



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS
GENES *ATP2A2* y *ATP2A3* (SERCA2 Y
SERCA3) EN LÍNEAS CELULARES
HUMANAS DE CÁNCER
GÁSTRICO Y DE COLON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

QFB. LUCÍA FLORES PEREDO

Tutor: DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG



MÉXICO, D. F.

Enero 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *ATP2A2* Y *ATP2A3* (*SERCA2* Y *SERCA3*) EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE CÁNCER GÁSTRICO Y DE COLON

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Ángel Zarain Herzberg en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Ángel Zarain Herzberg	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Juan Carlos Gómora Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Biol. Gabriela Rodríguez Rodríguez por su apoyo en la realización de los experimentos que fundamentan ésta tesis.

Se agradece al Dr. Juan Santiago García y a la QFB. Fabiola Hernández Rosas por proporcionar amablemente las muestras de mucosa gástrica de humano que se analizaron en esta tesis.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (78750). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Armando Tovar Palacio	Inst. Nac. de Nutrición “Salvador Zubirán”
Suplente	Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Carmen Mejía Vázquez	Instituto de Inv. Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional,

A mi madre por su comprensión, soporte, consejos y paciencia.

A mi padre por darme fuerza y empujarme a lograr mis metas.

A mis hermanos por cuidarme y confiar en mi.

A mi familia por su confianza y solidaridad.

A mis pequeños sobrinos y ahijados por darme felicidad e inyectar vida a mis días.

A mis amigos Esmeralda Soto, Gabriela Carranza, Elizabeth Ruiz, Sazitl Jardón, Alberto Hernández, Bernardo Luna, Gabriel Muciño, Pablo Argott, Pablo Téllez y Víctor Lemus por escucharme en momentos difíciles y compartir experiencias conmigo.

A Gabriel Moreno y Gabriela Rodríguez por ser grandes personas que me brindaron su amistad y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Jorge Fragoso, Julián Guzmán, Lola Hernández, Rafael Estrada y Ana Torres por colaborar juntos.

A mi tutor Dr. Ángel Zarain por su disposición y apoyo para el desarrollo de éste trabajo.

A la claridad del pensamiento para conseguir la objetividad en la ciencia

Al hambre que da el conocimiento para seguir aprendiendo

Con la emoción de hacer lo que me gusta y con el orgullo de ser universitaria!!

ÍNDICE	Página
Índice de Figuras y Tablas	III
Abreviaturas	V
Resumen	VI
Abstract	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Ión calcio	2
2.2 Expresión de las bombas de Calcio del Retículo Sarco(Endo)Plásmico (SERCA).....	3
2.3 ATPasas de tipo P	5
2.4 Estructura de la ATPasa de Calcio del Retículo Sarco(Endo)Plásmico (SERCA).....	6
2.5 Mecanismo de transporte de calcio de la bomba SERCA.....	10
2.6 Genes que codifican para las bombas SERCA (<i>ATP2A1-3</i>)	11
2.6.1 Gen <i>ATP2A1</i>	13
2.6.2 Gen <i>ATP2A2</i>	13
2.6.3 Gen <i>ATP2A3</i>	14
2.7 Propiedades bioquímicas de las isoformas de la bomba SERCA	14
2.8 Regulación de la actividad de la bomba SERCA.....	16
2.9 Consecuencias biológicas de la ausencia de la expresión de la bomba SERCA	
2.9.1 Knockout <i>ATP2A1</i>	21
2.9.2 Knockout <i>ATP2A2</i>	21
2.9.3 Knockout <i>ATP2A3</i>	24
2.10 Alteraciones de las bombas SERCA en procesos patológicos	25
2.10.1 BOMBA SERCA1.....	25
2.10.2 BOMBA SERCA2.....	26
2.10.3 BOMBA SERCA3.....	30

2.11	Las bombas SERCA y el cáncer.	30
2.12	Papel de SERCA en la diferenciación y proliferación celular.	34
2.13	Modelos de diferenciación celular.	37
2.14	SERCA y su posible uso en la terapia contra el cáncer	41
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
4.	HIPÓTESIS.	43
5.	OBJETIVO GENERAL.	44
6.	OBJETIVOS PARTICULARES	44
7.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	45
8.	RESULTADOS.	49
8.1	Cambios morfológicos de cultivos de la línea celular de carcinoma gástrico de humano KATO III, bajo inducción de diferenciación con SCFAs.	49
8.2	Análisis de la viabilidad celular de los diferentes tratamientos aplicados sobre KATO-III	53
8.3	Análisis de cambios morfológicos en cultivos de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 durante su diferenciación por confluencia	54
8.4	Expresión relativa de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en células de carcinoma gástrico KATO-III, con diferentes tratamientos farmacológicos.	56
8.5	Análisis de la expresión de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 durante la diferenciación inducida por confluencia de la línea celular humana de adenocarcinoma de colon Caco-2.	65
8.6	Abundancia relativa de las isoformas de SERCA en líneas celulares y muestras de tejido normal de colon y mucosa gástrica.	69
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
10.	CONCLUSIONES	87
11.	PERSPECTIVAS	88
12.	BIBLIOGRAFÍA	89

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Página

Figura 1. Papel del ión calcio como segundo mensajero intracelular	3
Figura 2. Arquitectura de la bomba SERCA1 basada en la cristalización inducida por Ca^{2+}	7
Figura 3. Modelo de la estructura primaria y secundaria de SERCA2	9
Figura 4. Esquema E1/E2: ciclo de reacción de la ATPasa de Ca^{2+}	11
Figura 5. Representación esquemática de los genes humanos <i>ATP2A1-3</i>	12
Figura 6. Alineamiento de la secuencia completa de aminoácidos de las diferentes isoformas de SERCA con Clustal W	15
Figura 7. Características clínicas e histológicas de la enfermedad de Darier	27
Figura 8. Participación de la bomba SERCA en la proliferación celular	35
Figura 9. Inducción de la diferenciación de la línea celular KATO-III con SCFAs: butirato de sodio y tributirato de glicerilo.	50
Figura 10. Tratamiento de células KATO-III con diferentes fármacos.	52
Figura 11. Viabilidad celular de KATO-III tratadas con mitramicina A.	53
Figura 12. Diferenciación espontánea de Caco-2 en cultivos post-confluentes.	55
Figura 13. Expresión relativa de SERCA3 en células KATO-III diferenciadas con butirato de sodio y tributirato de glicerilo	56
Figura 14. Expresión relativa de las isoformas de SERCA2 (a, b y c) en células KATO-III diferenciadas con butirato de sodio y tributirato de glicerilo	57
Figura 15. Expresión relativa las isoformas de SERCA en células KATO-III con un inhibidor de HDAC's - Tricostatina A.	58
Figura 16. Expresión relativa las isoformas de SERCA en células KATO-III con un inhibidor de HDAC's - Ácido valproico.	59
Figura 17. Expresión relativa las isoformas de SERCA en células KATO-III con un inhibidor de la transcripción dependiente de elementos ricos en GC - Mitramicina A.	60
Figura 18. Expresión relativa las isoformas de SERCA en células KATO-III con un agente hipometilante - 5-azacitidina.	61

Figura 19. Expresión relativa las isoformas de SERCA en células KATO-III con un inhibidor de proteínas fosfatasas - Ácido okadaico	62
Figura 20. Efecto del tratamiento combinado de butirato de sodio con diferentes agentes en la expresión relativa de SERCA3 en KATO-III.	63
Figura 21. Efecto del tratamiento combinado de butirato de sodio con diferentes agentes en la expresión relativa de SERCA2b en KATO-III.	64
Figura 22. Expresión relativa de SERCA3 durante la diferenciación inducida por confluencia de Caco-2	65
Figura 23. Expresión relativa de SERCA3 en la línea celular de colon normal humano 112-CoN en cultivos post-confluentes	66
Figura 24. Expresión relativa de las isoformas de SERCA2 (a, b y c) durante la diferenciación inducida por confluencia de Caco-2	67
Figura 25. Expresión relativa de las isoformas de SERCA2 (a, b y c) en la línea celular de colon normal humano 112-CoN en cultivos post-confluentes	68

TABLAS

Tabla 1. Afinidad por calcio y cinética de las diferentes isoformas de SERCA	16
Tabla 2. Secuencia de los primers utilizados para el qRT-PCR.	46
Tabla 3. Resultados de amplificación de las diferentes isoformas de SERCA en muestras de tejido y líneas celulares.	70
Tabla 4. Resultados de amplificación de las diferentes isoformas de SERCA en KATO-III y Caco-2 después de la diferenciación.	72

RESUMEN

El ión calcio es un segundo mensajero ubicuo que controla procesos fundamentales para la función y desarrollo de todas las células eucariontes. Entre los diferentes compartimentos celulares existe un gradiente en su concentración que regula el crecimiento, diferenciación y muerte de las células; por lo tanto, la homeostasis de este catión es fundamental en el desarrollo de procesos neoplásicos. El reservorio más importante de calcio dentro de una célula es el retículo endoplásmico que mediante transporte activo por parte de la ATPasa de Calcio del Retículo Sarco(Endo)Plásmico (SERCA) mantiene concentraciones bajas de este catión en el citosol. Las bombas SERCA1-3 en humanos son codificadas por tres genes denominados *ATP2A1-3*, los cuales a su vez producen 11 isoformas de la proteína, cuya expresión depende del tejido y de su estado de desarrollo.

Recientemente, varios reportes demostraron alteración en la expresión de SERCA2 y SERCA3 en diferentes neoplasias; particularmente en cáncer de colon y gástrico se ha identificado disminución o ausencia de la expresión de SERCA3 asociado a la pérdida de la diferenciación de las células tumorales. Está descrita la inducción en la expresión de la proteína SERCA3 en células tumorales a través de su diferenciación, sin embargo, a la fecha no existen reportes que investiguen si este aumento ocurre también a nivel de la transcripción del gen *ATP2A3*.

En este trabajo de tesis se comparó la expresión del ARNm de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas neoplásicas y tejido normal, comprobando la disminución en la expresión del ARNm de *ATP2A3*. En este proyecto se usaron dos líneas celulares de cáncer humano: cáncer gástrico (KATO-III) y adenocarcinoma de colon (Caco-2). Ambas líneas se utilizaron como modelos de diferenciación celular: Caco-2, inducido por confluencia celular, mientras que KATO-III a través de butirato de sodio. Con ambas se obtuvo un incremento muy marcado (>40 veces) y específico en la expresión del ARNm de *ATP2A3* (SERCA3) con respecto al ARNm de la isoforma de expresión ubicua SERCA2b, que se mantuvo sin cambios o parcialmente disminuida.

Además, se observó inducción del ARNm de *ATP2A3* en cultivos de KATO-III tratadas con diferentes agentes farmacológicos como: tricostatina A y ácido valproico (inhibidores de desacetilasas histonas - iHDAC's), 5-azacitidina (agente hipometilante del ADN); y mitramicina A (inhibidor de la unión de factores de transcripción que se unen secuencias ricas en G+C).

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la ausencia de la proteína SERCA3 en células de cáncer gástrico y de colon esta reprimida desde la transcripción del gen *ATP2A3*. Además, el incremento marcado en la expresión de ARNm de SERCA3 visto con los diferentes tratamientos utilizados, sugieren fuertemente que la expresión del gen *ATP2A3* está regulada tanto por mecanismos transcripcionales como epigenéticos. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para identificar a los elementos reguladores responsables de la activación transcripcional del gen *ATP2A3* y de los cambios en la estructura de la cromatina en la región promotora del gen en células cancerosas.

ABSTRACT

The calcium ion is a ubiquitous second messenger that controls fundamental processes for the function and development of all eukaryotic cells. There is a concentration gradient between the different cellular compartments that regulate growth, differentiation and cell death; therefore homeostasis of this cation is essential for the development of cancer tumors. The most important reservoir of calcium within the cell is the endoplasmic reticulum that actively transports the Ca^{2+} by the Sarco(Endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump in order to keep low cytosolic calcium concentrations. SERCA human pumps are encoded by three different genes called *ATP2A1-3*, which in turn produce 11 protein isoforms, whose expression occurs in a tissue and development stage specific manner.

Recently, several publications had shown alterations in SERCA2 and SERCA3 protein expression in different neoplasias, particularly in colon and gastric cancer, where it has been demonstrated low or absent expression of SERCA3 protein and that is related to loss of cell differentiation. It had been also shown that it is possible to promote SERCA3 protein expression by inducing cell differentiation, although to date there are no reports showing that regulation of *ATP2A3* expression occurs at the transcriptional level.

In this thesis work we compared *ATP2A2* y *ATP2A3* mRNA expression in neoplastic cells against normal tissue, confirming a decrease on *ATP2A3* mRNA expression. In this project we used two human cancer cell lines: colon adenocarcinoma Caco-2 cells, induced to differentiate by cell confluence, and gastric cancer KATO-III cells induced to differentiate with sodium butyrate. Both cell lines were used as models of neoplastic human cell differentiation. In both models we observed a specific and pronounced increase in SERCA3 mRNA expression (>40-fold) compared to the ubiquitously expressed isoform SERCA2b that did not change or slightly decrease its expression.

In addition, we found induction of *ATP2A3* mRNA expression in the KATO-III cell line treated with different pharmacological agents: trichostatin A and valproic acid (histone deacetylases - HDACs inhibitors), with 5-azacytidine (DNA hypomethylating agent), and mithramycin A (inhibitor of transcription factor binding to G+C regions).

In conclusion, the results obtained in this thesis demonstrate that the expression of the *ATP2A3* gene is repressed in colon and gastric cancer cells at transcriptional level. In addition the marked increase of SERCA3 mRNA expression observed with the different used treatments strongly suggest that expression of the *ATP2A3* gene is regulated by both transcriptional and epigenetic mechanisms. Additional studies are required to demonstrate de regulatory elements responsible for transcriptional activation of the *ATP2A3* gene as well as changes in chromatin structure in the promoter region of the gene in cancer cells.

1. INTRODUCCIÓN

A la fecha existen varios reportes de mutaciones y alteraciones en la expresión de las diferentes isoformas de las bombas de calcio del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) en diferentes tipos de tumores cancerosos humanos y animales. Se han identificado mutaciones en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* así como disminución en la expresión de las proteínas SERCA2 y SERCA3 que producen de manera respectiva, en distintos tipos de neoplasias como cáncer de colon, oral, del SNC, de tiroides y próstata, entre otros (Liu, Boivin et al. 2001; Pacifico, Ulianich et al. 2003; Korosec, Glavac et al. 2006). Las bombas SERCA participan en la homeostasis del Ca^{2+} que normalmente regula proliferación, diferenciación y muerte de las células, por ello estas alteraciones se postula que juegan un papel clave dentro del proceso neoplásico.

La evidencia directa entre la deficiencia de la expresión y/o función de las bombas SERCA y la formación de tumores, ha sido provista por un estudio en ratones heterocigotos para el gen *Atp2a2*^{+/-}. Los ratones *Atp2a2*^{+/-} presentaron una alta incidencia de carcinomas de células escamosas como resultado directo de la haploinsuficiencia del gen que codifica para las isoformas SERCA2a y SERCA2b (Liu, Boivin et al. 2001). Sin embargo, la haploinsuficiencia del gen *ATP2A2*^{+/-} en el humano no se ha relacionado con la aparición de tumores cancerosos, sino con una enfermedad autosómica dominante conocida como enfermedad de Darier, que se caracteriza por queratinización anormal de la piel y pérdida de la adhesión celular (Sakuntabhai, Ruiz-Perez et al. 1999). De forma interesante, la inhibición de las bombas SERCA con tapsigargina, que es un inhibidor irreversible y específico, sirve también como un agente promotor de tumores en la piel del ratón de diferentes estadios (Hakii, Fujiki et al. 1986).

Por otro lado, la expresión de las isoformas de SERCA3, que normalmente es muy abundante en mucosa gástrica y de intestino, se ha visto que disminuye drásticamente o se pierde completamente en carcinomas de colon y mucosa gástrica. Sin embargo, es posible inducir su expresión a nivel de proteína mediante tratamiento con butirato de sodio que es un ácido graso de cadena corta, producto natural de la degradación de las fibras de la dieta por las bacterias del intestino, ampliamente utilizado *in vitro* como inductor de la diferenciación (Gelebart, Kovacs et al. 2002). La disminución en la expresión de SERCA se ha relacionado con pérdida de la diferenciación celular, como resultado de alteraciones en múltiples vías de señalización, así como

por mecanismos epigenéticos como silenciamiento por hipermetilación de su región promotora, como se ha visto con el gen *ATP2A2* en cáncer oral (Endo, Uzawa et al. 2004; Brouland, Gelebart et al. 2005).

Actualmente se desconocen los mecanismos por los cuales se induce la expresión de las isoformas *SERCA3* tras un proceso de diferenciación, y si ocurre a nivel de la transcripción del gen *ATP2A3*. Dada su importancia en la homeostasis del calcio, esta inducción puede ser clave en el proceso de diferenciación celular, por lo que entender el proceso puede resultar útil como estrategia para el tratamiento o prevención del cáncer gástrico y de colon.

1. ANTECEDENTES

2.1 IÓN CALCIO

El ión calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero ubicuo cuya señalización se requiere para la función normal de todas las células eucariontes. El Ca^{2+} controla muchas de las funciones celulares como son la contracción muscular, la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y el estrés oxidativo; así como la síntesis, procesamiento y plegamiento de proteínas, por lo que se propone que el manejo fino de la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) es muy importante para que se lleven a cabo estas funciones de forma normal, y que las alteraciones en la $[\text{Ca}^{2+}]$ normal entre los diferentes compartimientos celulares facilita procesos tumorales. La $[\text{Ca}^{2+}]$ se modula en forma temporal y espacial a través de canales, bombas e intercambiadores de Ca^{2+} . Isoformas individuales de estas proteínas pueden variar en su localización celular así como su nivel de expresión entre los diferentes tejidos (ver Figura 1). En células en reposo, la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en el espacio extracelular es de 1-2 mM, mientras que en el citosol la $[\text{Ca}^{2+}]$ se mantiene en aproximadamente 10-100 nM, aunque a través de la movilización del Ca^{2+} de los reservorios celulares como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas, o por la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática desde el medio extracelular la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citosol se puede incrementar hasta 1 μM . Por otro lado, la $[\text{Ca}^{2+}]$ se estima entre 100 y 500 μM dentro del retículo endoplásmico (RE) que es el principal reservorio de este catión al interior de la célula (Monteith, McAndrew et al. 2007; Roderick and Cook 2008).

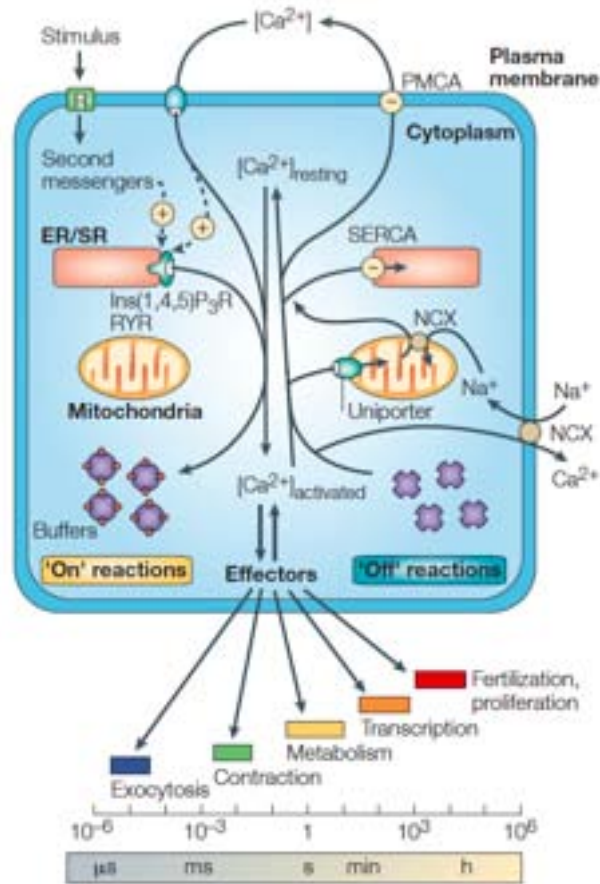


Figura 1. Papel del ión Ca^{2+} como segundo mensajero intracelular.
(Tomado de Berridge, Bootman *et al.* 2003)

2.2 EXPRESIÓN DE LAS BOMBAS DE CALCIO DEL RETÍCULO SARCO(ENDO) PLÁSMICO (SERCA)

Las bombas de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) son proteínas integrales de membrana que transportan Ca^{2+} activamente hacia el lumen del retículo sarcoplásmico (RS) de células musculares y del retículo endoplásmico (RE) de todos los tipos celulares, mediante la hidrólisis de ATP. Estas bombas muestran un alto grado de conservación entre especies, en humanos las bombas SERCA son codificadas por tres genes: *ATP2A1*, 2 y 3, cada uno de los cuales codifica diferentes isoformas de la proteína SERCA1, 2 y 3 respectivamente. El gen *ATP2A1* codifica dos isoformas de SERCA1 que se expresan exclusivamente en músculo esquelético de contracción rápida y su expresión está regulada durante el desarrollo, la isoforma

SERCA1b se expresa en neonatos y SERCA1a en adultos (Brandl, Green et al. 1986). El gen *ATP2A2* codifica para tres isoformas de la proteína SERCA2: la SERCA2a que se expresa muy abundantemente en corazón y músculo esquelético de contracción lenta; la SERCA2b que se expresa en músculo liso y de forma ubicua en tejidos no musculares; y la SERCA2c que se expresa en células endoteliales y de linaje hematopoyético (Verboomen, Wuytack et al. 1992; Wuytack, Raeymaekers et al. 1992). El gen *ATP2A3* codifica para la proteína SERCA3 que por mecanismos de “splicing” alternativo produce 6 isoformas (a-f) las cuales se expresan en células epiteliales y hematopoyéticas (Dode, De Greef et al. 1998; Bobe, Bredoux et al. 2004).

Las bombas SERCA son mediadores esenciales de la vía de señalización por Ca^{2+} tanto en células excitables y no excitables. El Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en la contracción muscular, con la conversión de una señal eléctrica a través de la membrana de la fibra muscular a una señal mecánica para que la contracción tenga lugar. En el proceso del acoplamiento excitación-contracción, las bombas de calcio SERCA restauran la concentración de Ca^{2+} en el citosol al bombear éste catión al interior del RS. Las variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ al interior de la célula generan señales intracelulares que conducen a respuestas celulares específicas, como plegamiento y procesamiento de proteínas, así como con programas de proliferación, diferenciación y apoptosis; por lo que la expresión de diferentes isoformas de SERCA tiene repercusión en la $[\text{Ca}^{2+}]$ basal y por ende en los procesos ya mencionados (Berridge, Bootman et al. 2003). Las SERCAs se encargan de reconstituir la dinámica del almacén de Ca^{2+} en el RE a través de las diferentes afinidades por calcio y velocidades de transporte, de cada una de las isoformas de la familia. La inhibición directa de la actividad de la bomba SERCA a través de tapsigargina ha mostrado que produce diferentes fenotipos, conforme al tipo celular en el que se inhiba su actividad, por ejemplo, se ha visto que induce la proliferación celular independiente de factor de crecimiento (Apati, Janossy et al. 2003); promueve un incremento en la producción de partículas virales de VIH (Papp and Byrn 1995); lleva a estrés del retículo endoplásmico y por lo tanto a muerte celular (Caspersen, Pedersen et al. 2000); induce el arresto del crecimiento celular (Waldron, Short et al. 1994), apoptosis (Rao, Hermel et al. 2001) o diferenciación celular (Schaefer, Magocsi et al. 1994).

2.3 ATPasas de tipo P

Las bombas de calcio SERCA son miembros de la familia de ATPasas tipo P, cuyo nombre hace referencia a su ciclo catalítico de reacción en el cual un residuo de aspartato (Asp) es fosforilado a través de la transferencia de un grupo fosfato proveniente del ATP, con lo cual cambia de una configuración inactiva (de baja afinidad por calcio) a una activa (de alta afinidad por calcio), con lo cual lleva a cabo el transporte de dos cationes a través de la membrana. El motivo que caracteriza a la familia de ATPasas tipo P es la secuencia D-K-T-G-T[LIVM]-[TIS], la cual inicia con el residuo de aspartato (D) que es fosforilado (D351 en el caso de SERCA1) (Pedersen 2007).

La familia de ATPasas tipo P se divide en cuatro clases (I al IV). Las bombas SERCA pertenecen a la clase II que incluyen a todas las enzimas que transportan iones para el metabolismo celular basal: Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y H^+ (Moller, Juul et al. 1996; Palmgren and Axelsen 1998). Las ATPasas del tipo I incluyen a aquellas que transportan metales pesados y a las ATPasas de bacterias que poseen otras subunidades adicionales. Las del tipo III incluyen a las bombas de protones de hongos y a las ATPasas dependientes de Mg^{2+} de las bacterias. Las del tipo IV incluyen proteínas más lejanamente relacionadas, la mayoría de las cuales sin una función asignada, los miembros de esta clase están implicados en el transporte de sustancias hidrofóbicas, como son aminofosfolípidos y donde se ha visto que la mutación en uno de sus miembros bloquea la circulación de sales biliares enterohepáticas (Bull, van Eijk et al. 1998).

Las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) son las que guardan mayor homología con las SERCAs. La ATPasa de Ca^{2+} del aparato de Golgi de las levaduras y la ATPasa de Na^+/K^+ tienen un 33% de identidad de secuencia con SERCA sugiriendo que pueden ser ortólogos. El grupo de Sweadner y colaboradores ha identificado mediante un análisis *in silico* un mayor alineamiento entre SERCA1a y la ATPasa de Na^+/K^+ en comparación con la PMCA y otros miembros de la familia de ATPasas tipo P, estimando que el plegamiento de la ATPasa de Na^+/K^+ y SERCA es muy similar, que concuerda con el 30% de identidad y 65% de similaridad en secuencia que conserva con respecto a SERCA1a (Korczak, Zarain-Herzberg et al. 1988)(Sweadner and Donnet 2001).

2.4 ESTRUCTURA DE LA ATPasa-Ca²⁺ DEL RETÍCULO SARCO(ENDO)PLÁSMICO (SERCA)

La combinación de la información bioquímica y estructural permitió llegar a la predicción de la estructura terciaria de la bomba SERCA1. La estructura se dividió en tres dominios principales denominados: dominio citoplasmático, transmembrana y el tallo. Más de la mitad de la masa total de la molécula de ATPasa se encuentra expuesta hacia el citoplasma, por lo que este dominio se compone de subdominios: la región amino terminal, el dominio de fosforilación, el dominio de unión a nucleótidos, el dominio bisagra y la región carboxilo terminal. El dominio de fosforilación y el de unión a nucleótidos forman el sitio activo para la hidrólisis de ATP (MacLennan, Brandl et al. 1985; MacLennan, Rice et al. 1997). La región del tallo conecta al dominio citoplasmático con la membrana. El dominio transmembrana se predijo que posee 10 hélices transmembranales (M1-M10) que anclan a la ATPasa de Ca²⁺ a la bicapa lipídica a través de los cuales se forma un canal transmembranal para el transporte de dos iones Ca²⁺ (Toyoshima, Nakasako et al. 2000).

La estructura tridimensional de SERCA1a fue determinada por cristalografía de rayos X a una resolución de 2.6 Å identificando los 994 aminoácidos que la componen. El dominio citoplasmático se dividió en tres dominios denominados: P, de fosforilación; N, de unión a nucleótidos y A, dominio actuador (ver Figura 2). El dominio P contiene al residuo Asp351, que es el sitio de autofosforilación por ATP. El dominio N se encuentra ubicado entre dos segmentos del dominio P, dentro del cual los residuos Phe487, Lys515, Lys492, Arg560 y Thr441 se han identificado como componentes importantes para la unión del ATP, este dominio se encuentra cargado positivamente a diferencia del dominio P que se encuentra cargado negativamente. El dominio A es un pequeño segmento aislado de 110 residuos (131-238) localizados entre las hélices transmembrana M2 y M3, que interactúa con un segmento de 40 aa del extremo amino en forma de dos hélices, es un dominio altamente móvil, lo cual le permite adquirir distintas posiciones para regular la unión y liberación del Ca²⁺, la cual está regulada por la concentración del mismo. La estructura de alta resolución confirma la existencia de 10 hélices α transmembranales (M1- M10). La hélice M5 se extiende a través de la superficie del lumen hacia el centro del dominio P y junto con la hélice M4 forma la conexión con la horquilla mayor del citoplasma que contiene a los

dominios P y N. Las hélices M2 y M3 también se extienden más allá de la membrana y sirven como sitios de anclaje para las horquillas más pequeñas del citoplasma que conforman al dominio A (Toyoshima and Nomura 2002).

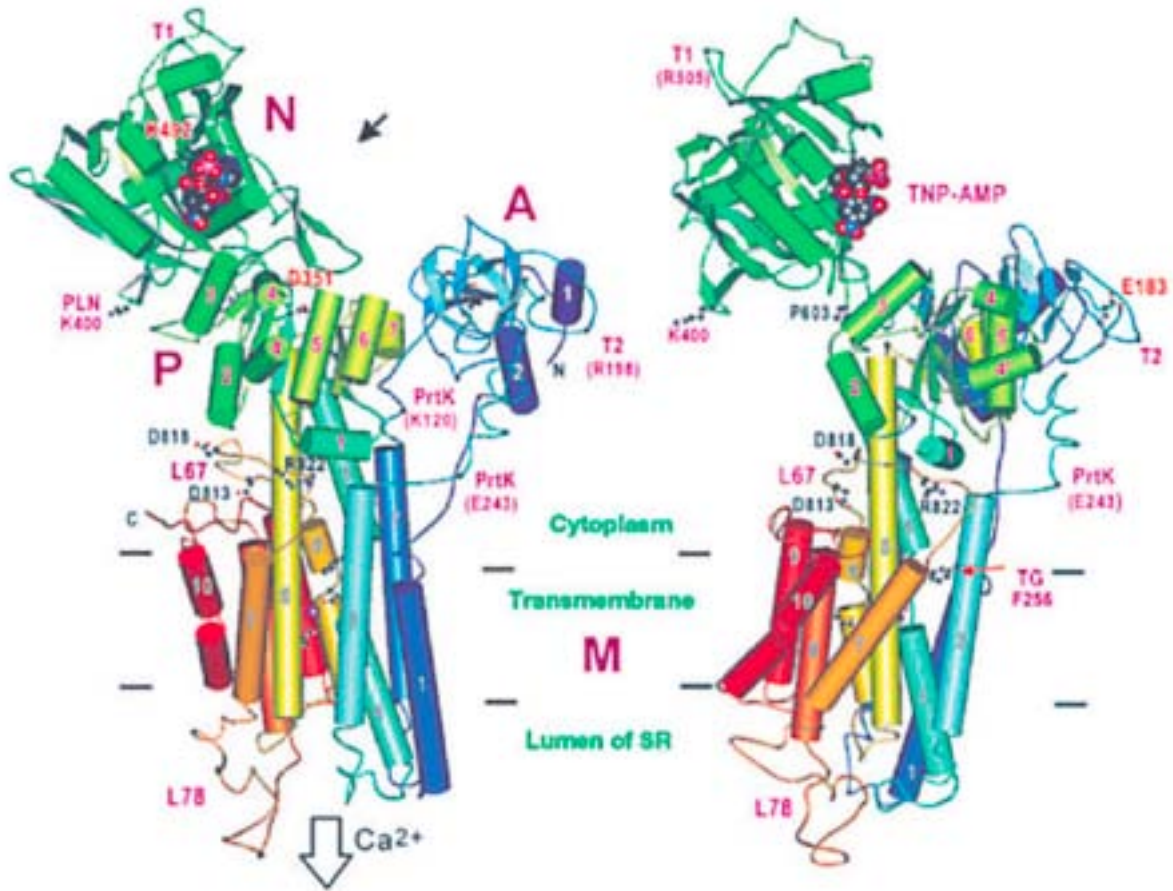


Figura 2. Arquitectura de la bomba SERCA1 basada en la cristalización inducida por Ca²⁺.

Las hélices α se encuentran representadas por cilindros, mientras que las hojas β con flechas. Los tres dominios citoplasmáticos están marcados como: N- de nucleótidos, P- de fosforilación, A- actuador. Las hélices transmembranales (M1-M10) así como los dominios P y A, se encuentran numerados. D351 es el residuo que se fosforila. Dos esferas representan los sitios transmembrana de unión para el transporte de Ca²⁺. Los sitios de unión para fosfolamban (PLN) y tapsigargina (TG) están señalados como principales sitios de digestión por tripsina (T1 y T2) y proteinasa K (PrTK). Tomado de (Martonosi and Pikula 2003).

Las hélices M4, M5, M6 y M8 fueron identificadas como los sitios de unión de los iones Ca²⁺, ambos sitios (I y II) se encuentran estabilizados por puentes de hidrógeno que junto con el residuo Asp800 unen cooperativamente al ión Ca²⁺. El transporte de protones se requiere para la

estabilidad de la ATPasa en la ausencia de los iones Ca^{2+} (Toyoshima and Inesi 2004). Los sitios se abren como resultado de cambios conformacionales durante su transporte, la unión de los iones es secuencial y cooperativa (Inesi, Kurzmack et al. 1980). El sitio I está localizado en el centro del dominio transmembranal entre las hélices M5, M6 y M8, formado por los residuos Asn768, Glu771 (M5); Thr799, Asp800 (M6); Glu908 (M8) y dos moléculas de agua. El sitio II es cercano a la hélice M4 aproximadamente 3 Å del sitio I y está formado por la contribución de M4-M6 sin la presencia de moléculas de agua.

En las preparaciones utilizadas para cristalizar a la proteína tanto de retículo sarcoplásmico nativo y en preparaciones reconstituidas en liposomas, se observó que SERCA tiene una tendencia alta para formar oligómeros, sin embargo, el significado funcional de estas asociaciones aún no se ha establecido (Jilka, Martonosi et al. 1975; Vanderkooi, Ierokomas et al. 1977; Papp, Pikula et al. 1987).

La inhibición de la actividad de SERCA y con ello el transporte de Ca^{2+} por fosfolamban, un inhibidor reversible de la bomba, se atribuye a la inhibición del movimiento del dominio que acompaña el transporte de Ca^{2+} . El sitio de unión de la tapsigargina, un inhibidor irreversible y específico de las bombas SERCA, se localizó en Phe256 cerca de la interfase membrana-citoplasma de M3, M5 y M7. Su unión previene el movimiento de la hélice M3 y mantiene a la bomba en su conformación de baja afinidad por calcio ya que disminuye la movilidad de las hélices transmembrana (Wootton and Michelangeli 2006).

Las estructuras secundarias de las isoformas SERCA2 y SERCA3 están basadas en la cristalización y estudios funcionales de SERCA1, sin embargo la secuencia de aminoácidos de SERCA2b predice la presencia de un dominio transmembranal extra (M11), lo cual ha sido demostrado por Bayle y colaboradores. En todas las isoformas de SERCA el extremo amino y carboxilo se encuentran expuestos hacia el citoplasma de la célula, con excepción de la isoforma SERCA2b que gracias al paso transmembranal extra coloca su extremo carboxilo hacia el lumen del retículo endoplásmico (Bayle, Weeks et al. 1995) (ver Figura 3).

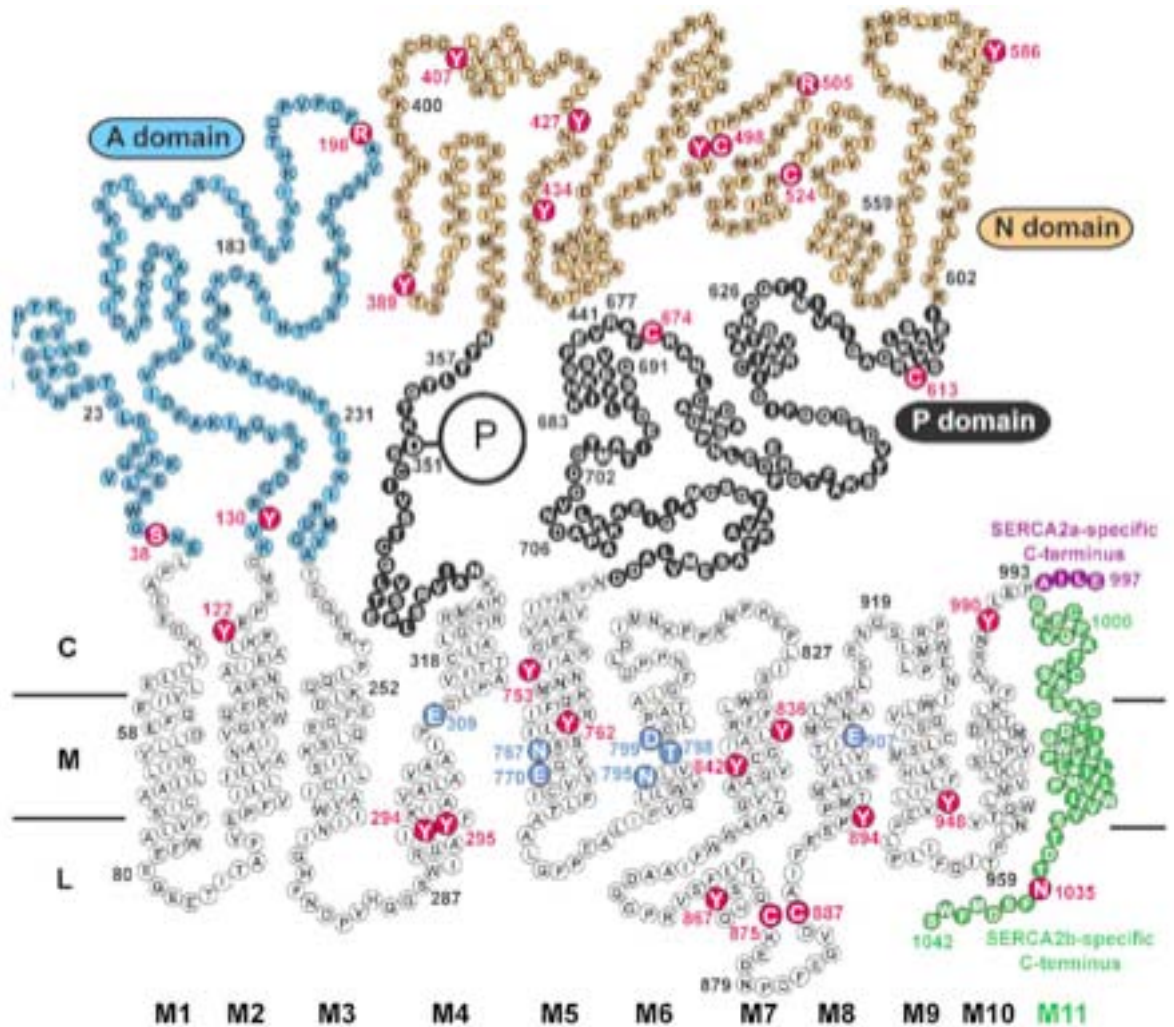


Figura 3. Modelo de la estructura primaria y secundaria de SERCA2. Modelo basado en la estructura cristalizada de SERCA1a, donde se muestra el paso transmembranal extra en la isoforma SERCA2b. SERCA2a, b y c; son idénticas hasta el aa 993 pero difieren en su extremo carboxilo: la secuencia específica en 2a AILE es remplazada en SERCA2b por un segmento de 49 aa que forma un segmento transmembranal adicional M11. Cada círculo corresponde a un aminoácido conforme el código de una letra, M1-M11 denotan las hélices transmembrana. Los aa que forman los sitios de unión para los iones Ca^{2+} se muestran como círculos azules con letras blancas en M4, M5, M6 y M8. Los círculos rojos con letras blancas denotan residuos que se han encontrado mutados en pacientes con Darier. C-citosol, M-membrana y L-lumen del RE o RS. Tomado de (Vangheluwe, Raeymaekers et al. 2005).

La proteína SERCA no posee una señal clásica para ser retenida en la membrana del RE como Lys-Asp-Glu-Leu/His-Asp-Glu-Leu/Lys-Lys-XX o Lys-X-Lys-X-Lys-X como en otras proteínas para que se dirijan al RE, sin embargo, si se reemplaza el extremo amino de la PMCA por el de SERCA, la PMCA se redirige al RE en vez de a la membrana plasmática (Foletti, Guerini et al. 1995).

2.5 MECANISMO DE TRANSPORTE DE CALCIO DE LAS BOMBAS SERCA

Las bombas SERCA transportan 2 iones Ca^{2+} en contra de un gradiente de concentración por medio del intercambio de 2 o 3 protones por molécula de ATP hidrolizada. La energía necesaria para realizar su función es de aproximadamente 12 kcal por lo que se le reconoce un papel importante en el mantenimiento del calor corporal (de Meis, Arruda et al. 2003).

Para el transporte de Ca^{2+} desde el citosol al lumen del RE o RS, las bombas SERCA pasan por un complejo ciclo que involucra cambios conformacionales de la proteína. Hasta la unión de dos iones Ca^{2+} , transfosforilación de ATP conduce al cambio conformacional de la proteína desde una proteína con alta afinidad por Ca^{2+} a un intermediario de baja afinidad. El mecanismo de reacción comúnmente se interpreta de acuerdo a un esquema E1/E2 (ver Figura 4). El modelo clásico postula que, en el estado E1 los sitios de unión a Ca^{2+} tienen muy alta afinidad por el catión y se encuentran accesibles en el citoplasma, sin embargo, en el estado E2 los sitios tienen muy baja afinidad y expuestos hacia el lumen del RE, resultando en la liberación de los dos iones Ca^{2+} (de Meis and Vianna 1979).

En el ciclo de reacción, después de la fosforilación, el dominio P (de fosforilación), el dominio A (actuador) y gran parte del dominio N (de unión a nucleótidos) se alinean. La enzima utiliza al ATP para formar un puente entre el dominio P y N. El ciclo de reacción de SERCA está regulado esencialmente por Ca^{2+} , ya que el ATP puede unirse a la enzima incluso en ausencia del ión, sin embargo en ausencia de Ca^{2+} el ciclo de reacción no puede continuar (MacLennan, Rice et al. 1997).

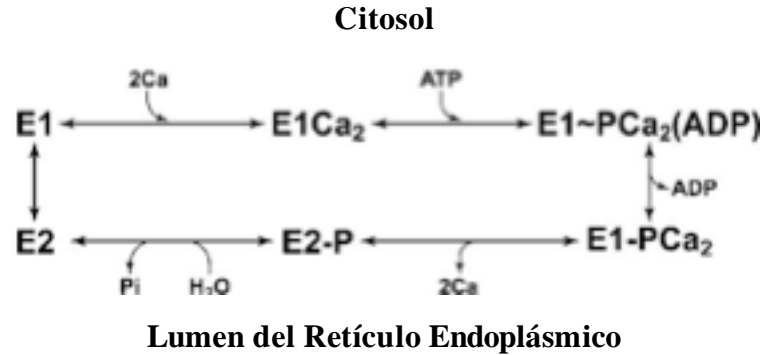


Figura 4. Esquema E1/E2: ciclo de reacción de la ATPasa de Ca²⁺. El transporte activo de Ca²⁺ a través de la membrana del RE o RS involucra cambios conformacionales de la enzima. La enzima pasa por dos estados de transición con diferente afinidad por el catión. En el estado E1 los sitios de unión a Ca²⁺ tienen muy alta afinidad por el catión y se encuentran expuestos hacia el citosol, la unión promueve un cambio de la proteína hacia el estado E2 que expone los sitios hacia el lumen del RE o RS donde tienen poca afinidad por el Ca²⁺ y lo liberan. E1 y E2: estados de transición de la bomba SERCA; E-P, intermediario de la enzima fosforilado.

2.6 GENES QUE CODIFICAN PARA LAS BOMBAS SERCA (ATP2A1-3)

Las bombas SERCA en humanos son codificadas por tres genes *ATP2A1-3*, cada uno produce diferentes isoformas de la proteína mediante splicing alternativo, cada una de las cuales tiene expresión tejido y momento del desarrollo específico. Entre los tres genes *AT2A1-3* dan lugar a 11 isoformas de SERCA, todas funcionales y con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa. El mecanismo de splicing alternativo ocurre en la región 3' de cada transcrito, por lo que todas las isoformas difieren entre sí en su extremo carboxilo. Resulta interesante notar que aunque son tres genes diferentes, cada uno produce péptidos idénticos hasta el aminoácido 993. Ver Figura 5.

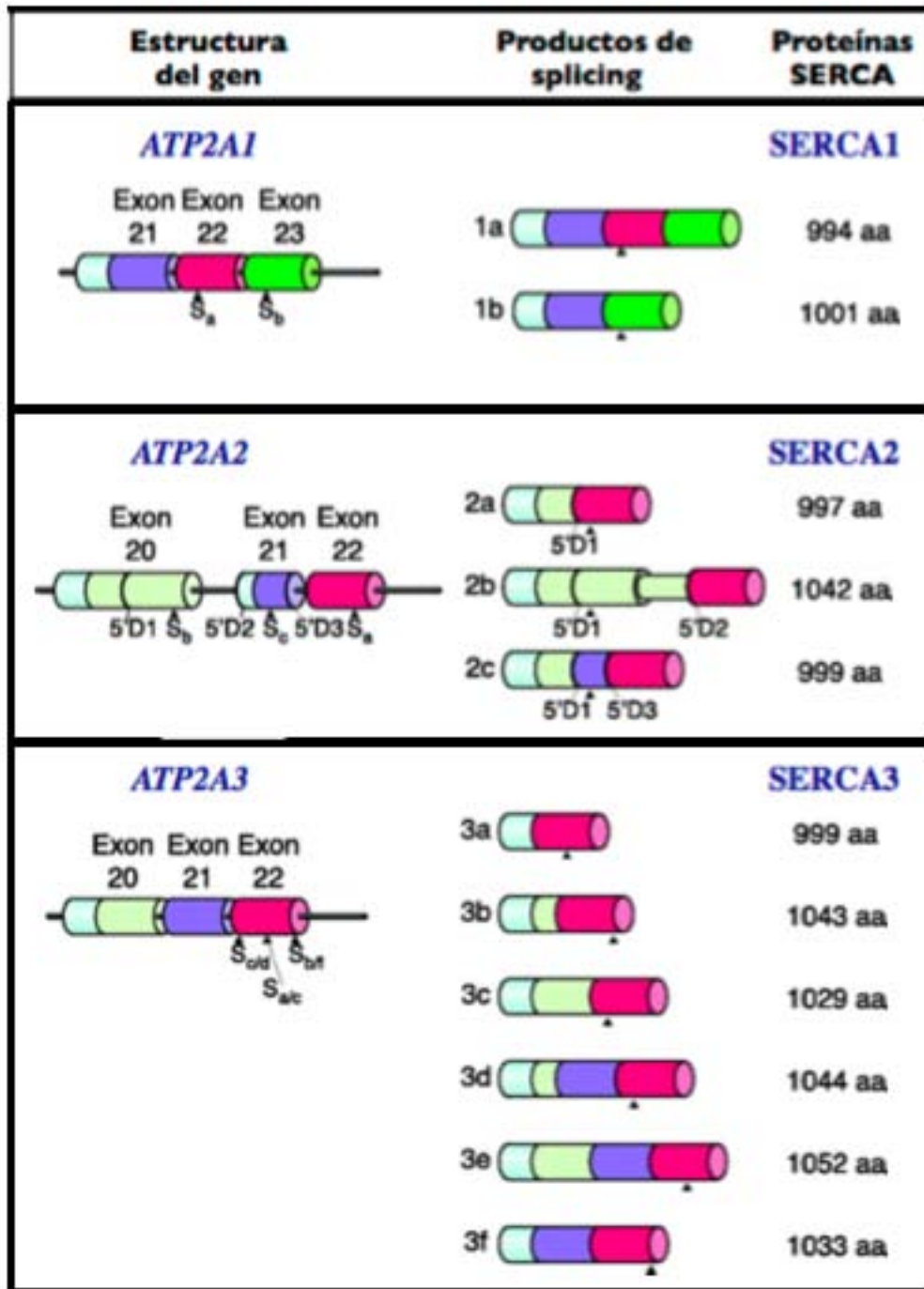


Figura 5. Representación esquemática del splicing alternativo de los genes humanos *ATP2A1-3*. Los exones están representados por cilindros de colores y los intrones como una línea negra. El cilindro más delgado en el transcrito de SERCA2 representa un pseudoexón que no se traduce a proteína. 5'D1, 5'D2 y 5'D3 indican los sitios donadores para el splicing que da lugar a los transcritos de SERCA2; a, b y c, respectivamente. S_{a-f} indica la posición de los diferentes codones de alto para generar las isoformas correspondientes de las proteínas. El tamaño de los productos proteicos se indica a la derecha. Los cilindros no están a escala. Tomado de (Brini and Carafoli 2009).

2.6.1 GEN *ATP2A1*

El gen humano de *ATP2A1* se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 en la banda 12.1, abarca 12.29 kb, contiene 23 exones y codifica un transcrito de 3.3 kb. El exón 22 puede sufrir splicing alternativo para dar 2 isoformas que se expresan en tejido muscular de contracción rápida: SERCA1a en el adulto y SERCA1b en neonatos. SERCA1a en el humano tiene 994 aminoácidos (aa) (se muestra la secuencia del extremo carboxilo que difiere entre las isoformas: ...**NYLEG**) mientras que SERCA1b 1001 aa (...**NYLEDPEDERRK**) (Schleef, Simon-Chazottes et al. 1996).

2.6.2 GEN *ATP2A2*

El gen humano de *ATP2A2* se encuentra en 12q23-24, abarca 65.69 kb y se encuentra organizado en 22 exones. El transcrito de 4.4 kb genera por splicing alternativo 3 isoformas de la proteína: SERCA2a, b y c. Las tres isoformas de SERCA2 son idénticas hasta el aminoácido 993, pero por splicing alternativo del exón 20 se generan las isoformas SERCA2a con 997 aa (...**NYLEPAILE**) y SERCA2b con 1042 aa (...**NYLEP/SDMFWS**) (Lytton and MacLennan 1988). La isoforma SERCA2b posee un dominio transmembranal extra de tal forma que el extremo carboxilo se encuentra en el lumen del retículo, lo cual junto con su expresión ubicua, son características únicas de esta isoforma. La isoforma SERCA2c se ha descrito recientemente por la inclusión de una pequeña secuencia codificante dentro del intrón 20, ahora exón 21, generando una proteína de 999 aa (...**NYLEPVLSSSEL**) (Gelebart, Martin et al. 2003). La isoforma SERCA2a se expresa predominantemente en corazón, músculo esquelético de contracción lenta y en el cerebro. La isoforma SERCA2b se expresa de forma abundante en músculo liso y en todos los tejidos no musculares. La expresión de SERCA2c se ha identificado en tejido epitelial, mesenquimal así como en células hematopoyéticas.

2.6.3 GEN *ATP2A3*

El gen *ATP2A3* es el miembro de la familia que fue descrito más recientemente y sin embargo, el que genera mayor número de isoformas (Martin, Bredoux et al. 2002; Bobe, Bredoux et al. 2004). El gen humano abarca 40.59 kb del cromosoma 17q13.3 y contiene 22 exones que codifican un transcrito de 4.7 kb, el cual produce 6 isoformas distintas (a-f) por procesamiento alternativo de los últimos 3 exones (20, 21 y 22). SERCA3a posee 999 aa (...**NHMHE**EMSQK), SERCA3b 1043 aa (...**NHMH**/PVCTSD) y SERCA3c 1024 aa (...**NHMH**/LASLKK). Tienen diferentes extremos carboxilos y se producen como resultado de la exclusión de los exones 20 y 21 en la isoforma SERCA3a; por exclusión parcial del exón 20 y total del 21 para la isoforma SERCA3b; por exclusión total del 21 en la isoforma SERCA3c. SERCA3d con 1044 aa (...**NHMH**/EEAGKK) y SERCA3e con 1052 aa (...**NHMH**/EEMSQK) conservan parte o completamente el exón 20, respectivamente, seguidos de los exones 21 y 22. Por último la isoforma SERCA3f que posee 1033 aa (...**NHMH**/EMSQK) se genera por exclusión total del exón 20 pero conserva el 21 y 22. A nivel de expresión de proteína, las isoformas a, b y c, se expresan muy abundantemente en células hematopoyéticas, nódulos linfáticos, timo, bazo, glándulas salivares, traquea, colon y páncreas. SERCA3 aparece siempre co-expresada con la isoforma de expresión ubicua, SERCA2b; sin embargo, SERCA2b puede encontrarse en ausencia de SERCA3 (Dode, De Greef et al. 1998; Kovacs, Felfoldi et al. 2001; Bobe, Bredoux et al. 2004; Chaabane, Corvazier et al. 2006).

2.7 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS ISOFORMAS DE LA BOMBA SERCA

Las isoformas de SERCA1-3 muestran un alto grado de conservación en su estructura primaria, SERCA2a posee 84% de identidad con SERCA1a; mientras SERCA3 muestra un 75% de identidad a SERCA1 y SERCA2 (ver Figura 6). La estructura primaria inicialmente altamente conservada en todas las isoformas de SERCA, predice que tienen una topología transmembrana y conformación proteica muy similar, sin embargo, diferencias en su extremo carboxilo producto del splicing alternativo que dan lugar a las diferentes isoformas les aportan propiedades funcionales características.

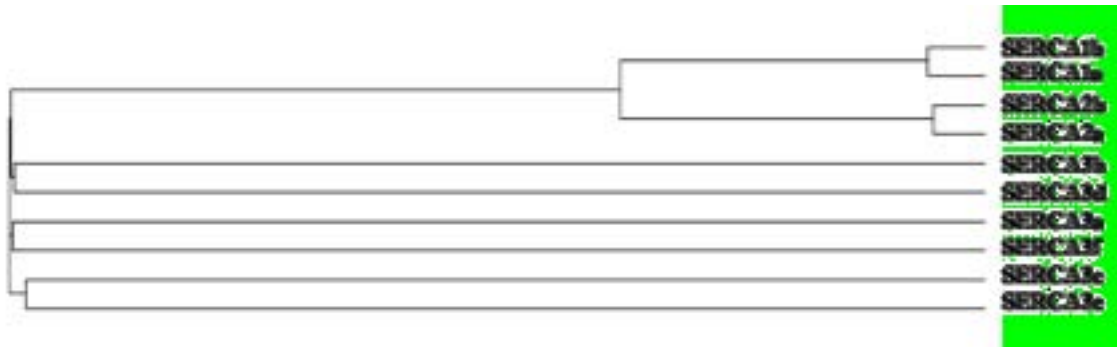


Figura 6. Alineamiento de la secuencia completa de aminoácidos de las diferentes isoformas de SERCA con Clustal W. Se muestra que existe un alto grado de conservación entre las diferentes isoformas, que como se esperaba es mayor entre las que produce cada gen. SERCA1 y SERCA2 se encuentran más conservadas en tanto que los miembros de SERCA3 son los más distantes en esta gran familia.

Las propiedades enzimáticas de las isoformas de SERCA han sido estudiadas en sistemas celulares heterogéneos mediante sobre-expresión de la proteína en cultivos de células COS o HEK-293, los estudios iniciales *in vitro* aislando microsomas reportan que SERCA1 y SERCA2a muestran afinidad y velocidad de transporte de Ca^{2+} similares (Sumbilla, Cavagna et al. 1999).

Entre las tres isoformas de SERCA2 (a, b y c) existen diferencias funcionales: SERCA2b tiene afinidad aparente por Ca^{2+} dos veces mayor que SERCA2a, pero 2 veces menor índice de recambio catalítico, lo cual se traduce en una menor capacidad de transporte de Ca^{2+} (Lytton, Westlin et al. 1992; Verboomen, Wuytack et al. 1994). La velocidad de disociación por Ca^{2+} de la isoforma SERCA2b fue 10 veces menor con respecto a SERCA2a y 1a lo que se explica por su alta afinidad por el catión (Dode, Andersen et al. 2003). Ambas isoformas muestran la misma sensibilidad de inhibición con fosfolamban (un inhibidor endógeno de la bomba) y tapsigargina (inhibidor específico y muy potente de origen natural). Recientemente se ha demostrado que la isoforma SERCA2c tiene una menor afinidad por Ca^{2+} en comparación con 2a y 2b, por lo que se especula que esta isoforma trabaja en un ambiente local con altas concentraciones de Ca^{2+} . Sin embargo, el índice de hidrólisis de ATP de SERCA2c es de 36 s^{-1} , el cual es muy similar al reportado para 2b (35 s^{-1}) pero mucho menor al reportado para 2a (70 s^{-1}) y SERCA1a (130 s^{-1}) (Dally, Bredoux et al. 2006). Ver Tabla 1.

Tabla 1. Afinidad por calcio y cinética de las diferentes isoformas de SERCA.

Isoforma de SERCA	K _{0.5} (μM)	Velocidad de hidrólisis de ATP s ⁻¹	Velocidad de disociación de calcio s ⁻¹
SERCA1a	0.32 ± 0.02 ^a 0.31 ± 0.02 ^b	95 ^a 130 ^c	27 ^{a,b}
SERCA2a	0.21 ± 0.01 ^b	70 ^c	23 ^b
2b	0.13 ± 0.01 ^b	35 ^c	2.5 ^b
2c	** ^c	36 ^c	ND
SERCA3a	1.47 ± 0.17 ^a	132 ^a	85 ^a
3b	1.27 ± 0.10 ^a	149 ^a	73 ^a
3c	1.57 ± 0.14 ^a	134 ^a	73 ^a

^a Estudio entre SERCA1 y SERCA3 (Dode, Vilsen et al. 2002);

^b Estudio entre SERCA1 y SERCA2 (Dode, Andersen et al. 2003); ND.- no detectada;

^c (Dally, Bredoux et al. 2006) **en este estudio reportan K_{0.5} 0.604 μM para la isoforma SERCA2c el cual es muy similar al que reportan para SERCA2b K_{0.5} 0.508 μM

Las isoformas de SERCA3 muestran una afinidad aparente por Ca²⁺ 5 veces menor, lo cual sugiere que SERCA3 es activa cuando la [Ca²⁺] en el citosol alcanza niveles elevados, como ocurre durante la estimulación celular (Dode, Vilsen et al. 2002; Martin, Bredoux et al. 2002). Las isoformas de SERCA3 son 10 veces más sensibles a la inhibición por vanadato comparado con las otras bombas SERCA y no son sensibles a fosfolamban. El grupo de Chandrasekera ha determinado la afinidad de la proteína endógena de SERCA3 en cultivos de linfocitos T Jurkat así como en linfocitos aislados de amígdalas humanas, corroborando su inusual baja afinidad por calcio (Chandrasekera, Kargacin et al. 2009).

2.8 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA BOMBA SERCA

Diferentes grupos de investigación han identificado múltiples proteínas que interactúan y modulan la función de la bomba SERCA, incluso su actividad se ve influenciada por la composición lipídica de la membrana del retículo endoplásmico o sarcoplásmico. Esta membrana se caracteriza por ser una membrana altamente fluida pobre en colesterol, por lo que el incremento en la relación colesterol/fosfolípidos en la membrana del RE o RS conduce a un incremento en el empaquetamiento de lípidos y disminución de la fluidez de la membrana, resultando en la inhibición de la actividad

de la bomba SERCA. Por lo tanto, la sobrecarga de colesterol provoca que se vacíe el reservorio de Ca^{2+} llevando al estrés del RE, que culmina en apoptosis (Li, Ge et al. 2004).

Fosfolamban (PLB). Es un inhibidor endógeno reversible de SERCA de bajo peso molecular (52 aa) que se encuentra en la membrana del RS de células musculares incluyendo el corazón, pero se encuentra ausente en músculo esquelético de contracción rápida. PLB en su forma no fosforilada interactúa *in vitro* con SERCA1a, SERCA2a y SERCA2b, pero no con SERCA3, inhibe a la bomba disminuyendo su afinidad aparente por Ca^{2+} . La fosforilación de fosfolamban por la proteína cinasa activada por AMPc (PKA) o la actividad de la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII), libera a la bomba de la inhibición. Junto con sarcolipina, PLB, representa el principal regulador de SERCA2 (MacLennan and Kranias 2003).

Sarcolipina (SNL). Es un homólogo más pequeño (31 aa) de PLB que se encuentra altamente expresado en músculo esquelético de contracción rápida donde es el principal inhibidor de SERCA1. Sin embargo también se expresa en corazón (Minamisawa, Wang et al. 2003) y en músculo de contracción lenta y se ha demostrado que también inhibe a SERCA2a. Anteriormente se consideraba que la interacción de SNL con SERCA a diferencia de PLB dependía de su nivel de expresión y no de su estado de fosforilación, sin embargo se ha visto que SNL puede fosforilarse en Thr-5 y por lo tanto su regulación es similar a la de PBL (Gramolini, Trivieri et al. 2006). Cuando se co-expresan *in vitro* SNL y PLB con SERCA1a o SERCA2a, tiene lugar una super-inhibición de la bomba, lo cual sugiere que cada uno de estos inhibidores bloquean su actividad por mecanismos independientes.

Calreticulina y Calnexina. Son proteínas de unión a Ca^{2+} que actúan como moléculas chaperonas en el RE uniéndose a glicoproteínas recién sintetizadas sin plegar. La chaperona tipo lectina calreticulina tiene una alta capacidad pero baja afinidad por Ca^{2+} , funcionando como sensor de $[\text{Ca}^{2+}]$, regulando la expresión de SERCA2 en el lumen del RE. Se ha propuesto que inhibe su actividad al unirse al extremo carboxilo de SERCA2b, donde el residuo Asn1036 puede glicosilarse y permite su interacción tanto con calreticulina como con calnexina. Además la inhibición por

parte de calreticulina ocurre sólo cuando hay elevadas $[Ca^{2+}]$ en el lumen del RE (Michalak, Corbett et al. 1999). Calnexina es también una chaperona transmembrana que se ha demostrado interactúa físicamente con SERCA2b mediante estudios de coimmunoprecipitación. Esta posee un dominio citosólico que contiene diferentes motivos consenso para diferentes proteínas cinasas; su interacción requiere la fosforilación del residuo citosólico S562, el cual cuando se desfosforila se reduce la interacción física con SERCA2b o incluso se pierde, liberando a la bomba de la inhibición (Roderick, Lechleiter et al. 2000).

Sarcalumenina. Es una proteína de unión a Ca^{2+} que se expresa en el lumen del RS del músculo cardíaco y esquelético pero se encuentra predominantemente en el RS longitudinal del músculo esquelético de contracción rápida, colocalizando con SERCA1a. La interacción con SERCA2 no ha sido determinada, sin embargo, en ratones *knockout* de sarcalumenina, se elevan los niveles de SERCA2 en el corazón pero sólo a nivel de proteína y no de ARNm, lo cual sugiere un papel de sarcalumenina en estabilizar a la proteína (Hadad, Meyer et al. 1999; Yoshida, Minamisawa et al. 2005).

Proteínas S100. Son una familia muy grande de proteínas con dominio EF de unión a Ca^{2+} que regulan procesos biológicos muy importantes. S100A1 se encuentra altamente expresada en músculo estriado, en especial en el músculo cardíaco, en donde es el principal regulador de la contracción. Se encuentra presente de forma libre en el citoplasma y asociada con el RS y filamentos contráctiles. S100A1 se encuentra sobre-expresada en hipertrofia ventricular; sin embargo, con expresión disminuida en los estados finales de falla cardíaca. S100A1 colocaliza en el RS *in vivo* e interactúa con SERCA2a *in vitro* en forma dependiente de la concentración de Ca^{2+} y se ha demostrado que estimula la captura de Ca^{2+} por la bomba, lo cual sugiere que puede incrementar su actividad a través de una interacción directa proteína-proteína (Kiewitz, Acklin et al. 2003; Most, Pleger et al. 2004).

Erp57. Es una óxido reductasa ubicua del RE que promueve la formación de enlaces disulfuro intra- e inter-moleculares durante el plegamiento de glicoproteínas. Erp57 interactúa

específicamente con calnexina o calreticulina (Leach, Cohen-Doyle et al. 2002). Juntas, Erp57, calreticulina y calnexina forman el llamado “ciclo calreticulina/calnexina” que es responsable del control de calidad y plegamiento de las glicoproteínas recién sintetizadas. Su interacción con SERCA2b puede funcionar como un sensor redox y su oxidación en determinados dominios puede inhibir el transporte de Ca^{2+} (Li and Camacho 2004).

Acilfosfatasa. Es una enzima de 11 kDa del citosol cargada negativamente que cataliza *in vitro*, la hidrólisis del enlace carboxilfosfato de varios sustratos solubles de bajo peso molecular. Un estudio encontró que la acilfosfatasa puede hidrolizar al intermediario acilfosforilado de algunas ATPasas tipo P, incluyendo a SERCA, incrementando por lo tanto la velocidad de transporte de la enzima (Nediani, Fiorillo et al. 1996; Nediani, Celli et al. 2003). En el corazón la enzima tiene un efecto estimulador el cual se atribuye a dos mecanismos: la acción directa de la acilfosfatasa en la hidrólisis del intermediario fosforilado o la liberación de la inhibición por fosfolamban a través del desplazamiento del inhibidor.

BCL-2. Interacción directa entre BCL-2 y SERCA se demostró por coimmunoprecipitación, tanto con SERCA2 (Kuo, Kim et al. 1998) como con SERCA1 (Dremina, Sharov et al. 2004). Además de su interacción con SERCA, Bcl-2 también parece afectar su nivel de expresión. La sobre-expresión de BCL-2 en células epiteliales de mama (MCF10A) resultó en sobre-expresión de SERCA2 tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína. En contraste la sobre-expresión de BCL-2 en células epiteliales de cáncer de próstata (LNCaP) resultó en la disminución de su expresión (Vanden Abeele, Skryma et al. 2002).

IRS. Estudios realizados en células musculares y en células β -pancreáticas han demostrado que SERCA1-3 se une al sustrato del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1 y IRS-2) y que su unión se estimula mediante el tratamiento con insulina (Borge and Wolf 2003). IRS 1 y 2 co-immunoprecipitan con SERCA en extractos de células de músculo esquelético y cardíaco de rata, demostrando una relación entre la isoforma SERCA1a del músculo esquelético y la SERCA2a del corazón; en ambos casos, la inyección de insulina provocó un incremento de 2 a 6 veces en su

asociación (Algenstaedt, Antonetti et al. 1997). IRS-1 también interactúa con SERCA3b tanto en cultivos de células T y de ovario de hamster normales así como en líneas celulares β que sobre-expresan IRS-1. Debido a que las células β son un blanco para la producción de insulina que expresan SERCA3 junto con SERCA2, se piensa que ambas isoformas de la bomba pueden modular la acción de la insulina en estas células, creando un puente entre la cascada de cinasas de tirosina y los efectos de la insulina con la concentración de Ca^{2+} . Por otro lado, se ha visto que la sobre-expresión de IRS-1 en células β inhibe la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* (Xu, Gao et al. 2000; Kulkarni, Roper et al. 2004).

Desmoplaquinas I y II. Son proteínas del citoesqueleto que anclan filamentos intermedios de queratina a la membrana plasmática en los desmosomas de la epidermis. Los desmosomas son complejos de adhesión críticos entre las células epiteliales adyacentes, que se ensamblan en respuesta al contacto célula-célula en ambientes con elevada $[\text{Ca}^{2+}]$ en el espacio extracelular. Desmoplaquinas y SERCA2 se ha demostrado que interactúan en la membrana del RE en una forma dependiente de Ca^{2+} en cultivos primarios de queratinocitos humanos, sugiriendo que SERCA2 puede tener una función accesoria en el ensamblamiento desmosomal (Dhitavat, Cobbold et al. 2003).

2.9 CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA AUSENCIA DE LA EXPRESIÓN DE LA BOMBA SERCA

2.9.1 KNOCKOUT *ATP2A1*

El grupo de trabajo de MacLennan (Pan, Zvaritch et al. 2003) desarrolló ratones *knockout* del gen *Atp2a1* en ratón (*Atp2a1*^{-/-}), los cuales nacieron vivos y fenotípicamente normales al principio pero posteriormente mostraron insuficiencia respiratoria hasta la cianosis y murieron rápidamente después de nacer por falla respiratoria. También hubo alteraciones en el movimiento de extremidades y evidencia de calambres, lo que concuerda con su abundante expresión en células musculares.

2.9.2 KNOCKOUT *ATP2A2*

SERCA2a es la isoforma predominante en el corazón (97.5%) aunque existen niveles bajos de SERCA2b (2.5%) (Lompre, Anger et al. 1994). La reducción de la expresión de SERCA2a por silenciamiento con ARN de interferencia (RNAi) en miocitos cardiacos resulta en la activación de un complejo dependiente de calcineurina, conduciendo al incremento de la expresión de factores de transcripción hipertróficos como Sp1, MEF2 y NFATc4, además de aumento en la expresión de proteínas que manejan Ca²⁺ como el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y TRPC, al parecer como mecanismo compensatorio (Seth, Sumbilla et al. 2004). La modulación en la expresión de transportadores de Ca²⁺ en cardiomiocitos hipertróficos conduce a anomalías funcionales en el ciclo del Ca²⁺ y a largo plazo afecta la función contráctil del corazón.

Para comprender mejor la función fisiológica de SERCA2 *in vivo*, el grupo de Gary Shull desarrolló un ratón *knockout* deletando la región promotora y los dos primeros exones del gen *Atp2a2* (Shull, Okunade et al. 2003). Sin embargo, mutantes homocigotos *Atp2a2*^{-/-} no fueron observados, consistente con la idea de que SERCA2b funciona como un gen de expresión ubicua, por lo que la ausencia de su expresión es incompatible con la vida. En contraste, los mutantes heterocigotos *Atp2a2*^{+/-} fueron fenotípicamente sanos a las 12 a 14 semanas de edad, sin embargo, la evaluación a los 9 meses demostró reducida contractilidad y relajación del músculo cardíaco. Los corazones de los mutantes mantuvieron una función cardíaca relativamente normal durante la

estimulación β -adrenérgica, aunque se encontró falla cardíaca a los 20 meses de edad en respuesta a la carga hemodinámica, mostrando mayor hipertrofia ventricular, comparando con el grupo control (Liu, Boivin et al. 2001). Sin embargo, el análisis de la función cardíaca de los pacientes con la enfermedad de Darier (su equivalente genético en humanos $ATP2A2^{+/-}$) mediante ecocardiograma no reveló evidencia de enfermedad cardíaca por pérdida de una copia de este gen (Burge and Wilkinson 1992; Tavadia, Tait et al. 2001).

Se esperaba que los ratones mutantes heterocigotos $Atp2a2^{+/-}$ con la edad (53 a 81 semanas) desarrollaran lesiones en la piel como los pacientes con la enfermedad de Darier. Inesperadamente, se vio que éstos presentaron una alta frecuencia de carcinomas de células escamosas (13 de 14 ratones; 93%) (Liu, Boivin et al. 2001). La disminución en la expresión de la proteína SERCA2 en estos tumores demostró que se originaron como resultado directo de la expresión incompleta del gen $Atp2a2$. Los tumores estuvieron restringidos a regiones con queratina y epitelio estratificado e incluyen carcinomas y papilomas en la cara, mucosa oral, lengua, esófago, estómago, genitales y áreas de la piel que carecen de vello, que se encontraron en un promedio de más de dos tumores por ratón. Sin embargo, pacientes con enfermedad de Darier no han mostrado predisposición a desarrollar cáncer, aunque carcinomas de células escamosas han sido reportados en un número limitado de pacientes. Estos resultados muestran que la expresión incompleta del gen $ATP2A2$ produce diferentes patologías en cada especie, desarrollo de cáncer en el ratón y lesiones en la piel en el humano, aunque el tejido afectado resulta ser el mismo, células epiteliales. La perturbación en la homeostasis del Ca^{2+} puede ser un factor de susceptibilidad en la acumulación de alteraciones genéticas en otros *loci*. Las bases de las diferencias entre especies respecto a la susceptibilidad a desarrollar tumores es incierta, sin embargo puede ser atribuida a factores como la actividad y el tamaño de los telómeros (Rangarajan and Weinberg 2003).

Ver Heyen y colaboradores, desarrollaron ratones transgénicos en los cuales SERCA2a ha sido reemplazada por la isoforma SERCA2b de alta afinidad por Ca^{2+} , mediante mutación del último exón que codifica el extremo carboxilo en la isoforma SERCA2a. Estos mutantes mostraron embrioletalidad (40%) que apareció como consecuencia de malformaciones cardíacas, sin embargo, a diferencia de los heterocigotos $Atp2a2^{+/-}$ la mayoría de los mutantes homocigotos $Atp2a2^{b/b}$ sobrevivieron hasta la edad adulta y sólo desarrollaron hipertrofia cardíaca concéntrica como

mecanismo compensatorio a la falta de SERCA2a (Ver Heyen, Heymans et al. 2001). El nivel de expresión de SERCA2b en los mutantes nulos de SERCA2a fue de ~60% comparado con los niveles normales de SERCA2a en los corazones silvestres, con una reducción en la actividad de recaptura del Ca^{2+} , consistente con la reducción en la expresión y actividad de SERCA. También se observaron reducciones tanto en el índice de contracción y relajación similares a los observados en los mutantes de una copia del gen *Atp2a2*^{+/-}.

Estos resultados demuestran que 2a y 2b no son equivalentes en términos de transducción de señales de crecimiento en miocitos cardiacos y vasculares, que es necesario un nivel basal de SERCA2a para la función cardiaca normal y que su reemplazo por la isoforma SERCA2b con mayor afinidad por Ca^{2+} , resulta en disfunción cardiaca y alteraciones en las vías de señalización por Ca^{2+} . La disrupción heterocigota de *ATP2A2*^{+/-} no se asocia con falla cardiaca en pacientes con enfermedad de Darier, sin embargo si se ha reportado la asociación entre falla o hipertrofia cardíaca con la disminución en la expresión de SERCA2a, lo cual sugiere que la disminución en su expresión en ciertas condiciones promueve falla cardiaca; aunque, no es suficiente para causarla (Tavadia, Tait et al. 2001; Mayosi, Kardos et al. 2006).

El desarrollo de tumores en células escamosas en ratón y lesiones en la piel en los humanos son los únicos fenotipos que resultan de la pérdida de la expresión de uno de los alelos del gen *ATP2A2*, lo que indica que la haploinsuficiencia de SERCA2 es relativamente benigna en el resto de los tipos celulares o que estos otros tipos celulares poseen una amplia gama de mecanismos compensatorios. Otros autores proponen que la plasticidad y adaptabilidad de las funciones celulares dependientes de la señalización por Ca^{2+} puede explicar la función relativamente normal de la mayoría de los tejidos en los que disminuye la expresión de SERCA2, sin embargo, el control de su actividad es de suma importancia en la homeostasis del Ca^{2+} . Como mecanismo compensatorio a la pérdida de un alelo del gen *ATP2A2*, se propone que el alelo funcional aumente su expresión, tanto por mecanismos epigenéticos como transcripcionales.

2.9.3 KNOCKOUT *ATP2A3*

A diferencia de la isoforma ubicua SERCA2b, las isoformas de SERCA3 se expresan sólo en ciertos tipos celulares, que incluyen células del endotelio vascular, del sistema hematopoyético,

epiteliales y β -pancreáticas. Sin embargo, su expresión es invariable en conjunto con SERCA2b y posee una afinidad inusualmente baja por Ca^{2+} , lo cual sugiere que funciona en un ambiente celular específico con altas concentraciones del catión.

La expresión abundante de SERCA3 en células pancreáticas beta normales (Arredouani, Guiot et al. 2002), la presencia de mutaciones en el gen *ATP2A3* en pacientes con diabetes tipo II y la expresión anómala de la ATPasa de Ca^{2+} en modelos de ratas diabéticas (Levy, Zhu et al. 1998) sugirieron que SERCA3 podía estar implicada en el desarrollo de la diabetes. Por ello, Gary Sull y colaboradores generaron un modelo de ratón nulo para la expresión de *Atp2a3*^{-/-}, el cual en primer lugar fue normal, demostrando que SERCA3 no desempeña un papel importante durante la embriogénesis del ratón y que no ejerce una función como gen de expresión ubicua. Además sugirió que SERCA3 desempeña un papel secundario en la homeostasis y señalización celular de Ca^{2+} ; sin embargo, estos mutantes mostraron defectos en la relajación del músculo liso *in vitro*, aunque sin ningún fenotipo de enfermedad. En el ratón heterocigoto de *Atp2a2*^{+/-}, la presión sanguínea y la función cardíaca estuvieron alteradas, pero fueron normales tanto en estado estacionario como bajo estimulación β -adrenérgica en los mutantes de *Atp2a3*^{-/-}; solo se encontraron algunas alteraciones en la señalización por Ca^{2+} en las células β -pancreáticas en el ratón nulo para *Atp2a3*^{-/-} como incremento en la amplitud de las ondas de Ca^{2+} después de la despolarización de la membrana, mientras que las ondas de Ca^{2+} decayeron mucho más rápido que en las células normales. Además, en respuesta a glucosa, la frecuencia en las oscilaciones de Ca^{2+} se encontró alterada en los mutantes y la amplitud relativa a los niveles basales de Ca^{2+} se incrementó. Estos resultados sugieren que el secuestro de Ca^{2+} por SERCA3 ocurre cuando el Ca^{2+} en el citosol se encuentra elevado, modulando el incremento en su concentración, desempeñando un papel en la liberación de Ca^{2+} durante la fase de decaimiento entre las oscilaciones y ondas de Ca^{2+} (Shull, Okunade et al. 2003).

A pesar de las alteraciones en la señalización por Ca^{2+} en el ratón *Atp2a3*^{-/-}, éste no desarrolló diabetes, mostrando niveles normales de glucemia así como de insulina, comprobándose en este modelo, que SERCA3 no es esencial en la homeostasis de la glucosa, sin embargo, los autores no descartan que perturbaciones en la homeostasis del Ca^{2+} puedan conducir a diabetes u otras enfermedades. Sin embargo, estos resultados no excluyen la posibilidad de que en otro fondo

genético, la reducción en la actividad de SERCA3 pueda contribuir a modular la homeostasis de la glucosa y el desarrollo de diabetes. Por otro lado, la inhibición de SERCA3 mediante oligonucleótidos antisentido no depleta el reservorio de Ca^{2+} del RE a diferencia de la inhibición de SERCA2b. Estos datos sugieren que el papel de SERCA3 en la célula beta pancreática puede ser diferente al de las otras bombas SERCA y estar involucrado en normalizar las oscilaciones de Ca^{2+} . A pesar de que no se ha establecido la localización de SERCA3 y SERCA2b en células β -pancreáticas, se ha visto que en células glandulares submandibulares se localizan en regiones intracelulares distintas, lo cual sugiere que estas isoformas modulan diferentes reservorios intracelulares de Ca^{2+} .

El estudio del ratón nulo para *Atp2a3*^{-/-} permitió esclarecer que las mutaciones o polimorfismos descritos en pacientes con diabetes tipo II no son causales de la enfermedad y que la reducida actividad de la bomba ocurre como consecuencia del estado hiperglicémico de los pacientes.

2.10 ALTERACIONES DE LAS BOMBAS SERCA EN PROCESOS PATOLÓGICOS

Diferentes enfermedades pueden resultar del manejo anormal de la $[\text{Ca}^{2+}]$ como hipertensión, enfermedad cardíaca, diabetes, depresión, enfermedad de Alzheimer e incluso cáncer, sin embargo a continuación se presentan ejemplos específicos en los que la disrupción de la función de la bomba SERCA conducen a un fenotipo de enfermedad en particular.

2.10.1 BOMBA SERCA1

Mutaciones en el gen *ATP2A1* han sido identificadas en pacientes con la enfermedad de Brody, una enfermedad genética autosómica recesiva poco común que afecta al músculo (Odermatt, Taschner et al. 1996). La enfermedad está caracterizada por relajación anormal de los músculos, calambres sin dolor y rigidez que se acentúan después de realizar ejercicio. Afecta principalmente a los músculos de las extremidades, los síntomas que se exacerban con el frío, aparecen después de ejercicio sostenido y repetido. La enfermedad es genéticamente heterogénea y pueden ocurrir defectos en un segundo o tercer gen para dar diferentes presentaciones de la enfermedad.

En esta enfermedad las mutaciones producen una proteína trunca con pérdida de la función de

SERCA1a, como resultado el Ca^{2+} no se transporta de vuelta al RS después de su liberación y se acumula en el mioplasma, resultando en relajación retardada y calambres. Sin embargo, los pacientes con la enfermedad de Brody conservan cierta capacidad para relajar el músculo, lo cual sugiere que las isoformas SERCA2 o 3 compensan en cierto modo la pérdida de la expresión de SERCA1a.

2.10.2 BOMBA SERCA2

Muchos estudios en modelos animales y en humanos han reportado disminución en el transporte y contenido de Ca^{2+} del RS en falla cardíaca, debido a una disminución en la expresión de SERCA2a tanto a nivel de ARNm como de proteína. A pesar de la heterogeneidad considerable en el nivel de expresión de SERCA2a en falla cardíaca, se postula que el transporte alterado del Ca^{2+} juega un papel clave en el mecanismo que conduce a falla cardíaca. Sin embargo, la disminución en la actividad de SERCA2a se debe principalmente al efecto de represión que ejerce fosfolamban, cuya expresión no se ha encontrado alterada o ligeramente disminuida, aunque en un estado hipofosforilado (es decir, cuando puede interactuar e inhibir a SERCA), resultando en severa disminución de la concentración de Ca^{2+} del RS conduciendo a insuficiencia cardíaca (Tavadia, Tait et al. 2001; Mayosi, Kardos et al. 2006).

Otra patología en la que la proteína dañada es SERCA2 es la enfermedad de Darier, una enfermedad autosómica dominante que afecta a ambos sexos y a todos los grupos étnicos, con una prevalencia estimada de entre 1 en 26300 a 1 en 100000, dependiendo del país evaluado (Cooper and Burge 2003). La penetrancia de la enfermedad es completa con expresión variable entre y dentro de las familias afectadas. La presentación de la enfermedad es generalmente en la pubertad y la mayoría de los pacientes presentan las primeras lesiones entre los 10 y los 20 años de edad. Típicamente las lesiones son pápulas grasas sobre la piel, de color amarillo a café que pueden encontrarse aisladas o formando grandes placas confluentes localizadas principalmente en áreas seboreicas del tronco, la espalda, parte superior del pecho, a los lados del cuello, cara, frente, orejas y cuero cabelludo (ver Figura 7).

En 1993 se mapeó a la región 12q23-24 como la responsable de la enfermedad de Darier y en 1999 se identificó dentro de esta región al gen *ATP2A2* como el afectado directamente. La identificación

de la bomba de Ca^{2+} como la proteína dañada en esta enfermedad fue inesperada y permitió relacionar un papel clave de la señalización de Ca^{2+} y SERCA2 en la homeostasis de la epidermis (Sakuntabhai, Ruiz-Perez et al. 1999; Hovnanian 2004).

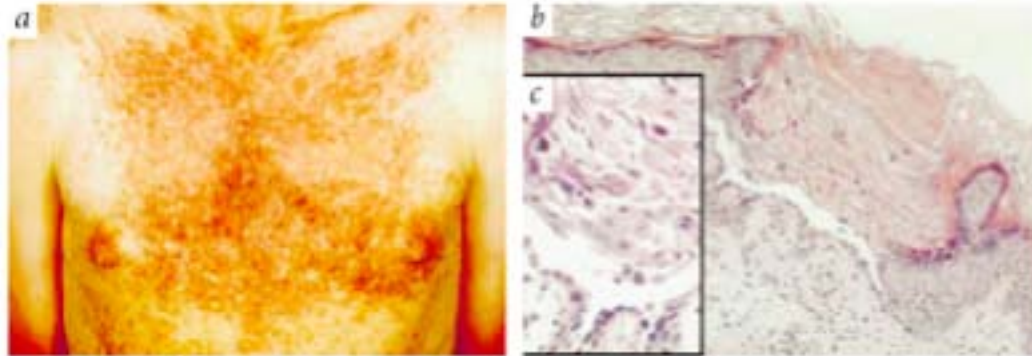


Figura 7. Características clínicas e histológicas de la enfermedad de Darier. a) Presentación clínica: pápulas queratósicas coalescen para formar placas extensas en el pecho. b) Sección histológica de piel afectada que muestra separación de las células de las capas suprabasales (acantolisis), división suprabasal y queratinización anormal. c) Imagen ampliada mostrando a las células acantolíticas de la capa suprabasal. Tomado de (Sakuntabhai, Ruiz-Perez et al. 1999)

Se han detectado más de 130 mutaciones en el gen *ATP2A2* en pacientes con enfermedad de Darier, la mayoría de las cuales son específicas de una familia. Las mutaciones están distribuidas a lo largo de la molécula entera sin evidencia de “hot spots” de mutaciones que afecten dominios funcionales críticos de SERCA2 (Pani and Singh 2007). Sin embargo, mutaciones espontáneas también son frecuentes; la mayoría de las mutaciones identificadas son mutaciones de sentido equivocado (50%), inserciones o deleciones que conservan el marco de lectura, aunque predicen la síntesis estructuralmente anómala de la proteína.

Otras mutaciones incluyen mutaciones sin sentido (12%) y mutaciones en marco (23%) que conducen a un codón prematuro de terminación y predicen la pérdida de la expresión de la proteína. El resto de las mutaciones, afectan los sitios de splicing (7%), sin embargo la consecuencia de éstas no ha sido establecida (Sakuntabhai, Ruiz-Perez et al. 1999; Dhitavat, Cobbold et al. 2003). Variabilidad inter e intra familias en el fenotipo de la enfermedad indica que factores genéticos y ambientales influyen en la expresión de la enfermedad.

A pesar de que todas las mutaciones se encuentran en el gen *ATP2A2*, en tres familias con la

enfermedad de Darier clásica, se encontró que las mutaciones se encuentran localizadas en una región del exón 20, el cual es específico de la isoforma 2b. Cada una de estas mutaciones conduce a codones de alto prematuros, indicando que la pérdida de la expresión de SERCA2b es suficiente para causar la enfermedad de Darier y que la isoforma 2a no es capaz de compensar su función. Estos datos son consistentes con la expresión más abundante de SERCA2b en la epidermis, sin embargo ambas isoformas se expresan en cultivos de queratinocitos (Tavadia, Authi et al. 2004).

A la fecha, las consecuencias funcionales de 68 mutaciones en *ATP2A2* identificadas en pacientes con enfermedad de Darier han sido estudiadas mediante mutagénesis sitio dirigida en tres estudios por separado (Ahn, Lee et al. 2003; Dode, Andersen et al. 2003; Miyauchi, Daiho et al. 2006). La sobre-expresión y análisis funcional de las mutantes de SERCA2 recombinantes en células COS ha mostrado que en la mayoría de los casos las mutaciones de sentido equivocado causan la pérdida del transporte de Ca^{2+} por actividad anómala de la ATPasa, ya que las mutaciones conducen a codones prematuros de alto y pérdida de la expresión del alelo mutado. Otras mutantes presentan reducida expresión de la proteína debido a inestabilidad de la misma. Sin embargo, de forma inesperada, una de las mutantes mostró mayor actividad y afinidad por Ca^{2+} . Estos resultados soportan la hipótesis de que la expresión incompleta de SERCA2 es el mecanismo responsable del desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, algunas mutaciones de sentido equivocado parcialmente inhiben la expresión del alelo normal, lo cual se asoció con un fenotipo más severo de la enfermedad, sugiriendo que algunas mutaciones de sentido equivocado pueden actuar al menos en parte a través de un mecanismo dominante negativo.

La evidencia encontrada a la fecha en muestras de pacientes con la enfermedad de Darier indica que la expresión anómala de SERCA2 afecta principalmente a los queratinocitos, que se manifiesta en la incapacidad para restablecer las elevadas concentraciones de calcio al interior del RE. Sin embargo, respecto a la concentración de calcio en el citosol de los queratinocitos, la evidencia es contradictoria. En el estudio de Leinonen se encontró que los niveles basales de Ca^{2+} estaban incrementados, pero el grupo de Foggia los describe disminuidos (Leinonen, Myllyla et al. 2005; Foggia, Aronchik et al. 2006). En este último, la concentración reducida de Ca^{2+} en el citosol mostró que proviene de la sobre-expresión de *ATP2C1*, que codifica la bomba de Ca^{2+} del aparato de Golgi (SPCA1). La señalización por Ca^{2+} se mantuvo en los queratinocitos con enfermedad de

Darier indicando que el reservorio del aparato de Golgi compensa la señalización anómala de SERCA2 en el retículo endoplásmico. En el mismo estudio, la inhibición de *ATP2C1* (gen que codifica la SPCA1) mediante siRNA disminuyó la viabilidad de los queratinocitos, mostrando que su sobre-expresión es un mecanismo que protege a la célula de la apoptosis. Pani y colaboradores, han encontrado sobre-expresión del canal catiónico TRPC1, tanto en queratinocitos de pacientes con enfermedad de Darier como en queratinocitos de ratón *Atp2a2*^{+/-} (Pani, Cornatzer et al. 2006). Estos autores han demostrado que la sobre-expresión del canal TRPC1 incrementa la proliferación celular y restringe la apoptosis, ilustrando otro mecanismo compensatorio en respuesta a la depleción de Ca²⁺ del RE. Estos resultados resaltan la comunicación entre el RE, el aparato de Golgi y los canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática como TRPC1 en la señalización por Ca²⁺. El Ca²⁺ activa el interruptor entre proliferación y diferenciación en los queratinocitos, este catión se requiere para el ensamblamiento de desmosomas y uniones adherentes, así como para la polimerización de actina. Un cambio en la concentración basal de Ca²⁺ en el lumen del RE se piensa que tiene su efecto en la señalización por Ca²⁺, principalmente en plegamiento, ensamblamiento, modificaciones post-traduccionales y transporte de diversas proteínas. Sin embargo, ningún defecto en la glicosilación de las proteínas desmosomales fue detectado en cultivos de queratinocitos de pacientes con Darier, aunque el transporte de desmoplaquinas hacia la membrana se mostró deficiente. Finalmente, dado que el Ca²⁺ desempeña un papel clave en la regulación de la transcripción, la expresión de un rango muy amplio de genes que participan en la adhesión y diferenciación celular puede estar alterada.

La observación de que la exposición a rayos ultravioleta B (UVB), calor e infecciones exacerbaban los síntomas de la enfermedad de Darier, ilustran el papel de factores externos en la presentación de la enfermedad. En la ausencia de estrés, la deficiencia de SERCA2 puede ser compensada por incremento en la expresión de el alelo normal así como otros sistemas reguladores, sin embargo, en presencia de factores que activan la enfermedad, ocurre una disrupción en este balance, conduciendo a una reducción significativa en los niveles de SERCA2 que exacerbaban el fenotipo de la enfermedad.

2.10.3 BOMBA SERCA3

Diferentes mutaciones de sentido equivocado en SERCA3 se han encontrado en un estudio

retrospectivo con pacientes diabéticos (Varadi, Lebel et al. 1999). En células β -pancreáticas de modelos animales de diabetes tipo 2 se ha reportado una $[Ca^{2+}]_c$ alterada en respuesta a la glucosa. Por ejemplo, se ha encontrado disminución en la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa en islotes de ratas inducidas a diabetes con estreptozotocina, así como en ratones con diabetes espontánea *db/db*. La sobre-expresión del receptor para el sustrato de insulina-1 (IRS-1), que ocurre después de exposición prolongada de células β TC6 a insulina, un fenómeno que ocurre generalmente como una etapa temprana en el desarrollo de la diabetes, inhibe la expresión del gen SERCA3 sin alterar la de SERCA2b, por lo que está podría ser una de las vías de señalización a través de la cual tiene lugar la disminución de su actividad. Es decir, la evidencia del ratón *knockout* de SERCA3 sin presentación de diabetes, conduce a la deducción de que la disminución en su expresión es consecuencia de la hiperglicemia más que constituir una causa del desarrollo de la enfermedad.

Arredouani y colaboradores encuentran que la expresión de SERCA3 en el páncreas del ratón se limita a células β secretoras de insulina. Utilizando un *knockout* de SERCA3 describen que la expresión de SERCA2b no se altera, por lo que la ausencia de SERCA3 no se compensa por sobre-expresión de 2b. Es de destacar que la concentración de Ca^{2+} en el citosol no se encuentra alterada con respecto al silvestre, lo que implica mecanismos compensatorios que mantienen la homeostasis del calcio al interior de la célula (Arredouani, Guiot et al. 2002).

También existen reportes que describen alteración en la expresión de SERCA3 en relación a ciertos tipos de cáncer, pero por su extensión y por ser el tema de este proyecto se tratará en el siguiente apartado de forma detallada.

2.11 LAS BOMBAS SERCA Y EL CÁNCER

La expresión y actividad de canales y bombas de Ca^{2+} puede ofrecer una ventaja para la proliferación o ser el resultado de mecanismos adaptativos para la supervivencia y resistencia a la apoptosis. Sin embargo el perfil de cambios en las proteínas que se encargan de la homeostasis del calcio no sigue un patrón uniforme en las diferentes neoplasias; incluso los mecanismos que conducen a su función alterada es muy amplio. Su expresión puede alterarse directamente por eventos de mutación, mediante mecanismos epigenéticos, por expresión alterada de factores de transcripción que modulen su expresión o mediante complejas vías de señalización. A la fecha

existen múltiples reportes de mutación o alteración en la expresión de moléculas que se encargan del manejo y vías de señalización de calcio, en muchos tipos de cáncer (Monteith, McAndrew et al. 2007; Roderick and Cook 2008).

La evidencia más directa entre deficiencia de SERCA y la formación de tumores ha sido provista por el desarrollo de ratones heterocigotos *Atp2a2*^{+/-}, donde se encontró que los ratones presentan una alta incidencia de carcinomas en células escamosas (o epitelio plano), como resultado directo de la haploinsuficiencia de la isoforma 2 de la bomba SERCA (Liu, Boivin et al. 2001).

El análisis por inmunoblot de los tumores del ratón *Atp2a2*^{+/-} mostró que la proteína SERCA2 se expresa de forma intacta y no reveló evidencia de formas truncadas, como las que frecuentemente se encuentran en los pacientes con enfermedad de Darier, aunque no se descartan mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones con actividad anómala de la proteína (Prasad, Boivin et al. 2005). Estudios sobre la patogénesis de carcinomas orales, identifican mutaciones en los genes *H-ras* o *K-ras* en los estadios tempranos del desarrollo del tumor, sin embargo en los tumores de ratones *Atp2a2*^{+/-} no se detectaron mutaciones que afecten estos genes, apuntando a que el evento inicial en la tumorigénesis inducida por *Atp2a2*^{+/-} no sigue la vía clásica de ganancia de función de éstos. Aunque no se detectaron mutaciones, contrario a lo que se esperaba, se encontró expresión elevada de *ras* en las muestras analizadas de ratones *Atp2a2*^{+/-} (Walker, Cullen et al. 2003). Las mutaciones en los genes *ras* se han considerado insuficientes para la progresión del tumor (Hanahan and Weinberg 2000), sin embargo, *ras* como oncogén aumenta la estabilidad de p53 a través de p19^{ARF} (Lin and Lowe 2001) cooperando directamente para inducir senescencia (Ferbeyre, de Stanchina et al. 2002). Típicamente, mutaciones con pérdida de función en p53 permiten la progresión del tumor con la acumulación de p53 mutada que carece de actividad como supresor de tumores y al contrario, pueden funcionar como factores oncogénicos, facilitando la progresión del tumor (Kim and Deppert 2004). En el análisis de los tumores de ratones *Atp2a2*^{+/-} no se encontraron mutaciones en p53 y de forma inesperada se encontraron niveles de expresión superiores los cuales se pueden atribuir a la lenta progresión de estos tumores (Liu, Boivin et al. 2001).

En el ratón también se ha visto que la tapsigargina (un inhibidor de origen natural irreversible, muy potente y altamente específico de la actividad de la bomba SERCA), sirve como un agente

promotor de tumores de diferentes grados de malignidad sobre la piel del animal, comprobando que promueve el crecimiento de queratinocitos en cultivo (Hakii, Fujiki et al. 1986; Harmon, Ducote et al. 1996; Gniadecki and Gajkowska 2003). Sin embargo, no es claro si estos efectos se deben a la inhibición parcial de SERCA2 (simulando haploinsuficiencia) o a su completa inhibición (pérdida de la heterocigocidad) o a un efecto independiente de SERCA.

En humanos, hay reportes que indican que la expresión de la proteína SERCA2b está significativamente disminuida en cáncer oral (un carcinoma de células escamosas) así como en cáncer de tiroides (Pacífico, Ulianich et al. 2003), donde es la principal isoforma. Alternativamente, mutaciones somáticas y en línea germinal en el gen *ATP2A2* han sido detectadas en pacientes con cáncer de colon y pulmón con la consecuente pérdida o reducción en la expresión de SERCA2, las cuales se han asociado con una predisposición a desarrollar este tipo de neoplasia (Korosec, Glavac et al. 2006). En un estudio con 52 muestras de pacientes con carcinomas orales no se identificaron mutaciones puntuales en el gen *ATP2A2*; sin embargo, se reportaron niveles disminuidos de la proteína SERCA2 los cuales se asociaron con el silenciamiento del gen por metilación del promotor, conduciendo a la propuesta de que *ATP2A2* puede funcionar como un gen supresor de tumores (Endo, Uzawa et al. 2004).

La expresión de SERCA3 normalmente se limita a ciertos tipos celulares, con expresión abundante en mucosa gástrica e intestino. Sin embargo se ha visto que la expresión de SERCA3, disminuye drásticamente o se pierde completamente en carcinomas de colon, demostrado por inmunohistoquímica en muestras de pacientes además de en múltiples líneas de carcinoma de colon y gástrico (Gelebart, Kovacs et al. 2002; Papp, Brouland et al. 2004; Brouland, Gelebart et al. 2005). Recientemente se reportó la presencia de mutaciones en el gen *ATP2A3* en línea germinal en un estudio retrospectivo con muestras de pacientes con cáncer de colon, pulmón y sistema nervioso central (SNC) y puesto que no encuentra evidencia de mutaciones somáticas sobre *ATP2A3* postulan que éste no funciona como un gen supresor de tumores sino que la haploinsuficiencia del gen es lo que modifica el ambiente celular y tisular predisponiendo al desarrollo del cáncer, con lo cual se establece que estas mutaciones podrían ser uno de los eventos tempranos en el proceso carcinogénico (Korosec, Glavac et al. 2009).

En humanos, a diferencia del ratón *Atp2a2^{+/-}*, la disminución de la expresión de SERCA2 en líneas

tumorales de tiroides y de SERCA3 en líneas de cáncer de colon y gástrico (Brouland, Valleur et al. 2006) se ha propuesto que es producto de la pérdida de la diferenciación de las células transformadas y no responsable del desarrollo de la malignidad *per se*.

Algunos grupos han reportado que en ciertas líneas tumorales hay un incremento en la expresión de SERCA2b y un aumento en el contenido de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, los cuales son requeridos para la inducción de la proliferación. Sin embargo, las vías moleculares involucradas no han sido identificadas. El grupo de Crepin, reportó que la inducción de la proliferación de las células normales epiteliales de próstata PNT1A con prolactina está relacionada con un incremento en el contenido de Ca^{2+} del RE y un aumento en la expresión de SERCA2b. El silenciamiento de la expresión de SERCA2b mediante ARN pequeño interferente (siRNA) conduce a la reducción de la proliferación celular de PNT1A. Estas observaciones conducen a los autores a concluir que la sobre-expresión de SERCA2b es un modulador de la proliferación inducida por prolactina (Crepin, Bidaux et al. 2007).

También hay evidencia de que la pérdida de la actividad de SERCA y el consecuente vaciado de los depósitos induce proliferación en diferentes tipos celulares tanto normales como neoplásicos, a través de la entrada de Ca^{2+} por la apertura de canales sensibles a Ca^{2+} y la activación de NFAT. Por ejemplo, en células epiteliales humanas de cáncer de próstata, la entrada de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} y la activación de NFAT han sido identificados como las principales vías que conducen a proliferación (Humez, Legrand et al. 2004). La bomba SERCA también desempeña un papel esencial en la síntesis, plegamiento, transporte y secreción de proteínas. El estrés del RE como resultado del vaciamiento de Ca^{2+} constituye una señal para la muerte celular. Se ha reportado que BCL-2 reduce la concentración de Ca^{2+} del RE por inhibición de SERCA2 ejerciendo su función como proteína antiapoptótica (Vanden Abeele, Skryma et al. 2002).

El análisis mediante inmunohistoquímica de biopsias de colon normal, mostró que la expresión de SERCA3 está modulada a través de las criptas del colon, con menor expresión en las células que ocupan el fondo de la cripta (células madre) y que se incrementa conforme las células avanzan por el eje de la cripta adquiriendo un fenotipo más diferenciado. La pérdida de diferenciación por la que se caracterizan las células neoplásicas correlaciona con la poca o nula expresión de SERCA3 que se ha encontrado en estas células. Las observaciones anteriores sugieren que la disminución en

la expresión de SERCA3 es un evento temprano en un proceso que implica múltiples pasos para el desarrollo de cáncer de colon (Brouland, Gelebart et al. 2005). La expresión paralela de isoformas de SERCA en los epitelios, 3 y 2b (ubicua), con afinidades distintas por calcio, sugieren que el incremento en la expresión de SERCA3 (isoforma con afinidad excepcionalmente alta por Ca^{2+}) durante el proceso de diferenciación normal, contribuye a la homeostasis de Ca^{2+} al interior de la célula manteniendo el programa de diferenciación. Además, se ha propuesto que en ciertos tipos celulares, SERCA3 puede estar asociada específicamente con la señalización por Ca^{2+} a través de IP3, en tanto que SERCA2, en la cascada de señalización que involucra las funciones constitutivas del RE como síntesis, plegamiento y maduración de proteínas. Por otro lado, no obstante la disminución en la expresión de SERCA3 que se encuentra en cáncer de colon y gástrico, se ha probado que es posible inducirla mediante tratamiento con ácidos grasos de cadena corta como el butirato de sodio, los cuales son producto natural de la degradación de las fibras de la dieta por las bacterias del intestino y que constituyen un excelente modelo para diferenciar células *in vitro* con compuestos que se encuentran de manera fisiológica en el lumen del intestino (Gelebart, Kovacs et al. 2002).

2.12 PAPEL DE SERCA EN LA DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR

El depósito de Ca^{2+} en el RE se remodela durante la diferenciación celular a través de regular la expresión, localización y actividad de las bombas SERCA en un forma isoenzima específica. La expresión de las diferentes isoformas de SERCA3 y SERCA2 está modulada durante la diferenciación según el tipo celular (Launay, Gianni et al. 1999; Gelebart, Kovacs et al. 2002). Por ejemplo, la expresión de la isoforma SERCA2c se encuentra modulada durante la diferenciación de los macrófagos, la cual se relaciona con una función específica de éstas células (Gelebart, Martin et al. 2003).

La proliferación está asociada con un incremento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]$. El receptor de inositol trifosfato (IP3R) es un canal de Ca^{2+} localizado en la membrana del RE. La acción de hormonas, factores de crecimiento o moléculas de señalización favorecen su apertura después de la unión de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), conduciendo a un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citosol por apertura de los depósitos y por la disminución en su captura por inhibición de la bomba SERCA. STIM1

(molécula de interacción con el estroma 1) se encarga de sensar la $[Ca^{2+}]$ ligando el vaciado del RE con la activación de los canales sensibles a Ca^{2+} (SOCs) ubicados en la membrana plasmática, permitiendo la entrada de calcio desde el espacio extracelular, favoreciendo la amplificación de la señal. El incremento sostenido (al menos 1-2 horas) en la $[Ca^{2+}]$ citosólica favorece la activación de la calcineurina, quien puede desfosforilar a diferentes proteínas, entre ellas a NFAT, lo cual le permite translocarse al núcleo donde actúa como un factor de transcripción, conduciendo a la inducción de múltiples genes (*SRF*, *Fos-Jun*, *GATA*, ciclina D1 y D2, *c-Myc*, entre otros) favoreciendo así el programa de proliferación celular. Ver Figura 8.

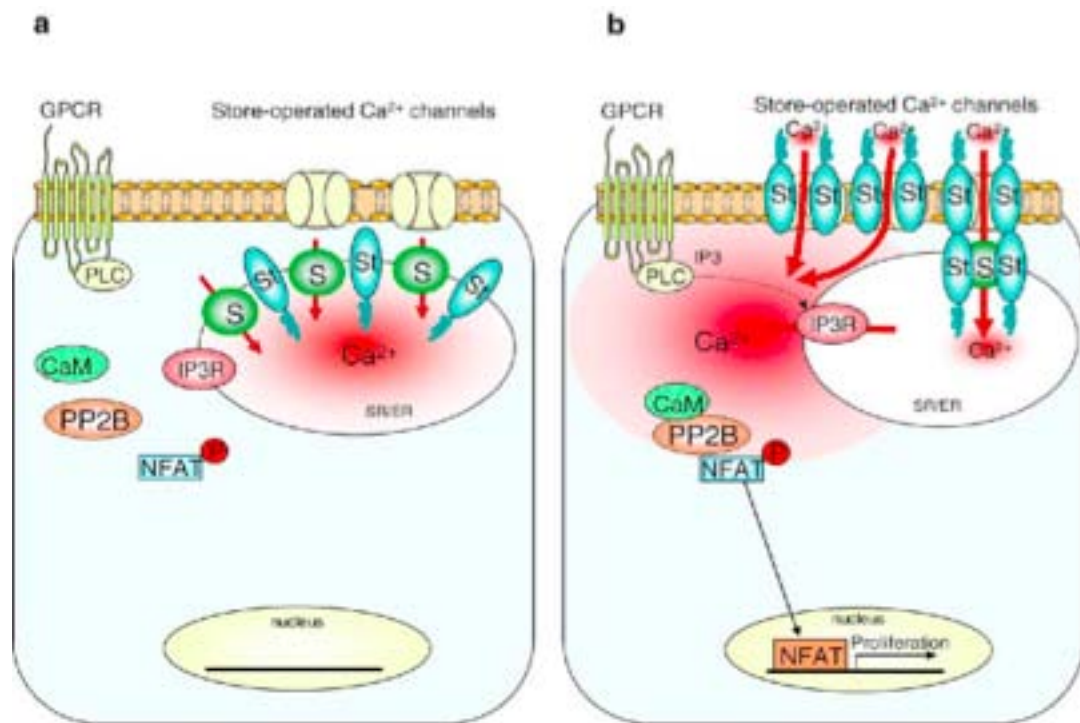


Figura 8. Participación de la bomba SERCA en la proliferación celular. a) Célula quiescente y b) célula en proliferación. La proliferación celular está asociada con la activación de la vía NFAT por incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]$ intracelular a través de la apertura de canales e inhibición de la bomba SERCA. CaM calmodulina, GPCR receptor acoplado a proteína G, PLC fosfolipasa C, PP2B proteína fosfatasa 2B (calcineurina), NFAT factor nuclear de linfocitos T activados, P fosfato, IP3 inositol-1,4,5-trifosfato, IP3R receptor de IP3, S SERCA, SR/ER retículo sarcoplásmico o endoplásmico, St STIM1 (molécula de interacción con el estroma 1). Tomado de (Lipskaia, Hulot et al. 2009).

El Ca^{2+} y la calmodulina controlan eventos clave en el ciclo celular. Las células epiteliales como los colonocitos y queratinocitos son muy sensibles a las $[\text{Ca}^{2+}]$ a diferencia de otros tipos celulares; las células normales de colon humano necesitan únicamente 0.05-0.1 mM para proliferar de forma óptima en lugar de 1.0-1.5 mM como el resto de las células.

Hay evidencia de que una dieta alta en Ca^{2+} protege en contra del desarrollo de cáncer de colon, ya que reduce la proliferación de estas células, sin embargo, en pacientes con pólipos adenomatosos su papel es contraproducente, ya que estimula la proliferación de los colonocitos y con ello el desarrollo del cáncer.

El balance entre proliferación de las células de la cripta y la muerte de las que se encuentran en la superficie de la mucosa de los epitelios debe mantenerse en equilibrio, ya que su acumulación en la pared de la cripta puede conducir a que las criptas se fusionen formando criptas aberrantes, que posteriormente forman microadenomas, pólipos y finalmente carcinomas. Los colonocitos están bajo un control muy estrecho del Ca^{2+} : en presencia de una $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular elevada (0.8-2.2 mM) las células apagan la maquinaria de proliferación y desarrollan uniones adherentes con sus células vecinas para permitir la diferenciación de éstas (Whitfield 2009).

Los eventos de proliferación y diferenciación de las células del colon están controlados por la ruta Wnt. Dentro de esta vía la β -catenina desempeña dos funciones diferentes en el mantenimiento del epitelio de colon normal. Primero, como regulador de la adhesión celular, la β -catenina se une con α -catenina en el citoplasma y se anclan al dominio extracelular de la E-caderina formando uniones con las células vecinas del colon, las cuales son dependientes de la $[\text{Ca}^{2+}]$ (por ejemplo uniones adherentes). Segundo, la β -catenina se encarga de mantener y acelerar el paso de las células del colon a través del ciclo celular para sostener su proliferación. En respuesta a ligandos Wnt, la β -catenina se transloca al núcleo y se une a secuencias blanco de ADN junto con factores de transcripción de la familia TCF-4, activando la transcripción de genes que conducen el progreso del ciclo celular como son c-Myc y ciclina D1, además de mantener apagado el gen $p21^{\text{Cip1/WAF1}}$ que es un regulador negativo del ciclo, con lo que mantiene un estado proliferativo activo. Además de estos genes, APC (Adenomatous Polyposis Coli), modulador de la vía Wnt, induce la expresión de survivina para prevenir la muerte por apoptosis (McDonald, Preston et al. 2006; Aoki and Taketo 2007).

La señal para detener el ciclo celular y conducir a la diferenciación, está controlada por la $[Ca^{2+}]$ del medio a través de los receptores sensibles a Ca^{2+} (CaSR) de la membrana plasmática cuando éstos son activados por el catión. El flujo de Ca^{2+} en las células, produce Ca^{2+} -calmodulina que a su vez activa a la CaMKII y a la CaMKIV nuclear que en turno estimula la expresión del gen CaSR vía su promotor que posee elementos de respuesta a Ca^{2+} . El incremento en la entrada de Ca^{2+} por el CaSR conduce a la expresión de E-caderina, una molécula implicada en la formación de uniones celulares entre las células para favorecer su diferenciación. Por otro lado, este aumento de $[Ca^{2+}]_c$ conduce a la activación de la vía no canónica Wnt, por inducción en la expresión de Wnt5a de forma independientemente de APC (Bhagavathula, Hanosh et al. 2007; MacLeod, Hayes et al. 2007).

2.13 MODELOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

- **Diferenciación espontánea por confluencia celular de cultivos Caco-2**

Caco-2 es una línea celular que se obtuvo originalmente de un adenocarcinoma de colon humano, cuando se cultivan a baja densidad, estas células tienen un fenotipo indiferenciado, pero cuando el cultivo alcanza confluencia celular, tiene lugar un proceso de diferenciación espontánea. Después de 22 días en cultivo se observa la formación de una monocapa de células, con características morfológicas y funcionales de enterocitos maduros, incluso hay desarrollo de uniones estrechas entre las células adyacentes. Las células en monocapa muestran una morfología cilíndrica, con microvellosidades y expresión de enzimas hidrolasas en su membrana apical propias del intestino delgado como por ejemplo, sacarasa isomaltasa, lactasa, aminopeptidasa N y di-peptidil peptidasa IV (Ranaldi, Islam et al. 1992). Sin embargo, se sugiere que las células Caco-2 diferenciadas por confluencia se parecen más a células fetales que a enterocitos del íleo adulto, ya que las enzimas ya mencionadas se expresan en el feto humano (alrededor de las 15 semanas de gestación), pero en el adulto ya no se encuentran presentes (Sambuy, De Angelis et al. 2005).

Los cultivos de Caco-2 son morfológicamente heterogéneos, se reporta expresión en mosaico de marcadores específicos de la función intestinal, como la de las enzimas hidrolasas, lo cual sugiere que la diferenciación morfológica y funcional no ocurre en paralelo. El proceso de diferenciación de

estás células solo empieza cuando las células alcanzan confluencia, con la expresión de marcadores morfológicos y bioquímicos de enterocitos absortivos. Cuando los cultivos se mantienen en subconfluencia las células Caco-2 se encuentran homogéneamente indiferenciadas, después de alcanzar la confluencia (día 0 al 20) se observan áreas de heterogénea diferenciación y polarización del epitelio. Los perfiles de expresión de genes, demuestran disminución en la expresión de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular, síntesis de ADN, procesamiento de ARN y traducción de proteínas; y aumento en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de fármacos y xenobióticos, transporte y metabolismo de lípidos, así como de la matriz extracelular (Vachon, Perreault et al. 1996; Mariadason, Arango et al. 2002).

Es uno de los modelos *in vitro* más relevantes para el estudio de diferenciación y regulación de la función intestinal, pero como estas células se cultivan normalmente en presencia de 15-20% de suero, se dificulta la identificación de los factores involucrados en la regulación de su proliferación y diferenciación. Sin embargo, se ha visto que el reemplazo del suero por insulina, transferrina y selenio en el medio es suficiente para conducir la diferenciación de estas células (Jumarie and Malo 1991).

La monocapa de células muestra una polaridad funcional que se manifiesta por la formación de domos de estas células en confluencia, donde hay flujo unidireccional de iones y agua. Además las células diferenciadas expresan receptores para factores de crecimiento y otros con función de transporte. Se ha descrito que a pesar de que Caco-2 exhibe una mejor diferenciación enterocítica morfológica y funcional comparado con otras líneas de carcinoma, tras la confluencia coexisten características de enterocitos y colonocitos (Engle, Goetz et al. 1998). Para monitorear la funcionalidad de la monocapa después de la confluencia, es posible medir la resistencia eléctrica trans-epitelial así como la permeabilidad a ciertas moléculas marcadoras. En adición, es posible verificar la morfología ultra-estructural a través de microscopía de transmisión de electrones.

Las células Caco-2 diferenciadas expresan EGF (factor de crecimiento epidermal), receptor de vitamina D, IGF-I (factor de crecimiento tipo insulina) éste último asociado con un incremento en su capacidad para proliferar en cultivo. Además, secretan NGF (factor de crecimiento de nervios), medio proveniente de estas células diferenciadas induce el crecimiento de neuritas de neuronas en cultivo, lo cual sugiere que estas células intestinales pueden inducir su propia inervación *in vivo*

(Sambuy, De Angelis et al. 2005).

Cuando Caco-2 se cultiva sobre un soporte, como son los filtros semipermeables que permiten el libre acceso de iones y nutrientes por ambos lados de la monocapa, las células consiguen mejor diferenciación morfológica y funcional, por lo que ha sido ampliamente utilizado como modelo fisiológico de transporte intestinal y para estudios de toxicidad (Hidalgo, Raub et al. 1989; Artursson 1990). Una de las diferencias funcionales entre el epitelio intestinal humano normal y Caco-2, es la falta de expresión de las isoenzimas del citocromo P450 en particular, CYP3A4, que se expresa de forma abundante en el intestino (van Breemen and Li 2005).

- **Diferenciación inducida por tratamiento con butirato de sodio**

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs por sus siglas en inglés) son producto de la fermentación bacteriana de las fibras de la dieta en el colon. Los productos finales principalmente son acetato, propionato y butirato. Los SCFAs se absorben una parte por difusión pasiva y la mayor parte a través de proteínas transportadoras, el butirato es la principal fuente de energía de los colonocitos, el propionato es asimilado por el hígado y el acetato entra a circulación periférica donde es metabolizado por los diferentes tejidos (Wong, de Souza et al. 2006).

El butirato ha sido estudiado ampliamente por sus efectos sobre las células cancerosas: induce diferenciación celular e inhibe su proliferación, sugiriendo su papel como anticarcinógeno. Sin embargo, también es fundamental en el desarrollo normal del colon. La disminución de las fuentes de carbohidratos en el colon distal conduce a la fermentación de proteínas, la cual es menos favorable la formación de productos tóxicos. Estos productos tóxicos junto con la baja disponibilidad de SCFAs en el colon distal se ha propuesto que está relacionado con desordenes gastrointestinales como colitis ulcerativa y cáncer (Chen, Faller et al. 2003; Vanhoutvin, Troost et al. 2009).

El butirato tiene efecto en rangos milimolares de concentración, cuando se adiciona a los cultivos de células tumorales produciendo muchos cambios morfológicos y bioquímicos los cuales son reversibles una vez que se remueve del medio. Algunos de los cambios ocurren en todas las líneas celulares cancerosas que se han estudiado (HT-29, SW-48, SW-403, SW1116, Caco-2, KATO-III, DLD-1, LS-174T) pero otros efectos varían por el tipo de células que son tratadas (Kruh 1982).

El butirato modifica de manera importante la morfología de las células, usualmente produce un alargamiento de las células con la aparición de protusiones. En células HCT (hepatoma de rata) hay alteración de los nucléolos y el núcleo. Los cambios morfológicos resultan al menos en parte de modificaciones en el citoesqueleto: inducción de vimentina y citoqueratina, formación de microfilamentos, de microtúbulos y fibras de actina. También hay cambios en las glicoproteínas de la superficie y los gangliosidos de la matrix externa (Kruh, Defer et al. 1992).

El butirato es el más potente de los SCFAs en inhibir la proliferación, su acción es dosis dependiente en todas las líneas tumorales estudiadas, así como en una línea epitelial no tumoral de rata (IEC-6). A bajas concentraciones (0.05-0.1 mM) butirato estimula parcialmente la proliferación celular. Pero a concentraciones ≥ 1 mM inhiben la proliferación de una forma dosis dependiente.

Avances recientes en biología molecular indican que butirato ejerce su efecto activando la transcripción de genes específicos, además inhibe la actividad de desacetilasas de histonas, con lo que facilita la unión de factores de transcripción sobre el ADN. Disminuye la expresión de genes asociados con proliferación y estrés oxidativo pero aumenta genes de mucina, uniones estrechas así como del transportador de monocarboxilatos (MCT1), se ha visto que bloquea la traslocación al núcleo de NF- κ B, por lo tanto previene la activación de genes pro-inflamatorios. También incrementa la expresión del oncogen *c-Fos* e inhibe la expresión de *c-Myc*. En general, induce la expresión de marcadores de diferenciación celular como isoenzimas intestinales: fosfatasa alcalina, dipeptidil peptidasa IV, sacarasa isomaltasa y lactasa. Por medio de análisis de expresión de microarreglos de ARN de individuos sanos tratados con butirato se han identificado alrededor de 500 genes modulados diferencialmente, en general se ha encontrado activación trascricional de vías de oxidación de ácidos grasos, cadena de transporte de electrones, estrés oxidativo así como regulación diferencial de genes relacionados a la integridad de los epitelios y apoptosis (Vanhoutvin, Troost et al. 2009).

Induce arresto del ciclo celular en G1 de forma dependiente de p21, promueve diferenciación y finalmente muerte celular programada. El arresto en G1 es muy general y se ha utilizado para sincronizar el crecimiento de cultivos (Gupta, Alpini et al. 1994). Sin embargo, en algunas líneas celulares como en Caco-2 o SW1116, el butirato de sodio (NaB) induce un bloqueo en la fase G2.

Promueve la expresión de p21 tanto a nivel de proteína y ARNm pero no modifica la de p16 o p27. A pesar de inducir arresto del ciclo celular se ha visto que NaB aumenta la expresión de ciclina D3 aunque D1 no cambia. No tiene efecto sobre otros reguladores del ciclo como cdk4, cdk6, ciclina B ni E. El mecanismo por el cual induce apoptosis en células epiteliales se relaciona con la hipofosforilación de Rb en presencia de butirato (Coradini, Pellizzaro et al. 2000; Pellizzaro, Coradini et al. 2001).

El efecto de NaB en la activación de p21 es directo sobre el promotor del gen y depende de 2 sitios de unión para factores de transcripción de la familia Sp, además es dependiente de p53. El tratamiento con tricostatina A, un inhibidor específico de desacetilasas de histona (HDACs) y no relacionado estructuralmente al NaB, demostró que la inducción de p21 es consecuencia directa de la inhibición de estas enzimas. El mecanismo específico de los inhibidores de HDACs en la transcripción de p21 se identificó al encontrar que HDAC4 interactúa a través de Sp1 con el promotor de p21, formando complejos co-represores de su transcripción (Mottet, Pirotte et al. 2009).

2.14 SERCA Y SU POSIBLE USO EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER

Para la terapia contra las células cancerosas se han utilizado dos estrategias para modular las $[Ca^{2+}]$: (1) dirigir un fármaco o mediante ARN interferente en contra de una isoforma específica de SERCA que esté inducida o reprimida en células cancerosas, (2) inducir estrés general del RE depletando la $[Ca^{2+}]$ dentro del mismo (Denmeade and Isaacs 2005).

Un ejemplo de la primera estrategia es provisto por el profármaco derivado de la taspigargina desarrollado para el tratamiento del cáncer de próstata. La taspigargina es un inhibidor general de SERCA que induce la depleción completa del Ca^{2+} del RE y conduce a la célula a apoptosis. Para dirigir el tratamiento en contra de las células cancerosas, éste fármaco ha sido acoplado a un péptido para producir un profármaco inactivo que sólo es activado por proteasas específicas que secretan las células tumorales de próstata como el antígeno específico de próstata que posee actividad de proteasa de serina (Denmeade, Jakobsen et al. 2003).

Para la segunda estrategia dado que SERCA3 está reprimida en células de cáncer de colon, la

sobre-expresión de SERCA3 en estas células puede ser de valor terapéutico. Por otro lado, es difícil dirigir una terapia específica basado en sobre-expresar a la proteína SERCA2, que se encuentra disminuida en los pacientes con enfermedad de Darier y en cáncer de tiroides, ya que la isoforma 2b se expresa de forma ubicua y su efecto en los demás tipos celulares es impredecible. De forma general, el entendimiento de la participación de la bomba SERCA en la homeostasis del calcio es muy importante para comprender su participación dentro del proceso carcinogénico y en el desarrollo normal de las células epiteliales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ión Ca^{2+} modula múltiples procesos en el interior de la célula que determinan su destino y existen diferentes mecanismos que mantienen su homeostasis. Actualmente se conoce que la bomba SERCA3 se encuentra disminuida en diferentes procesos neoplásicos, lo cual está en estrecha relación con la pérdida de diferenciación de los tejidos afectados; y aunque es posible aumentar la expresión de SERCA3 mediante la inducción a diferenciación de líneas celulares cancerosas *in vitro*, se desconoce si dicha inducción ocurre a nivel de la transcripción del gen *ATP2A3*, lo cual coadyuvará al mejor entendimiento del (los) mecanismo(s) por el (los) cual(es) se restablece su expresión al adquirir un fenotipo diferenciado.

4. HIPÓTESIS

Los cambios de expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* durante los procesos de diferenciación en células de cáncer gástrico y de colon son resultado de la regulación de su expresión por mecanismos epigenéticos, como los mediados por desacetilasas de histonas e hipermetilación del ADN del promotor y/o transcripcionales, mediados por factores de transcripción.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del ARNm de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares humanas de carcinoma gástrico y de colon durante la inducción de diferenciación.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Cultivar líneas celulares: KATO-III carcinoma gástrico de humano, Caco-2 adenocarcinoma de colon humano, 112-CoN colon “normal” humano y IEC-18 colon “normal” de rata.
- Obtener colon normal de ratón y muestras de mucosa gástrica normal de humano para ser usados como control.
- Inducir un fenotipo diferenciado de las células cancerosas indiferenciadas KATO-III con fármacos: butirato y gliceril tributirato de sodio.
- Realizar cultivos post-confluentes de Caco-2 para obtener células con un fenotipo diferenciado inducido por confluencia celular.
- Realizar tratamientos de los cultivos celulares de KATO-III con diferentes tratamientos: inhibidores de desacetilasas de histonas (butirato de sodio, gliceril tributirato, tricostatina A y ácido valproico); un agente hipometilante (5-azacitidina); un inhibidor de proteínas fosfatasas (ácido okadaico); y un inhibidor de transcripción de genes dependientes de factores de transcripción que se unen a secuencias ricas en G+C (mitramicina A).
- Evaluar por qRT-PCR en tiempo real los niveles de ARNm de cada una de las isoformas de SERCA2a, b y c (*ATP2A2*); y de forma general las de SERCA3 (*ATP2A3*).

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Cultivos celulares

Se trabajó con tres líneas celulares humanas: cáncer gástrico KATO-III, adenocarcinoma de colon Caco-2 y colon “normal” 112-CoN; y una de colon “normal” de rata IEC-18, todas de ATCC (*American Type Culture Collection*) fueron descongeladas y mantenidas en medio de cultivo IMDM, EMEM, concentración de suero 20% para las tumorales y 10% para las de colon normal; y 5% de CO₂ a 37°C, conforme a las recomendaciones del proveedor.

Muestras de tejido normal

Las muestras de tejido gástrico normal de humano se obtuvieron por endoscopia, tomadas por el gastroenterólogo que seleccionó áreas donde no había daño aparente. Se colectó tejido de cuatro pacientes diferentes, M2 a M5, de cada uno de ellos el gastroenterólogo tomó entre 2 a 3 biopsias (una biopsia corresponde al material que toma el endoscopio cada vez, que corresponde aproximadamente al tamaño de un grano de arroz). Las biopsias se colocaron en tubos y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido. Para la purificación de ARN total se tomó 1 o 2 biopsias y se hizo de acuerdo al protocolo descrito para el Trizol, homogenizando con un politron.

La muestra de epitelio normal de colon de ratón se obtuvo mediante disección de un par de ratones de 100 mg de peso promedio. Se tomó una porción del colon (aproximadamente 1 cm), el cual se colocó en solución Ringer a 37°C, se retiró la materia fecal, se realizó un corte longitudinal y se lavó dos veces en la misma solución. En la misma solución limpia, se raspó el tejido con ayuda de unas pinzas hasta desprender las células del epitelio intestinal, las cuales se colectaron mediante centrifugación. Una vez retirado el sobrenadante se adicionó de inmediato 1 mL de Trizol, se homogenizó con una pipeta y mediante centrifugación se retiraron los restos celulares para proceder con la extracción de ARN conforme a lo descrito.

Tratamientos Farmacológicos

Los cultivos se sometieron a tratamientos químicos cuando alcanzaron una confluencia del 80%, utilizando los siguientes compuestos: butirato de sodio (Fluka 19364, 99%), gliceril tributirato

(Sigma T8626), tricostatina A (Sigma T8552), mitramicina A (Sigma M6891, 99.59%), 5-azacitidina (Sigma A2385), ácido valproico (Sigma P4543), ácido okadaico (Alomone O900). De cada uno de ellos se prepararon stocks diluyéndolos en agua o en dimetil sulfóxido (DMSO Sigma D8418, 99.9%) conforme a sus características de disolución. Se tomaron en cuenta reportes previos para probar la concentración de cada agente además se realizó una curva para evaluar su efecto. Cada experimento se realizó a las concentraciones y durante el periodo que se indican más adelante, cada uno por duplicado y añadiendo el vehículo al control del tratamiento aplicado.

Ensayos de viabilidad celular

En el tratamiento de KATO-III con diferentes agentes a intervalos de concentración variada se observó que concentraciones elevadas de un tratamiento en específico resultaba en pronunciada muerte de las células en tratamiento, por ello se determinó la viabilidad de las células en cultivo mediante método colorimétrico utilizando el kit CellTiter 96 AQueous Cell Proliferation Assay (Promega G3582).

Purificación de ARN total y qRT-PCR tiempo real

Se realizó la extracción de ARN total por método orgánico con Trizol (Invitrogen 15596-018) como lo indica el fabricante, se evaluó la calidad del mismo mediante análisis en gel desnaturizante de agarosa y se cuantificó por método espectrofotométrico con la relación de absorbancia 280/260 nm mayor o igual a 1.8 como ARN de buena calidad. Se tomó 1 µg de ARN total para la síntesis de cADN mediante reacción de transcripción reversa con la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen 28025-013) a un volumen final de 20 µL. Posteriormente, para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en los cultivos celulares, se realizó amplificación de los genes de interés (*ATP2A2* y *ATP2A3*) mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) a través de cuantificación relativa con SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen 11761) normalizando cada muestra contra un gen de expresión ubicua (β -actina y gliceraldehído 3'-fosfato deshidrogenada (*GAPDH*)) en un equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). La secuencias de los cebadores que se utilizaron para la amplificación se muestran en la Tabla 2. Para amplificar las diferentes isoformas de SERCA2 se utilizó un cebador

específico para cada isoforma y uno común para todas ellas (SERCA2 F). Para amplificar SERCA3 se flanqueo una porción del ARNm que es común en todas las isoformas (a-f). Las isoformas se amplificaron utilizando secuencias específicas por especie como lo indica el nombre de los cebadores, sin embargo los de rata reconocen las mismas secuencias del ratón.

Tabla 2. Secuencia de los primers utilizados para el qRT-PCR

Nombre del primer	Secuencia 5' -- 3'
hACTB F	TGAAGGTGACAGCAGTCGCTTG
hACTB B	GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC
hGAPDH F	TGCCCTCAACGACCACTTTG
hGAPDH B	TCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGC
hSERCA2 F	CGAACCTTGCCACTCATCTTC
hSERCA2a B	CGGTTACTCCAGTATTGCAGGTTCC
hSERCA2b B	TGCCGAGAACGAGCAGGATTTG
hSERCA2c B	TCCAGTATTGACAGCAGAGCAGG
hSERCA3 F	CAGGGGACATTGTAGAAGTGGC
hSERCA3 B	TGGTCACGGACACAGATTCACC
RatSERCA3 F	ACATTGTGGAAGTGGCAGTGGG
RatSERCA3 B	TTCTTGTCTGCTGGTTCACGGCTC
RatSERCA2b B	CAATGTTTAGGAAGCGGTTACTCC
RatSERCA2 F	GGCTGATGGTGCTGAAAATCTT
RatGAPDH F	GGAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC
Rat GAPDH B	TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG
RatSERCA2a B	CAATGTTTAGGAAGCGGTTACTCC

(F-forward; B-backward)

Análisis de los resultados de PCR tiempo real

Se obtuvieron los datos de amplificación por triplicado de cada una de las muestras, se convirtieron en logaritmo y se analizaron los valores de Ct (ciclo umbral o *threshold*) mediante el método de $\Delta\Delta Ct$, con datos de Ct con $SD \leq 0.3$ entre los triplicados de cada muestra procedente de dos experimentos realizados de forma independiente, utilizando la siguiente fórmula:

$$Expresión \frac{SERCA}{ACTB} = \frac{(Eficiencia_{SERCA})^{\Delta Ct_{SERCA} (Control-Tratado)}}{(Eficiencia_{ACTB})^{\Delta Ct_{ACTB} (Control-Tratado)}}$$

Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media de 2 experimentos independientes +/- error estándar (EE). Los valores fueron comparados con análisis de varianza (ANOVA) con el software Prism 4, aplicando la prueba de Dunnett que compara varios grupos contra el control. En las gráficas, el asterisco (*) denota valores estadísticamente significativos con $p < 0.01$ y el signo de número (#) denota valores con $p < 0.05$ comparados con el control correspondiente a cada experimento.

8. RESULTADOS

8.1 Cambios morfológicos de cultivos de la línea celular de carcinoma gástrico humano, KATO III, bajo inducción de diferenciación con SCFAs.

Con el objetivo de analizar el efecto de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs por sus siglas en inglés), butirato de sodio (NaB) y tributirato de glicerilo (TNaB) en la diferenciación, al cultivo de la línea celular humana de cáncer gástrico KATO-III en medio IMDM con 20% suero, se le adicionó ambos tratamientos por separado en concentraciones de 1, 2, 3 y 4 mM y se cultivaron durante 96 hrs. KATO-III son células esféricas que crecen tanto adheridas como suspendidas en el medio de cultivo, agrupadas en forma de racimos. Se observó que desde las 24 hrs de tratamiento, las células adheridas cambiaron a una forma alargada, el cual se acentuó y fue notable en casi todas células del cultivo conforme aumento el periodo de tratamiento. El cambio morfológico fue más pronunciado y temprano cuando se trataron con NaB, aunque también fue evidente con tributirato de glicerilo. Además, con la concentración más alta probada de cualquiera de estos ácidos grasos (4 mM) se observó una disminución de la cantidad de células en cultivo, que como se comenta más adelante no está relacionado a toxicidad del tratamiento sino al arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis ya reportado por parte del NaB. Ver Figura 9.

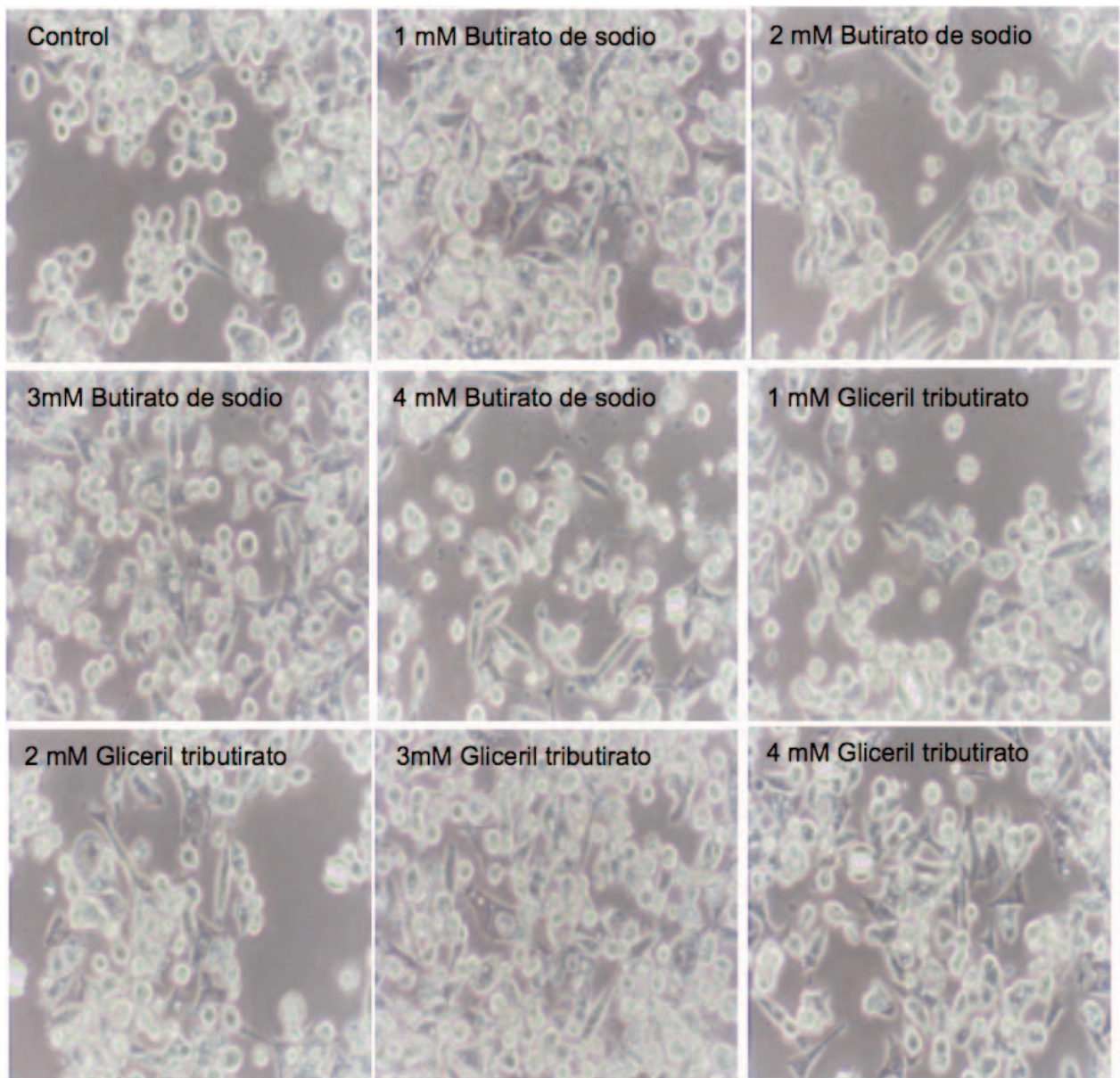


Figura 9. Inducción de la diferenciación de la línea celular KATO-III con SCFAs: butirato de sodio y tributirato de glicerilo. La concentración utilizada se muestra en cada foto, las células se cultivaron durante 96 hrs en medio IMDM con 20% de suero fetal bovino inactivado (SFBi), realizando cambios de medio con tratamiento fresco cada 24 hrs.

También se analizó el efecto de otros agentes farmacológicos sobre KATO-III, como el del agente hipometilante (5-azacitidina), un inhibidor de la transcripción de genes que dependen de factores de transcripción que reconocen sitios ricos en GC (mitramicina A), dos inhibidores específicos de desacetilasas de histonas (iHDAC's, tricostatina A y ácido valproico), un inhibidor de proteínas fosfatasa (ácido okadaico). Además se probó la combinación de éstos tratamientos con un tratamiento base de 2 mM de NaB. Cada tratamiento se adicionó sobre cultivos con 80% de confluencia, a las concentraciones que muestra la foto de la Figura 10, durante 48 hrs. El tratamiento con 5-azacitidina, se mantuvo durante 72 hrs ya que para ejercer su acción debe incorporarse en la secuencia de ADN.

El tratamiento con 5-azacitidina y mitramicina A no indujo cambios morfológicos notables en los cultivos de KATO-III. Sin embargo, el tratamiento con ácido okadaico en rangos picomolares de concentración indujeron cambios morfológicos en los cultivos de KATO-III, aunque no igual al observado con el NaB y el tributirato, ya que con ellos se observó que las células se alargaban, en tanto que con el ácido okadaico se observó que las células se hinchaban aunque conservaron su forma esférica. Con los iHDAC's (tricostatina A y ácido valproico), se apreció un cambio morfológico similar al visto con los ácidos grasos de cadena corta (NaB y tributirato de glicerilo) en estas células, aunque solo fue parcial, incluso con la concentración más alta de cada uno de ellos. Por ello, el cambio morfológico observado en KATO-III relacionado con la diferenciación celular que inducen el tratamiento con los ácidos grasos de cadena corta, también ocurre con los iHDACs. En los cultivos de KATO-III, también se realizaron combinaciones de alguno de los agentes ya mencionados con 2 mM de NaB, incluso se combinó tres y hasta cuatro agentes en un cultivo, observando que se conserva el cambio morfológico inducido por NaB. El tratamiento combinado con tres o cuatro agentes, al parecer resultó tóxico para estas células ya que disminuyen las células en el cultivo una vez transcurrido el periodo de tratamiento (ver Figura 10).

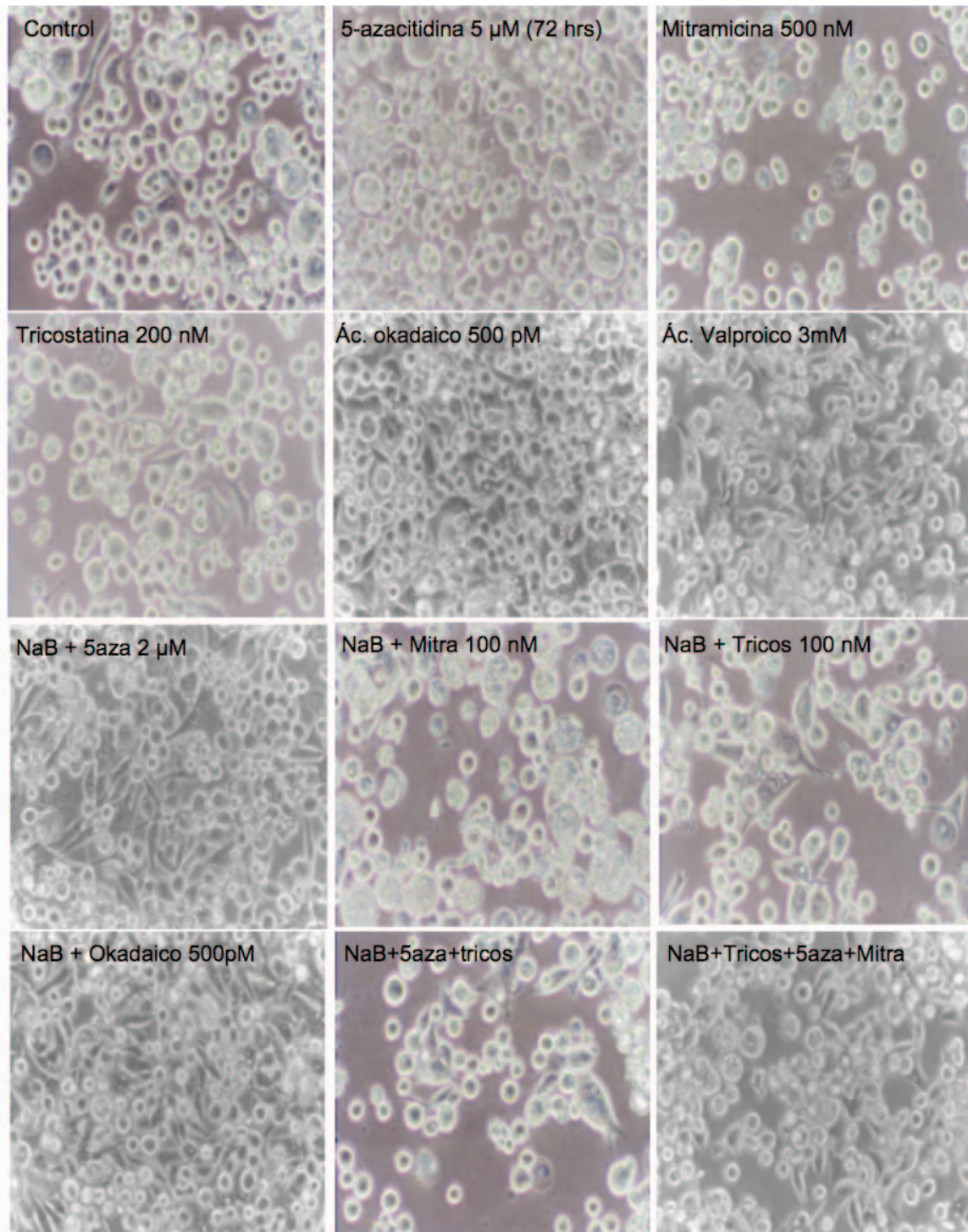


Figura 10. Tratamiento de células KATO III con diferentes fármacos. Las células se crecieron en medio IMDM al 20% de SFBi. Se muestran los cambios morfológicos en los cultivos, tras la adición de agentes farmacológicos con distintas actividades. La concentración utilizada se indica en la foto. En los tratamientos combinados se utilizó 2 mM de butirato de sodio además del agente que indica la foto. Todos los tratamientos se realizaron durante 48 hrs a menos que lo indique la foto, realizando cambio de medio con tratamiento fresco cada 24 hrs.

8.2 Análisis de la viabilidad celular de los diferentes tratamientos aplicados sobre KATO-III

Con el objetivo de investigar el efecto de los diferentes tratamientos utilizados sobre la viabilidad celular de la línea celular KATO-III, y determinar que ésta no influya en los datos de expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* que se analizan más adelante, se determinó la viabilidad de los cultivos con los diferentes tratamientos y concentraciones ya mencionadas, mediante el kit CellTiter de Promega. El tratamiento de estas células con mitramicina A, fue el que redujo la viabilidad celular en mayor medida, sin embargo, esta disminución fue de menos del 15% (ver Figura 11). La viabilidad de KATO-III con los diferentes tratamientos utilizados así como las combinaciones entre tres y hasta cuatros agentes no disminuyó más de éste porcentaje, por ello no se muestran.

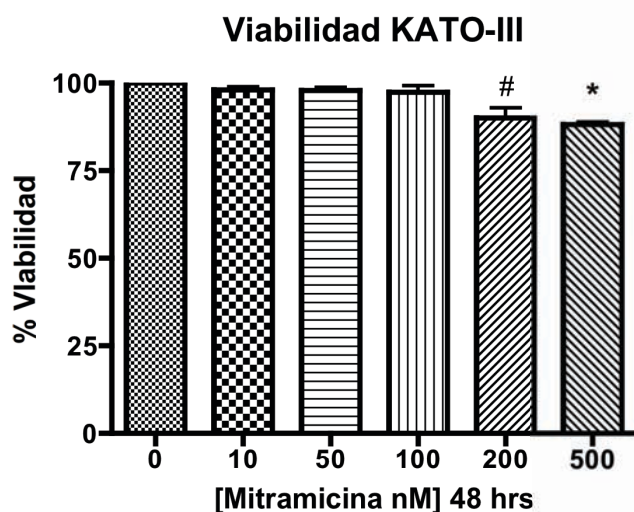


Figura 11. Viabilidad celular de KATO-III tratadas mitramicina A. La viabilidad se determinó con el kit CellTiter de Promega que correlaciona la incorporación de una sal que al ser metabolizada por las células lo transforma en formazan, cuya absorbancia se determinó a 490 nm. (# $P < 0.05$ y * $P < 0.01$ las barras representan +/- EE de dos experimentos independientes)

8.3 Análisis de cambios morfológicos en cultivos de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 durante su diferenciación por confluencia.

Caco-2 es una línea celular humana de adenocarcinoma de colon que está descrito pasa por diferenciación espontánea tras 22 días en cultivo confluyente y crecen adheridas a la caja de cultivo. Cuando están en estado indiferenciado carecen de forma definida, tanto su membrana citoplasmática como la nuclear no se aprecian con claridad y crecen en conjuntos de 4-6 células que dan origen a nuevas células, conduciendo a la formación de pequeñas islas que incrementan cada vez en el número de células que las conforman. Esto provoca la interacción entre las células, llevando al arresto del crecimiento por un proceso conocido como inhibición por contacto. Se reporta que durante el proceso de diferenciación estas células establecen uniones adherentes con la células vecinas hasta formar una monocapa de células que conforman un epitelio funcional polarizado. Finalmente se aprecio que tanto las membranas citoplasmática y nuclear se definieron, así como los núcleos de cada una de las células, es decir hay un cambio evidente en la morfología de las células Caco-2 tras su diferenciación espontánea (ver Figura 12).

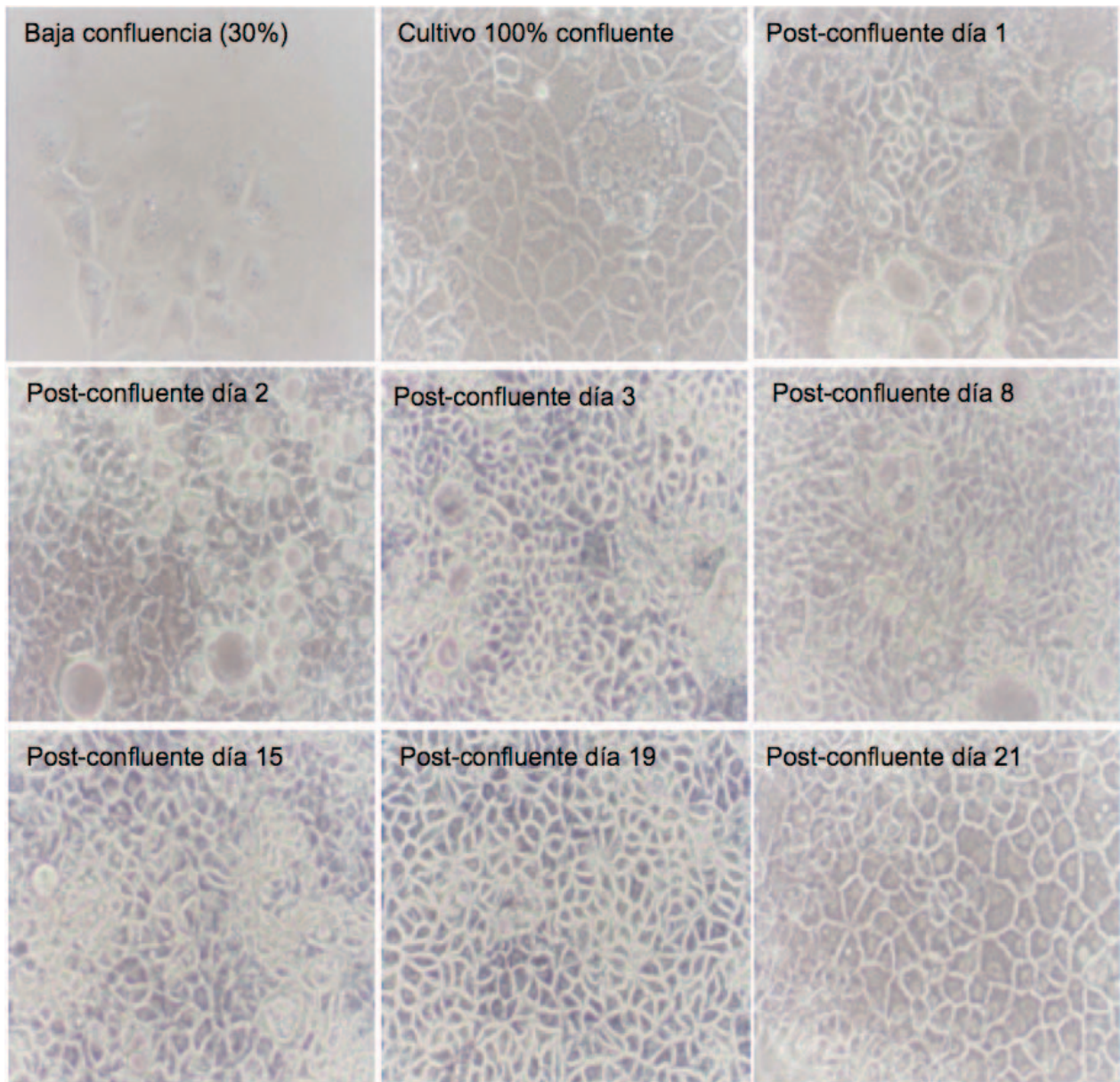


Figura 12. Diferenciación espontánea de Caco-2 en cultivos post-confluentes. El cultivo de células de adenocarcinoma de colon se realizó en medio de cultivo EMEM al 20% de SFBi, se mantuvo en cultivo durante 22 días, contados a partir de que el cultivo alcanzó el 100% de confluencia. En la diferenciación de Caco-2 se forma un epitelio polarizado, en la monocapa de células se forman estructuras denominadas domos a través de las cuales hay transporte activo de aniones y agua. Estos domos permiten que las células continúen proliferando por lo que se realizaron cambios de medio cada 24 hrs.

8.4 Expresión relativa de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en células de carcinoma gástrico, KATO-III, con diferentes tratamientos farmacológicos

Se realizó la detección de los niveles de expresión de ARNm de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* mediante q-RT-PCR en tiempo real, realizando tratamientos con las células de carcinoma gástrico KATO-III con agentes que inducen diferenciación celular como el butirato de sodio (NaB) y su análogo tributirato de glicerilo (TNaB). Se encontró que el tratamiento con 1 a 4 mM durante 96 horas indujo la expresión de *ATP2A3* o SERCA3, de manera concentración dependiente, siendo el máximo de 45 veces con la concentración 3 mM del tratamiento. En la inducción de la expresión de *ATP2A3* tras la diferenciación celular se observó que con la concentración más alta de cada tratamiento (4 mM) hubo una caída en su expresión, la cual se asocia con la disminución de células en proliferación activa por el arresto del ciclo celular y apoptosis reportado para el NaB, por esto se fijó en 2 mM la concentración para el resto de los ensayos como base para inducir diferenciación. Ver Figura 13.

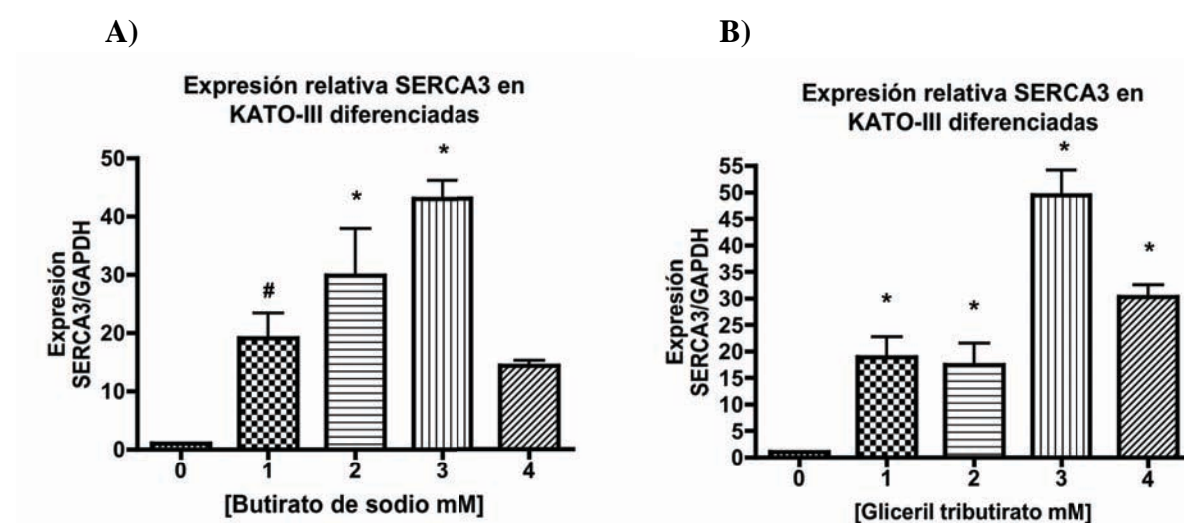


Figura 13. Expresión relativa de SERCA3 en células KATO-III diferenciadas con butirato de sodio y tributirato de glicerilo. Se usaron concentraciones de 1 a 4 mM de A) butirato de sodio (NaB) y B) tributirato de glicerilo (TNaB) durante 96 hrs de tratamiento. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados cada uno por triplicado y normalizados contra *GAPDH*. Las barras representan +/-EE, resultados significativos * $P \leq 0.01$ y # $P \leq 0.05$

Se determinaron de manera específica las tres isoformas del ARNm que produce el gen *ATP2A2* (SERCA2 a, b y c) mediante primers específicos para cada una de ellas. En el análisis de la expresión de estas isoformas se observó que hay una disminución significativa de la isoforma 2a en más del 0.6 veces con la concentración 4 mM de NaB, en tanto el tratamiento con tributirato de glicerilo la disminuye en 0.5 veces desde 1 mM. De forma contraria se encontró un aumento de 0.3 veces en la isoforma 2c pero sólo con la concentración de 1 mM de NaB, mientras que el tratamiento con TNaB no produjo cambios significativos en la expresión de esta isoforma. El análisis de expresión de la isoforma de expresión ubicua, 2b no cambió de manera significativa con las diferentes concentraciones de NaB y TNaB utilizadas para inducir diferenciación; solo se vio una ligera disminución en esta isoforma con 1 mM de TNaB en aproximadamente 0.2 veces ($P \leq 0.05$), aunque con un aumento en su concentración ya no hubo cambios. Ver Figura 14.

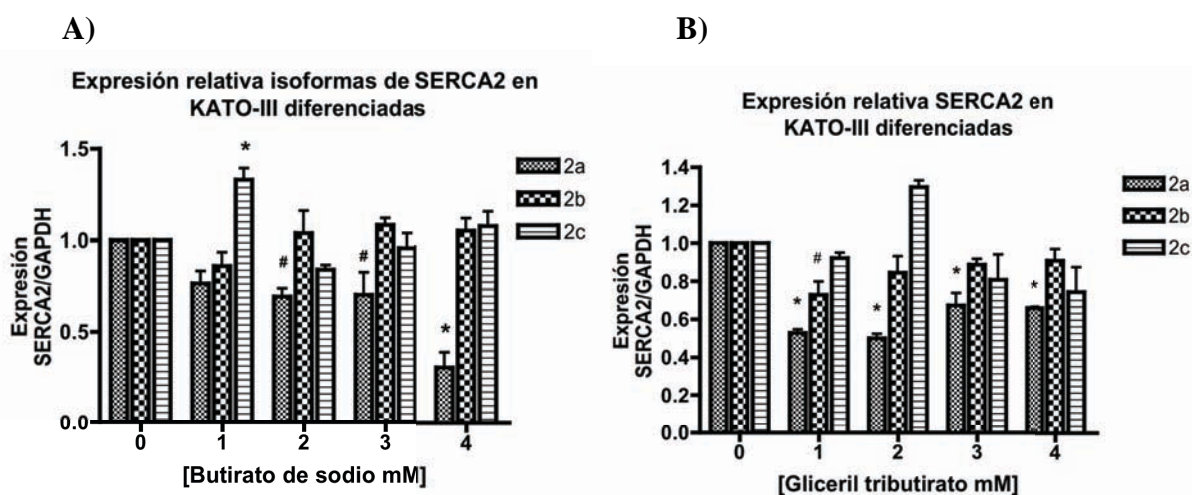


Figura 14. Expresión relativa de las isoformas de SERCA2 (a, b y c) en células KATO-III diferenciadas con butirato de sodio y tributirato de glicerilo. A) butirato de sodio (NaB) y B) tributirato de glicerilo (TNaB), 1 a 4 mM durante 96 hrs de tratamiento. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra *GAPDH*. Las barras representan \pm EE, resultados significativos * $P \leq 0.01$ y # $P \leq 0.05$.

Los mecanismos conocidos para inducir diferenciación por parte del butirato de sodio ocurre sobre múltiples blancos celulares: inhibición de desacetilasas de histonas (HDAC's); modulación de la activación de cinasas de tirosina y serina/treonina, así como de su contraparte, las proteínas fosfatasas; la de la proteína cinasa A (PKA); modulación de factores de transcripción como Sp1 y

Sp3, entre otros. Por ello, para delimitar el blanco de acción del butirato sobre la inducción del gen *ATP2A3* en células KATO-III, se realizaron tratamientos con inhibidores específicos de cada una de estas vías.

Utilizando dos inhibidores específicos de HDAC's: tricostatina A y ácido valproico, se encontró que con ambos hay inducción específica de la expresión de ARNm de *ATP2A3*. Ácido valproico incrementó su expresión aproximadamente 18 veces, en tanto que tricostatina A la indujo hasta 46 veces, consiguiendo igualar la expresión obtenida con NaB o TNaB. Esto sugiere que la actividad de las HDAC's es el principal mecanismo a través del cual se encuentra reprimida la expresión de *ATP2A3* en estas células tumorales y por lo tanto la inhibición específica de estas enzimas permite la transcripción específica del gen. Ver Figuras 15A y 16A.

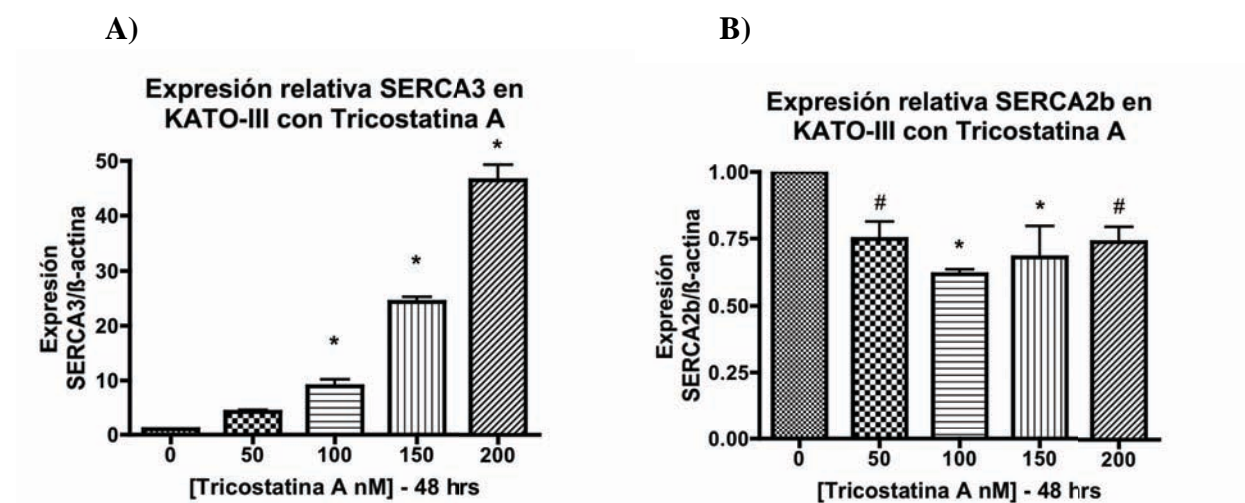


Figura 15. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III con un inhibidor de HDAC's -Tricostatina A. Tratamiento con tricostatina A, durante 48 hrs: A) SERCA3 y B) SERCA2b. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra β -actina. Las barras representan +/-EE, resultados significativos * $P \leq 0.01$ y # $P \leq 0.05$

A diferencia de *ATP2A3*, la expresión de la isoforma ubicua SERCA2b mostró una disminución significativa en su abundancia después del tratamiento con los inhibidores específicos de HDAC's, bajando hasta 40% con el tratamiento de ácido valproico 3 mM. Ver figuras 15B y 16B.

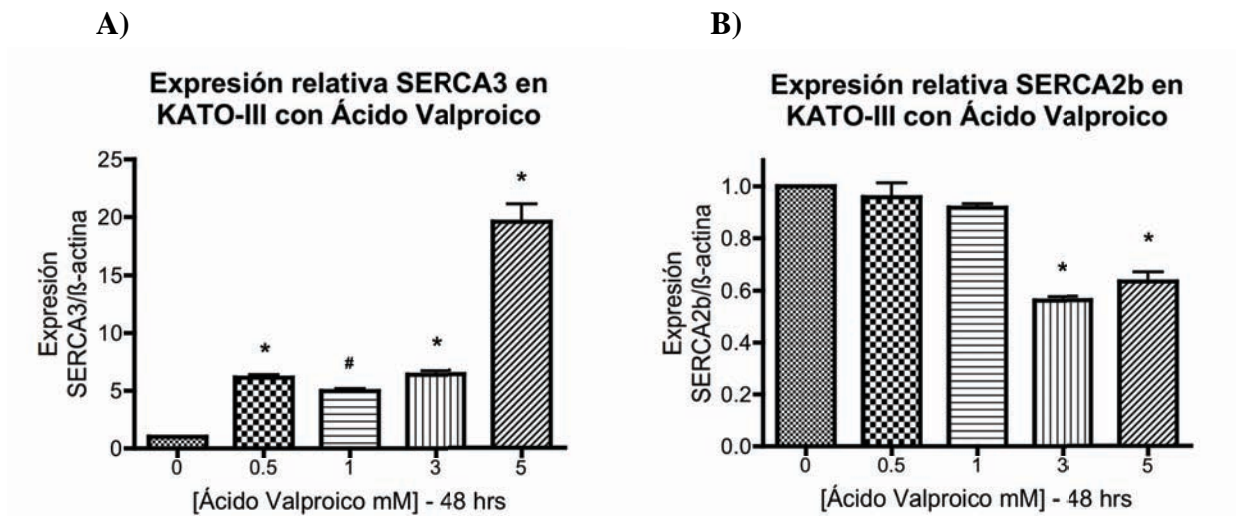


Figura 16. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III con un inhibidor de HDAC's - Ácido valproico. Tratamiento con ácido valproico, durante 48 hrs: A) SERCA3 y B) SERCA2b. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra β -actina. Las barras representan \pm EE, resultados significativos $*P \leq 0.01$

Para investigar el papel de secuencias ricas en C y G presentes en el promotor el gen *ATP2A3*, se usó el antibiótico mitramicina A, el cual se une a secuencias del ADN ricas en CG, bloqueando la transcripción de genes que dependen de la unión de factores de transcripción que reconocen este tipo de secuencias, como por ejemplo la familia de factores Sp. Usando la línea celular KATO-III se observó un incremento de hasta 6 veces en la expresión del gen *ATP2A3* el cual fue dosis dependiente, mientras que la expresión de SERCA2b solo aumentó ligeramente (1.4 veces), pero no fue estadísticamente significativo. La inducción en la expresión de SERCA3 fue moderada en comparación con el efecto de iHDAC's y butirato, pero sugiere que la regulación de la expresión de *ATP2A3* está influenciada por la acción de este tipo de factores de transcripción, mientras que la de *ATP2A2* no lo está. Ver Figura 17.

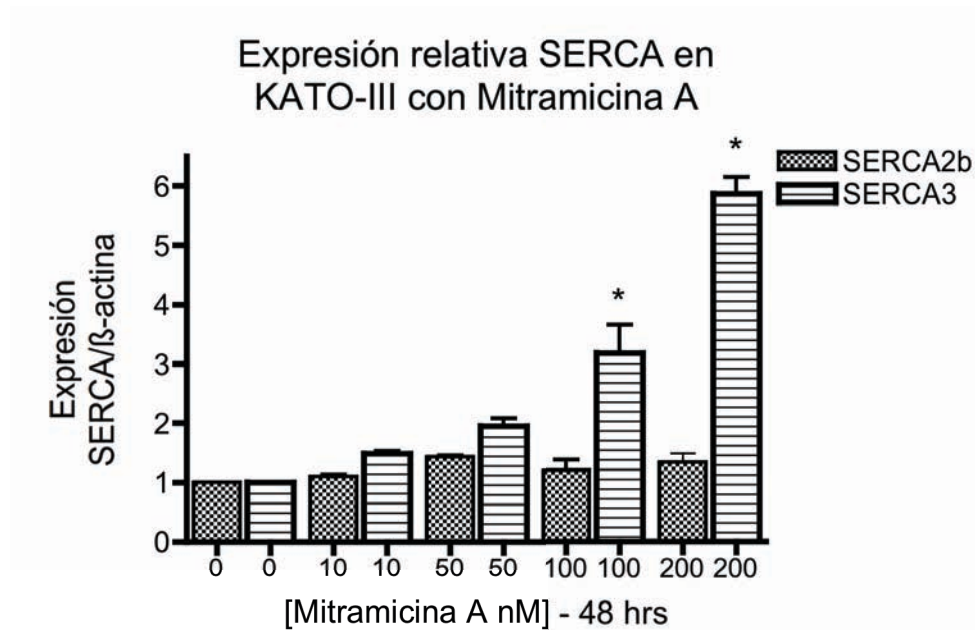


Figura 17. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III con un inhibidor de la transcripción dependiente de elementos ricos en GC - Mitramicina A. Tratamiento con mitramicina A, durante 48 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra β -actina. Las barras representan \pm EE, resultados significativos * $P \leq 0.01$ y # $P \leq 0.05$

En cáncer oral se ha reportado la disminución o pérdida de la expresión del gen *ATP2A2* tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares, la cual resulta de la hipermetilación de su región promotora. El promotor del gen *ATP2A3* también se encuentra inmerso dentro de una isla CpG y por lo tanto su expresión es susceptible de estar regulada por el mismo mecanismo que *ATP2A2*. Por ello se probó tratar las células tumorales KATO-III con un agente hipometilante como la 5-azacitidina, el cual es un análogo de la citosina que no puede ser metilado por lo que al incorporarse al ADN ya no recluta complejos co-represores, de tal forma que resulta en la activación de la transcripción génica. Al determinar el nivel de expresión de ARNm de *ATP2A3* con éste análogo se obtuvo un aumento hasta de 4 veces con la concentración de 5 μ M, en tanto la de *ATP2A2* se mantuvo sin cambios significativos. Por lo que en estas células de carcinoma gástrico, el mecanismo de silenciamiento por hipermetilación del promotor parece también participar en la regulación de la expresión del gen. Ver Figura 18.

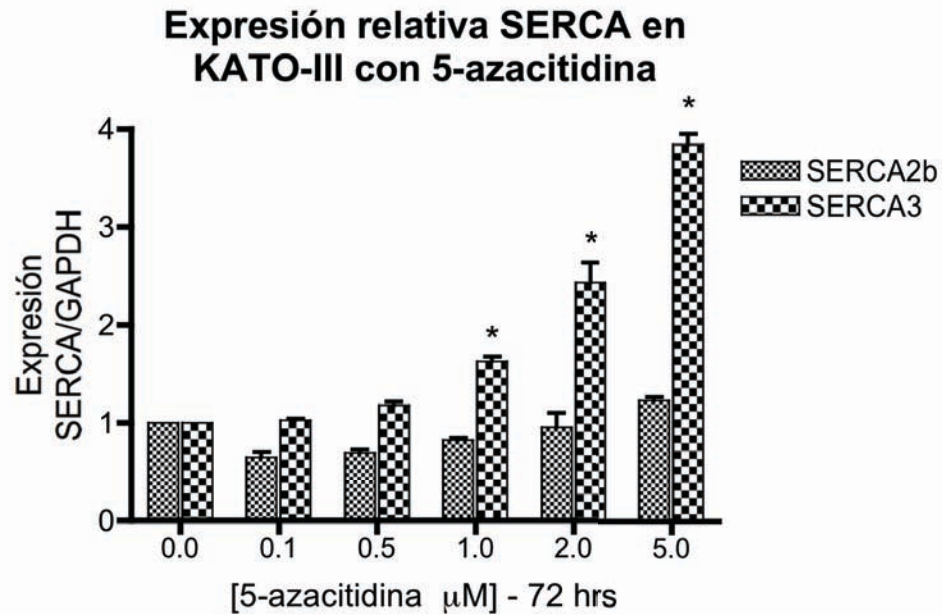


Figura 18. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III con un agente hipometilante - 5-azacitidina. Tratamiento con 5-azacitidina, durante 72 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra β -actina. Las barras representan \pm -EE, resultados significativos $*P \leq 0.01$

Para investigar el papel de proteínas fosfatasas en la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, usamos el ácido okadaico, que es un inhibidor de proteínas fosfatasas de treonina y serina (PP2A, PP1 y PP2B). Los resultados de la cuantificación de la expresión de las isoformas de SERCA3 y SERCA2b no mostraron cambios en los niveles de expresión de SERCA3 pero sí de SERCA2b, por lo que se descartó que la inducción en la expresión de SERCA3 se deba a activación de proteínas fosfatasa de treonina y serina. Sin embargo, es claro que estas enzimas sí modulan la expresión de SERCA2b. Ver figura 19.

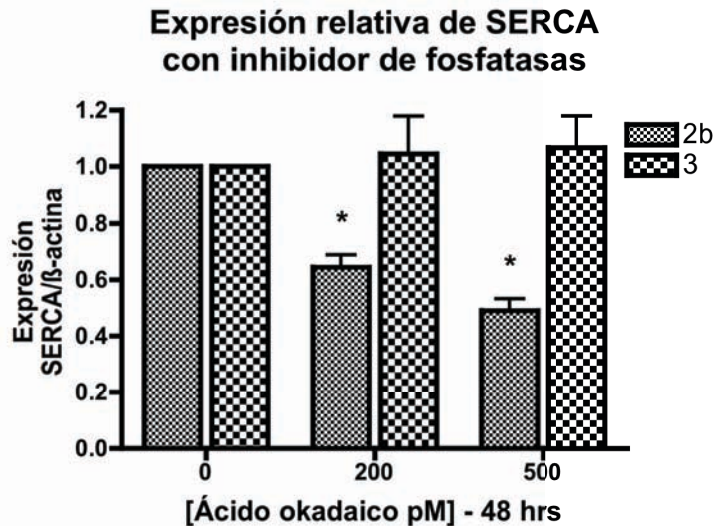


Figura 19. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III con un inhibidor de proteínas fosfatasa - Ácido okadaico. Tratamiento con ácido okadaico, durante 48 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra β -actina. Las barras representan \pm EE, resultados significativos $*P \leq 0.01$

Además, se realizaron combinaciones de los tratamientos anteriores manteniendo fija la concentración de butirato de sodio (2 mM), utilizando concentraciones intermedias de los demás tratamientos manteniendo cada combinación de tratamientos durante 48 hrs. Se encontró lo siguiente: el tratamiento solo con 2 mM de butirato de sodio (NaB) indujo la expresión de *ATP2A3* ~17 veces; pero cuando se combinó NaB con 5-azacitidina, prácticamente se mantuvo el efecto del NaB, es decir, un incremento de 18 veces. En tanto, el efecto individual de la 5-azacitidina es de solo 1.8 veces. Sin embargo, cuando se combinó NaB con tricostatina A o mitramicina A se observó que cada par desembocaba en un incremento superior en la expresión de *ATP2A3* del que inducían de forma individual, cada uno de ellos produjo un incremento de 8 y 3 veces respectivamente, pero cuando se adicionaron a los cultivos de KATO-III junto con NaB, hubo una inducción de hasta 60 veces. Por otro lado, la combinación de tres agentes, tricostatina A, 5-azacitidina además de NaB no condujo a la inducción de 60 veces obtenida con dos de los agentes (tricostatina A y NaB) sino de solo 23 veces, la cual se atribuye a que la 5-azacitidina eliminó el efecto sinérgico entre el NaB y la tricostatina A. Cuando se combinaron los cuatro tratamientos: mitramicina A, tricostatina A, 5-azacitidina y NaB, nuevamente se obtuvo la

inducción de 60 veces en la expresión de ARNm de *ATP2A3*, que al mismo tiempo resultó ser la inducción máxima vista de éste gen en las células KATO-III con los diferentes tratamientos probados. Ver figura 20.

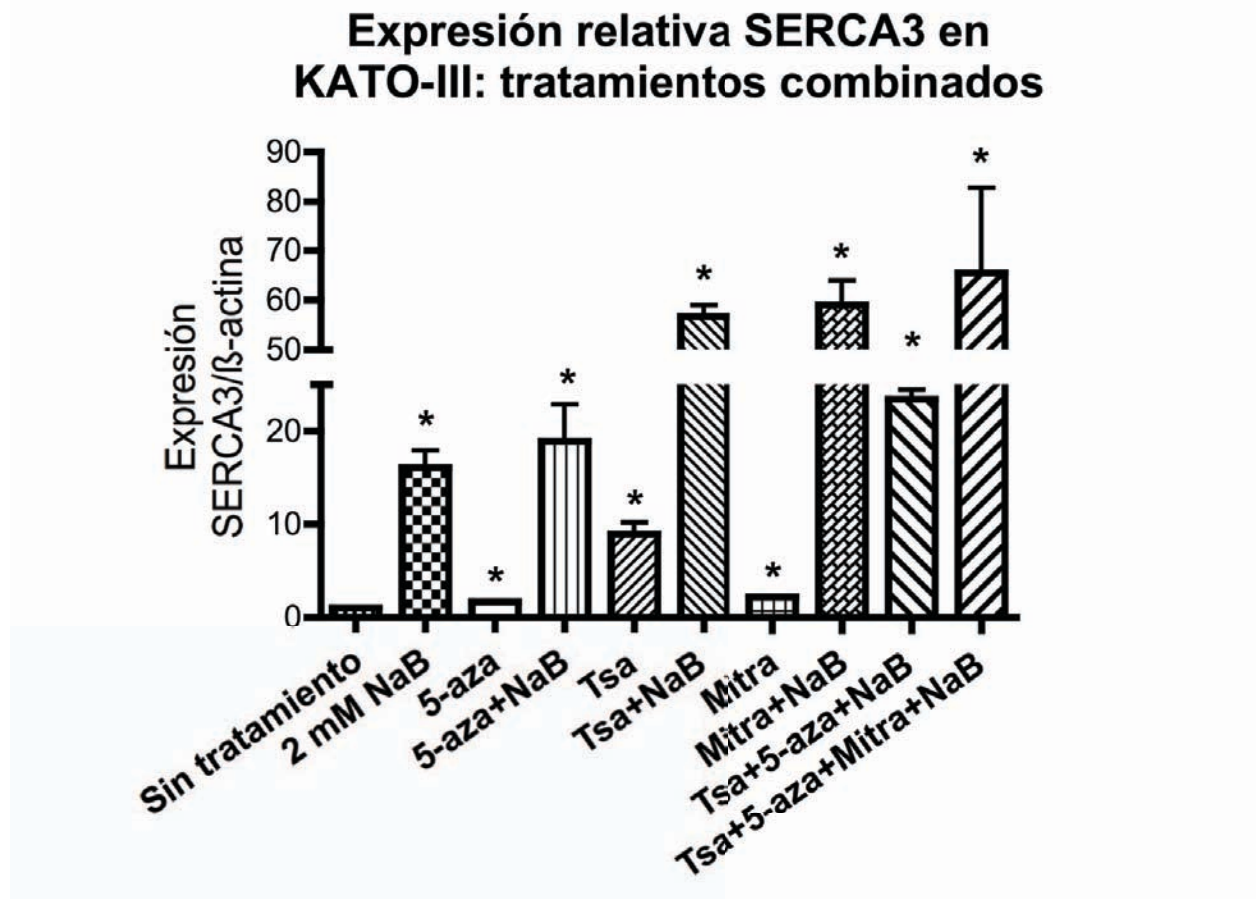


Figura 20. Efecto del tratamiento combinado de butirato de sodio con diferentes agentes en la expresión relativa de SERCA3 en KATO-III. Todos los tratamientos se realizaron durante 48 hrs. Butirato de sodio (NaB) 2 mM; 5-azacitidina (5-aza) 1 μM; tricostatina A (Tsa) 100 nM; mitramicina A (Mitra) 100 nM. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra β-actina. Las barras representan +/-EE, resultados significativos *P ≤ 0.01

Respecto a la expresión de SERCA2b comprobamos que el efecto individual de cada agente se mantuvo, es decir solos o en combinación conducen a la disminución parcial de su expresión o la mantuvieron sin cambios. El tratamiento de KATO-III con 2 mM de NaB o 5-azacitidina 1 μM solos o en combinación no produjo cambios significativos en la expresión de SERCA2b. En adición, el tratamiento con tricostatina A sola o en combinación con NaB sí resultó en la

disminución de aproximadamente un 40 a 50%, respectivamente. El tratamiento solo con mitramicina A produjo un incremento en la expresión de SERCA2b pero no fue estadísticamente significativo, mientras que la combinación con NaB resulta en la disminución de la mitad de su expresión. El resultado de la combinación de tres y cuatro agentes llevó a la disminución en la mitad de la expresión de SERCA2b. Ver figura 21.

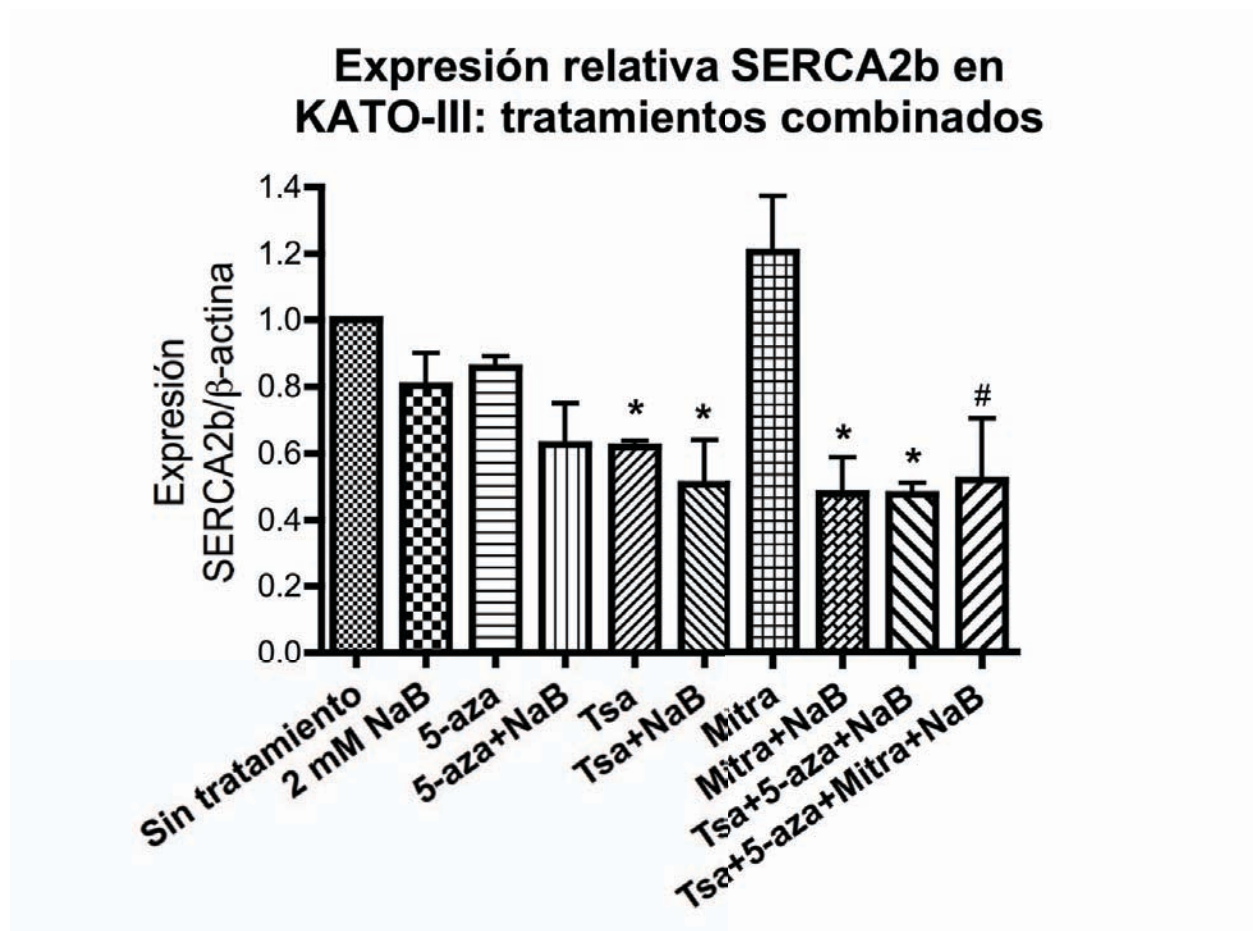


Figura 21. Efecto del tratamiento combinado de butirato de sodio con diferentes agentes en la expresión relativa de SERCA2b en KATO-III. Todos los tratamiento se realizaron durante 48 hrs. Butirato de sodio (NaB) 2 mM; 5-azacitidina (5-aza) 1µM; tricostatina A (Tsa) 100 nM; mitramicina A (Mitra) 100 nM. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra β-actina. Las barras representan +/-EE, resultados significativos *P≤ 0.01 y #P≤ 0.05

8.5 Análisis de la expresión de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 durante la diferenciación inducida por confluencia de la línea celular humana de adenocarcinoma de colon, Caco-2.

Utilizando cultivos post-confluentes de Caco-2 (adenocarcinoma de colon) como modelo de diferenciación espontánea inducida por confluencia celular, se analizó la expresión de SERCA2 y SERCA3 durante el proceso de diferenciación de estas células. Como control, se realizaron cultivos post-confluentes de células humanas de colon normal (112-CoN). Se encontró que durante el proceso de diferenciación de Caco-2 se incrementó la expresión de ARNm de SERCA3 de una forma muy pronunciada. Se observó además que la inducción fue muy temprana, desde que los cultivos alcanzaron el 100% de confluencia, se registro un incremento en la expresión de casi 10 veces comparado contra la expresión de las células en estado indiferenciado (30% de confluencia). Ver Figura 22.

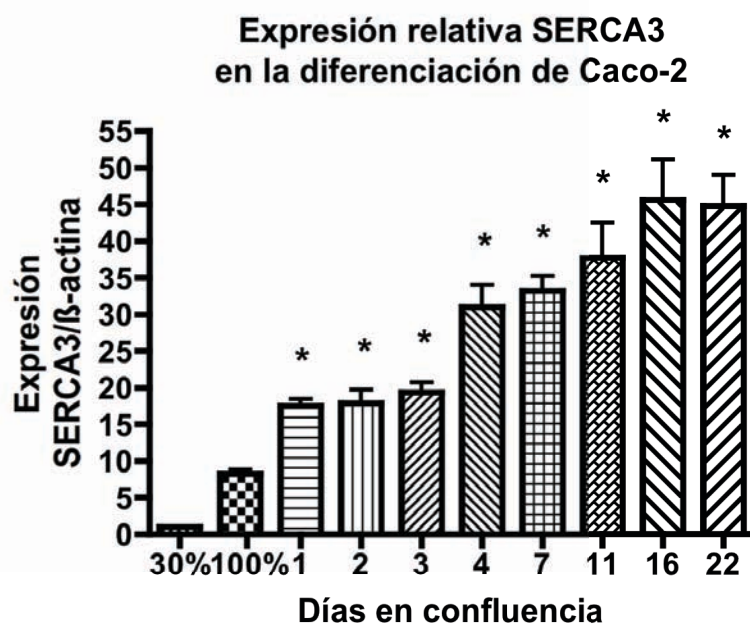


Figura 22. Expresión relativa de SERCA3 durante la diferenciación inducida por confluencia de Caco-2. Se analizó la expresión de células Caco-2 cultivadas en medio EMEM con 20% de suero: baja confluencia (30%); 100% de confluencia, desde el cuál se contaron los días en cultivo, tomando muestras en los días 1, 2, 3, 4, 7, 11, 16 y 22, realizando cambios de medio cada 48 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra la expresión de β -actina. Las barras representan +/-EE, resultados significativos * $P \leq 0.01$

El incremento en la expresión de SERCA3 en Caco-2 se mantuvo conforme aumentaron los días en cultivo, observando una inducción superior a 45 veces desde el día 16 y hasta los 22 días en confluencia, en el cual se reporta hay enterocitos funcionales.

Por otra parte, para descartar el efecto de la confluencia en la expresión de SERCA3, se cultivó una línea celular de colon normal humano, 112-CoN, la cuál se mantuvo en cultivo confluyente 22 días al igual que la línea tumoral. En el análisis de expresión de SERCA3 hubo una disminución significativa de hasta la mitad, que además fue muy temprana, desde los 4 días en cultivo confluyente, indicando que de forma normal la confluencia *per se* no induce la expresión de ARNm de *ATP2A3*, sino como resultado del proceso de diferenciación espontánea por el cual cursan las células Caco-2. Ver Figura 23.

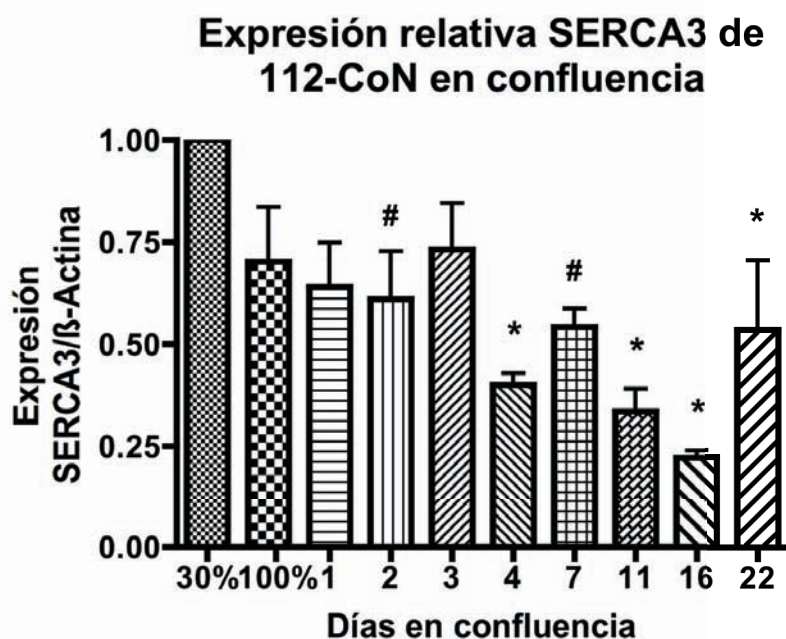


Figura 23. Expresión relativa de SERCA3 en la línea celular colon normal humano 112-CoN en cultivos post-confluentes. Las células se cultivaron en medio EMEM con 10% de suero: baja confluencia (30%); 100% de confluencia, desde el cuál se contaron los días en cultivo, tomando muestras en los días 1, 2, 3, 4, 7, 11, 16 y 22, realizando cambios de medio cada 48 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra la expresión de β-actina. Las barras representan +/-EE, resultados significativos * $P \leq 0.01$ y # $P \leq 0.05$

En el análisis de la expresión de las isoformas de SERCA2 (a, b y c) en las células de adenocarcinoma de colon Caco-2, se encontró que todas estas isoformas disminuyeron su expresión conforme aumentó el periodo de confluencia, observando solo un tercio de cada una de estas isoformas a los 16 días en confluencia. La expresión de la isoforma de expresión ubicua SERCA2b mostró primero un aumento significativo a 1.6 veces después de 1 día en confluencia, sin embargo después disminuyó su expresión como las otras dos isoformas, detectando 0.7 veces en el día 7 y 0.4 veces en el día 11. Ver Figura 24.

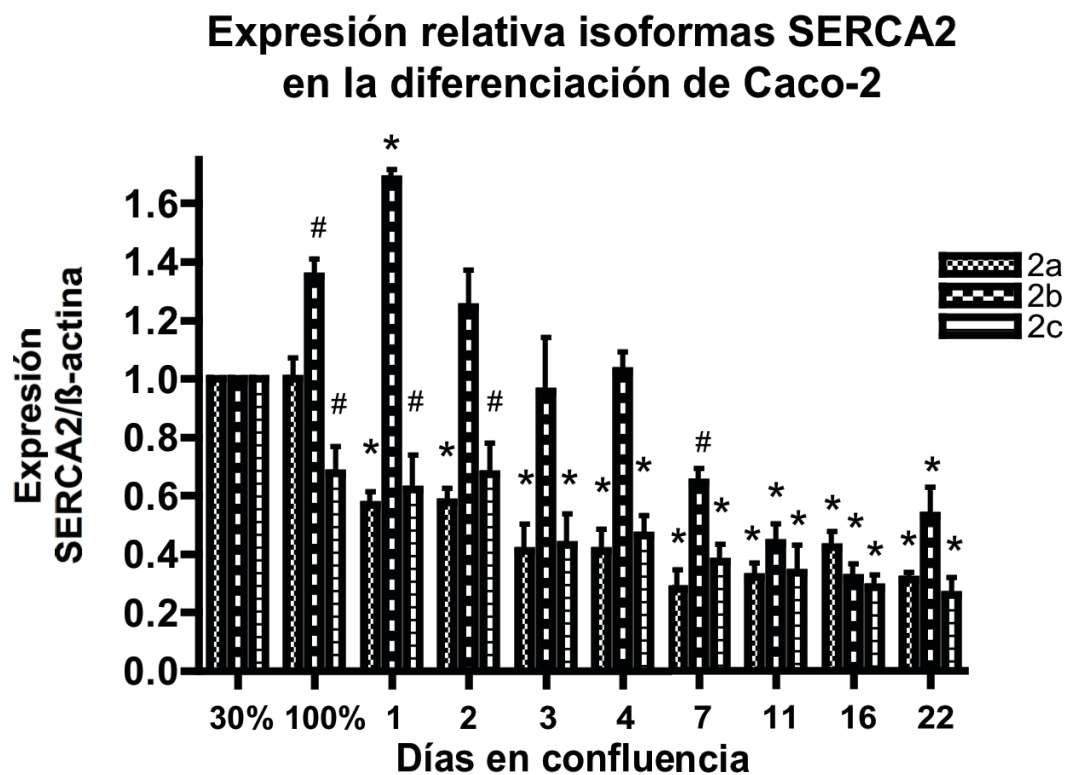


Figura 24. Expresión relativa de las isoformas de SERCA2 (a, b y c) durante la diferenciación inducida por confluencia de Caco-2. Las células de adenocarcinoma de colon humano se cultivaron en medio EMEM con 20% de suero: baja confluencia (30%); 100% de confluencia, desde el cuál se contaron los días en cultivo, tomando muestras en los días 1, 2, 3, 4, 7, 11, 16 y 22, realizando cambios de medio cada 48 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra la expresión de β -actina. Las barras representan \pm -EE, resultados significativos * $P \leq 0.01$ y # $P \leq 0.05$

Por otro lado, se analizó la expresión de las isoformas de SERCA2 (a, b y c) en células de colon normal humano 112-CoN. Se encontró un incremento en ~2 veces en las isoformas 2a y 2b, en tanto que la 2c mostró una disminución constante hasta la mitad durante los 22 días en cultivo confluyente. Por lo tanto, la disminución sostenida de las isoformas de la bomba SERCA2 en las células tumorales Caco-2, ocurren como consecuencia del proceso de diferenciación de la línea. Ver Figura 25.

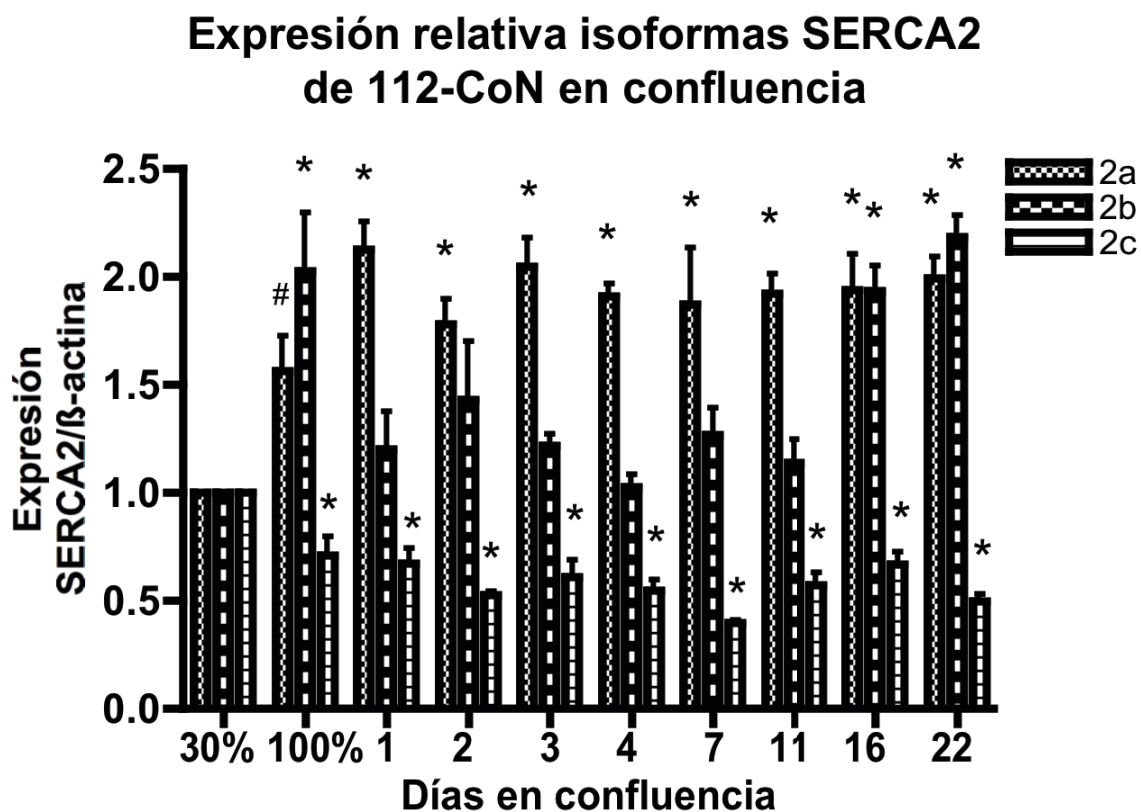


Figura 25. Expresión de las isoformas de SERCA2 (a, b y c) en la línea celular de colon normal humano 112-CoN en cultivos post-confluentes. Las células se cultivaron en medio EMEM con 10% de suero: baja confluencia (30%); 100% de confluencia, desde el cuál se contaron los días en cultivo, tomando muestras en los días 1, 2, 3, 4, 7, 11, 16 y 22, realizando cambios de medio cada 48 hrs. Los resultados son el promedio de dos experimentos individuales, determinados por triplicado y normalizados contra la expresión de β -actina. Las barras representan \pm -EE, resultados significativos $*P \leq 0.01$ y $\#P \leq 0.05$

8.6 Abundancia relativa de las isoformas de SERCA en líneas celulares y muestras de tejido normal de colon y mucosa gástrica.

Además del análisis relativo de la expresión de SERCA tras un proceso de diferenciación celular, los resultados crudos obtenidos de la amplificación por qRT-PCR en tiempo real reflejan la abundancia de cada ARNm en cada muestra cuantificada. Se determinó la expresión de las diferentes isoformas de SERCA2 (a, b y c) y SERCA3 en las líneas celulares humanas KATO-III (cáncer gástrico), Caco-2 (adenocarcinoma de colon), 112-CoN (colon normal); IEC-18 (colon normal de rata), así como en tejido normal de colon de ratón y mucosa gástrica de humano (4 muestras M2-M5) a través de qRT-PCR en tiempo real. La abundancia de cada ARNm se ve reflejada en el número de ciclos de amplificación (Ct's) necesarios para generar un producto, que se detecta por la fluorescencia emitida del SYBR green al intercalarse con el ADN generado. Debido a la cinética de la reacción de PCR la interpretación de un valor de Ct es opuesta, es decir a menor Ct mayor abundancia de un ARNm ya que indica que en la muestra había mayor cantidad de templado y por lo tanto se necesitaron menor número de ciclos para generar un producto por PCR; y un Ct más alto refleja poca abundancia de ARNm en la muestra, ya que implica que se requirieron más ciclos para poder generar una señal.

En el análisis de las isoformas de SERCA comparado contra la abundancia de los genes de expresión ubicua GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y β -actina, se encontró que conforme a lo reportado previamente (Dode, De Greef et al. 1998; Gelebart, Kovacs et al. 2002), la expresión de SERCA3 fue muy abundante en tejido normal tanto en mucosa gástrica de humano como en epitelio de colon de ratón. En el epitelio normal de colon de ratón, la expresión relativa de SERCA3 fue prácticamente igual a la del gen de expresión ubicua GAPDH ($SERCA3/GAPDH = 0.9$) y además fue casi 7 veces más abundante que la isoforma SERCA2b, cuya expresión pensábamos inicialmente era la más abundante en éste tejido, esto por ser una isoforma de expresión ubicua y que a la fecha no hay reportes de cuál isoforma es más abundante en los tejidos analizados. En las muestras de mucosa gástrica normal de humano, M2-M5, la expresión de SERCA3 no fue tan abundante como en el colon del ratón, encontrando que fue entre 5 a 8 veces menos abundante que β -actina, pero resultó comparable a la isoforma SERCA2b; en las muestras M2 y M3 fue 3 veces más abundante que SERCA2b, en M5 la expresión fue

prácticamente la misma y solo en M4 SERCA2b fue 3 veces más abundante que SERCA3. Ver Tabla 3.

En las líneas celulares ya sea normales o tumorales, de rata o humano, se encontró que la expresión de SERCA3, al igual que la isoforma 2a y 2c de SERCA2, fue muy poco abundante, obteniendo que el ARNm de la isoforma de expresión ubicua, SERCA2b fue el más abundante, aunque menor que la expresión de GAPDH o β -actina. Es importante destacar que la expresión de las bombas SERCA en dos líneas celulares de colon normal: humano 112-CoN y de rata IEC-18, el patrón encontrado se parece más al de las células tumorales, es decir se detectó contrario a lo esperado poca abundancia de SERCA3, siendo incluso 3 y 4.5 veces menor que el de las líneas de cáncer gástrico y de colon, probablemente debido al proceso de inmortalización de las líneas celulares y por lo tanto estas líneas celulares no reflejan lo que pasa en colonocitos normales por lo que no son buenos controles para el análisis de las bombas de calcio.

Tabla 3. Resultados de amplificación de las diferentes isoformas de SERCA en tejidos y líneas celulares. Se analizó la expresión de SERCA en muestras de tejido normal (mucosa gástrica de humano y epitelio de colon de ratón) así como en las líneas celulares indicadas en la tabla. Se muestran los valores de los Ct's y también las veces de amplificación con respecto a un gen de expresión ubicua GAPDH o ACTINA.

	Ciclos de Amplificación (Ct's)						Veces de expresión vs ACTINA o GAPDH			
	ACTINA	GAPDH	SERCA2a	SERCA2b	SERCA2c	SERCA3	SERCA2a	SERCA2b	SERCA2c	SERCA3
Líneas celulares de colon "normal"										
IEC-18 rata	ND	17.90	24.31	25.94	ND	31.89	6.4	8.0	ND	14.0
112-CoN humano	ND	15.73	27.00	21.12	31.06	30.38	11.3	5.4	15.3	14.6
Líneas celulares humanas de cáncer										
KATO-III gástrico	ND	16.93	26.65	20.45	31.03	28.75	9.7	3.5	14.1	11.8
Caco-2 colon	ND	14.48	25.10	19.22	28.71	27.35	10.6	4.7	14.2	12.9
TEJIDO NORMAL DE RATÓN Y HUMANO										
Epitelio de colon de ratón	ND	16.55	ND	24.30	ND	17.49	ND	7.7	ND	0.9
Mucosa gástrica de humano										
M2	18.05	ND	ND	24.77	ND	23.87	ND	6.7	ND	5.8
M3	19.99	ND	ND	28.73	ND	26.34	ND	8.7	ND	6.4
M4	18.68	ND	ND	23.93	ND	26.70	ND	5.2	ND	8.0
M5	17.44	ND	ND	24.36	ND	24.52	ND	6.9	ND	7.1

Ct's.- ciclos de amplificación; ND.- no detectado

Líneas celulares: normales y tumorales	SERCA2b > 2a >>> 3 > 2c
Tejidos normales: colon ratón y mucosa gástrica de humano	SERCA3 > 2b

En la Tabla 4 se muestran los resultados de expresión de las isoformas de SERCA tras la diferenciación de las líneas tumorales humanas: células KATO-III de cáncer gástrico con 2 mM de NaB y Caco-2 tras diferenciación espontánea por confluencia. Se obtuvo que la inducción en la expresión de SERCA3 con ambos modelos de diferenciación aumento entre 5 y 6 Ct's con respecto al estado indiferenciado de las mismas; sin embargo, como son datos crudos, cada Ct corresponde al doble de acuerdo a la cinética de reacción de la PCR. Por lo tanto, corresponde en más de 30 veces como se mostró en las Figuras 13A y 22.

A pesar del incremento tan marcado en la expresión de SERCA3 tras la diferenciación celular, SERCA2b se mantuvo como la isoforma más abundante en estas líneas celulares, es decir la inducción que se logró con la diferenciación aunque fue muy marcada no revierte la abundancia de estas isoformas en el estado tumoral. Considerando que en los tejidos normales de rata y humano, la isoforma de la bomba más abundante es SERCA3 y no la isoforma de expresión ubicua SERCA2b, el incremento específico en la expresión de SERCA3 tras la diferenciación (espontánea por confluencia o por NaB) conduciría en parte a restablecer su abundancia normal en estos tejidos. Sin embargo, los estímulos que conducen la diferenciación de las células tumorales analizadas, no consiguen restablecer a SERCA3 como la isoforma de la bomba predominante en la mucosa gástrica y el colon, como se identificó en los tejidos normales de humano y ratón (ver Tabla 3).

En esta tabla, también se aprecia que la expresión de la isoforma ubicua SERCA2b, se mantiene sin cambios durante la diferenciación y que su abundancia es muy similar al tejido normal (ver Tabla 3 y 4); incluso en las líneas celulares de colon "normal" (112-CoN y IEC-18) su patrón de expresión es muy homogéneo. Si se compara la abundancia de las diferentes isoformas de la bomba, en estado basal las células tumorales presentan baja expresión de SERCA3, SERCA2a y 2c, sin embargo, tras la diferenciación SERCA3 se induce mientras que SERCA2a y 2c mantienen su baja abundancia e incluso SERCA2a disminuye 3 Ct's en la línea Caco-2.

Tabla 4. Resultados de amplificación de las diferentes isoformas de SERCA en KATO-III y Caco-2 después de la diferenciación. Se muestran también las veces de amplificación de cada isoforma con respecto a un gen de ubicuo, GAPDH.

	Ciclo de Amplificación (Ct's)					Veces de expresión vs GAPDH			
	GAPDH	SERCA2a	SERCA2b	SERCA2c	SERCA3	SERCA2a	SERCA2b	SERCA2c	SERCA3
KATO-III gástrico									
Indiferenciadas	16.93	26.65	20.45	31.03	28.75	9.7	3.5	14.1	11.8
Diferenciación butirato	19.18	29.30	22.51	33.33	25.77	10.1	3.3	14.2	6.6
Caco-2 colon									
Indiferenciadas	14.48	25.10	19.22	28.71	27.35	10.6	4.7	14.2	12.9
Diferenciación espontánea	16.18	29.95	20.88	32.08	23.88	13.8	4.7	15.9	7.7

Ct's.- ciclos de amplificación

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a la función de SERCA como bomba de calcio del retículo endoplásmico, la pérdida o disminución de su expresión se considera que incide en el desarrollo normal de la célula, desempeñando un papel clave en el proceso carcinogénico ya que la pérdida de su expresión conduce a la desregulación de múltiples vías de señalización que controlan diferentes procesos como apoptosis, diferenciación y proliferación celular.

Aunque se han descrito mutaciones en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, que son los que codifican las proteínas SERCA2 y SERCA3 respectivamente, en diferentes neoplasias como cáncer de colon, pulmón, SNC, tiroides y mucosa oral; las mutaciones identificadas ocurren a nivel germinal, de manera rara, sin la identificación de *hot spots* de mutación a lo largo de estos genes, por lo que se ha establecido que sí bien las mutaciones confieren mayor susceptibilidad a desarrollar estas neoplasias se concluye que no son determinantes de su presentación (Endo, Uzawa et al. 2004; Korosec, Glavac et al. 2006; Korosec, Glavac et al. 2009).

El grupo de Gelebart demostró que la expresión de la proteína SERCA3 se encuentra disminuida o casi ausente en muestras de pacientes con cáncer gástrico y de colon, así como en múltiples líneas celulares humanas derivadas de estas neoplasias, pero se desconocía si esta pérdida ocurría también a nivel de ARNm del gen *ATP2A3* (Gelebart, Kovacs et al. 2002). Al comparar la abundancia de SERCA3 en muestras normales de epitelio (mucosa gástrica de humano y epitelio de colon de ratón) contra la encontrada en líneas tumorales humanas del mismo tipo celular (KATO-III carcinoma gástrico y Caco-2 adenocarcinoma de colon), fue posible establecer que la pérdida de la expresión de la proteína SERCA3 también ocurre a nivel del ARNm del gen. Esto sugiere que la desregulación en su expresión ocurre a nivel transcripcional. Ver Tabla 3.

A pesar de la disminución en la expresión de SERCA3 en células tumorales está descrito que es posible incrementarla mediante diferenciación *in vitro*, en este proyecto se utilizaron dos modelos de diferenciación con líneas neoplásicas humanas con poca diferenciación, descritos previamente por varios grupos de investigación (Basque, Chenard et al. 2001; Kiela, Hines et al. 2001; Basuroy, Sheth et al. 2003; Seth, Sheth et al. 2007; Su, Yeh et al. 2007). El primer modelo utiliza células KATO-III de carcinoma gástrico, diferenciadas mediante tratamiento farmacológico con ácidos grasos de cadena corta, SCFA's, como el butirato de sodio y tributirato de glicerilo). El

otro modelo fueron células de adenocarcinoma de colon, Caco-2, las cuales pasan por diferenciación espontánea tras 22 días en cultivo post-confluyente sin la adición de ningún agente que la promueva.

KATO-III es una línea de carcinoma gástrico humano de células en anillo de sello con pobre diferenciación. Tiene delección genómica de p53, amplificación de oncogenes FGFR-2, β -catenina, c-met, ciclina D; no expresa APC, Rb ni p16 y expresa bajos niveles de p21; además tiene mutaciones puntuales en E-caderina. Expresa TGF- β y receptores de tirosina cinasa (KGF-R, EGF-R, HGF-R e IGF1-R) (Faust and Meeker 1992; Nishimura K 1995; Akama, Yasui et al. 1996; Yokozaki 2000; Basque, Chenard et al. 2001; Suriano, Vrcelj et al. 2005).

Caco-2 es una línea de adenocarcinoma de colon humano que tiene una mutación sin sentido en el gen de APC [codón 1367, transición de C \rightarrow T, cambiando Gln (CAG) por un codón de paro (TAG)] que produce bajos niveles de una proteína truncada de 170 kDa de APC, nivel que se mantiene constante durante su diferenciación a enterocitos funcionales. En su estado como célula neoplásica presenta alta actividad de β -catenina/TCF la cual disminuye hasta 10 veces cuando se diferencia espontáneamente (22 días en cultivo post-confluyente), llevándose a cabo de forma independiente de APC (Mariadason, Bordonaro et al. 2001). Por lo que, al parecer la diferenciación de las células Caco-2 tiene lugar a través de una ruta no canónica Wnt. En adición, las células Caco-2 tienen elevada expresión de miembros de desacetilasas de histonas, HDAC3 y 4, que conforme se diferencia ésta línea celular, se ha observado que la expresión de HDAC4 disminuye, lo cual se asocia con activación de la expresión génica ya que tanto HDAC3 y 4 pueden formar parte del complejo co-represor N-CoR/SMRT (Wilson, Byun et al. 2006; Wilson, Byun et al. 2008). En la diferenciación de Caco-2 con 5 mM de butirato de sodio también se han visto efectos sobre factores de transcripción, por ejemplo, Sp3 aunque se encuentra constitutivamente acetilado en extractos de esta línea, tras la diferenciación se produce un enriquecimiento de este factor, incidiendo con ello en la activación o represión de sus blancos específicos, aunque no se menciona uno en particular (Kiela, Kuscuoglu et al. 2007).

La diferenciación *in vitro* de ambas líneas tumorales son modelos ampliamente utilizados desde hace varios años por numerosos grupos de investigación (Hidalgo, Raub et al. 1989; Artursson 1990; Jumarie and Malo 1991; Basque, Chenard et al. 2001; van Breemen and Li 2005). Aunque en este proyecto no se determinó ningún marcador de diferenciación, tanto el tratamiento de

KATO-III con NaB así como la diferenciación por confluencia de los cultivos de Caco-2, mostraron un cambio marcado en la morfología de estas células en acuerdo con lo ya reportado (ver Figura 9 y 12) (Kruh, Defer et al. 1992; Ranaldi, Islam et al. 1992). Las células KATO-III tienen forma esférica que crecen tanto adheridas como suspendidas en el medio, la cual cambia a una forma alargada que se aprecia mejor en las células que crecen adheridas una vez que se han tratado con diferentes inhibidores de HDAC's (NaB, TNaB, tricostatina A y ácido valproico), que se ha descrito inducen diferenciación celular mediante arresto del ciclo celular (Siavoshian, Segain et al. 2000; Chen, Faller et al. 2003; Bi and Jiang 2006). Por lo anterior, el cambio de fenotipo de KATO-III se asoció con la inducción de la diferenciación de estas células. Además se realizaron tratamientos de KATO-III con otros fármacos: un agente hipometilante (5-azacitidina), un inhibidor de la transcripción dependiente de elementos Sp (mitramicina A) y un inhibidor de fosfatasas (ácido okadaico). Con ninguno de ellos se vio un cambio en la morfología de las células cancerosas, pero cuando se combinó alguno de ellos con NaB, se obtuvo el mismo cambio que produjo el NaB por sí solo, la única excepción fue la combinación de NaB con mitramicina A, dónde las células no cambiaron su forma en el cultivo. La combinación de tres agentes (NaB, 5-azacitina y ácido okadaico) también indujo un cambio en la forma de estas células aunque, se aprecia que disminuye su viabilidad pues disminuye el número de células en el cultivo, sin embargo, estas células resistieron el tratamiento de cuatro agentes en el mismo cultivo, con una disminución máxima en su viabilidad hasta del 15%, con cualquiera de los tratamientos o combinación de los mismos. Observar Figuras 10 y 11.

El cambio de morfología observado en Caco-2 también fue evidente; estas células cuando se encuentran en baja confluencia (~30%) su membrana nuclear y plasmática resultó poco evidente, estas se desarrollan en cúmulos de 5 a 10 células que van creciendo conforme avanzan los días en cultivo formando islas con mayor número de integrantes. Conforme aumenta el porcentaje de confluencia del cultivo, incrementa su velocidad de proliferación que cuando alcanza el 100%, se observa que las membranas nuclear y citoplasmática se definen, con lo que los núcleos de cada célula se aprecian claramente. Observar Figura 12. Se ha descrito la formación de uniones adherentes durante la diferenciación espontánea de esta línea celular, que tras 22 días en cultivo confluyente forma un epitelio polarizado funcional (Grasset, Pinto et al. 1984; Hidalgo, Raub et al. 1989).

Para este proyecto, es importante destacar que el butirato de sodio (NaB) es uno de los diferentes ácidos grasos de cadena corta (SCFA, *short chain fatty acids*) que se encuentran de manera normal en el tracto intestinal, especialmente en el colon, producto de la degradación de las fibras de la dieta por las bacterias de la flora, de hecho es el tercero en abundancia después del acetato y propionato, respectivamente (Tazoe, Otomo et al. 2009). Estos SCFA's tienen importancia reconocida en el desarrollo y mantenimiento de la fisiología normal del epitelio intestinal, desempeñando un papel fundamental en la diferenciación, crecimiento y muerte de las células que conforman el intestino y estómago (Hamer, Jonkers et al. 2008). Por lo tanto la utilización de NaB es un modelo fisiológico del desarrollo de los epitelios. Por otra parte, las células de adenocarcinoma de colon, Caco-2, se diferencian de manera espontánea por confluencia celular, es decir no se adiciona ningún agente para la regresión a un epitelio polarizado funcional, de tal forma que la inducción en la expresión de SERCA3 se puede atribuir al programa de diferenciación *per se* y no a la actividad(es) intrínseca(s) del NaB.

En ambas líneas tumorales KATO-III y Caco-2, logramos establecer que la inducción previamente reportada a nivel de la proteína SERCA3 después de diferenciación *in vitro*, con NaB o espontánea, respectivamente (Gelebart, Kovacs et al. 2002), al parecer ocurre a nivel transcripcional, resultando en aumento de hasta 42 veces en la expresión relativa del ARNm del gen *ATP2A3*. Se observó que la inducción ocurre de forma específica, ya que en la determinación del ARNm de las diferentes isoformas de SERCA2 (a, b y c), su expresión se mantuvo sin cambios o por el contrario presenta diferentes grados de disminución en su abundancia. Observar Figuras 13, 14, 22 y 24.

Puesto que se desconocen los mecanismos por los cuales se da la inducción específica de SERCA3, el tratamiento de KATO-III con agentes farmacológicos con distinta actividad pretende vislumbrarlo. El NaB ha sido ampliamente utilizado para inducir diferenciación *in vitro*; aunque se conoce que induce arresto del ciclo celular a través de la inducción del gen p21 (regulador negativo de cinasas dependientes de ciclinas) e inhibición de ciclinas D1 y D3 (Mahyar-Roemer and Roemer 2001), se ha descrito que tiene efectos en múltiples blancos, de los cuales destacan su actividad como inhibidor de desacetilasas de histonas (iHDAC's), activación de cinasas, fosfatasas, así como incidir en ciertos factores de transcripción, en especial los de la familia Sp

(también conocidos como familia KLF, *Krupel like family*) (Black, Black et al. 2001; Kaczynski, Cook et al. 2003).

Se ha reportado que en cáncer gástrico y de colon hay expresión aumentada de diferentes miembros de HDAC's clase I y II. Se establece que la sobre-expresión de estas enzimas conlleva a represión génica ya que al catalizar la remoción de grupos acetilo de las proteínas histonas se neutraliza la carga entre el ADN y las histonas, facilitando la compactación de la cromatina, efecto que se refuerza con el reclutamiento de complejos represores (Wilson, Byun et al. 2006; Spurling, Godman et al. 2008; Wilson, Byun et al. 2008). Mediante iHDAC's como tricostatina A (TSA) y ácido valproico se estableció que la inhibición de su actividad desempeña un papel fundamental en la expresión de SERCA3, ya que con TSA es posible obtener una inducción muy similar (más de 46 veces) a la que se vio con NaB o su derivado TNaB (ambos la inducen más de 42 veces); sin embargo con ácido valproico sólo fue posible inducirla más de 18 veces (ver Figura 15 y 16). La inhibición de HDAC's puede incidir directamente en la expresión de SERCA3 al establecer una cromatina abierta que permita su transcripción, pero también puede ser resultado de un efecto indirecto, es decir, que incida sobre un factor de transcripción que module su expresión. Además tanto las HDAC's como su contraparte las HAT's (acetiltransferasas de histonas) ejercen su actividad sobre proteínas no histonas con lo que se incrementa el grado de complejidad del efecto observado.

El promotor *ATP2A3*, es rico en dinucleótidos CpG, de hecho, tanto el sitio de inicio de la traducción como el de la transcripción de este gen se encuentran inmersos en una isla CpG de 1.5 kb, lo cual conlleva a la formación de múltiples sitios putativos para factores de transcripción que reconocen secuencias ricas en G y C. Por ejemplo algún miembro de la familia Sp (o KLF-*Krupel Like Family*, gran familia de factores de transcripción que incluye factores Sp's y KLF's), que al reconocer y unirse a su secuencia blanco modulen su expresión. Un análisis *in silico* de su promotor basal (-135 a +1) identificó 5 sitios putativos para este tipo de factores de transcripción. Para estudiar el papel de estos factores de transcripción en la expresión de SERCA3 tratamos las células KATO-III con mitramicina A, un agente que reconoce y se une a secuencias ricas en G y C bloqueando la unión de estos factores con lo que se modifica la expresión de sus genes blanco. El tratamiento con éste antibiótico provocó un incremento en la expresión de *ATP2A3* (hasta 6 veces) que, considerando que los miembros de la familia de factores de transcripción KLF

pueden regular tanto de forma negativa como positiva a sus genes blanco, se propone que en el gen *ATP2A3*, éste factor estaría reprimiendo su expresión, ya que al poner mitramicina se promueve su transcripción (ver Figura 17). Además, resulta interesante que cuando se combinó mitramicina con butirato de sodio se vio un efecto sinérgico promoviendo la inducción de la expresión de *ATP2A3* hasta 60 veces, mientras que con butirato 2 mM solo había una inducción de la expresión de ~20 veces y con mitramicina de 3 veces (ver Figura 20). Por lo tanto, se podría sugerir que alguno de los factores Sp o KLF funciona como un represor de la expresión de este gen, que además podrían bloquear su expresión mediante la formación de complejos co-represores con algún miembro de las HDAC's sobre el promotor de *SERCA3*. De tal forma, la inhibición de la unión del factor de transcripción de la familia Sp o KLF, que se logra con mitramicina A, en conjunto con el bloqueo de las HDAC's (mediante NaB) lleva a una inducción específica y marcada de *SERCA3*.

Es importante mencionar que el efecto del tratamiento de KATO-III con mitramicina A sobre la expresión de *SERCA3* ya estaba reportado previamente por el grupo de Brouland, pero solo a nivel de la proteína, sin embargo, ellos observaron un efecto opuesto a la inducción que se identifico en éste trabajo (Brouland, Gelebart et al. 2005). Es decir, ellos reportaron que mitramicina A inhibe la expresión de la proteína *SERCA3* e incluso que es capaz de bloquear el efecto inductor del NaB. Sin embargo, se atribuye esta diferencia a que este grupo utilizó concentraciones muy elevadas de éste antibiótico (10 μ M) durante 48 hrs mientras que en éste proyecto se usaron concentraciones mil veces menores, de 10 a 200 nM también durante 48 horas. Con 500 nM se observó que la viabilidad de estas células disminuyó de forma significativa en 15% (ver Figura 11), por lo que está concentración no se considero para el análisis de la expresión de las isoformas de *SERCA* (ver Figura 17). Además, la inducción que se encontró a nivel de ARNm con mitramicina A sola, incluso se potencio cuando se combino con 2 mM de NaB. Ver Figura 20.

Otro mecanismo de regulación de la expresión de genes cuyo promotor se encuentra inmerso en una isla CpG, es a través de la metilación de los dinucleótidos CpG del ADN. Particularmente en cáncer, se ha visto que la represión de diferentes genes supresores de tumores ocurre por hipermetilación de su promotor. Las citocinas metiladas del ADN reclutan proteínas MeBP (*methyl binding proteins*) que a su vez atraen a complejos co-represores lo cual conduce a la

represión de la expresión génica. Tanto el promotor de SERCA3 y SERCA2 se hallan inmersos dentro de una isla CpG, aunque difieren en los elementos *cis* que conducen su transcripción basal. El gen *ATP2A2* posee una caja TATA clásica mientras que *ATP2A3* tiene una secuencia iniciadora o Inr, a la cual se une directamente la ARN polimerasa para la transcripción génica (Dode, De Greef et al. 1998; Zarain-Herzberg and Alvarez-Fernandez 2002). Está documentado que la disminución en la expresión de SERCA2 vista en cáncer oral, ocurre como consecuencia directa de la hipermetilación de su promotor (Endo, Uzawa et al. 2004). El tratamiento de KATO-III con un agente hipometilante del ADN como la 5-azacitidina se utilizó para evaluar este mecanismo epigenético en la regulación de la expresión de SERCA3. Este análogo de la citidina no puede ser metilado por la maquinaria celular, por lo que ejerce su efecto una vez que se incorpora al ADN tras la replicación celular, para lo cual se realizaron tratamientos durante 72 horas. Se observó que 5-azacitidina indujo de manera específica la expresión de SERCA3, hasta 3.5 veces con la concentración máxima utilizada (5 μ M) (ver Figura 18). Además el tratamiento combinado de 1 μ M de 5-azacitidina más 2 mM de butirato indujo la expresión de SERCA3 25.3 veces, de forma individual la inducen 1.7 y 17.4 veces respectivamente, por lo que no hubo un efecto sinérgico como el observado en la combinación de butirato con mitramicina A, sino prácticamente la suma de ambos. Ver Figura 20.

Es importante considerar que la inducción de SERCA3 observada con el tratamiento de KATO-III con el agente hipometilante, el bloqueador de la transcripción y los iHDAC's puede ser directa sobre el arreglo del gen o una consecuencia indirecta, es decir los efectos de cada agente puede estar regulando la expresión o actividad de algún factor de transcripción que a su vez module la expresión del gen *ATP2A3* que codifica a SERCA3, o ser incluso una combinación de ambos, la incidencia directa sobre la estructura del gen y sobre un factor de transcripción que coadyuven en la inducción observada de su expresión. En adición a las HDAC's, su contraparte las acetil transferasas de histonas (HAT's), que se encontrarían más activas al bloquear a las HDAC's, pueden modificar post-traduccionalmente (acetilación) múltiples factores de transcripción y con ello cambiar la afinidad por su sitio blanco en el ADN, también puede incidir en su interacción con otros factores así como con proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción.

Otro de los blancos de acción del butirato es sobre proteínas fosfatasa, por lo que se utilizó ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasa de serina/treonina (PP2A, PP2B y PP1). El tratamiento de

KATO-III con 200 y 500 pM de este agente no produjo cambios en la expresión de SERCA3, por lo cual se descartó la participación de proteínas fosfatasa dentro del proceso que mantiene reprimida su expresión en cáncer. Es importante considerar que en la literatura más tarde se notó que las concentraciones utilizadas solo podían inhibir a PP2A y que para inhibir también a PP1 y PP2B se requerían concentraciones 10 a 1000 veces mayores, respectivamente. Sin embargo, aunque inicialmente se utilizaron concentraciones en rango nM, había muerte celular muy marcada en los cultivos de KATO-III, por ello se decidió utilizar concentraciones en rango pM. A pesar de ello, se encontró que el ácido okadaico redujo de forma específica la expresión de SERCA2b hasta la mitad, por lo que al parecer PP2A, regula la expresión de la isoforma ubicua. Aún restaría probar otro inhibidor de proteínas fosfatasa menos tóxico o usar el ácido okadaico por un periodo más corto. Además, faltaría probar un inhibidor de fosfatasa alcalinas, de tirosina y ácidas, para asegurar que las proteínas fosfatasa no modulan la expresión de SERCA3. Ver Figura 19.

Analizando los posibles escenarios en el mecanismo de regulación de SERCA3, es posible que exista un recambio entre factores de transcripción, uno que funcione como modulador negativo cuya unión es bloqueada por mitramicina A pero además, puede haber otro factor de transcripción que funcione como regulador positivo que antagonice el efecto del represor. En adición, la iHDAC's puede coadyuvar en el mecanismo de inducción de SERCA3 a través de la acetilación del factor de transcripción que con ello adquiriera mayor afinidad por su secuencia blanco en el promotor de *ATP2A3* y al unirse promueva una fuerte transcripción del gen, incluso la acetilación puede modular su interacción con un complejo co-activador del mismo. Además, la inducción que se observó con el agente hipometilante indica que la metilación del ADN, también podría participar en el mecanismo de regulación de SERCA3.

En la diferenciación inducida por NaB y espontánea de las líneas tumorales KATO-III y Caco-2, respectivamente, a la par de la expresión de SERCA3 se determinó la expresión de las diferentes isoformas de ARNm de SERCA2 (a, b y c), encontrando en ambas líneas tumorales, que la más abundante de las tres isoformas fue la de expresión ubicua 2b (ver Tabla 3). La isoforma 2a aparece 6 veces menos abundante que 2b, mientras que 2c hasta 10 veces menos que 2b. En adición, después de la diferenciación, las isoformas 2a y 2c prácticamente no cambiaron su nivel de expresión (ver Tabla 4), por ello, con el resto de los tratamientos aplicados sobre KATO-III

sólo se determinó la expresión de la isoforma ubicua 2b junto con la isoforma 3 de la bomba SERCA.

El tratamiento de KATO-III con los iHDAC's, trichostatina A y ácido valproico, a diferencia de NaB y su análogo TNaB, provocaron una disminución significativa en la expresión de SERCA2b de hasta 0.4 veces (ver Figuras 15B y 16B). En tanto, con el agente hipometilante (5-azacitidina) y con el inhibidor de la transcripción (mitramicina A), no hubo cambios significativos en la expresión de la isoforma ubicua (ver Figura 17 y 18). Es importante notar que aunque el promotor de *ATP2A2* también posee múltiples sitios para factores de transcripción de la familia KLF, el tratamiento de KATO-III con mitramicina A sola no modifica la expresión de SERCA2b, pero el tratamiento combinado de mitramicina A con NaB sí conduce a una disminución hasta del 50% de su abundancia (ver Figuras 17 y 21).

Aunque se encontraron cambios en la expresión de SERCA2b con los diferentes tratamientos, éstos no se comparan con los vistos con SERCA3 donde hubo incrementos de más 40 veces en su expresión. Se atribuye esta diferencia a que, los mecanismos que se encargan de regular la expresión de estos genes debe ser distinta. Al ser SERCA2b una isoforma ubicua, el gen *ATP2A2*, que se encarga de codificar las tres isoformas de SERCA2 (a, b y c) debe encontrarse en un contexto cromatínico relajado con perfecta accesibilidad a toda la maquinaria de transcripción, por lo que no se espera que se halle dentro de una región cromosómica hipermetilada o hipoacetilada, por lo que estos tratamientos sólo modificaron parcialmente su expresión.

En el análisis de la expresión de SERCA2b en KATO-III combinando los diferentes agentes con NaB, se obtuvo que trichostatina A, mitramicina A o NaB 2 mM, no modificaron su expresión por sí solos pero cuando se adicionaron juntos al cultivo de estas células tumorales, hubo una disminución hasta la mitad en la expresión de la isoforma ubicua. Además cuando se combinaron tres y hasta cuatro agentes se observó el mismo grado de disminución de esta isoforma, que considerando que es una isoforma ubicua podría ser el grado máximo de disminución para que la célula aún sea funcional. En el caso del agente hipometilante, 5-azacitidina, se observó que ni aún en combinación con NaB este agente fue capaz de modificar su expresión. Ver Figura 21.

La línea celular Caco-2 es ampliamente utilizada como modelo de diferenciación, ya que está descrito que los cultivos post-confluentes de estas células tumorales después de 22 días sufren diferenciación espontánea sin tener que adicionar algún agente farmacológico al medio de

cultivo. Estas células alcanzan un fenotipo enterocítico maduro, con formación de uniones estrechas que forman un epitelio polarizado funcional; además expresan diferentes marcadores de diferenciación entre los cuales están: fosfatasa alcalina, dipeptidil peptidasa IV, antígeno carcinoembrionario y sacarasa-isomaltasa (Grasset, Pinto et al. 1984; Hidalgo, Raub et al. 1989). El análisis de la expresión durante el período de diferenciación de Caco-2 permitió establecer que la inducción de SERCA3 ocurre de forma muy temprana, incluso cuando el cultivo alcanzó el 100% de confluencia hubo inducción de ~9 veces en la expresión de ARNm con respecto a las células indiferenciadas (30% de confluencia). Además, el incremento en su expresión continuó conforme las células se diferenciaron por completo, superando incluso las 40 veces desde los 16 días en confluencia que se mantuvo hasta los 22 días (ver Figura 22). El grupo de Gelebart, había demostrado la inducción de la proteína SERCA3 tras la diferenciación espontánea de Caco-2; sin embargo, ellos veían que a partir de 5 días en confluencia se inducía su expresión de tal forma que podían detectarla, ya que en el estado indiferenciado parecía estar ausente (Gelebart, Kovacs et al. 2002). Por lo tanto, en este trabajo se demostró que la inducción de la expresión de SERCA3 tras la diferenciación *in vitro* de estas células de adenocarcinoma de colon, al igual que con las de carcinoma gástrico, KATO-III, ocurre a nivel transcripcional del gen *ATP2A3*.

Para establecer que la inducción en la expresión de SERCA3 observada en Caco-2 ocurrió como resultado del proceso de diferenciación y no por la confluencia celular, se sometió una línea de colon normal humano, 112-CoN, al mismo periodo de cultivo que Caco-2. Colectando muestras de estos cultivos al igual que de la línea tumoral, se observó que la confluencia celular *per se* no fue capaz de inducir la expresión de SERCA3, por el contrario hubo disminución significativa en su expresión a partir del día 2 en confluencia, la cual se acentuó conforme pasaron los días en confluencia, llegando a disminuir hasta la mitad de su nivel relativo de expresión (ver Figura 23). Es importante destacar que esta línea celular aunque proviene de un tipo normal (no maligno), contrario a lo visto en tejido normal, presenta baja abundancia de SERCA3, resultando incluso menor al encontrado en las líneas tumorales, Caco-2 y KATO-III. Esto se comprobó determinando su expresión en otra línea celular de colon “normal” de rata, IEC-18, la cual también presentó baja abundancia que al igual que la línea celular humana fue menor que el de las tumorales. Por ello, la determinación de la expresión de las isoformas de SERCA en la línea celular de colon normal humano, 112-CoN, sólo nos permitió descartar el efecto de la confluencia

en la inducción o represión respectiva observada de SERCA3 y SERCA2 tras la diferenciación espontánea de Caco-2, pero no resultó útil para comparar los niveles de expresión entre células tumorales y normales. Se atribuye la poca abundancia de SERCA3 en las líneas celulares de colon normal humano y de rata, al proceso de inmortalización que las genera.

En la determinación de la expresión de las diferentes isoformas de ARNm de SERCA2 (a, b y c) en Caco-2, se observó que tras la diferenciación por confluencia, de forma similar a la inducida con NaB en KATO-III, hubo una disminución en la expresión de SERCA2, sin embargo, por confluencia hubo una reducción de todas las isoformas y no solo de 2a. Incluso la isoforma ubicua 2b mostró una disminución, aunque fue más tardía (hasta el día 7 en confluencia), mientras que 2a y 2c, disminuyeron en 0.4 veces desde el día 1 en confluencia (ver Figura 24). La disminución de ambas isoformas se acentuó a los 3 días en cultivo disminuyendo hasta 0.6 veces. Esta diferencia entre los dos modelos de diferenciación utilizados se atribuye a que cada uno ocurre por mecanismos moleculares distintos, aunque ambas son células epiteliales. Sin embargo, la inducción de SERCA3 sí fue muy marcada en ambos modelos de diferenciación.

La expresión de las tres isoformas a, b y c de SERCA2 en la línea de colon normal humano, 112-CoN, se observó que la isoforma 2c al igual que en la línea tumoral Caco-2, disminuyó su expresión durante el periodo de confluencia hasta un 50%; sin embargo las isoformas 2a y 2b, de forma contraria a las células tumorales, en lugar de disminuir aumentaron su expresión hasta el doble (ver Figura 25). A pesar de que hubo un incremento en la expresión de la isoforma de expresión ubicua 2b en 112-CoN, esta se mantuvo constante durante la mayor parte del periodo analizado (día 1 a 11), lo cual muestra nuevamente que existen mecanismos que conservan estable su expresión.

Con el modelo de diferenciación espontánea por confluencia celular de Caco-2, se obtuvo inducción de SERCA3 en magnitud muy similar a la vista en KATO-III tras la adición de NaB, superando ambos más de 40 veces su expresión con respecto a un estado indiferenciado. Por lo tanto, la diferenciación de Caco-2 permitió ubicar que el programa de diferenciación *per se*, es lo que conduce a la inducción de SERCA3.

La diferenciación celular se ha asociado con la expresión diferencial de miembros de la familia de HDAC's. Por ejemplo, en el colon normal la expresión de HDAC4 se ha visto que es inversa al grado de diferenciación, requiriendo su regulación negativa para permitir la expresión de p21,

disminuir la proliferación a través del arresto del ciclo celular y con ello la diferenciación de las células (Wilson, Byun et al. 2008). HDAC1, 2 y 3 se encuentran sobre-expresadas en cáncer de colon; de hecho, está reportado que la inhibición directa con RNAi de HDAC3 es suficiente para inhibir el crecimiento, disminuir la supervivencia e incrementar la apoptosis de cultivos celulares (no así para HDAC1 y 2, donde su inhibición produce efectos similares pero no tan claros como HDAC3) (Wilson, Byun et al. 2006). Por lo tanto, la inducción de la transcripción de SERCA3 observada con ambos modelos de diferenciación (por confluencia celular y con NaB) converge en la regulación por HDAC's. Sin embargo, es claro que el panorama sigue siendo muy amplio ya que hoy día se conoce que estas enzimas regulan la expresión génica no solo a nivel de estructura de cromatina, sino también modulan la actividad de factores de transcripción a través de acetilación, cuyo resultado puede ser muy complejo, ya que esta modificación post-traducciona puede incidir en su estabilidad, localización celular así como en la formación de complejos co-activadores o co-represores de la transcripción. Además aunque se ha visto que el tratamiento de células de cáncer de colon, HCT116, con siRNA contra HDAC1, 2 o 3 promueve una fuerte expresión de p21, la inducción de este gen es de sólo la mitad de lo que produce el tratamiento con NaB, por lo que al parecer en la inducción de p21 por NaB (y probablemente también del gen SERCA3) las HDAC's, aunque participan de forma muy clara, no constituyen el único mecanismo en la inducción de su expresión .

La expresión normal de la proteína SERCA3 en el epitelio del colon es directamente proporcional al estado de diferenciación de la célula, a menor grado de diferenciación, como el de las células que se encuentran en la base de las criptas del intestino delgado y del colon, menor expresión de SERCA3 presentan, y conforme avanzan sobre el eje de la cripta y adquieren un fenotipo diferenciado, su expresión se incrementa. En principio se determinó la expresión de ARNm de las diferentes isoformas de SERCA (2a, 2b, 2c y 3) en cuatro líneas celulares: 2 de colon "normal" (no malignas) (112-CoN de humano y IEC-18 de rata); y 2 neoplásicas de humano (Caco-2 de adenocarcinoma de colon y KATO-III de carcinoma gástrico). Además se utilizaron muestras de tejido: cuatro de mucosa gástrica "normal" de humano (M2-M5) y en epitelio de colon de ratón. Con ello se identificó a SERCA3 como la isoforma de la bomba de calcio del retículo sarco(endo)plásmico más abundante en los tejidos normales, tanto de humano como de ratón, mientras que en las líneas celulares (tumoraes y las normales no transformadas) SERCA2b

fue la más abundante. Por lo tanto, se propone que hay un recambio de la isoforma 2b por la 3 de SERCA asociado a la transformación celular, que a su vez coincide con la pérdida de la diferenciación asociada al cáncer (ver Tabla 3). Es importante destacar que el recambio que se propone en las isoformas de SERCA tras la transformación maligna, puede corresponder a un mecanismo compensatorio tras la pérdida de la expresión de la isoforma 3. La expresión abundante de SERCA3 en todos los epitelios con características cinéticas propias, implican que este recambio modificarían el manejo de calcio al interior de las células y con ello, múltiples vías de señalización asociadas a proliferación, diferenciación y muerte celular. SERCA3 posee mayor capacidad de transporte aunque poca afinidad por calcio, por lo que se ha propuesto que moviliza este catión de manera muy eficiente pero sólo en ambientes con elevadas concentraciones de calcio. Por ello se propone que la pérdida o disminución en la expresión de SERCA3 asociada al cáncer, favorece el establecimiento y desarrollo del proceso neoplásico. Sin embargo, en el modelo *knockout* murino de *ATP2A3* donde se bloquea por completo la expresión de SERCA3, no hay signos ni síntomas de ninguna enfermedad, mostrando un fenotipo normal, por lo cual la alteración en la expresión de SERCA3 no es suficiente para originar un proceso neoplásico.

A la fecha ningún reporte establece cuál isoforma de SERCA es la más abundante en el colon o mucosa gástrica. En este trabajo se encontró que de forma fisiológica, en éstos tejidos la isoforma predominante es SERCA3 y no la isoforma de expresión ubicua SERCA2b como inicialmente se consideró, lo cual supone un manejo especial del Ca^{2+} en éstos tejidos a consecuencia de la actividad propia de cada una de estas isoformas. Esto podría explicar por qué la diferenciación afecta de manera más marcada la expresión de SERCA3 y no la de SERCA2. Se propone que los cambios en la expresión de SERCA2 ocurren a consecuencia del manejo del Ca^{2+} del medio por el incremento tan marcado en la expresión de SERCA3 (hasta 40 veces), es decir, como efecto secundario al restablecimiento de la concentración de este catión. Sin embargo, restaría probar esta hipótesis midiendo las concentraciones de calcio intracelular antes y después del proceso de diferenciación.

Por otro lado, se observó que en todas las líneas celulares analizadas (tumorales o “normales”; humano y rata), la isoforma más abundante fue SERCA2b y no SERCA3 como en los tejidos normales (mucosa gástrica de humano y epitelio de colon de ratón); es decir, al parecer la pérdida o disminución en la expresión de SERCA3 asociada al cáncer, conduce a un recambio en estas

isoformas: epitelio normal SERCA3>SERCA2b en tanto en el tumoral SERCA2b>>>SERCA3. Se obtuvo que tras la diferenciación de las células tumorales, el incremento en la expresión de SERCA3 aunque fue muy significativo (>40 veces), solo condujo a que la abundancia entre las isoformas tan sólo se asemejara al observado en los tejidos normales, SERCA2b \geq 3, aunque SERCA2b se mantuvo como la isoforma más abundante en ambas líneas celulares inducidas a diferenciación (ver Tabla 3 y 4). Si se analiza la expresión de la isoforma ubicua 2b, ésta se mantiene sin cambios independientemente de la línea celular; tumoral o “normal” y además su nivel de expresión resultó muy semejante al de los tejidos normales del humano y ratón; es decir la expresión de SERCA2b es constante, lo cual concuerda con su función como isoforma ubicua (ver Tabla 3 y 4). Es importante considerar que las observaciones anteriores surgen de la comparación de los datos de amplificación (ciclos de amplificación o Ct's) obtenidos de cada una de las líneas y tejidos, sin embargo, resta realizar un estudio de cuantificación absoluta de la expresión de SERCA2 y 3, ya que nuestros datos provienen de un análisis relativo y por separado de cada una de las muestras.

Puesto que se encontró a SERCA3 como isoforma principal en los epitelios de colon y gástrico, se propone que al igual que su expresión no determina el desarrollo de un proceso neoplásico pero sí contribuye a su desarrollo, el restablecimiento de las $[Ca^{2+}]$ al interior de la célula tras la activación de su expresión, llevaría al desarrollo normal de las células tumorales, así como a su muerte por apoptosis. De forma similar a lo ya reportado para células leucémicas, como por ejemplo la diferenciación de células de leucemia promielocítica aguda *in vivo*, mediante ácido todo trans-retinoico (Chomienne, Fenaux et al. 1996).

10. CONCLUSIONES

- Se observó un incremento en la expresión del ARNm de SERCA3 en dos líneas de células tumorales, KATO-III de carcinoma gástrico y Caco-2 de adenocarcinoma de colon, diferenciadas *in vitro* mediante iHDAC's y de forma espontánea en cultivos post-confluentes, respectivamente.
- Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la inducción de la expresión de SERCA3 (codificada por el gen *ATP2A3*) tras la diferenciación celular ocurre a nivel transcripcional. Se observaron incrementos en la expresión de ARNm de SERCA3 de hasta 40 veces con respecto al estado indiferenciado de las células neoplásicas utilizadas.
- La inducción de SERCA3 fue específica con respecto a la isoforma de expresión ubicua SERCA2b codificada por el gen *ATP2A2*, cuya expresión no cambio o disminuyó parcialmente.
- La abundancia de las isoformas de SERCA3 y SERCA2, se encuentra alterada en las células neoplásicas, siendo más abundante SERCA3 en la mucosa gástrica y colon normales, mientras que la isoforma de expresión ubicua SERCA2b fue la más abundante en todas las líneas celulares estudiadas (tumorales o “normales”).
- Se propone que el marcado incremento en la expresión de SERCA3 en un contexto de diferenciación celular contribuiría al restablecimiento de vías de señalización alteradas en las células neoplásicas, como la apoptosis y con ello aumentar la efectividad de terapias convencionales.

11. PERSPECTIVAS

Los diferentes tratamientos probados en este trabajo de tesis permiten establecer que las HDAC's tanto por su actividad intrínseca (desacetilasas de proteínas histonas y no histonas) como dentro de complejos co-represores, son clave dentro del proceso de inducción de la expresión de SERCA3 tras la diferenciación celular. Además, factores de transcripción de la familia KLF se propone que regulan su expresión. Sin embargo, queda por identificar qué miembro en particular de las HDAC's y qué factores de transcripción son los responsables de la inducción de su expresión, por lo que se propone realizar experimentos de interacción ADN-proteína como inmunoprecipitación de cromatina (ChIP's) así como ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA's) para establecer qué miembro interactúa directamente con su secuencia blanco dentro del promotor de SERCA3 promoviendo su expresión tras la diferenciación celular *in vitro*.

La identificación de los mecanismos de inducción de la expresión de SERCA3 tras la diferenciación celular puede contribuir al entendimiento de su participación dentro del proceso carcinogénico en donde la pérdida o disminución de su expresión puede relacionarse directamente con la pérdida de la diferenciación que sufren las células neoplásicas. Además, de forma similar a lo que ocurre con las células leucémicas, donde las células neoplásicas se consigue que mueran por apoptosis una vez que se han diferenciado, SERCA3 al regular las $[Ca^{2+}]_i$ podría desempeñar un papel clave en el éxito de esta estrategia aplicado ahora a células de cáncer gástrico y de colon.

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]: concentración de catión calcio
ADN: ácido desoxinucleico
APC: adenomatous polyposis coli
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: trifosfato de adenosina
ATP2A1-3: gen que codifica las isoformas de la proteína SERCA1-3
ATP2C1: gen que codifica la SPCA1
CaM: calmodulina
CaMK: proteína cinasa de calmodulina dependiente de calcio
CaSR: receptores sensibles a calcio
FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
GPCR: receptor acoplado a proteína G
HDAC's: desacetilasas de histonas
iHDAC's: inhibidor de HDAC's
IP3: trifosfato de inositol
IP3R: receptor de IP3
IRS: sustrato del receptor de insulina
MEF-2: myocyte enhancer factor-2
NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PKA: proteína cinasa activada por AMPc
PLB: fosfolamban
PLC: proteína cinasa C
PMCA: bomba ATPasa de Calcio de la Membrana Plasmática
PP2A: proteína fosfatasa 2A
PP2B: proteína fosfatasa 2B
RE: retículo endoplásmico
RNAi: ARN de interferencia
RNAsi: ARN pequeño interferente
RS: retículo sarcoplásmico
SCFA: ácido graso de cadena corta
SERCA: bomba ATPasa de Calcio del Retículo Sarco(Endo)Plásmico
SNC: sistema nervioso central
SNL: sarcolipina
SOC: canales sensibles a calcio
Sp1: factor de transcripción (specificity protein 1)
SPCA1: bomba ATPasa de Calcio del aparato de Golgi
STIM1: molécula de interacción con el estroma 1
TG: taspargina
TRPC: transient receptor potential channel
UVB: rayos ultravioleta B
VIH: virus de inmunodeficiencia humana

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, W., M. G. Lee, et al. (2003). "Multiple effects of SERCA2b mutations associated with Darier's disease." J Biol Chem **278**(23): 20795-801.
- Akama, Y., W. Yasui, et al. (1996). "Genetic status and expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric carcinoma cell lines." Jpn J Cancer Res **87**(8): 824-30.
- Algenstaedt, P., D. A. Antonetti, et al. (1997). "Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart." J Biol Chem **272**(38): 23696-702.
- Aoki, K. and M. M. Taketo (2007). "Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene." J Cell Sci **120**(Pt 19): 3327-35.
- Apati, A., J. Janossy, et al. (2003). "Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1." J Biol Chem **278**(11): 9235-43.
- Arredouani, A., Y. Guiot, et al. (2002). "SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) pumps for Ca(2+) homeostasis in pancreatic beta-cells." Diabetes **51**(11): 3245-53.
- Artursson, P. (1990). "Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells." J Pharm Sci **79**(6): 476-82.
- Basque, J. R., M. Chenard, et al. (2001). "Gastric cancer cell lines as models to study human digestive functions." J Cell Biochem **81**(2): 241-51.
- Basuroy, S., P. Sheth, et al. (2003). "Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer." J Biol Chem **278**(14): 11916-24.
- Bayle, D., D. Weeks, et al. (1995). "The membrane topology of the rat sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPases by in vitro translation scanning." J Biol Chem **270**(43): 25678-84.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-29.
- Bhagavathula, N., A. W. Hanosh, et al. (2007). "Regulation of E-cadherin and beta-catenin by Ca²⁺ in colon carcinoma is dependent on calcium-sensing receptor expression and function." Int J Cancer **121**(7): 1455-62.
- Bi, G. and G. Jiang (2006). "The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects." Cell Mol Immunol **3**(4): 285-90.
- Black, A. R., J. D. Black, et al. (2001). "Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer." J Cell Physiol **188**(2): 143-60.
- Bobe, R., R. Bredoux, et al. (2004). "Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 gene." J Biol Chem **279**(23): 24297-306.
- Borge, P. D., Jr. and B. A. Wolf (2003). "Insulin receptor substrate 1 regulation of sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 in insulin-secreting beta-cells." J Biol Chem **278**(13): 11359-68.

- Brandl, C. J., N. M. Green, et al. (1986). "Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences." *Cell* **44**(4): 597-607.
- Brini, M. and E. Carafoli (2009). "Calcium pumps in health and disease." *Physiol Rev* **89**(4): 1341-78.
- Brouland, J. P., P. Gelebart, et al. (2005). "The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis." *Am J Pathol* **167**(1): 233-42.
- Brouland, J. P., P. Valleur, et al. (2006). "[Expression of SERCA pumps during cell differentiation and tumorigenesis: application to colonic carcinogenesis]." *Ann Pathol* **26**(3): 159-72.
- Bull, L. N., M. J. van Eijk, et al. (1998). "A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis." *Nat Genet* **18**(3): 219-24.
- Burge, S. M. and J. D. Wilkinson (1992). "Darier-White disease: a review of the clinical features in 163 patients." *J Am Acad Dermatol* **27**(1): 40-50.
- Caspersen, C., P. S. Pedersen, et al. (2000). "The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2b is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein." *J Biol Chem* **275**(29): 22363-72.
- Chaabane, C., E. Corvazier, et al. (2006). "Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase type 3 isoforms (SERCA3b and SERCA3f): distinct roles in cell adhesion and ER stress." *Biochem Biophys Res Commun* **345**(4): 1377-85.
- Chandrasekera, P. C., M. E. Kargacin, et al. (2009). "Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3." *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(5): C1105-14.
- Chen, J. S., D. V. Faller, et al. (2003). "Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics?" *Curr Cancer Drug Targets* **3**(3): 219-36.
- Chomienne, C., P. Fenaux, et al. (1996). "Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia." *FASEB J* **10**: 1025.
- Cooper, S. M. and S. M. Burge (2003). "Darier's disease: epidemiology, pathophysiology, and management." *Am J Clin Dermatol* **4**(2): 97-105.
- Coradini, D., C. Pellizzaro, et al. (2000). "Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells." *Cell Prolif* **33**(3): 139-46.
- Crepin, A., G. Bidaux, et al. (2007). "Prolactin stimulates prostate cell proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression." *Biochem J* **401**(1): 49-55.
- Dally, S., R. Bredoux, et al. (2006). "Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 2 isoform (SERCA2c)." *Biochem J*.
- de Meis, L., A. P. Arruda, et al. (2003). "The thermogenic function of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase of normal and hyperthyroid rabbit." *Ann N Y Acad Sci* **986**: 481-8.
- de Meis, L. and A. L. Vianna (1979). "Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* **48**: 275-92.
- Denmeade, S. R. and J. T. Isaacs (2005). "The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer." *Cancer Biol Ther* **4**(1): 14-22.
- Denmeade, S. R., C. M. Jakobsen, et al. (2003). "Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* **95**(13): 990-1000.
- Dhitavat, J., C. Cobbold, et al. (2003). "Impaired trafficking of the desmoplakins in cultured

- Darier's disease keratinocytes." J Invest Dermatol **121**(6): 1349-55.
- Dode, L., J. P. Andersen, et al. (2003). "Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of Darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses." J Biol Chem **278**(48): 47877-89.
- Dode, L., C. De Greef, et al. (1998). "Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA." J Biol Chem **273**(22): 13982-94.
- Dode, L., B. Vilsen, et al. (2002). "Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses." J Biol Chem **277**(47): 45579-91.
- Dremina, E. S., V. S. Sharov, et al. (2004). "Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)." Biochem J **383**(Pt 2): 361-70.
- Endo, Y., K. Uzawa, et al. (2004). "Sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma." Int J Cancer **110**(2): 225-31.
- Engle, M. J., G. S. Goetz, et al. (1998). "Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes." J Cell Physiol **174**(3): 362-9.
- Faust, J. B. and T. C. Meeker (1992). "Amplification and expression of the bcl-1 gene in human solid tumor cell lines." Cancer Res **52**(9): 2460-3.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, et al. (2002). "Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence." Mol Cell Biol **22**(10): 3497-508.
- Foggia, L., I. Aronchik, et al. (2006). "Activity of the hSPCA1 Golgi Ca²⁺ pump is essential for Ca²⁺-mediated Ca²⁺ response and cell viability in Darier disease." J Cell Sci **119**(Pt 4): 671-9.
- Foletti, D., D. Guerini, et al. (1995). "Subcellular targeting of the endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca²⁺ pumps: a study using recombinant chimeras." FASEB J **9**(8): 670-80.
- Gelebart, P., T. Kovacs, et al. (2002). "Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation." J Biol Chem **277**(29): 26310-20.
- Gelebart, P., V. Martin, et al. (2003). "Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation." Biochem Biophys Res Commun **303**(2): 676-84.
- Gniadecki, R. and B. Gajkowska (2003). "Intracellular calcium pool emptying induces DNA synthesis in HaCaT keratinocytes." Exp Dermatol **12**(4): 453-9.
- Gramolini, A. O., M. G. Trivieri, et al. (2006). "Cardiac-specific overexpression of sarcolipin in phospholamban null mice impairs myocyte function that is restored by phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2446-51.
- Grasset, E., M. Pinto, et al. (1984). "Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters." Am J Physiol **247**(3 Pt 1): C260-7.
- Gupta, S., G. Alpini, et al. (1994). "Butyrate synchronization of hepatocytes: modulation of cycling and cell cycle regulated gene expression." Growth Factors **10**(3): 171-80.
- Hadad, N., H. E. Meyer, et al. (1999). "Cardiac sarcalumenin: phosphorylation, comparison with the skeletal muscle sarcalumenin and modulation of ryanodine receptor." J Membr Biol

- 170(1):** 39-49.
- Hakii, H., H. Fujiki, et al. (1986). "Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis." J Cancer Res Clin Oncol **111(3)**: 177-81.
- Hamer, H. M., D. Jonkers, et al. (2008). "Review article: the role of butyrate on colonic function." Aliment Pharmacol Ther **27(2)**: 104-19.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100(1)**: 57-70.
- Harmon, C. S., J. Ducote, et al. (1996). "Thapsigargin induces rapid, transient growth inhibition and c-fos expression followed by sustained growth stimulation in mouse keratinocyte cultures." J Invest Dermatol **107(2)**: 188-94.
- Hidalgo, I. J., T. J. Raub, et al. (1989). "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability." Gastroenterology **96(3)**: 736-49.
- Hovnanian, A. (2004). "Darier's disease: from dyskeratosis to endoplasmic reticulum calcium ATPase deficiency." Biochem Biophys Res Commun **322(4)**: 1237-44.
- Humez, S., G. Legrand, et al. (2004). "Role of endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNFalpha." J Cell Physiol **201(2)**: 201-13.
- Inesi, G., M. Kurzmack, et al. (1980). "Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles." J Biol Chem **255(7)**: 3025-31.
- Jilka, R. L., A. N. Martonosi, et al. (1975). "Effect of the purified (Mg²⁺ + Ca²⁺)-activated ATPase of sarcoplasmic reticulum upon the passive Ca²⁺ permeability and ultrastructure of phospholipid vesicles." J Biol Chem **250(18)**: 7511-24.
- Jumarie, C. and C. Malo (1991). "Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro." J Cell Physiol **149(1)**: 24-33.
- Kaczynski, J., T. Cook, et al. (2003). "Sp1- and Kruppel-like transcription factors." Genome Biol **4(2)**: 206.
- Kiela, P. R., E. R. Hines, et al. (2001). "Regulation of the rat NHE3 gene promoter by sodium butyrate." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281(4)**: G947-56.
- Kiela, P. R., N. Kuscuglu, et al. (2007). "Molecular mechanism of rat NHE3 gene promoter regulation by sodium butyrate." Am J Physiol Cell Physiol **293(1)**: C64-74.
- Kiewitz, R., C. Acklin, et al. (2003). "Ca²⁺ -dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase2a and phospholamban in the human heart." Biochem Biophys Res Commun **306(2)**: 550-7.
- Kim, E. and W. Deppert (2004). "Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss." J Cell Biochem **93(5)**: 878-86.
- Korczak, B., A. Zarain-Herzberg, et al. (1988). "Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene." J Biol Chem **263(10)**: 4813-9.
- Korosec, B., D. Glavac, et al. (2006). "Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer." Cancer Genet Cytogenet **171(2)**: 105-11.
- Korosec, B., D. Glavac, et al. (2009). "ATP2A3 gene is involved in cancer susceptibility." Cancer Genet Cytogenet **188(2)**: 88-94.
- Kovacs, T., F. Felfoldi, et al. (2001). "All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene are translated to proteins: a study of their co-expression in platelets and lymphoid cells." Biochem J **358(Pt 3)**: 559-68.

- Kruh, J. (1982). "Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture." Mol Cell Biochem **42**(2): 65-82.
- Kruh, J., N. Defer, et al. (1992). "[Molecular and cellular action of butyrate]." C R Seances Soc Biol Fil **186**(1-2): 12-25.
- Kulkarni, R. N., M. G. Roper, et al. (2004). "Islet secretory defect in insulin receptor substrate 1 null mice is linked with reduced calcium signaling and expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)-2b and -3." Diabetes **53**(6): 1517-25.
- Kuo, T. H., H. R. Kim, et al. (1998). "Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2." Oncogene **17**(15): 1903-10.
- Launay, S., M. Gianni, et al. (1999). "Lineage-specific modulation of calcium pump expression during myeloid differentiation." Blood **93**(12): 4395-405.
- Leach, M. R., M. F. Cohen-Doyle, et al. (2002). "Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin." J Biol Chem **277**(33): 29686-97.
- Leinonen, P. T., R. M. Myllyla, et al. (2005). "Keratinocytes cultured from patients with Hailey-Hailey disease and Darier disease display distinct patterns of calcium regulation." Br J Dermatol **153**(1): 113-7.
- Levy, J., Z. Zhu, et al. (1998). "The effect of glucose and calcium on Ca²⁺-adenosine triphosphatase in pancreatic islets isolated from a normal and a non-insulin-dependent diabetes mellitus rat model." Metabolism **47**(2): 185-9.
- Li, Y. and P. Camacho (2004). "Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57." J Cell Biol **164**(1): 35-46.
- Li, Y., M. Ge, et al. (2004). "Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages." J Biol Chem **279**(35): 37030-9.
- Lin, A. W. and S. W. Lowe (2001). "Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5025-30.
- Lipskaia, L., J. S. Hulot, et al. (2009). "Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation." Pflugers Arch **457**(3): 673-85.
- Liu, L. H., G. P. Boivin, et al. (2001). "Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump." J Biol Chem **276**(29): 26737-40.
- Lompre, A. M., M. Anger, et al. (1994). "Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression." J Mol Cell Cardiol **26**(9): 1109-21.
- Lytton, J. and D. H. MacLennan (1988). "Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene." J Biol Chem **263**(29): 15024-31.
- Lytton, J., M. Westlin, et al. (1992). "Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps." J Biol Chem **267**(20): 14483-9.
- MacLennan, D. H., C. J. Brandl, et al. (1985). "Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence." Nature **316**(6030): 696-700.

- MacLennan, D. H. and E. G. Kranias (2003). "Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 566-77.
- MacLennan, D. H., W. J. Rice, et al. (1997). "The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases." J Biol Chem **272**(46): 28815-8.
- MacLeod, R. J., M. Hayes, et al. (2007). "Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **293**(1): G403-11.
- Mahyar-Roemer, M. and K. Roemer (2001). "p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents." Oncogene **20**(26): 3387-98.
- Mariadason, J. M., D. Arango, et al. (2002). "A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro." Cancer Res **62**(16): 4791-804.
- Mariadason, J. M., M. Bordonaro, et al. (2001). "Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation." Cancer Res **61**(8): 3465-71.
- Martin, V., R. Bredoux, et al. (2002). "Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family." J Biol Chem **277**(27): 24442-52.
- Martonosi, A. N. and S. Pikula (2003). "The structure of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." Acta Biochim Pol **50**(2): 337-65.
- Mayosi, B. M., A. Kardos, et al. (2006). "Heterozygous disruption of SERCA2a is not associated with impairment of cardiac performance in humans: implications for SERCA2a as a therapeutic target in heart failure." Heart **92**(1): 105-9.
- McDonald, S. A., S. L. Preston, et al. (2006). "Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **3**(5): 267-74.
- Michalak, M., E. F. Corbett, et al. (1999). "Calreticulin: one protein, one gene, many functions." Biochem J **344 Pt 2**: 281-92.
- Minamisawa, S., Y. Wang, et al. (2003). "Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling." J Biol Chem **278**(11): 9570-5.
- Miyauchi, Y., T. Daiho, et al. (2006). "Comprehensive analysis of expression and function of 51 sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mutants associated with Darier disease." J Biol Chem **281**(32): 22882-95.
- Moller, J. V., B. Juul, et al. (1996). "Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases." Biochim Biophys Acta **1286**(1): 1-51.
- Monteith, G. R., D. McAndrew, et al. (2007). "Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport." Nat Rev Cancer **7**(7): 519-30.
- Most, P., S. T. Pleger, et al. (2004). "Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium." J Clin Invest **114**(11): 1550-63.
- Mottet, D., S. Pirotte, et al. (2009). "HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism." Oncogene **28**(2): 243-56.
- Nediani, C., A. Celli, et al. (2003). "Acylphosphatase interferes with SERCA2a-PLN association." Biochem Biophys Res Commun **301**(4): 948-51.
- Nediani, C., C. Fiorillo, et al. (1996). "Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium

- pump by acylphosphatase. Relationship to phospholamban phosphorylation." J Biol Chem **271**(32): 19066-73.
- Nishimura K, Y. H., Harwna Y Kajiyama G, Tahara E. (1995). "Alterations of the APC gene in carcinoma cell lines and precancerous lesions of the stomach." Int J Oncol **7**: 587-592.
- Odermatt, A., P. E. Taschner, et al. (1996). "Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease." Nat Genet **14**(2): 191-4.
- Pacifico, F., L. Ulianich, et al. (2003). "The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation." J Mol Endocrinol **30**(3): 399-409.
- Palmgren, M. G. and K. B. Axelsen (1998). "Evolution of P-type ATPases." Biochim Biophys Acta **1365**(1-2): 37-45.
- Pan, Y., E. Zvaritch, et al. (2003). "Targeted disruption of the ATP2A1 gene encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform 1 (SERCA1) impairs diaphragm function and is lethal in neonatal mice." J Biol Chem **278**(15): 13367-75.
- Pani, B., E. Cornatzer, et al. (2006). "Up-regulation of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) following sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 gene silencing promotes cell survival: a potential role for TRPC1 in Darier's disease." Mol Biol Cell **17**(10): 4446-58.
- Pani, B. and B. B. Singh (2007). "Darier's disease: a calcium-signaling perspective." Cell Mol Life Sci.
- Papp, B., J. P. Brouland, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase expression during differentiation of colon cancer and leukaemia cells." Biochem Biophys Res Commun **322**(4): 1223-36.
- Papp, B. and R. A. Byrn (1995). "Stimulation of HIV expression by intracellular calcium pump inhibition." J Biol Chem **270**(17): 10278-83.
- Papp, S., S. Pikula, et al. (1987). "Fluorescence energy transfer as an indicator of Ca²⁺-ATPase interactions in sarcoplasmic reticulum." Biophys J **51**(2): 205-20.
- Pedersen, P. L. (2007). "Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease." J Bioenerg Biomembr **39**(5-6): 349-55.
- Pellizzaro, C., D. Coradini, et al. (2001). "Modulation of cell cycle-related protein expression by sodium butyrate in human non-small cell lung cancer cell lines." Int J Cancer **91**(5): 654-7.
- Prasad, V., G. P. Boivin, et al. (2005). "Haploinsufficiency of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump, predisposes mice to squamous cell tumors via a novel mode of cancer susceptibility." Cancer Res **65**(19): 8655-61.
- Ranaldi, G., K. Islam, et al. (1992). "Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents." Antimicrob Agents Chemother **36**(7): 1374-81.
- Rangarajan, A. and R. A. Weinberg (2003). "Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice." Nat Rev Cancer **3**(12): 952-9.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." J Biol Chem **276**(36): 33869-74.
- Roderick, H. L. and S. J. Cook (2008). "Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺

- for cancer cell proliferation and survival." Nat Rev Cancer **8**(5): 361-75.
- Roderick, H. L., J. D. Lechleiter, et al. (2000). "Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca²⁺ oscillations via an interaction with SERCA2b." J Cell Biol **149**(6): 1235-48.
- Sakuntabhai, A., V. Ruiz-Perez, et al. (1999). "Mutations in ATP2A2, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease." Nat Genet **21**(3): 271-7.
- Sambuy, Y., I. De Angelis, et al. (2005). "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics." Cell Biol Toxicol **21**(1): 1-26.
- Schaefer, A., M. Magocsi, et al. (1994). "Early transient suppression of c-myb mRNA levels and induction of differentiation in Friend erythroleukemia cells by the [Ca²⁺]_i-increasing agents cyclopiazonic acid and thapsigargin." J Biol Chem **269**(12): 8786-91.
- Schleef, M., D. Simon-Chazottes, et al. (1996). "The gene encoding sarcoplasmic reticulum calcium ATPase-1 (Atp2a1) maps to distal mouse chromosome 7." Mamm Genome **7**(10): 788.
- Seth, A., P. Sheth, et al. (2007). "Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer." J Biol Chem **282**(15): 11487-98.
- Seth, M., C. Sumbilla, et al. (2004). "Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the Ca²⁺ signaling mechanism in cardiac myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16683-8.
- Shull, G. E., G. Okunade, et al. (2003). "Physiological functions of plasma membrane and intracellular Ca²⁺ pumps revealed by analysis of null mutants." Ann N Y Acad Sci **986**: 453-60.
- Siavoshian, S., J. P. Segain, et al. (2000). "Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression." Gut **46**(4): 507-14.
- Spurling, C. C., C. A. Godman, et al. (2008). "HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation." Mol Carcinog **47**(2): 137-47.
- Su, H. W., H. H. Yeh, et al. (2007). "Cell confluence-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) triggers epithelial dome formation via augmentation of sodium hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression." J Biol Chem **282**(13): 9883-94.
- Sumbilla, C., M. Cavagna, et al. (1999). "Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes." Am J Physiol **277**(6 Pt 2): H2381-91.
- Suriano, G., N. Vrcelj, et al. (2005). "beta-catenin (CTNNB1) gene amplification: a new mechanism of protein overexpression in cancer." Genes Chromosomes Cancer **42**(3): 238-46.
- Sweadner, K. J. and C. Donnet (2001). "Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum." Biochem J **356**(Pt 3): 685-704.
- Tavadia, S., K. S. Authi, et al. (2004). "Expression of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase type 2 and 3 isoforms in normal skin and Darier's disease." Br J Dermatol **151**(2): 440-5.
- Tavadia, S., R. C. Tait, et al. (2001). "Platelet and cardiac function in Darier's disease." Clin Exp Dermatol **26**(8): 696-9.

- Tazoe, H., Y. Otomo, et al. (2009). "Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon." Biomed Res **30**(3): 149-56.
- Toyoshima, C. and G. Inesi (2004). "Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum." Annu Rev Biochem **73**: 269-92.
- Toyoshima, C., M. Nakasako, et al. (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution." Nature **405**(6787): 647-55.
- Toyoshima, C. and H. Nomura (2002). "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium." Nature **418**(6898): 605-11.
- Vachon, P. H., N. Perreault, et al. (1996). "Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes." J Cell Physiol **166**(1): 198-207.
- van Breemen, R. B. and Y. Li (2005). "Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption." Expert Opin Drug Metab Toxicol **1**(2): 175-85.
- Vanden Abeele, F., R. Skryma, et al. (2002). "Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells." Cancer Cell **1**(2): 169-79.
- Vanderkooi, J. M., A. Ierokomas, et al. (1977). "Fluorescence energy transfer between Ca²⁺-transport ATPase molecules in artificial membranes." Biochemistry **16**(7): 1262-7.
- Vangheluwe, P., L. Raeymaekers, et al. (2005). "Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications." Cell Calcium **38**(3-4): 291-302.
- Vanhoutvin, S. A., F. J. Troost, et al. (2009). "Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa." PLoS One **4**(8): e6759.
- Varadi, A., L. Lebel, et al. (1999). "Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48)." Diabetologia **42**(10): 1240-3.
- Ver Heyen, M., S. Heymans, et al. (2001). "Replacement of the muscle-specific sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform SERCA2a by the nonmuscle SERCA2b homologue causes mild concentric hypertrophy and impairs contraction-relaxation of the heart." Circ Res **89**(9): 838-46.
- Verboomen, H., F. Wuytack, et al. (1992). "Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca²⁺ pumps and their modulation by phospholamban." Biochem J **286** (Pt 2): 591-5.
- Verboomen, H., F. Wuytack, et al. (1994). "The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca²⁺-transport ATPase (SERCA2a/b)." Biochem J **303** (Pt 3): 979-84.
- Waldron, R. T., A. D. Short, et al. (1994). "Endoplasmic reticulum calcium pump expression and control of cell growth." J Biol Chem **269**(16): 11927-33.
- Walker, S. A., P. J. Cullen, et al. (2003). "Control of Ras cycling by Ca²⁺." FEBS Lett **546**(1): 6-10.
- Whitfield, J. F. (2009). "Calcium, calcium-sensing receptor and colon cancer." Cancer Lett **275**(1): 9-16.
- Wilson, A. J., D. S. Byun, et al. (2008). "HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21." Mol Biol Cell **19**(10): 4062-75.
- Wilson, A. J., D. S. Byun, et al. (2006). "Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I

- HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer." J Biol Chem **281**(19): 13548-58.
- Wong, J. M., R. de Souza, et al. (2006). "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids." J Clin Gastroenterol **40**(3): 235-43.
- Wootton, L. L. and F. Michelangeli (2006). "The effects of the phenylalanine 256 to valine mutation on the sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) Ca²⁺ pump isoforms 1, 2, and 3 to thapsigargin and other inhibitors." J Biol Chem **281**(11): 6970-6.
- Wuytack, F., L. Raeymaekers, et al. (1992). "Ca(2+)-transport ATPases and their regulation in muscle and brain." Ann N Y Acad Sci **671**: 82-91.
- Xu, G. G., Z. Y. Gao, et al. (2000). "Insulin regulation of beta-cell function involves a feedback loop on SERCA gene expression, Ca(2+) homeostasis, and insulin expression and secretion." Biochemistry **39**(48): 14912-9.
- Yokozaki, H. (2000). "Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan." Pathol Int **50**(10): 767-77.
- Yoshida, M., S. Minamisawa, et al. (2005). "Impaired Ca²⁺ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcalumenin-deficient mice." J Biol Chem **280**(5): 3500-6.
- Zarain-Herzberg, A. and G. Alvarez-Fernandez (2002). "Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-2 gene: structure and transcriptional regulation of the human gene." ScientificWorldJournal **2**: 1469-83.