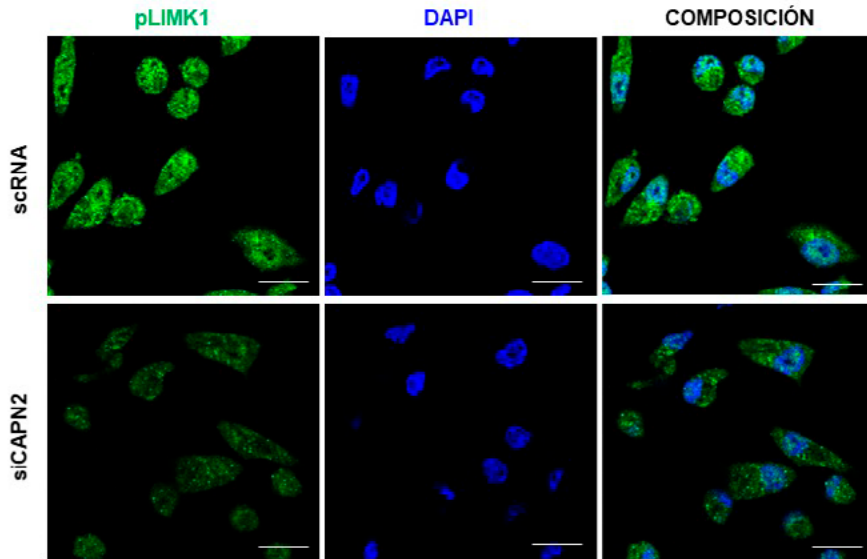
Se realizó el mismo estudio de la ratio pLIMK1/LIMK1 en extracto de proteínas totales de células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2. Como se observa en la figura 30, la eficiencia del silenciamiento así como la carga de las muestras son adecuadas. Al contrario de lo observado en las células MCF-7, los niveles de pLIMK1 disminuyen al silenciar la CAPN2. De nuevo, resulta sorprendente encontrar que los niveles totales de LIMK1 aumentan al silenciar la CAPN2. En consecuencia, la ratio pLIMK1/LIMK1 disminuye drásticamente tras el silenciamiento de la CAPN2. Estos resultados, junto con los obtenidos con las células MCF-7, sugieren que la CAPN2 regula la vía de fosforilación de LIMK1 en las BCC, aunque es muy posible que ésta esté mediada por la proteólisis de LIMK1.



**Figura 30: Papel de la CAPN2 sobre la ratio de fosforilación de LIMK1 en células MDA-MB-231.** Niveles de pLIMK1 y LIMK1 analizados mediante WB en extracto de proteínas totales de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. Se usó  $\alpha$ -CAPN2 y  $\alpha$ -GAPDH como marcadores de eficiencia del silenciamiento y carga respectivamente. Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y se representaron como la media de la ratio pLIMK1/LIMK1  $\pm$  SEM  $\#p \leq 0.05$  vs. scRNA.

Las imágenes de microscopia confocal confirmaron los resultados obtenidos por WB; los niveles de p(Thr-508)-LIMK1 disminuían en el ~ 90% de las células MDA-MB-231 transfectadas con siCAPN2 con respecto a las células scRNA (Figura 31). Sin embargo, no se observaron cambios aparentes en el patrón de distribución de pLIMK1 entre las células scRNA o siCAPN2. Parece que la CAPN2 no interviene en la modulación de la distribución de la quinasa mediante su fosforilación.

## RESULTADOS



**Figura 31: Papel de la CAPN2 sobre la distribución de pLIMK1 en células MDA-MB-231.** Imágenes de microscopía confocal de p(Thr-508)-LIMK1 (verde) en células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2 ( $n=3$ ). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestra la composición de ambas tinciones solapadas. Escala de 20  $\mu\text{m}$ .

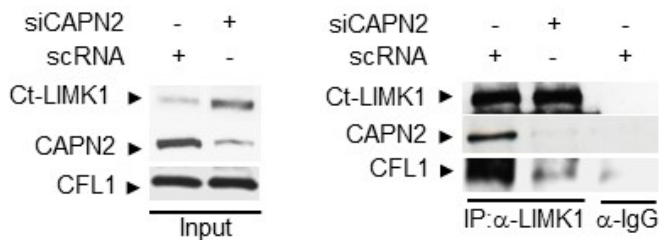
Los resultados obtenidos en los experimentos sugieren que la CAPN2 promueve la activación indirecta de LIMK1 mediante la regulación de su vía de fosforilación, aunque no parece regular su distribución celular a través de esta vía.

### 4.3 POSIBLE PAPEL DE LA CAPN2 EN LA ACTIVACIÓN DIRECTA DE LIMK1

Como ya se ha mencionado, la CAPN2 participa en la activación indirecta de LIMK1, a través de la activación de la vía ROCK-RhoA [214]. Sin embargo, se han descrito otros mecanismos diferentes para la activación de LIMK1 independientes de RhoA [215] y la fosforilación en Thr-508 de LIMK1. En este sentido, se ha demostrado que células MDA-MB-231 con sobreexpresión de LIMK1 exclusivamente citosólica o nuclear, presentaban niveles similares de pCFL1, a

pesar de que los niveles de p(Thr-508)-LIMK1 eran mucho menores en el núcleo que en el citosol [209]. Todo ello lleva a pensar que la quinasa no solo se activa por fosforilación del residuo Thr-508. De hecho, se ha publicado que algunas proteínas se unen al dominio LIM induciendo un cambio conformacional en la proteína que desenmascara su dominio quinasa permitiendo la fosforilación de la enzima y su activación [215].

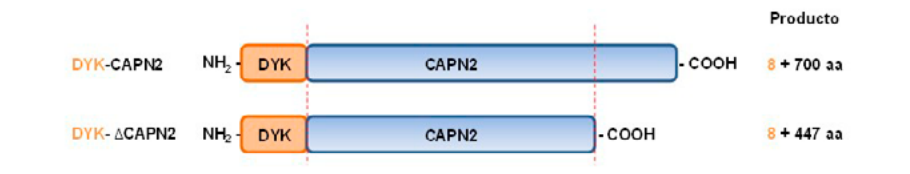
La CAPN2 podría promover la activación de LIMK1 por una ruta alternativa a la ya descrita; por una vía directa. Para confirmar este planteamiento, se analizó la interacción CAPN2/LIMK1 mediante co-inmunoprecipitación con el anticuerpo LIMK1 y posterior WB con  $\alpha$ -CAPN2 en extractos de proteínas totales de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. De acuerdo con lo observado en los experimentos previos, en los *Inputs* se observó un aumento de LIMK1 al silenciar la CAPN2 (Figura 32). Los resultados de la IP muestran que LIMK1 y CAPN2 co-inmunoprecipitan solo en células transfectadas con scRNA. La dependencia de CAPN2 para la unión de LIMK1 a su sustrato se analizó en estos inmunocomplejos. En las células transfectadas con siCAPN2, la CFL1 y LIMK1 apenas co-inmunoprecipitan, sugiriendo que la unión directa entre la CAPN2 y LIMK1 es crucial para la unión de LIMK1 con su sustrato, la CFL1.



**Figura 32: Interacción directa entre CAPN2 y LIMK1 en células MDA-MB-231.** Co-inmunoprecipitación de LIMK1, CAPN2 y CFL1 en extracto total de proteínas de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. IP con  $\alpha$ -LIMK1, seguido de WB con  $\alpha$ -LIMK1,  $\alpha$ -CAPN2 o  $\alpha$ -CFL1. Como control negativo, se usó IgG. En la figura se muestran los Inputs del experimento, así como la IP.

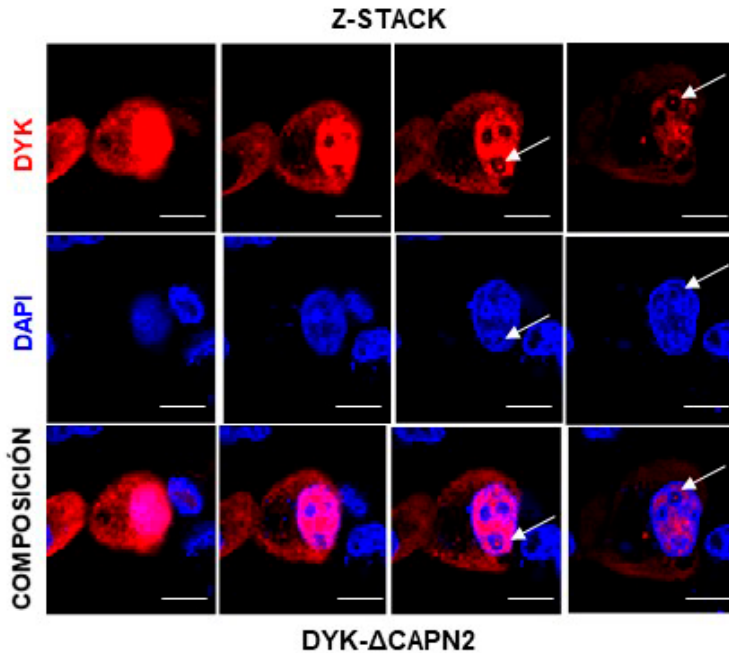
## RESULTADOS

LIMK1 posee dos dominios LIM y un dominio PDZ de unión a otras proteínas [215]. La CAPN2 contiene en su extremo C-terminal un dominio PDZ de tipo I [23] (Figura 2) a través del cual podría interactuar con LIMK1. Para evaluar el posible papel del extremo C-terminal de la CAPN2 en la unión CAPN2/LIMK1, se transfectaron células de la línea MCF-7 con el vector vacío MSCV o con vectores de expresión de CAPN2 completa o truncada (Figura 33): el vector DYK-CAPN2 contiene la CAPN2 completa (1-700aa), mientras que el vector DYK- $\Delta$ CAPN2 contiene una versión truncada de la CAPN2 (1-447aa), que carece del extremo C-terminal con el dominio PDZ. Ambos vectores se marcaron con una etiqueta DYK de 8aa en su extremo N-terminal:



**Figura 33: Representación gráfica del vector DYK-CAPN2 y DYK- $\Delta$ CAPN2.** El vector DYK-CAPN2 contiene el cDNA de la CAPN2 completa (1-700aa) y el vector DYK- $\Delta$ CAPN2 el cDNA de la CAPN2 truncada (1-447aa) sin la porción C-terminal con el motivo PDZ. Ambos se marcaron con una etiqueta DYK en el extremo N-terminal.

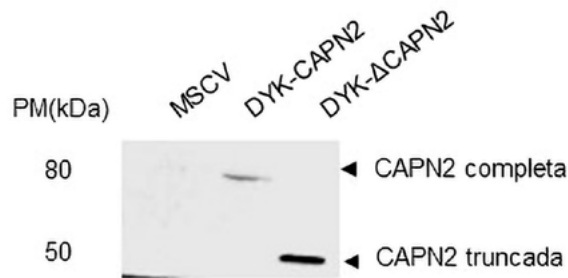
Se podría pensar que la  $\Delta$ CAPN2 al carecer del extremo C-terminal que contiene el dominio PEF, podría no dimerizar con la subunidad reguladora CAPNS1 afectando a su localización o a su estabilidad. Para examinar que la eliminación del extremo C-terminal de la proteína no afectaba a su distribución, se analizó la localización subnuclear de DYK- $\Delta$ CAPN2 en las células MCF-7 mediante tinción IF con  $\alpha$ -DYK. Se tomaron varios planos (*Z-Stack*) de una célula MCF-7 transfectada con DYK- $\Delta$ CAPN2 (Figura 34). Como puede observarse, la CAPN2 truncada presenta la misma localización nuclear y nucleolar (flechas) que la CAPN2 completa (Figura 10). La eliminación del extremo C-terminal de la  $\Delta$ CAPN2 no influye en su distribución.



**Figura 34:** Localización subnuclear de CAPN2 truncada en células MCF-7. Inmunotinción de  $\alpha$ -DYK (rojo) en células MCF-7 transfectadas con DYK- $\Delta$ CAPN2 ( $n=6$ ). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran varios planos de una célula representativa (Z-stack). Las flechas señalan la presencia de DYK- $\Delta$ CAPN2 en el nucléolo. Escala de 20  $\mu$ m.

Para descartar cualquier síntoma de inestabilidad o de degradación de la proteína CAPN2 truncada, se analizaron los niveles de DYK mediante WB en extracto de proteína nucleolar de células MCF-7 transfectadas con MSCV, DYK-CAPN2 y DYK- $\Delta$ CAPN2. Cabe destacar que la extracción de las proteínas nucleolares y su estudio por WB con  $\alpha$ -DYK, se realizó a las 48 horas de la transfección, tiempo suficiente para mostrar síntomas de degradación. De acuerdo con lo observado por IF, tanto la CAPN2 completa como la truncada se detectaron en el nucléolo de las células MCF-7 (Figura 35).

## RESULTADOS



**Figura 35:** Localización nucleolar de las formas completa o truncada de CAPN2 exógena en células MCF-7. Western blot con α-DYK en extractos nucleolares de células MCF-7 transfectadas con MSCV, DYK-CAPN2 y DYK-ΔCAPN2 (n=6).

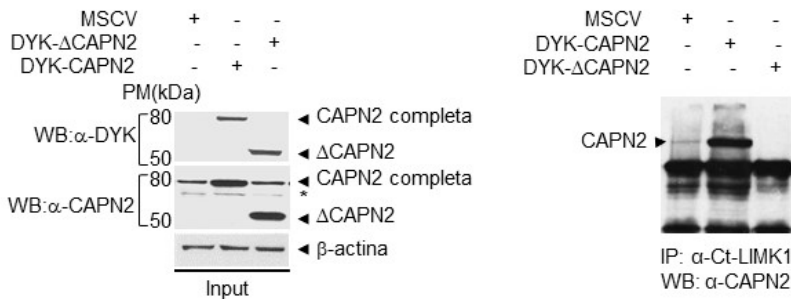
Los niveles de DYK fueron incluso mayores en las células transfectadas con DYK-ΔCAPN2 que en las DYK-CAPN2, descartando cualquier señal de inestabilidad. Aunque la ΔCAPN2, presentaba un peso molecular (~ 50kDa) diferente al de la CAPN2 completa (~ 80kDa), no se detectaron síntomas de degradación de la proteína. La eliminación del extremo C-terminal de la ΔCAPN2 no afecta a su estabilidad.

Los resultados de los experimentos por IF y WB demuestran que la CAPN2 truncada presenta la misma localización y estabilidad que la CAPN2 completa.

Tras descartar problemas en la distribución o la estabilidad de la CAPN2 truncada, se evaluó el posible papel del extremo C-terminal de la CAPN2 en la interacción CAPN2/LIMK1. Se realizó una IP con α-LIMK1 en extracto total de células MCF-7 transfectadas con el vector MSCV, DYK-CAPN2 y DYK-ΔCAPN2, seguida de WB con α-CAPN2. En los *Inputs*, se verificó la eficiencia de la sobreexpresión de CAPN2 y ΔCAPN2 con α-DYK y α-CAPN2 (Figura 36). En ellos se detectó una doble banda de la CAPN2 en las células transfectadas con DYK-ΔCAPN2 debido a la presencia de la CAPN2 endógena y la ectópica. Como se observa en la IP, LIMK1 y CAPN2 co-inmunoprecipitan levemente en las células control debido a



la CAPN2 basal. Se produce una intensa co-inmunoprecipitación entre LIMK1 y CAPN2 en las células transfectadas con la CAPN2 completa. Sin embargo, LIMK1 no interacciona con  $\Delta$ CAPN2. Los resultados indican que LIMK1 y CAPN2 forman un complejo a través de la unión del extremo C-terminal de la CAPN2 con LIMK1.

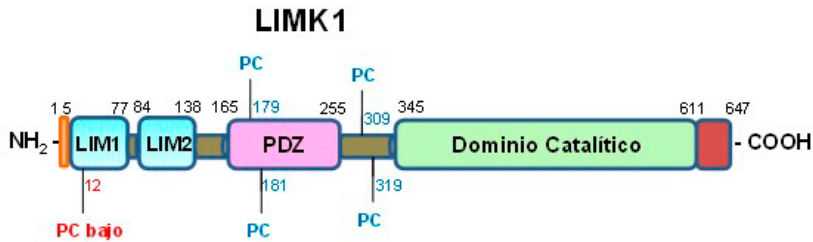


**Figura 36: Unión de LIMK1 al extremo Ct de CAPN2 en células MCF-7.** IP con  $\alpha$ -LIMK1 en extracto total de proteínas de células MCF-7 transfectadas con MSCV, DYK-CAPN2 y DYK- $\Delta$ CAPN2 seguido de WB con  $\alpha$ -CAPN2. Los Inputs se analizaron con  $\alpha$ -DYK,  $\alpha$ -CAPN2 y  $\alpha$ - $\beta$ -actina. \*Bandas inespecíficas.

#### 4.4 LIMK1 COMO POSIBLE DIANA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA CAPN2

El corte del extremo N-terminal autoinhibidor de LIMK1 se ha descrito como otro mecanismo de su activación [216]. Se conoce que la Caspasa-3 proteoliza el extremo N-terminal de LIMK1 produciendo una quinasa truncada constitutivamente activa [216]. Puesto que en experimentos anteriores observamos una disminución o aumento de LIMK1 cuando la CAPN2 se sobreexpresa o silencia respectivamente, es posible que la fosforilación y/o activación de LIMK1 esté mediada por su proteólisis. Mediante el programa GPS-CCD de predicción de puntos de corte de la CAPN2 [217], se analizaron los posibles puntos de corte sobre LIMK1 (Figura 37). Se encontraron 5 posibles puntos de corte en LIMK1; 4 con un umbral de predicción elevado y 1 con un umbral de predicción bajo.

## RESULTADOS

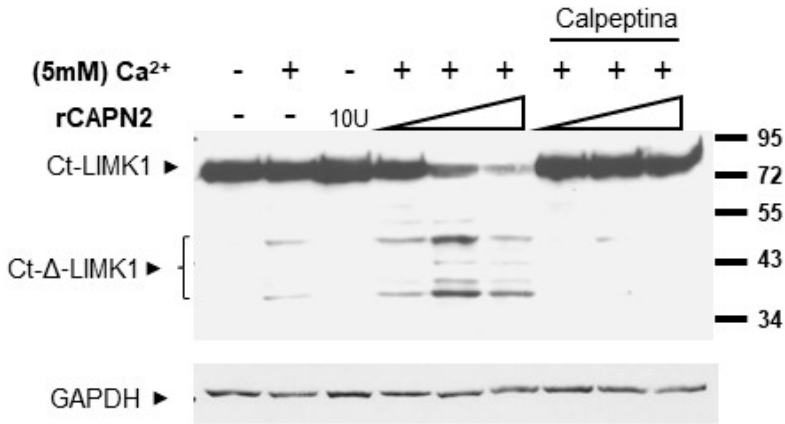


**Figura 37: Estructura de LIMK1.** Comenzando por el extremo N-terminal, los dominios LIM seguidos del dominio PDZ de unión a proteínas. Este se separa del dominio catalítico por una región rica en Pro/Ser susceptible de fosforilación. Con el programa GPS-CCD de predicción de puntos de corte de CAPNs [217], encontramos 5 posibles puntos de corte en LIMK1; 4 con un umbral de predicción elevado (PC azul) y 1 con un umbral de predicción bajo (PC rojo).

En conjunto, estos datos plantean la hipótesis de que la quinasa podría ser un sustrato de la CAPN2. Con el objetivo de estudiar a LIMK1 como posible diana de la actividad proteolítica de la CAPN2, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos:

### a. Ensayo de proteólisis de LIMK1 *in vitro*.

El extracto total de proteínas de células MDA-MB-231 se incubó con concentraciones crecientes de calpaína-2 recombinante (rCAPN2) y  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia o ausencia de calpeptina. Posteriormente, LIMK1 y sus posibles fragmentos se analizaron mediante WB. Tan solo con la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se detectaron fragmentos de LIMK1 truncada probablemente debido a la actividad de la CAPN2 endógena. En las muestras con 1U y 5U de rCAPN2 y  $\text{Ca}^{2+}$ , se detectaron fragmentos de LIMK1 (Figura 38). La quinasa era proteolizada de manera dosis dependiente por la rCAPN2 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a las células control. Sin embargo, a elevadas concentraciones de rCAPN2 (10U), la proteólisis de LIMK1 fue tan fuerte, que los fragmentos de la proteína, posiblemente más inestables, comenzaron a desaparecer. De acuerdo con esto, se ha descrito en la literatura, que los fragmentos de otras proteínas diana de la CAPN2, desaparecen en presencia de elevadas concentraciones de rCAPN2 [19, 28].



**Figura 38: Proteólisis de LIMK1 mediada por CAPN2.** Se incubó extracto total de células MDA-MB-231 con concentraciones crecientes de rCAPN2 (1, 5 y 10U) y  $Ca^{2+}$  5mM en presencia o ausencia de calpeptina 50 $\mu$ M. LIMK1 completa y truncada ( $\Delta$ LIMK1) se analizaron por WB con  $\alpha$ -LIMK1. Se usó GAPDH para asegurar la especificidad de proteólisis.

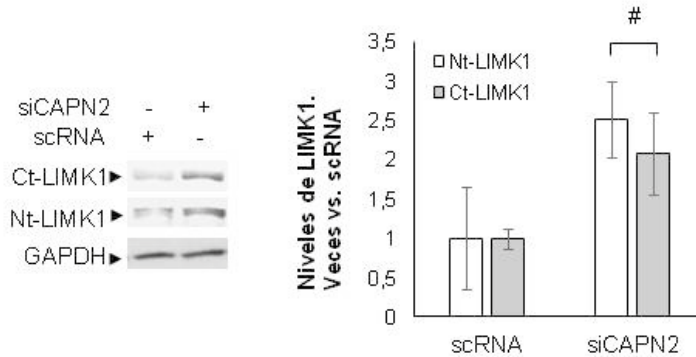
Cabe destacar la presencia de fragmentos de menor tamaño (38-50kDa) de LIMK1 en las muestras con rCAPN2 y  $Ca^{2+}$ . De acuerdo con estos datos, se sabe que la caspasa-3 proteoliza a LIMK1 produciendo dos fragmentos de ~ 45-60kDa con capacidad de fosforilar e inactivar a la CFL1 durante el proceso de apoptosis [216].

En presencia de calpeptina, se bloqueaba la actividad de la rCAPN2 no detectándose señal de proteólisis de LIMK1. Este resultado junto con los niveles de GAPDH que no variaban en ninguna muestra del experimento, sugieren que la CAPN2 proteoliza específicamente a LIMK1.

**b. Ensayo de proteólisis de LIMK1 *in vivo*.**

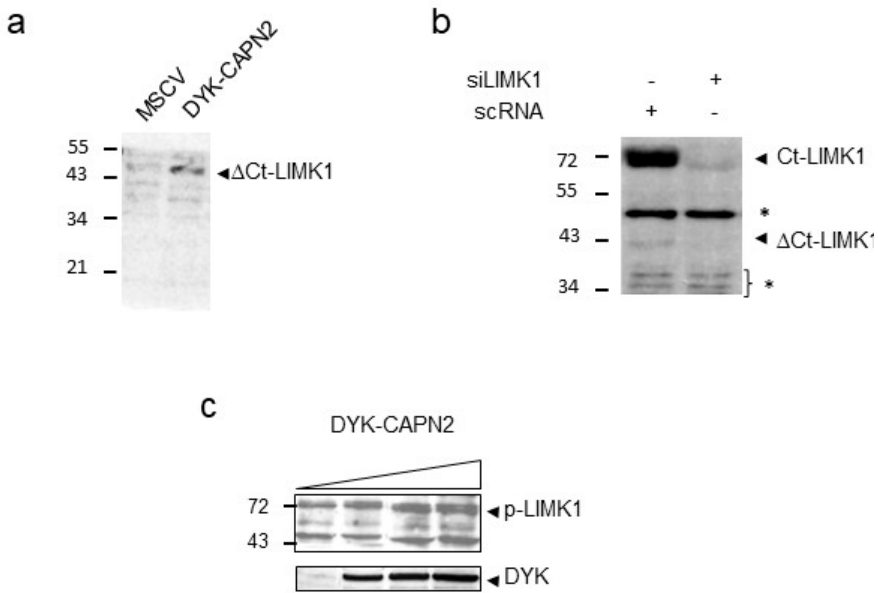
Se analizaron los niveles de LIMK1 en el extracto total de proteínas de células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2 mediante WB con  $\alpha$ -Ct-LIMK1 y  $\alpha$ -Nt-LIMK1. En ambos casos, aumentaban los niveles de LIMK1 al silenciar la CAPN2 con respecto al control (Figura 39).

## RESULTADOS



**Figura 39: Efecto de la expresión de CAPN2 sobre los niveles de LIMK1 en células MDA-MB-231.** Análisis de LIMK1 mediante WB con anticuerpos  $\alpha$ -Ct-LIMK1 y  $\alpha$ -Nt-LIMK1 en extracto total de proteínas de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. Los datos ( $n \geq 3$ ) se cuantificaron y normalizaron con  $\alpha$ -GAPDH y se representaron como la media de veces  $\pm$  SEM # $p < 0.05$  vs. scRNA.

El resultado del ensayo podría ser indicativo de la actividad proteolítica de la CAPN2 sobre LIMK1. Sin embargo, no se detectaron fragmentos de LIMK1 en este experimento. Probablemente, los fragmentos más inestables de la quinasa se encontrarán en el límite de detección de los WB. De hecho, la sobreexposición de los films correspondientes, mostró una banda de  $\sim 43$ - $45$ kDa en las células MCF-7 con expresión ectópica de la CAPN2, que aumentaba su intensidad con respecto a los controles (Figura 40 a). Del mismo modo, la sobreexposición de la membrana correspondiente a células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siLIMK1 permitió detectar una banda de  $\sim 43$ - $45$ kDa en las células control que podría ser el resultado de la actividad proteolítica de la CAPN2 endógena. Esta banda desaparecía en las células siLIMK1 (Figura 40 b) indicando la especificidad de la misma. Finalmente, cuando se analizó una fracción de LIMK1 menos abundante que la de LIMK1 total, como es pLIMK1, se observaron también posibles fragmentos de LIMK1. Es más, al transfectar las células MCF-7 con cantidades crecientes de DYK-CAPN2 e incubar la membrana del WB con pLIMK1, aparecía de nuevo la banda de  $\sim 43$ - $45$ kDa de manera proporcional a los niveles de CAPN2 ectópica (Figura 40 c). Los resultados indican que las bandas observadas a  $\sim 43$ - $45$ kDa podrían ser efectivamente fragmentos específicos de LIMK1 resultantes de la proteólisis mediada CAPN2.

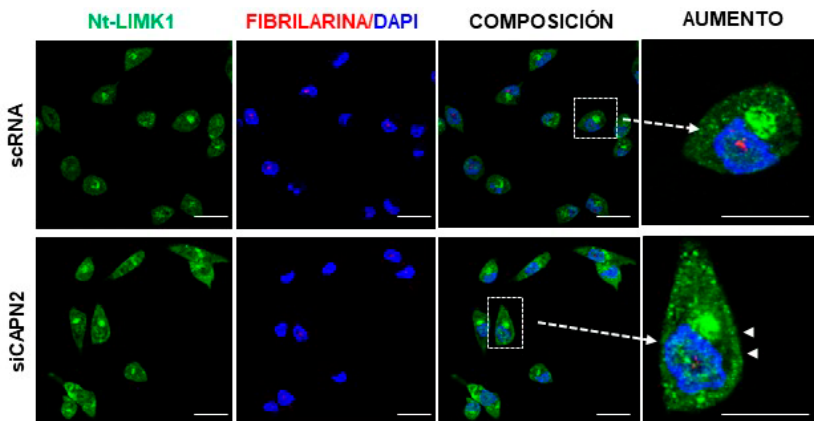


**Figura 40: Análisis de los productos de la proteólisis de LIMK1 mediada por CAPN2.** a) Niveles de LIMK1 analizados por WB en extractos totales de células MCF-7 transfectadas con MSCV y DYK-CAPN2. b) Niveles de LIMK1 analizados por WB extractos totales de células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siLIMK1. \*Bandas inespecíficas. c) Niveles de p-(Thr-508)-LIMK1 en extracto total de células MCF-7 transfectadas con cantidades crecientes de DYK-CAPN2. Se usó  $\alpha$ -DYK para asegurar la eficiencia de la expresión ectópica de CAPN2. En los tres casos, se muestra una sobreexposición de los films.

A pesar de que se ha publicado que la CAPN2 promueve la activación indirecta de LIMK1 vía ROCK/RhoA [214], los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, plantean que la proteólisis de LIMK1 mediada por la CAPN2 podría ser un mecanismo directo de su activación.

## 4.5 PAPEL DE LA CAPN2 EN LA REGULACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LIMK1

La actividad proteolítica de la CAPN2 podría regular la distribución de LIMK1. Se analizó la distribución de LIMK1 en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 con una tinción IF con  $\alpha$ -LIMK1. Los resultados del experimento confirmaron lo observado por WB; los niveles globales de LIMK1 aumentaban en las células transfectadas con siCAPN2 con respecto a las células control (Figura 41). En la imagen aumentada, destaca una acumulación de LIMK1 en el citosol de las células control y silenciadas. En cambio, destacamos que en ~ 53% de las células siCAPN2, se observa una acumulación de LIMK1 en la membrana celular que no se detecta en las células control (punta de flecha). Estos datos sugieren que la actividad proteolítica de la CAPN2 podría regular la distribución de LIMK1.



**Figura 41:** Efecto de la expresión de CAPN2 sobre la distribución de LIMK1 en células MDA-MB-231. IF de Nt-LIMK1 (verde), fibrilarina (rojo) en células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 (n=3). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestra la composición de ambas tinciones solapadas y un aumento de una célula representativa. Las puntas de flecha señalan un acúmulo de LIMK1 en la membrana de células siCAPN2. Escala de 20  $\mu$ m.

## 5. PAPEL DE LA CAPN2 EN LA FOSFORILACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA CFL1 DURANTE EL CICLO CELULAR

La fosforilación y redistribución de la CFL1 durante la mitosis, sigue el mismo patrón que el de activación de LIMK1; incrementa en etapas tempranas de la mitosis, alcanzando su máximo nivel en la metafase. Posteriormente, comienza a disminuir gradualmente hasta alcanzar los niveles basales en las etapas de anafase, telofase y citocinesis [218, 219]. Por el contrario, la activación de la vía ROCK/RhoA sigue un patrón distinto, alcanzando su pico máximo en la telofase [220]. Por ello, se ha postulado que durante el ciclo celular, LIMK1 debe de ser activada por otra vía diferente a la de su fosforilación en el residuo Thr-508 [218].

La CAPN2 podría participar en la activación mitótica de LIMK1 y posterior fosforilación de la CFL1 durante el ciclo celular. Para evaluar esta hipótesis, se estudiaron los niveles y la distribución de la CFL1 y la pCFL1 durante el ciclo celular en células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 no sincronizadas. En este experimento, no se usó ningún inhibidor específico del ciclo celular con el objetivo de no afectar a ningún proceso celular. Se sabe que el nocodazol, usado para bloquear la prometafase, altera la orientación del huso mitótico [221, 222], fenómeno regulado por LIMK1 [219].

Se realizó una tinción de IF con  $\alpha$ -CFL1 y  $\alpha$ -pCFL1 y posterior monitorización de la progresión del ciclo celular mediante análisis morfológico con DAPI y contraste de fases (Figura 42).

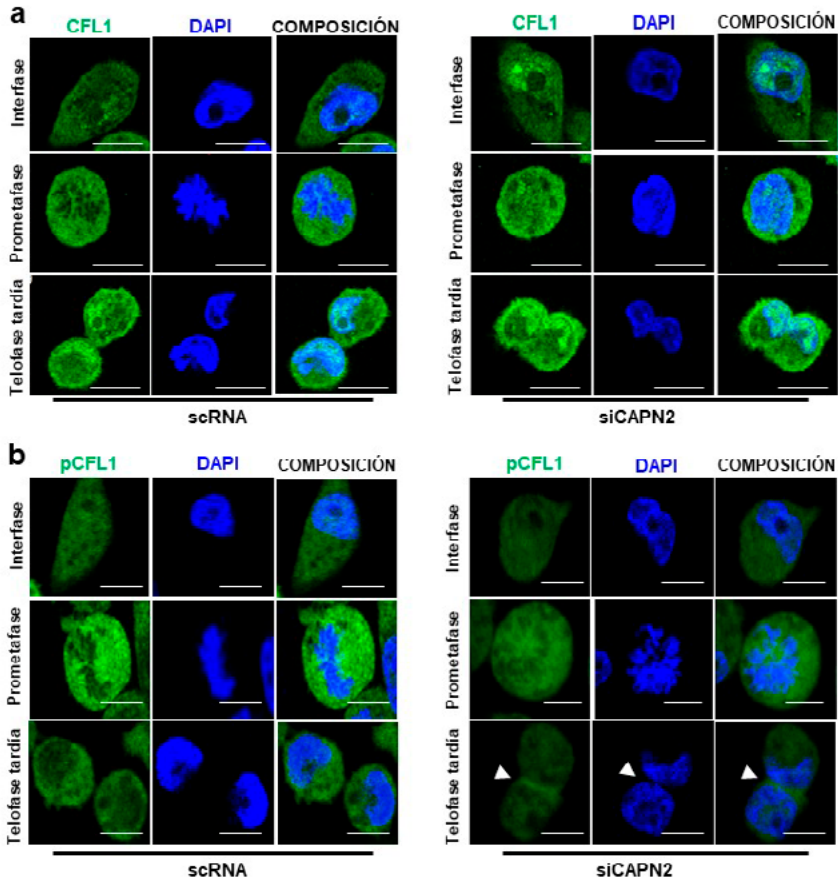
En las células control (Figura 42 izquierda) se observó que: i) en la interfase, la ratio pCFL1/CFL1 descendía en la membrana celular y en el núcleo; ii) en la prometafase, de acuerdo con otras publicaciones previas [218, 219], se producía un fuerte incremento de la ratio pCFL1/CFL1 con respecto a otras fases del ciclo; además, la CFL1 y la pCFL1 se distribuían uniformemente alrededor de

## RESULTADOS

los cromosomas; iii) en la telofase tardía, la CFL1 se acumulaba principalmente en el núcleo y en la membrana celular mientras que la pCFL1 se detectaba en el citoplasma. Estos datos, junto con lo ya descrito en la literatura [219], indican que la CFL1 fosforilada se trasloca de la periferia celular al citoplasma en la telofase.

En las células silenciadas para la CAPN2 (Figura 42 derecha), se producía un descenso significativo de la ratio pCFL1/CFL1 en todas las fases en comparación con las células control: i) en la interfase, la CFL1 se acumulaba anormalmente en el núcleo con respecto a los controles; ii) en la prometafase, se detectó un leve incremento de la pCFL1 con respecto a las demás fases del ciclo celular. No obstante, este incremento era muy inferior al que se producía en las células control; iii) en la telofase tardía, la CFL1 se acumulaba anormalmente en el núcleo mientras que la pCFL1 lo hacía en el anillo contráctil (punta de flecha). Los resultados sugieren que el silenciamiento de la CAPN2 retrasa la traslocación de la pCFL1 desde la periferia celular al citoplasma. La CAPN2 podría modular la fosforilación y distribución de la CFL1 durante el ciclo celular.



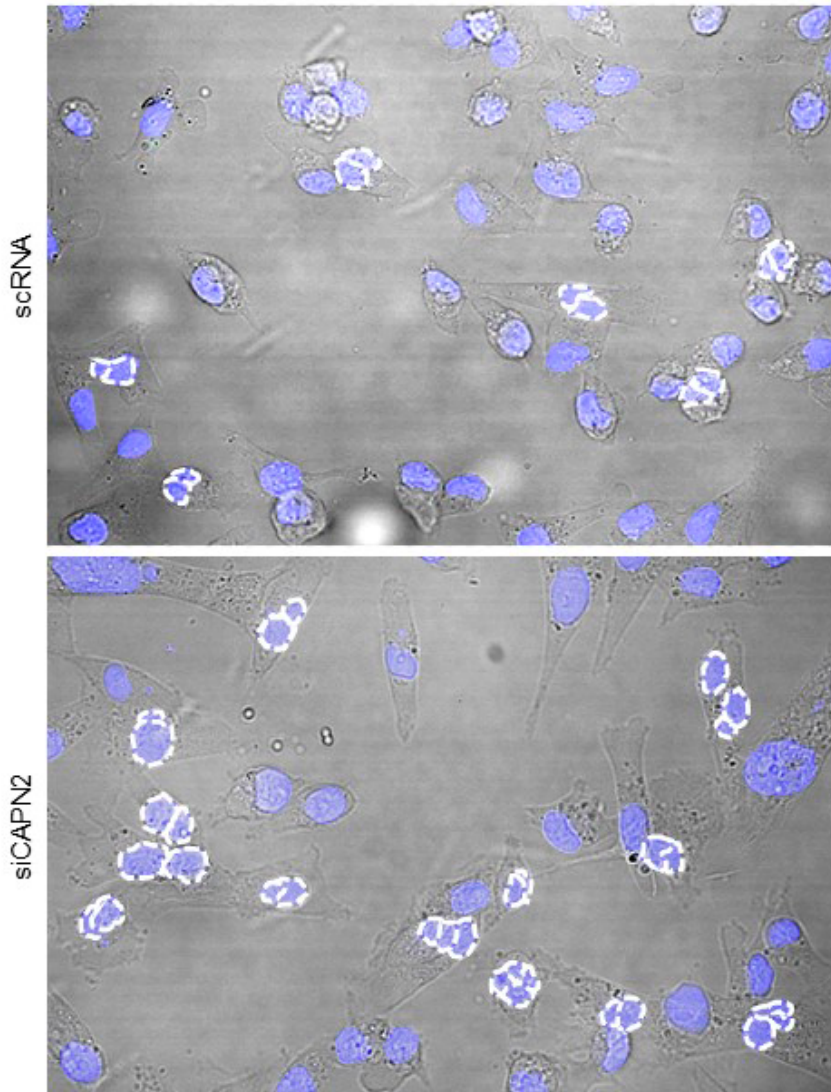


**Figura 42:** Papel de la expresión de CAPN2 sobre la distribución de CFL1/pCFL durante el ciclo celular. IF de a) CFL1 (verde) y b) pCFL1 (verde) en células MDA-MB-231 no sincronizadas transfectadas con scRNA (paneles izquierdos) y siCAPN2 (paneles derechos). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las puntas de flecha señalan un acúmulo de pCFL1 en el anillo contráctil de células siCAPN2. Se muestra la imagen aumentada de una célula representativa (n=6) de la interfase, prometafase y telofase tardía. Escala de 20  $\mu$ m.

## RESULTADOS

Diversos estudios describen que las alteraciones en el patrón de fosforilación de la CFL1 durante el ciclo celular, desencadenan una incorrecta orientación del huso mitótico, retrasos en la progresión de la anafase a la telofase y fallos en la citoquinesis, que conducen a la multinucleación [210, 218, 219, 223].

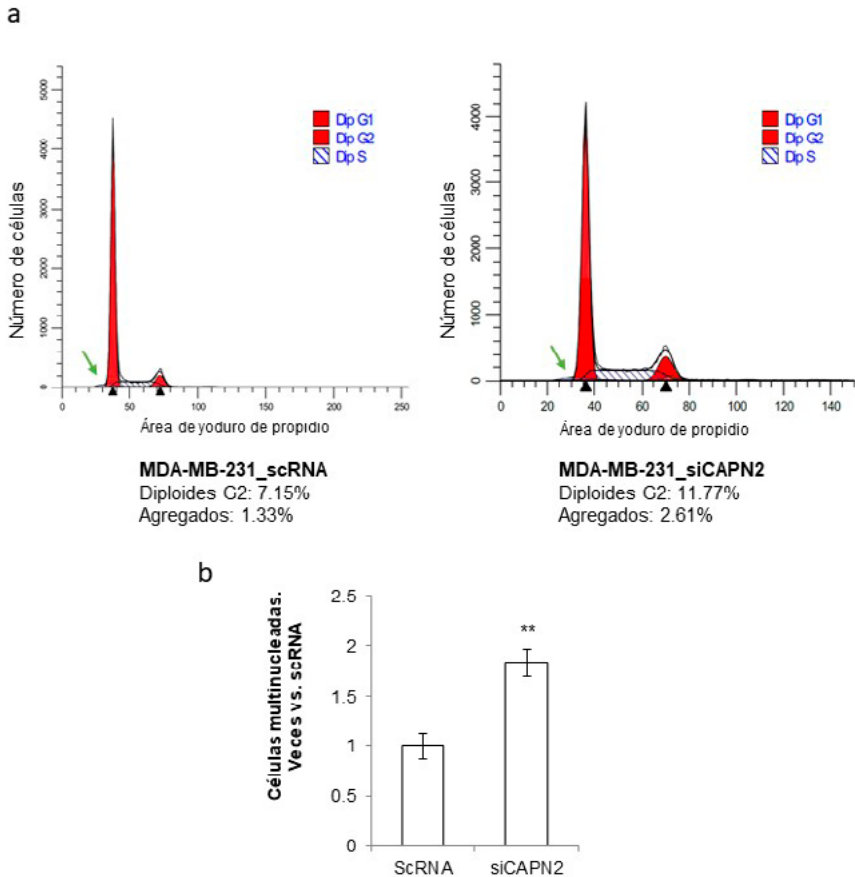
Con el objetivo de evaluar si las alteraciones en la expresión de la CAPN2 pueden ocasionar alteraciones en la progresión del ciclo celular y la citoquinesis, se analizó la multinucleación por monitorización de la morfología celular en las células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2. Como se observa en la figura 43, el número de células multinucleadas es el doble en las células MDA-MB-231 transfectadas con siCAPN2 que en las células control.



**Figura 43: Papel de la CAPN2 sobre la multinucleación de células MDA-MB-231.** Imágenes de microscopía confocal de células MDA-MB-231 transfectadas con scrNA y siCAPN2. La multinucleación se analizó mediante tinción nuclear con DAPI y contraste de fases. Las líneas blancas discontinuas rodean los núcleos. Se muestra una imagen representativa (n=16).

## RESULTADOS

Para confirmar los resultados obtenidos por microscopia confocal, se analizó la multinucleación como el porcentaje de agregados (flecha verde figura 44 a) detectados en las células MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2 por citometría de flujo. El número de células con mitosis aberrante y multinucleación era dos veces mayor en las células silenciadas para la CAPN2 con respecto a las células control (Figura 44 b). Estos resultados parecen indicar que la CAPN2 interviene en la regulación precisa de la división celular. De hecho, en la figura 44 a, se observa que un mayor porcentaje de células siCAPN2 permanecen en la fase G2/M con respecto a las células control ( $11\pm 0.53\%$  vs.  $7.27\pm 0.42\%$  respectivamente). Estos datos parecen indicar que el silenciamiento de la CAPN2 promueve la retención de las células en mitosis, sugiriendo que la CAPN2 podría regular la progresión del ciclo celular y la correcta división celular.



**Figura 44: Efecto de la expresión de CAPN2 sobre la progresión del ciclo celular.** a) Análisis mediante citometría de flujo del ciclo celular de MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. Se muestra el porcentaje de células en fase G2. La multinucleación (flecha verde) se valoró como porcentaje de agregados en cada condición (n=4). b) Cuantificación de las células MDA-MB-231 scRNA y siCAPN2 con multinucleación. Los datos obtenidos (n=4) se representaron como la media de veces  $\pm$  SEM \*\* $p \leq 0.0001$  vs. scRNA.

Los resultados de los experimentos por microscopia confocal y citometría de flujo sugieren que la CAPN2 podría modular la progresión del ciclo celular mediante una regulación precisa de la fosforilación y distribución de la CFL1. Además, parece que la CAPN2 presenta un papel importante en la mitosis y citoquinesis celular.



# DISCUSIÓN





# DISCUSIÓN

La desregulación de las CAPNs se ha descrito en un gran número de patologías, incluyendo el cáncer [36]. A pesar de que la CAPN2 se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer, la relación entre la expresión de las CAPNs y la progresión tumoral o la resistencia a terapias es controvertida [185, 188, 190, 224].

Publicaciones en la literatura señalan a la distribución de la CAPN2 como factor determinante de su función. La localización de la CAPN2 en un determinado compartimento celular de acuerdo con el proceso biológico, limitaría su acceso a sus sustratos específicos, y, por tanto su participación en las diferentes rutas de señalización [19, 23, 28, 108, 116, 134, 214]. Identificar los componentes dependientes de la CAPN2 en un compartimento celular concreto, ayudaría a determinar las funciones de la CAPN2 en un contexto celular determinado. Aunque son muchos los estudios sobre el papel de la CAPN2 en el citosol, su función en el núcleo de la célula no es del todo conocida.

Los cambios dinámicos entre las interacciones de los componentes nucleares son cruciales en procesos como la expresión génica, la proliferación celular, la reparación del DNA o la muerte celular [193]. Las modificaciones postraduccionales de las proteínas pueden alterar estas interacciones y, por tanto, la localización y la función de las mismas. La CAPN2 al ser considerada el nodo central de muchas vías de señalización celular [2, 5, 23, 36, 109], podría cambiar la dinámica de interacción entre las proteínas nucleares.

En esta tesis doctoral se ha estudiado la distribución subnuclear específica de la CAPN2 y su posible función tratando de identificar aquellas de sus dianas que podrían participar en las interacciones entre los componentes nucleares de las células de cáncer de mama en proliferación.

### 1. DISTRIBUCIÓN SUBNUCLEAR DE LA CAPN2

Nuestros datos indican que la CAPN2 nuclear no se distribuye de una forma homogénea en el núcleo de células de cáncer de mama en proliferación como ocurre con la CAPN1, sino que específicamente se localiza en el nucléolo y región perinucleolar. En efecto, en las BCC se detectó presencia de CAPN2 nucleolar y perinucleolar, siendo las líneas TNBC, con una alta expresión de la CAPN2, las que mayores niveles nucleares y nucleolares de la CAPN2 presentaban con respecto a las líneas luminales [28, 98]. De acuerdo con estos datos, se ha publicado en la literatura que la distribución de la CAPN2 depende del estado de división celular; encontrándose en el núcleo de células proliferantes desdiferenciadas y en el citosol de células quiescentes diferenciadas [15]. Se podría pensar que la detección de la CAPN2 nucleolar es un artefacto del anticuerpo usado en la tinción IF, pero en todos los ensayos se realizaron controles negativos. Además, no solo se detectó señal nuclear y nucleolar con el anticuerpo  $\alpha$ -CAPN2, sino que se usó un anticuerpo específico para la etiqueta DYK que detecta únicamente la CAPN2 sobreexpresada ectópicamente. También se podría pensar que la detección de CAPN2 nucleolar por WB podría ser consecuencia de una contaminación de las fracciones subcelulares, pero se han usado marcadores de pureza que indican lo contrario.

En cuanto a los determinantes de la localización subnuclear de la CAPN2, nuestros datos indican que la sobreexpresión de ésta promueve su localización nucleolar durante la proliferación celular. Los resultados de los experimentos de IF y WB de las fracciones subcelulares muestran una acumulación de la CAPN2 en el núcleo y nucléolo al sobreexpresar la CAPN2 en las células MCF-7, mientras que los niveles de la CAPN2 nucleolar disminuían al silenciar la CAPN2 en células MDA-MB-231. Estos datos sugieren que hay una correlación entre los niveles de expresión de CAPN2 y su localización subnuclear. De hecho, la ratio *No/No-less* de la CAPN2 permanecía constante al sobreexpresar o silenciar la CAPN2, indicativo de que la abundancia de la CAPN2 es un determinante de su localización nuclear y

nucleolar. Otras publicaciones demuestran que, durante el desarrollo embrionario, la localización nuclear de la CAPN2 se restringe a las células desdiferenciadas que expresan mayores niveles de CAPN2 [108].

Como hemos mencionado previamente, nuestros ensayos detectaron la presencia de CAPN2 en la región perinucleolar. La ausencia de membrana, le permite al nucléolo ensamblarse y disolverse en respuesta a cambios transcripcionales y la fase del ciclo celular [192]. Este proceso contribuye al constante tráfico de proteínas entre el nucléolo y el nucleoplasma [192–194], favoreciendo que la CAPN2 se localice también en la región perinucleolar. En ese sentido, se ha publicado que la nucleolina, a pesar de localizarse principalmente en el nucléolo, cambia su distribución en respuesta a variaciones osmóticas o tras su fosforilación [225, 226].

A pesar de que no se ha descrito el mecanismo de traslocación y/o retención de la CAPN2 en el nucléolo, la acumulación nucleolar de la CAPN2 podría deberse a varios factores. Mediante análisis bioinformático, nuestro grupo puso de manifiesto que la CAPN2 contiene una secuencia que cumple con todos los parámetros para ser reconocida como una NoLS: es rica en lisina y arginina, está cargada positivamente y solapa con una NLS y una región desorganizada de la CAPN2 [98]. Sin embargo, la internalización nucleolar de proteínas no se debe únicamente a la presencia de NoLS. Como ya se ha descrito para otras proteínas nucleolares [227–229], la CAPN2 podría interactuar con otras proteínas nucleolares, rDNA o rRNA para ser transportada y/o retenida en el nucléolo. De acuerdo con esto, como ya se ha mencionado, nuestro equipo describió previamente que la CAPN2 se une al promotor proximal del rDNA en líneas celulares de CRC, suprimiendo la biogénesis ribosomal en condiciones de falta de nutrientes [134]. En estos estudios también se observó que, tras la inhibición de la RNA polimerasa I y consiguiente desorganización del nucléolo, la CAPN2 no se dispersaba libremente por el nucleoplasma, sino que colocalizaba con la fibrilarina, una RNA metiltransferasa ubicada en el componente fibrilar denso del nucléolo que está implicada en la transcripción y procesado del pre-rRNA [230].

## DISCUSIÓN

Además de la posible NoLS, el proceso de ensamblaje y desensamblaje del nucléolo durante cada ciclo celular, podría contribuir a la internalización y/o retención de la CAPN2 en el nucléolo [192]. En la metafase, el nucléolo se desorganiza favoreciendo la interacción de las proteínas nucleolares con otras moléculas en el nucleoplasma [194]. Sería plausible pensar que la abundancia de la CAPN2 nuclear en las BCC favoreciera la unión de la proteasa a otras proteínas nucleolares o rDNA. Durante el proceso de ensamblaje del nucléolo al final de la mitosis, la interacción proteína-proteína o proteína-rDNA reclutaría a la CAPN2, quedando ésta retenida en el nucléolo. Este mismo mecanismo ha sido demostrado para la CAPN3, la cual se trasloca al nucléolo mediante su interacción con la proteína nucleolar Def, para controlar el ciclo celular y facilitar el desarrollo y regeneración hepática y la biogénesis ribosomal [100]. Se ha visto que la fosforilación de Def facilita la internalización de la CAPN3 en el nucléolo de una manera dosis dependiente [99].

## 2. RELACIÓN ENTRE LA DISTRIBUCIÓN NUCLEAR Y LA FUNCIÓN DE LA CAPN2 EN LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

En cuanto a la relación entre la función de la CAPN2 y su distribución, preferentemente nucleolar, varias publicaciones hacen hincapié en la desregulación de las funciones nucleolares en muchas enfermedades, entre otras, el cáncer [138–143]. En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio mostraron la presencia de la CAPN2 en el nucléolo de células de CRC [134]. Sin embargo, no se ha descrito presencia de CAPN2 en el nucléolo de células no tumorales.

Nuestros datos indican que la composición del proteoma nucleolar en células tumorales de cáncer de mama depende en parte de los niveles de expresión de la CAPN2. La dinámica nuclear permite que determinados componentes de estructuras subnucleares cambien su ubicación de manera temporal a otras subestructuras donde son modificados, retenidos y/o liberados dependiendo de la etapa del ciclo celular o del tipo de estímulo [193, 194]. Por ejemplo, la vía Def-CAPN3 promueve

el desarrollo del hígado al proteolizar a p53 en el nucléolo favoreciendo la correcta progresión del ciclo celular [99]. A su vez, dicha vía interviene en la regeneración de hígado al proteolizar e inactivar a Chek1 y Wee1 en el nucléolo y permitir la entrada de las células en mitosis [101]; pero además, Def-CAPN3 regula la biogénesis ribosomal al interactuar e internalizar el complejo Sas10-Mpp10 al nucléolo donde CAPN3 proteoliza a Mpp10, proteína encargada del procesado y maduración del rRNA, así como del ensamblaje de la subunidad pequeña del ribosoma [100]. Es decir, los cambios dinámicos en las interacciones entre los componentes del núcleo, son necesarios para muchos procesos celulares como la proliferación o la muerte celular [193]. La acumulación de la CAPN2 en el nucléolo podría ser crucial para regular la función y distribución de determinadas proteínas nucleolares en las BCC. Desvelar las dianas dependientes de la CAPN2 en las BCC, ayudaría a entender los determinantes moleculares de su localización nucleolar, así como las funciones de los productos de la CAPN2.

En el 2D-DIGE, se identificaron un total de 11 proteínas cuya localización nucleolar dependía de la CAPN2, entre las que se encontró a la CFL1. Aunque en esta tesis sólo se ha estudiado en profundidad el papel de la CAPN2 sobre la regulación de la CFL1, es importante destacar que estas 11 proteínas se encuentran desreguladas en el cáncer [195-201, 231-238]. Al tratarse de una proteasa, se esperaría que la CAPN2 proteolizara a las proteínas identificadas en el proteoma nucleolar. Estos datos podrían indicar que la sobreexpresión de la CAPN2 en el cáncer de mama podría ser responsable del procesamiento de estas dianas nucleolares y por tanto de un cambio en su función durante la transformación neoplásica. Sin embargo, los niveles nucleolares de algunas de estas proteínas disminuían tras la depleción de la CAPN2. Ya hemos demostrado que la CAPN2 regula la distribución subnuclear de la CFL1 de manera indirecta. Probablemente, la localización nucleolar del resto de proteínas identificadas se encuentre regulada también de forma indirecta por la CAPN2. En ese sentido, se ha reportado que la CAPN2 actúa como un nodo de regulación central en células de hepatocarcinoma, ejerciendo su actividad sobre proteínas y modificando su localización y la ruta de señalización en la que participan [239].

## DISCUSIÓN

Puesto que no se han analizado los niveles de las 10 proteínas restantes en las fracciones subnucleares, no se descarta que alguna de ellas pueda ser una diana directa de la actividad proteolítica de la CAPN2 en un compartimento subcelular concreto y no en la totalidad de la célula. De hecho, tres de las proteínas fueron identificadas en dos spots diferentes, lo que sugiere que la CAPN2 podría estar proteolizándolas.

En cualquier caso, los resultados de los experimentos demuestran que la CFL1 no es procesada por la CAPN2, sino que es su localización subnuclear la que depende de los niveles de la CAPN2. Este dato podría extenderse al resto de proteínas identificadas en nuestro análisis proteómico. No obstante, habría que validar si la localización nucleolar de las 10 proteínas restantes depende de los niveles de expresión de la CAPN2, si estas son procesadas o como en el caso de la CFL1, la CAPN2 modula su distribución subcelular. Como quiera que sea, parece que, probablemente, la composición del proteoma nucleolar durante el ciclo celular depende de los niveles de expresión de CAPN2.

### 2.1 LA CFL1 COMO DIANA DE LA CAPN2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA: RELEVANCIA

La CFL1 es una proteína moduladora del estado de polimerización/despolimerización de la F-actina [202]. Esta proteína regula la dinámica y reorganización de la actina al promover tanto la despolimerización como la polimerización de los filamentos de actina. La CFL1 interviene en el proceso de despolimerización de la F-actina al unirse y recortar sus extremos liberando monómeros de G-actina y produciendo extremos libres en la F-actina [210]. El incremento de la concentración de los monómeros de G-actina y de los extremos libres de la F-actina favorece, a su vez, la polimerización de los filamentos de actina [240, 241]. Por este motivo, la CFL1 es crucial en la correcta reorganización del citoesqueleto de actina [203] y la migración celular al estimular la formación de lamelipodios polarizados en la célula y su extensión [210, 240]. Además, la CFL1 participa en otras

funciones celulares que no están relacionadas directamente con la dinámica de la actina. La CFL1 es necesaria para el mantenimiento de los niveles nucleares óptimos de G-actina, mediante su interacción con la importina-9 (Ipo9) y posterior internalización nuclear de los monómeros de G-actina [242]. La actina nuclear regula procesos fundamentales como son la organización de los cromosomas y la transcripción génica [243], así como el mantenimiento de la integridad nuclear y de la homeostasis y supervivencia celular [244]. A su vez, la CFL1 es necesaria para el transporte de otras proteínas que regulan la transcripción, como ERK5 [245]. Se ha publicado que la CFL1 inhibe la proliferación de células epiteliales, a través de la inhibición de los cofactores de transcripción YAP1/TAZ1 de la vía de señalización Hippo [246]. Además, se ha descrito a la CFL1 como una proteína inductora de la apoptosis al trasladarse al interior de la mitocondria y promover la liberación del citocromo c tras alterar la permeabilidad del poro mitocondrial [247]. Por último, se ha visto que la pCFL1 interactúa directamente con la fosfolipasa D1, activándola y favoreciendo la migración celular [248].

La actividad de la CFL1 se encuentra altamente regulada por diversos mecanismos. Ésta se inhibe por fosforilación del residuo Ser-3 en el extremo N-terminal [208], por su unión a PIP<sub>2</sub> [249] y a cortactina [250], y por un incremento en el pH intracelular [251]. Por el contrario, la actividad CFL1 se incrementa por desfosforilación del residuo Ser-3 [252] y por interacción con la proteína-1 de interacción a actina (AIP1) [253] y con la proteína asociada a ciclina (CAP) [254]. Alteraciones en la regulación de la actividad o de los niveles de CFL1, así como desregulaciones en las quinasas y fosfatasas que modulan la ratio pCFL1/CFL1, promueven la proliferación tumoral, invasión y metástasis [202, 205, 209, 213, 255, 256]. Por ejemplo, la sobreexpresión de CFL1 se ha relacionado con un aumento en la migración de las células de cáncer de gástrico [257]. Un incremento en los niveles de LIMK1 y, por tanto, en los niveles de pCFL1, promueven la internalización del receptor EGFR en células de cáncer de mama aumentando su agresividad e invasividad tumoral [258]. El aumento de los niveles de pCFL1 favorece la progresión e invasión de células tumorales de vejiga [259].

### 2.2 LA CFL1 COMO DIANA INDIRECTA DE LA CAPN2: FOSFORILACIÓN/DISTRIBUCIÓN

Los experimentos realizados indican que la CFL1 no es una diana directa de la actividad proteolítica de la CAPN2 puesto que los niveles totales de la CFL1 no varían al silenciar la CAPN2. Además, nuestros ensayos establecieron que la proteasa regula de manera indirecta la distribución de la CFL1 al observar que el silenciamiento de la CAPN2 induce la acumulación perinucleolar y nucleolar de la CFL1. Se podría argumentar que la CAPN2 nuclear podría estar proteolizando únicamente a la CFL1 nuclear y nucleolar, lo que explicaría que no se observen cambios a nivel del extracto total. Sin embargo, tras analizar una fracción más restrictiva de la CFL1, como es la fracción fosforilada en células control y silenciadas para la CAPN2, sí que se observaron variaciones en el extracto no nucleolar de proteína, que comprende toda la célula a excepción del nucléolo. Además, se detectaron cambios en el patrón de fosforilación de la CFL1 dependientes de la actividad CAPN2 tras evaluar los niveles de pCFL1 en el extracto total de proteína en presencia o ausencia de inhibidores de la actividad CAPN. Estos datos demuestran que la CFL1 no es una diana directa de la CAPN2.

#### 2.2.1 Fosforilación de la CFL1

Se ha descrito en la literatura que la fosforilación de la CFL1 en su residuo Ser-3 inhibe su actividad despolimerizadora de la F-actina promoviendo cambios en su distribución subcelular [202]. La regulación del estado de polimerización de la actina depende de la ratio pCFL1/CFL1, siendo éste crucial en el proceso de tumorigénesis [205]. Un aumento del mismo, se ha relacionado con un mayor potencial de invasión y metástasis en células tumorales [202, 204, 206]. Nuestros ensayos confirman que la ratio pCFL1/CFL1 es proporcional a los niveles de expresión de la CAPN2 en las diferentes líneas de cáncer de mama. Hemos comprobado que las líneas celulares TNBC, con mayores niveles de expresión de CAPN2 [28], presentan mayor ratio pCFL1/CFL1, y por tanto, mayor agresividad tumoral, que las líneas luminales. Los experimentos con calpeptina o con siCAPN2 han determinado que la fosforilación



de la CFL1 depende de la actividad CAPN2. Además, pensamos que la CAPN2 regula la distribución de la CFL1 a través de la modulación de su vía de fosforilación tras evidenciar que el silenciamiento de la CAPN2 induce la acumulación perinucleolar y nucleolar de la CFL1, así como una disminución de los niveles de pCFL1 en la fracción no nucleolar de la célula.

Nuestros datos parecen indicar que la CAPN2 modula la actividad de LIMK1. Se ha publicado que las LIM quinasas LIMK1 y LIMK2 y las quinasas testiculares (TESK), fosforilan a la CFL1 en su residuo Ser-3 inhibiendo su capacidad de despolimerizar la F-actina, mientras que las fosfatasas SSH y CIN activan a la CFL1 al desfosforilarla [208, 210, 215, 255, 260]. Un estudio reciente demostró que el equilibrio preciso entre los niveles de expresión y la localización subcelular de la CFL1, LIMK1 y SSH1, es crucial en el control de la progresión y la agresividad de varios tipos de cáncer, entre ellos, el de mama [256]. A pesar de no detectarse cambios en la ratio pCFL1/CFL1 asociados a la actividad fosfatasa de SSH1, nuestros experimentos demostraron que la ratio pCFL1/CFL1 disminuía al silenciar LIMK1 en las células MDA-MB-231. Estos datos junto a publicaciones previas [209], apuntan a LIMK1 como la principal quinasa implicada en la fosforilación de la CFL1 en las BCC. En este sentido, ya se había descrito que la CAPN2 promueve la fosforilación de CFL1 de forma indirecta a través de la activación de la vía ROCK-RhoA [214]. No obstante, se ha podido demostrar que el patrón de activación de LIMK1 durante el ciclo celular no necesariamente coincide con el de activación de la vía ROCK-RhoA, razón por la cual se ha postulado que podría haber un mecanismo de activación de LIMK independiente de esta vía [218].

De hecho, nuestros experimentos demuestran que la CAPN2 se une específicamente a LIMK1 a través de su extremo C-terminal y que esta interacción, es crucial para la unión de LIMK1 con su sustrato, la CFL1. Puesto que no se han realizado análisis de los niveles de mRNA de LIMK1, no se puede descartar que la CAPN2 module su expresión. Sin embargo, la formación del complejo CAPN2/LIMK1/CFL1 detectado por co-inmunoprecipitación sugiere

## DISCUSIÓN

que, la CAPN2 más que modular los niveles de mRNA de LIMK1, modula su actividad quinasa. Sería necesario confirmar que la CAPN2 aumenta la actividad quinasa de LIMK1, pero esta actividad se ha analizado de forma indirecta tras comprobar con experimentos *in vivo* e *in vitro* que los niveles de pCFL1, el producto de LIMK1, aumentaban en las células TNBC, con mayores niveles de expresión de CAPN2.

A pesar de que se ha descrito que la CAPN2 activa indirectamente a LIMK1 vía ROCK-RhoA [214] (Figura 45), los experimentos de co-inmunoprecipitación y de proteólisis *in vitro* e *in vivo*, parecen demostrar que la CAPN2 activa de manera directa a la quinasa. En esta tesis se barajaron varias hipótesis que explicarían la activación directa de LIMK1 mediado por CAPN2:

- Activación por proteólisis y liberación del extremo N-terminal autoinhibidor de LIMK1

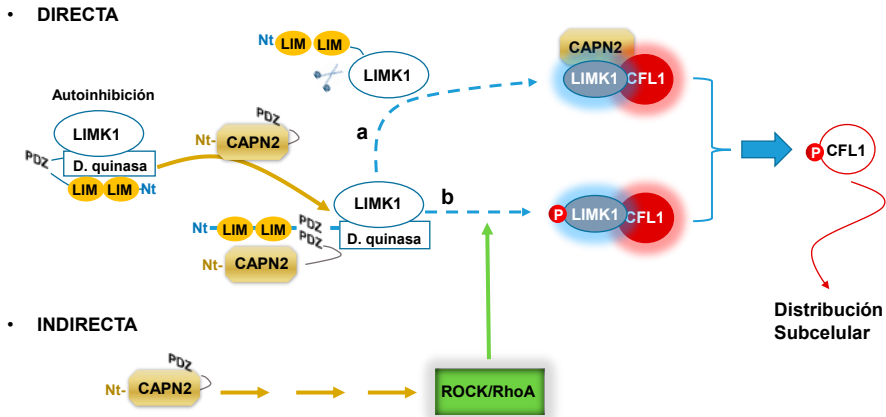
Se ha descrito en la literatura que la caspasa-3 proteoliza el extremo N-terminal autoinhibidor de LIMK1 produciendo una proteína truncada con capacidad de fosforilar a la CFL1 [216]. Mediante análisis informático, hemos encontrado 5 posibles puntos de corte en LIMK1 por parte de la CAPN2. Sería plausible pensar que la CAPN2 proteoliza el extremo N-terminal de LIMK1 activando a la quinasa y permitiendo que ésta actúe sobre su sustrato (Figura 45 a). De hecho, los resultados de los experimentos *in vivo*, muestran un incremento de los niveles LIMK1 al silenciar la CAPN2 y una disminución de los mismos al sobreexpresar la CAPN2. En estos experimentos no se detectaron fragmentos de LIMK1. Probablemente la cadena pesada del anticuerpo usado para la IP, enmascaró los fragmentos de LIMK1 dificultando su detección. A pesar de que deberían realizarse futuros ensayos en los que no interfiera la cadena pesada del anticuerpo, en nuestros experimentos, se cortó la membrana del WB para evitar hibridaciones inespecíficas y se sobreexpuso el film. En dichos experimentos se detectó una banda de ~ 43-45kDa que podría ser específica de LIMK1. Ésta

posee el mismo tamaño que el fragmento obtenido de la proteólisis de LIMK1 por la caspasa-3 [216]. Dicha banda aumenta su intensidad al sobreexpresar la CAPN2 con respecto a los controles y desaparece al silenciar LIMK1. Además, dicha banda aumenta su intensidad de forma proporcional a la concentración de DYK-CAPN2. Todos estos datos junto a los resultados obtenidos de la proteólisis *in vitro*, sugieren que la CAPN2 modula la actividad de LIMK1 a través de su proteólisis.

- Activación por unión al dominio LIM que desenmascara el dominio quinasa de LIMK1 permitiendo su fosforilación

Publicaciones previas describen que la unión del receptor neuronal BMPRII a los dominios LIM de LIMK1 induce un cambio conformacional en LIMK1 que desenmascara su dominio quinasa permitiendo su fosforilación y activación por parte de la quinasa Cdc42 perteneciente a la familia de las Rho GTPasas [261]. La CAPN2 podría activar a LIMK1 a través de su unión a los dominios LIM provocando un cambio conformacional que permitiese a otras quinasas fosforilar y activar LIMK1 (Figura 45 b). Una vez activa, LIMK1 fosforilaría a la CFL1 produciendo un cambio en su distribución subcelular. En ese sentido, hemos demostrado que los niveles de pLIMK1 disminuyen drásticamente en células con silenciamiento de CAPN2 y aumentan en células con sobreexpresión de CAPN2. Estos datos respaldan que la interacción directa entre la CAPN2 y LIMK1 promueve la fosforilación y activación de la quinasa.

## DISCUSIÓN



**Figura 45:** Hipotéticos mecanismos de activación de LIMK1 por la CAPN2. Autoinhibición de LIMK1 por unión de los dominios LIM al dominio catalítico de la quinasa. La CAPN2 modularía la activación de LIMK1 por varios mecanismos que podrían tener lugar de forma independiente o simultáneamente: 1. Activación directa de LIMK1 por CAPN2: La unión de CAPN2 a LIMK1 por el dominio PDZ favorecería la eliminación de dicha autoinhibición por a) proteólisis del extremo N-terminal autoinhibidor o alternativamente, por b) un cambio conformacional de LIMK1 y su posterior fosforilación por una quinasa. 2. Activación indirecta de LIMK1: La CAPN2 activa la vía ROCK/RhoA que resultaría en la fosforilación y activación de LIMK1. Esta fosforilación estaría favorecida por el cambio conformacional provocado por la unión de CAPN2 a LIMK1.

A su vez, la actividad proteolítica de la CAPN2 podría modular la distribución y actividad de LIMK1. Las imágenes de microscopia confocal detectan cambios en la distribución de LIMK1 al silenciar la CAPN2 sugiriendo que la CAPN2 regula este proceso. Sin embargo, serían necesarios estudios posteriores en fracciones subcelulares para confirmar esta hipótesis.

No obstante, resulta tentador especular con la relevancia biológica del mecanismo propuesto de modulación de LIMK1 mediado por CAPN2. Aunque no se ha descrito la presencia de LIMK1 en el nucléolo, se conoce su localización en *speckles* nucleares ([www.proteinatlas.org/ENSG00000106683-LIMK1/cell#human](http://www.proteinatlas.org/ENSG00000106683-LIMK1/cell#human)). Muchas proteínas localizadas en los *speckles* nucleares pueden presentar otra localización nuclear. Sin embargo, se desconoce la función específica, las modificaciones postraduccionales que sufren o las proteínas con las que interactúan [262]. Las proteínas que se organizan en

determinadas estructuras dentro del núcleo y el nucléolo, se encuentran en constante movimiento, pudiendo cambiar rápidamente de subestructura dependiendo de ciertos estímulos y la fase del ciclo celular [192–194]. Las proteínas nucleares podrían encontrarse alrededor del nucléolo en búsqueda de proteínas específicas con las que unirse [263] y el flujo dinámico ayudaría a la interacción entre la CAPN2 y LIMK1. Se sabe que determinadas mutaciones o la proteólisis de proteínas, pueden ocasionar alteraciones en la interacción proteína-proteína, proteína-RNA y/o en la distribución de los *speckles* nucleares [264]. Las diferencias en la distribución de LIMK1 observadas tras el silenciamiento de la CAPN2, podrían producir un cambio en la interacción o en la actividad sobre su sustrato, la CFL1.

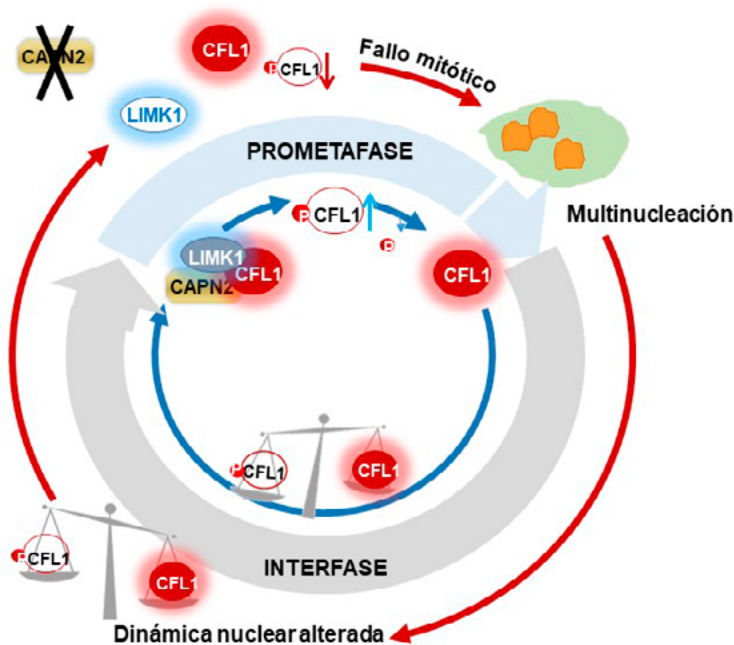
### 2.2.2 Relación fosforilación/distribución de la CFL1

Nuestros datos indican que la CAPN2 modula el patrón preciso de fosforilación de CFL1 durante el ciclo celular. Los análisis del patrón de fosforilación de la CFL1 durante el ciclo celular revelan que, los niveles de expresión de la CAPN2 son determinantes para la obtención de un patrón preciso de fosforilación de CFL1, necesario para el mantenimiento de la dinámica celular y para una correcta resolución de la mitosis en células tumorales. Aunque no se ha estudiado el patrón de activación y distribución de LIMK1, se ha visto que la fosforilación y distribución de la CFL1 durante la mitosis sigue el mismo patrón que el de la activación de LIMK1 [218, 219], pero distinto al de la activación de la vía ROCK/RhoA [220]. De ese modo, la CAPN2 regularía la ratio entre la pCFL1/CFL1, al activar a LIMK1 en puntos críticos del ciclo celular (Figura 46):

En la interfase, la CAPN2 mantendría una ratio de pCFL1/CFL1 baja promoviendo la actividad despolimerizadora de la CFL1 sobre la F-actina y favoreciendo procesos como la migración celular o la transcripción génica y el mantenimiento de la estructura nuclear [204]. La unión de la CAPN2 a LIMK1 con la consiguiente activación de la quinasa al inicio de la mitosis, produciría un aumento de la ratio pCFL1/CFL1 necesarios para la correcta orientación del huso mitótico y la progresión del ciclo celular

## DISCUSIÓN

[219]. En la telofase tardía, un descenso de la ratio pCFL1/CFL1 permitiría la acumulación de la CFL1 en el surco del anillo contráctil promoviendo la citoquinesis celular [218]. Alteraciones en la ratio pCFL1/CFL1 dependientes de los niveles de expresión de la CAPN2, producen una desregulación de la dinámica nuclear y fallo mitótico, resultando en la incompleta división celular y multinucleación (Figura 46) [210, 223].



**Figura 46:** Representación esquemática del papel de la CAPN2 sobre la CFL1 durante el ciclo celular de células de cáncer de mama. En condiciones de elevada expresión de CAPN2, i) en la interfase, la ratio pCFL1/CFL1 permanece bajo favoreciendo el correcto funcionamiento celular; ii) en la prometafase, la activación de LIMK1 mediada por CAPN2 induce el aumento de la ratio pCFL1/CFL1 necesario para la correcta progresión del ciclo celular; iii) en la telofase tardía, un descenso de la ratio pCFL1/CFL1 permite que la CFL1 se acumule en el anillo contráctil promoviendo la citoquinesis. La inhibición de la expresión de CAPN2 disminuye la ratio pCFL1/CFL1 provocando i) en la interfase, la acumulación de CFL1 en el nucléolo y región perinucleolar y ii) en la telofase tardía, incorrecta citoquinesis y multinucleación.

### 3. LA CAPN2 COMO NODO REGULADOR DEL INTERACTOMA NUCLEAR: PERSPECTIVAS

Ya se ha visto como, la composición y, probablemente la interacción entre las proteínas nucleolares es dependiente de los niveles de expresión de la CAPN2. Esas modificaciones pueden ocasionar efectos profundos sobre la célula. Nuestros análisis de monitorización de la morfología celular y citometría de flujo corroboran el papel de la CAPN2 en la regulación de la progresión de la mitosis y la citoquinesis en las BCC. De acuerdo con estos resultados, estudios con líneas de mioblastos murinos C2.7 o células HeLa con depleción de la CAPN2, describen defectos en la alineación de los cromosomas durante la prometafase, así como una segregación prematura de los cromosomas en la anafase y una mitosis aberrante [103, 104].

A pesar de que serían necesarias investigaciones posteriores para determinar la función exacta de la CAPN2 nucleolar, nuestros estudios han mostrado su implicación en la regulación de la vía de fosforilación y distribución de la CFL1 en las BCC tanto en interfase como en mitosis. Se podría pensar que la CAPN2 quedaría retenida en el nucléolo de las BCC en la interfase modulando la biogénesis del rRNA, como previamente se describió en las CRC [134]. De hecho, se ha descrito que la unión de la CFL1 con Ipo9 favorece la internalización nuclear de la G-actina, promoviendo la unión de la actina con la región promotora de genes ribosomales y la activación de la transcripción de rRNA por la RNA polimerasa I [243, 265].

Durante la mitosis, el desensamblaje del nucléolo liberaría a la CAPN2 para proteolizar y activar a LIMK1 incrementando los niveles de pCFL1 en la prometafase y promoviendo la polimerización de la F-actina necesaria para la correcta orientación del huso mitótico [266]. El mismo comportamiento se ha descrito en otras proteínas con una localización eventual o típica nucleolar como la Ki-67, la nucleofosmina (B23) o la fibrilarina [227–229]. Estas proteínas son retenidas en el nucléolo durante

## DISCUSIÓN

la interfase para modular la biogénesis ribosomal y liberadas posteriormente para permitir la progresión de la mitosis. Se ha visto que el silenciamiento de la proteína B23 o la fibrilarina en células HeLa no sincronizadas, también resulta en una mitosis aberrante y morfología nuclear anormal o multinucleación [227, 228].

Además de participar en el proceso de remodelación del citoesqueleto, la CAPN2 podría regular diversas funciones nucleares en las que la CFL1 presenta un papel importante como el mantenimiento de la estructura nuclear o el movimiento de los cromosomas en el huso mitótico [202, 204]. Además, se ha demostrado que la regulación de la polimerización de la actina mediada por el complejo CFL1-Ipo9, facilita la unión de la misma a las tres RNA polimerasas modulando su actividad [243, 267, 268].

Futuros estudios sobre la dinámica de la CAPN2 nucleolar ayudarían a entender la compleja red de interacciones nucleares. Como previamente se ha citado, la regulación precisa de la dinámica de la actina nuclear dependiente de la ratio pCFL1/CFL1, participa en procesos cruciales como la remodelación de la cromatina, la transcripción, el procesado del RNA, el transporte de proteínas entre el núcleo y el citosol y el mantenimiento de la estructura nuclear [269, 270]. Por ello, sería interesante estudiar el papel de la CAPN2 nuclear en procesos fisiológicos y patológicos relacionados con la dinámica de la actina.

Son muchos los estudios que relacionan la sobreexpresión de la CAPN2 o la sobreactivación de la vía LIMK1/CFL1 en el cáncer de mama, con el desarrollo del tumor y metástasis [28, 158, 202, 205, 207, 209, 213]. Se ha demostrado que ciertos tratamientos usados en quimioterapia como el glicol de polietileno, la reversina o el artesunato, inducen fallo mitótico, multinucleación y apoptosis de células de cáncer de colon, de pulmón y de próstata [271–273]. En la actualidad, se han desarrollado un gran número de inhibidores de la expresión y/o activación de la vía LIMK1/CFL1 para su posible uso en terapias anticáncer [202, 205, 213, 231, 274–280]. La CAPN2 sería una diana terapéutica a considerar, a la hora de diseñar inhibidores de la vía LIMK1/CFL1 en el cáncer de mama.



# **CONCLUSIONES**



# CONCLUSIONES

Durante la presente tesis doctoral se ha estudiado la distribución subnuclear específica de la CAPN2 y su posible función tratando de identificar y validar las posibles dianas dependientes de la CAPN2 que participan en las interacciones entre los componentes nucleares en las células en proliferación de cáncer de mama. En base a los resultados obtenidos, se ha concluido que:

1. La abundancia de la CAPN2 es un factor determinante de su localización nucleolar y perinucleolar en líneas BCC humanas en proliferación.
2. Existe un número limitado de proteínas, entre las que se encuentra la CFL1, cuya localización nucleolar depende de los niveles de CAPN2 en células MDA-MB-231.
3. Existe una correlación positiva entre los niveles de CAPN2, la ratio pCFL1/CFL1 y el subtipo de cáncer en las líneas de cáncer de mama estudiadas.
4. La CAPN2 modula el patrón preciso de fosforilación y distribución de la CFL1 mediado por LIMK1 durante el ciclo celular que resulta crucial para la correcta resolución de la mitosis de células MDA-MB-231.



# RESUMEN



# RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

Las calpaínas (CAPNs) son una familia de cisteín-proteasas calcio dependientes presentes en la mayoría de los tejidos y tipos celulares de los mamíferos [1–4]. En humanos, la familia de las CAPNs se compone por 15 miembros, de los cuales, las isoformas CAPN1 y CAPN2, conocidas como las CAPNs convencionales, son las mejor caracterizadas [2]. Al contrario que otras proteasas, las CAPNs no degradan a su sustrato, sino que realizan una proteólisis limitada del mismo, transformándolo y modificando su función, su distribución, su interacción con otras proteínas o su regulación. Por ello, se conocen como proteasas moduladoras [12]. A pesar de su similitud en la secuencia aminoacídica, las CAPNs convencionales reconocen diferentes sustratos y, por tanto, no realizan funciones redundantes [28]. La especificidad de las CAPNs por su sustrato no depende de su estructura primaria o de modificaciones postraduccionales de las proteasas, sino de estructuras más complejas de las mismas [75].

Se conocen más de 160 sustratos de las CAPNs, lo que las relaciona con una gran variedad de funciones fisiológicas y patológicas [15–19]. La localización de las CAPNs en un determinado compartimento celular promueve o limita su acceso a diferentes sustratos y por tanto, su participación en diversas rutas de señalización [109]. El desafío a la hora de establecer las funciones de las CAPNs en la célula, se encuentra en identificar sus sustratos específicos en un determinado compartimento celular.

El papel de las CAPNs en la membrana celular o en el citosol se ha estudiado en diferentes tipos celulares para explicar funciones como la migración, adhesión o muerte celular [23, 28, 116, 158, 214]. Sin embargo, las funciones de la CAPN2 nuclear no se han estudiado en profundidad. Se ha descrito que la distribución de la

## RESUMEN

CAPN2 depende de la fase del ciclo celular; encontrándose en el núcleo de células en proliferación [15, 93, 108] y en el citosol de células quiescentes diferenciadas [15]. La CAPN2 es una proteína determinante en la modulación del ciclo celular y la proliferación [15, 18]. Además de permitir la correcta progresión por los diferentes puntos del ciclo celular, la CAPN2 participa en la alineación de los cromosomas en la placa metafásica [103] y en el mantenimiento de la cohesión de las cromátidas hermanas durante la mitosis [104]. Determinados estudios con líneas de mioblastos murinos C2.7 o células HeLa con depleción de la CAPN2, describen una división celular aberrante y multinucleación [103, 104].

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron la presencia de la CAPN2 en el nucléolo de las CRC suprimiendo la biogénesis de rRNA bajo condiciones de falta de nutrientes [134], aunque los sustratos de la CAPN2 responsables de este proceso, no se identificaron. Se ha descrito en la literatura que las funciones nucleolares se encuentran desreguladas en muchas enfermedades, entre otras, el cáncer [138–143]. Estos datos llevaron a pensar que la CAPN2 podría presentarse en el nucléolo de las células en proliferación de cáncer de mama. Continuando con los estudios anteriores, se analizó el papel de las CAPNs convencionales en líneas de BCC. Observaron que las líneas luminales, MCF-7 y BT-474, expresaban elevados niveles de la CAPN1 y bajos de la CAPN2. Sin embargo, ocurría lo contrario en las líneas TNBC, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 [28].

El análisis de la distribución subnuclear de CAPN2, detectó una fuerte acumulación de la CAPN2 en el nucléolo y la región perinucleolar, tanto en células luminales como TNBC (Figura 7 a). El ensayo mostró que las líneas TNBC, con mayores niveles de expresión de la CAPN2, presentaban mayores niveles nucleares y nucleolares de la CAPN2 que las líneas luminales (Figura 7 b y c) [28, 98]. Estos datos parecían indicar que la abundancia de la CAPN2 era un factor determinante de su acumulación nuclear y nucleolar.



El nucléolo es una subestructura nuclear libre de membrana [133]. Esto favorece que se ensamble y se disuelva en respuesta a determinados estímulos o fases del ciclo celular; punto importante en el mantenimiento de la integridad celular y la homeostasis [192, 194]. Este ensamblaje y desensamblaje del nucléolo permite que determinados componentes de la estructura subnuclear cambien su ubicación de manera temporal a otras subestructuras donde son modificados, retenidos y/o liberados [193, 194]. El constante tráfico de proteínas entre el nucléolo y el nucleoplasma contribuye a los cambios dinámicos en las interacciones entre los componentes del núcleo. Estos procesos son cruciales para el correcto desarrollo de funciones celulares como la proliferación o la muerte celular [193]. La CAPN2 podría modular estos cambios mediante el procesado de las proteínas que participan en las interacciones entre componentes nucleares. Desvelar las dianas dependientes de la CAPN2, implicadas en las interacciones nucleares en las BCC, podría contribuir al desarrollo de terapias efectivas contra la progresión tumoral en el cáncer de mama.

## OBJETIVOS

En esta tesis, planteamos como objetivo global, determinar el papel isoforma-específico de la CAPN2 nuclear en el desarrollo y/o progresión tumoral. Análisis funcionales que nos proponemos abordar mediante aproximaciones proteómicas, moleculares y de microscopía confocal en líneas celulares de cáncer de mama humanas atendiendo a los diferentes subtipos más representativos. En concreto, proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación del mecanismo de retención de la CAPN2 en el nucléolo de células tumorales en proliferación: Estudio de la abundancia de la CAPN2 como factor determinante de su acumulación nucleolar y peri-nucleolar en líneas celulares de cáncer de mama.
2. Identificación del proteoma nucleolar dependiente de CAPN2.

## RESUMEN

- 2.1 Validación de datos derivados del análisis proteómico en células MDA-MB-231.
- 2.2 Selección de una posible diana nucleolar de la CAPN2 y estudio de la relación entre el subtipo de cáncer de mama y la expresión/actividad de la CAPN2 sobre dicha diana.
3. Estudio del mecanismo molecular por el cual la CAPN2 regula la función de la diana nucleolar seleccionada: relación entre la expresión de la CAPN2 y su efecto sobre la célula.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. LA ABUNDANCIA DE LA CAPN2 COMO POSIBLE DETERMINANTE DE SU LOCALIZACIÓN NUCLEOLAR

Como se ha mencionado anteriormente, estudios previos sobre la distribución subnuclear de la CAPN2 en las líneas luminales y las TNBC [28, 98], plantearon la hipótesis de que la abundancia de la CAPN2 podría ser un factor determinante de su localización nucleolar. Para estudiar dicha posibilidad, se evaluó la distribución subnuclear de DYK-CAPN2 sobreexpresada ectópicamente en la línea celular MCF-7 mediante IF. El ensayo detectó presencia de DYK-CAPN2 en el compartimento citosólico y nuclear de las células transfectadas con DYK-CAPN2, destacando un fuerte acúmulo de la proteína en el nucléolo de las mismas (Figura 10). Para validar los resultados obtenidos mediante la IF, se analizó la distribución subnuclear de la proteína DYK-CAPN2 en el extracto de proteínas de las fracciones nucleolar (*No*) y no nucleolar (*No-less*) de las células MCF-7 Mock y DYK-CAPN2 mediante WB. La CAPN2 incrementaba sus niveles en las fracciones *No* y *No-less* de células transfectadas con DYK-CAPN2 con respecto a las células control que expresan únicamente la CAPN2 basal (Figura 11).

Del mismo modo, se evaluó la distribución subnuclear de la CAPN2 en las células de la línea MDA-MB-231 transfectadas con scrRNA y siCAPN2 mediante

una tinción de IF. En las imágenes de microscopia confocal se pudo detectar un notable descenso de la intensidad de la CAPN2 en toda la célula al silenciar a la CAPN2 (Figura 14). La señal citosólica desaparecía por completo y aunque se detectaron trazas de CAPN2 en el nucléolo, sus niveles disminuían notablemente. Los resultados se validaron por WB de las fracciones *No* y *No-less* en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. La CAPN2 disminuía sus niveles en las fracciones *No* y *No-less* de las células siCAPN2 con respecto a las células control (Figura 15).

Además, no se observaron diferencias en la ratio de la CAPN2 en las fracciones *No/No-less* en las células transfectadas con Mock y DYK-CAPN2 y con scRNA y siCAPN2 (Figura 16). Estos datos sugieren que la abundancia de la CAPN2 podría ser un factor determinante para su acumulación nucleolar en células en proliferación de cáncer de mama.

## 2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEOLARES DEPENDIENTES DE CAPN2

Al ser una estructura libre de membrana [133], el nucléolo se ensambla y desensambla dependiendo de la fase del ciclo celular contribuyendo al constante tráfico de proteínas entre el nucléolo, la región perinucleolar y el nucleoplasma [192, 194]. Esto permite que se produzcan cambios dinámicos en las interacciones entre los componentes del núcleo, hecho vital para cualquier proceso molecular [193]. La CAPN2 podría acumularse en el nucléolo de las BCC para modular los cambios dinámicos entre las interacciones de los componentes nucleares. Desvelar las dianas dependientes de la CAPN2 implicadas en estas interacciones, ayudaría a identificar el determinante molecular de la función de la CAPN2 nucleolar en las BCC.

Con el fin de detectar las dianas nucleolares de la CAPN2, se analizó el proteoma del extracto nucleolar de las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 mediante 2D-DIGE. Se identificaron un total de 11 proteínas diferentes que aumentaban o disminuían significativamente sus niveles nucleolares en las células con silenciamiento de la CAPN2 con respecto a las células control (Tabla 8).

## RESUMEN

### 2.1 Las proteínas nucleolares como dianas de la actividad proteolítica de la CAPN2

El aumento de los niveles de las proteínas nucleolares en las células silenciadas para la CAPN2, así como la presencia de varios *spots* en algunas de las proteínas, sugerían que estas podrían ser dianas de la actividad proteolítica de la CAPN2. Se evaluaron los niveles y los fragmentos de algunas de las proteínas que aumentaban o disminuían sus niveles nucleolares al silenciar la CAPN2 mediante WB en las células MDA-MB-231 (Figura 18). No se detectaron diferencias significativas entre ambas ni tampoco fragmentos de las mismas. Los resultados obtenidos sugieren que, al menos, algunas de las dianas nucleolares de la CAPN2 no dependen de su actividad proteolítica.

### 2.2 La CFL1 como posible diana directa de la actividad CAPN2

Entre las 11 proteínas, se identificó a la CFL1, una proteína moduladora del estado de polimerización/despolimerización de la F-actina que interviene en la correcta reorganización del citoesqueleto [203], así como en un gran número de procesos fisiológicos y tumorigénicos [202, 204]. Se le atribuye un papel importante en el proceso de la invasión y metástasis en cáncer de mama [205]. En el 2D-DIGE se detectó que la CFL1 aumentaba sus niveles nucleolares en las células siCAPN2 con respecto a las células control (Figura 17), probablemente debido a la actividad proteolítica de la CAPN2.

Para evaluar la posibilidad de que la CFL1 fuera un sustrato directo de la CAPN2, primero se analizaron los niveles de la CFL1 en las líneas luminales y las líneas TNBC de cáncer de mama mediante WB (Figura 19). Las células MDA-MB-231 expresaban menores niveles de la CFL1 con respecto a las demás líneas celulares. Justo lo opuesto se observó para los niveles de expresión de la CAPN2 [28]. Posteriormente, se evaluaron los niveles de la CFL1 y sus fragmentos mediante WB en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 (Figura 20). No se detectaron diferencias significativas en los niveles de CFL1 entre las células control o silenciadas para CAPN2, ni tampoco fragmentos de la misma.

Los resultados parecían indicar que la CFL1 no es una diana directa de la actividad proteolítica de la CAPN2.

### 3. PAPEL DE LA CAPN2 EN LA MODULACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA CFL1

#### 3.1 Localización subcelular de la CFL1

Puesto que parece que la CFL1 no es una diana directa de la actividad proteolítica de la CAPN2, se planteó la hipótesis de que la CAPN2 podría presentar una función moduladora de su distribución. Para evaluarlo, se estudió la distribución de la CFL1 mediante IF en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. En las imágenes de microscopia confocal se observó que la CFL1 se localizaba en el citoplasma y el nucleoplasma de las células control, destacando un fuerte acúmulo de la proteína en la membrana de las mismas (Figura 21). En las células silenciadas para la CAPN2, se detectó señal de la CFL1 en el citosol y el núcleo, destacando una pequeña concentración en el nucléolo y un fuerte acúmulo en los espacios intercromatínicos de la región perinucleolar en ~ 45% de las células siCAPN2. Estos datos parecen indicar que la CAPN2 podría regular la distribución de la CFL1 en las BCC, ya que en ausencia de CAPN2, aumentan los niveles del CFL1 en el núcleo.

Para validar estos resultados, se evaluaron los niveles de la CFL1 en el extracto de proteínas citosólico y nuclear de células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 mediante WB. Los resultados confirman lo observado por la IF; únicamente se detectó un incremento de la CFL1 nuclear en las células siCAPN2 con respecto a los controles (Figura 22). Parece que el silenciamiento de la CAPN2 promueve la acumulación de la CFL1 en el núcleo, sugiriendo que la CAPN2 podría modular la distribución nuclear de la CFL1 en las BCC.

#### 3.2 Papel de la CAPN2 en la fosforilación y distribución de la CFL1

La fosforilación de la CFL1, inhibe su actividad despolimerizadora de la F-actina y promueve cambios en su distribución subcelular [202], siendo la ratio pCFL1/CFL1 fundamental en el proceso de tumorigénesis [205]. Un aumento de

## RESUMEN

la misma, se ha relacionado con un mayor potencial de invasión y metástasis en las células tumorales [202, 204, 206]. La CAPN2 podría modular la distribución de la CFL1 a través de su fosforilación. Las líneas celulares TNBC presentaban mayor ratio pCFL1/CFL1 que las líneas luminales (Figura 23). La fosforilación de la CFL1 podría ser dependiente de los niveles de expresión de la CAPN2. Con un test de Spearman, se estableció que la ratio pCFL1/CFL1 era directamente proporcional a los niveles de CAPN2 en las diferentes líneas de cáncer de mama (Figura 24). Las líneas TNBC son las que mayor ratio y mayores niveles de CAPN2 presentan. Estos resultados sugieren que la CAPN2 podría estar implicada en la regulación de la vía de fosforilación de la CFL1.

Para evaluar si la fosforilación de la CFL1 era dependiente de la actividad CAPN, se analizaron los niveles de pCFL1 en presencia y ausencia de calpeptina en las líneas celulares TNBC mediante WB. Como cabía esperar, la ratio pCFL1/CFL1 decrecía en ~ 50% de las células tratadas con calpeptina con respecto a las control (Figura 25). El bloqueo de la actividad CAPN disminuía la tasa de fosforilación de la CFL1. En las imágenes de microscopia confocal se observó que, tanto en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA como en las siCAPN2, la pCFL1 era más abundante en el citosol que en el núcleo (Figura 26). De acuerdo con los experimentos con calpeptina, la pCFL1 disminuía notablemente en ~ 77% de las células transfectadas con siCAPN2 con respecto al control. El silenciamiento de la CAPN2 disminuye la tasa de fosforilación de la CFL1.

Para verificar el posible papel de la CAPN2 en la distribución de la CFL1 a través de la modulación de su vía de fosforilación, se estudió la distribución subnuclear de la CFL1 y la pCFL1 por WB. Los resultados mostraron que el silenciamiento de la CAPN2 promovía la acumulación de la CFL1 en el nucléolo y una disminución de la pCFL1 en el resto de la célula (Figura 27). Estas observaciones parecen indicar que la CAPN2 podría modular la distribución de la CFL1 mediante la regulación de su vía de fosforilación.

## 4. POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA CAPN2 EN LA ACTIVACIÓN DE LIMK1

### 4.1. La CFL1 como sustrato de LIMK1

Se ha descrito que LIMK1 es la principal quinasa implicada en la fosforilación de la CFL1 en las células MDA-MB-231 [209]. Para comprobarlo, se analizó la ratio pCFL1/CFL1 mediante WB en las células transfectadas con scRNA y siLIMK1. La ratio pCFL1/CFL1 disminuía dos veces en las células siLIMK1 con respecto a las células control (Figura 28). Por ello, se considera a LIMK1 como la principal quinasa implicada en la fosforilación de la CFL1 en las células MDA-MB-231.

### 4.2. Papel de la CAPN2 en la activación indirecta de LIMK1

La CAPN2 promueve la fosforilación y activación indirecta de la LIMK1 mediante la vía ROCK-RhoA [214]. Se observó que la ratio de pLIMK1/LIMK1 aumentaba 1.6 veces en las células MCF-7 con sobreexpresión ectópica de la CAPN2 con respecto a los controles (Figura 29). Por el contrario, la ratio disminuía dos veces al silenciar a la CAPN2 en las células MDA-MB-231 con respecto a las células control (Figura 30). Los resultados sugieren que la CAPN2 regula la vía de fosforilación de LIMK1 en las BCC.

Las imágenes de microscopia confocal confirmaron lo observado por WB, los niveles de pLIMK1 disminuían en ~ 90% de las células siCAPN2 con respecto al control. Sin embargo, no se observaron cambios aparentes en el patrón de distribución de pLIMK1 entre ambas (Figura 31). Parece que la CAPN2 no interviene en la regulación de la distribución de la quinasa a través de su fosforilación.

### 4.3 Posible papel de la CAPN2 en la activación directa de LIMK1

Además de la activación indirecta de LIMK1 a través de la vía ROCK-RhoA [214], la CAPN2 podría promover la activación de LIMK1 por una ruta alternativa; una vía directa. Para analizar esta posibilidad, se evaluó la interacción entre la CAPN2 y LIMK1 por IP seguida de WB en las células MDA-MB-231 transfectadas

## RESUMEN

con scRNA y siCAPN2. Los resultados mostraron que LIMK1, CFL1 y CAPN2 co-inmunoprecipitaban únicamente en las células transfectadas con scRNA (Figura 32). En las células transfectadas con siCAPN2, la CFL1 y LIMK1 a penas co-inmunoprecipitaban, sugiriendo que la unión directa entre la CAPN2 y LIMK1 es crucial para la unión de LIMK1 con su sustrato, la CFL1.

LIMK1 posee dos dominios LIM y un dominio PDZ de unión a otras proteínas [215]. La CAPN2 contiene en su extremo C-terminal un dominio PDZ de tipo I [23] (Figura 2). La CAPN2 podría interactuar con LIMK1 a través de su extremo C-terminal. Para evaluar esta posibilidad, se transfectaron células MCF-7 con el vector de expresión de CAPN2 completa o su versión truncada que carece del extremo C-terminal (Figura 33). La CAPN2 truncada presentaba la misma estabilidad y localización nuclear y nucleolar que la CAPN2 completa (Figura 34 y 35).

Tras descartar problemas en la distribución o la estabilidad de la CAPN2 truncada, se evaluó el posible papel del extremo C-terminal de la CAPN2 en la unión CAPN2/LIMK1 mediante IP seguida de WB en células MCF-7 con sobreexpresión ectópica de la CAPN2 completa y la CAPN2 truncada (Figura 36). Se detectó que la CAPN2 co-inmunoprecipitaba levemente con LIMK1 en las células control debido a la CAPN2 basal. Se observó una co-inmunoprecipitación intensa entre LIMK1 y la CAPN2 en las células transfectadas con la CAPN2 completa. No obstante, LIMK1 no interactuaba con la CAPN2 truncada. Los resultados indican que la CAPN2 forma un complejo con LIMK1 a través de su extremo C-terminal.

### 4.4 LIMK1 como posible diana de la actividad proteolítica de la CAPN2

El corte del extremo N-terminal autoinhibidor de LIMK1 se ha descrito como otro mecanismo de su activación [216]. Este hecho junto con los 5 posibles puntos de corte en LIMK1 encontrados con el programa GPS-CCD de predicción de puntos de corte de la CAPN2 (Figura 37), plantearon la posibilidad de que LIMK1 fuera un sustrato de la CAPN2. Para estudiar a la quinasa como posible diana de la actividad proteolítica de la CAPN2, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos:



a. Ensayo de proteólisis de la LIMK1 *in vitro*. El extracto de proteínas de células MDA-MB-231 se incubó con concentraciones crecientes de rCAPN2 y  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia o ausencia de calpeptina. Tras analizar a LIMK1 y sus fragmentos mediante WB, se observó que LIMK1 era proteolizada de manera dosis dependiente por la rCAPN2 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a las células control (Figura 38). Se detectaron fragmentos de menor tamaño (38 -50kDa) de LIMK1 en las muestras con rCAPN2 y  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que, en las muestras con calpeptina, se bloqueaba la actividad de la rCAPN2 no detectándose señal de proteólisis de LIMK1. Este resultado junto con los niveles de GAPDH que no variaban en ninguna muestra del experimento, sugieren una proteólisis de la LIMK1 mediada por la CAPN2.

b. Ensayo de proteólisis de LIMK1 *in vivo*. Se analizaron los niveles de LIMK1 mediante WB en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y si-CAPN2. Utilizando anticuerpos tanto  $\alpha\text{-Ct-LIMK1}$  como  $\alpha\text{-Nt-LIMK}$  se observó un aumento de LIMK1 en las células silenciadas para la CAPN2 con respecto a las células control (Figura 39). Este dato podría ser indicativo de la actividad proteolítica de la CAPN2 sobre LIMK1. La sobreexposición de los films correspondientes a los WB de células MCF-7 y MDA-MB-231 permitió detectar una banda de ~ 43-45kDa específica de LIMK1 (Figura 40). Los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo*, plantean que la proteólisis de LIMK1 mediada por la CAPN2 podría ser un mecanismo directo de su activación.

#### 4.5 Papel de la CAPN2 en la regulación de la distribución de LIMK1

La actividad proteolítica de la CAPN2 podría regular la distribución de LIMK1. Se analizó la distribución de LIMK1 en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 por IF. Se confirmó lo observado por WB; los niveles globales de LIMK1 aumentaban en las células transfectadas con siCAPN2 con respecto a las células control (Figura 41). Se detectó un acúmulo de LIMK1 en el citosol de las células control y silenciadas y en la membrana del ~ 53% de las células siCAPN2. Estos datos parecen indicar que la actividad proteolítica de la CAPN2 podría modular la distribución de LIMK1.

## 5. PAPEL DE LA CAPN2 EN LA FOSFORILACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA CFL1 DURANTE EL CICLO CELULAR

La fosforilación y redistribución de la CFL1 durante la mitosis, sigue el mismo patrón que el de la activación de LIMK1; alcanzando su máximo nivel en la metafase y disminuyendo hasta alcanzar los niveles basales en las etapas de anafase, telofase y citoquinesis [218, 219]. Por el contrario, la activación de la vía ROCK/RhoA sigue un patrón distinto, alcanzando su pico máximo en la telofase [220]. La CAPN2 podría participar en la activación mitótica de LIMK1 y posterior fosforilación de la CFL1 durante el ciclo celular. Para evaluar esta hipótesis, se estudió por IF la distribución de la CFL1 y la pCFL1 durante el ciclo celular en células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2 no sincronizadas. La progresión del ciclo celular se evaluó mediante análisis morfológico con DAPI y contraste de fases (Figura 42). En las células control (Figura 42 izquierda) se observó que: i) en la interfase, la ratio pCFL1/CFL1 descendía en la membrana celular y en el núcleo; ii) en la prometafase, incrementaba la ratio pCFL1/CFL1 con respecto a otras fases del ciclo; además, la CFL1 y la pCFL1 se distribuían uniformemente alrededor de los cromosomas; iii) en la telofase tardía, la CFL1 se acumulaba principalmente en el núcleo y en la membrana celular mientras que la pCFL1 se detectaba en el citoplasma. Estos datos, junto con lo previamente publicado [220], indican que la CFL1 fosforilada se trasloca de la periferia celular al citoplasma en la telofase.

En las células silenciadas para la CAPN2 (Figura 42 derecha), la ratio pCFL1/CFL1 disminuía en todas las fases en comparación con las células control; i) en la interfase, la CFL1 se acumulaba anormalmente en el núcleo con respecto a los controles; ii) en la prometafase, se detectó un leve incremento de la pCFL1 con respecto a las demás fases del ciclo celular. No obstante, este incremento era muy inferior al que se producía en las células control; iii) en la telofase tardía, la CFL1 se acumulaba anormalmente en el núcleo mientras que la pCFL1 lo hacía en el anillo contráctil. Los resultados sugieren que el silenciamiento de la CAPN2 retrasa la traslocación de la pCFL1 desde la periferia celular al citoplasma.

Las alteraciones en el patrón de fosforilación de la CFL1 durante el ciclo celular, desencadenan retrasos en la progresión de la anafase a la telofase y fallos en la citoquinesis, que conducen a la multinucleación [210, 218, 219, 223]. Se analizó la multinucleación por monitorización de la morfología celular en las células MDA-MB-231 transfectadas con scRNA y siCAPN2. El número de células multinucleadas era el doble en las células silenciadas para la CAPN2 que en las células control (Figura 43). Los resultados obtenidos por microscopia confocal se confirmaron tras analizar la multinucleación como el porcentaje de agregados detectados en las células scRNA y siCAPN2 por citometría de flujo (Figura 44 a). El número de células con mitosis aberrante y multinucleación era dos veces mayor en las células silenciadas para la CAPN2 con respecto a las células control (Figura 44 b), sugiriendo que la CAPN2 participa en la regulación precisa de la división celular. De hecho, un mayor porcentaje de células siCAPN2 permanecían en la fase G2/M con respecto a los controles ( $11\pm 0.53\%$  vs.  $7.27\pm 0.42\%$  respectivamente, figura 44 a). Estos datos parecen indicar que el silenciamiento de la CAPN2 promueve la retención de las células en mitosis, sugiriendo que la CAPN2 podría regular la progresión del ciclo celular y la correcta división celular.

Los resultados de los experimentos sugieren que la CAPN2 podría modular la progresión del ciclo celular mediante una regulación precisa de la fosforilación y distribución de la CFL1. Además, parece que la CAPN2 presenta un papel importante en la mitosis y citoquinesis celular.

## CONCLUSIONES

Durante la presente tesis doctoral se ha estudiado la distribución subnuclear específica de la CAPN2 y su posible función tratando de identificar y validar las posibles dianas dependientes de la CAPN2 que participan en las interacciones entre los componentes nucleares en las células en proliferación de cáncer de mama. En base a los resultados obtenidos, se ha concluido que:

## RESUMEN

1. La abundancia de la CAPN2 es un factor determinante de su localización nucleolar y perinucleolar en líneas BCC humanas en proliferación.
2. Existe un número limitado de proteínas, entre las que se encuentra la CFL1, cuya localización nucleolar depende de los niveles de CAPN2 en células MDA-MB-231.
3. Existe una correlación positiva entre los niveles de CAPN2, la ratio pCFL1/CFL1 y el subtipo de cáncer en las líneas de cáncer de mama estudiadas.
4. La CAPN2 modula el patrón preciso de fosforilación y distribución de la CFL1 mediado por LIMK1 durante el ciclo celular que resulta crucial para la correcta resolución de la mitosis de células MDA-MB-231.

# **BIBLIOGRAFÍA**



# BIBLIOGRAFÍA

1. Sorimachi, H., Hata, S., Ono, Y.: Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem.* **150**, 23-37 (2011).
2. Campbell, R.L., Davies, P.L.: Structure-function relationships in calpains. *J. Biochem.* **447**, 335-351 (2012).
3. Ono, Y., Saido, T.C., Sorimachi, H.: Calpain research for drug discovery: Challenges and potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 854-876 (2016).
4. Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J.: The calpain system. *Physiol. Rev.* **83**, 731-801 (2003).
5. Ono, Y., Sorimachi, H.: Calpains : an elaborate proteolytic system. *Biochem. Biophys. Acta.* **1824**, 224-236 (2012).
6. Croall, D.E., Ersfeld, K.: The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol.* **8**, 1-11 (2007).
7. Guroff, G.: A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* **239**, 149-155 (1964).
8. Huston, R.B., Krebs, E.G.: Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca<sup>2+</sup>. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochem.* **6**, 2116-2122 (1968).
9. Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K.I., Imahori, K.: Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. Purification and characterization. *J. Biochem.* **84**, 225-230 (1978).
10. Murachi, T., Tanaka, K., Hatanaka, M., Murakami, T.: Intracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv. Enzyme Regul.* **19**, 407-424 (1980).
11. Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi M., Suzuki, K.: Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature.* **312**, 6-12 (1984).
12. Hiroyuki, B.: Review Calpain chronicle -an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc. Jpn. Acad.* **87**, 287-327 (2011).
13. Liu, J., Liu, M.C., Wang, K.K.W.: Calpain in the CNS: from synaptic function to neurotoxicity. *Sci. Signal.* **1**, 1-14 (2008).
14. Liu, Z.X., Yu, K., Dong, J., Zhao, L., Liu, Z., Zhang, Q., Li, S., Du, Y., Cheng, H.: Precise prediction of calpain cleavage sites and their aberrance caused by mutations in cancer. *Front. Genet.* **10**, 1-13 (2019).

## BIBLIOGRAFÍA

15. Raynaud, F., Carnac, G., Marcilhac, A., Benyamin, Y.: m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp. Cell Res.* **298**, 48-57 (2004).
16. Santos, D.M., Xavier, J.M., Morgado, A.L., Solá, S., Rodrigues, C.M.P.: Distinct regulatory functions of calpain 1 and 2 during neural stem cell self-renewal and differentiation. *PLoS One.* **7**, 26-39 (2012).
17. Franco, S.J., Huttenlocher, A.: Regulating cell migration: Calpains make the cut. *J. Cell Sci.* **118**, 3829-3838 (2005).
18. Jánossy, J., Ubezio, P., Apáti, Á., Magócsi, M., Tompa, P., Friedrich, P.: Calpain as a multi-site regulator of cell cycle. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 1513-1521 (2004).
19. Arandis, T., Ferrer-Vicens, I., Torres, L., García, C., García-Trevijano, E.R., Zaragoza, R., Viña, J.R.: Differential functions of calpain 1 during epithelial cell death and adipocyte differentiation in mammary gland involution. *J. Biochem.* **459**, 355-368 (2014).
20. Dutt, P., Croall, D.E., Arthur, J.S.C., De Veyra, T., Williams, K., Elce, J.S., Greer, P.A.: m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev. Biol.* **6**, 1-11 (2006).
21. Jahnke, V.E., Peterson, J.M., Van Der Meulen, J.H., Boehler, J., Uaesoontrachoon, K., Johnston, H.K., Defour, A., Phadke, A., Yu, Q., Jaiswal, J.K., Nagaraju, K.: Mitochondrial dysfunction and consequences in calpain-3-deficient muscle. *Skelet. Muscle.* **10**, 1-17 (2020).
22. Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., Maellaro, E.: Calpains and cancer: Friends or enemies? *Arch. Biochem. Biophys.* **564**, 26-36 (2014).
23. Baudry, M.: Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekyll and Mr Hyde? *Curr. Neuropharmacol.* **17**, 823-829 (2019).
24. Wang, Y., Liu, Y., Bi, X., Baudry, M.: Calpain-1 and Calpain-2 in the brain: new evidence for a critical role of calpain-2 in neuronal death. *Cells.* **9**, 1-16 (2020).
25. Storr, S.J., Thompson, N., Pu, X., Zhang, Y., Martin, S.G.: Calpain in breast cancer: role in disease progression and treatment response. *Pathobiology.* **82**, 133-141 (2015).
26. Cong, J., Goll, D.E., Peterson, A.M., Kapprell, H.P.: The role of autolysis in activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases ( $\mu$ -calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* **264**, 10096-10103 (1989).
27. Friedrich, P.: The intriguing Ca<sup>2+</sup> requirement of calpain activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 1131-1133 (2004).
28. Rodríguez-Fernández, L., Ferrer-Vicens, I., García, C., Oltra, S.S., Zaragoza, R., Viña, J.R., García-Trevijano, E.R.: Isoform-specific function of calpains in cell adhesion disruption: Studies in postlactational mammary gland and breast cancer. *J. Biochem.* **473**, 2893-2909 (2016).



29. Hosfield, C.M., Elce, J.S., Davies, P.L., Jia, Z.: Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* **18**, 6880-6889 (1999).
30. Hata, S., Sorimachi, H., Nakagawa, K., Maeda, T., Abe, K., Suzuki, K.: Domain II of m-calpain is a Ca<sup>2+</sup>-dependent cysteine protease. *FEBS Lett.* **501**, 111-114 (2001).
31. Strobl, S., Fernández-Catalán, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K., Bode, W.: The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 588-592 (2000).
32. Nalefski, E.A., Falke, J.J.: The C2 domain calcium-binding motif structural and functional diversity. *Protein Sci.* **5**, 2375-2390 (1996).
33. Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K., Friedrich, P.: Domain III of calpain is a Ca<sup>2+</sup>-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1333-1339 (2001).
34. Imajoh, S., Kawasaki, H., Suzuki, K.: The COOH-Terminal E-F hand structure of calcium-activated neutral protease (CANP) is important for the association of subunits and resulting proteolytic activity. *J. Biochem.* **101**, 447-452 (1987).
35. Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S., Davies, P.L., Elce, J.S., Cygler, M.: Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 532-538 (1997).
36. Hosseini, M., Najmabadi, H., Kahrizi, K.: Calpains: Diverse functions but enigmatic. *Arch. Iran. Med.* **21**, 170-179 (2018).
37. Moldoveanu, T., Hosfield, C.M., Lim, D., Elce, J.S., Jia, Z., Davies, P.L.: A Ca<sup>2+</sup> switch aligns the active site of calpain. *Cell.* **108**, 649-660 (2002).
38. Moldoveanu, T., Jia, Z., Davies, P.L.: Calpain activation by cooperative Ca<sup>2+</sup> binding at two non-EF-hand sites. *J. Biol. Chem.* **279**, 6106-6114 (2004).
39. Suzuki, K., Emori, Y., Ohno, S., Imahori, S., Kawasaki, H., Miyake, S.: Structure and function of the small (30K) subunit of calcium-activated neutral protease (CANP). *Biomed. Biochim. Acta.* **45**, 1487-1491 (1986).
40. Hata, S., Kitamura, F., Yamaguchi, M., Shitara, H., Murakami, M., Sorimachi, H.: A gastrointestinal calpain complex, G-calpain, is a heterodimer of CAPN8 and CAPN9 calpain isoforms, which play catalytic and regulatory roles, respectively. *J. Biol. Chem.* **291**, 27313-27322 (2016).
41. Pal, G.P., Elce, J.S., Jia, Z.: Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.* **276**, 47233-47238 (2001).

## BIBLIOGRAFÍA

42. Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S., Suzuki, K.: Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 376-383 (1995).
43. Dutt, P., Arthur, J.S.C., Croall, D.E., Elce, J.S.: m-Calpain subunits remain associated in the presence of calcium. *FEBS Lett.* **436**, 367-371 (1998).
44. Zhang, W., Mellgren, R.L.: Calpain subunits remain associated during catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 890-896 (1996).
45. Hanna, R.A., Campbell, R.L., Davies, P.L.: Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature.* **456**, 409-412 (2008).
46. Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S., Suzuki, K.: A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *FEBS Lett.* **358**, 101-103 (1995).
47. Zimmerman, U.J.P., Boring, L., Pak, U.J.H., Mukerjee, N., Wang, K.K.W.: The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB Life.* **50**, 63-68 (2000).
48. Chou, J.S., Impens, F., Gevaert, K., Davies, P.L.: m-Calpain activation in vitro does not require autolysis or subunit dissociation. *Biochem. Biophys. Acta.* **1814**, 864-872 (2011).
49. Kiss, R., Kovács, D., Tompa, P., Perczel, A.: Local structural preferences of calpastatin, the intrinsically unstructured protein inhibitor of calpain. *Biochem.* **47**, 6936-6945 (2008).
50. Wendt, A., Thompson, V.F., Goll, D.E.: Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biological Chemistry.* **385**, 465-472 (2004).
51. Hanna, R.A., García-Díaz, B.E., Davies, P.L.: Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS Lett.* **581**, 2894-2898 (2007).
52. Betts, R., Anagli, J.: The beta and gamma CH2 of B27-WT's Leu11 and Ile18 side chains play a direct role in calpain inhibition. *Biochem.* **43**, 2596-604 (2004).
53. Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., Carson, M., Jin, L., Yuen, P.W., Takano, E., Hatanaka, M., DeLucas, L.J., Narayana, S.V.: Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 539-547 (1997).
54. Higuchi, M., Tomioka, M., Takano, J., Shirotani, K., Iwata, N., Masumoto, H., Maki, M., Itohara, S., Saido, T.C.: Distinct mechanistic roles of calpain and caspase activation in neurodegeneration as revealed in mice overexpressing their specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* **280**, 15229-15237 (2005).

55. Liang, B., Duan, B.Y., Zhou, X.P., Gong, J.X., Luo, Z.G.: Calpain activation promotes BACE1 expression, amyloid precursor protein processing, and amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **285**, 27737-27744 (2010).
56. Rao, M. V., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Yang, D.S., Schmidt, S.D., Stavrides, P.H., Campbell, J., Chen, Y., Jiang, Y., Paskevich, P.A., Cataldo, A.M., Haroutunian, V., Nixon, R.A.: Marked calpastatin (CAST) depletion in Alzheimer's disease accelerates cytoskeleton disruption and neurodegeneration: neuroprotection by CAST overexpression. *J. Neurosci.* **28**, 12241-12254 (2008).
57. Cong, M., Thompson, V.F., Goll, D.E., Antin, P.B.: The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 660-666 (1998).
58. Averna, M., De Tullio, R., Salamino, F., Melloni, E., Pontremoli, S.: Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C. *FEBS Lett.* **450**, 13-16 (1999).
59. Adachi, Y., Takano, E., Murachi, T., Hatanaka, M., Distribution and expression of calpastatin in human hematopoietic system cells. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **369**, 1-16 (1988).
60. Vo, T.M., Burchett, R., Brun, M., Monckton, E.A., Poon, H.Y., Godbout, R.: Effects of nuclear factor I phosphorylation on calpastatin (CAST) gene variant expression and subcellular distribution in malignant glioma cells. *J. Biol. Chem.* **294**, 1173-1188 (2019).
61. Wiederanders, B.: Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochem. Pol.* **50**, 691-713 (2003).
62. Elce, J.S., Hegadorn, C., Arthur, J.S.C.: Autolysis, Ca<sup>2+</sup> requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.* **272**, 11268-11275 (1997).
63. Baki, A., Tompa, P., Alexa, A., Molnar, O., Friedrich, P.: Autolysis parallels activation of  $\mu$ -calpain. *J. Biochem.* **318**, 897-901 (1996).
64. Kumari, R., Maiti, T.K.: Calpain-2 participates in the process of calpain-1 inactivation. *Biosci. Rep.* **41**, 1-22 (2021).
65. Coolican, S.A., Hathaway, D.R.: Effect of L- $\alpha$ -phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca<sup>2+</sup>-dependent protease. Reduction of the Ca<sup>2+</sup> requirement for autolysis. *J. Biol. Chem.* **259**, 11627-11630 (1984).
66. Leloup, L., Shao, H., Bae, Y.H., Deasy, B., Stolz, D., Roy, P., Wells, A.: M-calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **285**, 33549-33566 (2010).

## BIBLIOGRAFÍA

67. Hood, J.L., Brooks, W.H., Rossman, T.L.: Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **279**, 43126-43135 (2004).
68. Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D.A., Blair, H.C., Wells, A.: Epidermal growth factor activates m-Calpain (Calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2499-2512 (2004).
69. Du, M., Li, X., Li, Z., Shen, Q., Wang, Y., Li, G., Zhang, D.: Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in  $\mu$ -calpain activity. *Food Chem.* **252**, 33-39 (2018).
70. Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z., Wells, A.: Activation of m-Calpain (Calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-Calpain. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2716-2727 (2002).
71. Smith, S.D., Jia, Z., Huynh, K.K., Wells, A., Elce, J.S.: Glutamate substitutions at a PKA consensus site are consistent with inactivation of calpain by phosphorylation. *FEBS Lett.* **542**, 115-118 (2003).
72. Du, M., Li, X., Li, Z., Shen, Q., Ren, C., Zhang, D.: Calpastatin inhibits the activity of phosphorylated  $\mu$ -calpain in vitro. *Food Chem.* **274**, 743-749 (2019).
73. Verspurten, J., Gevaert, K., Declercq, W., Vandenabeele, P.: SitePredicting the cleavage of proteinase substrates. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 319-323 (2009).
74. Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilágyi, A., Bánóczy, Z., Hudecz, F., Friedrich, P.: On the sequential determinants of calpain cleavage. *J. Biol. Chem.* **279**, 20775-20785 (2004).
75. Sorimachi, H., Mamitsuka, H., Ono, Y.: Understanding the substrate specificity of conventional calpains. *Biol. Chem.* **393**, 853-871 (2012).
76. Siklos, M., BenAissa, M., Thatcher, G.R.J.: Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B.* **5**, 506-519 (2015).
77. Potter, D.A., Tirnauer, J.S., Janssen, R., Croall, D.E., Hughes, C.N., Fiacco, K.A., Mier, J.W., Maki, M., Herman, I.M.: Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.* **141**, 647-662 (1998).
78. Xu, L., Deng, X.: Protein kinase C promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of  $\mu$ - and m-calpains. *J. Biol. Chem.* **281**, 4457-4466 (2006).
79. Sundaramoorthy, P., Sim, J.J., Jang, Y.S., Mishra, S.K., Jeong, K.Y., Mander, P., Chul, O.B., Shim, W.S., Oh, S.H., Nam, K.Y., Kim, H.M.: Modulation of intracellular

- calcium levels by calcium lactate affects colon cancer cell motility through calcium-dependent calpain. *PLoS One*. **10**, 1-15 (2015).
80. Roumes, H., Leloup, L., Dargelos, E., Brustis, J.J., Daury, L., Cottin, P.: Calpains: Markers of tumor aggressiveness? *Exp. Cell Res.* **316**, 1587-1599 (2010).
  81. Gu, J., Xu, F., Zhao, G., Lu, C., Lin, Z., Ding, J., Ge, D.: Capn4 promotes non-small cell lung cancer progression via upregulation of matrix metalloproteinase 2. *Med. Oncol.* **32**, (2015).
  82. Sun, Y., Chen, Y., Li, S., Lei, Y., Xu, D., Jiang, N., Zhang, Y., Cao, J., Ke, Z.: NanoVelcro-captured CTC number concomitant with enhanced serum levels of MMP7 and MMP9 enables accurate prediction of metastasis and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Int. J. Nanomedicine*. **12**, 6399-6412 (2017).
  83. Gafni, J., Cong, X., Chen, S.F., Gibson, B.W., Eller, L.M.: Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J. Biol. Chem.* **284**, 25441–25449 (2009).
  84. Chua, B.T., Guo, K., Li, P.: Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J. Biol. Chem.* **275**, 5131–5135 (2000).
  85. Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S., Greer, P.A.: Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 16016–16024 (2006).
  86. Smith, M.A., Schnellmann, R.G.: Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **96**, 32-37 (2012).
  87. Xie, R.J., Zheng, L., Cai, S., Chen, Y.S., Yang, Y., Yang, T., Han, B., Yang, Q., Hu, X.X.: Calpain-2 activity promotes aberrant endoplasmic reticulum stress-related apoptosis in hepatocytes. *World J. Gastroenterol.* **26**, 1450-1462 (2020).
  88. Abe, K., Takeichi, M.: NMDA-Receptor activation induces calpain-mediated  $\beta$ -catenin cleavages for triggering gene expression. *Neuron*. **53**, 387-397 (2007).
  89. Saito, T., Konno, T., Hosokawa, T., Asada, A., Ishiguro, K., Hisanaga, S.I.: p25/Cyclin-dependent kinase 5 promotes the progression of cell death in nucleus of endoplasmic reticulum-stressed neurons. *J. Neurochem.* **102**, 133-140 (2007).
  90. Mandic, A., Viktorsson, K., Strandberg, L., Heiden, T., Hansson, J., Linder, S., Shoshan, M.C.: Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3003-3013 (2002).
  91. Yan, M., Chen, K., He, L., Li, S., Huang, D., Li, J.: Uric acid induces cardiomyocyte apoptosis via activation of Calpain-1 and endoplasmic reticulum stress. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**, 2122-2135 (2018).

## BIBLIOGRAFÍA

92. Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., Anderson, S., Brabletz, T., Eisenman, R.N.: Stress-induced cleavage of Myc promotes cancer cell survival. *Genes Dev.* **28**, 689-707 (2014).
93. König, N., Raynaud, F., Feane, H., Durand, M., Mestre-Francès, N., Rossel, M., Ouali, A., Benyamin, Y.: Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and *Microcebus* brain. *J. Chem. Neuroanat.* **25**, 129-136 (2003).
94. Liu, Z., Ji, J., Zheng, D., Su, L., Peng, T.: Calpain-2 protects against heat stress-induced cardiomyocyte apoptosis and heart dysfunction by blocking p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Cell Physiol.* **234**, 10761-10770 (2019).
95. Liang, Y.C., Yeh, J.Y., Forsberg, N.E., Ou, B.R.: Involvement of  $\mu$ - and m-calpains and protein kinase C isoforms in L8 myoblast differentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 662-670 (2006).
96. Shimada, M., Greer, P.A., McMahon, A.P., Boussein, M.L., Schipani, E.: In vivo targeted deletion of calpain small subunit, *Capn4*, in cells of the osteoblast lineage impairs cell proliferation, differentiation, and bone formation. *J. Biol. Chem.* **283**, 21002-21010 (2008).
97. Yajima, Y., Sato, M., Sorimachi, H., Inomata, M., Maki, M., Kawashima, S.: Calpain system regulates the differentiation of adult primitive mesenchymal ST-13 adipocytes. *Endocrinology.* **147**, 4811-4819 (2006).
98. Rodríguez Fernández, L.: Subcellular distribution of calpain-1 and calpain-2 as a key event for calpain-mediated functions in physiological and neoplastic mammary models. Doctoral thesis. Universidad de Valencia (2019).
99. Guan, Y., Huang, D., Chen, F., Gao, C., Tao, T., Shi, H., Zhao, S., Liao, Z., Lo, L.J., Wang, Y., Chen, J., Peng, J.: Phosphorylation of Def regulates nucleolar p53 turnover and cell cycle progression through Def recruitment of Calpain 3. *PLoS Biol.* **14**, 1-31 (2016).
100. Zhao, S., Huang, D., Peng, J.: Nucleolus-localized Def-CAPN3 protein degradation pathway and its role in cell cycle control and ribosome biogenesis. *J. Genet. Genomics.* **48**, 955-960 (2021).
101. Chen, F., Huang, D., Shi, H., Gao, C., Wang, Y., Peng, J.: *Capn3* depletion causes Chk1 and Wee1 accumulation and disrupts synchronization of cell cycle reentry during liver regeneration after partial hepatectomy. *Cell Regen.* **9**, 1-18 (2020).
102. Kashiwagi, A., Schipani, E., Fein, M.J., Greer, P.A., Shimada, M.: Targeted deletion of *Capn4* in cells of the chondrocyte lineage impairs chondrocyte proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2799-2810 (2010).
103. Honda, S., Marumoto, T., Hirota, T., Nitta, M., Arima, Y., Ogawa, M., Saya, H.: Activation of m-Calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 10615-10623 (2004).

104. Magnaghi-Jaulin, L., Marcilhac, A., Rossel, M., Jaulin, C., Benyamin, Y., Raynaud, F.: Calpain 2 is required for sister chromatid cohesion. *Chromosoma*. **119**, 267-274 (2010).
105. Eifler, K., Vertegaal, A.C.O.: SUMOylation-mediated regulation of cell cycle progression and cancer. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 779-793 (2015).
106. Ho, W.C., Pikor, L., Gao, Y., Elliott, B.E., Greer, P.A.: Calpain 2 regulates Akt-FoxO-p27Kip1 protein signaling pathway in mammary carcinoma. *J. Biol. Chem.* **287**, 15458-15465 (2012).
107. Kovacs, L., Cao, Y., Han, W., Meadows, L., Kovacs-Kasa, A., Kondrikov, D., Verin, A.D., Barman, S.A., Dong, Z., Huo, Y., Su, Y.: PFKFB3 in smooth muscle promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**, 617-627 (2019).
108. Raynaud, F., Marcilhac, A., Chebli, K., Benyamin, Y., Rossel, M.: Calpain 2 expression pattern and sub-cellular localization during mouse embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 383-388 (2008).
109. Storr, S.J., Carragher, N.O., Frame, M.C., Parr, T., Martin, S.G.: The calpain system and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **11**, 364-374 (2011).
110. Bevers, M.B., Neumar, R.W.: Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 655-673 (2008).
111. Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., Eisenman, R.N.: Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell.* **142**, 480-493 (2010).
112. Toyota, H., Yanase, N., Yoshimoto, T., Moriyama, M., Sudo, T., Mizuguchi, J.: Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Lett.* **189**, 221-230 (2003).
113. Han, X., Liu, C., Zhang, K., Guo, M., Shen, Z., Liu, Y., Zuo, Z., Cao, M., Li, Y.: Calpain and JNK pathways participate in isoflurane – induced nucleus translocation of apoptosis-inducing factor in the brain of neonatal rats. *Toxicol. Lett.* **285**, 60-73 (2018).
114. Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., Simon, H.U.: Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1124-1132 (2006).
115. Luzio, J.P., Pryor, P.R., Bright, N.A.: Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 622-632 (2007).
116. Arnandis, T., Ferrer-Vicens, I., García-Trevijano, E.R., Miralles, V.J., García, C., Torres, L., Viña, J.R., Zaragoza, R.: Calpains mediate epithelial-cell death during mammary gland involution: mitochondria and lysosomal destabilization. *Cell Death Differ.* **19**, 1536-1548 (2012).

## BIBLIOGRAFÍA

117. Villalpando-Rodríguez, G.E., Torriglia, A.: Calpain 1 induces lysosomal permeabilization by cleavage of lysosomal associated membrane protein 2. *Biochem. Biophys. Acta.* **1833**, 2244-2253 (2013).
118. Peintner, L., Venkatraman, A., Waeldin, A., Hofherr, A., Busch, T., Voronov, A., Viau, A., Kuehn, E.W., Köttgen, M., Borner, C.: Loss of PKD1/polycystin-1 impairs lysosomal activity in a CAPN (calpain)-dependent manner. *Autophagy.* **17**, 2384-2400 (2021).
119. López-Menéndez, C., Simón-García, A., Gamir-Morralla, A., Pose-Utrilla, J., Lu-ján, R., Mochizuki, N., Díaz-Guerra, M., Iglesias, T.: Excitotoxic targeting of Kinds220 to the Golgi apparatus precedes calpain cleavage of Rap1-activation complexes. *Cell Death Dis.* **10**, 535-549 (2019).
120. Zuo, S., Kong, D., Wang, C., Liu, J., Wang, Y., Wan, Q., Yan, S., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Q., Lyu, L., Li, X., Shan, Z., Qian, L., Shen, Y., Yu, Y.: CRTH2 promotes endoplasmic reticulum stress-induced cardiomyocyte apoptosis through m-calpain. *EMBO Mol. Med.* **10**, 8237-8245 (2018).
121. French, J.P., Quindry, J.C., Falk, D.J., Staib, J.L., Lee, Y., Wang, K.K.W., Powers, S.K.: Ischemia reperfusion induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* **290**, 128-136 (2006).
122. Lahiri, S.K., Quick, A.P., Samson-Couterie, B., Hulsurkar, M., Elzenaar, I., van Oort, R.J., Wehrens, X.H.T.: Nuclear localization of a novel calpain-2 mediated junctophilin-2 C-terminal cleavage peptide promotes cardiomyocyte remodeling. *Basic Res. Cardiol.* **115**, 1-13 (2020).
123. Bano, D., Dinsdale, D., Cabrera-Socorro, A., Maida, S., Lambacher, N., McColl, B., Ferrando-May, E., Hengartner, M.O., Nicotera, P.: Alteration of the nuclear pore complex in Ca(2+)-mediated cell death. *Cell Death Differ.* **17**, 119-133 (2010).
124. Choi, Y.H.: Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* **272**, 28479-28484 (1997).
125. Jariel-Encontre, I.: Complex mechanisms for c-fos and c-jun degradation. *Mol. Biol. Rep.* **24**, 51-56 (1997).
126. Kubbutat, M.H., Vousden, K.H.: Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 460-468 (1997).
127. Chang, H., Sheng, J.J., Zhang, L., Yue, Z.J., Jiao, B., Li, J.S., Yu, Z. Bin.: ROS-induced nuclear translocation of Calpain-2 facilitates cardiomyocyte apoptosis in tail-suspended rats. *J. Cell Biochem.* **10**, 2258-2269 (2015).
128. Sheng, J.J., Chang, H., Yu, Z-Bin.: Nuclear translocation of Calpain-2 mediates apoptosis of hypertrophied cardiomyocytes in transverse aortic constriction rat. *J. Cell Physiol.* **230**, 2743-2754 (2015).



129. Tremper-Wells, B., Vallano, M.L.: Nuclear calpain regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent signaling via proteolysis of nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type IV in cultured neurons. *J. Biol. Chem.* **21**, 65-75 (2005).
130. Pellicciari, R., Camaioni, E., Costantino, G.: Life or death decisions: The case of Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) as a therapeutic target for brain ischaemia. *Elsevier.* **42**, 125-169 (2004).
131. Chou, S.M., Huang, T.H., Chen, H.C., Li, T.K.: Calcium-induced cleavage of DNA topoisomerase I involves the cytoplasmic-nuclear shuttling of calpain 2. *Cell Mol. Life Sci.* **68**, 2769-2784 (2011).
132. Vo, T.M., Jain, S., Burchett, R., Monckton, E.A., Godbout, R.: A positive feedback loop involving nuclear factor IB and calpain 1 suppresses glioblastoma cell migration. *J. Biol. Chem.* **294**, 12638-12654 (2019).
133. Pederson, T.: The nucleolus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1-15 (2011).
134. Telechea-Fernández, M., Rodríguez-Fernández, L., García, C., Zaragoza, R., Viña, J.R., Cervantes, A., García-Trevijano, E.R.: New localization and function of calpain-2 in nucleoli of colorectal cancer cells in ribosomal biogenesis: Effect of KRAS status. *Oncotarget*, **9**, 9100-9113 (2018).
135. Pederson, T.: Regulatory RNAs derived from transfer RNA? *RNA.* **16**, 1865-1869 (2010).
136. von Kobbe, C., Bohr, V.A.: A nucleolar targeting sequence in the Werner syndrome protein resides within residues 949-1092. *J. Cell Sci.* **15**, 3901-3907 (2002).
137. Boisvert, F.M., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A.I.: The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 574-585 (2007).
138. Penzo, M., Montanaro, L., Treré, D., Derenzini, M.: The ribosome biogenesis-cancer connection. *Cells.* **8**, 55-67 (2019).
139. Woods, S.J., Hannan, K.M., Pearson, R.B., Hannan, R.D.: The nucleolus as a fundamental regulator of the p53 response and a new target for cancer therapy. *Biochem. Biophys. Acta.* **1849**, 821-829 (2015).
140. Stępiński, D.: The nucleolus, an ally, and an enemy of cancer cells. *Histochem. Cell Biol.* **150**, 607-629 (2018).
141. Carotenuto, P., Pecoraro, A., Palma, G., Russo, G., Russo, A.: Therapeutic approaches targeting nucleolus in cancer. *Cells.* **8**, 1-20 (2019).
142. Lindström, M.S., Jurada, D., Bursac, S., Orsolich, I., Bartek, J., Volarevic, S.: Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene.* **37**, 2351-2366 (2018).

## BIBLIOGRAFÍA

143. Roche, B., Arcangioli, B., Martienssen, R.: New roles for Dicer in the nucleolus and its relevance to cancer. *Cell Cycle*. **16**, 1643-1653 (2017).
144. Moretti, D., Del Bello, B., Cosci, E., Biagioli, M., Miracco, C., Maellaro, E.: Novel variants of muscle calpain 3 identified in human melanoma cells: cisplatin-induced changes in vitro and differential expression in melanocytic lesions. *Carcinogenesis*. **30**, 960-967 (2009).
145. Badugu, R., García, M., Bondada, V., Joshi, A., Geddes, J.W.: N-terminus of calpain 1 is a mitochondrial targeting sequence. *J. Biol. Chem.* **283**, 3409-3417 (2008).
146. Saras, J., Heldin, C.H.: PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 455-458 (1996).
147. Lee, H.J., Zheng, J.J.: PDZ domains and their binding partners: Structure, specificity, and modification. *Cell Commun. Signal.* **8**, 1-18 (2010).
148. Giallourakis, C., Cao, Z., Green, T., Wachtel, H., Xie, X., López-Illasaca, M., Daly, M., Rioux, J., Xavier, R.: A molecular-properties-based approach to understanding PDZ domain proteins and PDZ ligands. *Genome Res.* **16**, 1056-1072 (2006).
149. Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C., Brecht, D.S.: Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. **84**, 757-767 (1996).
150. Penkert, R.R., DiVittorio, H.M., Prehoda, K.E.: Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6 - Pals1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1122-1127 (2004).
151. London, T.B.C., Lee, H.J., Shao, Y., Zheng, J.: Interaction between the internal motif KTXXXI of Idax and mDvl PDZ domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 326-332 (2004).
152. Zhou, L., Zhu, D.Y.: Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Biol. Chem.* **20**, 223-230 (2009).
153. Dunn, H.A., Ferguson, S.S.G.: PDZ protein regulation of G-protein-coupled receptor trafficking and signaling pathways. *Mol. Pharmacol.* **88**, 624-629 (2015).
154. Kurbatskaya, K., Phillips, E.C., Croft, C.L., Dentoni, G., Hughes, M.M., Wade, M.A., Al-Sarraj, S., Troakes, C., O'Neill, M.J., Pérez-Nievas, B.G., Hanger, D.P., Noble, W.: Upregulation of calpain activity precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Commun.* **31**, 4-34 (2016).

155. Kramerova, I., Ermolova, N., Eskin, A., Hevener, A., Quehenberger, O., Armando, A.M., Haller, R., Romain, N., Nelson, S.F., Spencer, M.J.: Failure to up-regulate transcription of genes necessary for muscle adaptation underlies limb girdle muscular dystrophy 2A (calpainopathy). *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2194-2207 (2016).
156. Hata, S., Abe, M., Suzuki, H., Kitamura, F., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Sakimura, K., Sorimachi, H.: Calpain 8/nCL-2 and calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-calpain, involved in gastric mucosal defense. *PLoS Genet.* **6**,1010-1040 (2010).
157. Pánico, P., Salazar, A.M., Burns, A.L., Ostrosky-Wegman, P.: Role of calpain-10 in the development of diabetes mellitus and its complications. *Arch. Med. Res.* **45**, 103-115 (2014).
158. Chen, J., Wu, Y., Zhang, L., Fang, X., Hu, X.: Evidence for calpains in cancer metastasis. *J. Cell. Physiol.* **234**, 8233-8240 (2019).
159. Al-Bahlani, S.M., Al-Rashdi, R.M., Kumar, S., Al-Sinawi, S.S., Al-Bahri, M.A., Shalaby, A.A.: Calpain-1 expression in triple-negative breast cancer: a potential prognostic factor independent of the proliferative/apoptotic index. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 929-945 (2017).
160. Braun, C., Engel, M., Seifert, M., Theisinger, B., Seitz, G., Zang, K.D., Welter, C.: Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. *Int. J. Cancer.* **84**, 6-9 (1999).
161. Yu, B.H., Li, B.Z., Zhou, X.Y., Shi, D.R., Yang, W.T.: Cytoplasmic FOXP1 expression is correlated with ER and calpain II expression and predicts a poor outcome in breast cancer. *Diagn. Pathol.* **13**, 30-36 (2018).
162. Marciel, M.P., Rose, A.H., Martínez, V., Horio, D.T., Hashimoto, A.S., Hoffmann, F.W., Bertino, P., Hoffmann, P.R.: Calpain-2 inhibitor treatment preferentially reduces tumor progression for human colon cancer cells expressing highest levels of this enzyme. *Cancer Med.* **7**, 175-183 (2018).
163. Yang, M.F., Lou, Y.L., Liu, S.S., Wang, S.S., Yin, C.H., Cheng, X.H., Huang, O.P.: Capn4 overexpression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *J. Cancer.* **9**, 304-309 (2018).
164. Cai, J.J., Qi, Z.X., Hua, W., Zhu, J.J., Zhang, X., Yao, Y., Mao, Y.: Increased expression of Capn4 is associated with the malignancy of human glioma. *CNS Neurosci. Ther.* **20**, 521-527 (2014).
165. Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., Corti, A., Signorini, C., Maellaro, E.: Calpain-3 impairs cell proliferation and stimulates oxidative stress-mediated cell death in melanoma cells. *PLoS One.* **10**, 1-22 (2015).

## BIBLIOGRAFÍA

166. Roperto, S., De Tullio, R., Raso, C., Stifanese, R., Russo, V., Gaspari, M., Borzacchiello, G., Averna, M., Paciello, O., Cuda, G., Roperto, F.: Calpain3 is expressed in a proteolytically active form in papillomavirus-associated urothelial tumors of the urinary bladder in cattle. *Plos One*. **5**, 1-18 (2010).
167. Liu, Y., Wang, Y., Sun, X., Mei, C., Wang, L., Li, Z., Zha, X.: miR-449a promotes liver cancer cell apoptosis by downregulation of Calpain 6 and POU2F1. *Oncotarget*. **7**, 13491-13501 (2016).
168. Lee, S.J., Kim, B.G., Choi, Y.L., Lee, J.W.: Increased expression of calpain 6 during the progression of uterine cervical neoplasia: immunohistochemical analysis. *Oncol. Rep.* **19**, 859-863 (2008).
169. Peng, P., Wu, W., Zhao, J., Song, S., Wang, X., Jia, D., Shao, M., Zhang, M., Li, L., Wang, L., Duan, F., Zhao, R., Yang, C., Wu, H., Zhang, J., Shen, Z., Ruan, Y., Gu, J.: Decreased expression of Calpain-9 predicts unfavorable prognosis in patients with gastric cancer. *Sci. Rep.* **6**, 1-23 (2016).
170. Moreno-Luna, R., Abrante, A., Esteban, F., González-Moles, M.A., Delgado-Rodríguez, M., Sáez, M.E., González-Pérez, A., Ramírez-Lorca, R., Real, L.M., Ruiz, A.: Calpain 10 gene and laryngeal cancer: a survival analysis. *Head Neck*. **33**, 72-76 (2011).
171. Ding, Y., Ma, M., Li, Q., Gao, S., Li, S., Liu, J., Geng, C.: Clinical significance of SHER2-ECD and calpain-10 expression in tumor tissues of patients with breast cancer. *Oncol. Rep.* **43**, 2093-2104 (2020).
172. Yixuan, Z., Norika-Mengchia, L., Yongchen, W., Ji, Y.: Endothelial cell calpain as a critical modulator of angiogenesis. *Biochem Biophys.* **1863**, 1326-1335 (2017).
173. Zheng, X., Zhou, A.X., Rouhi, P., Uramoto, H., Borén, J., Cao, Y., Pereira, T., Akyürek, L.M., Poellinger, L.: Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2560-2565 (2014).
174. Woolston, C.: Breast cancer. *Nature*. **527**, 75-78 (2015).
175. Smith, S.E., Mellor, P., Ward, A.K., Kendall, S., McDonald, M., Vizeacoumar, F.S., Vizeacoumar, F.J., Napper, S., Anderson, D.H.: Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. *Breast Cancer Res.* **19**, 1-12 (2017).
176. Hennigs, A., Riedel, F., Gondos, A., Sinn, P., Schirmacher, P., Marmé, F., Jäger, D., Kauczor, H.U., Stieber, A., Lindel, K., Debus, J., Golatta, M., Schütz, F., Sohn, C., Heil, J., Schneeweiss, A.: Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: a large prospective cohort study. *BMC Cancer*. **16**, 1-9 (2016).
177. Li, Z.H., Hu, P.H., Tu, J.H., Yu, N.S.: Luminal B breast cancer: Patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget*. **7**, 65024-65033 (2016).

178. Fahad-Ullah, M.: Breast Cancer: current perspectives on the disease status. Breast cancer metastasis and drug resistance. *Advances in experimental medicine and biology*. Springer. **1152**, 51-64 (2019).
179. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., Narod, S.A.: Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4429-4434 (2007).
180. Kumar, P., Aggarwal, R.: An overview of triple-negative breast cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* **293**, 247-269 (2016).
181. Prat, A., Perou, C.M.: Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5-23 (2011).
182. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., Li, J.: Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J. Cancer.* **8**, 3131-3141 (2017).
183. Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y. La, Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Pollack, J.R.: Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One.* **4**, 1-25 (2009).
184. Ho, W.C., Pikor, L., Gao, Y., Elliott, B.E., Greer, P.A.: Calpain 2 regulates Akt-FoxO-p27(Kip1) protein signaling pathway in mammary carcinoma. *J. Biol. Chem.* **287**, 15458-15465 (2012).
185. MacLeod, J.A., Gao, Y., Hall, C., Muller, W.J., Gujral, T.S., Greer, P.A.: Genetic disruption of calpain-1 and calpain-2 attenuates tumorigenesis in mouse models of HER2+ breast cancer and sensitizes cancer cells to doxorubicin and lapatinib. *Oncotarget.* **9**, 33382-33395 (2018).
186. Storr, S.J., Zhang, S., Perren, T., Lansdown, M., Fatayer, H., Sharma, N., Gahlaut, R., Shaaban, A., Martin, S.G.: The calpain system is associated with survival of breast cancer patients with large but operable inflammatory and non-inflammatory tumours treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget.* **7**, 47927-47937 (2016).
187. Pu, X., Storr, S.J., Ahmad, N.S., Chan, S.Y., Moseley, P.M., Televantou, D., Cresti, N., Boddy, A., Ellis, I.O., Martin, S.G.: Calpain-1 is associated with adverse relapse free survival in breast cancer: a confirmatory study. *Histopathology.* **68**, 1021-1029 (2016).
188. Rajković-Molek, K., Mustačić, E., Avirović, M., Georgev, P., Demaria, M., Aničić, J., Ban, J., Babarović, E.: The expression of calpain-1 and androgen receptor in breast cancer and their correlation with clinicopathological characteristics: an immunohistochemical retrospective study. *Pathol. Res. Pract.* **216**, 1-19 (2020).

## BIBLIOGRAFÍA

189. Kulkarni, S., Reddy, K.B., Esteva, F.J., Moore, H.C.F., Budd, G.T., Tubbs, R.R.: Calpain regulates sensitivity to trastuzumab and survival in HER2-positive breast cancer. *Oncogene*. **29**, 1339-1350 (2010).
190. Jeon, K.H., Yu, H.V., Kwon, Y.: Hyperactivated m-calpain affects acquisition of doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Acta*. **1862**, 1126-1133 (2018).
191. Chen, Y., Li, Z., He, Y., Shang, D., Pan, J., Wang, H., Chen, H., Zhu, Z., Wan, L., Wang, X.: Estrogen and pure antiestrogen fulvestrant (ICI 182 780) augment cell-matrigel adhesion of MCF-7 breast cancer cells through a novel G-protein coupled estrogen receptor (GPR30) to calpain signaling axis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **275**, 176-181 (2014).
192. Lafontaine, D.L.J., Riback, J.A., Bascetin, R., Brangwynne, C.P.: The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 165-182 (2021).
193. Nozawa, R.S., Yamamoto, T., Takahashi, M., Tachiwana, H., Maruyama, R., Hirota, T., Saitoh, N.: Nuclear microenvironment in cancer: control through liquid-liquid phase separation. *Cancer Sci.* **111**, 3155-3163 (2020).
194. Németh, A., Grummt, I.: Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr. Opin. Cell Biol.* **52**, 105-111 (2018).
195. Cine, N., Baykal, A.T., Sunnetci, D., Canturk, Z., Serhatli, M., Savli, H.: Identification of ApoA1, HPX and POTEE genes by omic analysis in breast cancer. *Oncol. Rep.* **32**, 1078-1086 (2014).
196. Lee, J.: Role of cyclophilin A during oncogenesis. *Arch. Pharm. Res.* **33**, 181-187 (2010).
197. Chevalier, F., Depagne, J., Hem, S., Chevillard, S., Bensimon, J., Bertrand, P., Lebeau, J.: Accumulation of cyclophilin A isoforms in conditioned medium of irradiated breast cancer cells. *Proteomics*. **12**, 1756-1766 (2012).
198. Askeland, C., Wik, E., Finne, K., Birkeland, E., Arnes, J.B., Collett, K., Knutsvik, G., Krüger, K., Davidsen, B., Aas, T., Eide, G.E., Stefansson, I.M., Foulkes, W.D., Akslen, L.A.: Stathmin expression associates with vascular and immune responses in aggressive breast cancer subgroups. *Sci. Rep.* **10**, 1-14 (2020).
199. Kuang, X.Y., Jiang, H.S., Li, K., Zheng, Y.Z., Liu, Y.R., Qiao, F., Li, S., Hu, X., Shao, Z.M.: The phosphorylation-specific association of STMN1 with GRP78 promotes breast cancer metastasis. *Cancer Lett.* **377**, 87-96 (2016).
200. Alhudiri, I.M., Nolan, C.C., Ellis, I.O., Elzagheid, A., Rakha, E.A., Green, A.R., Chapman, C.J.: Expression of Lamin A/C in early-stage breast cancer and its prognostic value. *Breast Cancer Res. Treat.* **174**, 661-668 (2019).

201. Matsumoto, A., Hieda, M., Yokoyama, Y., Nishioka, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., Matsuura, N.: Global loss of a nuclear lamina component, lamin A/C, and LINC complex components SUN1, SUN2, and nesprin-2 in breast cancer. *Cancer Med.* **4**, 1547-1557 (2015).
202. Shishkin, S., Eremina, L., Pashintseva, N., Kovalev, L., Kovaleva, M.: Cofilin-1 and other ADF/cofilin superfamily members in human malignant cells. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1-27 (2017).
203. Sousa-Squiavinato, A.C.M., Rocha, M.R., Barcellos-de-Souza, P., de Souza, W.F., Morgado-Díaz, J.A.: Cofilin-1 signaling mediates epithelial-mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **1866**, 418-429 (2019).
204. Kanellos, G., Frame, M.C.: Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 3211-3218 (2016).
205. Wang, W., Eddy, R., Condeelis, J.: The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 429-440 (2007).
206. Liu, Y., Wang, Z., Huang, D., Wu, C., Li, H., Zhang, X., Meng, B., Li, Z., Zhu, T., Yang, S., Sun, W.: LMO2 promotes tumor cell invasion and metastasis in basal-type breast cancer by altering actin cytoskeleton remodeling. *Oncotarget.* **8**, 9513-9524 (2017).
207. Munsie, L.N., Desmond, C.R., Truant, R.: Cofilin nuclear-cytoplasmic shuttling affects cofilin-actin rod formation during stress. *J. Cell Sci.* **125**, 3977-3988 (2012).
208. Prunier, C., Prudent, R., Kapur, R., Sadoul, K., Lafanechère, L.: LIM kinases: Cofilin and beyond. *Oncotarget.* **8**, 41749-41763 (2017).
209. McConnell, B. V., Koto, K., Gutierrez-Hartmann, A.: Nuclear and cytoplasmic LIMK1 enhances human breast cancer progression. *Mol. Cancer.* **10**, 1-13 (2011).
210. Mizuno, K.: Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell. Signal.* **25**, 457-469 (2013).
211. Hosein, M., Alexey, G., Alla, M., Neha, G., Louis-Felix, N., Akihiro, N., Kentaro, T., Pieter, C.: PKA-dependent phosphorylation of LIMK1 and Cofilin is essential for mouse sperm acrosomal exocytosis. *Physiol. Behav.* **176**, 139-148 (2017).
212. dos Santos, A.A., López-Granero, C., Farina, M., Rocha, J.B.T., Bowman, A.B., Aschner, M.: Oxidative stress, caspase-3 activation and cleavage of ROCK-1 play an essential role in MeHg-induced cell death in primary astroglial cells. *Food Chem. Toxicol.* **113**, 328-336 (2018).
213. Lee, M.H., Kundu, J.K., Chae, J. Il, Shim, J.H.: Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer. *Arch. Pharm. Res.* **42**, 481-491 (2019).

## BIBLIOGRAFÍA

214. Briz, V., Baudry, M.: Calpains: Master regulators of synaptic plasticity. *Neuroscientist*. **23**, 221-231 (2017).
215. Manetti, F.: LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med. Res. Rev.* **32**, 968-998 (2012).
216. Tomiyoshi, G., Horita, Y., Nishita, M., Ohashi, K., Mizuno, K.: Caspase-mediated cleavage and activation of LIM-kinase 1 and its role in apoptotic membrane blebbing. *Genes to Cells*. **9**, 591-600 (2004).
217. Liu, Z., Cao, J., Gao, X., Ma, Q., Ren, J., Xue, Y.: GPS-CCD: A novel computational program for the prediction of calpain cleavage sites. *PLoS One*. **6**, 1-21 (2011).
218. Amano, T., Kaji, N., Ohashi, K., Mizuno, K.: Mitosis-specific activation of LIM motif-containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 22093-22102 (2002).
219. Kaji, N., Muramoto, A., Mizuno, K.: LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *J. Biol. Chem.* **283**, 4983-4992 (2008).
220. Kimura, K., Tsuji, T., Takada, Y., Miki, T., Narumiya, S.: Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation. *J. Biol. Chem.* **275**, 17233-17236 (2000).
221. O'Connell, C.B., Wang, Y.L.: Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol. Biol. Cell*. **11**, 1765-1774 (2000).
222. Théry, M., Racine, V., Pépin, A.: The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat. Cell Biol.* **7**, 947-953 (2005).
223. Kaji, N., Ohashi, K., Shuin, M., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K.: Cell cycle-associated changes in Slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33450-33455 (2003).
224. Storr, S.J., Lee, K.W., Woolston, C.M., Safuan, S., Green, A.R., Macmillan, R.D., Benhasouna, A., Parr, T., Ellis, I.O., Martin, S.G.: Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer. *Ann. Oncol.* **23**, 2289-2296 (2012).
225. Yang, L., Reece, J.F., Cho, J., Bortner, C.D., Shears, S.B.: The nucleolus exhibits an osmotically regulated gatekeeping activity that controls the spatial dynamics and functions of nucleolin. *J. Biol. Chem.* **283**, 11823-11831 (2008).
226. Abdelmohsen, K., Gorospe, M.: RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* **9**, 799-808 (2012).



227. Amin, M.A., Matsunaga, S., Ma, N., Takata, H., Yokoyama, M., Uchiyama, S., Fukui, K.: Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 320-326 (2007).
228. Amin, M.A., Matsunaga, S., Uchiyama, S., Fukui, K.: Depletion of nucleophosmin leads to distortion of nucleolar and nuclear structures in HeLa cells. *J. Biochem.* **415**, 345-351 (2008).
229. Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A.Z., Muller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A.A., Gerlich, D.W.: Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature.* **535**, 308-312 (2016).
230. Shubina, M.Y., Musinova, Y.R., Sheval, E. V.: Nucleolar methyltransferase fibrillarin: evolution of structure and functions. *Biochem.* **81**, 941-950 (2016).
231. Liu, C., Xing, H., Luo, X., Wang, Y.: MicroRNA-342 targets Cofilin 1 to suppress the growth, migration and invasion of human breast cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **687**, 1-21 (2020).
232. Chen, L., Cai, J., Huang, Y., Tan, X., Guo, Q., Lin, X., Zhu, C., Zeng, X., Liu, H., Wu, X.: Identification of cofilin-1 as a novel mediator for the metastatic potentials and chemoresistance of the prostate cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* **880**, 1-19 (2020).
233. Sim, M.J.W., Lu, J., Spencer, M., Hopkins, F., Tran, E., Rosenberg, S.A., Long, E.O., Sun, P.D.: High-affinity oligoclonal TCRs define effective adoptive T cell therapy targeting mutant KRAS-G12D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 12826-12835 (2020).
234. Geng, J., Zhang, R., Yuan, X., Xu, H., Zhu, Z., Wang, X., Wang, Y., Xu, G., Guo, W., Wu, J., Qin, Z.H.: DRAM1 plays a tumor suppressor role in NSCLC cells by promoting lysosomal degradation of EGFR. *Cell Death Dis.* **11**, 1-15 (2020).
235. Sharif, F., Rasul, A., Ashraf, A., Hussain, G., Younis, T., Sarfraz, I., Chaudhry, M.A., Bukhari, S.A., Ji, X.Y., Selamoglu, Z., Ali, M.: Phosphoglycerate mutase 1 in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life.* **71**, 1418-1427 (2019).
236. Gong, Y., Yang, G., Wang, Q., Wang, Y., Zhang, X.: NME2 is a master suppressor of apoptosis in gastric cancer cells via transcriptional regulation of miR-100 and other survival factors. *Mol. Cancer Res.* **18**, 287-299 (2020).
237. Winter, J., Kraus, D., Reckenbeil, J., Probstmeier, R.: Oncogenic relevant defensins: expression pattern and proliferation characteristics of human tumor cell lines. *Tumor Biol.* **37**, 7959-7966 (2016).

## BIBLIOGRAFÍA

238. Feng, J., Zhou, Z., Shi, L., Yang, X., Liu, W.: Cancer stem cell markers ALDH1 and Bmi1 expression in oral erythroplakia revisited: implication for driving the process of field cancerization. *J. Oral Pathol. Med.* **49**, 96-99 (2020).
239. Shen, C., Yu, Y., Li, H., Yan, G., Liu, M., Shen, H., Yang, P.: Global profiling of proteolytically modified proteins in human metastatic hepatocellular carcinoma cell lines reveals CAPN2 centered network. *Proteomics*. **12**, 1917-1927 (2012).
240. Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S., Mizuno, K.: Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *J. Cell Biol.* **177**, 465-476 (2007).
241. Oser, M., Condeelis, J.: The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J. Cell. Biochem.* **108**, 1252-1262 (2009).
242. Dopie, J., Skarp, K.P., Rajakylä, E.K., Tanhuanpää, K., Vartiainen, M.K.: Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 544-552 (2012).
243. Percipalle, P.: Co-transcriptional nuclear actin dynamics. *Nucl.* **4**, 43-52 (2013).
244. Kanellos, G., Zhou, J., Patel, H., Ridgway, R.A., Huels, D., Gurniak, C.B., Sandilands, E., Carragher, N.O., Sansom, O.J., Witke, W., Brunton, V.G., Frame, M.C.: ADF and Cofilin1 control actin stress fibers, nuclear integrity, and cell survival. *Cell Rep.* **13**, 1949-1964 (2015).
245. Madak-Erdogan, Z., Ventrella, R., Petry, L., Katzenellenbogen, B.S.: Novel roles for ERK5 and Cofilin as critical mediators linking ER $\alpha$ -driven transcription, actin reorganization and invasiveness in breast cancer. *Mol. Cancer Res.* **12**, 714-727 (2014).
246. Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., Piccolo, S.: A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell.* **154**, 1047-1059 (2013).
247. Klamt, F., Zdanov, S., Levine, R.L., Pariser, A., Zhang, Y., Zhang, B., Yu, L., Veestra, T.D., Shacter, E.: Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1241-1246 (2009).
248. Han, L., Stope, M.B., De Jesús, M.L., Oude-Weernink, P.A., Urban, M., Wieland, T., Rosskopf, D., Mizuno, K., Jakobs, K.H., Schmidt, M.: Direct stimulation of receptor-controlled phospholipase D1 by phospho-cofilin. *EMBO J.* **26**, 4189-4202 (2007).
249. Frantz, C., Barreiro, G., Domínguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M.J.S., Jacobson, M.P., Barber, D.L.: Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *J. Cell Biol.* **183**, 865-879 (2008).

250. Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Arias, M., Chen, X., DesMarais, V., Van Rheenen, J., Koleske, A.J., Condeelis, J.: Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *J. Cell Biol.* **186**, 571-587 (2009).
251. Bernstein, B.W., Painter, W.B., Chen, H., Minamide, L.S., Abe, H.: Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. *Cell Motil. Cytoskelet.* **47**, 319-336 (2000).
252. Kurita, S., Watanabe, Y., Gunji, E., Ohashi, K., Mizuno, K.: Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase slingshot-1. *J. Biol. Chem.* **283**, 32542-32552 (2008).
253. Shoichiro, O.: Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry.* **42**, 13363-13370 (2003).
254. Moriyama, K., Yahara, I.: Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *J Cell Sci.* **115**, 1591-601 (2002).
255. Aggelou, H., Chadla, P., Nikou, S.: LIMK/cofilin pathway and Slingshot are implicated in human colorectal cancer progression and chemoresistance. *Virchows Arch.* **472**, 727-737 (2018).
256. Sousa-Squiavinato, A.C.M., Vasconcelos, R.I., Gehren, A.S., Fernandes, P.V., de Oliveira, I.M., Boroni, M., Morgado-Díaz, J.A.: Cofilin-1, LIMK1 and SSH1 are differentially expressed in locally advanced colorectal cancer and according to consensus molecular subtypes. *Cancer Cell Int.* **21**, 1-15 (2021).
257. Daryabari, S.S., Fathi, M., Mahdavi, M., Moaddab, J., Ali, M., Feizi, H., Shokoohi, B.: Overexpression of CFL1 in gastric cancer and the effects of its silencing by siRNA with a nanoparticle delivery system in the gastric cancer cell line. *J. Cell Physiol.* **235**, 6660-6672 (2020).
258. Nishimura, Y., Yoshioka, K., Bernard, O., Bereczky, B., Itoh, K.: A role of LIM kinase 1/cofilin pathway in regulating endocytic trafficking of EGF receptor in human breast cancer cells. *Histochem. Cell Biol.* **126**, 627-638 (2006).
259. Chung, H., Kim, B., Jung, S.H., Won, K.J., Jiang, X., Lee, C.K., Lim, S.D., Yang, S.K., Song, K.H., Kim, H.S.: Does phosphorylation of cofilin affect the progression of human bladder cancer? *BMC Cancer.* **13**, 1-12 (2013).
260. Delorme-Walker, V., Seo, J.Y., Gohla, A., Fowler, B., Bohl, B., DerMardirossiana, C.: Chronophin coordinates cell leading edge dynamics by controlling active cofilin levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 5150-5159 (2015).
261. Lee-Hoeflich, S.T., Causing, C.G., Podkowa, M., Zhao, X., Wrana, J.L., Attisano, L.: Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J.* **23**, 4792-4801 (2004).

## BIBLIOGRAFÍA

262. Galganski, L., Urbanek, M.O., Krzyzosiak, W.J.: Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res.* **45**, 10350-10368 (2017).
263. Phair, R.D., Misteli, T.: High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature.* **404**, 604-609 (2000).
264. Marzahn, M.R., Marada, S., Lee, J., Nourse, A., Kenrick, S., Zhao, H., Ben-Nissan, G., Kolaitis, R., Peters, J.L., Pounds, S., Errington, W.J., Privé, G.G., Taylor, J.P., Sharon, M., Schuck, P., Ogden, S.K., Mittag, T.: Higher-order oligomerization promotes localization of SPOP to liquid nuclear speckles. *EMBO J.* **35**, 1254-1275 (2016).
265. Ye, J., Zhao, J., Hoffmann-Rohrer, U., Grummt, I.: Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* **22**, 322-330 (2008).
266. Almonacid, M., Terret, M.É., Verlhac, M.H.: Actin-based spindle positioning: new insights from female gametes. *J. Cell Sci.* **127**, 477-483 (2014).
267. Miyamoto, K., Gurdon, B.: Transcriptional regulation and nuclear reprogramming: roles of nuclear actin and actin-binding proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 3289-3302 (2013).
268. Domingues, C., Geraldo, A.M., Anjo, S.I., Matos, A., Almeida, C., Caramelo, I., Lopes-da-Silva, J.A., Paiva, A., Carvalho, J., Pires das Neves, R., Manadas, B., Grãos, M.: Cofilin-1 is a mechanosensitive regulator of transcription. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1-20 (2020).
269. Latonen, L., Moore, H.M., Bai, B., Jäämaa, S., Laiho, M.: Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene.* **30**, 790-805 (2011).
270. Rockel, T.D., Von Mikecz, A.: Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J. Struct. Biol.* **140**, 189-199 (2002).
271. Steinbrück, L., Pereira, G., Efferth, T.: Effects of artesunate on cytokinesis and G2/M cell cycle progression of tumour cells and budding yeast. *Cancer Genomics and Proteomics.* **7**, 337-346 (2010).
272. Lu, Y.C., Lee, Y.R., Liao, J. Der, Lin, C.Y., Chen, Y.Y., Chen, P.T., Tseng, Y.S.: Reversine induced multinucleated cells, cell apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer cells. *PLoS One.* **11**, 1-14 (2016).
273. Fukuta, K., Kohri, K., Fukuda, H., Watanabe, M., Sugimura, T., Nakagama, H.: Induction of multinucleated cells and apoptosis in the PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000. *Cancer Sci.* **99**, 1055-1062 (2008).

274. Nebl, G., Meuer, S.C., Samstag, Y.: Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J. Biol. Chem.* **271**, 26276-26280 (1996).
275. Sari-Hassoun, M., Clement, M.J., Hamdi, I., Bollot, G., Bauvais, C., Joshi, V., Toma, F., Burgo, A., Cailleret, M., Rosales-Hernández, M.C., Macias-Pérez, M.E., Chabane-Sari, D.: Cucurbitacin I elicits the formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates by stimulation of the RhoA/ROCK pathway and inhibition of LIM-kinase. *Biochem Pharmacol.* **102**, 45-63 (2016).
276. Oku, Y., Tareyanagi, C., Takaya, S., Osaka, S., Ujiiie, H., Yoshida, K., Nishiya, N.: Multimodal effects of small molecule ROCK and LIMK inhibitors on mitosis, and their implication as anti-leukemia agents. *PLoS One.* **9**, 92402-92420 (2014).
277. Mardilovich, K., Baugh, M., Crighton, D., Kowalczyk, D., Gabrielsen, M., Munro, J., Croft, D.R., Lourenco, F., James, D., Kalna, G., McGarry, L., Rath, O., Shanks, E., Garnett, M.J., McDermott, U., Brookfield, J., Charles, M., Hammonds, T.: LIM kinase inhibitors disrupt mitotic microtubule organization and impair tumor cell proliferation. *Oncotarget.* **6**, 38469-38486 (2015).
278. Huang, F., Wang, P., Wang, X.: Thapsigargin induces apoptosis of prostate cancer through cofilin-1 and paxillin. *Oncol. Lett.* **16**, 1975-1980 (2018).
279. Sun, M.Y., Wang, D.D., Sun, J., Zhao, X.H., Cai, S., Wu, Q.X., Jie, T., Ni, Z.H., Sun, J.Y., Tang, Q.F.: The Zuo Jin Wan formula increases chemosensitivity of human primary gastric cancer cells by AKT mediated mitochondrial translocation of cofilin-1. *Chin. J. Nat. Med.* **17**, 198-208 (2019).
280. Yoshizawa, M., Nakamura, S., Sugiyama, Y., Tamai, S., Ishida, Y., Sueyoshi, M., Toda, Y., Hosogi, S., Yano, Y.: 6-Hydroxythiobinupharidine inhibits migration of LM8 osteosarcoma cells by decreasing expression of LIM Domain Kinase 1. *Anticancer Res.* **39**, 6507-6513 (2019).



**ANEXO**







OPEN

# Cleavage and activation of LIM kinase 1 as a novel mechanism for calpain 2-mediated regulation of nuclear dynamics

L. Rodríguez-Fernández<sup>1,4</sup>, S. Company<sup>1,4</sup>, R. Zaragoza<sup>2,3</sup>, J. R. Viña<sup>1,2</sup> & E. R. García-Trevijano<sup>1,2</sup>✉

Calpain-2 (CAPN2) is a processing enzyme ubiquitously expressed in mammalian tissues whose pleiotropic functions depend on the role played by its cleaved-products. Nuclear interaction networks, crucial for a number of molecular processes, could be modified by CAPN2 activity. However, CAPN2 functions in cell nucleus are poorly understood. To unveil CAPN2 functions in this compartment, the result of CAPN2-mediated interactions in cell nuclei was studied in breast cancer cell (BCC) lines. CAPN2 abundance was found to be determinant for its nucleolar localization during interphase. Those CAPN2-dependent components of nucleolar proteome, including the actin-severing protein cofilin-1 (CFL1), were identified by proteomic approaches. CAPN2 binding, cleavage and activation of LIM Kinase-1 (LIMK1), followed by CFL1 phosphorylation was studied. Upon CAPN2-depletion, full-length LIMK1 levels increased and CFL1/LIMK1 binding was inhibited. In addition, LIMK1 accumulated at the cell periphery and perinucleolar region and, the mitosis-specific increase of CFL1 phosphorylation and localization was altered, leading to aberrant mitosis and cell multinucleation. These findings uncover a mechanism for the role of CAPN2 during mitosis, unveil the critical role of CAPN2 in the interactions among nuclear components and, identifying LIMK1 as a new CAPN2-target, provide a novel mechanism for LIMK1 activation. CFL1 is crucial for cytoskeleton remodeling and mitosis, but also for the maintenance of nuclear structure, the movement of chromosomes and the modulation of transcription frequently altered in cancer cells. Consequently, the role of CAPN2 in the nuclear compartment might be extended to other actin-associated biological and pathological processes.

Calpain-2 (CAPN2) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent cysteine protease ubiquitously expressed in mammalian tissues<sup>1</sup>. In contrast to other proteases, the result of CAPN2 enzymatic activity is not substrate degradation, but a cleaved-substrate with different functions, distribution, interacting proteins or ways of regulation<sup>2,3</sup>. Accordingly, the plethora of physiological or pathological functions described for CAPN2 are related to the role played by its end-products<sup>2,4-10</sup>. From that point of view, CAPN2 could be considered as a regulatory node for different signaling pathways. Therefore, CAPN2-targets should be identified in order to determine CAPN2 functions in a particular cellular context. This is not an easy task taking into account the following considerations: (i) CAPN2 proteolyzes in vitro a large number of substrates that are not necessarily cleaved in vivo<sup>3,11</sup>; (ii) CAPN2-mediated cleavage of substrates is not dependent on their primary structure or post-translational modification<sup>11</sup>; and, (iii) CAPN2 expression and factors related to the modulation of its enzymatic activity<sup>2,3,12</sup> will play an undoubting role, but do not provide information on the context-dependent functions of CAPN2.

Current models to explain the multiple functions of CAPN2 point to its subcellular distribution. Indeed, the localization of CAPN2 in a cellular compartment according to the type of biological process, would limit its access to specific substrates<sup>5,7-10,13,14</sup>. Following this rationale, the challenge to establish CAPN2 functions would be the identification of isoform-specific substrates of CAPN2 in a given subcellular compartment.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Avda. Blasco Ibañez, 15, 46010 Valencia, Spain. <sup>2</sup>Fundación Investigación Hospital Clínico-INCLIVA, Valencia, Spain. <sup>3</sup>Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, Spain. <sup>4</sup>These authors contributed equally: L. Rodríguez-Fernández and S. Company. ✉email: elena.ruiz@uv.es

The role of CAPNs at cell membranes or in the cytosolic compartment has been largely studied in different cell types to explain cell migration, cell adhesion or cell death<sup>4–8,10</sup>. However, CAPN2 functions in the nuclear compartment have not been completely elucidated. Several studies have shown that in proliferating cells, CAPN2 is mainly localized in the nucleus<sup>14–16</sup>, while in differentiated quiescent cells CAPN2 is restricted to the cytosol<sup>15</sup>. Moreover, nuclear localization of CAPN2 has been associated to high expression levels and active mitosis in embryonic stem cells as well as in 8-cell embryos<sup>14</sup>. In this sense, chromosome misalignment and aberrant mitosis has been reported in CAPN2-depleted HeLa cells<sup>17,18</sup>. Although these data indicate that CAPN2 is most probably involved in the modulation of cell cycle or mitosis, CAPN2-targets and mechanisms underlying these effects remain elusive. Our group previously showed that CAPN2 is localized in the nucleolus of colorectal cancer cells participating in rRNA biogenesis under growth-adverse conditions<sup>13</sup>; however, those CAPN2-targets responsible for this or other effects were not identified. This is an important issue, since components of a particular subnuclear structure can be eventually sorted to other substructures where they are modified, retained and/or released depending on the stage of cell cycle or type of stimulus<sup>19,20</sup>.

The dynamic changes in the interaction among nuclear components are crucial for gene expression, cell proliferation, DNA repair or cell death<sup>19</sup>. Post-translational modifications change the localization and interactions networks. Presumably, proteins processed by CAPN2 would change the nuclear interaction networks. In this study we sought to identify the CAPN2-mediated components of these interactions in the cell nuclei of proliferating cells.

## Results and discussion

**Subnuclear distribution of CAPN2 in proliferating breast cancer cell lines.** High levels of CAPN2 have been associated to CAPN2 nuclear localization in proliferating cells<sup>14</sup>. We previously described that luminal cells (MCF-7 and BT-474) express lower levels of CAPN2 than triple negative breast cancer cells (MDA-MB-231 and MDA-MB-468)<sup>8</sup>. Nuclear distribution of CAPN2 was studied in asynchronous cultured cells by immunofluorescence staining and immunoblotting. Different cell lines were selected according to their CAPN2 levels<sup>8</sup>.

In agreement with our previous reports in colorectal cancer cells<sup>13</sup>, CAPN2 staining was detected in the nucleoplasm of all cell lines studied (Fig. 1A). However, nuclear CAPN2 levels were higher in triple negative (TNBC) cells, those with the highest metastatic potential. Immunoblots of cytosolic and nuclear fractions also showed that, in addition to the cytosol, CAPN2 was strongly accumulated in the nuclear compartment of TNBC cells (Fig. 1B). These data are consistent with a preferential localization of CAPN2 in nuclei of undifferentiated cells<sup>14–16</sup>.

Colocalization of CAPN2 and the nucleolar marker fibrillarin demonstrated its strong accumulation in nuclei of all cell lines (Fig. 1A). Subnuclear distribution of CAPN2 was also analyzed in nucleolar (No) and nucleolar-less fractions (No-Less, containing whole cell extracts except nucleoli) by western blot (Fig. 1C). CAPN2 was detected in nucleolar fractions from all cell lines. However, the nucleolar/nucleolar-less (No/No-less) ratio of CAPN2 was dramatically higher in TNBC than in luminal cell lines.

CAPN1 is the other isoform ubiquitously expressed in mammalian tissues<sup>1</sup>. To confirm the isoform-specific distribution of CAPN2 in breast cancer cells (BCCs), the subnuclear distribution of CAPN1 was also analyzed by confocal microscopy (Fig. 1D). CAPN1 was spread throughout the nucleoplasm of BCCs without any obvious enhancement of a particular region. Luminal cells showed higher levels of nuclear CAPN1 than TNBC cells. The analysis of CAPN1 in subcellular fractions by western blot showed the same results (Supplementary Fig. S1). Finally, double staining with CAPN1 and CAPN2 antibodies showed a limited colocalization of both isoforms in nuclei of MDA-MB-231 cells. CAPN2, but not CAPN1, was strongly accumulated in nucleoli and perinucleolar region of MDA-MB-231 cells (Fig. 1E).

Thus, it can be concluded that nuclear abundance of CAPN2 seems to be dependent on its overall expression levels according to the breast cancer subtype. In addition, both CAPNs show a differential subnuclear distribution in BCCs suggesting an isoform-specific role for nuclear CAPN2.

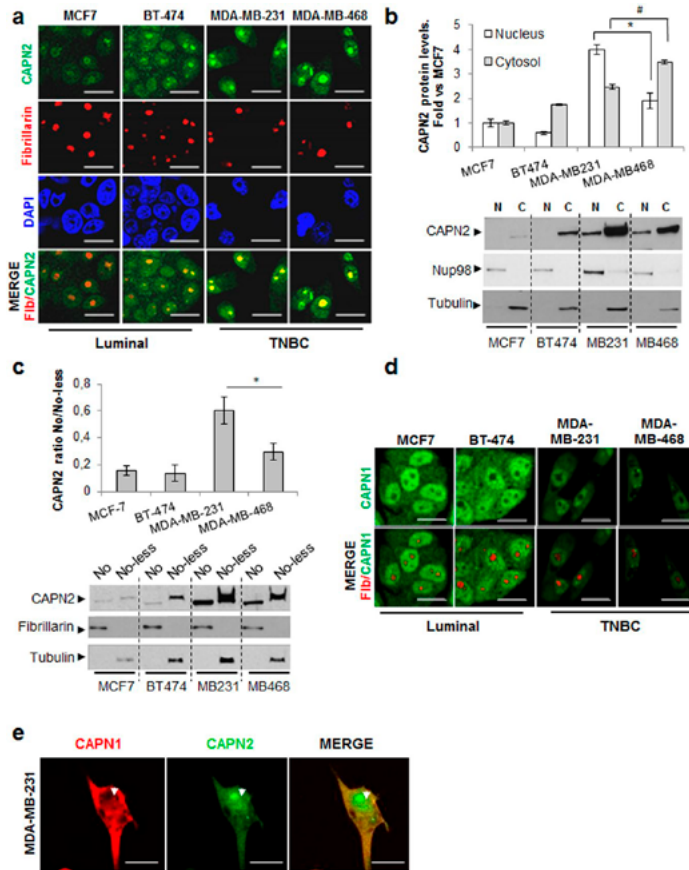
The composition of the nucleolus and perinucleolar region is subjected to dynamic changes throughout the cell cycle<sup>19,20</sup>. Proteins are sequestered in the nucleolus to control its activity in the nucleoplasm or the activity and stability of downstream targets under different types of stimuli<sup>21,22</sup>. We could speculate that CAPN2 would be retained in a particular subnuclear localization depending on its abundance.

**Relationship between abundance and nucleolar localization of CAPN2.** To explore whether abundance of nuclear CAPN2 is the key determinant for its nucleolar accumulation, CAPN2 was either, ectopically overexpressed or downregulated in MCF-7 and MDA-MB-231, respectively (Supplementary Fig. S2).

Epitope-tagged CAPN2 (DYK-CAPN2) was immunolocalized in both, the cytosolic and nuclear compartment of MCF-7 cells (a cell line with almost undetectable levels of endogenous nuclear CAPN2) (Fig. 2A). However, in order to analyze the subnuclear localization of ectopically over-expressed CAPN2, the high intensity of fluorescence signal was reduced. Thus, Flag-tagged CAPN2 was barely distinguished in the cytosol (arrowhead, Fig. 2A) and strongly detected in nuclei, where the protease was more concentrated.

As shown in Z-stack images and western blot with anti-DYK antibodies (Fig. 2A,B), ectopic DYK-CAPN2 accumulated into the nucleolus of transiently transfected cells, further confirming the specificity of CAPN2 nucleolar localization.

On the other hand, CAPN2 silencing in MDA-MB-231 cells (the cell line with the highest nuclear CAPN2 levels) strongly decreased the accumulation of CAPN2 in the whole cell (Fig. 2C,D). Although overall CAPN2 levels were efficiently down-regulated (70% decrease Supplementary Fig. S2) by siCAPN2, a 30% fraction of CAPN2 was still expressed. Accordingly, traces of nucleolar CAPN2 were detected in the nucleolus of CAPN2-silenced cells (Fig. 2C, arrow). Most likely nucleolar proteins concentrated in such a reduced area are more

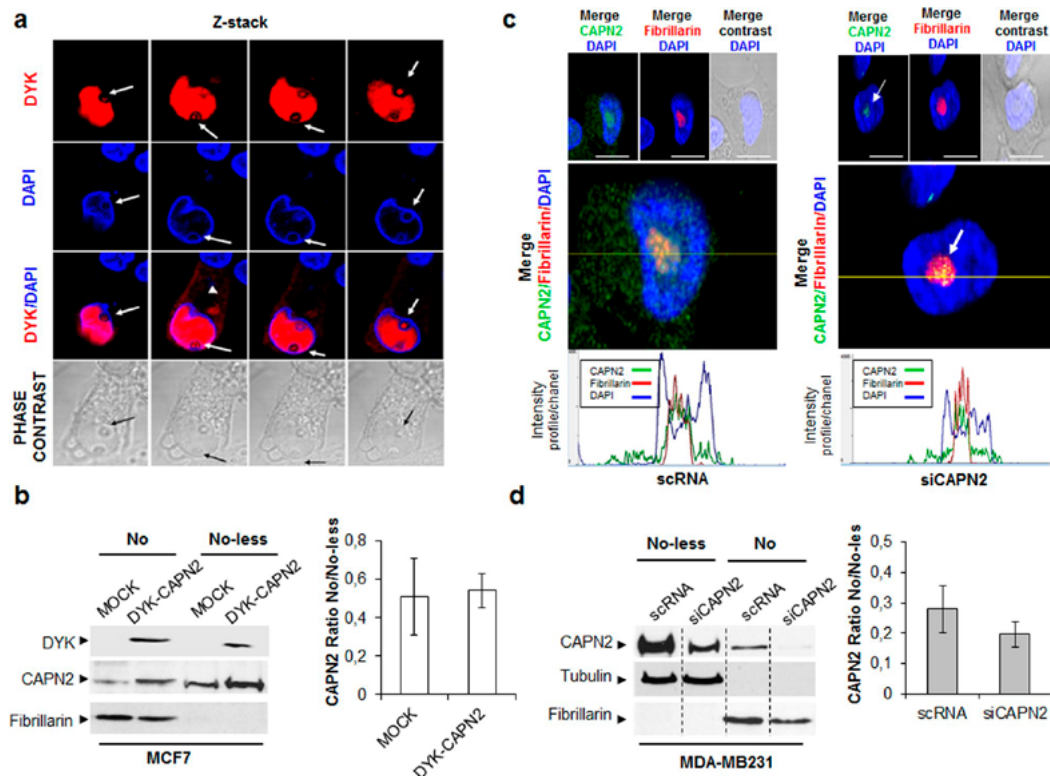


**Figure 1.** Subnuclear distribution of CAPN2 in breast cancer cell lines. **(a)** Confocal images of CAPN2 (green), fibrillarlin (red), DAPI (blue) and merge in BCC lines. Scale bars 25  $\mu$ m. **(b)** Subcellular distribution of CAPN2 analyzed by western blot in cytosolic (C) and nuclear (N) fractions. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified, normalized with Nup98 (N) or tubulin (C) and plotted as mean fold  $\pm$  SEM vs. MCF-7 cells. \* $p \leq 0.01$  nuclear and # $p \leq 0.01$  cytosolic fractions. **(c)** Subcellular distribution of CAPN2 in nucleolar (No) and Nucleolar-less (No-less) fractions analyzed by western blot. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified, normalized with fibrillarlin (No) or tubulin (No-less) and plotted as mean No/No-less ratio vs. MCF7 cells, \* $p \leq 0.01$ . **(d)** Immunofluorescence staining of CAPN1 (green) and fibrillarlin (red) in BCC lines. Scale bars 25  $\mu$ m. **(e)** Colocalization of CAPN1 (red) and CAPN2 (green) by staining with anti-mouse CAPN1 and anti-rabbit CAPN2 antibodies in MDA-MB-231 cells. Scale bars 15  $\mu$ m. Juxtaposed images from different lanes in the same blot are separated by dotted lines in **(b, c)**. Full-length blots are shown in Supplementary Fig. S14. Representative images of all cells are shown in **(a, d, e)**.

efficiently detected. Alternatively, as described for other proteins<sup>23,24</sup>, CAPN2 half-life could be higher in the nucleolus than in the rest of the cell.

Whatsoever, the effect of decreasing or increasing relative protein levels can be analyzed. We reasoned that the No/No-less ratio of overexpressed or downregulated CAPN2 would be constant in case the abundance was a key determinant for its nucleolar accumulation. CAPN2 No/No-less ratio was not significantly different when comparing mock and CAPN2-overexpressing MCF-7 cells (Fig. 2B) or scrNA and siCAPN2-transfected MDA-MB-231 cells (Fig. 2D). The higher levels of CAPN2, the higher accumulation into nuclei and nucleoli. On the whole, these data confirm the specificity of CAPN2 subnuclear distribution and, point out to CAPN2 abundance as an important determinant for its nucleolar localization in proliferating cells.

CAPN2 has no recognized nucleolar localization signal (NoLS). However, nucleolar proteins are not known to share a common NoLS. Nucleolar localization motifs are characterized by R/K rich sequences and positively charged residues, overlapping nuclear localization signals (NLS) and disorganized structures<sup>25–27</sup>. A bioinformatics-based analysis of CAPN2 (Supplementary Figs. S3–S6) predicted a non-consensus sequence fulfilling all the above mentioned conditions to be recognized as a NoLS.



**Figure 2.** Specificity and expression-dependent localization of CAPN2 in nucleoli of BCCs. (a) Subnuclear distribution of ectopically expressed DYK-CAPN2 in MCF-7 cells analyzed by fluorescence staining with anti-DYK antibody (red) or DAPI (blue). Z-stack images (left to right) are shown. DYK-CAPN2 detected in nucleoli (arrow) and cytosol (arrowhead) is pointed out. Scale bars 20  $\mu$ m. (b) Subnuclear distribution of DYK-CAPN2 analyzed by western blot in nucleolar (No) and nucleolar-less (No-less) fractions of MCF-7 cells transfected with either MSCV (Mock) or DYK-CAPN2 expression vector. Nucleolar CAPN2 was analyzed with both, anti-DYK and anti-CAPN2 antibodies. Fibrillarin was used to assess the purity of No fractions. The ratio of No/No-less CAPN2 is represented as mean  $\pm$  SEM. No significant differences were found among both groups ( $n = 3$ ). (c) Immunofluorescence analysis of CAPN2 in scRNA/siCAPN2 MDA-MB-231 transfected cells. Merge images of DAPI (blue) and either, CAPN2 (green), fibrillarin (red) or phase contrast are shown. Scale bars 20  $\mu$ m. Representative images of all cells are shown. Magnification and H intensity profiles/channel exhibit the presence of residual CAPN2 (arrow) in nucleoli of CAPN2-silenced cells. (d) Subnuclear distribution of CAPN2 analyzed by western blot in No and No-less fractions of MDA-MB-231 cells transfected either with, scRNA or siCAPN2. Fibrillarin (No) and tubulin (No-less) were used to assess the purity of fractions. Data were quantified and plotted as mean CAPN2 No/No-less ratio  $\pm$  SEM. No significant differences were found ( $n = 6$ ). Juxtaposed images from different lanes in the same blot are separated by dotted lines in (d). Full-length blots are shown in Supplementary Fig. S14.

Nevertheless, it seems that additional factors are needed to target proteins to the nucleolus. NoLS, rather than a nucleolar-recruiting signal, is thought to mediate the interaction of nucleolar proteins, rDNA or rRNA with those non-nucleolar proteins to be imported or retained into the nucleolus<sup>28</sup>. In that sense, we have previously described that CAPN2 binds to the core promoter of rDNA in colorectal cancer cells<sup>13</sup>. In addition to rDNA, CAPN2 might interact with nucleolar proteins, as also predicted in our bioinformatics analysis (Supplementary Fig. S7). Similarly, CAPN3 translocates to nucleoli by interaction with the nucleolar protein Def<sup>29</sup>. It seems that the membrane-less structure of nucleoli might also contribute to the internalization/retention of proteins.

The absence of membrane enables nucleoli to rapidly assemble or dissolve in response to growing stimuli. At metaphase, as the nucleolus disassembles many nucleolar proteins associate with other molecules in the nucleoplasm<sup>20</sup>. It is tempting to speculate that the high concentration of CAPN2 in nuclei of TNBC cells might favour its specific interaction with nucleolar proteins or rDNA. It seems reasonable to think that nucleoli assembly at the end of mitosis might retain higher amount of CAPN2 in CAPN2-overexpressing BCCs. Whether the nucleolar localization of CAPN2 involves its interaction with additional proteins remains to be explored. In the

future, the identification of CAPN2 interacting proteins in nucleoli would be an important issue to completely unveil the molecular determinants of CAPN2 nucleolar localization.

**Identification of the CAPN2-dependent components of nucleoli.** Accumulation of CAPN2 into the nucleolus could be crucial for the function/regulation of nuclear proteins. Nucleolar extracts from scRNA and siCAPN2 MDA-MB-231 transfected-cells were analyzed by 2D-DIGE. Nucleoli are membrane-less structures, continuously subjected to assembly/disassembly during cell cycle<sup>30</sup>. Therefore, nucleolar extracts from asynchronous cells are expected to include proteins from nucleoli and perinucleolar region.

A total of 11 differentially represented spots were excised from 2D-DIGE gels and identified by LC-MS/MS (Supplementary Table S1). The actin-severing protein cofilin-1 (CFL1) was found among the upregulated proteins in the nucleolus of CAPN2-depleted cells (Fig. 3A). CFL1 is required for actin cytoskeleton reorganization, and for a number of physiological and tumorigenic processes<sup>30,31</sup>.

Focusing on this CAPN2-target, CFL1 protein levels were analyzed in BCC cell lines. As shown in Fig. 3B, luminal cells have higher levels of CFL1 than TNBC cells. The opposite has been reported for CAPN2<sup>8</sup>. In agreement with this, low CFL1 levels detected in TNBC cells could be the result of CAPN2-mediated cleavage of CFL1. Strikingly, truncated CFL1 or differences in total CFL1 levels were not observed upon CAPN2 silencing in MDA-MB-231 cells (Fig. 3C).

Other nucleolar proteins either upregulated or downregulated in CAPN2-knocked-down cells were also analyzed, but no significant differences were found (Supplementary Fig. S8). Hence, the CAPN2-dependent composition of nucleoli and perinucleolar region does not seem to result from the proteolytic activity of CAPN2 on identified proteins, but rather on the subcellular distribution of nuclear components.

CAPN2-mediated distribution of CFL1 was studied in CAPN2 knocked-down MDA-MB-231 cells by immunofluorescence staining (Fig. 3D). CFL1 was distributed throughout the cytoplasm and nucleoplasm of scRNA control cells. Fluorescence intensity analysis revealed a stronger accumulation of CFL1 in the region extending from the cell membrane to ~1–2 μm into the cell surrounding a large region of low staining (zoom image asterisk and H profile). Although still detected into the cytoplasm, ~45% of CAPN2-depleted cells showed an important fraction of CFL1 accumulated at interchromatin spaces as nuclear speckles, at the perinucleolar region (arrowhead) and, although almost undetectable, into nucleoli. The effect of CAPN2 expression in nuclear CFL1 levels was confirmed by western blot in subcellular fractions of siCAPN2 cells (Fig. 3E). No change of CFL1 levels could be detected in the cytosolic compartment upon CAPN2 silencing. However, according to the CFL1 distribution in confocal images, a significant increase of nuclear CFL1 levels was observed in siCAPN2 compared to scRNA-transfected cells.

All in all, these data might suggest a role for CAPN2 in the modulation of nuclear rather than total, CFL1 levels.

**Role of CAPN2 in the control of phospho-cofilin-1 levels.** Phosphorylation of CFL1 inhibits its actin-severing activity and promotes changes in its subcellular distribution<sup>30</sup>. Phospho-CFL1 to CFL1 (pCFL1/CFL1) ratio, critical for tumorigenesis<sup>30–32</sup>, was significantly higher in TNBC cells than in luminal cells (Fig. 4A). A positive correlation between CAPN2 protein levels and pCFL1/CFL1 ratio ( $r = 0.8159$ ,  $p = 0.02$ ) was found in the luminal and TNBC cell lines used in this study (Supplementary Fig. S9). Thus, we hypothesized that CAPN2 might be involved in the regulation of CFL1 phosphorylation pathway.

In agreement with this, calpeptin (a specific inhibitor of calpain activity) partially inhibited CFL1 phosphorylation in TNBC cell lines and consequently, the ratio pCFL1/CFL1 was significantly decreased when compared to untreated controls (Fig. 4B).

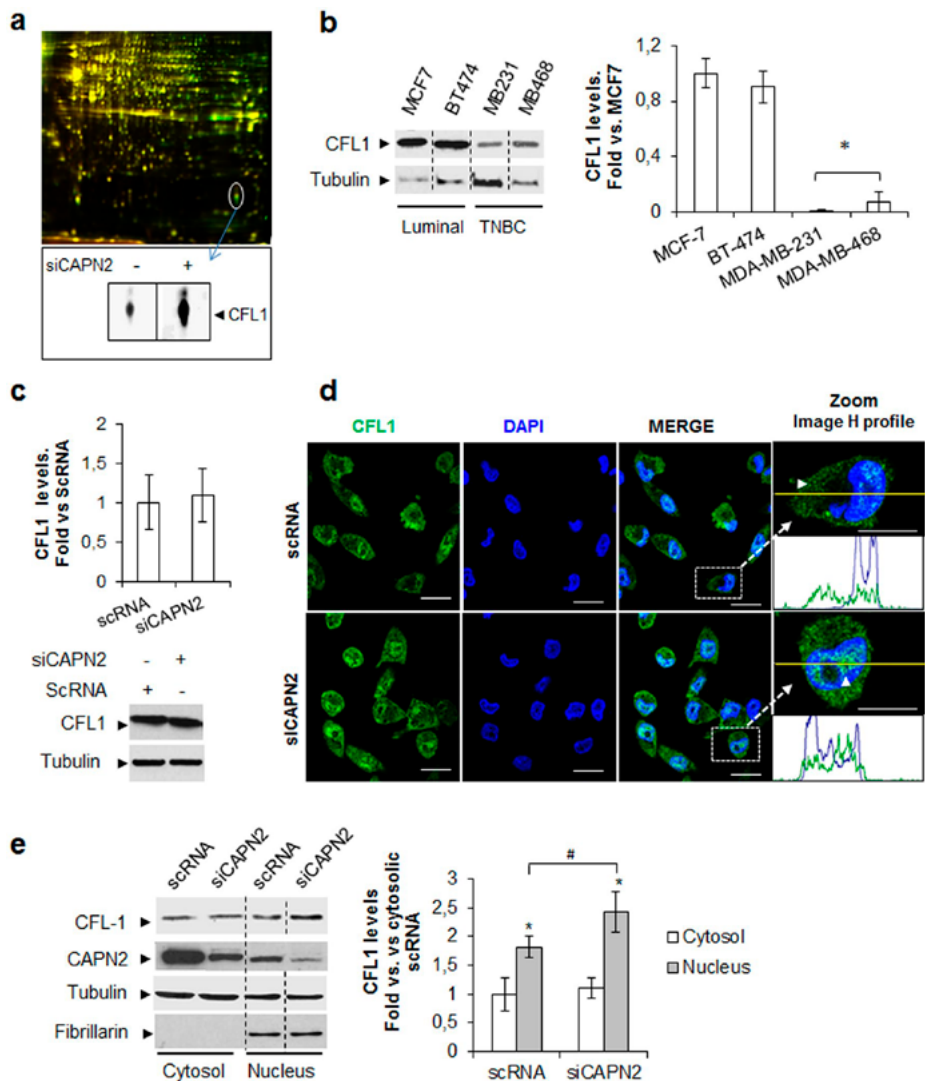
Distribution of pCFL1 was analyzed by confocal microscopy in control and CAPN2-depleted cells (Fig. 4C). As previously reported<sup>33</sup>, pCFL1 was clearly more abundant in the cytosolic compartment than in the cell nucleus. In agreement with results obtained with calpain inhibitor, pCFL1 levels also decreased in most of siCAPN2-transfected cells (~77%) analyzed by immunofluorescence staining (Fig. 4C) and in nucleolar-less fractions analyzed by western blot (Fig. 4D). These data further confirm that CAPN2 is, at least in part, involved in the phosphorylation pathway of CFL1.

Interestingly, although no traces of pCFL1 could be detected in nucleolar fractions, CFL1 levels increased upon CAPN2 silencing. These observations not only validate data obtained in our proteomic analysis, but also lead to hypothesize that CAPN2 might be involved in CFL1 distribution through the modulation of its phosphorylation pathway. Supporting this hypothesis, it has been reported that pCFL1 is mainly localized in the cytosol while its dephosphorylated form adopts a nuclear localization<sup>33–35</sup>. However, although out of the scope of this paper, important questions related to the mechanisms for CFL1 phosphorylation and distribution are yet to be determined.

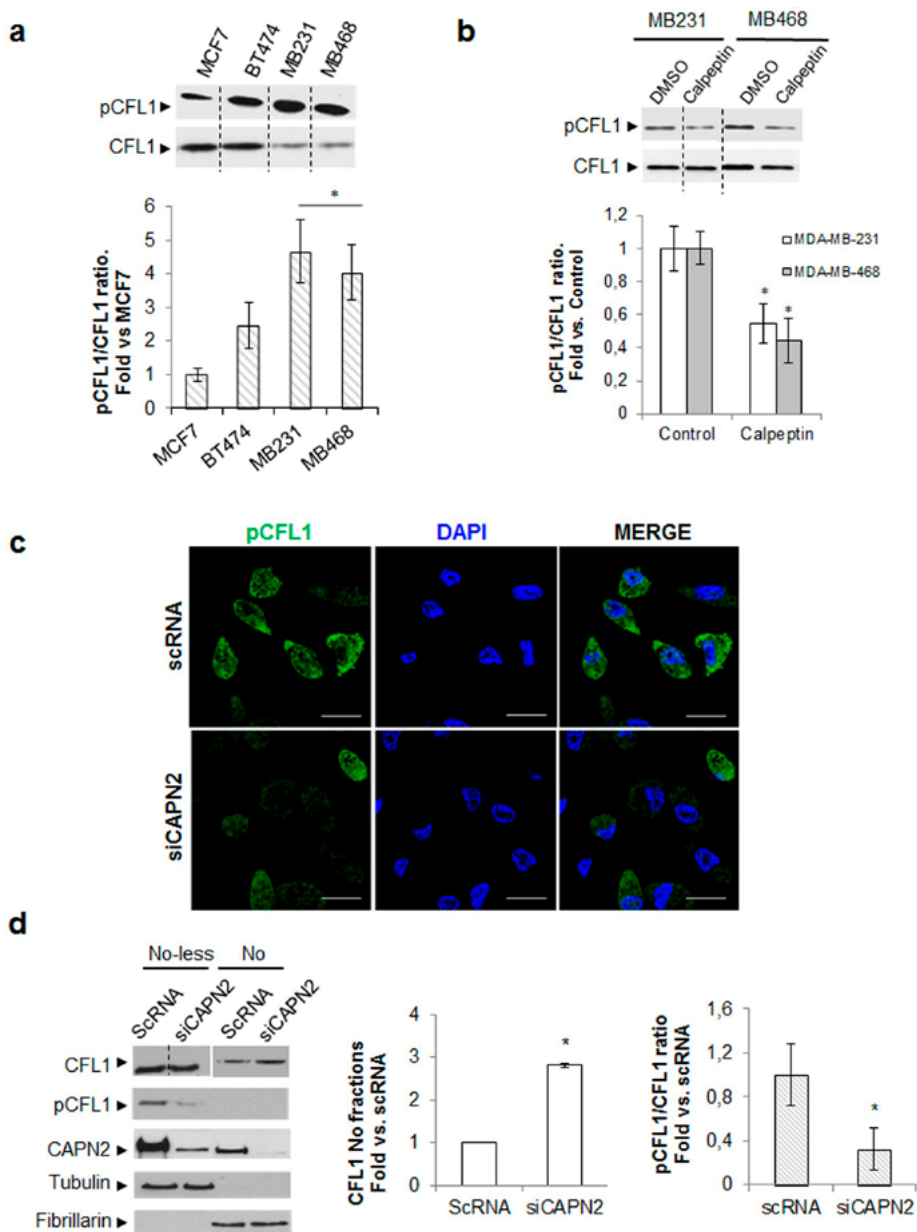
**Analysis of cofilin-1 phosphorylation pathway as indirect target of CAPN2.** CAPN2 could induce CFL1 phosphorylation by the indirect activation of its phosphorylation pathway. Since both, LIMK1 and LIMK2 are known to phosphorylate CFL1, we previously confirmed the prominent role of LIMK1 on CFL1 phosphorylation in MDA-MB-231 cells as reported<sup>36</sup>. A significant reduction in the pCFL1/CFL1 ratio was observed after LIMK1 silencing (Supplementary Fig. S10). We could not detect any CAPN2-dependent effect on slingshot/chronophin (SSH/CIN) phosphatase (data not shown) known to dephosphorylate CFL1<sup>27</sup>.

Over-expression of DYK-CAPN2 in MCF-7 cells induced the phosphorylation of (Thr-508)-LIMK1 (Fig. 5A and Supplementary Fig. S10). Interestingly, ectopic expression of CAPN2 reduced levels of total LIMK1. Accordingly, pLIMK1/LIMK1 ratio was significantly increased in DYK-CAPN2-transfected cells. Conversely, pLIMK1/LIMK1 ratio was reduced upon CAPN2 silencing. (Fig. 5B). Most cells stained with p(Thr-508)-LIMK1 antibody

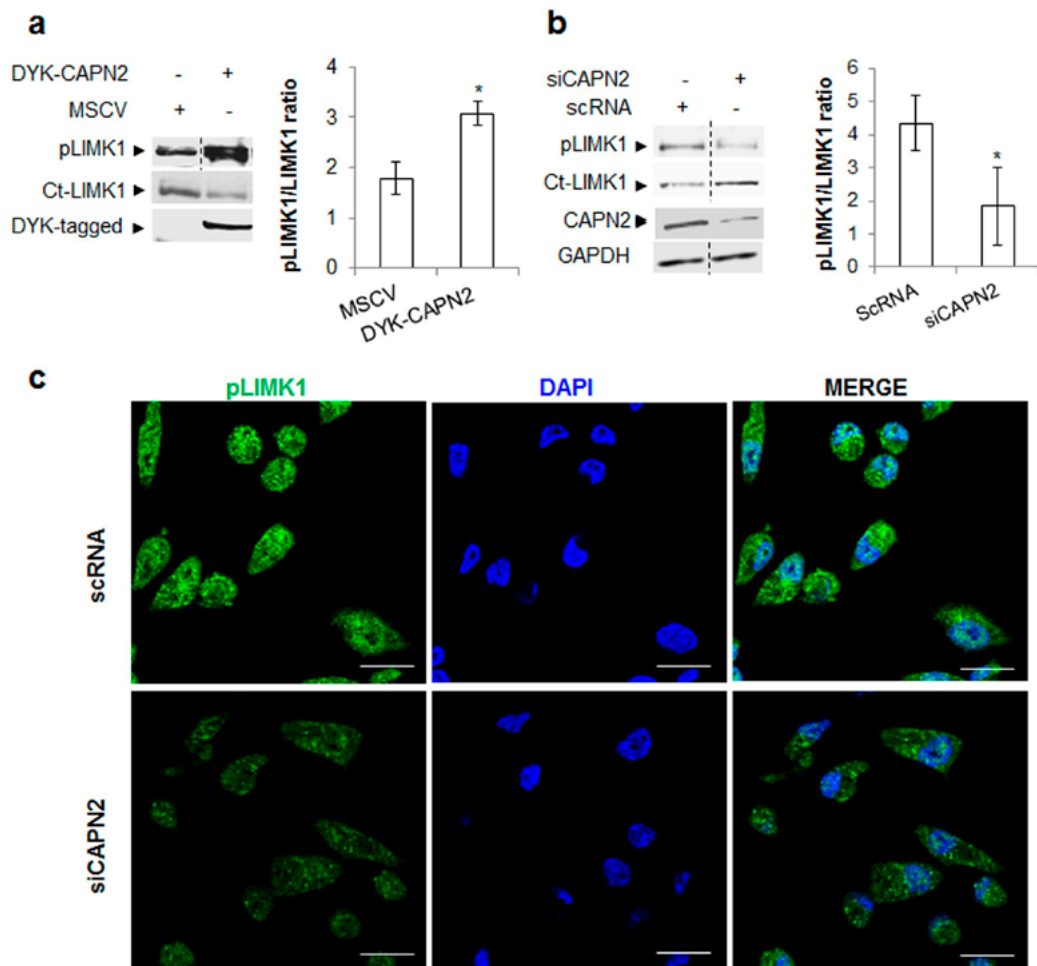




**Figure 3.** Identification of CFL1 as a protein with a CAPN2-dependent subcellular distribution. (a) 2D-DIGE of nuclear extracts from MDA-MB-231 transfected with scRNA and siCAPN2. A representative gel is shown ( $n=4$ ). Inset shows unmerge images of the spot identified as CFL1. (b) Total CFL1 protein levels in BCC lines. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified, normalized with tubulin and represented as mean fold  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.01$  vs. MCF-7 cells. (c) Western blot of total CFL1 levels in scRNA/siCAPN2-transfected MDA-MB231 cells. Data ( $n=6$ ) were quantified, normalized with tubulin and represented as mean fold  $\pm$  SEM vs. scRNA. (d) CFL1 (green) immunostaining and DAPI (blue) in MDA-MB-231 cells transfected with scRNA or siCAPN2. ( $n=6$ ). H intensity profiles/channel are shown. Scale bars 20  $\mu$ m. (e) Subcellular distribution of CFL1 in cytosolic and nuclear fractions. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified, normalized with fibrillarilin (N) or tubulin (C), and plotted as mean fold  $\pm$  SEM vs. scRNA cytosolic fractions. \* $p \leq 0.01$  vs. scRNA cytosolic fractions. # $p \leq 0.05$  vs. scRNA nuclear fractions. Juxtaposed images from different lanes in the same blot are separated by dotted lines in (b, e). Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S14.



**Figure 4.** Effect of CAPN2 expression in Cofilin-1 phosphorylation rate and subnuclear distribution. (a) Immunoblots of pCFL1 and CFL1 in whole extracts from BCC cell lines. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified and represented as the ratio pCFL1/CFL1 mean fold  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.01$  vs. MCF7 cells. (b) Immunoblots of pCFL1 and CFL1 in whole protein extracts from TNBC cells ( $n = 3$ ) cultured for 24 h in the presence of vehicle (DMSO) or 50  $\mu$ M calpeptin. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified and the ratio pCFL1/CFL1 represented as mean fold  $\pm$  SEM vs. DMSO-treated cells. \* $p \leq 0.01$ . (c) Immunofluorescence staining of pCFL1 (green) and DAPI (blue) in MDA-MB-231 cells transfected with scRNA/siCAPN2 ( $n = 6$ ). Scale bars 20  $\mu$ m. (d) Subnuclear distribution of CFL1 and pCFL1 analyzed by western blot in nucleolar (No) and nucleolar-less fractions (No-less) from MDA-MB-231 cells transfected with scRNA/siCAPN2. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified, normalized with fibrillarlin (No) or tubulin (No-less), and plotted as nucleolar CFL1 mean fold  $\pm$  SEM vs. scRNA transfected-cells \* $p \leq 0.01$  or as the ratio pCFL1/CFL1 mean fold  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$  vs. scRNA transfected-cells. Juxtaposed images from different lanes in the same blot are separated by dotted lines in (a, b, d). Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S14.



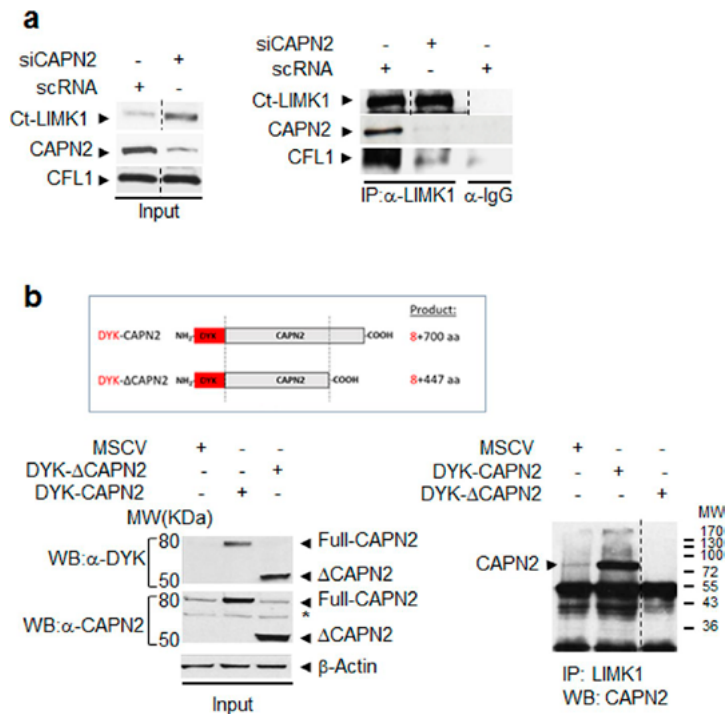
**Figure 5.** CAPN2 promotes phosphorylation of LIMK1 in BCCs. **(a)** p(Thr508)LIMK1 and total Ct-LIMK1 levels analyzed by western blot in MCF-7 cells transfected with MSCV empty vector or DYK-CAPN2. Anti-DYK antibody was used to assess transfection efficiency. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified and plotted as mean pLIMK1/LIMK1 ratio  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$  vs. MSCV. **(b)** p(Thr508)LIMK1 and total Ct-LIMK1 levels in MDA-MB-231 cells transfected with scRNA/siCAPN2. Anti-CAPN2 and anti-GAPDH antibodies were used to assess transfection efficiency and equal loading respectively. Data ( $n \geq 3$ ) were quantified, and plotted as mean pLIMK1/LIMK1 ratio  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$  vs. scRNA transfected-cells. **(c)** p(Thr508)LIMK1 (green) distribution in MDA-MB-231 cells transfected with scRNA/siCAPN2 ( $n = 3$ ) was analyzed by immunofluorescence staining. Nuclei stained with DAPI (blue) and merge images are shown. Scale bars 20  $\mu$ m. Juxtaposed images from different lanes in the same blot are separated by dotted lines in **(a, b)**. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S14.

showed an overall decrease of pLIMK1 levels after CAPN2 depletion (~90%), although no apparent change in a particular pattern of pLIMK1 distribution was detected (Fig. 5C).

In agreement with these data, CAPN2 has been reported to trigger the ROCK-RhoA-mediated phosphorylation of LIMK1 at Thr-508 during cell migration or synaptic plasticity<sup>7</sup>. However, other mechanisms for LIMK1 activation have been suggested<sup>37</sup>. Reported data show similar levels of pCFL1 after ectopic expression of nuclear-LIMK1 or cytosolic-LIMK1 in MDA-MB-231 cells, despite levels of p(Thr-508)-LIMK1 were much lower in the nucleus than in the cytosol<sup>36</sup>.

**Direct interaction of CAPN2 and LIMK1.** Protein binding to LIM domains is known to induce a LIMK1 conformational change and unmask the kinase domain which can be subsequently phosphorylated and activated<sup>37</sup>. CAPN2/LIMK1 direct binding was analyzed by coimmunoprecipitation followed by western blot in





**Figure 6.** Direct interaction of CAPN2 and LIMK1 in MDA-MB-231 cells. (a) Coimmunoprecipitation of LIMK1 and CAPN2 in protein extracts from MDA-MB-231 cells transfected with scRNA/siCAPN2. Whole extracts were immunoprecipitated with anti-Ct-LIMK1 and analyzed by western blot with anti-CAPN2 and anti-CFL1 antibodies. Inputs are shown. (b) Full-length DYK-CAPN2 or DYK-ΔCAPN2 was overexpressed in MCF-7 cells (graphical representation is shown). Protein extracts were immunoprecipitated with anti-Ct-LIMK1 and analyzed by western blot with anti-CAPN2 antibody. Uncropped image is shown. Inputs were analyzed with DYK, CAPN2 or β-actin antibodies (left panel). (\*) Unspecific bands recognized by CAPN2 antibody. Juxtaposed images from different lanes in the same blot are separated by dotted lines. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S14.

total extracts of MDA-MB-231 cells transfected with either, scRNA or siCAPN2. CAPN2/LIMK1 coimmunoprecipitation was observed in control but not in CAPN2 knocked-down samples (Fig. 6A). Down-regulation of CAPN2 also prevented LIMK1 binding to its substrate CFL1, suggesting that CAPN2/LIMK1 interaction is a major determinant for LIMK1 activity on CFL1.

In addition to LIM domains, LIMK1 contains a PDZ domain known to be a protein–protein interaction module<sup>37</sup>. A type I PDZ binding domain has been recently identified at the C-terminus of CAPN2 (Supplementary Fig. S11)<sup>38</sup>. To assess the role of the C-terminus of CAPN2 in this interaction, MCF-7 cells were transfected with a DYK-tagged expression vector coding for either, full length or truncated CAPN2 (ΔCAPN2) which retains the catalytic domains but lacks its C-terminal portion (Fig. 6B). Since the PDZ domain of CAPN2 was at its C-terminus, an N-terminal epitope-tagged expression vector was selected.

LIMK1 coimmunoprecipitated with full-length DYK-CAPN2, but failed to coimmunoprecipitate with DYK-ΔCAPN2 (Fig. 6B). It could be argued that since C-terminally ΔCAPN2 lacks the PEF domain it will not dimerize with the CAPNS1 regulatory subunit and consequently, ΔCAPN2 could be unstable or even mislocalized relative to full length CAPN2. Truncated CAPN2 was over-expressed for 48 h in our experiments, time enough to compromise the levels of an unstable protein. Nevertheless, our analysis by western blot showed even higher ΔCAPN2 protein levels than epitope-tagged full-length CAPN2 (Fig. 6B, inputs) and no signs of protein degradation. In addition, subcellular localization of ΔCAPN2 was analyzed by western blot and confocal microscopy in MCF-7 cells (Supplementary Fig. S12). Truncated CAPN2 exhibits the same localization in nuclei and nucleoli as full-length CAPN2. Therefore, mislocalization or instability of ΔCAPN2 was not preventing the interaction between LIMK1 and ΔCAPN2 in our experiments.

These data not only demonstrate the specificity of CAPN2/LIMK1 interaction, but also support the direct interaction of LIMK1 with the C-terminal domain of CAPN2.

**LIMK1 as a target of CAPN2 cleavage-activity.** Cleavage of N-terminal autoinhibitory domain of LIMK1 has been described as another mechanism for LIMK1 activation<sup>37</sup>. LIMK1 has several predicted sites for CAPN2 cleavage (Supplementary Fig. S11). The identification of LIMK1 as a CAPN2-substrate was analyzed in a cell-free assay with recombinant CAPN2 (rCAPN2) followed by western blot (Fig. 7A). Full-length LIMK1 was proteolyzed in a dose-dependent manner by rCAPN2 in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Truncated fragments of LIMK1 strongly increased in the presence of 1U and 5U of recombinant CAPN2 and  $\text{Ca}^{2+}$  when compared to control samples. Moreover, LIMK1 fragments are observed even in the sole presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , most likely resulting from endogenous CAPN2 activity (lane 2, Fig. 7A). As expected, a high non-physiological CAPN2 concentration (10U) produces extensive proteolysis of full length LIMK1. Truncated and surely more unstable forms of LIMK1 are reduced under such CAPN2 concentration. Fragments of other reported calpain-substrates are also reduced when incubated with high concentrations of rCAPN2<sup>39</sup>. Since GAPDH protein levels were not affected, the unspecific proteolysis of LIMK1 by rCAPN2 was discarded.

Interestingly, two major LIMK1 cleavage fragments (~38–50 KD) were detected. Caspase-3-mediated cleavage of LIMK1 also results in ~45–60 KD LIMK1 fragments which retain CFL1 phosphorylation activity<sup>39</sup>. In the presence of calpeptin, full-length LIMK1 was not affected by rCAPN2 and truncated LIMK1 was not detected.

These data show the specificity of CAPN2-mediated cleavage of LIMK1. Conversely, a significant increase of full-length LIMK1 was detected upon CAPN2 down-regulation in MDA-MB-231 cells by western blot (Fig. 7B) and immunofluorescence staining (Fig. 7C). Interestingly, while an overall increase of LIMK1 levels was observed upon CAPN2 depletion, a high percentage of cells (53%) also showed LIMK1 accumulation at the cell periphery (arrowhead).

Unfortunately, truncated LIMK1 could not be detected in these experiments. The antibody against Ct-LIMK1 detected several lower molecular weight proteins when films were overexposed. Most probably, the amount of  $\Delta$ LIMK1 was at the detection limit in total protein extracts making very difficult to distinguish between unspecific or specific recognition by the antibody.

Samples from MSCV and DYK-CAPN2 MCF-7-transfected cells were electroblotted and membranes excised and incubated with Ct-LIMK1 antibody. Since MCF-7 cells express low levels of LIMK1, the lower part of membranes was overexposed to detect  $\Delta$ LIMK1 (Supplementary Fig. S10). At least one band, also detected in MSCV-control cells, seemed to specifically increase upon CAPN2 overexpression. Protein extracts from siLIMK1-transfected cells were analyzed by western blot with the same anti-Ct-LIMK1 antibody. A low molecular weight protein (~43–45 KD) observed in control cells, was not detected in siLIMK1 transfected cells (Supplementary Fig. S10). Conversely, other unspecific bands detected by the antibody were not affected by LIMK1 silencing. These data suggest that most likely the increased bands recognized by the antibody in DYK-CAPN2 samples could be indeed  $\Delta$ LIMK1. Interestingly, when analyzing a more restrictive fraction of LIMK1, such as p(T508) LIMK1, the same ~43–45 KD band was detected.

Although it is still possible that other kinases from the ROCK/RhoA pathway have a synergistic role in LIMK1 activation<sup>40</sup>, these data suggest a CAPN2-mediated cleavage of LIMK1 as a novel mechanism for LIMK1 activation. In addition, it could be speculated that CAPN2-mediated cleavage of LIMK1 could be part of its activation mechanism or alternatively, it could also be involved in the subcellular distribution of LIMK1. However, this hypothesis should be further confirmed.

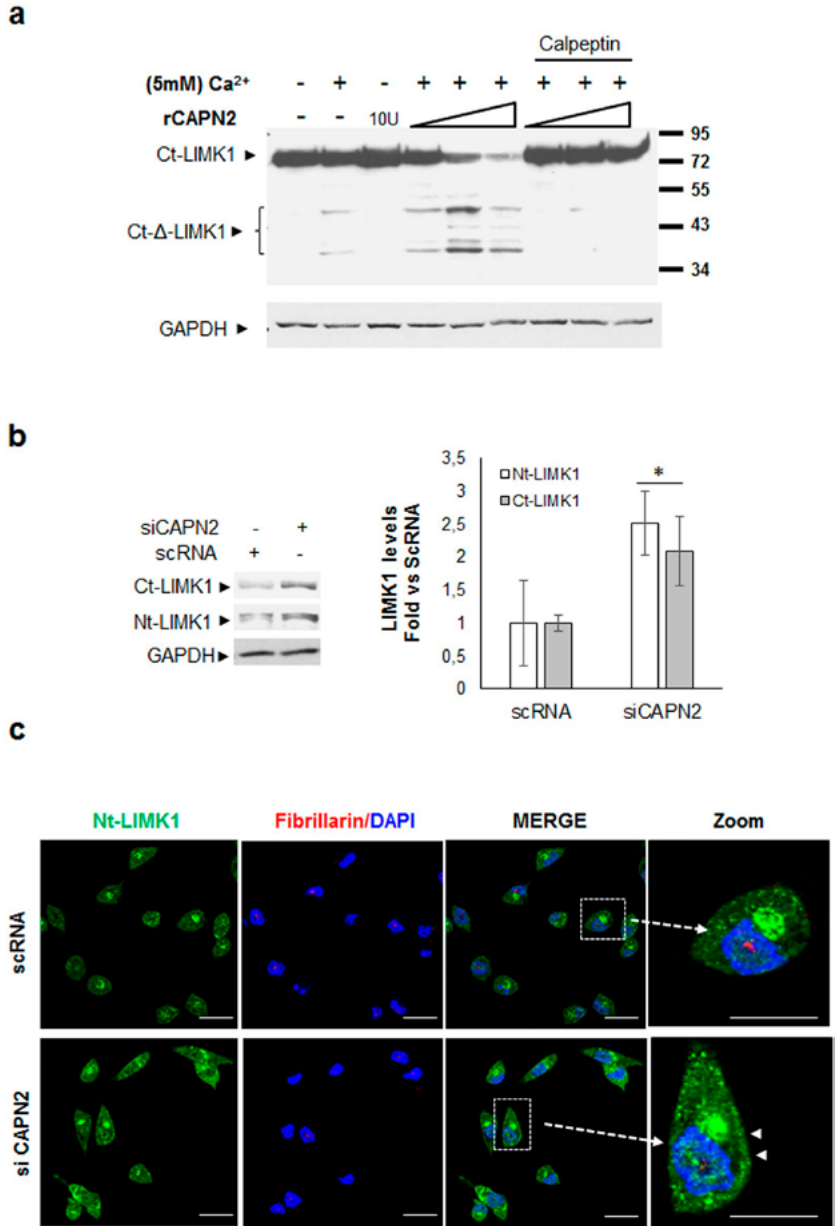
LIMK1 is known to be localized in nuclear speckles ([www.proteinatlas.org/ENSG00000106683-LIMK1/cell#human](http://www.proteinatlas.org/ENSG00000106683-LIMK1/cell#human)). Most proteins from nuclear speckles can also be found at other nuclear locations, although their specific functions, post-translational modifications and interacting partners need to be elucidated<sup>41</sup>. Proteins from nuclear speckles and nucleoli continuously dissociate from and associate to their respective sub-compartments and the rate of these movements has been shown to be dependent on the transcription activity and the phase of the cell cycle. It has been suggested that nuclear proteins might roam the nucleus in search of specific binding partners<sup>42</sup>. This highly dynamic context would help CAPN2/LIMK1 interaction. Cleavage or mutation of low complexity regions in proteins from nuclear speckles is known to alter protein–protein, protein–RNA interactions and localization to nuclear speckles<sup>43</sup>. The differential subcellular distribution of LIMK1 upon CAPN2-silencing might reflect a change in its activity or interaction with its partner CFL1.

**Effect of CAPN2 expression on CFL1 phosphorylation during cell cycle.** Phosphorylation and redistribution of CFL1 during mitosis follows the same pattern as LIMK1 activation at prometaphase<sup>44,45</sup>, but not that of ROCK/RhoA which peaks at telophase<sup>46</sup>. Actually, mitotic activation of LIMK1 has been reported to be driven by other mechanisms than phosphorylation at Thr-508 by the ROCK/RhoA pathway<sup>44</sup>.

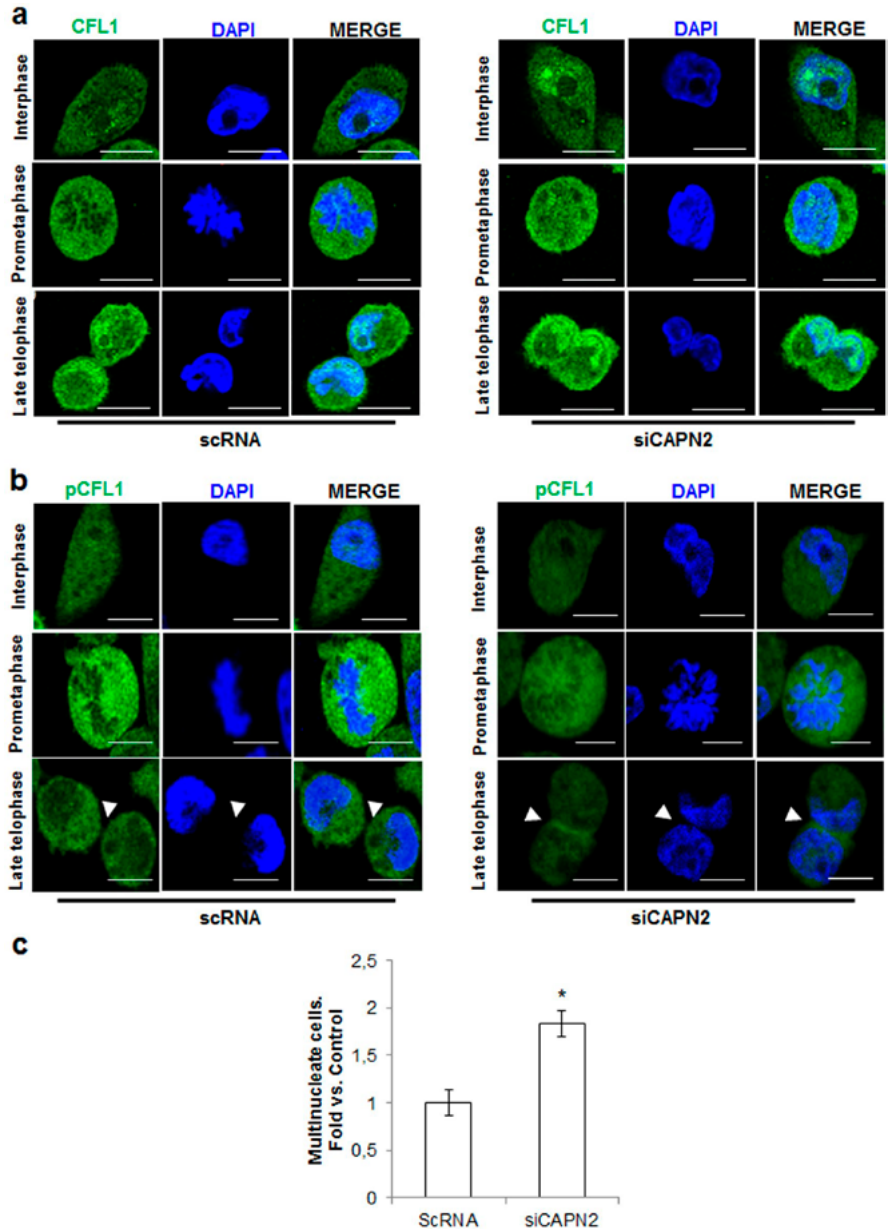
The role of CAPN2 on mitotic activation of LIMK1 and subsequent phosphorylation of its substrate CFL1 was studied during cell cycle in asynchronous cells in a context not disturbed by phase-specific inhibitors. For instance, nocodazol commonly used to block cell cycle at prometaphase, is known to alter spindle positioning<sup>47,48</sup>, an important LIMK1-regulated event<sup>45</sup>. Cells transfected with either, scRNA or siCAPN2 were stained with CFL1 or pCFL1 antibodies and cell cycle progression monitored by DAPI staining and cell morphology.

As previously reported for control cells<sup>44,45</sup>, at prometaphase the pCFL1/CFL1 ratio was strongly increased compared to neighbouring cells and pCFL1 homogeneously distributed surrounding chromosomes (Fig. 8A,B, left panels). At late telophase and interphase, the pCFL1/CFL1 ratio decreased at cell membranes and within the nucleus: dephosphorylated CFL1 accumulated into the nucleus and at the cell membranes, while pCFL1 translocated from the cell periphery into the cytoplasm, (Fig. 8B, left panel arrowhead).

In CAPN2-depleted cells, the pCFL1/CFL1 ratio was dramatically downregulated at any phase when compared to control cells (Fig. 8A,B, right panels). A modest increase of pCFL1 was observed at prometaphase compared to surrounding cells. At late telophase, pCFL1 translocation from the cell periphery to the cytoplasm



**Figure 7.** CAPN2-mediated cleavage of LIMK1. **(a)** In vitro CAPN2-cleavage assay. Protein extracts from MDA-MB-231 cells incubated with increasing concentrations (1, 5 and 10U) of recombinant CAPN2 in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup> and 50 μM calpeptin. Truncated (ΔLIMK1) and full length LIMK1 were analyzed by western blot with Ct-LIMK1 antibody. GAPDH was used to show cleavage specificity. A representative uncropped image is shown. **(b)** Ct-LIMK1 and Nt-LIMK1 levels in MDA-MB-231 cells transfected with scRNA/siCAPN2. LIMK1 protein levels were quantified, normalized with GAPDH and plotted as mean (n ≥ 3) fold ± SEM. \*p ≤ 0.05 vs. scRNA transfected-cells. **(c)** Confocal images of Nt-LIMK1 (green), Fibrillarlin (red) and DAPI (blue) in MDA-MB-231 cells transfected with scRNA/siCAPN2. Magnification shows a merge image of a representative cell. Scale bars 20 μm. Full-length blots are shown in Supplementary Fig. S14.



**Figure 8.** Effect of CAPN2 expression on CFL1 distribution and phosphorylation during cell cycle. Immunofluorescence staining of (a) CFL1 (green) and (b) pCFL1 (green) in asynchronous MDA-MB-231 cells transfected with scRNA/siCAPN2. Scale bars 20  $\mu$ m. Representative images of almost all cells found at prometaphase and late telophase in scRNA or siCAPN2-transfected cells are shown. (c) Quantification of multinucleate cells in MDA-MB-231 transfected with scRNA or siCAPN2 and analyzed by flow cytometry. Values were plotted as mean (n = 4) fold  $\pm$  SEM vs. scRNA transfected-cells \*p  $\leq$  0.0001.

was delayed (Fig. 8B, arrowhead). In addition, dephosphorylated CFL1 was abnormally accumulated into the cell nucleus at late telophase and interphase.

These data suggest that CAPN2 might be involved in the modulation of CFL1 phosphorylation and localization during cell cycle. Altered pattern of CFL1 phosphorylation leads to abnormal centrosome migration, delayed anaphase/telophase, cytokinesis fail and cell multinucleation<sup>44,45,49</sup>. Thus, multinucleation was analyzed in siCAPN2-transfected cells. The number of multinucleate cells after CAPN2-downregulation was two-fold higher than in control cells (Fig. 8C and Supplementary Fig. S13). These data suggest that CAPN2 plays a crucial role during mitosis progression and cytokinesis through the modulation of CFL1 phosphorylation at critical steps of mitosis. In fact, we observed a higher percentage of cells at G2/M in siCAPN2-transfected cells than in siCAPN2 controls ( $11 \pm 0.53\%$  vs.  $7.27 \pm 0.42\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ). In agreement with this, CAPN2 depletion in C2.7 murine myoblast cell line or in HeLa cells resulted in defective chromosome alignment during prometaphase, unbalanced chromosome segregation during anaphase and aberrant mitosis<sup>17,18</sup>. However, in the before mentioned studies no mechanism for the effect of CAPN2 on cell mitosis was provided.

We could speculate that CAPN2 would be retained in the nucleolus of BCCs at interphase modulating rRNA biogenesis as we previously reported in colorectal cancer cells<sup>13</sup>, and released during mitosis to cleave and activate LIMK1 known to be involved in spindle positioning at prometaphase<sup>45</sup>. The same behavior has been observed in other proteins with eventual or typical nucleolar localization such as, Ki-67, nucleophosmin (B23) or fibrillarin<sup>50–52</sup>. These nucleolar proteins are retained in the nucleolus at interphase to modulate rRNA biogenesis and, released later for mitotic congression. Moreover, depletion of B23 or fibrillarin in HeLa cells also results in aberrant mitosis and abnormal nuclear morphology or cell multinucleation in asynchronous interphase cells<sup>51,52</sup>.

It has been recently shown that spindle positioning requires not only microtubule polymerization, but also actin polymerization at prometaphase<sup>53</sup>. CAPN2-mediated activation of LIMK1 would increase pCFL1 levels at prometaphase, promoting F-actin polymerization for the correct mitotic congression.

In addition to its function on nucleoskeleton remodeling, nuclear roles for CFL1 include the maintenance of nuclear structure, association with the three RNA polymerases and movement of chromosomes<sup>30,31</sup>. Consequently, our findings suggest a new mechanism for CAPN2 functions in the nuclear compartment involving the time-course of LIMK1 activation and CFL1 phosphorylation during cell cycle.

## Conclusions

The altered interaction between nuclear components leads to nuclear dysfunction and often to cancer development<sup>20</sup>. Our experiments indicate that differential CAPN2 expression according to the breast cancer subtype is an important determinant for its nucleolar localization in tumor cells. We show that the composition and presumably, the interaction of nucleolar proteins found in control cells change upon CAPN2 downregulation. In addition, our data indicate that the modification of these interactions has profound effects in the cell. CAPN2-depletion results in altered mitosis and cell multinucleation. Data presented herein strongly suggest that CAPN2 plays a critical role in LIMK1-mediated phosphorylation of CFL1 which, although more evident during mitosis, also occurs at interphase. We propose a CAPN2-mediated cleavage and activation of LIMK1 as a novel mechanism to induce phosphorylation of CFL1.

In the future, unveiling the dynamics of nucleolar CAPN2 will be important to understand the complex network of nuclear interactions. Nuclear actin dynamics, modulated by pCFL1/CFL1 ratio, are involved in chromatin remodeling, transcription, RNA processing, intranuclear transport, nuclear export, and maintenance of the nuclear architecture<sup>23,24</sup>. Therefore, the role of CAPN2 in the nuclear compartment might be extended to an important number of actin-associated biological and pathological processes that need to be further investigated. Finally, high expression of CAPN2 and aberrant activation of the LIMK1/CFL1 axis found in breast cancer have been positively correlated with cancer development and metastasis<sup>6,8,30,33</sup>. A number of inhibitors of LIMK1/CFL1 expression and/or activation have been explored for their possible use in anticancer therapies<sup>30,35</sup>. CAPN2 might be an important target with therapeutic potential for the design of inhibitors of the LIMK1/CFL1 signaling pathway in breast cancer.

## Methods

**Materials.** Primary and secondary antibodies used in western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence staining are provided in Supplementary Table S2. Recombinant CAPN2 (208718) and calpain inhibitor Calpeptin (03-34-0051), were from Calbiochem.

**Cell culture.** Human breast cancer cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) including certificate of analysis and mutation sequencing data. Cell lines from either luminal, basal, or claudin-low subtypes were used in this study as representative models of breast cancer cells with different CAPN2 abundance<sup>8</sup>. Selected luminal cell lines include: MCF-7 (ATCC HTB-22) and BT-474 (ATCC HTB-20), and triple-negative cell lines were MDA-MB-468 (ATCC HT-132) and MDA-MB-231 (ATCC HT-26). Cells were cultured in DMEM Medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (K952, Amresco) and L-glutamine (G7513, Sigma) under standard conditions. Only low-passage cell lines were used for the studies. For experiments cells were plated at a density of  $12\text{--}13.10^4/\text{cm}^2$  (MCF-7),  $14\text{--}16.10^4/\text{cm}^2$  (BT474) and  $16\text{--}18.10^3/\text{cm}^2$  (MDA-MB-231 and MDA-MB-468) and maintained in asynchronous culture under standard conditions for 48 h.

**CAPN2 overexpression.** Expression plasmids coding for DYK-tagged full-length CAPN2 and DYK-tagged-ΔCAPN2 (1–447) were commercially available from GenScrip. The cDNA of full length CAPN2

(0Hu23853C) and truncated CAPN2 ( $\Delta$ CAPN2) (0Hu56639C) were cloned on pcDNA3.1(+)-N-DYK construct. DYKDDDDK-epitope was tagged to the N-terminus of both, full-length and truncated CAPN2.

MCF-7 cells were cultured under standard conditions until preconfluence (48 h after seeding). Pre-confluent MCF-7 cells were transfected using Lipofectamine 3000 (L3000008, Life Technologies) following manufacturer's instructions. Transfection reagents were diluted in Opti-MEM (31985070, Gibco). CAPN2 and  $\Delta$ CAPN2 transfection efficiency was analyzed by western blot at 48 h after transfection.

**CAPN2 and LIMK1 knockdown by esiRNA.** Cells were transiently transfected either with CAPN2 (EHU025391-50UG), LIMK1 (EHU073301) or Universal Negative Control #1 siRNA (SIC001), all purchased from Sigma. MDA-MD-231 cells were transfected following forward-transfection protocol and Lipofectamine 3000 as Transfection reagent. Transfection reactions were carried out for 24 h. Dilutions of esiRNA and Lipofectamine were performed in Opti-MEM following manufacturer's instructions. esiRNA transfection efficiency was analyzed either by RT-qPCR at 48 h and 72 h after transfection or by western blot at 72 h after transfection.

**Subcellular fractionation.** *Isolation of nuclear/cytosolic fractions.* Nuclear and cytoplasmic fractions were isolated using the Nuclear Extract kit (Active Motif, 40010) according to manufacturer's instructions. In brief, washed cells were pelleted and lysed in hypotonic buffer to obtain cytoplasmic fractions. Nuclear pellets were incubated in lysis buffer for 30 min with gentle agitation at 4 °C. Samples were then centrifuged and supernatants recovered as nuclear fractions.

*Nucleoli isolation.* Cells ( $3 \times 10^6$ ) were seeded on T225 cm<sup>2</sup> flasks and cultured as indicated above. Nucleoli isolation was performed following a slightly modified published protocol<sup>13</sup>. Briefly, cells were washed 3 times and suspended in 1.5 ml cold Solution I (0.5 M sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, protease and phosphatase inhibitors). Cells were sonicated (Sonics, VCX130) on ice (40% amplitude, 10 pulses 10 s on/off) and >90% efficiency ensured under the microscope. Cell lysates were laid on the same volume of Solution II (1 M sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, protease and phosphatase inhibitors) and 1800×g centrifuged (10 min, 4 °C). Supernatants were 1800×g centrifuged again (10 min, 4 °C) and collected as *nucleolar-less* fractions containing the whole cell extract except nucleoli. Pellets were suspended in RIPA solution containing protease and phosphatase inhibitors, sonicated (40% amplitude, 4 pulses of 10 s/50 s on/off) and 14,000×g centrifuged (10 min, 4 °C). Supernatants were collected as *nucleolar* fractions and stored at -80 °C.

**Protein extraction and immunoblotting.** Total protein was extracted in RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Equal amounts of protein were size-fractionated by SDS-PAGE gel electrophoresis and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Protran, Whatman). When samples from different cell lines were to be compared, although run in different gels, these were electroblotted onto the same membrane and incubated with the specific primary and HRP-conjugated secondary antibody. Blots were developed by enhanced chemiluminescence reaction (ECL Detection Kit, GE Healthcare). Equal loading or fraction purity was confirmed by reprobing blots with  $\alpha$ -tubulin, Nup98, GAPDH or fibrillarin antibodies. To avoid membrane stripping whenever possible, blots were cut and each strip incubated with different antibodies to detect several proteins in the same membrane as described in supplementary information (uncropped images).

**In vitro CAPN2 cleavage assay.** Whole protein extracts from MDA-MB-231 cells were incubated for 20 min at 37 °C with different units of recombinant CAPN2 in the presence of 5 mM Ca<sup>2+</sup>. To confirm calpain-mediated cleavage of LIMK1, reactions were carried out in the presence or absence of the chemical inhibitor of calpain activity, calpeptin (50  $\mu$ M). Reactions were stopped by dissolving samples in SDS/Laemmli buffer and finally LIMK1 cleavage was analyzed by Western blotting as described above.

**Immunoprecipitation.** Proteins were extracted in RIPA buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors as described elsewhere. Dynabeads™ protein G (Invitrogen 10003D) were 10 min pre-incubated with  $\alpha$ -LIMK1 (1:50) or Normal serum IgG antibodies in RIPA. Magnetic beads were washed three times in lysis buffer and further incubated with 200  $\mu$ g of protein extracts. After four washes, pull-down proteins were eluted in 50 mM glycine, pH 2.8 and boiled in Laemmli buffer 5× for immunoblot analysis.

**Immunofluorescence analysis.** Cells were cultured onto 13 mm  $\varnothing$  borosilicate Cover Glass (VWR 631-0149) and immunostained as described previously<sup>10</sup>. Briefly, cells were incubated with the indicated primary antibodies overnight at 4 °C, followed by the secondary antibody. To ensure the signal specificity a negative control (where cells were incubated with secondary but not primary antibody) was routinely included. Nuclei were counterstained with DAPI (Invitrogen). Pictures were acquired on a FV1000 Olympus confocal microscope. Fields with too few or too many cells were excluded. At least 4 fields for each independent experiment were analyzed. The average number of cells/field was usually  $60 \pm 10$ . Except for studies in single cells, the most representative image of all fields was always selected and shown as a section of ~10 cells.

**Analysis of multinucleate cells.** Multinucleate MDA-MB-231 cells were analyzed by flow cytometry at the Cytometry Unit from Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM), Universitat de Valencia. Briefly, cells were trypsinized at 72 h after transfection with either scRNA or siCAPN2, fixed with 70% ethanol, stained with propidium iodide (PI/RNAsa from Immunostep) and run in a flow cytometer (BD FACS Vosse) using a FACSuite software. Subsequent analysis with ModFit LT (V4.1.7) software was used for multinucleate and cell



cycle examination. In addition, cells cultured in coverslips were fixed and nuclei stained with DAPI. Phase contrast/DAPI merge images obtained with a FV1000 Olympus confocal microscope were used to see multinucleate cells.

**2D-DIGE proteomic analysis.** 2D-DIGE analysis was performed in nucleolar extracts from control and CAPN2 knocked-down MDA-MB-231 cells (n = 4). Nucleolar samples from scRNA and siCAPN2-transfected cells were alternatively labelled with Cy-3 or Cy-5 to decrease inter-gel variability. Recombined samples from silenced and control cells were labelled with Cy-2 for normalization and separated on 24 cm Immobiline DryStrips (pH 3–11) and 12.5%-acrylamide SDS-PAGE gels. Gels were scanned with Typhoon 9400 Variable Mode Imager and image analysis performed using DeCyder software (v7.0, Amersham Biosciences, GE Healthcare) and SameSpots v5.0.1.0. Significance of statistically different proteins was calculated using Student's t-test and accepted when the value was  $p \leq 0.05$ . Spots from 11 differentially represented proteins were excised and identified by LC-MS/MS at the proteomics facility (SCSIE) at the University of Valencia.

**Bioinformatics-based predictions.** Prediction of NoLS motifs, positively charged, NLS and NoLS overlapping, and unfolded regions as well as protein–protein interaction sites in CAPN2 (NP\_001739) were analyzed by different predictions platforms as indicated in Supplementary Figs. S3–S7.

**Statistics.** Data are presented as mean fold  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was estimated by one-sample Student's t-test with SPSS software. Differences were considered significant at least at  $p \leq 0.05$ . Spearman's correlation rho test was used for correlation analysis where a Rs value from 0.8 to 1 indicated a strong correlation between the pair of groups tested. Independent experiments were conducted with a minimum of three replicates per condition to allow statistical comparison.

### Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its online supplementary material file.

Received: 8 February 2021; Accepted: 30 July 2021

Published online: 11 August 2021

### References

1. Sorimachi, H., Hata, S. & Ono, Y. Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem.* **150**, 23–37. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr070> (2011).
2. Ono, Y., Saido, T. C. & Sorimachi, H. Calpain research for drug discovery: Challenges and potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 854–876. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.212> (2016).
3. Campbell, R. L. & Davies, P. L. Structure-function relationships in calpains. *Biochem. J.* **447**, 335–351. <https://doi.org/10.1042/bj21020921> (2012).
4. Huang, Y. & Wang, K. K. The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* **7**, 355–362. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(01\)02049-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(01)02049-4) (2001).
5. Baudry, M. Calpain-1 and Calpain-2 in the brain: Dr. Jekyll and Mr. Hyde?. *Curr. Neuropharmacol.* **17**, 823–829. <https://doi.org/10.2174/1570159x17666190228112451> (2019).
6. Chen, J., Wu, Y., Zhang, L., Fang, X. & Hu, X. Evidence for calpains in cancer metastasis. *J. Cell Physiol.* **234**, 8233–8240. <https://doi.org/10.1002/jcp.27649> (2019).
7. Briz, V. & Baudry, M. Calpains: Master regulators of synaptic plasticity. *Neuroscientist.* **23**, 221–231. <https://doi.org/10.1177/1073858416649178> (2017).
8. Rodríguez-Fernández, L. et al. Isoform-specific function of calpains in cell adhesion disruption: Studies in postlactational mammary gland and breast cancer. *Biochem. J.* **473**, 2893–2909. <https://doi.org/10.1042/bcj20160198> (2016).
9. Arnanadis, T. et al. Differential functions of calpain 1 during epithelial cell death and adipocyte differentiation in mammary gland involution. *Biochem. J.* **459**, 355–368. <https://doi.org/10.1042/bj20130847> (2014).
10. Arnanadis, T. et al. Calpains mediate epithelial-cell death during mammary gland involution: Mitochondria and lysosomal destabilization. *Cell Death Differ.* **19**, 1536–1548. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.46> (2012).
11. Sorimachi, H., Mamitsuka, H. & Ono, Y. Understanding the substrate specificity of conventional calpains. *J. Biol. Chem.* **393**, 853–871. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0143> (2012).
12. Ono, Y. & Sorimachi, H. Calpains: An elaborate proteolytic system. *Biochem. Biophys. Acta.* **224–236**, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.005> (1824).
13. Telechea-Fernández, M. et al. New localization and function of calpain-2 in nucleoli of colorectal cancer cells in ribosomal biogenesis: Effect of KRAS status. *Oncotarget* **9**, 9100–9113. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23888> (2018).
14. Raynaud, F., Marcilhac, A., Chebli, K., Benyamin, Y. & Rossel, M. Calpain 2 expression pattern and sub-cellular localization during mouse embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 383–388. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072448fr> (2008).
15. Raynaud, F., Carnac, G., Marcilhac, A. & Benyamin, Y. m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp. Cell Res.* **298**, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.053> (2004).
16. König, N. et al. Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and microcebus brain. *J. Chem. Neuroanat.* **25**, 129–136. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(02)00102-3) (2003).
17. Honda, S. et al. Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 10615–10623. <https://doi.org/10.1074/jbc.m308841200> (2004).
18. Magnaghi-Jaulin, L. et al. Calpain 2 is required for sister chromatid cohesion. *Chromosoma* **119**, 267–274. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0255-z> (2010).
19. Nozawa, R. S. et al. Nuclear microenvironment in cancer: Control through liquid-liquid phase separation. *Cancer Sci.* **111**, 3155–3163. <https://doi.org/10.1111/cas.14551> (2020).
20. Németh, A. & Grummt, I. Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr. Opin. Cell Biol.* **52**, 105–111. <https://doi.org/10.1016/jceb.2018.02.013> (2018).
21. Tao, T. et al. Def defines a conserved nucleolar pathway that leads p53 to proteasome-independent degradation. *Cell Res.* **23**, 620–634. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.16> (2013).

22. Saiwaki, T., Kotera, I., Sasaki, M., Takagi, M. & Yoneda, Y. In vivo dynamics and kinetics of pKi-67: Transition from a mobile to an immobile form at the onset of anaphase. *Exp. Cell Res.* **308**, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.04.010> (2005).
23. Dino Rockel, T. & von Mikecz, A. Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J. Struct. Biol.* **2002**(140), 189–199. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(02\)00527-0](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00527-0) (2002).
24. Latonen, L., Moore, H. M., Bai, B., Jäämaa, S. & Laiho, M. Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene* **30**, 790–805. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.469> (2011).
25. Musinova, Y. R., Kananykhina, E. Y., Potashnikova, D. M., Lisitsyna, O. M. & Sheval, E. V. A charge-dependent mechanism is responsible for the dynamic accumulation of proteins inside nucleoli. *Biochim. Biophys. Acta.* **1853**, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.007> (2015).
26. Martin, R. M. *et al.* Principles of protein targeting to the nucleolus. *Nucleus* **6**, 314–325. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1079680> (2015).
27. Emmott, E. & Hiscox, J. A. Nucleolar targeting: The hub of the matter. *EMBO Rep.* **10**, 231–238. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.14> (2009).
28. Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. & Campos, I. To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* **2**, E107–E112. <https://doi.org/10.1038/35014078> (2000).
29. Guan, Y. *et al.* Phosphorylation of def regulates nucleolar p53 turnover and cell cycle progression through def recruitment of calpain3. *PLoS Biol.* **14**, e1002555. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002555> (2016).
30. Shishkin, S., Eremina, L., Pashintseva, N., Kovalev, L. & Kovaleva, M. Cofilin-1 and other ADF/Cofilin superfamily members in human malignant cells. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 10. <https://doi.org/10.3390/ijms18010010> (2016).
31. Kanellos, G. & Frame, M. C. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 3211–3218. <https://doi.org/10.1242/jcs.187849> (2016).
32. Liu, Y. *et al.* LMO2 promotes tumor cell invasion and metastasis in basal-type breast cancer by altering actin cytoskeleton remodeling. *Oncotarget* **8**, 9513–9524. <https://doi.org/10.1242/jcs.187849> (2017).
33. Munsie, L. N., Desmond, C. R. & Truant, R. Cofilin nuclear-cytoplasmic shuttling affects cofilin-actin rod formation during stress. *J. Cell Sci.* **125**, 3977–3988. <https://doi.org/10.1242/jcs.097667> (2012).
34. Mizuno, K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal.* **25**, 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.001> (2013).
35. Nebl, G., Meuer, S. C. & Samstag, Y. Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J. Biol. Chem.* **271**, 26276–26280. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.42.26276> (1996).
36. McConnell, B. V., Koto, K. & Gutierrez-Hartmann, A. Nuclear and cytoplasmic LIMK1 enhances human breast cancer progression. *Mol. Cancer.* **10**, 75. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-75> (2011).
37. Manetti, F. LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med. Res. Rev.* **32**, 968–998. <https://doi.org/10.1002/med.20230> (2012).
38. Wang, Y. *et al.* The tyrosine phosphatase PTPN13/FAP-1 links calpain-2, TBI and tau tyrosine phosphorylation. *Sci. Rep.* **7**, 11771. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12236-3> (2017).
39. Tomiyoshi, G., Horita, Y., Nishita, M., Ohashi, K. & Mizuno, K. Caspase-mediated cleavage and activation of LIM-kinase 1 and its role in apoptotic membrane blebbing. *Genes Cells.* **9**, 591–600. <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00745.x> (2004).
40. Lee, M. H., Kundu, J. K., Chae, J. I. & Shim, J. H. Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer. *Arch. Pharm. Res.* **42**, 481–491. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01153-w> (2019).
41. Galganski, L., Urbaneck, M. O. & Krzyzosiak, W. J. Nuclear speckles: Molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res.* **2017**(45), 10350–10368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx759> (2017).
42. Phair, R. D. & Misteli, T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* **404**, 604–609. <https://doi.org/10.1038/35007077> (2000).
43. Marzahn, M. R. *et al.* Higher-order oligomerization promotes localization of SPOP to liquid nuclear speckles. *EMBO J.* **35**, 1254–1275. <https://doi.org/10.15252/embj.201593169> (2016).
44. Amano, T., Kaji, N., Ohashi, K. & Mizuno, K. Mitosis-specific activation of LIM motif-containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 22093–22102. <https://doi.org/10.1074/jbc.m20144200> (2002).
45. Kaji, N., Muramoto, A. & Mizuno, K. LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *J. Biol. Chem.* **283**, 4983–4992. <https://doi.org/10.1074/jbc.m708644200> (2008).
46. Kimura, K., Tsuji, T., Takada, Y., Miki, T. & Narumiya, S. Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation. *J. Biol. Chem.* **275**, 17233–17236. <https://doi.org/10.1074/jbc.c000212200> (2000).
47. Théry, M. *et al.* The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat. Cell Biol.* **7**, 947–953. <https://doi.org/10.1038/ncb1307> (2005).
48. O'Connell, C. B. & Wang, Y. L. Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 1765–1774. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1765> (2000).
49. Kaji, N. *et al.* Cell cycle-associated changes in Slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33450–33455. <https://doi.org/10.1074/jbc.m305802200> (2003).
50. Cuylen, S. *et al.* Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* **535**, 308–312. <https://doi.org/10.1038/nature18610> (2016).
51. Amin, M. A., Matsunaga, S., Uchiyama, S. & Fukui, K. Depletion of nucleophosmin leads to distortion of nucleolar and nuclear structures in HeLa cells. *Biochem. J.* **415**, 345–351. <https://doi.org/10.1042/bj20081411> (2008).
52. Amin, M. A. *et al.* Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.092> (2007).
53. Almonacid, M., Terret, M. É. & Verhac, M. H. Actin-based spindle positioning: new insights from female gametes. *J. Cell Sci.* **127**, 477–483. <https://doi.org/10.1242/jcs.142711> (2014).

## Acknowledgements

This work was supported by the Generalitat Valenciana [Grant Number GVPROMETEO 2018-167 (to JRV)]. This paper is dedicated to Concha García, former member of the research group and friend who devoted her career to the technical assistance of PhD students, post-doctoral fellows and professors for 42 years.

## Author contributions

L.R.-F.: Most experiments, formal analysis. S.C.: Most experiments, formal analysis. R.Z.: investigation, Writing-Reviewing and Editing. J.R.V.: Funding acquisition, Writing-Reviewing and Editing. E.R.G.-T.: Conceptualization, Supervision, Writing—original draft preparation. Writing-Reviewing and Editing. All authors reviewed the manuscript.



### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95797-8>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to E.R.G.-T.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

