



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

0346
3

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS ISOFORMAS
DE LA ATPasa DE CALCIO DE MEMBRANA
PLASMÁTICA EXPRESADAS EN EL TEJIDO
HEPÁTICO DE RATA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)**

P R E S E N T A

Blanca Alicia Delgado Coello

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Jaime Mas Oliva

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco infinitamente a todos aquellos que me ayudaron a concluir este trabajo ...

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCION	3
1.1 Características de las ATPasas tipo P.	5
1.2 Ciclo Catalítico de la ATPasa de Calcio.	6
1.3 Genes que Codifican para la PMCA e Isoformas Generadas por Edición Alternativa.	9
1.4 Topografía de la ATPasa de Calcio de la Membrana Plasmática.	14
1.5 Posibles Mecanismos de Regulación de la ATPasa de Ca ²⁺ Hepática	16
1.6 Isoformas de la PMCA Reportadas en Células Hepáticas.	20
1.7 Metabolismo del Calcio en Células Hepáticas Tumorales.	21
1.8 Metabolismo del Calcio en Células Hepáticas Durante la Regeneración.	22
2. OBJETIVOS E HIPOTESIS	28
3. MATERIAL Y METODOS	
3.1 Análisis de la Biblioteca de DNAC del Hepatoma AS-30D.	30
3.2 Análisis de la Expresión de los RNAm del Hígado de Rata en Diferentes Estadios de Desarrollo.	34
i) Amplificación de DNA Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	36
ii) Hibridaciones DNA-DNA	37
3.3 Transferencia de Proteínas (Análisis tipo Western).	46
4. RESULTADOS	
4.1 Clonas Aisladas por Análisis de la Biblioteca de DNAC.	48
4.2 Análisis de la Expresión de los RNAm del Hígado de Rata en Diferentes Estadios de Desarrollo	50
4.3 Análisis de la Expresión a Nivel de Proteínas.	55
5. DISCUSION	58
6. CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	68

RESUMEN

La ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) es una enzima ubicua de células eucariontes que mediante la hidrólisis de ATP, transporta calcio hacia el espacio extracelular. Esta enzima es codificada por cuatro genes que por edición alternativa principalmente en los sitios A y C, generan una diversidad de isoformas. El sitio A se localiza próximo al extremo amino y tiene relación en la interacción con fosfolípidos ácidos, el sitio C está cercano al extremo carboxilo e incluye el dominio de unión de calmodulina. Nosotros hemos mostrado previamente que la actividad cinética de la PMCA en el hepatocarcinoma AS-30D es significativamente menor que en el hígado normal (Mas Oliva y col., 1991). El objetivo central de este estudio fue el investigar si dicho comportamiento pudiera deberse a la subexpresión de algún RNAm o a la expresión de una isoforma desconocida de la ATPasa. Por análisis de una biblioteca de DNAc construida a partir del hepatoma AS-30D, sólo detectamos la isoforma PMCA1. En segunda instancia, analizamos por RT-PCR la expresión de los genes 1 y 4 editados a nivel de sitio A y C en varios estados de desarrollo, así como en hígado en regeneración y en el tumor AS-30D. Las variantes 1b y 4b son las consideradas constitutivas, aún en el tejido tumoral. Sin embargo, cualitativamente nuestras amplificaciones por PCR indican una expresión menor de la isoforma constitutiva 4b en el hepatoma y una expresión menor o nula de algunas otras isoformas con respecto al hígado normal. Aparentemente la isoforma más abundante en el hepatoma es la variante 1x, con niveles muy similares a los de la totalidad de las muestras, seguida por la variante 1b. Encontramos a la isoforma 4d sólo en el hígado normal y en regeneración, dicha isoforma ha sido reportada previamente por nuestro grupo en humanos (Santiago y col., 1996). Nuestros datos sugieren que nuestros hallazgos cinéticos previos puedan atribuirse a la combinación particular de isoformas de PMCA observadas en el tejido tumoral. A nivel de proteínas, encontramos una relación ATPasa/proteína total mayor en el tejido tumoral con respecto al hígado normal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUMMARY

The plasma membrane calcium ATPases (PMCA) are ubiquitous enzymes of eucaryotic cells that through the hydrolysis of ATP release calcium to the extracellular space. These enzymes are encoded by four genes that through alternative splicing, mainly at splice sites A and C, produce a large diversity of isoforms. Site A is located very close to the amino terminal end and is involved in the interaction with acidic phospholipids. Site C is close to the carboxyl terminal end and it includes the calmodulin binding domain. Previously, we showed that PMCA kinetic activity in AS-30D hepatocarcinoma cells is significantly lower than that in normal rat liver (Mas Oliva, 1991). The goal of the present study has been to investigate if that behavior could be related to a down-expression of some mRNA encoding this enzyme, or to the expression of some unknown isoform. By screening of a cDNA library constructed from an AS-30D cell line, we only found the isoform PMCA1. Second, we analyzed the expression of genes 1 and 4 at the splice sites A and C by RT-PCR at different developmental stages, as well as in regenerating liver and in the hepatocarcinoma cell line AS-30D. PMCA1b and 4b variants are constitutive isoforms in normal and transformed cells. However, our results qualitatively suggest a lower expression of the isoform 4b in the AS-30D cell and a low or absent expression of other isoforms in comparison to normal liver. Apparently, the highest expressed isoform in the hepatoma was the 1x with quite similar levels in all the samples, followed by the isoform 1b. We found in normal liver as well as in regenerating liver, the isoform 4d previously reported by our group in humans (Santiago, 1996). We suggest the possibility that our previous kinetic results could be explained by the specific group of PMCA isoforms observed in the tumor tissue. At the protein level, we found a higher ATPase/total protein ratio in the tumor tissue than in the normal liver.

1. INTRODUCCION

Dada la amplitud del tema de este trabajo, se desglosará el marco teórico en varios subtemas. Se hablará brevemente de los sistemas que mueven Ca^{2+} en la célula, con énfasis en las ATPasas tipo P y describiendo el ciclo catalítico de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Enseguida, se describen los genes implicados en la codificación de la misma ATPasa y el modelo topológico más aceptado para esta proteína. Por último, se centrará la atención en los posibles mecanismos de regulación e isoformas de la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática ya descritas en hígado, así como en el papel que juega el Ca^{2+} en los modelos estudiados en este trabajo; es decir, en células hepáticas tumorales y en regeneración.

La gran diversidad de funciones en las que participa el calcio, es conocida en nuestros días, de ahí que sea considerado un segundo mensajero fundamental en los sistemas biológicos, y por lo tanto, requiera de finos mecanismos que regulen su concentración intracelular. En el interior de la célula, este catión se encuentra en concentraciones del orden nanomolar, en tanto que extracelularmente su concentración se eleva al rango milimolar.

Las proteínas que unen calcio se pueden clasificar en dos grupos: uno, el de las proteínas membranales que gobiernan el paso de calcio en el citoplasma hacia el exterior de la célula; otro grupo corresponde a las proteínas solubles del citoplasma y los mismos organelos cuya función principal es la de actuar como intermediarios para activar otras proteínas (Sjölin, 1996). Las limitaciones cuantitativas de las proteínas solubles en lo concerniente a la función amortiguadora del calcio, no aplican para las proteínas intrínsecas de membrana, las cuales forman complejos con calcio en un lado de la membrana, lo transportan y repiten la operación de manera continua (Carafoli y col., 1997).

Para el mantenimiento de las bajas concentraciones intracelulares de este catión, la célula cuenta con un delicado balance a cargo de canales de calcio, un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la bomba de calcio, todos estos sistemas presentes en la membrana plasmática. De ellos, la bomba de calcio es el de mayor afinidad por el catión ya que su

Km es de alrededor de 0.5 μM o menor, sin embargo, es un sistema de baja capacidad pues transporta 0.5 nmol/mg de proteína de membrana/seg, de manera que responde rápidamente a elevaciones en la concentración intracelular de este catión, regulando finamente sus concentraciones (Carafoli, 1997). La ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico (SERCA) también tiene una alta afinidad por Ca^{2+} , pero su capacidad de transporte es mayor, por ejemplo la ATPasa de músculo esquelético rápido con una Km menor a $0.5\mu\text{M}$, transporta 70 nmol/mg/seg (MacLennan, 1970). A pesar de que el Ca^{2+} que atraviesa la membrana plasmática dispara eventos intracelulares fundamentales, el calcio necesario para la actividad celular es extraído de los almacenamientos intracelulares como son el retículo endoplásmico, las mitocondrias e inclusive el núcleo (Fig. 1).

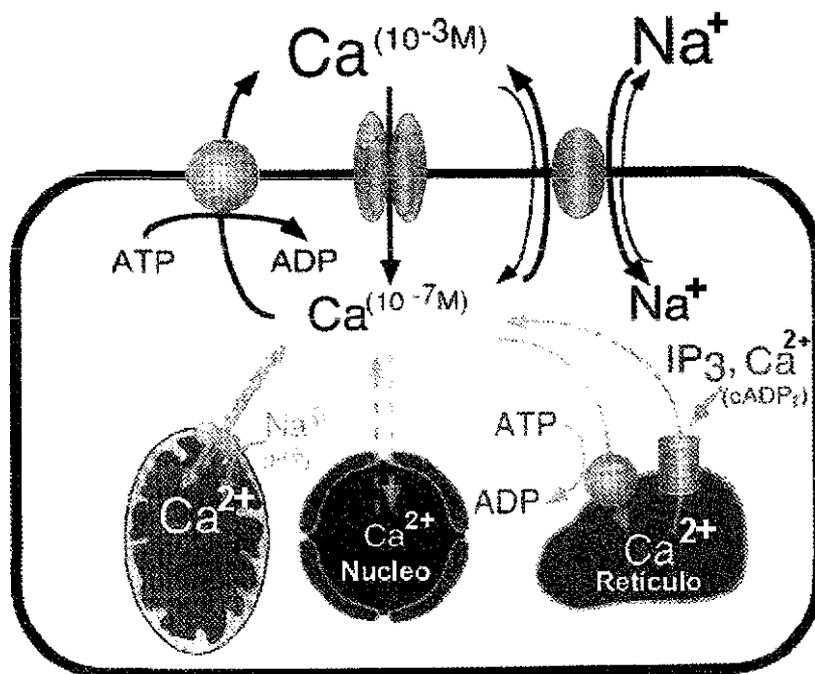


Figura 1. Sistemas amortiguadores de la concentración intracelular de calcio en la célula eucariote (Tomado de Carafoli y col., 1997).

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS ATPasas TIPO P

La ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA, por sus siglas en Inglés) fue descrita en el eritrocito humano por Schatzmann en 1966. A pesar del hecho de que usualmente esta enzima representa sólo del 0.01-0.1% de la proteína total de membrana (Knauf y col., 1974), en la actualidad se reconoce su amplia distribución en células eucariontes y está muy bien caracterizada bioquímica y molecularmente. La familia de las bombas de calcio consta de más de 20 proteínas distintas (Keeton y col., 1995). En humanos podrían resultar entre 20 y 30 isoformas distintas producto de los 4 genes y solo 2 sitios de edición alternativa (Hilfiker y col., 1994).

La bomba de calcio de la membrana plasmática tiene las siguientes características (Carafoli, 1992):

- i) Requiere una baja concentración de calcio libre por lo que se considera un sistema de alta afinidad y es regulada directamente por calmodulina (CAM).
- ii) Requiere de magnesio y calcio como cofactores.
- iii) Su peso molecular oscila entre 134 y 140 kD.
- iv) Forma un intermediario fosforilado de manera dependiente de calcio.
- v) Es inhibida por vanadato y lantano.
- vi) La estequiometría $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ es de 1.



De manera similar a las ATPasas tipo E1-E2, la formación de un aspartil-fosfato o intermediario fosforilado (IF) determina el criterio de la clasificación de esta enzima dentro de las ATPasas tipo P (Pedersen y col., 1987). Con E1-E2 se denotan las dos conformaciones de alta y baja afinidad por calcio que se ha propuesto adopta la enzima durante su ciclo catalítico (Fig. 2). Otras enzimas importantes que pertenecen a este grupo son la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y la ATPasa de calcio de retículo endosarcoplásmico.

Respecto al papel de CAM, se sabe que esta proteína moduladora no es activa por sí misma sino que forma complejos $\text{Ca}^{2+}\text{-CAM}$ (Teo y col., 1973; Lin y col., 1974) teniendo capacidad para unir 4 iones de Ca^{2+} . Cuando el catión se le une, CAM adopta una conformación tal que permite hacer activo al complejo (Liu y col., 1976; Dedman y col., 1977). Se propone que la unión de Ca^{2+} induce un cambio conformacional, de manera

similar a lo que ocurre con la troponina C, que expone zonas hidrofóbicas en la superficie de la proteína (La Porte y col., 1980; Tanaka y col., 1980; Manalan y col., 1984; Babu y col., 1985). Como se ha mencionado, CAM tiene la propiedad de estimular directamente a la ATPasa (Vincenzi y col., 1980) a través de un efecto combinado sobre la K_m y V_{max} de la enzima, aunque siendo predominante el efecto sobre la primera. En presencia de concentraciones óptimas de CAM (1 nM), la K_m basal para calcio de la ATPasa de 20 μM , disminuye a 0.5 μM (Niggli y col., 1981). La estrecha afinidad de la enzima por CAM, ha sido aprovechada metodológicamente para purificar exitosamente la enzima mediante cromatografía de afinidad con columnas de Sepharosa acopladas con CAM (Niggli y col., 1979).

En ausencia de CAM, la enzima alcanza la mitad de su activación máxima en presencia de fosfolípidos ácidos o ácidos grasos poli-insaturados (Ronner, 1977; Niggli, 1981) situación que *in vivo* podría ser relevante, dada la presencia de estos lípidos en el interior de las membranas. Otros tratamientos alternativos que activan a la ATPasa son tratamientos proteolíticos (Enyedi y col., 1980; Caroni y col., 1981; Zurini y col., 1984), la fosforilación por proteínas cinasas A, C o G (PKA Caroni y col., 1981; PKC, Furukawa y col., 1989; Wright y col., 1993). La activación mediada por proteína cinasa G ocurre a través de un mecanismo indirecto vía fosforilación de una proteína de 240 kD (Yoshida y col., 1991), y por inducción de un estado oligomérico (Kosk-Kosicka y col., 1988). Todos estos procedimientos ocurren a través de un efecto predominante sobre la K_m de la enzima (Carafoli, 1992).

Respecto a la estequiometría $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ se sabe que aún cuando desde el punto de vista termodinámico cabe la posibilidad de que esta relación pudiera ser igual a 2. Los datos experimentales de la enzima *in situ* (Schatzmann, 1973), o reconstituida en liposomas (Niggli y col., 1981) apoyan una estequiometría de 1.

1.2 CICLO CATALITICO DE LA ATPasa DE Ca^{2+}

La energía necesaria para el transporte de calcio hacia el medio extracelular, se obtiene de la hidrólisis de ATP. Esta hidrólisis ocurre por una serie de pasos que involucran transiciones conformacionales y la formación e hidrólisis cíclica de una fosfoenzima o intermediario fosforilado (IF). El IF en preparaciones de membranas o en la

enzima pura tiene una estabilidad máxima a un pH cercano a 1 (Rega y col., 1975; Lichtner y col., 1980). Los eventos del ciclo, se han estudiado mediante técnicas de cinética rápida (stop-flow) que tienen poder de resolución en el orden de milisegundos, i.e. cuando la reacción está en condiciones pre-estacionarias. La estabilidad del IF a un pH ácido, permite que las reacciones de cinética rápida se detengan con soluciones ácidas, sin dañar a la fosfoenzima. Brevemente, los pasos del ciclo catalítico son: fosforilación, fosforilación reversa, desfosforilación, transición del IF en sus dos estados conformacionales ($E1\sim P \leftrightarrow E2\sim P$) y la transición $E2 \leftrightarrow E1$ (Fig. 2).

La fosforilación ocurre en presencia de calcio en el medio de reacción y la enzima se encuentra como el confórmero E1 de alta afinidad por calcio y que aparentemente se orienta hacia el lado interno de la membrana plasmática. El magnesio estimula este paso promoviendo que la reacción alcance el estado estacionario a tiempos más cortos. Se postula que la fosforilación requiere ATP en el sitio de alta afinidad y de calcio en el sitio de transporte de la ATPasa, y que el sitio de alta afinidad por ATP representa el sitio catalítico de la enzima (Garrahan, 1986).

Cuando la fosforilación se detiene por dilución isotópica de ATP marcado, la fosfoenzima decae rápidamente. El decaimiento se acelera por ADP cuyo efecto es dependiente de calcio (Rega y col., 1978). Posiblemente el efecto de ADP signifique la capacidad del IF para transferir su fosfato al ADP y regenerar ATP invirtiendo la reacción. Trabajo previo de nuestro grupo, ha demostrado que la reacción de fosforilación durante la cual ocurre la hidrólisis de ATP, puede invertirse para producir ATP a partir de $P_i + ADP$, cuando se usan concentraciones milimolares de calcio y medios con hidrofobicidad aumentada (Mas-Oliva y col., 1983; Mas-Oliva, 1985). Por estudios de cinética rápida hemos encontrado que en la ATPasa de sarcolema, el IF alcanza más pronto su nivel estacionario cuando se preincuba sin CAM. En la etapa pre-estacionaria, se encontró que CAM en tiempos cortos aumenta la concentración del IF, pero su velocidad de formación es más lenta que en ausencia de CAM. Paralelamente se encontró que la liberación de P_i en ausencia de CAM muestra un retraso mayor seguido a la formación del IF con respecto a la liberación de P_i que se forma en presencia de CAM (Oliva, 1996).

La formación de $E1\sim P$ es una reacción endergónica que a pesar de que se estimula por magnesio, procede hacia la siguiente reacción del ciclo, probablemente

favorecida por el carácter exergónico de la reacción $E_2\sim P \rightarrow E_2 + P_i$. Respecto a la desfosforilación del IF, hemos demostrado que CAM es capaz de acelerar la desfosforilación del IF en la ATPasa de calcio de retículo sarcoplásmico (Mas-Oliva y col., 1992) y en la ATPasa de eritrocitos humanos (Delgado-Coello y col., 1996).

La transición $E_1\sim P \leftrightarrow E_2\sim P$ es un evento compuesto de dos reacciones que requieren magnesio pero no de ATP, ni de calcio. El primer paso involucra una transición conformacional que conduciría al IF desde la forma $E_1\sim P$ sin alterar su estructura covalente. El segundo paso implica la hidrólisis del IF, suponiendo que sólo $E_2\sim P$ sufre hidrólisis y que una vez que interviene magnesio en el cambio conformacional, la velocidad de desfosforilación aumenta cuando ATP se une en algún sitio de $E_2\sim P$ cuya afinidad es mucho menor que la del sitio al que se une ATP para promover la fosforilación. A bajas concentraciones de ATP, su sitio en $E_2\sim P$ estaría desocupado, la reacción es muy lenta y el magnesio es inefectivo. Dado que la catálisis de la hidrólisis de ATP puede explicarse por la transferencia del fosfato- γ del ATP a la enzima, el ATP actuaría en $E_2\sim P$ como un modificador sin sufrir hidrólisis (Garrahan, 1986). La transición $E_2 \leftrightarrow E_1$ es menos conocida, pero se sabe que no requiere calcio y es favorecida por ATP tanto en la ATPasa de calcio de membrana plasmática (Carafoli y col., 1982; Rega y col., 1986), como en la de retículo sarcoplásmico (de Meis, 1981) y en la bomba Na^+-K^+ (Schuurmans y col., 1981).

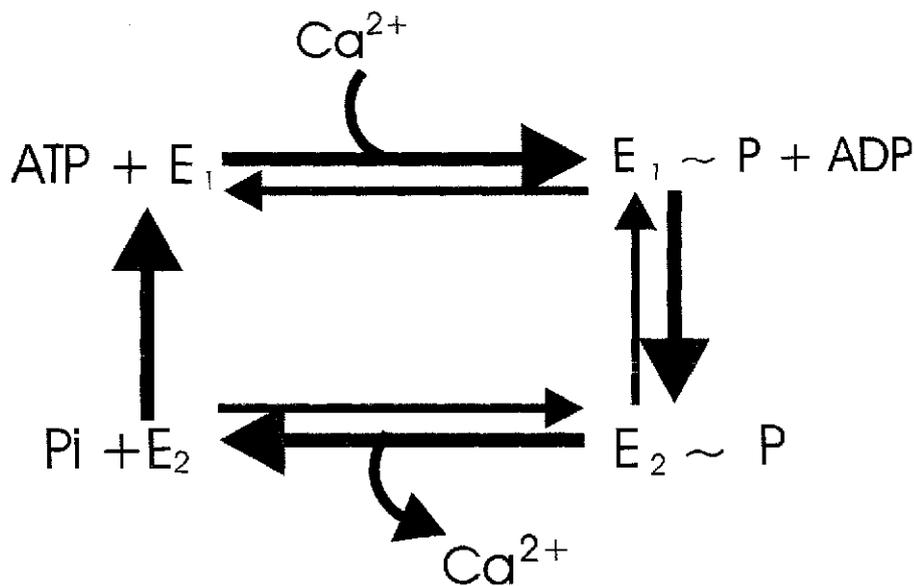


Figura 2. Ciclo catalítico abreviado de la ATPasa de calcio de la membrana plasmática.

1.3 GENES QUE CODIFICAN PARA LA PMCA E ISOFORMAS GENERADAS POR EDICION ALTERNATIVA

La bomba de calcio es codificada por 4 genes que en el humano, han sido mapeados y localizados en los cromosomas 12 (isoforma 1), 1 (isoforma 4) (ambas descritas por Olson y col., 1991), 3 (isoforma 2, Brandt y col. 1992; Latif y col., 1993) y la isoforma 3 en el cromosoma X (Carafoli, 1993; Wang y col., 1994).

Además, existe una variedad de isoformas que son generadas por edición alternativa de los transcritos primarios. Teóricamente, dicha edición ocurre en 4 sitios (A-D) de los cuales los más importantes son A y C. Una generalización útil es que las isoformas difieren esencialmente en la región C-terminal reguladora. Por otro lado, las regiones importantes para la función catalítica como el sitio de unión a ATP, el sitio de fosforilación y los motivos estructurales involucrados en el patrón de plegamiento son altamente conservados lo que significa que la diversidad de isoformas no involucra los arreglos transmembranales y las unidades que protruyen hacia el citoplasma (Carafoli, 1992). Las isoformas correspondientes de humano y rata tienen una similitud de 97-99% en su secuencia de aminoácidos, mientras que las isoformas dentro de una misma especie muestran entre un 85% y un 90% de similitud en su secuencias primarias (Strehler, 1991).

El sitio A de edición ubicado hacia el extremo amino, está relacionado con el producto del gen 2 e incluye exones que codifican residuos cercanos a un dominio sensible a fosfolípidos. El sitio B involucra al dominio transmembranal 10, lo que afectaría la topología de la enzima dejando un número impar de cruces a través de la membrana. El sitio C abarca el sitio de unión a CAM y se localiza en el extremo carboxilo y D, involucra el sitio de unión de la proteína cinasa A (Fig. 3). Cabe decir que de las isoformas resultantes de los sitios B y D, sólo se cuenta con evidencias basadas en reportes de DNAC deletados hallados en humano y rata, respectivamente. Sin embargo, por las implicaciones topológicas de la enzima y fisiológicas de su expresión, es necesario corroborar su existencia real pues incluso se ha sugerido que pudiera existir algún artefacto de clonación o que estas variantes resulten de un edición aberrante (Stauffer y col., 1993; Keeton y col., 1993; Santiago y col., 1996). Los cuatro productos básicos han sido clonados, pero sólo 3 se han expresado y estudiado funcionalmente (Heim y col.,

1992; Hilfiker y col, 1994; Stauffer y col., 1993). La isoforma 3 es la que aún no se ha expresado (Carafoli y col., 1997).

La primera letra de las isoformas, designa la especie a que corresponde por ejemplo: "r" para rata y "h" para humano, después se indica PMCA y enseguida un número que identifica los diferentes productos génicos y una letra minúscula que indica la isoforma editada. Cada letra sucesiva se refiere al tiempo de publicación (Shull y col., 1988; Strehler y col., 1990). Para las isoformas con edición alternativa en el sitio A o en el sitio C, dichas letras minúsculas suelen ser las letras finales o iniciales del alfabeto, respectivamente.

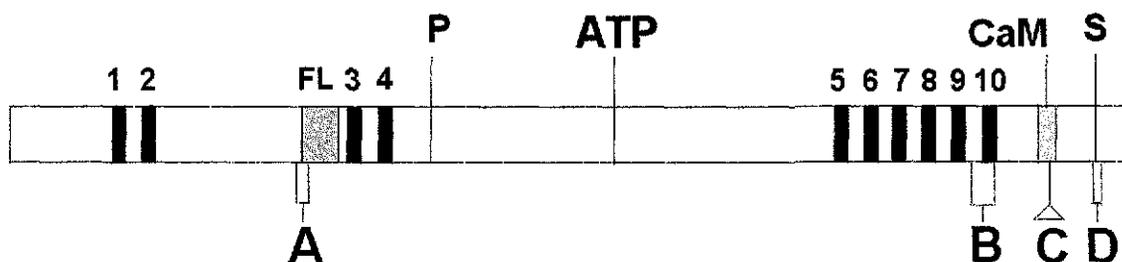


Figura 3. Diagrama de la secuencia de la PMCA y sitios potenciales de edición alternativa (A-D). Se muestran los 10 dominios transmembranales, el sitio de fosforilación (P), el de unión de FITC/ATP, los dominios A y B que unen CAM, la región de estimulación por fosfolípidos (FL) y el sitio de fosforilación por cinasa A (S).

Los 4 genes codificantes a excepción del gen 1, producen formas alternativas a nivel de sitio A (Fig 4.A). La isoforma conocida del gen 1 es llamada 1x. En el gen 2, las distintas combinaciones de sus tres exones (de 33, 60 y 42 pb) generan en humano la variante 2z que no incluye ningún exón, 2x que incluye al exón de 42 pb, y 2w que incluye 135 pb, i.e. los 3 exones (Stauffer y col. 1993). En algunos tejidos de rata se encuentra la variante 2y en la que pueden incluirse solo los exones de 33 y 60 pb (Adamo y col., 1992). Del gen 3 por inclusión o exclusión de un fragmento de 42 pb, se producen las variantes 3x y 3z, respectivamente (Stauffer y col., 1993). Del gen 4 se conocen dos formas: la variante 4x que incluye un exón de 36 pb y la variante que no lo incluye, la 4z (Stauffer y col., 1993; Keeton y col., 1995). La variante 4z se ha reportado en humano, específicamente en corazón (Stauffer y col., 1993).

A nivel de sitio C (Fig 4.B), el gen 1 de humano produce una variante que incluye un exón de 154 pb que con cuatro sitios donadores internos en posiciones 87, 114, 152 y

154, que dan lugar a 5 variantes (1a-1e) en humanos. El gen de rata tiene un exón similar de 154 pb y aparentemente se edita de una manera semejante (Adamo y col., 1992). Del gen 2 sólo se producen dos variantes por inclusión (2a) o exclusión (2b) de un exón de 227 pb, el cual a su vez se compone de 2 exones de 172 y 55 nucleótidos respectivamente. El gen 3 comprende 2 exones de 154 y 68 pb que pueden a su vez dar lugar a tres variantes, sin inclusión (3b), la que incluye al exón de 154 pb (3a) y la que incluye a ambos (3g). La variante 3e se ha descrito en rata y se genera por una variante surgida de un sitio donador interno al exón de 154 pb. En humanos, las variantes 4a y 4b se originan por la inclusión y exclusión de un exón de 154 pb, respectivamente. Nuestro grupo ha descrito una variante más en sitio B/C en humanos, denominada 4d que contiene el exón en el sitio B con un corte en el exón en sitio C en el mismo sitio aceptor que la isoforma 4a pero en este caso, usando un sitio donador interno a 108 pb del comienzo del exón C (Fig. 5) (Santiago y col., 1996). En general, la edición alternativa en sitio C puede originar proteínas con sensibilidad distinta a CAM y con una región COOH terminal distinta.

La coordinación entre la expresión de los distintos exones puede ocurrir con objeto de construir una bomba de calcio que reúna requerimientos óptimos y específicos para la regulación del calcio intracelular en los diferentes tejidos a través del desarrollo (Adamo y col., 1992).

La distribución de estas isoformas muestra que éstas siguen un patrón tejido-específico, lo cual es claro en las isoformas PMCA1a-PMCA1d. La distribución de PMCA4a es idéntica que la de PMCA1b y ambas se han encontrado en todos los tejidos estudiados por lo que se consideran formas originadas de genes constitutivos (housekeeping genes) de la enzima. Las isoformas 1c y 4a se encuentran en tejidos excitables, 1d se ha reportado en músculo esquelético y corazón específicamente (Hammes y col., 1994). La variante PMCA2 se ha detectado en hígado, glándulas adrenales, médula espinal y cerebro. PMCA3a se encuentra en médula espinal y la 3b en timo, glándulas adrenales, médula espinal y cerebro. De las formas especializadas, se han encontrado subespecializaciones a nivel de regiones cerebrales y más aún, de tipos neuronales, por ejemplo en las células de Purkinje se han descrito cantidades importantes

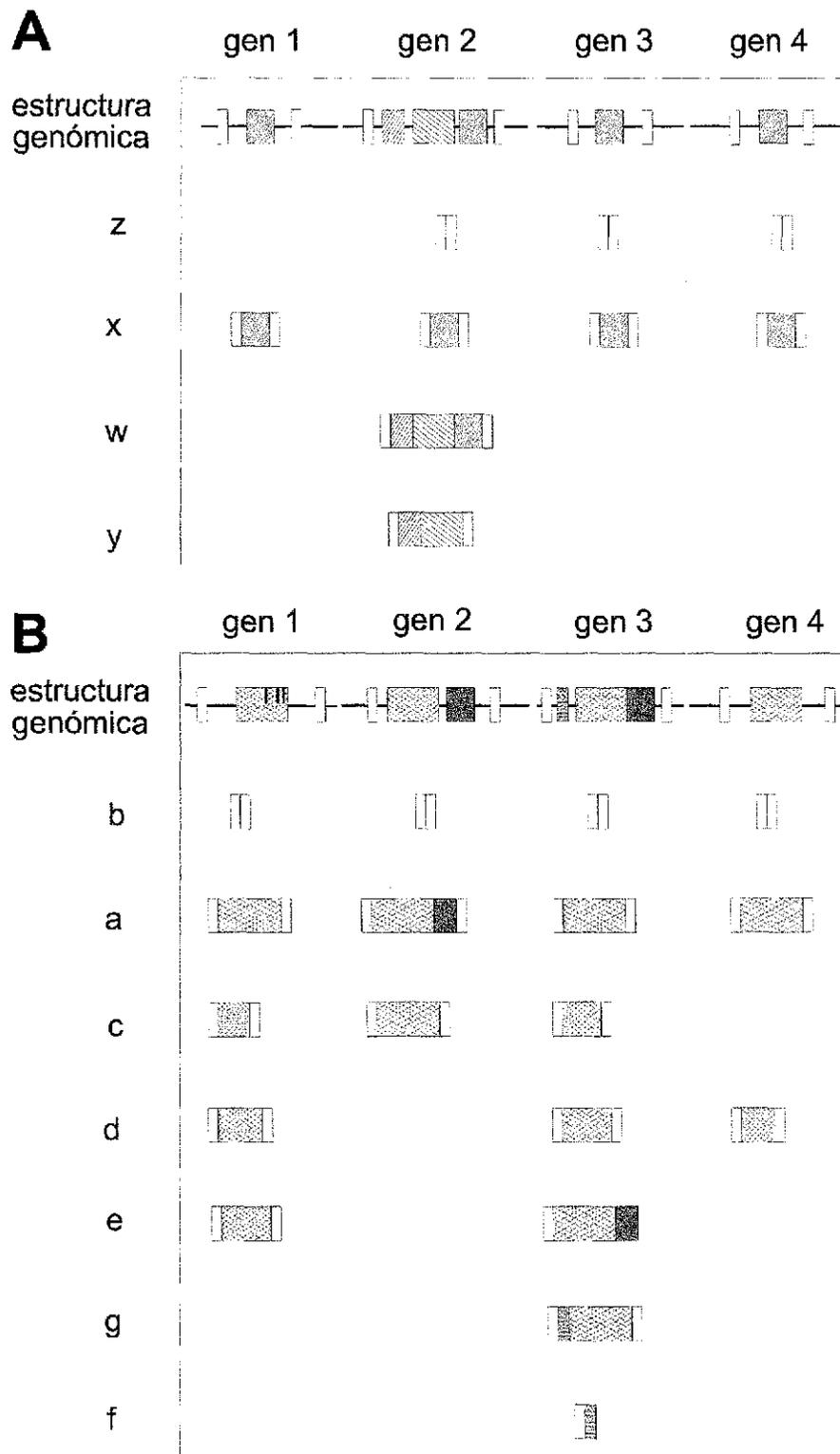


Figura 4. Esquema de las variantes generadas por edición alternativa de los genes codificantes para la PMCA. **A)** Variantes a nivel de sitio A. **B)** Variantes a nivel de sitio C. (Modificado de Stauffer y col., 1993).

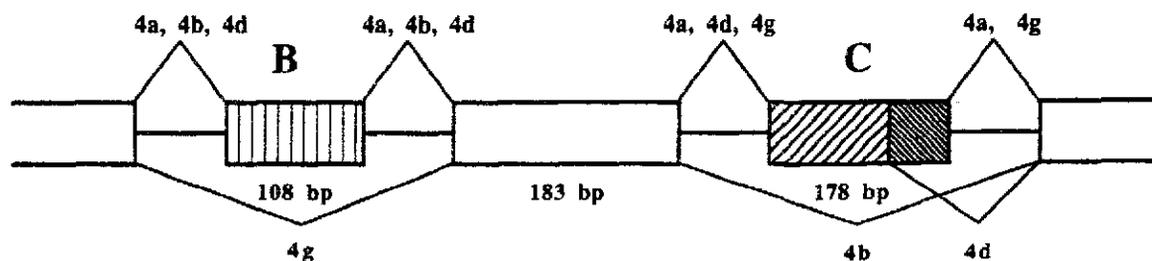


Figura 5. Esquema del patrón de edición de la isoforma hPMCA4 en los sitios B y C. Los exones de la región COOH terminal, se representan por cajas sombreadas. En el sitio C de edición, se resalta la variante 4d descrita en corazón de humano fetal y adulto (Tomado de Santiago y col., 1996).

de la isoforma 2 en tanto que la isoforma 3 es típica de los plexos coroideos (Stauffer y col., 1995).

En general, estas isoformas muestran diferencias no sólo en su distribución tejido-específica, sino también en sus características cinéticas. Las características de las isoformas básicas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades de las isoformas de la PMCA*.

	PMCA1	PMCA2	PMCA3	PMCA4
Distribución	ubicua	cerebro	cerebro	ubicua
Nivel de expresión en rata y humano	alto	alto	bajo	medio
Cambios de expresión	cambio fetal/adulto	cambio fetal/adulto	subregulada en tejidos adultos	cambio fetal/adulto
KdCAM ^a	40-50 nM	8-10 nM	ND	40-50 nM
KdATP ^b	0.1 µM	0.2-0.3 µM	ND	0.7 µM
τ de degradación por calpaína	2-4 min	50-55 min	ND	50-55 min

ND= dato no disponible

^a La forma analizada fue C1, i.e. sin inserto en el sitio C que incluye el dominio de unión de CAM.

^b Se determinó de la formación de fosfoenzima.

* Tabla tomada de Carafoli y col., 1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Si se analiza la distribución de las isoformas en una forma más fina, encontramos que las formas de distribución amplia son en sitio A: 1x y 4x, y a nivel de sitio C: las variantes 1b y 4b (Stauffer y col., 1993).

1.4 TOPOGRAFIA DE LA ATPasa DE Ca^{2+} DE LA MEMBRANA PLASMATICA

A pesar de que aún no se cuenta con estudios cristalográficos específicos de la PMCA, una estructura similar unifica a las ATPasas tipo P como grupo, ya que su organización tridimensional parece ser común para todos sus miembros. De acuerdo a un modelo dilucidado inicialmente para la SERCA a partir de la secuencia de aminoácidos (MacLennan y col., 1985), la proteína está formada por 10 dominios transmembranales de los cuales un 80% de la masa total, representado por 4 unidades, se orienta hacia el lado citoplásmico de la membrana (Fig. 6). El 20% extracelular, consta de pequeñas asas que interconectan los dominios transmembranales. La estructura cristalina de la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico a una resolución de 14 Å muestra que pueden incluirse 10 segmentos transmembranales (Stokes y col., 1994). Recientemente, este modelo ha sido confirmado mediante la cristalización de la SERCA a una resolución de 2.6 Å (Toyoshima y col., 2000) Por otro lado, estudios de transcripción/traducción *in vitro* han proporcionado evidencia de 8 ó 9 de los 10 u 11 segmentos transmembranales considerados en los modelos topológicos actuales para las ATPasas de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico y de retículo endoplásmico, respectivamente (Bayle y col., 1995).

La primera unidad ubicada del lado citoplásmico es el extremo amino terminal que consta de 90 a 100 residuos, dependiendo de la isoforma que se trate. La segunda unidad, cuya función es desconocida, abarca uno de 2 sitios de unión para fosfolípidos ácidos. La tercera protruye del dominio transmembranal 4 que contiene el sitio activo de la enzima, esto es, el sitio de fosforilación del Asp que forma una unión covalente con el fosfato gamma del ATP y el dominio ubicado hacia el carboxilo terminal que une ATP el cual contiene a su vez, una lisina conservada. La última unidad, protruye de la última hélice transmembranal que contiene los sitios de unión a CAM, los sitios consenso de fosforilación por PKA y PKC (éste contiene un residuo de treonina común a todas las isoformas) y los sitios de unión a calcio que posiblemente modulan la actividad de la bomba.

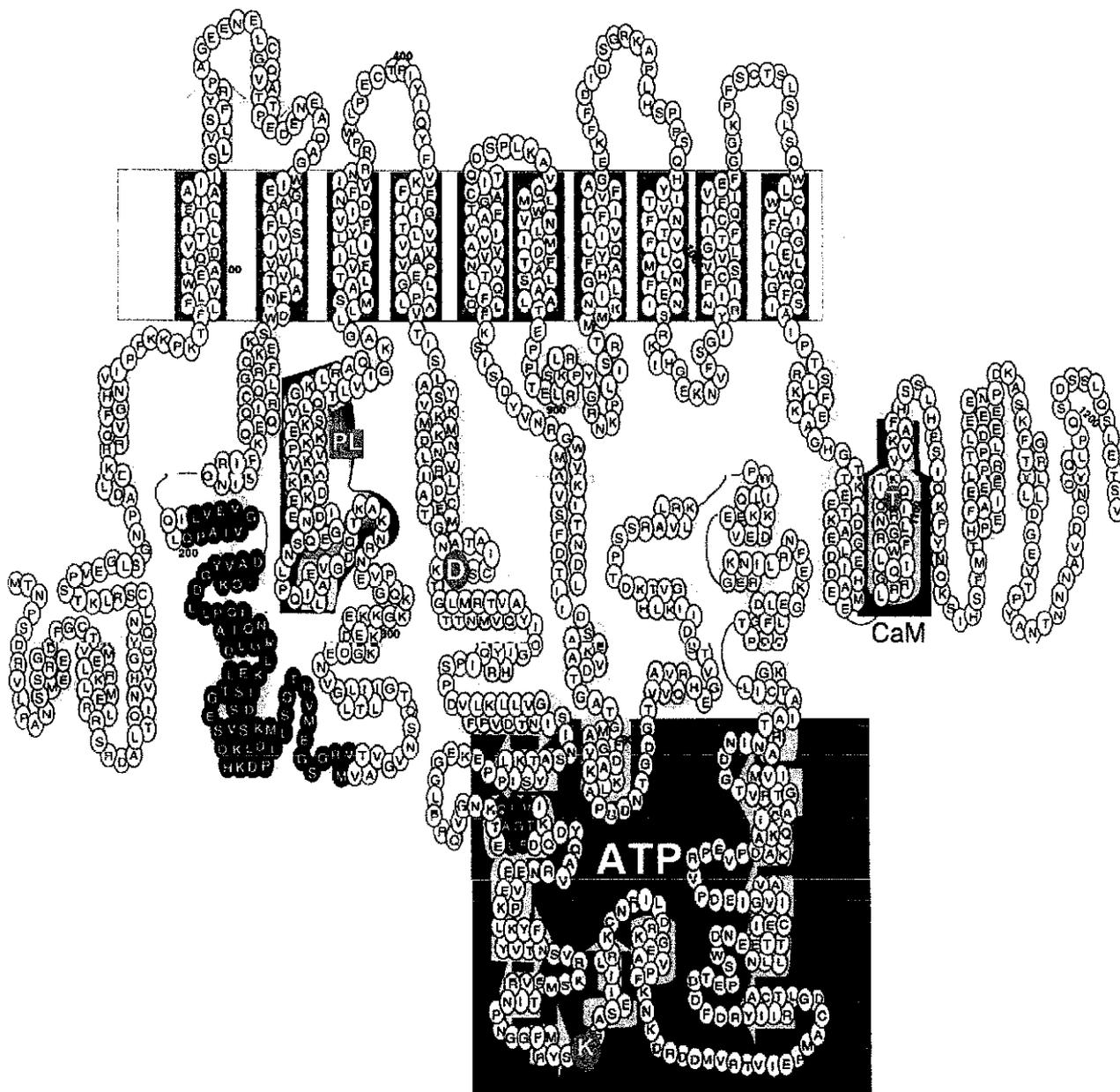


Figura 6. Modelo topológico de la PMCA donde se muestra la estructura primaria y la estructura secundaria para esta enzima. En la región extracelular destacan las asas que conectan los 10 dominios transmembranales. En la región citoplásmica; CAM representa el dominio de unión a calmodulina, donde se resalta el residuo de treonina fosforilado por protein cinasa C. PL es una secuencia que interacciona con fosfolípidos ácidos. Los dos dominios en negro son los "receptores" para el dominio autoinhibitorio de unión a CAM. La región sombreada y encerrada en un cuadro (ATP) es parte de la bomba donde el ATP se une, resalta un residuo conservado de lisina. D es el sitio de fosforilación. (Tomado de Carafoli y col., 1997).

La unidad carboxilo terminal de la bomba tiene aparentemente una función autoinhibitoria lo cual ha sido apoyado por experimentos de proteólisis. Por análisis de los fragmentos producidos por incubación de la enzima con tripsina, se encontró que hay pérdida de porciones C terminales. Estos fragmentos corresponden a segmentos que protruyen de la membrana y que contienen el dominio de unión a CAM (Zurini, 1984; Benaim y col., 1984; Zvaritch y col., 1990). En consecuencia la bomba no responde a CAM y se mantiene activada de forma permanente en su ausencia, es por ello que se piensa que el dominio de unión a CAM puede funcionar como inhibidor de la actividad enzimática. Existen datos obtenidos con una proteasa intracelular llamada calpaína (Murachi, 1983), que pudieran ser importantes *in vivo* pues ésta es dirigida preferencialmente a proteínas que unen CAM (Wang y col., 1989). La activación por esta proteasa, se relaciona con el corte en dos pasos de la bomba en el inicio del dominio de unión a CAM (James, 1989). En suma, CAM retrasa la proteólisis y altera el patrón de corte por lo que se sugiere que *in vivo*, en presencia de CAM, el patrón de degradación sería modificado. Además, la digestión de la bomba *in situ* es más rápida y completa, i.e. sin la formación del fragmento de 124 kD característico de la degradación por calpaína (Wang y col., 1989; James y col., 1989). El mecanismo de inhibición se ha estudiado con ayuda de un derivado sintético fotoactivable del dominio de unión a CAM, el cual ha permitido identificar las zonas adicionales de interacción. Los sitios identificados se localizan entre los sitios de unión de la fosfoenzima y ATP (sitio FITC), otro más, está en la unidad entre los dominios transmembranales 2 y 3. Tridimensionalmente, se apreciaría cómo se pliega la región C-terminal de la bomba manteniendo juntas la segunda y tercera unidades citoplásmicas inhibiendo así a la bomba en ausencia de CAM (Falchetto y col., 1991; Falchetto y col., 1992). Después CAM interactúa con su dominio de unión y lo aleja de sus sitios receptores, relevando la inhibición.

1.5 POSIBLES MECANISMOS DE REGULACION DE LA ATPasa DE Ca^{2+} HEPATICA

La fisiología del hígado es sumamente compleja dado que desempeña funciones como órgano efector y también como órgano sensor (Kietzmann y col., 1997). Dentro de las funciones del hígado como efector, resaltan su papel como centro metabólico, como

centro de defensa desde el punto de vista de que procesa y elimina agentes xenobióticos (por ejemplo, drogas), además de que los macrófagos residentes realizan fagocitosis o los linfocitos granulares grandes que se encargan de eliminar células tumorales que pudieran detectar. El hígado actúa también como estación de control hormonal sintetizando y liberando precursores y mediadores hormonales, y funciona como reservorio sanguíneo. El hígado se considera órgano sensor pues reporta el suministro de nutrientes a los centros del hipotálamo, es decir, contribuye al control de la ingesta de alimentos.

A pesar de su aparente uniformidad histológica, a nivel morfométrico e histoquímico, el hígado es bastante heterogéneo. Esta heterogeneidad se relaciona con la microcirculación, pues las células periportales y las perivenosas poseen un repertorio distinto de enzimas, translocadores, receptores y estructuras subcelulares que marcan también distintas capacidades funcionales (Kietzmann y col., 1997). Un fenómeno que ocurre en el tejido hepático formado de células típicamente quiescentes, después de diferentes estímulos, es la regeneración que hace a este órgano, un objeto de interés de muchos laboratorios de investigación.

La información previa nos da una idea general de lo que hasta la fecha se conoce de la isoformas de la PMCA. En el caso específico del hígado nos encontramos con una enzima que no es activada por CAM y su peso es 10 kD mayor al promedio reportado para la generalidad de las ATPasas de calcio que es de 134 kD (Kessler y col., 1990).

Lo anterior ha dificultado su purificación por el método convencional, así que mediante cromatografía de inmunoafinidad con un anticuerpo monoclonal dirigido contra una secuencia conservada de la ATPasa de eritrocito (clona 5F10) se ha logrado su purificación (Kessler y col., 1990). Cabe mencionar que aunque la enzima no responde a CAM, sí cuenta con un dominio de unión de alta afinidad por CAM. Kessler, mostró que la enzima de hígado une CAM en concentraciones de 1 y 3 nM (Kessler y col., 1990), es decir, con mayor afinidad que la bomba de eritrocitos cuya K_d es de 4 nM (Graf y col., 1981). Esta observación probablemente indique que el dominio de unión a CAM se encuentre enmascarado en la enzima intacta y por lo tanto, la enzima no es capaz de unirse a columnas acopladas a CAM.

En años previos se ha mantenido una discusión de la posible coexistencia de dos ATPasas sustancialmente distintas. Iwasa y col. describieron una ATPasa de alta y otra

de baja afinidad por calcio y además, independiente y dependiente de calcio, respectivamente (Iwasa y col., 1983). El mismo grupo demostró también que la ATPasa de alta afinidad es inhibida por CAM, en tanto que la de baja afinidad es moderadamente estimulada por dicha proteína. Por su parte, Lin y col. reportaron dos ATPasas ambas dependientes de magnesio (Lin 1985; Lin y col., 1988). Con base en observaciones como la amplia especificidad de la enzima por nucleótidos, por metales y además por experimentos de la enzima reconstituida en liposomas en los que se encontró que no se lleva a cabo transporte de calcio dependiente de ATP, Lin y col. propusieron (Lin, 1985) que esta proteína pudiera ser una ectoenzima encargada de regular posiblemente la concentración extracelular de ATP en la vecindad de la membrana plasmática (Lin y col., 1988)

El hecho de que la ATPasa de calcio hepática no responda a CAM, abre la posibilidad de que posiblemente sea regulada a través de un mecanismo distinto. En 1984, se reportó que en forma característica esta ATPasa es inhibida por altas concentraciones de glucagon, involucrando así a otras moléculas (Lotersztajn y col., 1984). Sin embargo, más adelante el mismo grupo demostró que un producto de la degradación de glucagon, el miniglucagon que incluye los residuos 19-29 del extremo COOH, pudiera ser el que fisiológicamente inhibe a la enzima (Mallat y col., 1987; Lotersztajn y col., 1990). Aun cuando el miniglucagon no activa a la adenilato ciclasa, este metabolito es un inhibidor 1000 veces más eficiente de la ATPasa de calcio, que el propio glucagon. Se ha descrito una acción bifásica para este péptido la cual se ha asociado con una regulación por proteínas G heterotriméricas. La subunidad α implicada es del tipo G_s dado que el efecto es claramente inhibido en ratas tratadas con la toxina del cólera y no por la toxina pertussis (Lotersztajn y col., 1990). También el efecto se ve inhibido específicamente por un anticuerpo dirigido contra los 10 residuos del COOH terminal de la subunidad $G_{s\alpha}$ (Jouneaux y col., 1993). Otras hormonas también inhiben a la ATPasa como son la calcitonina y la hormona paratiroidea humana y su efecto es mediado también por alguna proteína G_s pero sin activar adenil ciclasa. Otro activador de adenil ciclasa es el isoproterenol, sin embargo no ejerce efecto alguno sobre la bomba de calcio, lo que indica que no existe una comunicación cruzada entre los dos sistemas receptor-efector. Cabe la posibilidad de que la subunidad G_s sea funcionalmente especializada y

que exista una compartimentalización de Gs (Jouneaux y col., 1993). Al heterodímero $\beta\gamma$ también se le confiere actividad reguladora sobre la actividad de la bomba de calcio. Aparentemente estas subunidades son capaces de inhibir directamente la actividad basal de la enzima formando un complejo con la $G\alpha$ asociada, de manera que su papel central en la inhibición hormonal del sistema sería el de controlar los reservorios de Gs (Lotersztajn y col., 1992).

Un mecanismo alternativo de regulación de la ATPasa hepática podría ocurrir, vía alguna proteína unidora de calcio distinta de CAM. El candidato más viable reportado en la literatura es una proteína llamada regucalcina, la cual tiene un peso de aproximadamente 33 kD (Shimokawa y col., 1993). Dicha proteína fue aislada de la fracción citosólica del hígado de rata y es homóloga en su secuencia primaria con CAM sólo en un 13.3% (Nojima y col., 1987). Regucalcina aumenta la actividad de la PMCA del hígado de rata, aún en ausencia del catión (Takahashi y col., 1993 y 1994). Aparentemente, a la fecha no se ha usado esta proteína para intentar la purificación de la enzima de una forma análoga a como se hace con columnas de CAM-Sepharosa. Actualmente nuestro grupo está en vías de montar metodologías para explorar esta posibilidad.

En este punto, es importante hacer énfasis en que se ha demostrado experimentalmente que la regulación de estas enzimas transportadoras de calcio, no ocurre de manera independiente, sino que la sobre-expresión de una tiene un efecto sobre la expresión de otra(s). Esta subregulación de la ATPasa de calcio de retículo sarcoplásmico (SERCA) endógena se ha observado en células CHO (de ovario de hámster Chino) transfectadas con PMCA4Cl (Guerini, 1995) y en células endoteliales de aorta de rata transfectadas con PMCA1a (Liu, 1996). Asimismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de SERCA3 subregula la PMCA y las variantes de SERCA endógenas (Kuo y col., 1997). Es claro entonces, que las principales vías transportadoras de calcio están regulatoriamente ligadas y entonces la expresión ectópica de una bomba de calcio produce una subregulación de la expresión de la PMCA y la SERCA endógenas involucrando así al mismo núcleo celular que rige la expresión genética.

Otra posibilidad de regulación que ya se ha descrito, es que los lípidos membranales modularan la actividad de la enzima (Ronner y col., 1977; Niggli y col.,

1981). Sin embargo, aún no se ha descrito la influencia que el colesterol, abundante en las membranas hepáticas, podría ejercer sobre la PMCA. Nuestro grupo, ha demostrado que el colesterol lleva a cabo un importante papel estabilizando a la ATPasa de Ca^{2+} de corazón y de eritrocitos en condiciones de estrés térmico (Ortega y col., 1996; Santiago y col., 2000). Básicamente, el colesterol incrementa la estabilidad conformacional de la enzima impidiendo que se inactive por choque térmico (Ortega y col., 1996). Se proponen dos mecanismos posibles para tal efecto, ya que el colesterol aumenta el espesor de la bicapa lipídica, puede estabilizar a las proteínas de membrana (McIntosh, 1978; Maneri y col., 1988). Otra posibilidad es que el colesterol puede a su vez reordenar y empacar lípidos insaturados de la bicapa, compensando de esa manera los cambios conformacionales que puedan sufrir potencialmente las proteínas integrales. El colesterol tiene la capacidad de potenciar el efecto estabilizador que el calcio también tiene sobre la enzima (Santiago y col., 2000). En general, estos hallazgos indican el carácter multifactorial de la regulación de las enzimas membranales.

1.6 ISOFORMAS DE LA PMCA REPORTADAS EN CELULAS HEPATICAS

En relación con las variantes de PMCA expresadas en el tejido hepático de rata, en la literatura se ha reportado la presencia de las formas constitutivas de la enzima, i.e. las isoformas 1 y 4b. Por PCR se identificó que en todos los tejidos, incluyendo al hígado, se encuentra el mensajero para PMCA4 (Brandt y col., 1992). En todos los tejidos, excepto en hígado se ha encontrado un RNAm de 8.5 kb que reconoce una secuencia de 275 pb que incluye la secuencia no traducida y el inicio de la secuencia codificante de hPMCA4 (mediante sondas de humano y de rata). En el mismo trabajo, se reportó que la forma más abundante en el hígado de rata es la variante PMCA2b (Keeton y col., 1993). Mediante estudios por RT-PCR a partir de los mismos RNAm se encontró expresada la isoforma rPMCA4 editada en el sitio A, aún en el hígado (Keeton y col., 1995). En un análisis por PCR cuantitativa, se encontró también que en el hígado humano se expresa mayoritariamente la isoforma PMCA1x (70%), después la PMCA4x (28%) y en mínimas cantidades la PMCA2 (2x y 2w). Las variantes en sitio C fueron predominantemente la 1b (70%), después la 4b (28%), la 2b sólo representa un 2% (Stauffer y col., 1993). Existe

un reporte previo donde se analizaron específicamente las isoformas presentes en hígado de rata y humano. En dicho reporte, sólo se encontraron las isoformas de PMCA1 y PMCA2, donde la primera fue la más abundante de las dos (Howard y col., 1994).

Recientemente empleando técnicas de hibridación *in situ*, se ha reportado que en embriones de ratón el gen de PMCA1 se expresa ampliamente desde los 9.5 días de gestación, en tanto que PMCA4 se expresa a los 12.5 días de gestación con un nivel elevado en hígado. La expresión de la isoforma PMCA4 desciende en hígado a los 18.5 días mientras aumenta en otros sitios (Zacharias y col., 1999).

1.7 METABOLISMO DEL CALCIO EN CELULAS HEPATICAS TUMORALES

Dado que en este trabajo se empleó el sistema tumoral AS-30D, cabe mencionar algunas de sus características básicas. Inicialmente, se produjo un tumor sólido en el hígado más una acumulación de fluido con células libres, mediante la alimentación de ratas macho durante 12 semanas con el compuesto carcinogénico 3'-metil-4-dimetilaminoazobenceno al 0.06% (Griffin y col., 1948). El tumor primario fue llamado 30D. El tumor ascítico AS-30D surgió por inoculación de ratas hembra con células provenientes del fluido del tumor 30D (Smith y col., 1970). Más adelante, el tumor se inoculó tanto en ratas hembras como en machos. Histológicamente, estas células muestran ser de origen epitelial con apariencia general de hepatocitos aún cuando la forma de los núcleos varía. Los demás componentes del fluido, tales como eritrocitos se remueven fácilmente lavando con solución salina o algún otro amortiguador. El tumor se designó como hepatoma por haberse obtenido el tumor primario precisamente de hígado.

Actualmente es claro que el metabolismo de calcio en células tumorales se encuentra alterado, pues se ha comprobado experimentalmente en varios sistemas transformados, que éstos proliferan activamente en medios con concentraciones milimolares del catión (Swierenga y col., 1978). Además se han cuantificado niveles intracelulares y mitocondriales de calcio endógeno muy por arriba de los niveles normales hallados en células no malignas (Hickie y col., 1967; Cittadini y col., 1982; Fiskum, 1985). Por ejemplo, en el hepatoma de Morris se han medido niveles de calcio de 413 $\mu\text{g/g}$ en comparación con 120 $\mu\text{g/g}$ medido en hígado normal de rata (Hickie y col., 1967). En células del tumor ascítico de Erlich, se ha mostrado que el aumento de calcio intracelular,

ocurre por entrada de calcio a través de la membrana plasmática (Cittadini y col., 1982). En el hepatoma AS-30D también se ha demostrado una capacidad aumentada significativamente tanto de la célula como de las mitocondrias para capturar calcio en presencia y en ausencia de ATP y en las células intactas o permeabilizadas con digitonina (Fiskum y col., 1985). La captura elevada de calcio en mitocondrias, representa un eficiente mecanismo protector para la célula tumoral, dado que de esa forma la concentración intracelular del catión es baja y así evita la activación de enzimas proteolíticas y lipolíticas sensibles a calcio (Farber, 1982). Además este mecanismo es de relevancia para la sobrevivencia del tumor, pues las células están expuestas potencialmente a largos períodos de isquemia (Kennedy y col., 1980).

Concomitantemente a los niveles elevados de calcio, se han encontrado niveles o actividad elevadas de CAM en células transformadas (Watterson, 1976; Criss, 1982)) lo cual involucra aún más al calcio en los eventos que suceden en estos sistemas.

Los niveles de colesterol en la membrana mitocondrial son elevados (tres veces por arriba del contenido en mitocondrias normales) y explican de alguna manera su capacidad de acumulación del catión (Parlo y col., 1984; Woldegiorgis y col., 1985).

1.8 METABOLISMO DEL CALCIO EN CELULAS HEPATICAS DURANTE LA REGENERACION

El hígado es un órgano típicamente dividido en lóbulos, aunque en la mayoría de los mamíferos no existe un límite definido para estas unidades. En la rata el hígado está dividido en 4 lóbulos, el mayor es el lóbulo medio que se posiciona ventralmente y cubre al lóbulo lateral izquierdo, así como al lateral derecho y al caudado (van Dongen y col., 1990; Waynforth y col., 1992). Las células hepáticas son quiescentes (índice mitótico de 1 mitosis/20,000 células) de las cuales la mayoría son hepatocitos o células parenquimatosas (Steer, 1995). Sin embargo, ante estímulos químicos, físicos o infecciosos y hepatectomía parcial (HP), las células hepáticas se replican activamente en un proceso conocido como regeneración hepática. Estrictamente, este proceso es más bien una hiperplasia compensatoria pues el hígado aumenta su masa hasta alcanzar una proporción adecuada respecto a la masa corporal (Columbano y col., 1996; Michalopoulos

y col., 1997). Cuando la proliferación se induce por estímulos químicos sin pérdida previa de células, el mecanismo se llama hiperplasia directa.

El modelo de regeneración más reportado en la literatura es el que involucra hepatectomía parcial (HP), que de acuerdo a Higgins y Anderson (1931) se entiende que por extracción de los lóbulos mayores del tejido hepático de ratas, se logra una hepatectomía del 70%. Esta capacidad de regeneración se ha observado en todos los mamíferos estudiados a la fecha y se lleva a cabo en un lapso de 7 a 10 días en ratas (Steer, 1995). La velocidad de regeneración depende de factores como el estado nutricional, la edad, ingesta de alcohol, entre otros.

El proceso de regeneración hepática es sumamente complejo e involucra dos etapas principales: una fase cebadora en la que las células se liberan de la inhibición natural para dividirse y una fase de progresión en la que se promueve la replicación celular. Como es lógico imaginar, en este proceso ocurre una cascada de eventos en los que intervienen multitud de factores gobernados por eventos señaladores y transductores que dependen de la actividad metabólica del hígado, de interacciones entre células parenquimatosas y no parenquimatosas, componentes de la matriz extracelular y circuitos reguladores endócrinos, autócrinos, parácrinos y neurales. Tal cascada de eventos es llamada "sinfonía portal" (Fig. 7) la cual comienza por una abrupta caída en los niveles de calcio en plasma que produce incrementos de vasopresina y glucagon, entre otros factores (Macmanus y col., 1975; Cornell, 1985). La caída de calcio alcanza un máximo de 1 mg/100 ml de plasma en las 6 horas posteriores, tiempo en el cual se liberan a la circulación portal la hormona paratiroidea y una nueva oleada de glucagon. A las 12 horas posthepatectomía comienza la síntesis de DNA con un máximo a las 24 horas. A la fecha, se han identificado cuatro familias conocidas de factores de transcripción (HNF1, HNF3, HNF4 Y C/EBP) específicos del hígado que son responsables de los cambios que ocurren en la expresión diferencial de genes en el hígado en regeneración a distintos tiempos (Nagy, 1994).

El fenómeno de regeneración involucra prácticamente a todos los organelos celulares y a la misma membrana plasmática la cual se conoce sufre cambios de fluidez en particular asociados con la proporción colesterol/fosfolípidos (Bruscalupi y col., 1980; Kohmoto y col., 1994).

Con base al innegable papel que el calcio juega en la fisiología particular de los sistemas tumorales y del hígado en regeneración, a nosotros nos interesan las alteraciones que deben ocurrir a nivel de la membrana plasmática particularmente en lo que se refiere a una de las más importantes proteínas movilizadoras de calcio, la PMCA.

En nuestro laboratorio, se ha trabajado previamente con la ATPasa de calcio del hígado de rata desde un punto de vista cinético, usando paralelamente dos modelos: uno de células en crecimiento acelerado pero controlado (hígado en regeneración) y un segundo correspondiente al hepatoma AS-30D que sigue un crecimiento descontrolado como es característico de los sistemas transformados (Mas-Oliva y col., 1991). La actividad de la enzima fue significativamente menor tanto en hígado en regeneración como en células tumorales, respecto a las células normales. Una observación importante es que a través de mediciones de la actividad enzimática, se determinó que la actividad de la bomba de calcio se ve dramáticamente disminuida después de una HP y que su recuperación es un evento tardío del proceso de regeneración.

En la Fig. 8 se muestra que a partir del 4o. día, la actividad de la enzima comienza a elevarse y hasta después del 15o día se aproxima a los niveles normales. Este dato fue considerado para el diseño y planeación de los tiempos en que se estudiaría la expresión de los RNAm de la ATPasa bajo la influencia del proceso de regeneración, que se describe más adelante.

A pesar de que la actividad de la enzima tumoral fue menor que la del sistema normal, sorprendentemente, la capacidad de transporte de calcio en ambos fue prácticamente idéntica (5.5 y 5.9 nmoles Ca^{2+} /mg/10 min, respectivamente) y el recambio $\text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$ fue también muy similar en ambos casos: 30 y 26 nmoles $\text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$ /mg/min, respectivamente; (Mas-Oliva y col., 1991). Estas observaciones sugieren que posiblemente los sitios moduladores de la reacción de recambio de la ATPasa en las células transformadas, sean regulados de manera especial. Asimismo, indican que la membrana plasmática de las células tumorales presenta un mecanismo que regula el movimiento de calcio mediante la bomba de calcio, pero haciendo un uso óptimo de su energía.

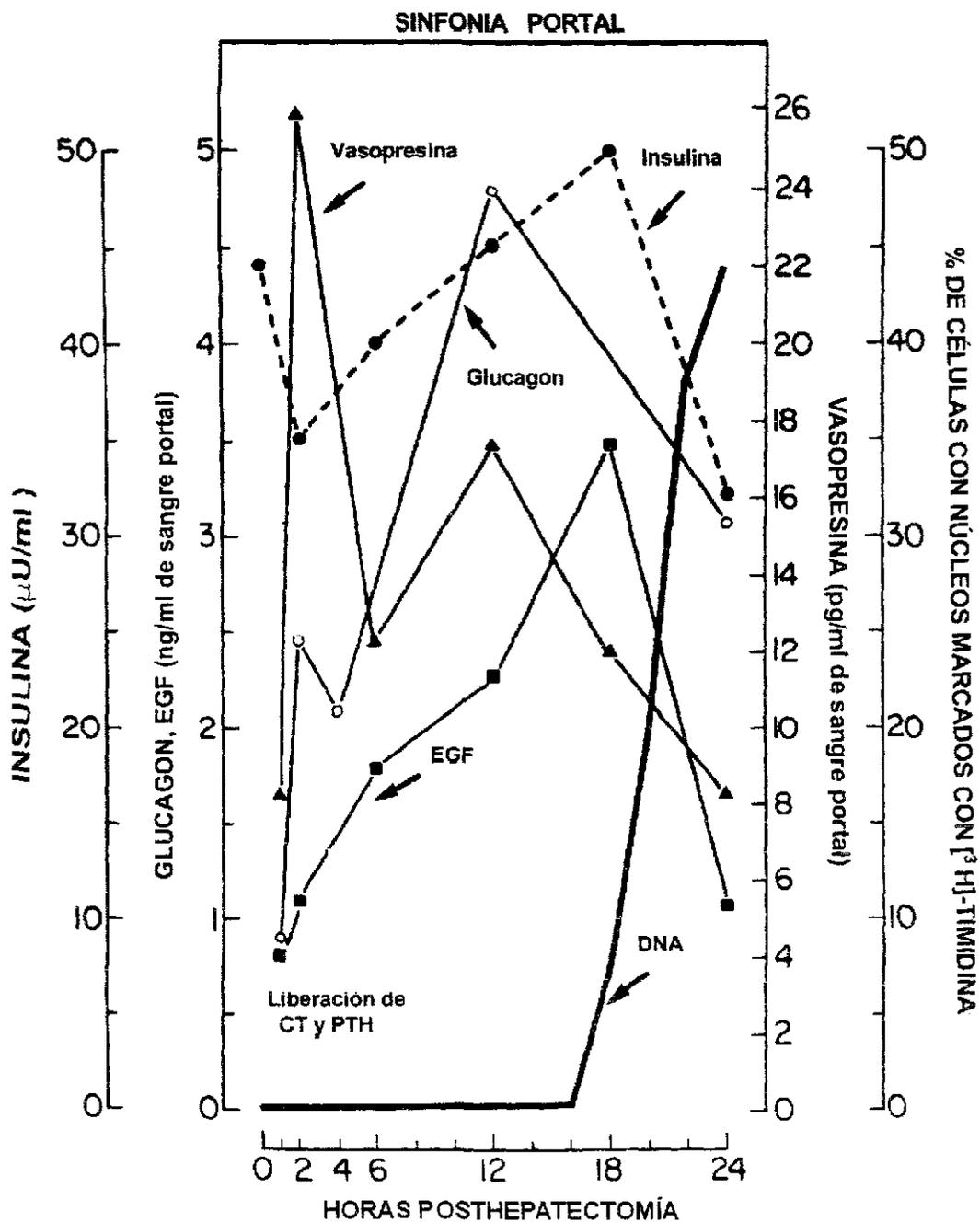


Figura 7. Sinfonía portal durante la cual se liberan a la circulación portal, varias hormonas después de una hepatectomía parcial. EGF= factor de crecimiento epidermal; CT=calcitonina; PTH= hormona paratiroidea. (Tomada de Whitfield, 1990, según datos de Macmanus y col., 1975 y de Cornell, 1985).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estas observaciones nos han llevado a pensar en la posibilidad de que la ATPasa de calcio del sistema tumoral pudiera tener diferencias a nivel de secuencia de DNA y por ende, en su secuencia primaria, respecto al sistema normal que de alguna manera lo hacen más eficiente. Las limitantes para abordar esta posibilidad desde un punto de vista bioquímico, nos condujo a utilizar un análisis a nivel molecular de la(s) isoforma(s) que pudieran estarse expresando en el hepatoma AS-30D o bien, si una expresión particular de estas isoformas, pudiera explicarnos las conductas cinéticas que observamos. Lo anterior tiene sentido si se piensa en que la naturaleza provee a las células con un mecanismo de control fino de las señales intracelulares, a través de generar múltiples variantes (Enyedi y col., 1994).

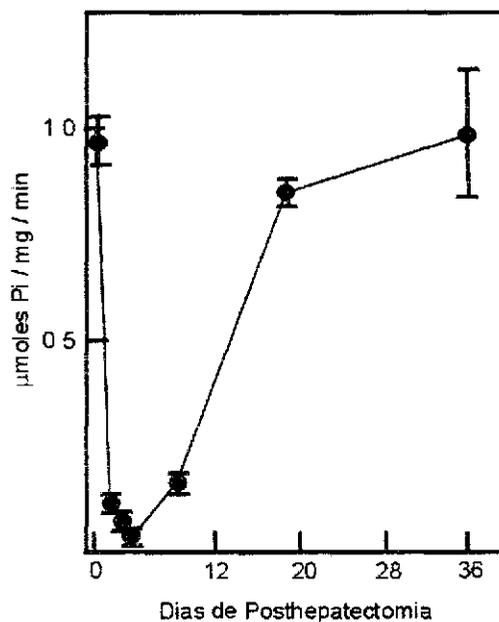


Figura 8. Actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) medida en vesículas de membrana plasmática de hígado en regeneración a distintos tiempos. Promedio ± E.E de dos experimentos (Tomado de Mas-Oliva y col., 1991).

En primera instancia, se usó una biblioteca de DNAc construida a partir del RNAm del hepatoma AS-30D, lo que garantiza una representación completa de los mensajeros que se expresan en esta línea celular. En paralelo, dado que presuntamente estas proteínas deben ser codificadas por mensajeros poco abundantes, mediante un análisis por RT-PCR y con sondas previamente usadas por nuestro grupo (Santiago y col., 1996)

se procedió a un análisis cualitativo de su expresión. Básicamente se exploró la expresión de las isoformas 1, y 4 con sus variantes por edición en los sitios A y C en el hígado normal durante varias etapas de desarrollo, en hígado en regeneración y en el sistema tumoral AS-30D.

De esta manera, utilizando herramientas de biología molecular hemos realizado un análisis que nos permite entender más ampliamente la expresión y regulación de esta ATPasa de calcio especial, en varios estados fisiológicos de la célula hepática.

2. OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVO GENERAL:

- 1) Analizar con herramientas de biología molecular, la distribución de isoformas de la ATPasa de calcio de membrana plasmática que se expresan en el tejido hepático de rata durante diferentes etapas de desarrollo, en condiciones de regeneración y en el sistema tumoral AS-30D.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Analizar una biblioteca de DNAC del hepatoma de rata AS-30D, para determinar las isoformas presentes de la ATPasa de calcio de membrana plasmática.
- 2) Amplificar por RT-PCR los mensajeros que codifican para las variantes de los genes 1 y 4, generadas por edición alternativa en los sitios A y C.
- 3) Dilucidar la existencia de un patrón de expresión diferencial de las distintas isoformas de la ATPasa de calcio en los tejidos hepáticos fetal, en regeneración y del tumor AS-30D.
- 4) Analizar si existe una expresión diferencial de la ATPasa de Ca^{2+} a nivel de proteínas, en las membranas de hígado normal tanto fetal como adulto, en regeneración y en el hepatoma AS-30D.

HIPOTESIS

Con base en el conocimiento de que la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática del tumor AS-30D presenta un mecanismo altamente eficiente para transportar calcio hacia el espacio extracelular, sin un requerimiento mayor de energía que la ATPasa de Ca^{2+} de hígado normal, es posible que el análisis molecular de este sistema revele la expresión de una isoforma desconocida de la bomba de calcio, o una combinación especial de las isoformas ya conocidas. Por otro lado, en el modelo de hígado en regeneración en el cual la recuperación de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} es un evento tardío, podría encontrarse un patrón diferencial de reactivación de las distintas isoformas dependiente del tiempo transcurrido posterior a una hepatectomía.

3. MATERIAL Y METODOS

Los medios empleados para crecimiento del fago (NZCYM) y de las bacterias (LB base y LB agar + agarosa), así como las sales y amortiguadores, se obtuvieron de Sigma (Sigma Company, St Louis, MO). Las enzimas de restricción, la reverso transcriptasa murina y algunos de los oligonucleótidos empleados fueron adquiridos con GIBCO BRL (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD U.S.A.), también se usó el juego para secuenciación dsDNA Cycle Sequencing System provisto por la misma compañía. Para el marcaje de algunas de las sondas se usó el Oligolabelling Kit de Pharmacia LKB Biotechnology, B Uppsala, Sweden. Tanto el $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ como el $\alpha^{32}\text{P-dCTP}$ (actividades específicas de 3000 Ci/mmol) se adquirieron con DuPont NEN Research Products Boston, MA.

La biblioteca de DNAc del hepatoma AS-30D fue construida por Clontech Laboratories Inc. Palo Alto, CA. Los filtros de nitrocelulosa se obtuvieron de Millipore Corporation, Bedford, MA. Las membranas de nylon Hybond-N+ se adquirieron con Amersham International plc, Buckinghamshire, UK. Los productos para elución de DNA de la agarosa (gene-clean) se obtuvieron de BIO 101 Inc, La Jolla, CA. Para las reacciones de síntesis de DNAc y de amplificación de DNA, se usaron transcriptasa reversa murina y AmpliTaq polimerasa de Perkin-Elmer Corporation.

3.1 ANALISIS DE LA BIBLIOTECA DE DNAc DEL HEPATOMA AS-30D

Para el crecimiento del tumor AS-30D, se usaron ratas Wistar macho de un peso promedio de 200 g las cuales se inocularon intraperitonealmente con 1 ml de concentrado de células del hepatoma (3×10^6 células/ml). Los concentrados de células se mantuvieron en congelación en nitrógeno líquido en presencia de medio Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) adicionado con dimetilsulfóxido al 10%, hasta su utilización. El líquido ascítico producido se extrajo de las ratas a una semana de su inoculación. En condiciones estériles se procedió a eliminar eritrocitos básicamente, centrifugando el líquido ascítico en un amortiguador de NaCl 150mM, KCl 5 mM y Tris-HCl 20 mM, pH 7.4. Finalmente las células se resuspendieron en PBS, se congelaron en nitrógeno líquido rápidamente y se enviaron

para la construcción de la biblioteca (Clontech, de acuerdo al método de Gubler y col., 1983), o bien, se procesaron para la obtención de RNA para los experimentos de RT-PCR.

La biblioteca fue preparada usando como vector de clonación, al fago λ gt10 y acoplado el inserto con un acoplador de 12 bases de longitud (secuencia: CCGGAATTCCGG) en el sitio EcoRI (Fig. 9). El DNAc fue obtenido a partir de RNAm aislado usando como cebadores oligodT y oligómeros al azar en paralelo. Los títulos de la biblioteca de acuerdo al proveedor fueron para sus formas amplificada y no amplificada de 1.5×10^6 ufp/ml y de 1.7×10^6 ufp/ml (ufp, unidades formadoras de placas), respectivamente. El tamaño promedio de los insertos identificados por PCR usando oligos para el fago λ gt10, fue de 2.1 kB (Fig. 10). El hospedero recomendado para propagar el vector es la cepa C600 de *E. coli* para las cuales se usó como criterio de selección, la producción de placas de lisis turbias y claras. Las placas normales llevan el gen *cl* y son turbias, en tanto que las que llevan el gen mutado *cl'*, son claras.

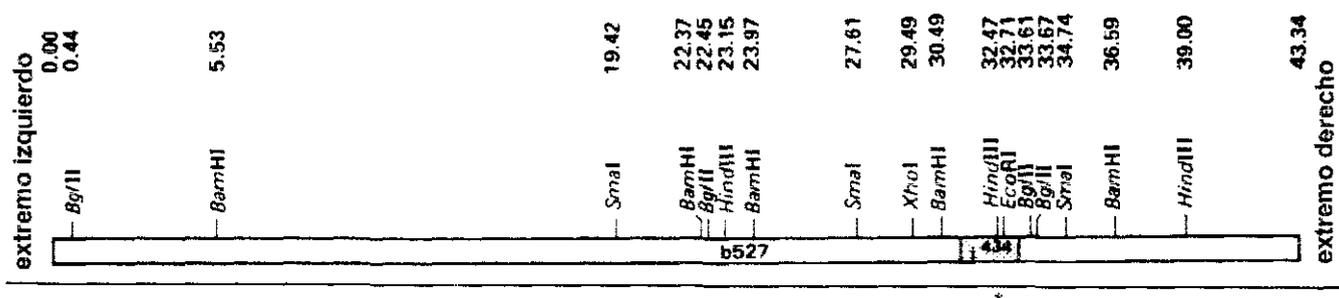


Figura 9. Mapa del vector de inserción λ gt10 donde se indican los sitios de restricción de los cuales destaca el sitio EcoRI (*) en el gen represor del fago (*cl*), sitio en el cual se insertan fragmentos de DNA hasta de 7.6 kB. La inserción de un DNA en el gene represor permite identificar placas recombinantes que son típicamente claras (*cl'*).

Antes de iniciar el análisis de la biblioteca, hicimos nuestra propia titulación la cual resultó ser de 1.8×10^7 ufp/ml. De acuerdo a este cálculo, se usaron diluciones de 3×10^3 de la biblioteca de cDNA en medio SM o diluyente del fago λ (solución 10X: NaCl 1.0 M, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1M, Tris-HCl 0.35M, pH 7.5). Las bacterias C600 por infectar, fueron crecidas en LB-ampicilina adicionado con maltosa al 0.2% para aumentar la adsorción del fago, la

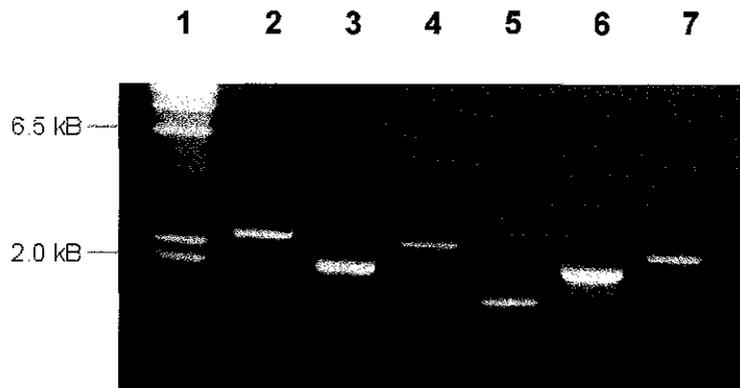


Figura 10. Gel que muestra los productos de PCR de placas claras obtenidas de la biblioteca de DNAC, obtenidos por amplificación con oligos para λ gt10. En el primer carril, se muestra el marcador de λ cortado con Hind III. En los siguientes carriles se muestran sólo seis insertos con pesos de 2.5, 2.1, 2.3, 1.6, 2.0 y 2.2 kB, respectivamente. La ausencia de bandas en los demás carriles (no se muestran), puede deberse a que el inserto sea muy grande para amplificarse, o muy pequeño para visualizarse, o que simplemente no exista.

pastilla final se resuspendió en $MgSO_4$ 10 mM final para estabilizar al fago durante la infección. La infección se hizo incubando 1.5 ml de bacterias con el fago ya diluido a $37^\circ C$ durante 20 minutos, sin agitación. Después de este tiempo, se agregaron 5 ml de LB-agarosa (precalentada a $47^\circ C$) por tubo y se vació inmediatamente en cajas Petri estériles de 90 mm de diámetro. Ya secas las placas, se incubaron a $37^\circ C$ toda la noche hasta alcanzar semiconfluencia para poder resolver con claridad entre distintas clonas. Las placas se guardaron a $4^\circ C$ mientras no se usaran.

Para la identificación de clonas positivas (screening=tamizaje) se inició con diluciones de fago de 3×10^3 /caja que en un total de 40 cajas, hacen 1.2×10^5 clonas analizadas por cada serie de tres tamizajes sucesivos para la confirmación de las clonas previamente identificadas como positivas (Fig. 11). Para cada serie se hicieron réplicas colocando, con ayuda de unas pinzas, membranas de nitrocelulosa sobre las cajas (previamente incubadas al menos una hora a $4^\circ C$ para endurecer la agarosa y facilitar el procedimiento). Tanto las cajas como los filtros se numeraron y se les colocaron tres marcas asimétricas con tinta China para facilitar la alineación con las autoradiografías correspondientes a las hibridaciones de los filtros con una sonda específica. Las réplicas se colocaron 2 minutos en

una solución desnaturante de NaOH 0.5M + NaCl 1.5M y después se lavaron dos veces por dos minutos en una solución neutralizante de Tris-HCl 0.5M (pH 8) + NaCl 1.5M y finalmente se lavaron rápidamente en SSC 3X (solución 20X: NaCl 3M + Citrato de Na 0.3 M, pH 7). Se secaron los filtros a temperatura ambiente y se fijó el DNA mediante 2 ciclos automáticos en un entrecruzador de luz UV (cross-linker de Stratagene).

Para la validación de la identidad de estas clonas, se usó como sonda una clona de la isoforma PMCA2 de rata que fue subclonada en pBR322 de cuya restricción con PstI se obtienen 4 bandas: una de 3.969 Kb correspondiente al plásmido y de 3.7, 1.956 y 0.842 kB (Fig. 12), correspondientes a los fragmentos generados por los cortes en sitios internos del DNAc de esta clona. El marcaje de los fragmentos eluidos de la agarosa, se hizo por extensión con hexámeros al azar y con fragmento Klenow y $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Las hibridaciones se hicieron a 42°C durante toda la noche como se detalla más adelante (sección 3.2, ii). Las réplicas en nitrocelulosa se lavaron con alta astringencia en presencia de SSC 0.2X.

Las clonas que resultaron positivas en el primer rastreo fueron fácilmente distinguibles por un halo o cola alrededor de la placa de lisis, éstas se colectaron de las placas de LB-agarosa en condiciones estériles, con ayuda de la boca de una pipeta Pasteur. Los pedazos de agarosa se colocaron en microviales conteniendo 500 μl de solución SM más dos gotas de cloroformo. El segundo análisis se hizo seleccionando al azar algunas de las clonas positivas y haciendo diluciones 1:1000 en medio SM del concentrado obtenido del primer rastreo, y de ahí se prepararon 3 diluciones (1:50, 1:20 y 1:10) en un total de 100 μl de medio SM. A cada dilución se le agregaron 100 μl de bacterias C600 recién preparadas para infectar por 20 minutos en las mismas condiciones que en el análisis previo. Después, igualmente se agregaron 5 ml de LB-agarosa por tubo y se vaciaron en cajas Petri. Dependiendo de la dilución que diera mejor confluencia, se seleccionó para el resto de las clonas por analizar o se hicieron distintas diluciones. Se hicieron réplicas de las cajas y se procesaron igual que las anteriores. Para el tercer análisis, se repitió el mismo procedimiento, excepto que ahora se colectaron las clonas del segundo rastreo, usando una punta de menor diámetro que en el primero con objeto de evitar la contaminación con otras clonas.

De las clonas confirmadas como positivas se purificó el DNA del fago y se secuenció con los oligonucleótidos complementarios a ambos brazos de $\lambda\text{gt}10$ (Tabla 2). Asimismo, los

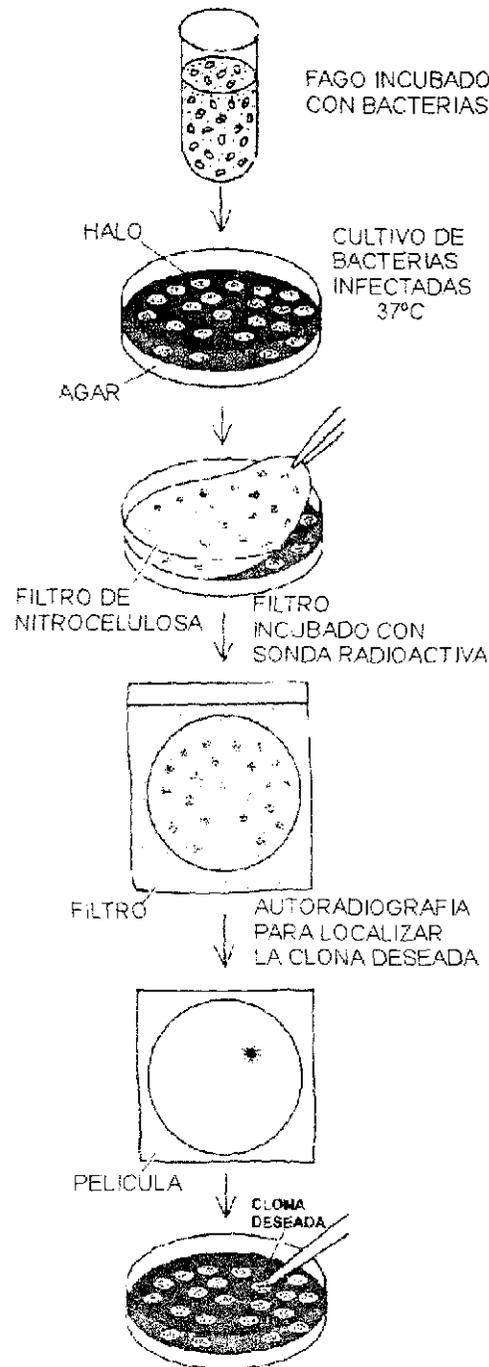
insertos de estos fagos, se liberaron cortando con EcoRI y se subclonaron en el plásmido pTZ19R (o en pBluescript) previamente preparado para la reacción de ligación, i.e. digerido con EcoRI y desfosforilado con fosfatasa alcalina, en células NM522. Para hacer competentes a las células para transformación se usó el protocolo con cloruro de calcio (Cohen y col., 1973). Para la transformación, se usaron distintos volúmenes de la reacción de ligación para cada fragmento, que se incubaron con células competentes que se plaquearon en dos densidades distintas en presencia de ampicilina (100 mg/ml). De las colonias resistentes a ampicilina, se aisló el DNA de acuerdo al método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989) y se determinó por digestión con EcoRI y electroforesis en geles de agarosa, cuáles tenían un inserto del tamaño esperado. Estos DNAs fueron secuenciados con los oligonucleótidos adecuados para los plásmidos de la serie M13/pUC (Tabla 2), siguiendo el método de terminación de la cadena (Sanger y col., 1977). Las secuencias obtenidas fueron enviadas a un banco de datos (BLAST) y se localizaron las homologías con las distintas isoformas reportadas para la ATPasa de calcio de membrana plasmática.

3.2 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS RNAm DEL HIGADO DE RATA EN DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO

i) Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para esta sección de nuestro estudio, utilizamos ratas Wistar macho de 200-250g las cuales fueron hepatectomizadas parcialmente de acuerdo al método original (Higgins y col., 1931) que implica la ablación de los dos lóbulos mayores del tejido hepático. Se recuperaron los hígados en regeneración a los 2, 4, 8, 14 y 17 (R2→R17) días posteriores a la operación. Asimismo, se obtuvieron hígados fetales de 13 y 17 (F13, F17) días de gestación, así como hígados de ratas neonatas (NEO) y de adultos normales (HN). También se colectaron células del hepatoma AS-30D a partir del líquido ascítico generado por el tumor a los 7 días de inoculado i.p. en los animales. Se aislaron RNA totales de todos los tejidos, según el método de tiocianato de guanidina (Chomczynski y col., 1987) cuya calidad se evaluó espectrofotométricamente y por análisis electroforético en geles de agarosa-formaldehído al 1%.

Con estos RNAs se hicieron RT-PCRs y se obtuvo el DNAc utilizando 5 µg de RNA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 11. Metodología empleada para cada serie de análisis en busca de clonas positivas portadoras de insertos relacionados con la ATPasa de calcio de membrana plasmática (PMCA) en la biblioteca de DNAc del hepatoma AS-30D.

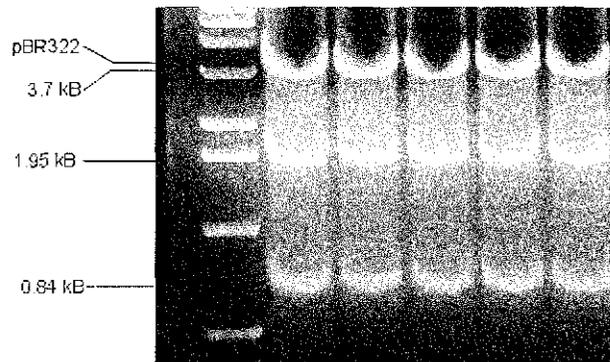


Figura 12. Patrón de bandas resultante de la restricción de una clona completa de rPMCA2 incluida en pBR322 (banda de 3.9 kB) con la enzima PstI. Los carriles después del marcador de peso molecular son idénticos y muestran las bandas de 3.7, 1.956 y 0.842 kB que se eluyeron y se usaron como sondas.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la secuenciación de clonas positivas en el fago λ gt10 o en células NM522.

OLIGO	SECUENCIA
λ gt10 →	5' - CCT TTT GAG CAA GTT CAG CCT GG -3'
λ gt10 ←	5' - GGT GGC TTA TGA GTA TTT CTT CC -3'
M13 →	5' - CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG -3'
M13 ←	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'

total iniciales en un volumen de 5 μ l conteniendo oligodT (50 pmol) y hexámeros al azar (50 pmol), utilizando el programa: 68°C/5' - rampa a 25°C durante 10 minutos, al alcanzar los 25°C, se agregaron 15 μ l de la mezcla de reacción conteniendo el amortiguador: MgCl₂ 5 mM, dNTPs 1 mM cada uno, inhibidor de RNAasas (RNAzin, 1U/ μ l)) y 2.5 U/ μ l de transcriptasa reversa murina. El ciclo prosiguió durante 60 minutos a 42°C más 5 minutos a 95°C.

De cada DNAC se usó una quinta parte de la reacción (4 μ l) para una reacción en un volumen de 44 μ l (incluyendo al amortiguador: MgCl₂ 0.2 mM, dNTPs 0.2 mM cada uno y 1 U de Taq polimerasa) para la amplificación por PCR para la cual se realizó una preincubación a alta temperatura (hot-start), de manera que se incubó a 82°C por un minuto y entonces se agregó la mezcla correspondiente de oligonucleótidos sentido y antisentido (10 pmol de cada uno en 2 μ l totales). La amplificación se llevó a cabo durante 35 ciclos con la secuencia: 94°C por 45" seguido de 55°C por 45" y 72°C por 2', al final del programa se incluyó un paso de extensión a 72°C durante 10 minutos (Fig. 13). El termociclador empleado fue el modelo 9600 de Perkin-Elmer. Se usaron oligonucleótidos para GAPDH como control y los correspondientes a las isoformas de rata PMCA1 y PMCA4 sitios A y C para ambas (ver secuencias en Tabla 3). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2% (excepto para GAPDH) teñidos con bromuro de etidio.

ii) Hibridaciones DNA-DNA (Southern)

Los geles con los productos obtenidos por PCR se transfirieron durante toda la noche en membranas de nylon Hybond N+ con solución SSC 20X, previa desnaturalización del gel en una solución de NaOH 0.2M + NaCl 1.5M durante 20 minutos y neutralización en Tris 0.5M (pH 7.4) + NaCl 1.5M por 20 minutos. Las membranas con los DNAs transferidos se lavaron con SSC 2X para remover el exceso de sales y se fijó el DNA en un entrecruzador UV mediante dos ciclos automáticos. Todas las incubaciones de prehibridación e hibridación se realizaron en un horno Techne HB-2D.

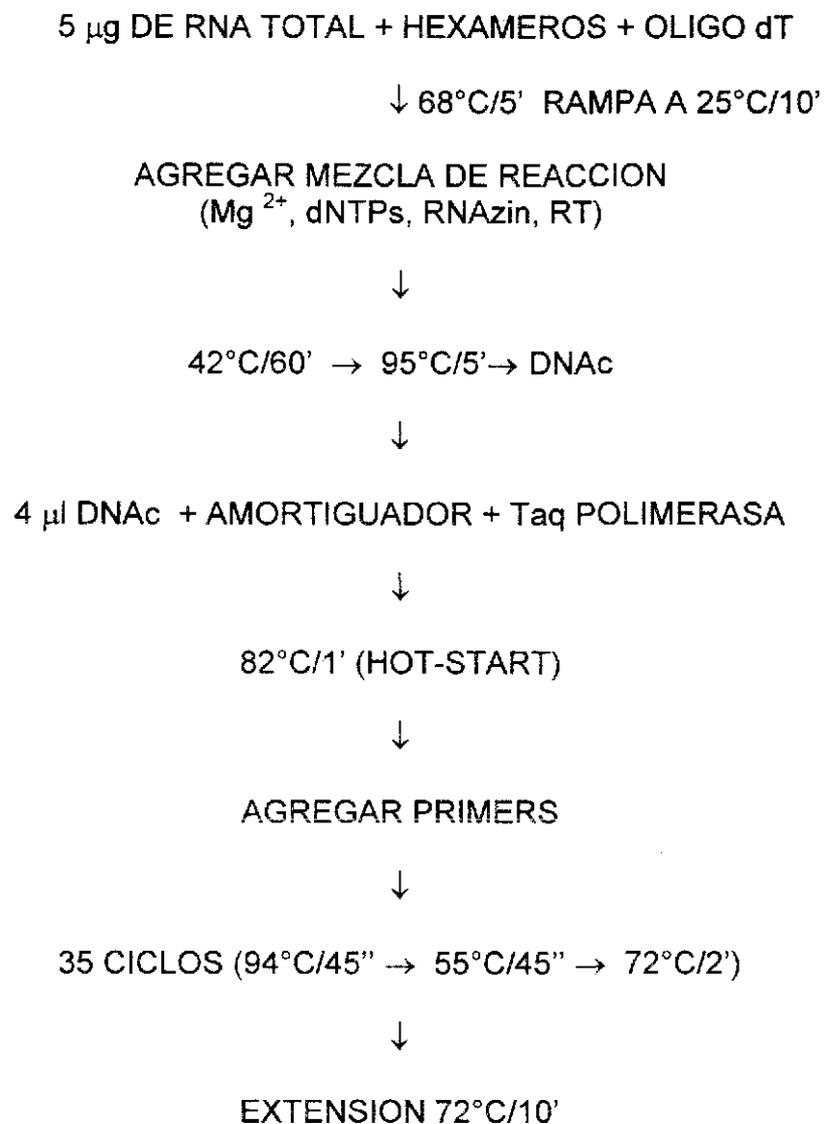


Fig. 13. Diagrama de flujo del programa empleado para las amplificaciones por RT-PCR.

Las membranas con los productos de PMCA1 y 4 sitio A, se hibridaron con la misma sonda empleada para el análisis de la biblioteca de DNAc. Para las membranas con los fragmentos de rPMCA1 y rPMCA4 sitio A, la mezcla de prehibridación tenía las siguientes concentraciones finales: SSC 5X, Denhardtts 5X, formamida al 50%, SDS 0.1% y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón, la mezcla se calentó a 65°C antes de agregarla a las membranas e incubarla a 42°C toda la noche. La sonda fue marcada en presencia de 20 µl de la siguiente mezcla de reacción: 2U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I + 5 µl de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP + una mezcla de dATP, dGTP y dTTP en concentraciones finales de 25 µM (en un amortiguador Tris-HCl 500 mM, pH 7.8) + 2 µl de hexámeros al azar (concentración de 3.1 mg/ml) incubando a 37°C por 2 h y posteriormente se precipitó con EDTA 0.5M pH 8, acetato de sodio 3M (pH 7) y etanol al 100% a -20°C por 2 horas. Finalmente la sonda se recuperó centrifugando a 13,000 rpm/25' a 4°C, se resuspendió en amortiguador TE (Tris 10 mM pH 8 + EDTA 1 mM, pH 8) y se calentó el DNA marcado a 92°C por 5' antes de agregarlo a la mezcla de prehibridación previamente caliente a 65°C, para hibridar a 42°C durante toda la noche. Los filtros se lavaron para remover la unión inespecífica, aumentando la astringencia desde SSC 2X-SDS 0.1% a 42°C, a SSC 1X-SDS 0.1% a 50 y/o 65°C hasta SSC 0.2 ó 0.1X-SDS 0.1%, de ser necesario.

Las membranas con los productos del sitio C de ambas isoformas se prehibridaron al menos 4 horas, en una solución con las siguientes concentraciones finales: SSC 6X, Denhardtts 5X, SDS 0.5%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón y pirofosfato de sodio 0.05% en un volumen de 10 ml a 37°C. En este caso se usaron como sondas, oligos internos de las secuencias de rata amplificadas, para sitio rPMCA1 sitio C: 5'-GCTCTAAGGCGACAACCCTCC -3' (3661-3681, Fig. 14) y para rPMCA4 sitio C: 5'-CTTCGTTGGCTTCTAAGTCGC -3' (3796-3817, Fig. 15). Para marcaje, se usaron aproximadamente 3 pmoles del oligo que se incubó en un volumen total de 10 µl en presencia de 10U de T4 polinucleótido cinasa, el amortiguador correspondiente y $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP a 37°C/30 minutos, la reacción se detuvo incubando a 65°C por 15 minutos. La sonda se recuperó por filtración a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.20 µm con un poco de mezcla de hibridación. La mezcla de hibridación consistió en SSC 6X, Denhardtts 1X, tRNA de levadura (20 µg/ml) y pirofosfato de sodio 0.05% en un volumen de 10 ml, las membranas

se hibridaron a 37°C toda la noche. La unión inespecífica fue removida mediante lavados con SSC 6X-pirofosfato de sodio 0.05% a 37°C y aumentando la temperatura conforme fuese necesario. Las membranas se expusieron en película X-OMAT de Kodak. a -70°C de 2 hs a toda la noche.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificación de productos mediante reacciones de RT-PCR.

OLIGO	SECUENCIA	FRAGMENTO(S) ESPERADO(S)
hPMCA1 sitio A	→ 5'-CAGGTA CT CATGTAAGGGAAGGCTC -3' (785-809) ← 5'-CACTCTTCAATGGCTGCATTTCC -3' (1015-993)	231 pb (1x) (310 pb, 2w)*
rPMCA1 sitio C	→ 5'-GAGATCCCTGAGGAGGAATTGG -3' (3502-3523) ← 5'-TGTGCGGCTCTGAATCTTCTATC -3' (3893-3871)	392 pb (1b)
rPMCA4 sitio A	→ 5'-TGGTCAGCTTATACTCCAGTG -3' (752-776) ← 5'-GGTCCCTTGCTTGCTTTCTTCTC -3' (1201-1179)	450 pb (4x) 420pb (4z)
rPMCA4 sitio B/C	→ 5'-AGAGATCGACCATGCCGAGATG -3' (3398-3419) ← 5'-AACAGTTTCAGCATCCGACAGG -3' (3852-3831)	455 pb (4a) 385 pb (4d) 277 pb (4b)
GAPDH **	→ 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT -3' (71-96) ← 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC -3' (1030-1053)	983 pb

* Este juego de oligos fueron reportados por Verma y col., 1988. La banda correspondiente a 2w no era esperada, pero se identificó por secuenciación.

** Los oligos para amplificar GAPDH son los reportados para humano (Stauffer y col., 1993), los cuales se usaron para amplificar secuencias de rata, dada la alta homología entre estas especies.

Los demás juegos de oligos se diseñaron con base a lo reportado por Keeton y col., 1993; Keeton y col., 1995; Adamo y col., 1992 y con ayuda del programa de análisis MacVector 6.0.1.

1 tgtggagaag aagggagcgt cggaccggaa cggatgtata catctcaaga ttgagaggaa
61 gaaacaagtc atgggccagt ggtcaagata cttctctggg aattgttget gctgataact
121 gctttaccaa gtcatacaat gagtgtttgg ttaaggaag attttaatat taaaagatt
181 ttcattcttg aaaattgac aagtgaagat ttcatttctt ttttttttg ggaaacattt
241 tcctcctcat aaattaccct tgtaatgggc gacatggcaa acaactcagt tgcataatagt
301 ggtgtgaaaa actccttgaa agaagctaact catgatggcg actttggcat cacacttgcc
361 gagctgcggg cctcatgga gctcaggctc acagatgcat tacgaaaaat acaggaaagc
421 tatggggatg tctatggaat ttgcaccaag ttgaaaacat ctcccaatga aggtttaagt
481 ggaaatcctg cagatttaga aagaagagaa gcagtgtttg gaaagaactt tatacctcct
541 aagaagccaa aaacctttct tcagttagta tgggaagcat tacaagatgt cactttaatt
601 atactagaaa tcgcagccat agtatcattg ggcctttctt tttatcaacc tccggaaggg
661 gataatgcac tttgtggaga agtttctgtt ggggaagaag aaggtgaagg agaaacgggg
721 tggattgaag gagctgccat cctcttgctg gtggtgtgtg tgggttagt gacggctttc
781 aatgactgga gtaaggagaa acagttccga ggcttgca gtcgaattga acaggaacag
841 aagttcaccg tcatcagggg tgggcaggct atccagatac ctgtagctga cactactgtt
901 ggagacattg cccaagtga gtacgggtgat cttcttccag ctgatggtat attgattcaa
961 ggcaatgacc ttaaaattga cgagagttcg ttgactggcg agtctgacca tgttaagaag
1021 tctctagata aagaccctt gcttctttca **ggtaactcatg taatggaagg ttctggaagg**
1081 atggctcgtta ctgctgtagg tgtgaactct caaactggga tcatctttac cttacttggg
1141 gctggaggcg aagaggagga aaagaaagat gagaagaaga aagaaaagaa aaataagaaa
1201 caagatggag ctattgaaaa tcgcaacaaa gcaaaagccc aagacggcgc ggccat**ggag**
1261 **atgcagcctc tgaagagtga** agaaggggga gatggtgat agaaagacaa gaagaaagca
1321 aatctgcaa agaaggaaaa gtctgtgtta caagggaaac ttacgaagct ggctgttcag
1381 attggcaaag caggtctgct gatgtctgcc atcacggtta tcatcctagt gctatatttt
1441 gtgatcgata ccttctgggt tcagaagagg ccgtggcttg ctgagtgcac gccaatctac
1501 atccagtaact ttgtgaagtt cttcattatc ggggtcaccg ttctagtggg cgcggtgccc
1561 gaaggcctcc cgctggccgt cacgatctca ctggcttact ccgtcaagaa aatgatgaag
1621 gataacaact tgggtgaggca cctggacgct tgtgagacca tggggaacgc tacagctatc
1681 tgttccgata agacggggac cctgacgatg aacaggatga cggctcgttca ggcctacatc
1741 aacgaaaagc attataaaaa ggttccggaa ccagaagcca tcccgccaaa tctcctgtcc
1801 tatctggtaa caggaatttc tcatgtgggg aataaaacag aatgtgcctt gttgggattt
1861 aaagagggtg gattacctcg tcagtgtggg gttagaaatg aaataccaga agaagcattg
1921 ctcttgatt taaagcggga ttatcaagat gttagaaatg aaataccaga agaagcattg
1981 taciaagtct ataccttcaa ttctgttagg aatccatga gtacagctct aaagaattca
2041 gatggaagtt tccggatctt cagcaagggg gcactctgaga taattctgaa aaagtgtttc
2101 aaaatcttga gtgctaattg tgaggccaaa gtgttccgac ccagagaccg agatgacatt
2161 gtgaagacgg tgattgagcc catggcatct gaaggcctga gaacctatg cctagcgttc
2221 agagacttcc ccgcaggaga gccagaacca gagtgggata acgagaacga tgtcgtcacc
2281 ggcttactt gcatcgctgt tgtggggatt gaagatcctg tgaggcctga ggtaccagag
2341 gcaataaaga aatgtcagag ggctggaatt accgtgcgca tggctactgg tgataatatt
2401 aacacagctc gggccattgc taccaaatgc ggtattttac acccagggga agatttctg
2461 tgcttagaag gtaaagattt taaccgaaga atacgaaatg aaaaggaga gattgaacaa
2521 gagaggatag acaagatttg gccaaagctt cgagtgcttg caagatcatc tcccactgac
2581 aaacatacac tggttaaagg tataattgac agcacagtct cagagcaacg ccaggttgta
2641 gctgtgacag gggatggtac aaatgacggg cctgcgctga agaaagcaga cgttggcttt
2701 gcaatgggca ttgctggaac tgatgtggtt aaagaagcat ctgatatcat tctcacagat
2761 gacaacttca caagcattgt taaagcgtt atgtggggac ggaatgtcta tgacagcatc
2821 tcaaaattcc ttcagttcca gcttactgtt aatgtagtgg ccgtgattgt cgctttcacg



2881 ggcgcttgta ttactcaaga ctgcgactg aaggcggtac agatgctctg ggtcaacctc
 2941 atcatggaca cgctggcctc cctggctctg gcgacagaac caccaccga gtcactcctg
 3001 ctccggaagc cttacgggag aaacaagcct ctcatctcac gcacaatgat gaagaatata
 3061 ttgggccatg cgttctatca gctcgtagt gtcttcacgc tcttggtcgc tggagagaag
 3121 tttttcgata tcgacagtgg gaggaacgcc cctctgcatg ctccaccgtc agagcactac
 3181 accattgtgt tcaacacctt tgtgctgatg cagctcttca atgaaataaa tgcccggaaa
 3241 attcatgggg aaagaaatgt gtttgaagg atcttcaaca acgccatctt ctgcacaatt
 3301 gtcttaggca cctttgtggt gcagataata atcgtgcagt ttggcgggaa gcctttcagc
 3361 tgctcagaac tttcaataga acaatggctg tgggccatat tcttggggat ggggacctta
 3421 ctctggggcc agcttatttc aaccattcca accagccgct taaagtctt aaaagaagct
 3481 ggccatggga cacagaagga **agagatccct gaggaggaat tggcggagga** tgttgaagag
 3541 attgaccatg ccgaacggga gttgcggcgt ggccagatct tgtggttag aggcctgaac
 3601 agaatccaaa cacagatgga tgtagtgaat gctttccaga gtggagggtc cattcagggg
 3661 gctctaaggc gacaaccctc catcgccagc cagcaccatg atgtaacaaa tgtttctacc
 3721 cctacacatg tagtgttttc ctcttctact gcttctactc ctgtggggta tccgagtggg
 3781 gaatgcattt cgtagctctt tatacgaagg gttagagaag ccagaatcaa gaagttcaat
 3841 ccacaacttt atgacacacc ccgagtttag **gatagaagat tcagagccgc acatccccct**
 3901 tatcgatgac actgatgctg aagatgacgc tctactaaa cgcaactcca gccctccgcc
 3961 ctctcctaac aaaaataaca atgccgttga cagcgggatc caccttcaa tagaaatgaa
 4021 caagtctgct acctcttcgt ccccaggag cccactgcat agtttgaaa catcactctg
 4081 attgtaagct gaacgttaac aactagccg cactgtaaag aaacaaattg aaactgagtc
 4141 ttttcacaca ttgtgacgga caagatggcg ttcttgtctc cggacttcaa cagaagacac
 4201 acttgtagca atgtagattt atttttt

Figura 14. Secuencia de nucleótidos del DNAC de la isoforma rPMCA1 (clave de acceso del Genbank: J03753). En rojo se indican las secuencias a las que se unieron los oligos diseñados para el sitio A de hPMCA (ver Tabla 3) En azul se indican las secuencias de los oligos para amplificación en sitio C. En este último segmento, se muestra subrayada la secuencia del oligo interno (3661-3681) empleado como sonda para identificar los productos de este sitio (Shull y col., 1988).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

1 gctactctga aacttattgc acaagatatt gtcaatttat ccctaactg ggctcccaga
 61 gaagaaaaaa gtgggaagaa acgaagaaga gaaggcaaga gacactgctc agttagaggg
 121 gaaactctac atcttctctg gttgagagtc tggtaaccga aggcaagatg acgaatccat
 181 caggacataa cttgccagcc aactcggtag ctgagagcta tgaaggggag tttggctgca
 241 ccttaatgga cctgaggaag ctcatggagc ttcgtgcagc tgatgcagtg acccagatca
 301 gtgcccacta tggagtgta caagaaatct gcgcaagact gaaaacctcc cctgtagaag
 361 gtctgtctgg gaaccctgca gatttggaga agcgtagact tgtttttggg aagaacatga
 421 tacctccgaa aaagcccaag acgttcttag aattagtgtg ggaagccctg caggatgtca
 481 cactcatcat cctggagatc gcagccatca tatccctggc cctgtccttc taccggcctc
 541 ctggcgggga aatgaaatc tgtggccaca ttgtaagtaa cccagaagaa gatgaggaag
 601 gagaaactgg ctggattgaa ggggcagcca ttcttgccctc ggtgatcatt gtggtattcg
 661 tgacagcctt caacgactgg agcaaagaga agcagttccg ggggctgcag agtcgcattg
 721 agcttgagca aaaattctcc attatccgga **atggctcagct tatacaactc ccagtggtg**
 781 agattgtggt gggagatatt gcccaggtca aatacgggtga cctgctgctc gccgacggaa
 841 tcctaatacca gggaaatgat ctgaagattg acgagagctc tttgacagga gaatcagatc
 901 atgtcaagaa gactctggac aaagaccca tgttgctctc agggactcat gtgatggaag
 961 gctctggagc gatggtggtg actgctgtgg gaatcaattc ccagactgga atcatcttca
 1021 ccctcttagg ggctaattgag gaagaagacg atgagaaaaa gaagaaaggt aaaaaacaag
 1081 gagtctctga aaatcgcaac aaagcaaaaa cccaggatgg agtggccttg gaaatccagc
 1141 cactcaacag ccaggagggg ctcgatagtg aggaaaagga **gaagaaagca agcaagggac**
 1201 **ccaagaagga** gaagtcggtc ctgcagggca agctcacacg cctggctgtg cagatcggga
 1261 aggcaggtct gatcatgtct atcctcacag tcctcatcct gattctatac ttcgtggttg
 1321 acaatttctg gatacagcgc cgggcatggc ttctgagtg cactcctgtg tacatccagt
 1381 attttgtcaa gttcttcatc atcggagtca ctgtactggt agtggctgtg ccagaggggc
 1441 tgccactggc tgtcaccatc tcgttggcct actctgtaaa gaaaatgatg aaggacaaca
 1501 acttggctcc gcacttggac gcctgtgaga cgatgggcaa ccccacagcc atctgctctg
 1561 ataagacggg cacgctgacc atgaaccgca tgaccgtggt acaagcttac attgggggca
 1621 ctactaccg ccagatccca aaacctgacg acctcccacc caacgttctg gacctcatag
 1681 tcaacagcat ctgtatcaac tctgcttaca cttctaagat tctgcctcca gagaaagagg
 1741 gaggcctccc ccggcaagta ggcaacaaga cagagtgtgg actgctgggc tttgtcacag
 1801 acctgaagca ggactaccaa gcagttcgca gtgagatgcc cgaggagaag ctcttcaagg
 1861 tgtacacctt caactcagtg cgcaagtcca tgagcaccgt catcaggaag ccggaagggg
 1921 gcttccgcgt gttcagcaag ggcgcctccg agataatgct gcgcaagtgt gatcggatcc
 1981 tgaacaagga aggaggaatt gtaccattca aaactaagga ccgagacaat atggtacgca
 2041 acgtcattga gcccatggcc agtgaaggac tccggaccat cggcatagct taccgagatt
 2101 ttgatggtga agagccctcg tgggaaaatg agaatgagat cttcactggg ctggtctgca
 2161 ttgcagtggt gggcattgag gacctgtgc gccagaggt accagatgcc attaacaagt
 2221 gcaaacgggc tggcattact gtcaggatgg tgacaggtga caacgtcaac acagccaggg
 2281 ccatcgccac caaatgtggc atcttgactc ctggtgatga cttcctgtgt ctggaagga
 2341 aagaattcaa cagactcata cgcaatgaga agggcgaggt cgaacaagaa aagctggaca
 2401 aggtctggcc caggcttcgg gtactggcac gatcttctcc cacagacaag cacacattgg
 2461 tgaaggtat cattgacagc aatattgggg aacagaggca ggtggtggct gtcaccggtg
 2521 atggaaccaa tgatggaccg gctctaaaga aagcagatgt cggttttgct atgggcattg
 2581 caggcacaga tgtggctaag gaggcatacag acatcatcct gactgatgac aacttcaaca
 2641 gcattgtgaa ggcagtgatg tggggccgga acgtatacga cagcatttcc aagttcctgc
 2701 agttccagct cactgtcaac gtggtggccg tgattgtggc tttctctgga gcctgcatca
 2761 ctcaggatc cccactgaaa gcggtgcaga tgctgtgggt gaacctgatc atggacacgt
 2821 ttgcttctct ggccctggcc acagagcccc cgaccgatc cctgctgagg cgtcgcctc

2881 atgggcgaaa caagcccctg atctctcgca caatgatgaa gaacatcctg ggccacgagg
 2941 tgtatcagct cggaatcgtc ttctctctcg tctttgctgg cgacaaactg tttgacattg
 3001 acagtgggag gaaggcgctt ctcaattcac caccagcca gcactacacc attgttttca
 3061 acacgtttgt gctgatgcaa ctcttcaacg agatcaactc tcggaagatc catggcgaga
 3121 agaatgtctt tgcagggtgc taccgcaaca tcattttctg ctctgttgtt ttaggcacgt
 3181 tcttctgcca gatcttgatc gtggaagtgg gaggtaagcc cttcagctgc acaaacctca
 3241 ccatggagca gtggatgtgg tgtctcttta tagggatcgg agaacttttg tggggccagg
 3301 tcactctctg aatacctacc aagtctctaa agttcctgaa agaggcgggc catggcagtg
 3361 acaaagagga gatcagcaag gacgctgagg ggctggaaga **gatcgaccat gccgagatgg**
 3421 agcttcgccc aggccagatc ctctgggtcc gtggcctgaa ccggattcag actcagattg
 3481 aagtaattaa caaattccag acgggagcct cttttaaggg agtcttaagg cgacagaact
 3541 tgagtcaaca acttgatgta aaactgggtc ctagctccta ttcagaagca gttgcgtcag
 3601 tcagaacctc cccctccacc tcttctgccc ttacacctcc tctgtggggc aatcagagtg
 3661 gtcaaagtat ttcatagttt ccgagacgtc attcataaat ccaagaacca ggtctccatc
 3721 cacagcttca tgaccacaacc tgagtacgcc gcagacgatg aaatgtcaca gtccttctg
 3781 aatcaagagg aaagtccttc gttggcttct aagtcgcgga ttaccaagcg **cctgtcggat**
 3841 **gctgaaactg** **tttcacagaa** caacacgaat aacaatgccg tggactgcca ccaagtgcaa
 3901 atcgttgcct cccatcccaa cagccctcta caaagccagg agacaccggg ctgaacgtcc
 3961 atcctctgag taccgtccct gctctccctt ttttctcttc atctgtccta tctgtatgtg
 4021 atggtgggac ttgtcattgt ttcacagct gctcctaagc atgtgagaac cccacctga
 4081 ccatgaagaa gcacagacct ac

Figura 15. Secuencia nucleotídica de la isoforma rPMCA4 (clave de acceso al Genbank, U15408). En rojo se indican las secuencias de los oligos empleados para amplificación por PCR en sitio A; en azul se muestran los oligos específicos para sitio B/C. En la región del sitio C, se ubica subrayada la secuencia del oligo interno (3796-3817) usado como sonda para identificar los productos del mismo sitio (Keeton y col., 1995).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

3.3 TRANSFERENCIA DE PROTEINAS (Análisis tipo Western)

Con el objeto de analizar cualitativamente si existen diferencias en las ATPasas de los distintas muestras hepáticas a nivel de proteínas, decidimos hacer inmunotransferencias con el anticuerpo monoclonal 5F10. Dicho anticuerpo se obtuvo a partir de eritrocitos humanos y reconoce una región conservada de la PMCA localizada en el asa intracelular entre los dominios transmembranales M4 y M5, con un epítopo entre los aminoácidos 724-783.

En primera instancia se aislaron fracciones crudas de membranas de hígado normal y en regeneración de rata y del hepatoma AS-30D, de acuerdo al método reportado por nuestro grupo (Mas-Oliva y col., 1991). En el caso de las células colectadas del hepatoma, se hizo preliminarmente un lavado de las mismas en un amortiguador de NaCl 150 mM, KCl 5 mM y Tris-HCl 20 mM, pH 7.4. El homogenado inicial de todos los tejidos se ajustó midiendo con un refractómetro Zeiss a una densidad de 47% con sacarosa y se centrifugó en un gradiente discontinuo de sacarosa seguido de dos capas de 44 y 42.3% de sacarosa en un amortiguador de Tris-HCl 5 mM, pH 8 (150,000 X g/1 h en un rotor SW 28 de Beckman). La fracción membranal se recuperó sobre la capa de 42.3%, se lavó en el amortiguador Tris-HCl 5 mM pH 8 por centrifugación a 40,000 X g por 15' en un rotor Beckman 60Ti. La pastilla final se resuspendió en un amortiguador de Hepes-Na 25 mM y MgCl₂ 10 mM, pH 7.4 y se congeló a -70°C hasta su uso.

Para nuestros análisis tipo Western se colectaron los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 100,000 x g/30' de muestras solubilizadas por 20' en Tritón X-100 (concentración final de 0.5%) de las tres preparaciones de membranas de hígado y se cuantificó la proteína total. Las mediciones de proteína se hicieron de acuerdo al método con ácido bicinonínico (Pierce, catálogo 23225). Como control positivo se incluyó además a la ATPasa de eritrocitos humanos purificada a homogeneidad por nosotros mediante columnas de Sefarosa acopladas con calmodulina (Niggli y col., 1979). Se corrieron geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% (Laemmli, 1970) con las muestras solubilizadas usando 25 mA por cada gel. En los carriles se cargaron cantidades equivalentes de proteína para cada tipo membranal (20 µg). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie o se transfirieron en nitrocelulosa con poro de 0.45 µm (Bio-Rad) usando un sistema húmedo aplicando una corriente de 100 mA durante toda la noche. El amortiguador usado para transferir las proteínas fue el siguiente: Tris 25 mM + Glicina 192 mM + Metanol 20%. La calidad de las

transferencias se corroboró en la nitrocelulosa por tinciones con Ponceau S (solución al 0.2% en ácido tricloroacético y ácido sulfosalicílico al 3% de Sigma).

Todas las incubaciones siguientes de las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se realizaron a temperatura ambiente y en agitación suave. Los bloqueos de unión inespecífica se hicieron con leche descremada al 2.5% en un amortiguador de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 + NaCl 150 mM + Tween 20 al 0.05% (TBST) durante 1 hora. Posteriormente se incubó por 1 hora más con el primer anticuerpo. El primer anticuerpo usado fue el monoclonal clona 5F10 en una dilución 1:1,000 recomendada por el proveedor (Affinity Bioreagents, Inc., catálogo MA3-914). Después de incubar con el primer anticuerpo, se lavaron las membranas con TBST con cambios cada 15 minutos por un total de una hora, y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo fue una mezcla de anti IgG+A+M(H+L)-peroxidasa de ratón aislada de cabra (Alpha Diagnostic International, catálogo 40420). Este anticuerpo se usó en una dilución 1:50,000 en leche-TBST y se incubó la membrana de nitrocelulosa durante 1 hora. Posteriormente se lavó con TBST por una hora con lavados de 15 minutos cada vez. Al final se lavó 15 minutos sólo con TBS (i.e. el mismo amortiguador, sin Tween), para evitar inhibir la actividad de la enzima del anticuerpo conjugado. El revelado de las proteínas reconocidas por el anticuerpo se hizo con el sistema quimioluminiscente ECL (Amersham, catálogo RPN2106) y se expuso en película Biomax de alto contraste de Kodak durante distintos tiempos.

4. RESULTADOS

4.1 CLONAS AISLADAS POR ANALISIS DE LA BIBLIOTECA DE DNAC DEL HEPATOMA AS-30D

En esta sección de nuestro trabajo se realizó un análisis de alrededor de 1.2×10^5 clonas por cada serie de 3 rastreos en busca de clonas positivas para la ATPasa de calcio del hepatoma AS-30D. En total se analizaron alrededor de 1×10^6 clonas de la biblioteca.

En la Fig. 16.A se muestra una serie de ejemplos de las clonas positivas verdaderas obtenidas del fago λ gt10 en los que se aprecian los insertos de entre 1.6 y 2 kB. Este tamaño, concuerda perfectamente con el tamaño previsto por Clontech, proveedor de la biblioteca. Los insertos se obtuvieron cortando con EcoRI el DNA previamente purificado del fago. La identidad de estos fragmentos fue comprobada por experimentos de hibridación DNA-DNA usando como sonda una clona completa del DNAC de rata correspondiente a rPMCA2 (Fig. 16.B).

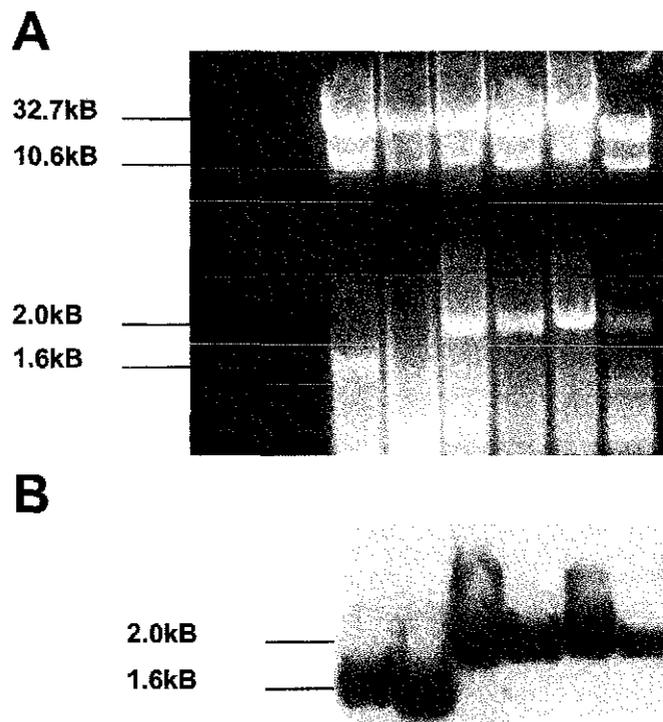


Figura 16. A) Gel de agarosa al 1% donde se separaron electroforéticamente los insertos liberados por digestión con EcoRI del DNA del fago λ gt10 de algunas de las clonas positivas. Las bandas de alto peso molecular de 32.7 y 10.6 kB, representan el brazo izquierdo y derecho del fago λ gt10, respectivamente. **B)** Autoradiografía de las mismas clonas transferidas en nitrocelulosa que hibridaron con el DNAC completo de la isoforma rPMCA2.

Después de un análisis exhaustivo de esta biblioteca, no encontramos una isoforma distinta a las previamente reportadas como constitutivas. Todas las clonas positivas (aproximadamente 11 clonas) fueron secuenciadas en el fago y/o en células NM522 transformadas conteniendo estos insertos. Las secuencias se enviaron a un banco de datos (BLAST) para su alineamiento con secuencias altamente semejantes. En la Fig. 17 se muestra un mapa donde se ubican las clonas positivas analizadas las cuales se sobrelapan y cubren la extensión total de la secuencia de la isoforma PMCA1 de rata.

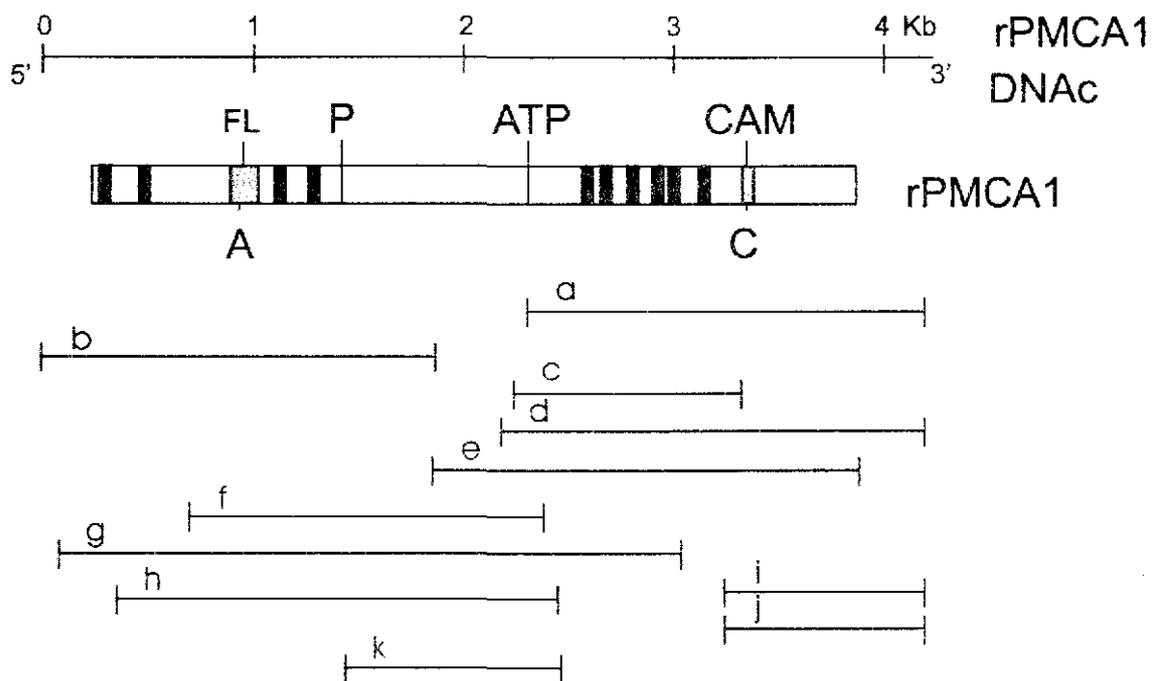


Figura 17. Esquema de las clonas aisladas de la biblioteca de DNAc de células del hepatoma AS-30D. La barra superior muestra la secuencia codificante de la isoforma rPMCA1, las 10 regiones transmembranales se indican con barras negras y se indican los sitios de edición alternativa A y C en los dominios de unión para fosfolípidos y calmodulina, respectivamente. Las barras inferiores indican la longitud de las clonas aisladas con los respectivos nombres (a-k) asignados durante los rastreos. Todas las clonas que se ubican en el sitio A corresponden a la isoforma 1x; en el sitio C, las clonas corresponden a la isoforma 1b.

4.2 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS RNAm DEL HIGADO DE RATA EN DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO

Para esta sección de nuestro estudio aislamos RNA tejido hepático normal de ratas adultas (HN), de hígados a los 2, 4, 8, 14 y 17 días posthepatectomía (R2, R4, R8, R14 y R17, respectivamente) así como de hígado fetal de 13 y 17 días de gestación (F13 y F17), hígado de ratas neonatas (NEO) y de células AS-30D (HEP). Para todas las reacciones de RT-PCR se usaron 5 µg de RNA total de cada uno de los tejidos. Como control, realizamos amplificaciones del gen constitutivo para la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

En la Fig. 18, se muestran los productos de PCR obtenidos con oligos específicos para PMCA1. Los productos editados en el sitio A (el cual se ubica hacia el extremo amino e involucra exones que codifican residuos próximos a un dominio sensible a fosfolípidos) se muestran en la Fig. 18.A. De acuerdo a la tabla 3, se esperaba una banda única de 231 pb correspondiente a la variante 1x. Sin embargo, es evidente una banda adicional de un peso molecular de 312 pb; dado lo inesperado de este resultado, decidimos aislar esta banda, subclonarla y secuenciarla. Esta banda resultó inequívocamente ser la isoforma 2w la cual se obtuvo debido a que el par de oligos utilizado, también hibrida con el DNAC de la isoforma 2 (Fig. 19). Un análisis cualitativo sugiere que la isoforma 1x tiene una expresión relativamente alta y muy similar en todos los tejidos, no así la isoforma 2w la cual es mucho menos abundante y con mayor variación si se comparan los contenidos. En la Fig. 18 se muestra un par de autoradiografías, correspondientes a reacciones de PCR distintas a las mostradas en los paneles A y B de la misma figura, pero realizadas bajo las mismas condiciones, que demuestran la especificidad de los productos obtenidos. En estas hibridaciones se usaron como sondas, un oligo interno marcado para los productos de sitio A (Fig. 18.C) y el DNAC completo de rPMCA2 para el sitio C (Fig. 18.D)

La isoforma 4 del sitio A comprende las variantes 4x y 4z de 450 y 420 pb, respectivamente. La expresión de 4x es mayor que la de 4z, aunque en el gel se aprecia que la expresión es notoriamente menor en el hepatocarcinoma y en el hígado fetal de 13 días (Fig. 20.A). Resalta también que la expresión de la isoforma 4x aumenta a través del proceso de regeneración hepática siendo aparentemente mayor que en el hígado normal. La variante 4z no se encontró en hígado fetal de 13 días, en el hígado normal adulto, ni en el hepatoma. En

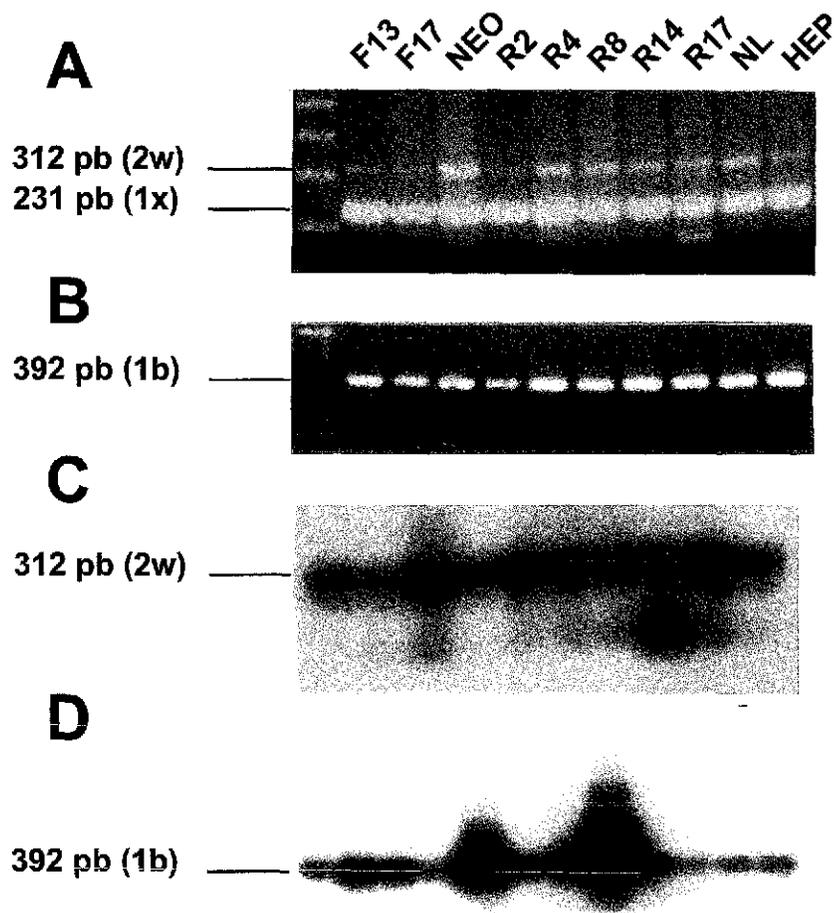


Figura 18. Gel de agarosa al 2% con los productos de PCR con oligos específicos del sitio A (Panel A) y sitio C (panel B) de la isoforma PMCA1. F13, hígado fetal de 13 días; F17, hígado fetal de 17 días; NEO, hígado neonato; R2, hígado de 2 días de regeneración; R4, hígado de 4 días de regeneración; R8, hígado de 8 días de regeneración; R14, hígado de 14 días de regeneración; R17, hígado de 17 días de regeneración; NL, hígado adulto normal; HEP, hepatoma AS-30D. En el panel C se muestra la hibridación tipo Southern de los productos generados con oligos del sitio 1A con las sondas de rPMCA2. En el panel D se muestra la hibridación tipo Southern de productos generados con oligos para sitio 1C con un oligo internos de la secuencia, en este caso las muestras fueron: F17, NEO, NEO, R2, R4, R8, R14, R17, HN, HN, y HEP, HEP. Las hibridaciones mostradas en los paneles C y D no corresponden a los mismos experimentos de los paneles A y B.

los demás estadios analizados solo se detectó tenuemente.

Las variantes del gen 4 editadas en sitio C reportadas en la literatura son la 4a y 4b de 455 y 277 pb, respectivamente. Con nuestro juego de oligos diseñados para sitio 4B/C, se amplificaron las variantes 4a (455 pb), 4b (277 pb) y 4d (385) (Fig. 20.B). Esta última reportada por nuestro grupo en humano (Santiago, 1996) y por primera vez reportada en hígado. La isoforma constitutiva 4b muestra una expresión relativamente alta en la mayoría de los tejidos, excepto en el hígado en regeneración temprana y en el hepatoma AS-30D. La identidad de estas variantes fue comprobada por hibridación con un oligo interno de esta secuencia (Fig. 20.C) o por hibridación con el DNAc completo de rPMCA2 (Fig. 20.D). Las hibridaciones mostradas en estas autoradiografías corresponden a geles distintos de los mostrados en los paneles A y B de la misma figura, obtenidos bajo las mismas condiciones.

Utilizando el hallazgo adicional de la isoforma 2w, analizamos la contribución de las isoformas editadas en el sitio A de los genes 1 y 4 y encontramos que en las muestras hepáticas analizadas, la variante 1x representa bajo nuestras condiciones, la mayor proporción aparente, seguida de las variantes 2w, 4x y 4z.

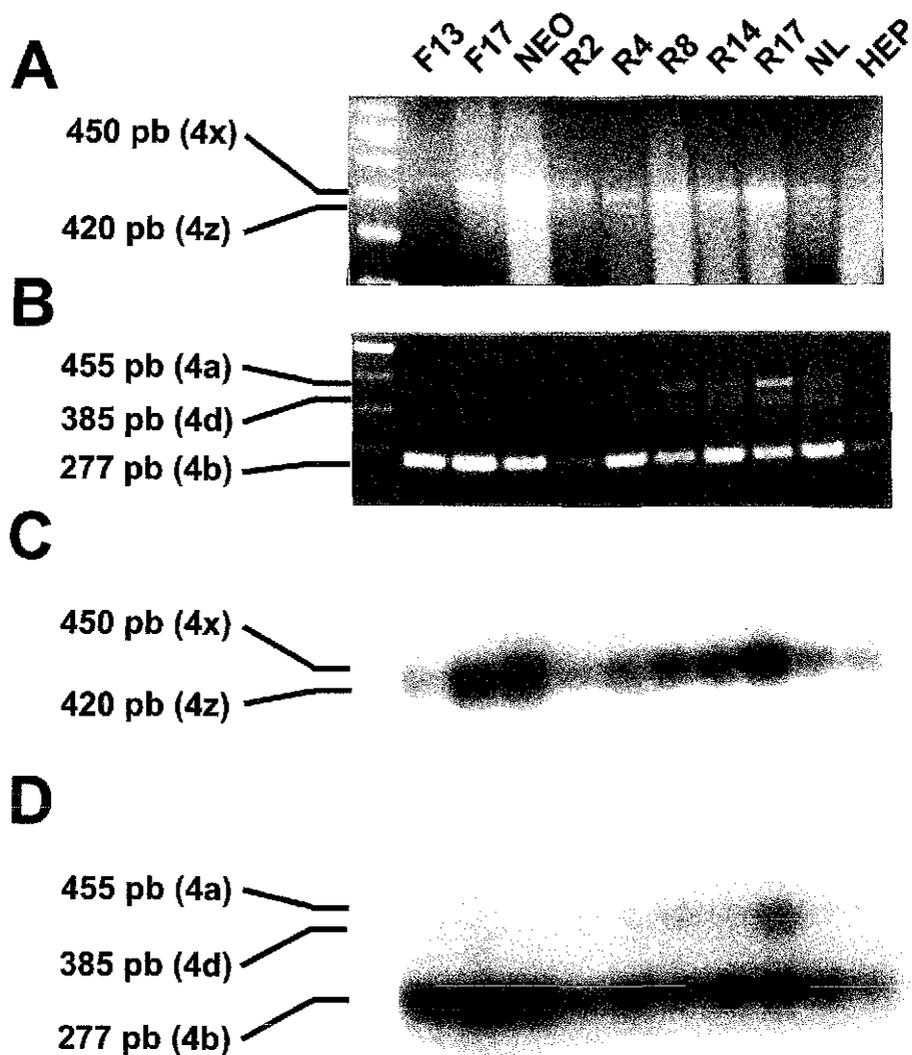


Figura 20. A) Gel de agarosa al 2% con los productos de PCR con oligos específicos del sitio A (Panel A) y sitio C (panel B) de la isoforma PMCA4. En los paneles C y D, se muestran hibridaciones tipo Southern (de experimentos distintos a los mostrados en A y B) de los productos de PCR obtenido del sitio 4A y 4C, respectivamente. Las abreviaturas y el orden de las muestras son iguales que en la Fig.18.

4.3 ANALISIS DE LA EXPRESION A NIVEL DE PROTEINAS

En la Fig. 21 se muestra un gel representativo teñido con azul de Coomassie idéntico al usado para transferir a nitrocelulosa, excepto que en este gel se cargó un exceso de ATPasa purificada a homogeneidad (40 μg) para poder visualizarla con claridad. En el mismo gel se cargaron 20 μg del sobrenadante obtenido al solubilizar fracciones crudas de membranas de hígado normal y del hepatoma AS-30D con Tritón X-100. Con objeto de explorar la expresión de la ATPasa de Ca^{2+} en las distintas etapas de regeneración analizadas en este trabajo se realizaron geles que fueron teñidos con azul de Coomassie, o se transfirieron en nitrocelulosa. Paralelamente se corrió el correspondiente control de ATPasa purificada de eritrocitos, que aunque no se aprecia en el gel teñido con azul de Coomassie (Fig. 22), sí fue detectable con el anticuerpo monoclonal.

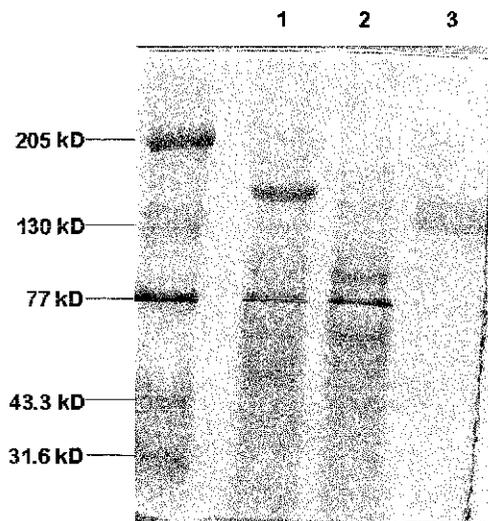


Figura 21. Gel de poliacrilamida al 7.5% teñido con azul de Coomassie. Se muestra el marcador de peso molecular (marcador preteñido Kaleidoscope de Bio-Rad); en el carril 1 se muestra el solubilizado del hepatoma AS-30D y en el carril 2, el de hígado normal de rata; en el carril 3 se muestra la ATPasa de calcio purificada a homogeneidad de eritrocitos humanos.

En la Figura 23.A se muestra el análisis tipo Western obtenido empleando el anticuerpo monoclonal 5F10, en esta inmunotransferencia se aprecia en el primer carril, el control positivo dado por la ATPasa de eritrocitos (hPMCA) purificada donde se cargaron aproximadamente 500 ng de proteína. En los siguientes carriles, se muestran iguales cantidades de proteína

transferida de los sobrenadantes de muestras solubilizadas de fracciones crudas de membranas de hígado normal (NL) y del hepatoma AS-30D (HEP), respectivamente (20 μ g). Aunque las cantidades de proteína aplicadas al gel fueron iguales, es obvio que la cantidad de ATPasa de calcio no es equivalente en las membranas de hígado normal en comparación con el hepatoma AS-30D. Resalta claramente en el carril correspondiente al hepatoma AS-30D y muy tenuemente en el carril del hígado normal adulto, la presencia de una banda de mayor peso que la ATPasa de calcio de eritrocito (138 kD). En el análisis tipo Western que se muestra en la Fig. 23.B, se usaron igualmente 20 μ g de proteína solubilizada por carril para cada una de las etapas de regeneración reportadas en la sección de resultados de RT-PCR, éstas son: hígado en regeneración de 2 (R2), 4 (R4), 8 (R8), 14 (R14) y de 17 días (R17). En el tiempo más corto posthepatectomía fue aparente una elevación en la cantidad de ATPasa, que disminuyó conforme avanzó el tiempo de regeneración del tejido hepático.

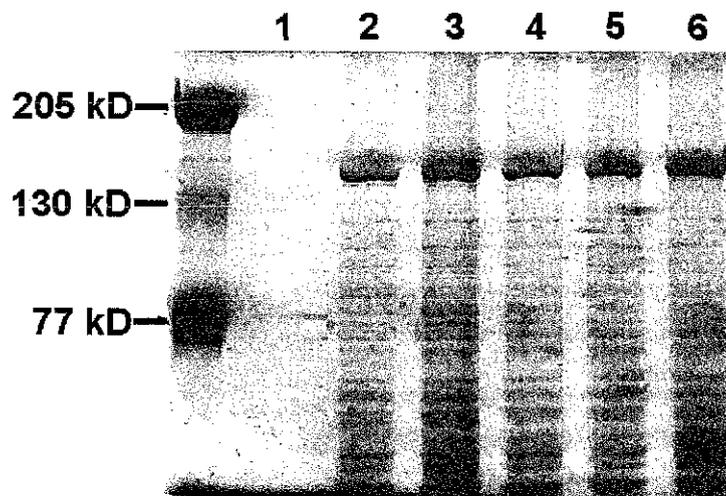


Figura 22. Gel de poliacrilamida al 7.5% teñido con azul de Coomassie de los solubilizados crudos correspondientes a muestras de hígado en regeneración. Se muestra el marcador de peso molecular (marcador preteñido Kaleidoscope de Bio-Rad); en el carril 1 se muestra el control positivo (ATPasa de eritrocitos humanos) y en los carriles 2 a 6 se muestran 20 μ g de los solubilizados de hígado en regeneración de 2, 4, 8, 14 y 17 días.



Figura 23. Autoradiografía de proteínas transferidas en nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo monoclonal 5F10 dirigido contra la ATPasa de eritrocitos y reveladas por quimioluminiscencia. En el panel A se muestra el control positivo correspondiente a la ATPasa pura de eritrocitos humanos [hPMCA, (460 ng, aproximadamente)] cuyo peso aproximado es de 138 kD; se muestran también, las bandas reconocidas en el solubilizado de hígado normal (NL) y en el solubilizado del hepatoma AS-30D [HEP (20 μ g de proteína cada uno)]. En el panel B se muestra el control positivo (hPMCA), el control de una rata laparotomizada y sucesivamente, las muestras correspondientes al hígado en regeneración desde 2 hasta 17 días (R2-R17).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. DISCUSION

La ATPasa de calcio de la membrana plasmática del hígado no es tan bien conocida como las provenientes de otros tejidos. Esta enzima pertenece a las ATPasas tipo P, sin embargo no comparte todas las características consideradas generales para estas ATPasas. El hecho de que esta enzima forma un intermediario fosforilado estabilizado por lantano como ocurre con el de otras ATPasas y la semejanza demostrada con las proteínas de la familia, por ejemplo con la bomba de eritrocitos, contribuyen a considerar sin duda que corresponde a una ATPasa tipo P (Carafoli, 1992).

La información existente acerca de esta ATPasa de calcio es en verdad controvertida. Un punto de debate es si solo existe una ATPasa o son dos (Iwasa y col., 1983; Lin 1985 y 1988). Más aún, se desconoce en qué dominio físico de la membrana se localiza. También se discute qué molécula o moléculas podrían hacer las veces de CAM en esta enzima en particular, siendo un candidato la proteína unidora de calcio, regucalcina (Takahashi y col., 1993). Respecto a la primera controversia, Lin y col. pusieron a discusión la existencia de una $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPasa la cual es distinta de la bomba de Ca^{2+} , ambas con propiedades distintas como la especificidad por ATP, el requerimiento de Mg^{2+} , la formación de una fosfoenzima y además su localización.

Aparentemente, esta ATPasa de calcio puede ser regulada de una forma distinta y pueden participar moléculas que nunca han sido relacionadas con la regulación de otras bombas de calcio, tales como regucalcina (Takahashi y col., 1993; Takahashi y col., 1994) y las proteínas G (Jouneaux y col., 1993). Llama la atención que por un lado, regucalcina es una proteína unidora de calcio no muy conocida dentro de la literatura general y por el contrario, las proteínas G son ampliamente conocidas porque intervienen en multitud de procesos intracelulares, pero ambas se han mencionado como probables moduladoras de la ATPasa hepática.

Los problemas de estudiar proteínas como la ATPasa de calcio que representa una baja proporción de las proteínas de membrana, han sido superados al menos parcialmente, a través de las herramientas que provee la biología molecular. Precisamente dadas estas ventajas, nuestro objetivo fue el explorar desde un punto de vista molecular qué sucede en el

5. DISCUSION

La ATPasa de calcio de la membrana plasmática del hígado no es tan bien conocida como las provenientes de otros tejidos. Esta enzima pertenece a las ATPasas tipo P, sin embargo no comparte todas las características consideradas generales para estas ATPasas. El hecho de que esta enzima forma un intermediario fosforilado estabilizado por lantano como ocurre con el de otras ATPasas y la semejanza demostrada con las proteínas de la familia, por ejemplo con la bomba de eritrocitos, contribuyen a considerar sin duda que corresponde a una ATPasa tipo P (Carafoli, 1992).

La información existente acerca de esta ATPasa de calcio es en verdad controvertida. Un punto de debate es si solo existe una ATPasa o son dos (Iwasa y col., 1983; Lin 1985 y 1988). Más aún, se desconoce en qué dominio físico de la membrana se localiza. También se discute qué molécula o moléculas podrían hacer las veces de CAM en esta enzima en particular, siendo un candidato la proteína unidora de calcio, regucalcina (Takahashi y col., 1993). Respecto a la primera controversia, Lin y col. pusieron a discusión la existencia de una $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPasa la cual es distinta de la bomba de Ca^{2+} , ambas con propiedades distintas como la especificidad por ATP, el requerimiento de Mg^{2+} , la formación de una fosfoenzima y además su localización.

Aparentemente, esta ATPasa de calcio puede ser regulada de una forma distinta y pueden participar moléculas que nunca han sido relacionadas con la regulación de otras bombas de calcio, tales como regucalcina (Takahashi y col., 1993; Takahashi y col., 1994) y las proteínas G (Jouneaux y col., 1993). Llama la atención que por un lado, regucalcina es una proteína unidora de calcio no muy conocida dentro de la literatura general y por el contrario, las proteínas G son ampliamente conocidas porque intervienen en multitud de procesos intracelulares, pero ambas se han mencionado como probables moduladoras de la ATPasa hepática.

Los problemas de estudiar proteínas como la ATPasa de calcio que representa una baja proporción de las proteínas de membrana, han sido superados al menos parcialmente, a través de las herramientas que provee la biología molecular. Precisamente dadas estas ventajas, nuestro objetivo fue el explorar desde un punto de vista molecular qué sucede en el

hígado de rata. En particular ha sido de nuestro interés, saber si existe alguna expresión diferencial de isoformas de PMCA en el hepatoma AS-30D, así como en el hígado en distintas etapas de desarrollo y durante el proceso de regeneración.

El papel que juega el calcio en los tejidos tumorales, ha sido abordado por varios grupos (Hickie y col., 1967; Swierenga y col., 1978). En el caso del hepatocarcinoma AS-30D, se sabe que lleva a cabo una captura elevada de este catión tanto a través de la membrana plasmática, como a través de la membrana mitocondrial (Fiskum 1985). En el mismo sistema tumoral, hemos encontrado que las células transportan calcio con eficiencia similar a como lo hacen las células normales. Además, mostramos que la actividad de la ATPasa es menor que los controles y a pesar de ello, el transporte de calcio es similar. Este fenómeno se explicó a través de un recambio $ATP \leftrightarrow Pi$ elevado el cual a su vez pudiera sostener el transporte de calcio (Mas-Oliva, y col., 1991). Estos hallazgos sugieren que la bomba de calcio de AS-30D tiene un mecanismo más eficiente para regular el movimiento de calcio haciendo un uso óptimo de la energía.

En el hígado en condiciones de regeneración, ideal como modelo de células en crecimiento acelerado pero bajo control, hemos encontrado que la actividad de la PMCA comienza a recuperarse alrededor del 40. día posthepatectomía. La actividad enzimática alcanza sus niveles normales hasta después de 20 días (Mas-Oliva y col., 1991, Fig. 8).

Parece ser que la naturaleza provee a las células con un delicado control de señales intracelulares a través de la producción de una gran diversidad de variantes (Enyedi y col., 1994). En el caso de la PMCA se han descrito cuatro genes básicos de los cuales la edición alternativa genera gran variedad de variantes o subtipos. Varios grupos han analizado la distribución de las distintas isoformas y han mostrado que las variantes PMCA1 y 4 son las de más amplia distribución, o constitutivas. Por otro lado, las variantes PMCA 2 y 3 se distribuyen siguiendo un patrón tejido-específico siendo particularmente localizadas en el sistema nervioso. En el hígado, se ha demostrado que la variante PMCA2b es la más abundante de las tres isoformas generadas en sitio C en el gen 2 (Keeton y col., 1993). Sin embargo, por análisis cuantitativo se encontró que dicha isoforma sólo explica cerca de un 2% de la expresión total (Stauffer y col., 1993). La información recopilada de la literatura no abarca todas las posibilidades de expresión fisiológica del tejido hepático, consideradas

en este trabajo.

Para llevar a cabo nuestros objetivos, hicimos uso de dos herramientas fundamentales de la biología molecular: el análisis de una biblioteca de DNAC y amplificaciones por PCR de mensajeros específicos de la PMCA.

El análisis a través de tamizajes sucesivos de la biblioteca de DNAC del hepatoma AS-30D proporcionó un hallazgo muy general. Bajo nuestras condiciones, encontramos que este sistema tumoral expresa mayoritariamente a la isoforma rPMCA1, es decir, encontramos consistentemente a una de las isoformas constitutivas (housekeeping) descritas hasta ahora (Fig. 17). La poca información provista por el análisis de la biblioteca de DNAC se atribuye al hecho de que idealmente una biblioteca de esta naturaleza, se diseña a partir de tejidos con una alta expresión de los RNAm de interés. Si se considera que la cantidad de proteína es un buen indicador de la abundancia del mensajero correspondiente, se calcula que de una proteína que representa el 1% del total de proteínas celulares el RNAm codificante implica al 1% del poliA. Las clonas de DNA de interés comprometerían un 1% de las clonas en la biblioteca de DNAC (Ausubel, 1995). Existen cálculos de que la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática representa sólo el 0.01-0.1% del contenido total de proteína (Knauf y col., 1974). Este valor aproximado nos indica que una cantidad mínima de RNAm se encuentra representada en la biblioteca de DNAC. Los resultados obtenidos con nuestra biblioteca sugieren que de alguna forma, las variantes de rPMCA 1x (sitio A) y 1b (sitio C) son las más abundantes en el tejido tumoral AS-30D.

Sin embargo, una mayor aproximación al estudio de estas proteínas de baja expresión, se logra a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Trabajos previos por PCR cuantitativa en tejidos humanos, reportan que la mayor parte de la expresión (70%) de las isoformas editadas en sitio A se debe a la variante 1x, seguida por la variante 4x que explica un 28%. Las variantes 2x y 2w sólo representan $\leq 1\%$. Las formas más abundantes editadas en sitio C son las variantes PMCA1b y 4b (Stauffer y col., 1993). Un estudio enfocado en el tejido hepático de humano y de rata mostró que las isoformas constitutivas 1 y 4 se expresan en abundancia, a diferencia de PMCA2 en el hígado humano, en tanto que PMCA1 es más abundante que PMCA2 en el hígado normal de rata (Howard y col., 1994).

Mediante amplificaciones por PCR, encontramos una expresión diferencial obvia en el

hepatocarcinoma AS-30D. Podemos decir que la isoforma 1x mostró aparentemente un alto contenido en el tejido hepático y además más o menos constante en todos los estadios del hígado (Fig. 18) como corresponde a una variante constitutiva. En esta misma figura resalta una banda inesperada que se explica adecuadamente observando el análisis de secuencia de la Fig. 19. Es evidente la homología entre los oligonucleótidos diseñados originalmente para humano (Tabla 3) y la secuencia de rata reportada en la literatura (Adamo y col., 1992). En la Fig. 18.B se observa la expresión de la variante generada del gen 1 editada en sitio C, llamada 1b que mostró una síntesis muy similar en todas las muestras analizadas. Referente a las variantes editadas en sitio A del gen de PMCA4, encontramos una mayor variabilidad. Se observa un bajo rendimiento en estados fetales tempranos (F13) y en el hepatoma AS-30D de la variante 4x resaltando el hígado neonatal y el hígado en regeneración de 17 días con los mayores rendimientos de esta isoforma. En comparación, la isoforma 4z se presentó con mucho menor rendimiento en general, y ausente en F13, hígado normal y en el hepatoma.

Del análisis de la expresión de variantes del gen 4 editadas en sitio C, demostramos que la isoforma 4b es constitutiva y se expresa en todos los tejidos (Fig. 20). Llama la atención una expresión ligeramente menor de ésta en el tejido tumoral así como en el hígado regenerado de 2 días. Con relación a lo observado con la expresión de la isoforma 4b podemos especular respecto al mecanismo de subregulación mediado por calcineurina, originalmente descrito en neuronas de rata expuestas artificialmente a un aumento sostenido de Ca^{2+} en el citosol (Guerini y col., 2000). Este mecanismo podría relacionarse con lo observado en el hepatoma y en etapas relativamente tempranas de la regeneración hepática, dado que en estos sistemas también se han descrito elevaciones del Ca^{2+} citosólico (Díaz-Muñoz y col., 1998; Cittadini y col., 1982; Fiskum, 1985) donde calcineurina podría tener un papel modulador relevante. Curiosamente, las variantes 4a y 4d no se encontraron en el tumor, ni en hígado en etapas tempranas de desarrollo (neonatal y fetal). Un hallazgo relevante fue la aparente expresión diferencial como función del estado de desarrollo, en particular de la isoforma 4d. Cabe hacer énfasis en que la isoforma 4d sólo se había reportado previamente en corazón humano tanto en estado fetal como adulto (Santiago y col., 1996). La presencia de las variantes producidas del gen 4 es un dato nuevo, que contrasta con el reporte previo por Howard y col. (Howard y col., 1994) quienes descartaron la

presencia de todas las variantes de PMCA4 en el hígado de rata.

La expresión no sólo tejido-específica, sino desarrollo-específica de los subtipos de la PMCA, se ha demostrado previamente en el transcurso de la diferenciación miogénica y neuronal (Hammes y col., 1994). En estirpes de megacarioblastoides se expresan cantidades relativamente altas de PMCA, mientras que en las plaquetas maduras, sólo se encuentran trazas de la proteína (Pászty y col., 1998).

La edición alternativa de variantes puede alterarse y mantenerse en respuesta a estímulos externos (Zacharias y col., 1996). En células IMR32 (neuroblastoma humano) con el calcio intracelular elevado artificialmente, la edición del gen 2 del sitio A se alteró dejando expresar a la variante x además del subtipo w que se expresa en condiciones basales. Un hallazgo más de este trabajo es que estos cambios en la edición, no requieren síntesis de proteínas para que ocurran, por lo que éste pudiera ser un mecanismo que regule la expresión genética a nivel post-transcripcional (Zacharias y col., 1996). Mediante técnicas de hibridación *in situ* se han detectado patrones de expresión de los 4 genes de PMCA sobrelapantes espacialmente pero distintos en embriones de ratón (Zacharias y col., 1999). En este trabajo se reportó la presencia de las isoformas 1 y 4, esta última desde los 12.4 días de gestación en mayor proporción en hígado que en otros tejidos con un claro decaimiento en la expresión hacia los 18.5 días. Este patrón de expresión sugiere una regulación tanto positiva como negativa.

En el presente trabajo se muestran diferencias dependiendo del estado de desarrollo o de la etapa de regeneración. Los resultados obtenidos amplificando los mensajes contenidos en los RNAm codificantes para las ATPasas de Ca^{2+} sugieren que la PMCA incluyendo todas sus variantes, pueden ser reguladas por mecanismos muy complejos que modulan señales específicas para la expresión de las mismas.

Consideramos que la combinación de isoformas detectadas en el hepatoma AS-30D, o de alguna manera, la suma integrada de sus características intrínsecas (por ejemplo, su afinidad por Ca^{2+} y CAM), expliquen probablemente cómo el transporte de calcio se realiza eficientemente con una menor actividad hidrolítica (Mas-Oliva, 1991). Es claro que las variantes conocidas de la PMCA poseen propiedades que las distinguen, las cuales guardan estrecha relación con su ubicación y papel fisiológico. Por ejemplo, las variantes del gen 2 (2a y 2b), son inusualmente sensibles a calcio (su afinidad por Ca^{2+} es mayor) y a CAM lo

que correlaciona con su localización preferencial en el sistema nervioso (Elwess y col., 1997). La isoforma rPMCA2b es 4 veces más sensible a CAM que la isoforma hPMCA4b y la isoforma rPMCA2a presenta mucho mayor afinidad que la isoforma humana correspondiente (Elwess y col., 1997). El hepatoma AS-30D, como otros sistemas tumorales, se caracteriza por una elevada concentración intracelular de calcio, por lo que se esperaría la expresión de subtipos de la PMCA mucho menos susceptibles al catión.

Consideramos que probablemente, los cambios observados en la expresión de los RNAm del hepatoma AS-30D, deben ocurrir en este tipo de sistemas transformados en forma paralela con otros cambios importantes. Una posibilidad que podría imaginarse es que la aparente subexpresión de isoformas específicas pudiera ocurrir simultáneamente con una sobreexpresión de otros sistemas celulares que mueven calcio. Este tipo de regulación, se presenta *in vivo* en células CHO (células de ovario de hámster Chino, Guerini y col., 1995) o en células endoteliales de aorta de rata (células RAEC, Liu y col., 1996). Una expresión de 15 a 20 veces mayor de PMCA4b sobre la cantidad de bomba endógena produce una subregulación de la ATPasa sarcoplásmica endógena (Guerini y col., 1995). Lo contrario ocurre cuando se sobreexpresa la variante SERCA 3; en este caso, se observa que la ATPasa (SERCA 3) sarcoplásmica y la variante SERCA2 endógenas disminuyen su expresión (Kuo y col., 1997).

Desde el punto de vista fisiológico, parecería muy interesante el vislumbrar la expresión de los mensajeros editados en sitio C pues en esta región se localiza el sitio de unión a CAM. En el caso de la PMCA hepática, este sitio adquiere especial interés, pues la principal proteína unidora de calcio (CAM), aparentemente no juega un papel en su regulación. Sin embargo, la PMCA de hígado purificada parcialmente mediante inmunocromatografía de afinidad es capaz de unir CAM con una afinidad mayor que la que presenta la PMCA de eritrocito (Kessler, y col., 1990). La unión de CAM se demostró en ensayos en los que la proteína transferida en nitrocelulosa y previo bloqueo de las membranas, se incubaron con distintas concentraciones de ¹²⁵I-CAM. Es decir, Aún cuando no se conoce la organización estructural y funcional del dominio de unión a CAM en la ATPasa de calcio hepática, pudiera suceder que este dominio se encuentre enmascarado en la enzima intacta. Lo anterior tiene sentido, dado que cuando la enzima se trata en condiciones desnaturalizantes, tanto para electroforesis como para ensayos de unión con la

proteína transferida, el dominio puede quedar expuesto (Kessler y col., 1990). No obstante, esto no resuelve la incógnita de qué sucede en la enzima intacta. Todo parece indicar que la enzima de hígado presenta una afinidad por calcio óptima en ausencia de CAM que refleja alguna forma de interacción del dominio de CAM con algún(os) otro(s) dominio(s) que potencialmente pudiera estar en otro sitio de la bomba.

De la transferencia que se muestra en la Fig. 23, cabe mencionar que nuestro control positivo funcionó de acuerdo a lo esperado, mostrando una banda correspondiente a la enzima purificada, (PM= 138 kD). Nosotros usamos una dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal para incubar la nitrocelulosa conteniendo las proteínas de geles cargados con aproximadamente 460 ng de proteína purificada. Aunque esta cantidad de proteína puede parecer excesiva, nos permitió visualizar la enzima sin ruido de fondo, lo cual no ocurría si se cargaba 10 veces más de enzima (Fig. 23.A). Para los geles teñidos con azul de Coomassie, se cargó un exceso de la enzima y apenas fue visible la banda correspondiente (Fig. 21).

En el caso de nuestra pregunta a resolver respecto a si existen diferencias a nivel de proteínas entre las células de hígado normal y las del hepatoma AS-30D, es importante mencionar que en los geles teñidos con azul de Coomassie resaltan diferencias en el patrón de bandas de ambos tipos celulares (Figs. 21 y 22). Por otra parte, el análisis tipo Western (Fig. 23.A) muestra claramente, tanto en el caso del hígado normal como en el hepatoma AS-30D, una banda del mismo peso de la ATPasa pura. En la literatura se reporta que la ATPasa de hígado es típicamente de mayor masa que el resto de la familia (Kessler y col., 1990; Carafoli, 1992). Aparentemente, en las membranas hepáticas normales, el anticuerpo monoclonal no reconoce bandas de manera específica de tamaño mayor que la de la PMCA de eritrocitos. El proveedor del anticuerpo establece que esta clona reconoce la banda correspondiente a la PMCA, y dos bandas de 95 y 180 kD que posiblemente representen productos naturales de proteólisis o de agregación de la enzima. Kessler y col. al purificar la enzima de hígado encontraron 3 bandas de 170, 140 y 42 kD, de las cuales sólo las dos mayores tuvieron reacción cruzada con el anticuerpo mAb5F10 (Kessler y col., 1990). En nuestro caso, las dos bandas que observamos son de pesos muy similares que podrían representar dos de las isoformas, tal vez las constitutivas que sabemos solo difieren en pocos daltones.

Lo más interesante que resalta con el análisis tipo Western de la figura 23.A y que se

encontró consistentemente en otros lotes de membranas, es que si se compara la intensidad de las bandas reconocidas en el hígado normal y en el hepatoma, es notable que en este último existe una mayor cantidad de ATPasa de calcio por miligramo de proteína total del solubilizado. Esta observación sugiere que en el caso de la ATPasa tumoral ocurre que por una parte, la regulación de la proteína pueda tener lugar principalmente a nivel traduccional y/o post-traduccional, más que en el inicio de la transcripción como es lo más común. El hecho de que estos resultados indiquen que la membrana plasmática del tumor AS-30D contiene una mayor cantidad de ATPasa de calcio que las membranas de hígado normal pudiera contraponerse con la observación de que en el sistema tumoral, la cinética indica que la actividad enzimática es menor respecto al hígado normal (Mas-Oliva y col., 1991). Sin embargo, la banda que reconoce al anticuerpo monoclonal puede representar una mezcla de las variantes detectadas por nuestro análisis por RT-PCR no distinguibles como bandas distintas por ser muy parecidas en peso molecular, que no necesariamente tendrían que ser funcionales.

Los análisis tipo Western de los solubilizados de membranas crudas de hígado en distintas etapas de regeneración se muestran en la Figura 23.B. En la etapa más temprana de regeneración analizada (R2) ocurre una "estimulación" de la expresión de la proteína que pudiera ser necesaria para amortiguar los efectos de la condición de estrés dada por la cascada de eventos que se suceden después de una hepatectomía parcial. En etapas posteriores, se observa que la cantidad de proteína va decreciendo.

Todavía quedan muchas incógnitas por resolver acerca de esta complicada enzima movilizadora de calcio. Entre otras, no se conoce cuál es la razón de que su peso molecular sea mayor respecto al resto de las ATPasas de calcio de acuerdo a lo reportado por Kessler (Kessler y col., 1990). A la fecha no se ha demostrado por ejemplo, que la proteína pudiera encontrarse glucosilada (Kessler y col., 1990). Se sugiere la posibilidad de que la enzima contenga una secuencia de inserción, no determinada en la actualidad. Tampoco se cuenta con una preparación de cada región de la membrana hepática, libre de contaminación y que no deje lugar a dudas respecto a su localización. Es factible que pudiera encontrarse una expresión diferencial de isoformas en función del dominio en que se localicen.

En conclusión, debemos puntualizar que este es el primer trabajo en el que se reportan la expresión de los RNAm de la PMCA de hígado de rata en un tejido tumoral, así

como en distintas etapas del desarrollo y en regeneración. Un dato interesante es que de acuerdo con resultados previos (Mas-Oliva y col., 1991), la recuperación de la PMCA es un evento tardío en el proceso regenerativo. Los cambios observados en la expresión diferencial de las isoformas estudiadas, reflejan la importancia que potencialmente pudieran tener éstas en la regulación fina de la homeostasis del calcio durante las diferentes etapas del desarrollo, tanto normal como anormal. Además, encontramos una diferencia entre la cantidad de PMCA presente en las células hepáticas normales con respecto a las tumorales, que bien podría dar un indicio de una adaptación especial de estas últimas, a las demandas específicas de un sistema transformado.

Como perspectivas del trabajo, se desarrollará la metodología específica para purificar a esta enzima en gran escala, tanto del hígado normal como del tumor AS-30D, mejorando las metodologías bioquímicas ya reportadas, o bien, intentando el uso de moduladores propuestos para la PMCA de hígado acoplados a columnas de afinidad. Un punto de especial interés será el estudiar el dominio de unión a CAM de la PMCA hepática donde probablemente radiquen diferencias sustanciales respecto al resto de las ATPasas membranales. Continuando con el enfoque molecular, se implementarán a la brevedad posible, metodologías de PCR en tiempo real que permitan una aproximación cuantitativa de la expresión de las distintas isoformas. Por otro lado, será de interés hacer complementariamente una evaluación a través de métodos inmunohistoquímicos, de la expresión de la ATPasa de calcio en el hígado en los tiempos inmediatos a la intervención quirúrgica para tener un mapeo temporal más preciso de lo que ocurre en el hígado en regeneración. Será necesario hacer uso de anticuerpos específicos de cada isoforma de la PMCA con el propósito de dilucidar claramente qué isoformas activan su expresión durante el proceso. Asimismo, cabe la posibilidad de desarrollar métodos de hibridación *in situ* empleando sondas apropiadas para el tejido hepático, que pudieran proporcionar información adicional acerca no sólo del complejo fenómeno de regeneración, sino también de las diferencias de un sistema transformado como el hepatoma AS-30D.

6: CONCLUSIONES

- 1) Mediante el análisis de una biblioteca de DNAc proveniente del hepatoma AS-30D y bajo nuestras condiciones experimentales, sólo pudimos detectar a la isoforma constitutiva rPMCA1 en este sistema tumoral.
- 2) Mediante técnicas de RT-PCR fue posible identificar en todos los tejidos analizados, las isoformas consideradas como constitutivas procedentes de edición alternativa en los sitios A y C,
- 3) La expresión disminuida de algunas las isoformas detectadas en el hepatoma AS-30D, podría explicar, el comportamiento cinético de la mezcla de subtipos que expresa este sistema tumoral.
- 4) Se determinó la existencia de un patrón diferencial de expresión de las isoformas de PMCA, asociado a las diferentes etapas de desarrollo o de regeneración del tejido hepático.
- 5) La isoforma 4d se detectó en el tejido hepático normal y en etapas avanzadas de regeneración.
- 6) La relación ATPasa de calcio/proteína membranal total es aparentemente mayor en el sistema tumoral que en el tejido hepático normal.

REFERENCIAS

1. Adamo, H.P. and Penniston, J. T. (1992). New Ca²⁺ pump isoforms generated by alternative splicing of rPMCA2 mRNA. *Biochem. J.* 283:355-359.
2. Babu, Y., Sudhakar, S., Sack, J.S. et al. (1985). Three dimensional structure of calmodulin. *Nature* 315:37-40.
3. Bayle, D., Weeks, D. and Sachs, G. (1995). The membrane topology of the rat sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPases by *in vitro* translation scanning. *J. Biol. Chem.* 270:25678-25684.
4. Benaim, G., Zurini, M., and Carafoli, E. (1984). Different conformational states of the purified Ca²⁺-ATPase of the erythrocyte plasma membrane revealed by controlled trypsin proteolysis. *J. Biol. Chem.* 259:8471-8477.
5. Benton, W.D., and Davis, R.W. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196:180-182.
6. Brandt, P., Neve, R.L., Kammesheidt, A., Rhoads, R.E. and Vanaman, T.C. (1992). Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels. *J. Biol. Chem.* 267 4376-4385.
7. Bruscalupi, G., Curatola, G., Lenaz, G., Leoni, S., Mangiantini, M.T., Mazzanti, L., Spagnuolo, S. and Trentalancia, A. (1980). Plasma membrane changes associated with rat liver regeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 597:263-273.
8. Carafoli, E. (1992). The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 267:2115-2118.
9. Carafoli, E. and Guerini, D. (1993). Molecular and cellular biology of plasma membrane Ca²⁺ ATPase. *Trends in Cardiovasc. Med.* 3:177-184.
10. Carafoli, E. and Guerini, D. (1997). The Plasma Membrane Calcium Pump en Calcium and Cellular Metabolism. Sotelo, J. R. and Benech, J. C. (eds). Transport and Regulation. Plenum Press, New York.
11. Carafoli, E., Zurini, M. (1982). The Ca²⁺-pumping ATPase of plasma membranes. purification, reconstitution and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 683:279-301.
12. Caroni, P. and Carafoli, E. (1981). Regulation of Ca²⁺ pumping ATPase of sarcolemma by a phosphorylation/dephosphorylation process. *J. Biol. Chem.* 256:9371-9373
13. Cittadini, A. (1981). *Mol. Cell Biochem.* 36:85-93.
14. Cittadini, A., Dani, A. M., Wolf, F., Bossi, D. and Calviello, G. (1982). Calcium permeability of Erlich ascites tumour cell plasma membrane *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 686:27-35.
15. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H.W., and Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:3240
16. Columbano, A. and Shinozuka, H. (1996) Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J.* 10:1118-1128.
17. Cornell, R.P. (1985). Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration. *Am. J. Physiol.* 249,R551.
18. Criss, W.E. (1982). *Fed. Proc.* 41:2289-2291
19. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

20. de Meis, L (1981). The sarcoplasmic reticulum, transport and energy transduction, in *Transport in the Life Sciences*, Vol. 2, Bittar, E.E. Ed. John Wiley and Sons, New York. Chapter 8.
21. Dedman, J.R., Potter, J.D., Lackson, J.D., Johnson, J.D., Mean, A.R (1977). *J. Biol. Chem.* 252:8415-8422. Physicochemical properties of rat testis Ca^{2+} -dependent regulator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Relationship of Ca^{2+} binding, conformational changes, and phosphodiesterase activity.
22. Delgado-Coello, B. and Mas-Oliva, J. (1996) Lead affects the formation of the phosphorylated intermediate on the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase from human erythrocytes *Med. Sci. Res.* 24:159-161
23. Díaz-Muñoz, M., Cañedo-Merino, R., Gutiérrez Sainas, J. and Hernández-Muñoz, R. (1998) Modifications of intracellular calcium release channels and calcium mobilization following 70% hepatectomy. *Arch. Biochem. Biophys.* 349:105-112.
24. Elwess, N.L., Filoteo, A.G., Enyedi, A. and Penniston, J.T (1997) Plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 272:17981-17986
25. Enyedi, A., Sarkadi, B., Szasz, I., Bot, B. and Gardos, G. (1980). Molecular properties of the red cell calcium pump. II Effects of proteolysis, proteolytic digestion and drugs on the calcium-induced phosphorylation by ATP in inside/out red cell membrane vesicles. *Cell Calcium* 1:299-310
26. Enyedi, A., Verma, A.K., Heim, R., Adamo, H., Filoteo, A.G., Strehler, E. and Penniston, J.T (1994) The Ca^{2+} affinity of the plasma membrane Ca^{2+} pump is controlled by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 269:41-43.
27. Falchetto, R., Vorherr, T. and Carafoli, E. (1992) The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci.* 1:1613-1621
28. Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J. and Carafoli, E. (1991). The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 266:2930-2936
29. Farber, J.L. (1982) Biology of disease membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis *Lab Invest.* 47:114-123.
30. Fiskum, G. (1985) Intracellular levels and distribution of Ca^{2+} in digitonin-permeabilized cells. *Cell Calcium* 6:25-37.
31. Furukawa, K.I., Tawada, Y. and Shigekawa, M. (1989) Protein kinase C activation stimulates plasma membrane Ca^{2+} pump in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 264:4844-4849
32. Garrahan, P.J. (1986) Partial reactions of the Ca^{2+} -ATPase. En *The Ca^{2+} Pump of Plasma Membranes*. Rega, A.F. and Garrahan, P.J. eds. CRC Press, Inc. USA
33. Graf, E., and Penniston, J.T. (1981). *Arch. Biochem. Biophys.* 210:256-262.
34. Griffin, A.C., Nye, W.N., Noda, L. and Luck, J.M. (1948). Tissue proteins and carcinogenesis. I. The effect of carcinogenic azo dyes on liver proteins. *J. Biol. Chem.* 176:1225-1234.
35. Grunstein, M., and Hogness, D.S. (1975). Colony hybridization a method for the isolation of cloned cDNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3961-3965.
36. Gubler, U. and Hoffman B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
37. Guerini, D., Garcia-Martin-E, Zecca, A., Guidi, F. and Carafoli, E. (1998). The calcium pump of the plasma membrane: membrane targeting, calcium binding sites, tissue-specific isoform expression. *Acta Physiol. Scandinavica* 163 Suppl. 643:265-273.
38. Guerini, D., Schroder, S., Foletti, D., and Carafoli, E. (1995) Isolation and characterization of a stable Chinese hamster ovary cell line overexpressing the plasma membrane Ca^{2+} ATPase. *J. Biol. Chem.* 270:14643-14650.

39. Guerini, D., Wang, X., Li, L., Genazzani, A., and Carafoli, E. (2000). Calcineurin controls the expression of isoform 4CII of the plasma membrane Ca^{2+} pump in neurons. *J. Biol. Chem.* 275:3706-3712.
40. Hammes, A., Oberdorf, S., Strehler, E., Stauffer, T., Carafoli, E., Vetter, H. and Neyses, L. (1994). Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *FASEB J.* 8: 428-435.
41. Heim, R., Iwata, T., Zvaritch, E., Adamo, H.P., Rütishauser, B., Strehler, E.E., Guerini, D. and Carafoli, E. (1992). Expression, purification and properties of the plasma membrane Ca^{2+} pump and its N-terminally truncated 105-kDa fragment. *J. Biol. Chem.* 267:24476-24484
42. Hickie, R.A. and Kalant, H. (1967). Calcium and magnesium content of rat liver an Morris hepatoma 5123tc. *Can. Res.* 27:1053-1057.
43. Higgins, G.M. and Anderson, R.M. (1931). Experimental pathology of the liver. *Arch. Pathol.* 12:186-202.
44. Hilfiker, H., Strehler-Page, M.A., Stauffer, T.P., Carafoli, E. and Strehler, E.E. (1993). Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1. *J. Biol. Chem.* 268:19717-19725.
45. Hilfiker, H., Guerini, D. and Carafoli, E. (1994). Cloning and expression of isoform 2 of the human plasma membrane Ca^{2+} ATPase. *J. Biol. Chem.* 268:19717-19725.
46. Howard, A., Barley, N.F., Legon, S. and Walters, J.R.F. (1994). Plasma-membrane calcium-pump isoforms in human and rat liver. *Biochem J.* 303:275-279
47. Iwasa, T., Iwasa, Y., and Krishnaraj, R. (1983). Comparison of high affinity Ca^{2+} -ATPase and low affinity Ca^{2+} -ATPase in rat liver plasma membranes. *Arch. Int. Pharmacology.* 264:40-58
48. James, P.H., Pruschy, M., Vorherr, T., Krebs, J., Morelli, A., Castello, G., McCormick, D., Penniston, J.T., De Flora, A. and Carafoli, E. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:8289-8296.
49. Jouneaux, C., Audigier, Y., Goldsmith, P., Pecker, F., and Lotersztajn, S. (1993). Gs mediates hormonal inhibition of the calcium pump in liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 268:2368-2372.
50. Keeton, T.P., Burk, S.E. and Shull, G. (1993). Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. *J. Biol. Chem.* 268:2740-2748
51. Keeton, T.P., and Shull, G.E. (1995). Primary structure of rat plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice site A. *Biochem. J.* 306:779-785.
52. Kennedy, K.A., Teicher, B.A., Rockwell, S. and Sartorelli, A.C. (1980). The hypoxic tumor cell: a target for selective cancer chemotherapy. *Biochem. Pharm.* 29:1-8.
53. Kessler, F., Bennardini, F., Bachs, O., Serratos, J., James, P., Caride, A., Gazzoti, P., Penniston, J.T. and Carafoli, E. (1990). Partial purification and characterization of the Ca^{2+} -pumping ATPase of the liver plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 265:16012-16019.
54. Kietzmann T. and Jungerman, K. (1997). Metabolic zonation of liver parenchyma and its short-term and long-term regulation. In: *Functional Heterogeneity of Liver Tissue: From Cell Lineage Diversity to Sublobular Compartment-Specific Pathogenesis.* by Vidal-Vanaclocha, F. Chapman and Hall, U.S.A.
55. Knauf, P.A., Proverbio, F., and Hoffman, J.F. (1974). Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca-ATPase and N-K-ATPase in human red cell ghosts. *J. Gen. Physiol.* 63:324-336.
56. Kohmoto, M., Tanaka, J., Yoshida, M., Kasamatsu, T., Fujita, K.I., Zhong, W.B., Kaidou, T., Tamura, J. and Imamura, M. (1994). Plasma membrane fluidity during regeneration and atrophy of the rat liver following portal branch ligation. *Eur. Surg. Res.* 26:221-229
57. Kosk-Kosicka, D. and Bzdega, T. (1988). *J. Biol. Chem.* 263:18184-18189

58. Kuo, T.H., Liu, B-F, Yu, Y., Wuytack, F., Raeymaekers, L. and Tsang, W. (1997). Co-ordinated regulation of the plasma membrane calcium pump and the sarco(endo)plasmic reticular calcium pump gene expression by Ca^{2+} . *Cell Calcium* 21(6):399-408.
59. Laemmli U.K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
60. LaPorte, D. C., Wierman, B.M. and Storm, D.R. (1980). Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin. *Biochemistry* 19:3814-3819.
61. Latif, F., Duh, F. M., Gnarra, J., et al. (1993). Von Hippel-Lindau syndrome. Cloning and identification of the plasma membrane Ca^{++} -transporting ATPase isoform 2 gene resides in the von Hippel-Lindau gene region. *Cancer Res.* 53(4):861-867.
62. Lichtner, R. and Wolf, H. U. (1980). Characterization of the phosphorylated intermediate of the isolated high-affinity (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase of the human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 598:486.
63. Lin, S. H. (1985). The rat liver plasma membrane high affinity (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is not a calcium pump. Comparison with ATP-dependent calcium transporter. *J. Biol. Chem.* 260:10976-10980.
64. Lin, S. H. and Russell, W.E. (1988). Two Ca^{2+} -dependent ATPases in rat liver plasma membrane. The previously purified (Ca^{2+} - Mg^{2+}) ATPase is not a Ca^{2+} pump but an ecto-ATPase. *J. Biol. Chem.* 263:12253-12258.
65. Lin, Y. M., Liu, Y.P., and Cheung, W.Y. (1974). *J. Biol. Chem.* 249:49-43
66. Liu, B. F., Xu, X., Fridman, R., Muallem, S., and Huo, T.H. (1996). Consequences of functional expression of the plasma membrane calcium pump isoform 1a. *J. Biol. Chem.* 271:5536-5544.
67. Liu, Y.P. and Cheung, W.Y. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:4193.
68. Lotersztajn, S., Hanoune, J. and Pecker, F. (1981). A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. Dependence of an endogenous protein activator distinct from calmodulin. *J. Biol. Chem.* 256:11209-11215.
69. Lotersztajn, S., Epand, R., Mallat, A. and Pecker, F. (1984). Inhibition by glucagon of the calcium pump in liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259:8195-8201.
70. Lotersztajn, S., Pavoine, C., Brechler, V., Roche, B., Dufour, M., Le-Nguyen, D., Bataille, D. and Pecker, F. (1990). Glucagon-(19-29) exerts a biphasic action on the liver plasma membrane Ca^{2+} pump which is mediated by G proteins. *J. Biol. Chem.* 265:9876-9880.
71. Lotersztajn, S., Pavoine, C., Deterre, P., Capeau, J., Mallat, A., LeNguyen, D., Dufour, M., Rouot, B., Bataille, D. and Pecker, F. (1992). Role of G protein $\beta\gamma$ subunits in the regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem.* 267:2375-2379.
72. MacLennan, D. H. (1970). Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 245:4508-4513.
73. MacLennan, D. H., Brandl, C.J., Korczak, B. and Green, N.M. (1985). Amino acid sequence of a Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316:696-700.
74. Macmanus, J.P., Youdale, T., and Braceland, B.M. (1975). Evidence for the release of calcitonin and parathyroid hormone during liver regeneration in the rat. *Horm. Metab. Res.* 7:83.
75. Mallat, A., Pavoine, C., Dufour, M., Lotersztajn, S., Bataille, D. and Pecker, F. (1987). A glucagon fragment is responsible for the inhibition of the liver Ca^{2+} pump by glucagon. *Nature* 325:620-622.
76. Manalan, A.S. and Klee, C.B. (1984). Calcium binding proteins and their fragments. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 18:227-277.
77. Maneri, L.R. and Low, P.S. (1988). Structural stability of the erythrocyte anion transporter, band 3, in different lipid environments. A differential scanning calorimetric study. *J. Biol. Chem.* 263:16170-16178.

78. Mas-Oliva, J, de Meis, L, and Inesi, G. (1983). Calmodulin stimulates both adenosine 5'-triphosphate hydrolysis and synthesis catalyzed by a cardiac calcium ion dependent adenosintriphosphatase. *Biochemistry* 22:5822-5825.
79. Mas-Oliva, J. (1985). Synthesis of ATP catalyzed by the $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase from erythrocyte ghosts. Energy conservation in plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 812:163-167.
80. Mas-Oliva, J. (1992). Effect of calmodulin on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isolated from cardiac muscle. *Cardioscience* (3):107-115.
81. Mas-Oliva, J, Pérez-Monfort, R., Cárdenas-García, M. and Rivas-Duro M. (1991). Altered coupling states between calcium transport and (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase in the AS-30D ascites hepatocarcinoma plasma membrane. *Mol. Cell. Biochem.* 100:39-50
82. McIntosh, T.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 822:267-287.
83. Means, A.R. and Rasmussen, C. D (1988). Calcium, calmodulin and cell proliferation. *Cell Calcium* 9:313-319.
84. Michalopoulos G K. and DeFrances, M.C (1997) Liver regeneration. *Science* 276:59-66
85. Murachi, T. (1983). *Trends. Biochem. Sci.* 8 167-169
86. Nagy, P., Bisgaard, H C and Thorgeirsson, S S. (1994) Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *J. Cell Biol* 126 23-233
87. Niggli, V., Adunyah, E S., Penniston, J T., and Carafoli, E. (1981). Purified (Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATPase of the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem* 256:395-401
88. Niggli, V., Penniston, J T. and Carafoli, E. (1979). Purification of the $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPase from human erythrocyte membranes using a camodulin affinity column. *J. Biol. Chem* 254:9955-9958.
89. Nojima, H. and Sokabe, H (1987) Structure of a gene for rat calmodulin. *J. Mol. Biol.* 193 439-445.
90. Oliva, G. (1996) Regulación cinética de los intermediarios fosforilados de la ATPasa (Ca^{2+}, Mg^{2+}) de sarcolema cardíaca por calmodulina. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina.
91. Olson, S, Wang, M.G, Carafoli, E, Strehler, E.E: and McBride, O.W. (1991). Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPases to human chromosomes 1q25-32 and 12q21-23. *Genomics* 9:629-641.
92. Ortega, A. Santiago-García, J., Mas-Oliva-J. and Lepock, J R (1996) Cholesterol increases the thermal stability of the Ca^{2+}/Mg^{2+} ATPase of cardiac microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1283 45-50
93. Parlo, R.A. and Coleman, P S. (1984). Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria: the truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* 259.9997-10003
94. Pászty K., Kovács, T., Lacabartz-Porret, C., Papp, B., Enouf, J, Filoteo, A.G., Penniston, J.T: and Enyedi, A. (1998) Expression of hPMCA4b, the major form of the plasma membrane calcium pump in megakaryoblastoid cells is greatly reduced in mature human platelets. *Cell Calcium* 24: 129-135.
95. Pedersen, P.L. and Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPases I: ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12:146-150.
96. Pedersen, P.L. and Carafoli, E (1987) Ion motive ATPases II: energy-coupling and work output. *Trends Biochem. Sci.*12:186-189.
97. Rega, A.F. and Garrahan, P.J. (1978). Calcium ion-dependent dephosphorylation of the Ca^{2+} -ATPase of red cells by ADP. *Biochim. Biophys. Acta* 507:182.
98. Rega, A F., and Garrahan, P.J (1975). Calcium ion-dependent phosphorylation and ATPase activity of the human erythrocyte membranes. *J. Membr Biol.* 22:313.

99. Rega, A.F. and Garrahan, P.J. (1986). The Ca²⁺ pump of plasma membranes. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA.
100. Ronner, P., Gazotti, P. and Carafoli, E. (1977). A lipid requirement for the (Ca²⁺ Mg²⁺)-activated ATPase of erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 179:578-583.
101. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, 2:69-2.72 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
102. Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975) Rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94:441-448.
103. Santiago-Garcia, J., Mas-Oliva, J., Saavedra, D. and Zarain-Herzberg, A. (1996). Analysis of mRNA expression and cloning of a novel plasma membrane Ca²⁺ ATPase splice variant in human heart. *Mol. Cell Biochem.* 155:173-182.
104. Santiago-Garcia, J., Delgado-Coello, B. and Mas-Oliva, J. (2000). Thermal analysis of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Mol. Cell. Biochem.* 209:105-112.
105. Schatzmann, H.J. (1966) ATP-dependent Ca⁺⁺ extrusion from human red cells. *Experientia* 22:364-365.
106. Schatzmann, H.J. (1973). *J. Physiol.* 235:551-569.
107. Schuurmans, F.M.A.H. and Bonting, S.L. (1981). Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase, in Membrane Transport, Bonting S.L. and de Pont, J.J. Eds. Elsevier/North Holland, Amsterdam. Chapter 6.
108. Shimokawa, N. and Yamaguchi, M. (1993). Molecular cloning and sequencing of the cDNA coding for a calcium-binding protein regucalcin from rat liver. *FEBS Letter* 327:251-255.
109. Shull, G.E. and Greeb, J. (1988). Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 263:8646-8657.
110. Shull, G.E. and Greeb, J. (1989) Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 264:18569-18576.
111. Sjölin, L. (1996). The structure of calmodulin and related fragments. In: Molecular Biology Intelligence Unit. Crystallographically determined structures of some biologically important macromolecules. Chapman and Hall, U.S.A.
112. Smallwood, J.I., Gügi, B. and Rasmussen, H. (1988). Regulation of erythrocyte Ca²⁺ pump activity by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263:2195-2202.
113. Smith, D. F., Walborg, E. F. Jr. and Chang, J. P. (1970). Establishment of a transplantable ascites variant of a rat hepatoma induced by 3'-methyl-1-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 30:2306-2309.
114. Stauffer, T., Guerini, D. and Carafoli, E. (1995). Tissue distribution of the four genes products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J. Biol. Chem.* 270:12184-12190
115. Stauffer, T.P., Hilfiker, H., Carafoli, E. and Strehler, E.E. (1993). Quantitative analysis of alternative splicing options for human plasma membrane calcium pump genes. *J. Biol. Chem.* 268:25993-26003
116. Steer, C. (1995). Liver regeneration. *FASEB J.* 9:1396-1400.
117. Stokes, D. L., Taylor, W. R. and Green, N. M. (1994). *FEBS Lett.* 346:32-38.
118. Strehler, E.E. (1991) Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca²⁺ pumps. *J. Membr. Biol.* 120:1-15
119. Strehler, E.E., James, P., Fischer, R., et al. (1990). Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 265:2835-2842
120. Swierenga, S.H., Whitfield, J.F. and Karasaki, S. (1978). Loss of proliferative calcium dependence: simple in vitro indicator of tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:6069-6072.

121. Takahashi, H. and Yamaguchi, M. (1993). Regulatory effect of regucalcin on (Ca²⁺ -Mg²⁺)- ATPase in rat liver plasma membranes: comparison with the activation by Mn²⁺ and Co²⁺. *Mol Cell Biochem.* 124:169-174.
122. Takahashi, H. and Yamaguchi, M. (1994). Activating effect of regucalcin on (Ca²⁺ -Mg²⁺)- ATPase in rat liver plasma membranes: relation to sulfhydryl group. *Mol. Cell. Biochem.* 136:71-76.
123. Tanaka, T. and Hidaka, H. (1980). Hydrophobic regions function in calmodulin-enzyme(s) interactions. *J. Biol. Chem.* 255: 11078-11080.
124. Teo, T.S., and Wang, J.H. (1973). Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca²⁺ binding protein. *J. Biol. Chem.* 248: 5950-5955.
125. Toyoshima, H., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405 647-654.
126. Van Dongen, J. J., Remie, R., Rensema, J.W. and van Wunnik, G. H.J (1990). Manual of microsurgery on the laboratory rat. Part I. Elsevier Science Publishers. The Netherlands
127. Verma, A.K., Filoteo, A.G., Stanford, D.R., Wieben, E. D., Penniston, J.T., Strehler, E.E., Fischer, R., Heim, R., Vogel, G., Mathews, S. et al (1988). Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump. *J. Biol. Chem.* 263:14152-14159.
128. Vincenzi, F.F., and Larsen, F.L. (1980). The plasma membranes calcium pump regulation by a soluble Ca²⁺ binding protein. *Federation. Proc.* 39:2427-2431.
129. Wang, K.K., Villalobo, A. and Roufogalis, B.D. (1989) Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem. J.* 262:693-706
130. Wang, M.G., Yi, H., Hilfiker, H., Carafoli, E., Strehler, E.E. and McBride, O.W. (1994). Localization of two genes encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPases isoforms 2 (ATP2B2) and 3 (ATP2B3) to human chromosomes 3P26→P25 AND xQ28, respectively. *Cytogenet. Cell. Genet.* 67 41-45.
131. Watterson, D.M., Van Eldik, L., Smith, R.E. and Vanaman, T.C. (1976). Calcium-dependent regulatory protein of cyclic nucleotide metabolism in normal and transformed chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73:2711-2715.
132. Waynforth, H.B. and Flecknell, P.A. (1992) Experimental and surgical techniques in the rat. Academic Press. Great Britain.
133. Whitfield, J.F. (1990) Calcium, Cell Cycles, and Cancer. CRC Press, Inc. Florida, USA. p.27
134. Woldegiorgis, G. and Shrago, E. (1985) Adenine nucleotide translocase activity and sensitivity to inhibitors. *J. Biol. Chem.* 260:7585-7590.
135. Wright, L.C., Chen, S. and Roufogalis, B.D. (1993). Regulation of the activity and phosphorylation of the plasma membrane Ca²⁺ - ATPase by protein kinase C in intact human erythrocytes. *Arch Biochem. Biophys.* 306:277-284.
136. Yamaguchi, M. and Yamamoto, T. (1978). *Chem. Pharm. Bull.*, 26 1915-1918.
137. Yamaguchi, M. and Sugii, K. (1981). *Chem. Pharm. Bull.* 29:567-570.
138. Yoshida, Y., Sun, H.-T., Cai, J.-Q. and Imai, S. (1991). Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca²⁺ pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240 kDa protein. *J. Biol. Chem.* 266:9819-19825.
139. Zacharias, D.A., and Strehler, E.E. (1996). Change in plasma membrane Ca²⁺ ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca²⁺. *Curr. Biol.* 6:1642-1652.
140. Zacharias, D.A. and Kappen, C. (1999). Developmental expression of the four plasma membrane calcium ATPase (Pmca) genes in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 1428:397-405

141. Zvaritch, E., James, P., Vorherr, T., Falchetto, R., et al. (1990). Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca^{2+} using trypsin proteolysis. *Biochemistry* 29:8070-8076.
142. Zvaritch, E., Vellani, F., Guerini, D. and Carafoli, E. (1995). A signal for endoplasmic reticulum retention located at the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform G1. *J. Biol. Chem.* 270:2679-2688.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN