

# LA CALRETICULINA ES UN COMPONENTE CENTRAL EN LA REGULACIÓN DE DIFERENTES PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS EN LA CÉLULA\*

**Miguel Ángel Velázquez Flores<sup>1</sup>, Rodrigo Chan Torrano<sup>1</sup>, Ruth Ruiz Esparza Garrido<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México. Correo E: dr.velazquez.imss@gmail.com.

<sup>2</sup>Catedrática CONACyT, Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México. Correo E: rruizes@conacyt.mx

## RESUMEN

La calreticulina es una proteína multifuncional que se identificó y caracterizó inicialmente en el retículo endoplásmico, y que posteriormente se identificó en otros compartimientos subcelulares, en donde regula diferentes procesos. Interesantemente, esta proteína es la única chaperona que se ha identificado en la superficie celular y que es secretada al torrente sanguíneo. La localización de la región amino terminal de la calreticulina, en el suero sanguíneo, forma parte de la firma de anticuerpos asociados con la detección del cáncer hepático y sugiere su utilización para la detección y/o diagnóstico de otros tipos de cáncer. Asimismo, estudios recientes demostraron que la calreticulina interacciona con la región 3'-UTR de los RNAs mensajeros del receptor tipo I de la angiotensina y del transportador de glucosa 1 para regular sus niveles de expresión.

## PALABRAS

### CLAVE:

Calreticulina, expresión proteica, localización subcelular, interactoma.

## ABSTRACT

Calreticulin is a multifunctional protein that was initially identified and characterized in the endoplasmic reticulum, and further identified in different subcellular compartments to regulate a variety of cellular processes. Interestingly, this protein is the only chaperone that has been identified in the cell surface and which is secreted to the extracellular space. Since the amino-terminal region of the calreticulin is part of the antibodies signature to detect the hepatocellular carcinoma, it could also be useful for the detection and/or diagnosis of other types of cancer. Besides, recent studies showed that calreticulin interacted with the 3'-UTR regions of the Angiotensin Receptor Type I and glucose Transporter 1 messenger RNAs to regulate their expression levels.

## KEY WORDS:

Calreticulin, protein expression, subcellular localization, interactome.

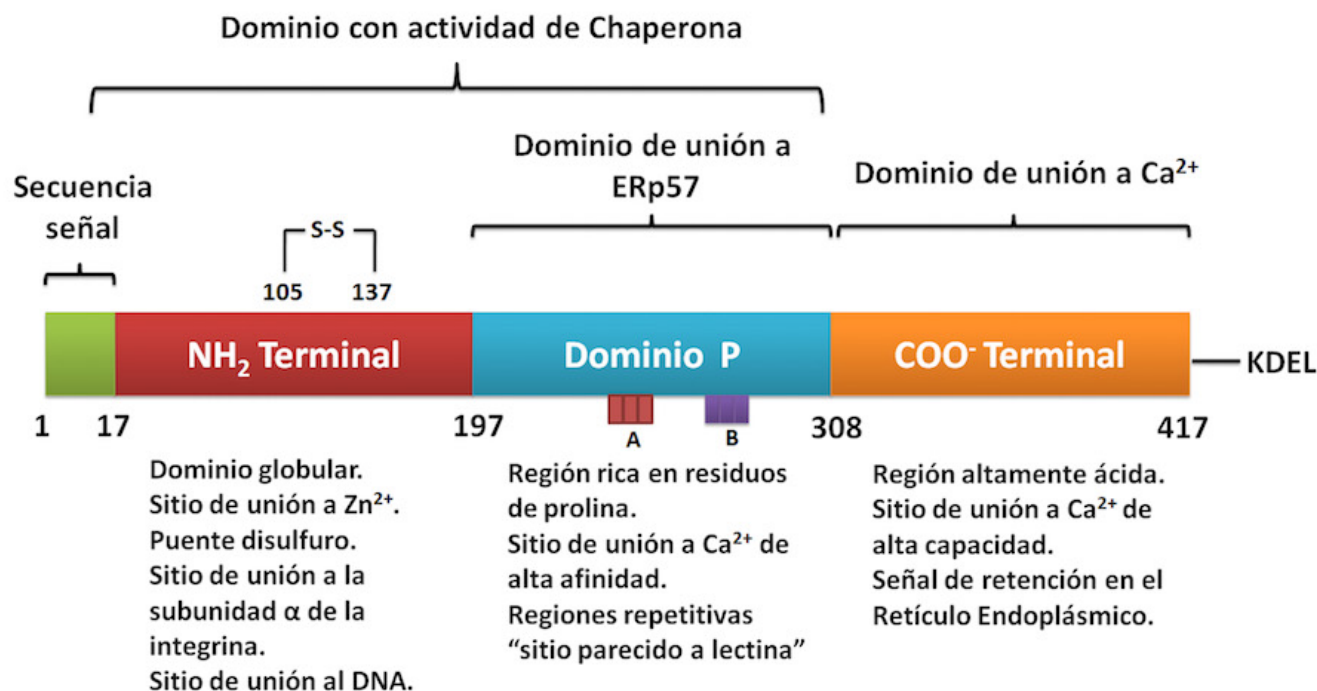
## INTRODUCCIÓN

La calreticulina (CRT) es una proteína chaperona (46 kDa) que consiste de tres dominios estructurales y funcionales (1). El dominio P –rico en residuos de prolina- tiene solamente un sitio de unión a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) de alta afinidad ( $K_D = 1.6 \mu\text{M}$ ;  $B_{\text{MAX}} = 1 \text{ mol/mol}$  de proteína), mientras que el dominio carboxilo terminal (C-Terminal) tiene baja afinidad ( $K_D = 0.03\text{-}2 \text{ mM}$ ) y una alta capacidad<sup>3</sup>

( $B_{\text{MAX}} = 20\text{-}50 \text{ mol/mol}$  de proteína) para la unión de este catión (2). El dominio amino terminal (N-terminal) contiene una secuencia señal que dirige a la CRT hacia el retículo endoplásmico (RE) y el C-terminal una secuencia KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) de retención en este compartimiento subcelular (Fig. 1). En el lumen del RE, la CRT, junto con otras chaperonas, participa en el plegamiento correcto de las proteínas (por medio de su sitio con actividad de lectina) y previene la agregación

\*Recibido: 29 de julio de 2015 Aceptado: 27 de octubre de 2015

<sup>3</sup> $B_{\text{MAX}}$ . Número máximo de sitios de unión.



**Figura 1. Dominios estructurales y funcionales de la calreticulina.** La calreticulina posee sitios de unión a Ca<sup>2+</sup> de baja y alta afinidad, así como una región que presenta repetidos de prolina (dominio P). En las regiones N y C terminales se localizan secuencia de localización y retención en el retículo endoplásmico, respectivamente. Tomada y modificada de Michalak et al. 2009.

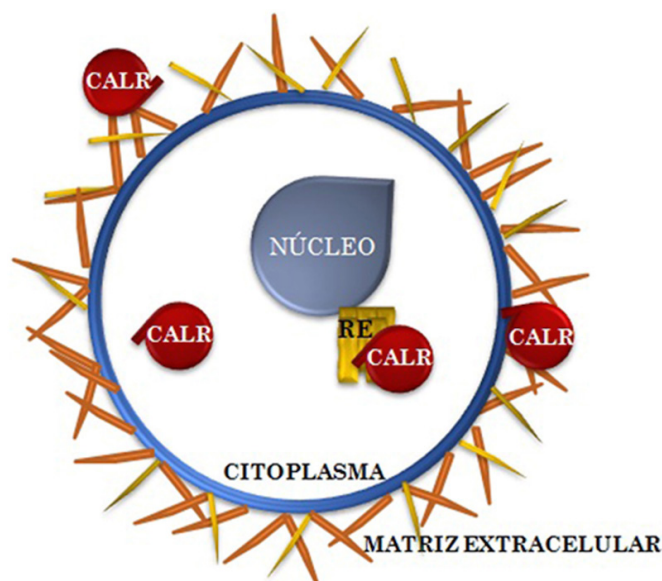
proteica. Asimismo, la CRT identifica y dirige las proteínas mal plegadas hacia el proteosoma para su degradación. Otra función de la CRT en el RE es el control de la concentración de Ca<sup>2+</sup> luminal, en donde el 50% de la concentración de este catión se asocia a esta proteína (3). Se ha observado que un incremento en los niveles de expresión proteicos se traduce en un mayor almacenamiento de Ca<sup>2+</sup> en el RE (4-5), mientras que una disminución en su expresión resulta en una menor capacidad de almacenamiento de este catión (3) y en defectos durante el desarrollo del corazón del ratón (6-7). Además de su localización en el RE, la CRT se encuentra en diferentes compartimientos subcelulares (Fig. 2) para regular procesos celulares como son el procesamiento y presentación de antígenos en la respuesta inmune (8), la fagocitosis de las células cancerosas por medio de las células dendríticas (9), la fagocitosis de las células apoptóticas (10), así como la adhesión, migración y proliferación celular (11-12). También, la CRT participa en la regulación de la migración celular, al regular el desensamble de las adhesiones focales (13), y en la anoikis, la cual es un tipo de muerte celular que se caracteriza por la pérdida de la adhesión celular (14). Debido a la participación de la CRT en la regulación de diferentes procesos celulares,

esta proteína "clásica del RE" está emergiendo como un mediador crítico de diversos procesos fisiológicos y patológicos tales como la cicatrización cutánea, la respuesta inmune, la fibrosis y el cáncer (13-16).

### LOCALIZACIÓN DE LA CRT EN LA MATRIZ EXTRACELULAR

Estudios iniciales demostraron que la CRT se localiza en la matriz extracelular (MEx) de la pre-dentina dental (15) y que existe un incremento en la expresión de ésta en tejidos fibrosos (16). De acuerdo a esto, se sugiere que la CRT participa en la formación de la MEx y en la resistencia a la anoikis, ya que estos procesos son característicos durante la fibrogénesis.

En un modelo de arteroesclerosis, la CRT se localizó en la MEx de las arterias del conejo durante la remodelación vascular. Además, diferentes líneas de evidencia indican que la CRT se localiza en la fase insoluble a detergentes de la MEx de fibroblastos humanos en cultivo, y que ésta se transloca hacia la MEx en respuesta al tratamiento con ácido ascórbico. Dadas las interacciones que la CRT establece con colágenos fibrilares, con la laminina y con la TSP1 (Trombospondina 1), así



**Figura 2. La calreticulina se localiza en distintos compartimientos subcelulares.** La CRT se caracterizó inicialmente como una proteína residente exclusivamente del retículo endoplásmico (RE); sin embargo, estudios posteriores demostraron su presencia en el citoplasma, en la membrana celular y en la matriz extracelular. Según la región en la que se localice la CRT, va a ser la función que desempeña en un sistema.

como por su capacidad de modular la actividad de metaloproteinasas en la MEx, es factible que la CRT module la estructura y/o el intercambio de componentes en la MEx o bien, que esta proteína funcione como un "link" molecular entre la MEx y la superficie celular. Por lo tanto, se ha propuesto que en condiciones aberrantes, en las que la CRT ya no se incorpora a la MEx, la inducción de su secreción y su posterior interacción con componentes de la MEx podría restablecer los mecanismos moleculares alterados del sistema (17). En efecto, como se describe posteriormente, la aplicación ectópica de la CRT es determinante para la activación de la vía mediada por la PI3K (Fosfatidilinositol 3-Cinasa) en respuesta a TSP1 (13).

## PARTICIPACIÓN DE LA CRT EN LA ADHESIÓN CELULAR

Uno de los primeros indicios de que la CRT regula la adhesión celular, surgió de un trabajo en el que se demostró que la unión de la CRT citoplásmica a la secuencia de aminoácidos KxGFFFKR<sup>4</sup> (Lys-x-Gly-Phe-Phe-Phe-Lys-Arg), de la región intracelular de las integrinas, estabiliza la unión de las integrinas

con su ligando y activa a FAK (Proteína Cinasa de Adhesión Focal) (18). Asimismo, se observó que la CRT co-inmunoprecipita con integrinas durante la adhesión celular (18) y que se encuentra en complejos de adhesión focal junto con ciertas integrinas y LRP1 (Proteína 1 relacionada con el Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad) (19). Además de interactuar a nivel citoplásmico con las integrinas, la CRT – localizada en la superficie celular– se une a dominios extracelulares de la integrina  $\alpha 2 \beta 1$  (20) y a formas glicosiladas de la laminina para mediar la propagación de células de melanoma. Esto apoya la idea de que la CRT puede estar funcionando como un tipo de lectina en la adhesión celular (21).

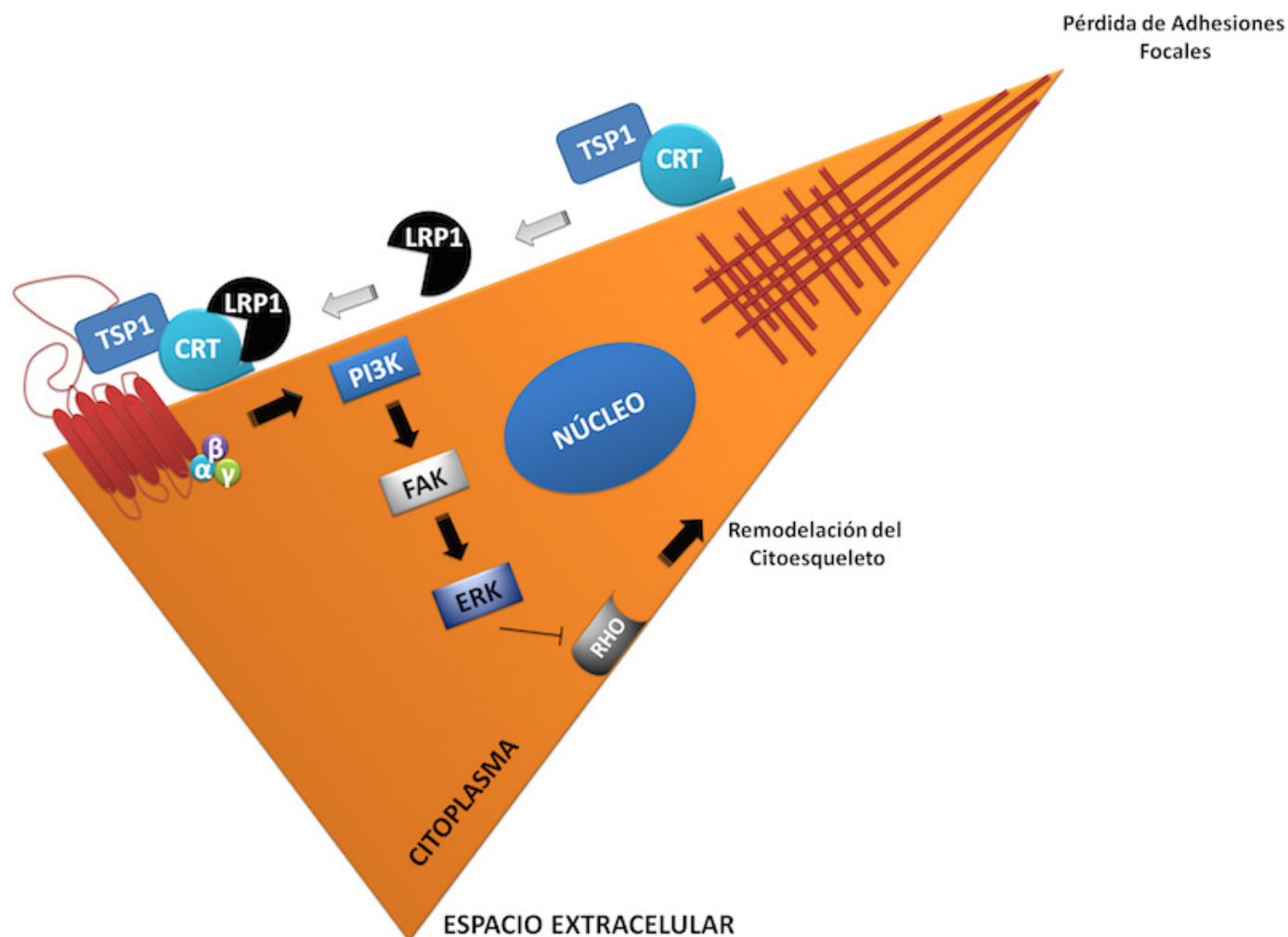
## CRT Y MIGRACIÓN CELULAR

La participación de la CRT en la migración celular está directamente relacionada con la formación y desensamble de las adhesiones focales, al estabilizar a las integrinas y de esta forma a la MEx. La expresión de la CRT en la superficie de las células endoteliales de la aorta del bovino y de los fibroblastos, facilita su interacción con la TSP1 soluble y de esta forma regula el desensamble de las adhesiones focales y la migración celular. La interacción de la CRT con la TSP1, por medio de los aminoácidos 19-36 de su región N-terminal, induce el acoplamiento del complejo CRT-TSP1 con el receptor LRP1 (22). La formación de este macrocomplejo (CRT-TSP1•LRP1) induce la activación de receptores acoplados a proteínas G $\alpha_i$ , los cuales inhiben la producción del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPc), y activan la vía mediada por la PI3K, FAK y ERK (Proteínas Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares). Esto resulta en la disminución de la actividad de proteínas G pequeñas, de la familia Rho, lo que conlleva a la reorganización del citoesqueleto y a la pérdida de las adhesiones focales (13) (Fig. 3). En fibroblastos de ratones que no expresan la CRT, se observó que la activación de la TSP1 no tiene efecto sobre la activación de la vía PI3K-FAK-ERK; sin embargo, la aplicación exógena de la CRT es suficiente para inducir la activación de esta vía (13). Por lo tanto, la expresión de la CRT en la superficie celular es determinante en la regulación de las adhesiones focales por medio de la vía TSP1•PI3K-FAK-ERK.

## CÁNCER Y LA RESPUESTA INMUNE

En un estudio realizado por Tufi y col. (23), se demostró que el proceso de destrucción de las células cancerosas, mediado por el sistema inmu-

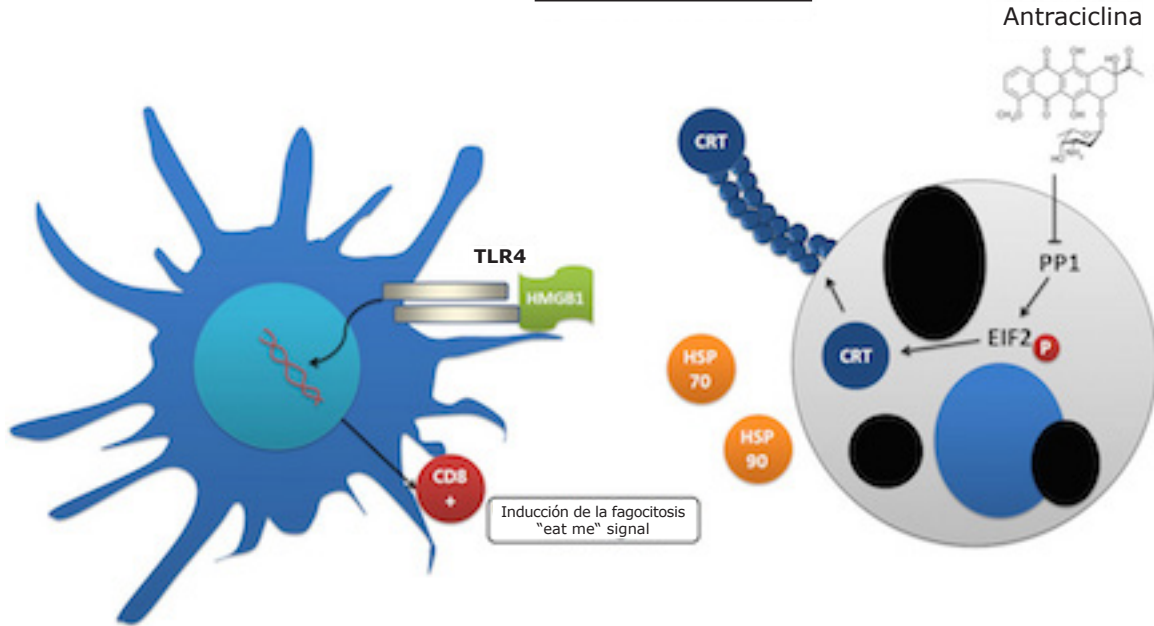
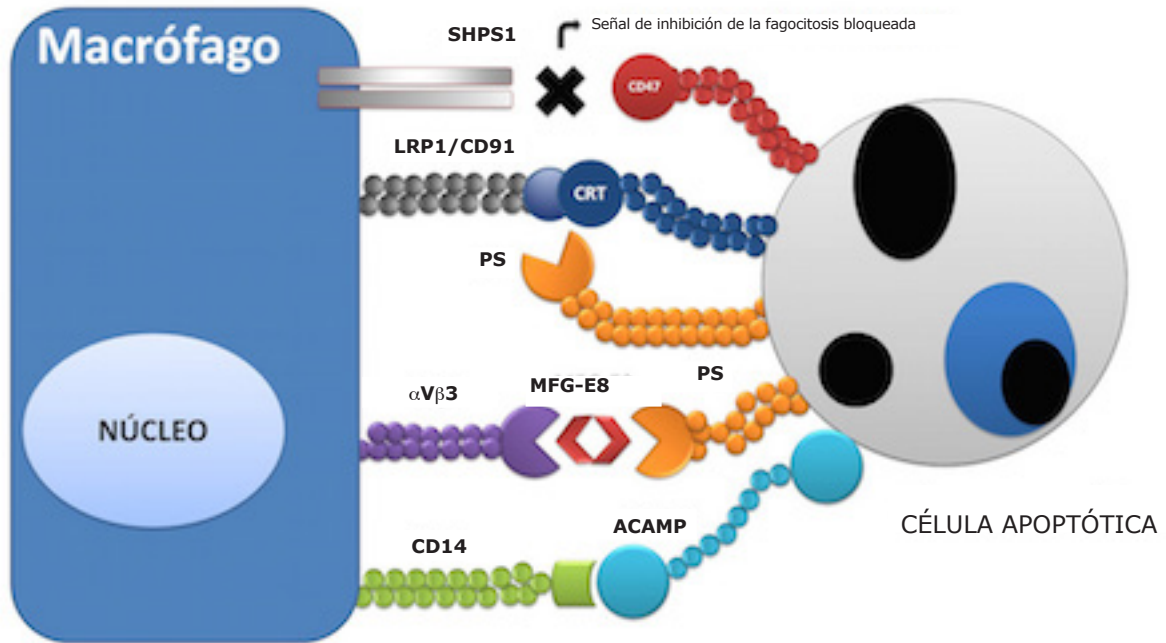
<sup>4</sup>Secuencia KxGFFFKR. Motivo proteico altamente conservado en el dominio citoplásmico de las subunidad alfa de las integrinas.



**Figura 3. La localización de la CRT en la superficie celular induce la pérdida de las adhesiones focales de los fibroblastos.** Cuando la CRT se localiza en la superficie celular, ésta se une al factor TSP1 soluble e interacciona con el receptor LRP1, lo cual induce la activación de la vía mediada por la PI3K. La activación de la PI3K disminuye la actividad de proteínas G pequeñas (Rho) y esto remodela el citoesqueleto para que se desensamblen las adhesiones focales.

ne, es dependiente de la localización de la CRT en la superficie celular. La aplicación de antraciclinas, así como de inhibidores específicos de la PP1 (proteína fosfatasa 1)/ PPR1 (Subunidad Reguladora 1A (Inhibidora) de la Fosfatasa 1)-involucrada en la desfosforilación de la proteína eIF2 $\alpha$  (Proteína Hiperfosforilada durante el estrés del RE) -, induce la translocación (en minutos) de la CRT a la superficie de células pre-apoptóticas y la remoción de éstas por las células dendríticas y linfocitos T primarios específicos para antígenos tumorales (24). La translocación de la CRT a la superficie celular, por antraciclinas, ocurre en respuesta a una disminución de Ca<sup>2+</sup> en el RE y es seguida por la expresión y liberación de las proteínas de choque térmico Hsp90 (Proteína de

Choque Térmico, 90 kDa) y Hsp70 (Proteína de Choque Térmico, 70 kDa), así como por la liberación de la proteína HMGB1 (Proteína de Alta Movilidad del Grupo I) que actúa sobre el TLR4 (Receptor 4 parecido a Toll) en las células dendríticas (9). La interacción de la proteína HMGB1 con el TLR4 induce el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales por las células dendríticas, lo cual facilita la activación de las células T y la generación de células T citotóxicas (CD8+), las cuales actúan en contra de las células neoplásicas (Fig. 4A). De forma similar, Gardai y cols. sugieren que la CRT, en la superficie celular de las células apoptóticas, es un ligando del receptor LRP1 y junto con la fosfatidilserina (PS), inactiva a la Molécula CD47 (CD47), lo cual resulta en la

**A****SINAPSIS FAGOCÍTICA****B****SINAPSIS FAGOCÍTICA**

**Figura 4. Sinapsis fagocítica entre una célula apoptótica y un macrófago.** A) La inhibición de la fosfatasa 1(PP1) por antraciclinas inhibe la desfosforilación del Factor 2 de Iniciación Eucarionte (EIF2 $\alpha$ ), lo cual induce la disminución la concentración de  $Ca^{2+}$  en el lumen del RE, y la translocación de la CRT hacia la superficie celular. De igual manera, se liberan las proteínas de choque térmico de 90 (HSP90) y 70kDa (HSP70), y de la Proteína de alta Movilidad del Grupo I (HMGBI) que actúa sobre el Receptor 4 Parecido a Toll (TLR4). B) La translocación de la CRT y de la fosfatidilserina (PS) hacia la superficie celular de las células apoptóticas facilita su interacción con el receptor LRP1/CD91 que es expresado en los macrófagos. Este reconocimiento proteico inhibe a CD47 y en consecuencia, la activación del receptor fagocítico SHPS1 (Proteína Alfa Reguladora de la Señal), el cual induce vías de señalización relacionadas con la inhibición de la fagocitosis. En la superficie celular, la PS puede interaccionar con varios receptores fagocíticos, como la Integrina Alfa V (ITAV). CD14 funciona como un factor de inmovilización que reconoce a las ACAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Células Apoptóticas). Tomado y modificado de Gregory y Brown, 2005.

inactivación de vías de señalización –mediadas por SHPS1- que inhiben la fagocitosis (Fig. 4B). Las células que no expresan a la CRT en la superficie celular no se fagocitan por las células dendríticas; sin embargo, la aplicación exógena de la CRT restablece la fagocitosis de las células tumorales. Interesantemente, el tratamiento con antraciclinas de pacientes con leucemia mieloide aguda, produjo un incremento en la expresión de la CRT en células cancerosas circundantes, sugiriendo que la exposición de la CRT en la superficie de las células neoplásicas podría promover una respuesta positiva en la terapia contra el cáncer (25).

La presencia de la región N-terminal de la CRT (ecto CRT) en el suero sanguíneo, forma parte de la firma de los auto-anticuerpos que permiten la detección del cáncer hepático y se ha propuesto que esta región N-terminal es la responsable de la inducción de la reactividad inmune contra los antígenos tumorales. Por el contrario, se sabe que la CRT y las proteínas Hsp90 y Hsp70 tienen actividad anti-apoptótica, lo cual indica que estas proteínas podrían promover también la sobrevivencia de las células cancerosas. De hecho, la geldanomicina, inhibidor análogo de la proteína Hsp90, se utiliza en la clínica (fase I y II) para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (26).

Además de los mecanismos mencionados, la CRT ejerce otro tipo de efectos sobre la respuesta inmune. Para facilitar la respuesta inmune de las células T, la CRT forma un complejo con las proteínas TSP1, LRP1 y CD47 (Proteína Asociada a Integrinas) para mediar la adhesión y migración de estas células (27). Un punto importante es que la exposición de la CRT en la superficie celular es esencial para el reconocimiento y para la fagocitosis de las células neoplásicas por los macrófagos. Este proceso es independiente de la exposición de la PS y es importante en la inducción y secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$  (Factor  $\alpha$  de Necrosis Tumoral), las cuales activan la respuesta inmune. La presencia de la CRT en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos y de las células “asesinas naturales” (natural killer cells), es necesaria para la interacción y formación de sinapsis que inducen la muerte celular de las células blanco (28).

Adicionalmente, Obeid (29) demostró que los péptidos inhibidores del complejo PP1/PPR1A se fusionan con moléculas que inducen la translocación de la CRT hacia la superficie celular de distintas líneas celulares tumorigénicas. Esto resulta en el incremento de la fagocitosis de las células tumorales, por las células dendríticas, y en la reducción

del crecimiento tumoral en modelos murinos de cáncer de colon, mama y fibrosarcoma. Por ende, el empleo de estos péptidos, para inducir la exposición de la CRT en la superficie de las células neoplásicas, podría tener un impacto clínico en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

### **IMPACTO CLÍNICO DE LA EXPRESIÓN DE LA CRT EN DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER**

La correlación entre la expresión de la CRT y la tumorigénesis se ha estudiado ampliamente en diferentes tipos de cáncer (30) y la mayoría de los reportes indican que los tumores exhiben mayores niveles de expresión que los tejidos no neoplásicos (31-32). Asimismo, ciertos estudios muestran que los niveles de expresión de la CRT se correlacionan positivamente con la etapa clínica y con la metástasis –hacia los nodos linfáticos- en el cáncer gástrico (33) y de mama (34). Pacientes con cáncer de páncreas y de esófago, que mostraron una sobre-expresión en los niveles de la CRT, tuvieron una sobrevida pobre (35-36).

Otros estudios han revelado que la CRT se encuentra significativamente sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer y que este cambio en su expresión sirve como un biomarcador para detectar el cáncer de vejiga (37). De manera importante, el incremento en los niveles de la CRT en la orina permite diferenciar tumores malignos –alto grado- de tumores con un mejor pronóstico clínico –bajo grado- (37), lo que sugiere que la sobre-expresión de la CRT en el cáncer podría estar relacionada con la progresión tumoral. No obstante, la expresión de la CRT correlaciona positivamente con la respuesta a la quimioterapia de pacientes con cáncer de ovario (38) y con un mejor pronóstico de pacientes con neuroblastoma (39). Con base en lo anterior, la participación de la CRT en la formación y progresión tumoral parece depender del tipo celular y del estado clínico.

Recientemente, se detectaron mutaciones en el gen que codifica para la calreticulina (CRT) en neoplasmas mieloproliferativos (NMP) (40-41). La mayoría de los pacientes con NMP, incluyendo policitemia vera (PV), trombocitemia (TE) y mielofibrosis primaria (MFP), mostraron mutaciones en el gen JAK2 (Cinasa Janus2) (42-43) y el resto mostró mutaciones en el gen CRT, las cuales incluyen una pérdida de 52 pares de bases (pb) y una inserción de 5 pb que modifican el marco de lectura (44). Por lo tanto, las proteínas que son codificadas por este gen alterado carecen del dominio C-terminal KDEL, lo cual modifica su unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y el crecimiento celular.

## PARTICIPACIÓN DE LA CRT EN LA ESTABILIDAD DEL mRNA

Además de todo lo descrito anteriormente, la CRT funciona como una proteína de unión a RNA mensajero (mRNA). La CRT desestabiliza tanto al mRNA de AT1 (Receptor tipo I de la Angiotensina II) (45) como al del GLUT1 (Transportador de Glucosa 1) (46), al unirse a los extremos 3'-UTRs. Importantly, la desestabilización del mRNA del GLUT1 ocurre en condiciones de alta glucosa, lo cual puede tener un significado importante en la regulación de los niveles de glucosa durante el síndrome metabólico. Estos resultados aportan evidencia sobre una función nueva para la CRT en un sistema biológico.

## CONCLUSIONES

La función de la CRT en un tipo celular determinado depende de diversos factores como son sus niveles de expresión y localización, así como de las interacciones proteína-proteína y proteína-mRNA que establece en la célula. Aun cuando cambios en su expresión y localización se han asociado con la desregulación de diversos procesos celulares, otros estudios son necesarios para identificar los mecanismos que rigen esta desregulación. Desde nuestro punto de vista, es necesario identificar las interacciones proteína-proteína y proteína-mRNA que la CRT establece en cada tipo celular y que determinan su función.



## REFERENCIAS

1. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M (2009) Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 417: 651-666.
2. Baksh S, Michalak M (1991) Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its  $\text{Ca}^{2+}$  binding domains. *J Biol Chem* 266(32):21458-65.
3. Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demarex N, Opas M, Michalak M (2001) Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol* 154: 961-972.
4. Bastianutto C, Clementi E, Codazzi F, Podini P, De Giorgi F, Rizzuto R, Meldolesi J, Pozzan T (1995) Overexpression of calreticulin increases the  $\text{Ca}^{2+}$  capacity of rapidly exchanging  $\text{Ca}^{2+}$  stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J Cell Biol* 130: 847-855.
5. Mery L, Mesaeli N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause KH (1996) Overexpression of calreticulin increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  storage and decreases store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *J Biol Chem* 271: 9332-9339.
6. Lynch J, Guo L, Gelebart P, Chilibeck K, Xu J, Molkentin JD, Agellon LB, Michalak M (2005) Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling cascade. *J Cell Biol* 170: 37-47.
7. Guo L, Nakamura K, Lynch J, Opas M, Olson EN, Agellon LB, Michalak M (2002) Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *J Biol Chem* 277: 50776-50779.
8. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccosanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54-61.
9. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G (2008) Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 15: 3-12.
10. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JA, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM (2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123: 321-334.
11. Orr AW, Pallero MA, Xiong WC, Murphy-Ullrich, JE (2004) Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly. *J Biol Chem* 279: 48983-48992.
12. Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, Chesser A, Michalak M, Rahman M, Siebert JW, Gold LI (2008) Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol* 173: 610-630.
13. Goicoechea S, Pallero MA, Eggleton P, Michalak M, Murphy-Ullrich JE (2002) The anti-adhesive activity of thrombospondin is mediated by the

- N-terminal domain of cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 277: 37219–37228.
14. Pallero MA, Elzie CA, Chen J, Mosher DF, Murphy-Ullrich JE (2008) Thrombospondin 1 binding to calreticulin-LRP1 signals resistance to anoikis. *FASEB J* 22: 3968–3979.
  15. Somogyi E, Petersson U, Hultenby K, Wendel M (2003) Calreticulin—an endoplasmic reticulum protein with calcium-binding activity is also found in the extracellular matrix. *Matrix Biol* 22: 179–191.
  16. Kypreou KP, Kavvadas P, Karamessinis P, Peroulis M, Alberti A, Sideras P, Psarras S, Capetanaki Y, Politis PK, Charonis AS (2008) Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *Proteomics* 8: 2407–2419.
  17. Eggleton P, Llewellyn DH (1999) Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *Scand J Immunol* 49: 466–473.
  18. Coppolino M, Leung-Hagesteijn C, Dedhar S, Wilkins J (1995) Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem* 270: 23132–23138.
  19. Tran H, Pankov R, Tran SD, Hampton B, Burgess WH, Yamada KM (2002) Integrin clustering induces kinectin accumulation. *J Cell Sci* 115: 2031–2040.
  20. Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M (2005) Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol* 245: 91–121.
  21. White TK, Zhu Q, Tanzer ML (1995) Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading. *J Biol Chem* 270: 15926–15929.
  22. Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE (2003) Thrombospondin signaling through the calreticulin/ LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116: 2917–2927.
  23. Tufi R, Panaretakis T, Bianchi K, Criollo A, Fazi B, Di Sano F, Tesniere A, Kepp O, Paterlini-Brechot P, Zitvogel L, Piacentini M, Szabadkai G, Kroemer G (2008) Reduction of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin. *Cell Death Differ* 15: 274–282.
  24. Viaud S, Terme M, Flament C, Taieb J, Andre F, Novault S, Escudier B, Robert C, Caillat-Zucman S, Tursz T, Zitvogel L, Chaput N (2009) Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha. *PLoS One* 4: e4942.
  25. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia GM, Kepp O, Piacentini M, Froehlich KU, van Endert P, Zitvogel L, Madeo F, Kroemer G (2008) The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 15: 1499–1509.
  26. Gehrmann M, Radons J, Molls M, and Multhoff G (2008) The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells. *Cell Stress Chaperones* 13: 1–10.
  27. Forslow A, Liu Z, Sundqvist KG (2007) Receptor communication within the lymphocyte plasma membrane: a role for the thrombospondin family of matricellular proteins. *Cell Mol Life Sci* 64: 66–76.
  28. Sipione S, Ewen C, Shostak I, Michalak M, Bleackley RC (2005) Impaired cytolytic activity in calreticulin-deficient CTLs. *J Immunol* 174: 3212–3219.
  29. Obeid M (2009) Anticancer activity of targeted proapoptotic peptides and chemotherapy is highly improved by targeted cell surface calreticulin-inducer peptides. *Mol Cancer Ther* 8: 2693–2707.
  30. Lu YC, Weng WC, Lee H (2015) Functional roles of calreticulin in cancer biology. *Biomed Res Int* 2015;2015:526524.
  31. Armenian M, Veerakumarasivam A, Abdullah S, Rosli R (2013) Calreticulin and cancer. *Pathol Oncol Res* 19:149–154.
  32. Ruiz Esparza-Garrido R, Velázquez-Flores MÁ, Diegopérez-Ramírez J, López-Aguilar E, Siordia-Reyes G, Hernández-Ortiz M, Martínez-Batallar AG, Encarnación-Guevara S, Salamanca-Gómez F, Arenas-Aranda DJ (2013) A proteomic approach of pediatric astrocytomas: MiRNAs and network insight. *J Proteomics* 94: 162–75.
  33. Chen CN, Chang CC, Su TE, Hsu WM, Jeng YM, Ho MC, Hsieh FJ, Lee PH, Kuo ML, Lee H, Chang KJ (2009) Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 16: 524–533.
  34. Lwin ZM, Guo C, Salim A, Yip GW, Chew FT, Nan J, Thihe AA, Tan PH, Bay BH (2010) Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod Pathol* 23: 1559–1566.
  35. Du XL, Hu H, Lin DC, Xia SH, Shen XM, Zhang Y, Luo ML, Feng YB, Cai Y, Xu X, Han YL, Zhan

- QM, Wang MR (2007) Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Med (Berl)* 85: 863–875.
36. Sheng W, Chen C, Dong M, Zhou J, Liu Q, Dong Q, Li F (2014) Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J Cell Physiol* 229: 887–897.
  37. Kageyama S, Isono T, Iwaki H, Wakabayashi Y, Okada Y, Kontani K, Yoshimura K, Terai A, Arai Y, Yoshiki T (2004) Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. *Clin Chem* 50: 857–866.
  38. Kageyama S, Isono T, Matsuda S, Ushio Y, Satomura S, Terai A, Arai Y, Kawakita M, Okada Y, Yoshiki T (2009) Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. *Int J Urol* 16: 481–486.
  39. Vaksman O, Davidson B, Tropé C, Reich R (2013) Calreticulin expression is reduced in high-grade ovarian serous carcinoma effusions compared with primary tumors and solid metastases. *Hum Pathol* 44: 2677–2683.
  40. Chang HH, Lee H, Hu MK, Tsao PN, Juan HF, Huang MC, Shih YY, Wang BJ, Jeng YM, Chang CL, Huang SF, Tsay YG, Hsieh FJ, Lin KH, Hsu WM, Liao YF (2010) Notch1 expression predicts an unfavorable prognosis and serves as a therapeutic target of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 16: 4411–4420.
  41. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanese C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schönegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 369: 2379–2390.
  42. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJ, Harrison CN, Cross NC, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 369: 2391–2405.
  43. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144–1148.
  44. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779–1790.
  45. Sun C, Zhang S, Li J (2015) Calreticulin gene mutations in myeloproliferative neoplasms without Janus kinase 2 mutations. *Leuk Lymphoma* 56: 1593–1598.
  46. Nickenig G, Michaelsen F, Müller C, Berger A, Vogel T, Sachinidis A, Vetter H, Böhm M (2002) Destabilization of AT1 receptor mRNA by calreticulin. *Circ Res* 90: 53–58.