



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *ATP2A3* (SERCA3) TRAS LA  
DIFERENCIACIÓN DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE CÁNCER GÁSTRICO  
Y DE COLON

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Lucía Flores Peredo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg  
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

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

Ciudad de México, Noviembre 2017.



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.

# REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *ATP2A3* (SERCA3) TRAS LA DIFERENCIACIÓN DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE CÁNCER GÁSTRICO Y DE COLON

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de doctorado 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 Alfonso 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 y la Dra. Cristina Castañeda Patlán por su apoyo en la realización de los experimentos que fundamentan ésta tesis.

El proyecto fue apoyado parcialmente por donativos de CONACYT No.78750 y No. 164413; y por los donativos de PAPIIT-DGAPA-UNAM IN213613 y IN217216 para A.Z.-H. Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT No. 215102 para la realización de la presente tesis, además de apoyo económico para la asistencia a Congresos Nacionales e Internacionales por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

El Jurado de Examen de Doctorado estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marcela Lizano Soberón
Vocal	Dr. Alfonso Dueñas González
Vocal	Dra. Mayra Furlan Magaril
Vocal	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Secretario	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

## AGRADECIMIENTOS

A Margarita Peredo, mi madre, la mujer más fuerte, ejemplo de nobleza, paciencia, amor incondicional y quién me regala su sabiduría desde que tengo memoria.

A Pedro Flores, mi padre, que me protege y ha protegido siempre, con su calidez, ternura y amor, con él aprendí a debatir, además es mi ejemplo de responsabilidad y trabajo incansable.

A mis hermanos que me cuidan aún a pesar de mi carácter independiente y con quienes comparto un cálido ambiente familiar.

A mi compañero Eric Flores, con quién disfruté y aprendo de la vida.

Agradezco el acompañamiento amistoso de mis pares de trabajo Jorge Fragoso, Eduardo Izquierdo, Gabriel Moreno, Julián Guzmán, Abigail Guzmán, Rafael Estrada y Lola Hernández, con quienes día a día aprendí no solo de ciencia sino también experiencias que me acompañarán durante toda mi vida.

A mi amiga Gabriela Carranza Pérez, mi compañera de carrera académica, de vida y pasión por los felinos, quién partió pronto de éste mundo pero que llevaré siempre en mi corazón, procurando imitar su perfeccionismo, dedicación y amor por los demás.

A mis amigos Gabriel Muciño, Esmeralda Soto, Sazitl Jardón, Pablo Argott, Alberto Hernández, a quienes admiro y quiénes aunque a distancia, gozo de su apoyo y espero seguir conservando su valiosa compañía.

A Gabriela Rodríguez quién se ha convertido en un apoyo incondicional, compartiendo su experiencia, su tiempo y energía, quién además de exigir calidad en el trabajo, protege y cuida indistintamente a cada integrante del laboratorio.

A la UNAM, mi segunda casa desde el bachillerato, con quién mantengo una deuda por el conocimiento académico y valores adquiridos durante mi formación.

A mi comité tutorial, quienes dedicaron su tiempo, conocimiento y experiencia para enriquecer y fortalecer el resultado de éste trabajo, así como mi desarrollo profesional.

## ÍNDICE

<b>RECONOCIMIENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>8</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>13</b>
2.1 LAS BOMBAS DE CALCIO DEL RETÍCULO SARCO/ENDOPLÁSMICO .....	13
2.2 EXPRESIÓN DE SERCA3 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL CÁNCER .....	16
2.3 ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DEL GEN <i>ATP2A3</i> .....	18
2.4 ELEMENTOS REGULATORIOS BASALES DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN <i>ATP2A3</i> HUMANO .....	23
2.5 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DEL GEN <i>ATP2A3</i> HUMANO .....	24
2.5.1 Familia de Factores de Transcripción tipo Krüppel .....	24
2.5.2 Factor de Transcripción tipo Krüppel-4 (KLF-4).....	26
2.5.3 Factores de Transcripción Sp1 y Sp3 .....	28
2.6 DESACETILASAS DE HISTONAS (HDAC'S).....	29
2.7 MODELOS DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS CANCEROSAS .....	30
2.7.1 Butirato y diferenciación del epitelio del colon.....	30
2.7.2 Modelo de diferenciación por confluencia celular .....	32
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>35</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>35</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>36</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>36</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
7.1 Estrategia experimental.....	37

7.2 Cultivos celulares y tratamientos farmacológicos .....	38
7.3 Purificación de ARN total y qRT-PCR en tiempo real.....	38
7.4 Aislamiento de proteína total.....	40
7.5 Determinación de la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ).....	40
7.6 Construcciones de plásmidos.....	41
7.7 Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa.....	41
7.8 Extractos nucleares .....	42
7.9 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) .....	42
7.10 Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).....	43
7.11 Mutagénesis sitio dirigida.....	44
7.12 Análisis estadístico .....	45
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
8.1 Expresión de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en la línea celular de cáncer gástrico KATO-III tras la diferenciación celular con butirato. ....	46
8.2 Expresión de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en la línea celular de cáncer gástrico KATO-III tras la diferenciación celular con Tricostatina A.....	47
8.3 Expresión de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 tras la diferenciación celular por confluencia celular.....	49
8.4 Cambio en la abundancia relativa de isoformas de SERCA en las líneas celulares de cáncer gástrico y de colon tras la diferenciación celular. ....	51
8.5 Determinación de calcio intracelular en líneas celulares de cáncer gástrico y de colon inducidas a diferenciación.....	53
8.6 Análisis de la secuencia del promotor de <i>ATP2A3</i> humano. ....	55
8.7 Determinación de la actividad transcripcional de construcciones quiméricas del promotor del gen humano <i>ATP2A3</i> . ....	58
8.8 Expresión diferencial de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y KLF4 después de la diferenciación celular.....	61
8.9 Ensayo <i>in vitro</i> de unión ADN-proteína que demuestra la unión de factores de transcripción por su secuencia blanco en el promotor de <i>ATP2A3</i> .....	62
8.10 Ensayo <i>in vivo</i> de unión ADN-proteína que demuestra la unión de factores de transcripción por su secuencia blanco en el promotor de <i>ATP2A3</i> .....	67

8.11 Ensayo <i>in vivo</i> que demuestra que el aumento en la expresión de SERCA3 en células diferenciadas de cáncer epitelial se acompaña de modificación en residuos de histonas que favorecen su expresión.....	69
8.12 Efecto de la mutación sitio dirigida de los elementos <i>cis</i> del promotor de <i>ATP2A3</i> en la actividad transcripcional del promotor. ....	70
<b>9. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>11. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>82</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del splicing alternativo de los genes humanos <i>ATP2A1-3</i> .....	14
Figura 2. Análisis de la actividad transcripcional de diferentes construcciones del promotor del gen humano <i>ATP2A3</i> en células Jurkat E6.1 fusionadas al gen de luciferasa como gen reportero. ....	19
Figura 3. Comparación de las regiones reguladoras del gen <i>ATP2A3</i> humano y de ratón. ....	20
Figura 4. Isla CpG del gen humano de <i>ATP2A3</i> .....	22
Figura 5. Elementos regulatorios de la transcripción basal.....	23
Figura 6. Familia de factores de transcripción tipo Krüppel.....	25
Figura 7. Dominios funcionales del factor de transcripción Klf-4.....	27
Figura 8. Esquema de la función dual de Klf-4 en la transcripción.....	28
Figura 9. Esquema de funcionamiento del butirato de sodio en la diferenciación de epitelios.....	32
Figura 10. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III diferenciadas con butirato .....	47
Figura 11. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III diferenciadas con Tricostatina A .....	48
Figura 12. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células Caco-2 diferenciadas por confluencia celular.....	50
Figura 13. Expresión relativa de las isoformas de ARNm de SERCA en células Caco-2 y KATO-III, antes y después de la diferenciación celular .....	52
Figura 14. Determinación de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en células KATO-III antes y después de la diferenciación.....	55
Figura 15. Análisis in silico de las regiones proximales 5' del gen <i>ATP2A3</i> entre especies ....	58
Figura 16. La inducción de la diferenciación celular aumenta la actividad de construcciones del promotor humano de <i>ATP2A3/Luc</i> .....	59
Figura 17. El tratamiento con Actinomicina D bloquea el aumento en la expresión de ARNm de SERCA3, así como de la actividad transcripcional del promotor <i>ATP2A3/Luc</i> inducido por butirato .....	60
Figura 18. Expresión de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf-4 en células KATO-III diferenciadas con butirato.....	62

Figura 19. Ensayo in vitro de interacción de elementos putativos del promotor proximal de <i>ATP2A3</i> con extractos nucleares de células Caco-2.....	64
Figura 20. Ensayo in vitro de interacción de elementos putativos del promotor proximal de <i>ATP2A3</i> con extractos nucleares de células KATO-III.....	66
Figura 21. Regulación de la expresión de SERCA3 mediante la unión diferencial de Sp1, Sp3 y Klf4 con sus secuencias blanco en el promotor de <i>ATP2A3</i> .....	68
Figura 22. Regulación de la expresión de SERCA3 a través de modificación de residuos de histona en el promotor de <i>ATP2A3</i> .....	69
Figura 23. La mutación de los elementos cis Sp y Klf bloquea la expresión basal de <i>ATP2A3</i> y su transactivación a través de inhibidores de HDAC's .....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Afinidad por calcio y cinética de las diferentes isoformas de SERCA.....	17
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el qRT-PCR.....	39
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) .....	43
Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos para generar mutantes de los elementos Sp y Klf....	45

## ABREVIATURAS

[Ca<sup>2+</sup>]: concentración del catión calcio

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

APC: adenomatous polyposis coli

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: trifosfato de adenosina

ATP2A1-3: genes que codifican las proteínas SERCA1-3, respectivamente

HDAC's: desacetilasas de histonas

iHDAC's: inhibidor de HDAC's

IP3: trifosfato de inositol

KLF: factor de transcripción tipo Krüppel

pb: par de bases

PSMA: antígeno de membrana específico de próstata

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RE: retículo endoplásmico

SCFA: ácido graso de cadena corta

SERCA: bomba ATPasa de Calcio del retículo sarco/endoplásmico

Sp1: factor de transcripción Sp1 (specificity factor 1)

## RESUMEN

Las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (SERCA's), bombean  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el lumen del retículo endoplásmico modulando las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico para regular varios procesos celulares incluyendo el crecimiento de células tumorales. Estudios previos han reportado disminución en la expresión de la proteína SERCA3 en líneas celulares de cáncer gástrico y de colon, y mostró que la diferenciación celular *in vitro* aumenta su expresión. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos de transcripción y factores de transcripción que regulan la expresión SERCA3 en las células cancerosas epiteliales. En este trabajo, se demuestra que el ARNm de SERCA3 aumenta hasta 45 veces en dos líneas celulares de cáncer epitelial, KATO-III y Caco-2, inducidas a diferenciación con inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACI) y por la confluencia celular, respectivamente. Para evaluar los elementos transcripcionales que responden a los estímulos de diferenciación celular, se clonó el promotor *ATP2A3* humano, generando construcciones por delección y transfectándolas en células KATO-III. Mediante análisis funcionales se localizaron elementos de ADN basales y responsivos a diferenciación dentro de la región promotora proximal de -135 pb. A través de ensayos de unión de ADN-proteína y mutagénesis sitio dirigida, se encontró unión de los factores de transcripción Sp1, Sp3, y Klf-4 a elementos del promotor proximal de *ATP2A3*, regulando la expresión basal del gen. Se demostró que estos factores de transcripción participan en el aumento de expresión de *ATP2A3* durante la diferenciación celular de células tumorales. Éste estudio proporciona evidencia de que Sp1, Sp3, y Klf-4 modulan la expresión transcripcional de SERCA3 durante la inducción de la diferenciación de células de cáncer epitelial.

## ABSTRACT

The sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (SERCAs), pumps  $\text{Ca}^{2+}$  into the endoplasmic reticulum lumen modulating cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations to regulate various cellular processes including tumor cell growth. Previous studies have reported downregulation of SERCA3 protein expression in gastric and colon cancer cell lines and showed that *in vitro* cell differentiation increases its expression. However, little is known about the transcriptional mechanisms and transcription factors that regulate SERCA3 expression in epithelial cancer cells. In this work, we demonstrate that SERCA3 mRNA is upregulated up to 45-fold in two epithelial cancer cell lines, KATO-III and Caco-2, induced to differentiate with histone deacetylase inhibitors (HDACi) and by cell confluence, respectively. To evaluate the transcriptional elements responding to the cell differentiation stimuli, we cloned the human *ATP2A3* promoter, generated deletion constructs and transfected them into KATO-III cells. Basal and differentiation responsive DNA elements were located by functional analysis within the first -135 bp of the proximal promoter region. Using site-directed mutagenesis and DNA-protein binding assays we found that Sp1, Sp3, and Klf-4 transcription factors bound to *ATP2A3* proximal promoter elements that regulate basal gene expression. We showed that these factors participated in the increase of *ATP2A3* expression during cancer cell differentiation. This study provides evidence for the first time that Sp1, Sp3, and Klf-4 transcriptionally modulate the expression of SERCA3 during induction of epithelial cancer cell differentiation.

## 1. INTRODUCCIÓN

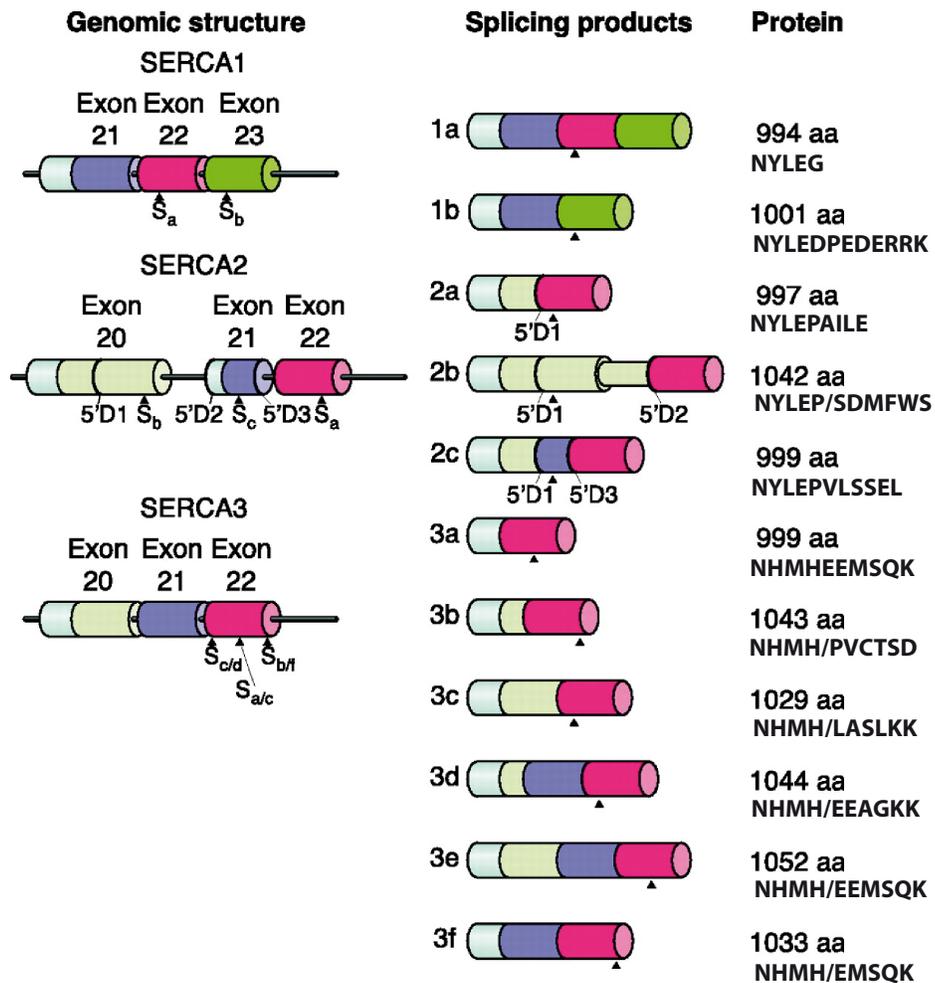
Las ATPasas de calcio del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) son codificadas por tres genes *ATP2A1*, 2 y 3, los cuales producen una isoforma de la proteína SERCA1, 2 o 3, respectivamente, cuyo patrón de expresión varía entre los diferentes tejidos y estado de diferenciación de las células. La proteína SERCA3 se expresa abundantemente en epitelios, endotelios, sistema nervioso y en células de origen hematopoyético. La expresión de SERCA3 en epitelios como el colon e intestino delgado, así como en células del sistema nervioso, guarda una relación directa con el grado de diferenciación de dichos tejidos. A la fecha, un grupo de investigación identificó la disminución o incluso pérdida de la expresión de la proteína SERCA3 en cáncer gástrico y de colon, estableciendo una correlación inversa entre su abundancia y el grado de displasia del tumor, es decir a mayor grado de displasia menor expresión de la bomba SERCA3. Además, el mismo grupo identificó que es posible inducir la expresión de la proteína mediante diferenciación *in vitro* utilizando dos modelos: a) mediante tratamiento con butirato de sodio (ácido graso de cadena corta, producto del metabolismo de las fibras de la dieta por la flora habitual del intestino); b) inducida por confluencia celular (1). Utilizando ambos modelos, nosotros pudimos identificar que la inducción de la expresión de SERCA3 ocurre también a nivel de ARNm del gen *ATP2A3*. Existe poca información sobre la regulación transcripcional del gen *ATP2A3*, por lo que éste proyecto pretende evaluar los factores de transcripción y modificaciones epigenéticas que llevan al aumento en su expresión tras inducir diferenciación celular *in vitro* en dos líneas humanas de cáncer gástrico y de colon.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 LAS BOMBAS DE CALCIO DEL RETÍCULO SARCO/ENDOPLÁSMICO

El ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un segundo mensajero ubicuo cuya señalización controla muchas de las funciones celulares como contracción muscular, diferenciación, proliferación, apoptosis, estrés oxidativo; síntesis, procesamiento y plegamiento de proteínas, por lo que su homeostasis es muy importante para que estas funciones se lleven a cabo de forma normal (2).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se modula en tiempo y espacio a través de canales, bombas e intercambiadores, las bombas SERCA (ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico) desempeñan un papel clave en la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ , participando en su distribución espacio-temporal dentro de la célula. La bomba de calcio SERCA, se encarga de mantener baja la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  (10-200 nM) en todas las células mediante transporte activo hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE), organelo que constituye su principal reservorio. En el humano, la bomba SERCA es codificada por tres genes denominados *ATP2A1-3*, cada uno de los cuales codifica diferentes isoformas de la proteína (SERCA1a,b; SERCA2a-c; SERCA3a-f, respectivamente) como resultado de splicing alternativo y cuya expresión se modula de forma tejido específica y en diferentes estadios del desarrollo (Figura 1) (3-5).



**Figura 1. 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 pseudo-exón 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<sub>a-f</sub> 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 (6).

Las diferentes isoformas de SERCA3 se distinguieron de las bombas SERCA1 y SERCA2 por su expresión en células no musculares, a la fecha se ha detectado su expresión en epitelios,

endotelios, células del linaje hematopoyético y diferentes glándulas. En los órganos principales como hígado, bazo, pulmón, riñón, cerebro, estómago, intestino, corazón y sistema reproductor también hay expresión de SERCA3 con diferentes grados de abundancia. La expresión de SERCA3 también varía según el grado de maduración de las células, por lo que se ha estudiado y propuesto que SERCA3 tiene una participación fundamental en el desarrollo embrionario, neuronal, del sistema hematopoyético, así como del epitelio intestinal (7-9). Aunque su expresión está ampliamente distribuida, esta no se considera ubicua, porque a diferencia del ratón *knock out* de SERCA2 (cuya isoforma SERCA2b se expresa en todos los tipos celulares) que resulta incompatible con la vida, el ratón *knock out* de SERCA3 es viable y sin fenotipo de enfermedad. La expresión de SERCA3 está modulada durante el proceso de diferenciación normal donde se observa que en los tejidos analizados incrementa (1,8,10).

A la fecha existen múltiples reportes de mutación o alteración en la expresión de moléculas que se encargan del manejo y vías de señalización por calcio, en muchos tipos de cáncer. Sin embargo, la evidencia directa entre deficiencia de SERCA y la formación de tumores fue provista por el estudio en ratones heterocigotos deficientes de una copia del gen SERCA2 (*Atp2a2*<sup>+/-</sup>) que presentan una alta incidencia de carcinomas de células escamosas (mucosa oral, lengua, esófago, estómago, genitales y áreas de la piel que carecen de vello), como resultado directo de la haploinsuficiencia del gen *Atp2a2*. En los tumores analizados de ratones *Atp2a2*<sup>+/-</sup> no se detectaron mutaciones que afecten a los genes *ras* o *p53*, apuntando a que el evento inicial en la tumorigénesis inducida por mutaciones *Atp2a2*<sup>+/-</sup> no siguen la vía clásica de ganancia de función de éstos. De forma inesperada se encontró aumentada la expresión de p53 lo cual se asocia con la lenta progresión de los tumores (11). Hay reportes que indican que la expresión de la isoforma SERCA2b esta significativamente disminuida en cáncer oral (un carcinoma de células escamosas) así como en cáncer de tiroides (12). Alternativamente, han sido detectadas mutaciones somáticas y en línea germinal del gen *ATP2A2* en pacientes con cáncer de colon provocando la pérdida o la reducción en la expresión de SERCA2b (13). También se ha reportado disminución de su expresión como resultado de silenciamiento del gen por metilación de su promotor, conduciendo a la propuesta de que *ATP2A2* puede funcionar como un gen supresor de tumores (14).

## 2.2 EXPRESIÓN DE SERCA3 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL CÁNCER

La abundante expresión de SERCA3, se ha visto que disminuye drásticamente hasta hacerse incluso indetectable en carcinomas de colon, lo anterior fue demostrado mediante inmunohistoquímica en muestras de pacientes además de en múltiples líneas neoplásicas de colon. Sin embargo, es posible inducir la expresión de SERCA3 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. Mediante inmunohistoquímica se comprobó que la expresión de SERCA3 corresponde con el estado de diferenciación de las células del colon normal, siendo mayor en células diferenciadas y menor en las células poco diferenciadas, lo cual es concordante con la des-diferenciación que sufren las células tumorales. El análisis de su expresión en los adenocarcinomas de colon mostró que está globalmente disminuida cuando se compara con la mucosa normal, además de que la pérdida de su expresión es más pronunciada conforme aumenta el grado de displasia (pérdida de la diferenciación) (1). Las observaciones anteriores les llevan a concluir que la disminución en la expresión de SERCA3 es un evento temprano en un proceso que implica múltiples pasos para el desarrollo de la carcinogénesis en el colon (15).

La taspigargina es un inhibidor de la actividad de la bomba SERCA y sirve como un agente promotor de tumores de diferentes estadios en la piel del ratón (16) y también se ha demostrado que induce la síntesis de ADN (17) estimulando el crecimiento de queratinocitos en cultivo (18). Sin embargo, no es claro si estos efectos se deben a la inhibición parcial de SERCA (simulando haploinsuficiencia), a su completa inhibición (pérdida de la heterocigocidad) o a un efecto independiente de SERCA. También hay evidencia de que la pérdida de la actividad de SERCA y el consecuente vaciado de los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  induce proliferación en diferentes tipos celulares normales y neoplásicos a través de la entrada del catión por la apertura de canales sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de la vía NFAT. Algunos grupos han reportado que en ciertas líneas tumorales hay un incremento en la expresión de SERCA2b y un aumento en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, los cuales son requeridos para la inducción de la proliferación, sin embargo, las vías moleculares involucradas no han sido identificadas (19).

La afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  de las isoformas de SERCA3 ( $K_{0.5}=1.1 \mu\text{M}$ ) es inferior a la de la isoforma de expresión ubicua, SERCA2b ( $K_{0.5}=0.3 \mu\text{M}$ ), por lo tanto el reemplazo de SERCA2b por SERCA3 durante el proceso de diferenciación celular puede conducir a la disminución en el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y por lo tanto a mayores  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el citosol lo que llevaría a señales más pronunciadas del catión en el citosol hacia la estimulación de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis (ver Tabla 1). Además se ha propuesto que en ciertos tipos celulares, SERCA3 puede estar asociada específicamente con la parte movilizable de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  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 (15).

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

Isoforma de SERCA	$K_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	Velocidad de hidrólisis de ATP ( $\text{s}^{-1}$ )	Velocidad de disociación de calcio ( $\text{s}^{-1}$ )
SERCA1a	$0.32 \pm 0.02^a$ $0.31 \pm 0.02^b$	95 <sup>a</sup> 130 <sup>c</sup>	27 <sup>a,b</sup>
SERCA2a	$0.21 \pm 0.01^b$	70 <sup>c</sup>	23 <sup>b</sup>
2b	$0.13 \pm 0.01^b$	35 <sup>c</sup>	2.5 <sup>b</sup>
2c	** <sup>c</sup>	36 <sup>c</sup>	ND
SERCA3a	$1.47 \pm 0.17^a$	132 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>
3b	$1.27 \pm 0.10^a$	149 <sup>a</sup>	73 <sup>a</sup>
3c	$1.57 \pm 0.14^a$	134 <sup>a</sup>	73 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Estudio entre SERCA1 y SERCA3 (Dode, Vilsen et al. 2002)(20);

<sup>b</sup> Estudio entre SERCA1 y SERCA2 (Dode, Andersen et al. 2003)(21); ND.- no detectada;

<sup>c</sup> (Dally, Bredoux et al. 2006) (22) el valor de  $K_{0.5}$  reportado es 0.604 el cual es muy similar al reportado para 2b 0.508, sin embargo, no se coloca en la tabla porque no se encuentra en el mismo orden de magnitud que los ya citados.

Las observaciones anteriores establecen que la bomba SERCA, desempeña un papel clave en el programa celular, contribuye para la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, la cual es determinante para la diferenciación y la función normal de la célula, así como una posible participación en el desarrollo de neoplasias.

SERCA3 se expresa invariablemente en conjunto con la isoforma ubicua SERCA2b, y puesto que posee una afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  mucho menor, se sugiere que funciona en un ambiente celular particular. Los ratones *knock out* de SERCA3 son viables y aunque presentan defectos en la relajación del músculo liso *in vitro* no tienen el fenotipo de ninguna enfermedad (23).

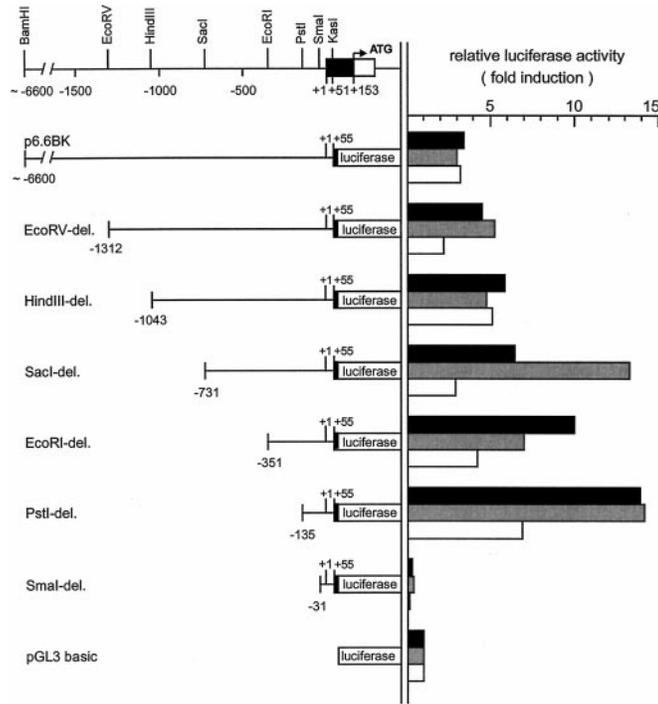
El gen SERCA3 (*ATP2A3*) ha sido poco estudiado, sin embargo es el miembro de las bombas SERCA con mayor número de isoformas de la proteína SERCA3a-f, su región promotora se encuentra dentro de una isla CpG lo cual indica que su expresión podría estar regulada por el mecanismo epigenético de metilación del ADN (Figura 4), cómo se ha probado con el gen de SERCA2, donde se observó disminución de su expresión por hipermetilación de su región promotora en células de cáncer oral (14). El promotor de *ATP2A3* carece de caja TATA y se conoce que factores de transcripción como Sp1 y Ets-1 modulan la expresión basal del gen *ATP2A3* en células endoteliales de humano y ratón (24,25), pero poco se sabe acerca de la regulación de su expresión en células tumorales.

### **2.3 ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DEL GEN *ATP2A3***

En el humano el gen *ATP2A3* comprende 40.59 kb del cromosoma 17p13.3, está formado por 23 exones que codifican un transcrito de 4.7 kb, el cual por procesamiento alternativo genera 6 variantes funcionales de la proteína SERCA3 (a-f) de ~100 kDa, que difieren en su extremo carboxilo. Cada una de las isoformas se expresan diferencialmente entre los tejidos, aunque también se encuentran co-expresadas dos o más de éstas en un mismo tipo celular (26-29).

El promotor del gen *ATP2A3* humano fue clonado por el grupo de Dode en 1998, quienes identificaron que el gen posee una secuencia iniciadora (Inr) en vez de una caja TATA clásica, identificaron un sitio único de inicio de la transcripción ubicado a 152 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, ambos inmersos dentro una isla CpG de 1.5 kb (5). El análisis funcional de construcciones de diferente longitud del promotor de *ATP2A3* a través de un sistema de gen reportero en células Jurkat (línea celular de linfocitos T), identificó que la región -135 a -31 pb contiene los elementos mínimos necesarios para la transcripción de éste gen, por lo que se le estableció como promotor basal del gen *ATP2A3* (ver Figura 2) (5). La determinación de la actividad transcripcional del promotor del gen *ATP2A3* muestra que corriente arriba de la secuencia de -735 existen elementos que regulan de forma negativa al

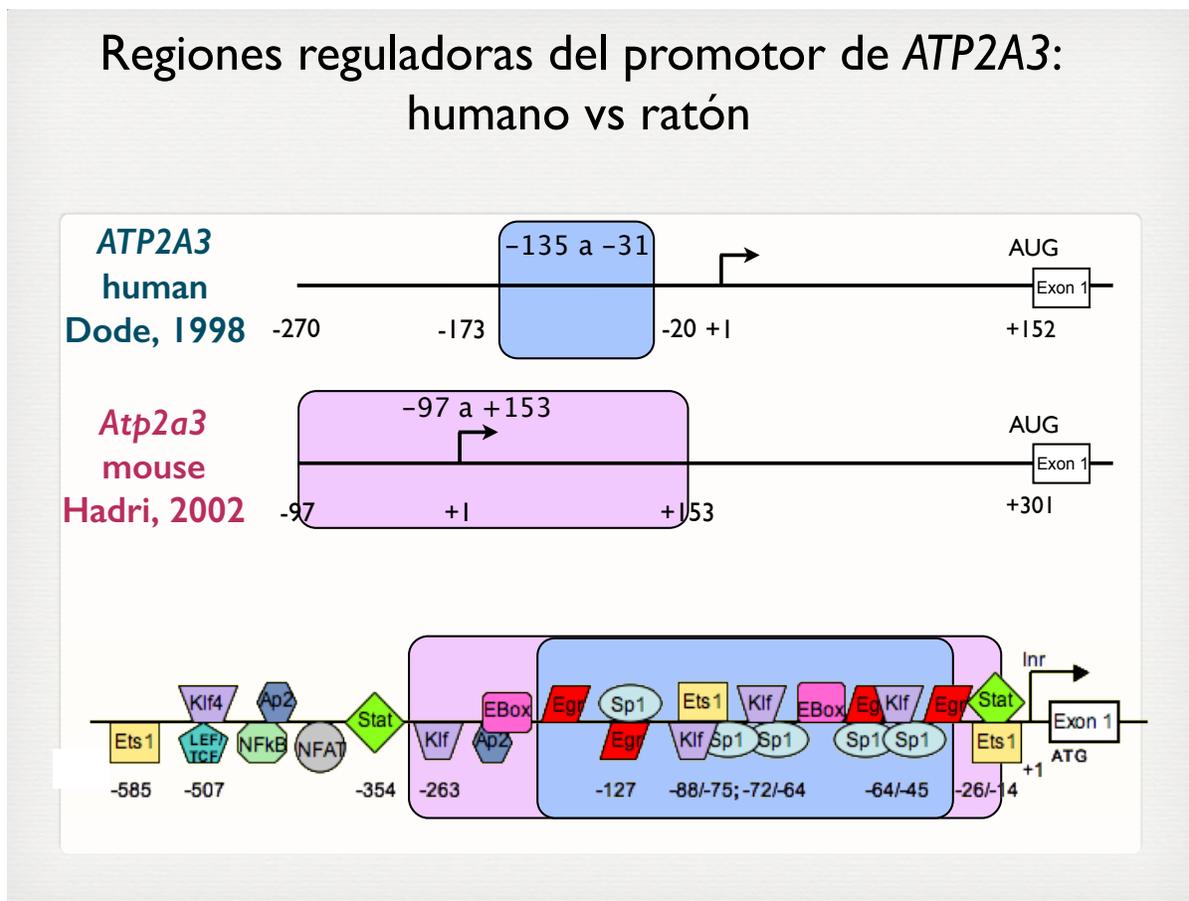
gen. Un análisis *in silico* de la región reguladora-5' realizado por el mismo grupo encontró diferentes elementos *cis* en el promotor de *ATP2A3* que pueden modular su expresión, entre los cuales describen elementos Sp1, Ap2, Ets-1, MyoD, y GATA (5). A la fecha no se ha determinado la actividad de las diferentes construcciones del gen *ATP2A3* en células del epitelio intestinal normales o cancerosas.



**Figura 2. Análisis de la actividad transcripcional de diferentes construcciones del promotor del gen humano *ATP2A3* en células Jurkat E6.1 fusionadas al gen de luciferasa como gen reportero.** El +1 denota el sitio de inicio de la transcripción (TSS), en números positivos y negativos se denotan secuencias corriente arriba o corriente abajo del TSS, respectivamente. Las barras blanco, gris y negro representan resultados de tres determinaciones de actividad. Tomado de Dode, L., et al. 1998 (5).

En 2002 el grupo de Hadri, identificó en células endoteliales de ratón un sitio único de la transcripción (TSS) en el gen *Atp2a3* del ratón, ubicado a 301 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción (24), distinto al identificado por Dode en el gen humano ubicado a 152 pb (Figura 3). Además, establecieron que los factores Sp1 y Ets-1 como los elementos *cis* responsables en conducir la transcripción basal del gen *Atp2a3*, ambos ubicados dentro del promotor proximal mínimo identificado por su grupo como de -97 a +153 pb. Cabe destacar

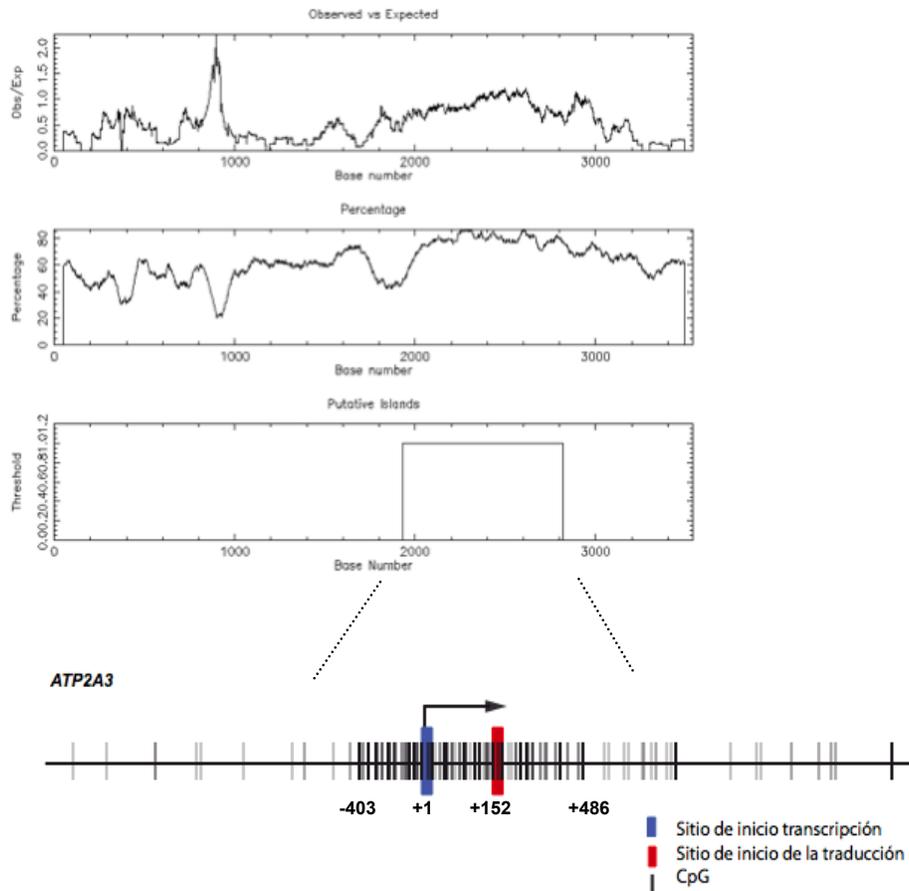
que Dode *et al.* describió como promotor mínimo del gen *ATP2A3* a una región más corta que la descrita para el gen de ratón, sin embargo, esta diferencia es atribuible al tamaño de las construcciones utilizadas por cada grupo, siendo más estrecha la región analizada por Dode *et al.* en 1998, pero que como se observa en la Figura 3 se encuentra contenida dentro de la descrita por Hadri *et al.* (5,24). Posteriormente, el grupo de Hadri encontró que la histamina promueve la expresión del gen *Atp2a3* en células endoteliales humanas tras la activación de la vía calcineurina/NFAT. Sin embargo, NFAT modula de forma indirecta a *Atp2a3* al transactivar la expresión de Ets-1, que como ya habían descrito se une al promotor y conduce su expresión (25).



**Figura 3. Comparación de las regiones reguladoras del gen *ATP2A3* humano y de ratón.** El análisis de las secuencias con BLAST identifico que los sitios de inicio de la transcripción y traducción son distintos en estas dos especies. Además, se muestra un esquema con las secuencias putativas de reconocimiento a factores de transcripción en la región proximal del promotor de *ATP2A3* humano identificadas mediante análisis de secuencia con Transfact Biobase.

Respecto a la regulación transcripcional del gen *ATP2A3* humano, Griffin *et al.* encontraron que cuando se suplementan células Jurkat con biotina hay disminución en la actividad transcripcional del promotor del gen, así como en la expresión del ARNm de SERCA3, postulando que existe una desregulación a nivel transcripcional. El grupo identificó a los elementos de respuesta a biotina en el promotor de *ATP2A3* entre -731 a -135 pb, donde existen nueve elementos *cis* para la unión de factores de transcripción de la familia Sp (Sp1 y Klf, ver Figura 3). El tratamiento con biotina llevo a un incremento en la abundancia nuclear de factores de transcripción Sp1 y Sp3 y puesto que se conoce que Sp3 pueden funcionar como activador o represor de la transcripción, los autores postularon que Sp3 podría unirse al promotor de *ATP2A3* y reprimir su expresión (30).

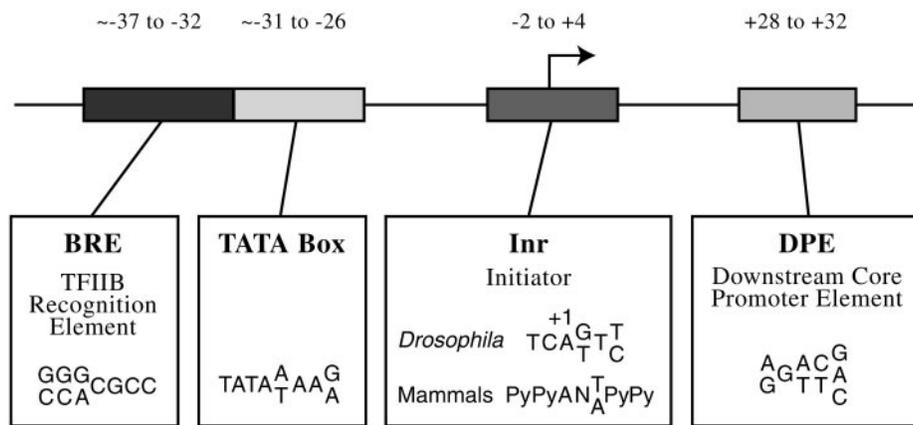
El promotor del gen humano de *ATP2A3* se encuentra inmerso en una isla CpG de 890 pb con 118 sitios CpG posibles de ser metilados, dicha isla abarca de -403 a +486 pb con referencia al +1 de SERCA3, por lo que los sitios de inicio de la transcripción y traducción se encuentran inmersos en la misma y la metilación del ADN puede influir en la regulación de su expresión (ver Figura 4).



**Figura 4. Isla CpG del gen humano de *ATP2A3*.** Análisis de la región promotora del gen *ATP2A3* humano con el software Methyl Primer Express de Applied Biosystems, reveló que tanto el sitio de inicio de la transcripción como el sitio de inicio de la traducción se encuentran inmersos en una Isla CpG de 890 pb.

## 2.4 ELEMENTOS REGULATORIOS BASALES DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *ATP2A3* HUMANO

El promotor basal del gen *ATP2A3* como ya mencionó carece de caja TATA, sin embargo, un análisis de secuencia permitió identificar que posee dos elementos regulatorios (Figura 5). Un elemento Inr y uno DPE que podrían ser los responsables de conducir su transcripción basal en ausencia de la caja TATA (ver Figura 15c). La caja TATA puede funcionar en la ausencia de motivos BRE, Inr o DPE. En contraste, el motivo DPE requiere la presencia de un Inr.



**Figura 5. Elementos regulatorios de la transcripción basal.** Representación esquemática de la posición de elementos regulatorios de la transcripción basal en genes eucariontes. La línea representa una secuencia de ADN, las cajas representan al elemento regulatorio, los números positivos o negativos indican la posición relativa de los mismos con referencia al +1 o sitio de inicio de la transcripción. También se muestra la secuencia consenso para cada elemento regulatorio. Tomado de Smale & Kadonaga, 2003 (31).

El elemento Inr por sí solo soporta un bajo nivel de iniciación específica por la RNA pol II. En extractos nucleares su actividad es comparable a la de la caja TATA como elemento aislado. Estos dos elementos funcionan sinérgicamente uno con otro cuando se encuentran separados por 25 pb, esto porque hay unión cooperativa de TFIID a estos dos elementos. Cuando un Inr se inserta en un promotor sintético corriente abajo de 6 sitios de unión para factores Sp1 (en la ausencia de una caja TATA), la Inr soporta altos niveles de transcripción con un sitio de inicio de la transcripción (TSS) dentro de la Inr, lo cual apunta a la relevancia de los elementos Sp1 en la regulación de la expresión de *ATP2A3*. A pesar de la importancia de los elementos Sp1,

el motivo que marca el inicio de la transcripción es el Inr, ya que cuando la Inr se inserta en una localización diferente relativa a los sitios Sp1, la síntesis de ARN inicia en el nucleótido que dicta la Inr.

La transcripción no siempre inicia en el nucleótido +1 del Inr. El reconocimiento del Inr lo realiza el complejo TFIID. Se ha detectado su unión cuando el promotor basal contiene un elemento DPE corriente abajo del Inr; o una caja TATA corriente arriba del Inr; en la presencia de solo un Inr no se ha detectado la unión de TFIID. También se reporta que TFIIA resulta crítico para la unión cooperativa de TFIID al elemento Inr, lo cual es consistente con que TFIIA induce un cambio conformacional en el complejo TFIID que altera su contacto con el ADN vecino al TSS.

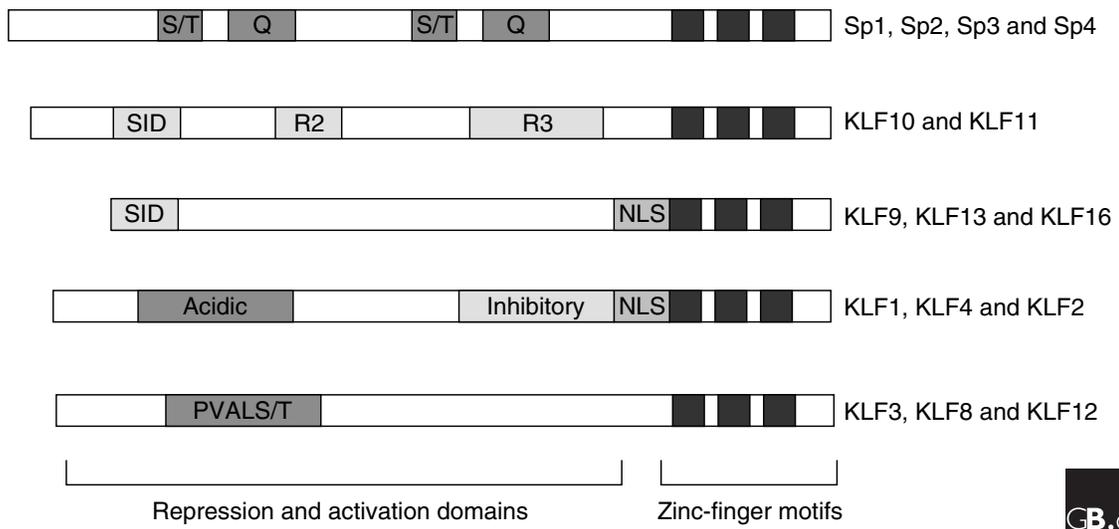
Análisis bioinformáticos indican que en la mayoría de los promotores humanos es posible localizar al menos uno de los elementos “core” en la posición correcta relativa al TSS. Además, una gran mayoría de promotores en eucariontes se caracterizan por tener islas CpG, de 0.5 a 2 Kpb de ADN cuyos dinucleótidos CpG se encuentran no metilados. Estas islas se encuentran tanto en genes de expresión ubicua como en genes de expresión tejido específico. Se estima que las islas CpG se encuentran presentes en la mayoría de los promotores humanos, los cuales además carecen de motivos como la caja TATA, DPE's e Inr, tal es el caso del gen *ATP2A3* cuyo promotor se encuentra inmerso en una isla CpG y carece de caja TATA. Las islas CpG pueden presentar múltiples sitios de unión para el factor de transcripción Sp1, el cual reconoce motivos GC. La unión de Sp1 puede reclutar TFIIB, TFIIF, TBP/TFIID y otros factores basales, para formar el complejo de pre-iniciación, estimulando el inicio de la transcripción, aunque no la elongación. El reclutamiento de TFIID por Sp1 explica su reconocida habilidad de inducir la transcripción de genes cuyo promotor carece de caja TATA (32).

## **2.5 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DEL GEN *ATP2A3* HUMANO**

### **2.5.1 Familia de Factores de Transcripción tipo Krüppel**

La región proximal del promotor de *ATP2A3* como ya se mencionó, se encuentra inmersa en

una isla CpG de 890 pb, favoreciendo la presencia de un gran número de elementos putativos *cis* para factores de transcripción generalmente denominados Sp's. Sin embargo, los elementos *cis* Sp, pueden unir algún elemento de los 21 factores de transcripción que componen la familia KLF (Krüppel Like Factors) la cual se compone de factores Sp's (Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4) y KLF's (KLF1-17), que comparten como característica tres dedos de zinc en su extremo carboxilo para su unión al ADN (ver Figura 6). Todos los miembros de esta familia se unen a elementos ricos en GC, sin embargo, los factores Sp muestran preferencia por elementos o cajas GC (5'-G/T-GGGCGG-G/A-G/A-C/T-3') mientras que los KLF's reconocen principalmente cajas GT (5'-GGGGTGGGGC-3'). La expresión de los miembros de la familia KLF es variable, con miembros de expresión ubicua como Sp1, Sp3, KLF3, KLF6, KLF7, KLF9, KLF10, KLF11, KLF13, KLF14; y otros que se expresan de forma diferencial de acuerdo al tejido y estado de diferenciación de las células. Estos factores pueden activar o reprimir la expresión de genes según su interacción con factores de transcripción de la misma o diferente familia, además de que modificaciones post-transcripcionales como fosforilación o acetilación en los mismos también alteran su actividad (33).



**Figura 6. Familia de factores de transcripción tipo Krüppel.** Esquema de los dominios de los factores de transcripción que comprenden la familia Krüppel, donde se muestra que comparten un motivo con tres dedos de zinc de unión al ADN. Tomado de Kaczynski, J., *et al.* 2003 (34).

### 2.5.2 Factor de Transcripción tipo Krüppel-4 (KLF-4)

KLF-4, también conocido como GSK3 por su abundante expresión en el intestino (*Gut Krüppel Like Factor*), se ha identificado como uno de los factores de transcripción maestros en la generación de células madre pluripotentes iPS (*induced Pluripotent Stem cells*), por reprogramación de células somáticas, para lo cual se requiere encender su expresión junto con los factores de transcripción Oct-4, Sox-2 y c-Myc (35). KLF-4 se expresa abundantemente en epitelios como el colon e intestino delgado, dónde además se ha identificado que tiene un patrón de expresión diferencial, con poca o nula expresión en células madre, y alta en células en fase post-mitótica de diferenciación. El ratón *knock out Klf4<sup>-/-</sup>* muere después de 15 h de nacido, con severos defectos en la diferenciación terminal de la piel y además presenta un número muy reducido de células caliciformes en el colon (36).

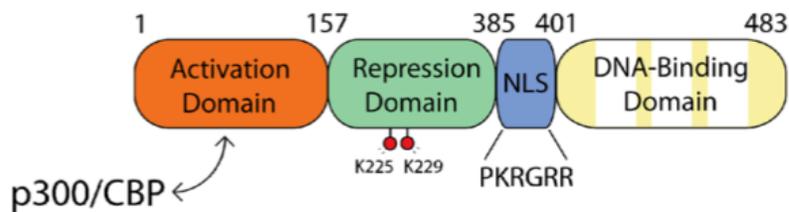
El factor KLF-4 interactúa con  $\beta$ -catenina e inhibe la ruta canónica Wnt que media la fisiología normal del intestino (37). El ARNm de KLF4 se encuentra disminuido en cáncer de colon y gástrico, por lo que se propone que participa en el proceso tumorigénico. La transfección de la proteína APC en células HT-29 (cáncer de colon), modula positivamente la expresión del gen KLF4, que a su vez conduce a una disminución en los niveles de  $\beta$ -catenina en el núcleo y disminución en el índice de proliferación celular (38). En la mayoría de los casos esporádicos de cáncer colorectales se han detectado mutaciones en el gen de APC, lo que llevaría a una disminución en la expresión de KLF4, aumento de  $\beta$ -catenina en el núcleo y, por último, activación de genes que sostienen la proliferación anormal de los pólipos adenomatosos.

En carcinomas de colon el nivel de expresión de KLF4 es inversamente proporcional con el estadio del tumor, de forma que menor expresión corresponde con un tumor de mayor estadio. Se ha visto aumento en la expresión de KLF4, tras diferenciación *in vitro* de líneas celulares tanto de cáncer gástrico y de colon a través de tratamiento con butirato de sodio o en cultivos confluentes, respectivamente (39,40). El incremento en la expresión de KLF-4 por butirato resulta en la inducción de la expresión del gen p21 y en la inhibición de la ciclina B1 (41). La expresión de p21 induce arresto del ciclo celular y permite el establecimiento del programa de diferenciación, por lo tanto, la inducción de la expresión de KLF-4 constituye al menos una parte del mecanismo de inducción de la diferenciación de células tumorales por butirato de

sodio.

Se ha identificado que KLF4 inhibe la transición epitelio-mesénquima a través de su acción como factor de transcripción, promoviendo la expresión de E-caderina mediante interacción directa con su región promotora, contribuyendo a la formación de uniones estrechas con las células vecinas (42). Por lo anterior a KLF4 se le ha denominado como proteína supresora de tumores, cuya expresión es fundamental en el mantenimiento de la fisiología normal de los epitelios. En procesos neoplásicos la pérdida o disminución de la expresión de KLF4 mantiene activa la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y favorece la metástasis.

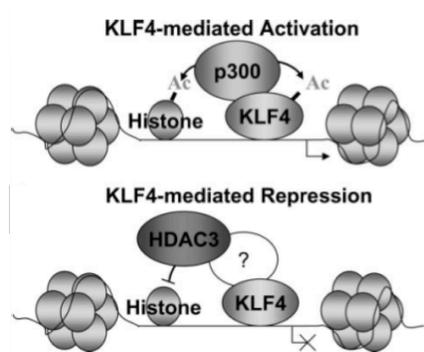
KLF-4 es una proteína de 470 aa con un peso molecular de 50 kDa. Se han identificado diferentes dominios nombrados según su función: dominio ácido, de activación transcripcional localizado en el extremo-N; en el extremo carboxilo se encuentra el dominio de unión al ADN, con 81 aa que forman tres dedos de zinc  $C_2H_2$ ; cuenta con una señal de localización nuclear y un dominio de represión transcripcional. Además, la proteína posee una secuencia PEST, que indica que su degradación ocurre a través de la vía ubiquitina-proteosoma (43) (ver Figura 7).



**Figura 7. Dominios funcionales del factor de transcripción KLF4.** En el extremo N-terminal se encuentra el dominio de trans-activación donde interactúa con co-activadores como p300/CBP. La región central contiene un dominio de represión, con dos lisinas que pueden ser acetiladas por p300/CBP, a continuación, está la señal de localización nuclear (NLS). En el extremo C-terminal se encuentra un dominio de unión al ADN con tres dedos de zinc. Tomado de Evans & Liu 2008 (44).

La función de KLF-4 como activador o represor de la transcripción depende de su interacción con otras proteínas como: factores de transcripción, co-activadores o co-represores de la transcripción. KLF-4 es capaz de interactuar con remodeladores de la cromatina como p300/CBP que poseen actividad de acetil transferasa de histonas (HAT, por sus siglas en

inglés), desempeñándose como co-activador de la transcripción; en adición, KLF-4 puede unirse también a miembros de HDAC's (desacetilasas de histonas), los cuales participan en complejos co-represores de la transcripción. La expresión de KLF-4 es exclusivamente nuclear y está sujeto a modificaciones post-traduccionales que modifican su actividad, por ejemplo, acetilación en dos residuos de lisina (Lys-225 y Lys-229) aumenta su afinidad de unión por su secuencia blanco en el ADN de los genes que regula (45) (ver Figura 8).



**Figura 8. Esquema de la función dual de KLF-4 en la transcripción.** Regula positivamente la transcripción cuando interactúa con co-activadores como p300 o CBP y por el contrario la reprime cuando forma complejos co-represores junto con desacetilasas de histonas (HDAC's). Tomado de Evans, P. *et al.*, 2007 (45).

### 2.5.3 Factores de Transcripción Sp1 y Sp3

Sp1 y Sp3 se expresan de forma ubícu y reconocen secuencias de ADN casi idénticas. Su papel en la regulación génica es compleja ya que ambos pueden competir por cajas-GC, -CT y -GT, sufrir modificaciones post-traduccionales, interactuar con otros factores de transcripción y en adición Sp3 posee varias isoformas.

Sp1 es un transactivador que se une de forma directa o a otras moléculas de Sp1 formando homo-oligómeros. Sp1 puede transactivar a través de un sitio de reconocimiento o de forma sinérgica a través de dos o más elementos. Modula la transcripción basal de genes a través de la interacción con factores de transcripción de la maquinaria basal como TBP/TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIA, entre otros. También interactúa con complejos remodeladores de la cromatina como CBP/p300, SWI/SNF, HDAC1, DNMT1 además de que se propone que sitios Sp1

protegen a las islas CpG de la metilación (32).

Sp1 puede ser modificado post-traduccionalmente mediante fosforilación, acetilación, glicosilación, ubiquitinación, sumoilación y poli-ADP-ribosilación. Sp1 puede ser fosforilado en 5 residuos de aa: Ser59, Ser131, Thr453, Thr579 y Thr739. Los residuos S59, S131 y T453 se encuentran en los dos dominios de activación de la transcripción del extremo amino de Sp1. La mutación de S131, S59, T355, T453, T739 muestran menor activación transcripcional de sus genes blanco. La fosforilación de S59 mostró que incrementa su unión por el ADN. La fosforilación de Sp1 tiene efectos positivos y negativos en función de su unión al ADN y la activación de la transcripción. Además algunos sitios de fosforilación se encuentran localizados en las regiones de interacción con otras proteínas, por lo que la activación transcripcional que ejerce puede estar mediada por otras proteínas (46).

El gen Sp3 codifica cuatro proteínas funcionales y estructuralmente distintas: dos denominadas L1 y L2 de 110-115 kDa y dos isoformas de 70-80 kDa, denominadas M1 y M2, que se producen a través de diferentes inicios internos de la traducción. Cada isoforma Sp3 se expresa en niveles equivalentes en todas las células y tejidos de mamífero independientemente del estado de crecimiento o inducción por estímulos internos (47). Sp3 puede actuar como activador o represor de la transcripción dependiendo del promotor, tipo celular e isoforma. Sp3 también puede interactuar con HDAC y otros co-represores.

## **2.6 DESACETILASAS DE HISTONAS (HDAC'S)**

Las desacetilasas de histonas (HDAC's) son una familia de enzimas que como lo indica su nombre catalizan la desacetilación de proteínas histonas que son las que se encargan de mantener la estructura de la cromatina en forma de nucleosomas, sin embargo, a la fecha está plenamente establecido que las HDAC's también ejercen su acción sobre proteínas no histonas, como factores de transcripción.

Hasta el momento se han descrito 18 miembros, que componen la familia de HDAC's en mamíferos, las cuales se dividen en cuatro clases conforme a su homólogo en la levadura. Las HDAC's de clase I (1, 2, 3 y 8) se expresan de forma ubicua. Las de clase II (4, 5, 6, 7, 9 y 10), tienen un patrón de expresión es tejido específico. La HDAC 11 muestra solo cierto grado de homología con las HDAC's de clase 1 y 2, pero no el suficiente para ser clasificado dentro de alguno de estos grupos, por lo que se le asigno la clase IV. La clase III, también conocida

como familia sir2, comprende siete miembros en humanos, Sirt1-7 (48).

Diferentes grupos de investigación han identificado expresión aumentada de desacetilasas de histonas (HDAC's), principalmente de las de clase I y II, en diferentes tipos de cáncer, incluidos cáncer gástrico y de colon, lo cual se asocia con desacetilación global de proteínas histonas, que favorece una cromatina compacta e inaccesible para la transcripción génica. Se ha identificado que las HDAC's también forman parte de complejos co-represores promoviendo el silenciamiento de genes específicos a través de la interacción con un factor de transcripción en particular que establece el reclutamiento de estos complejos. Las HDAC's también modulan la expresión génica mediante su actividad enzimática *per se* sobre proteínas no histonas, por ejemplo, la acetilación de un factor de transcripción modifica su afinidad de unión por su secuencia blanco, su interacción con otras proteínas, su estabilidad o incluso modifica su localización celular. Los inhibidores de HDAC's como el butirato, Tricostatina A, SAHA, ácido valproico, entre otros, han sido utilizados por décadas mostrando su efectividad como agentes antitumorales ya que inducen diferenciación, arresto del crecimiento e inducción de apoptosis (48).

## **2.7 MODELOS DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS CANCEROSAS**

### **2.7.1 Butirato y diferenciación del epitelio del colon**

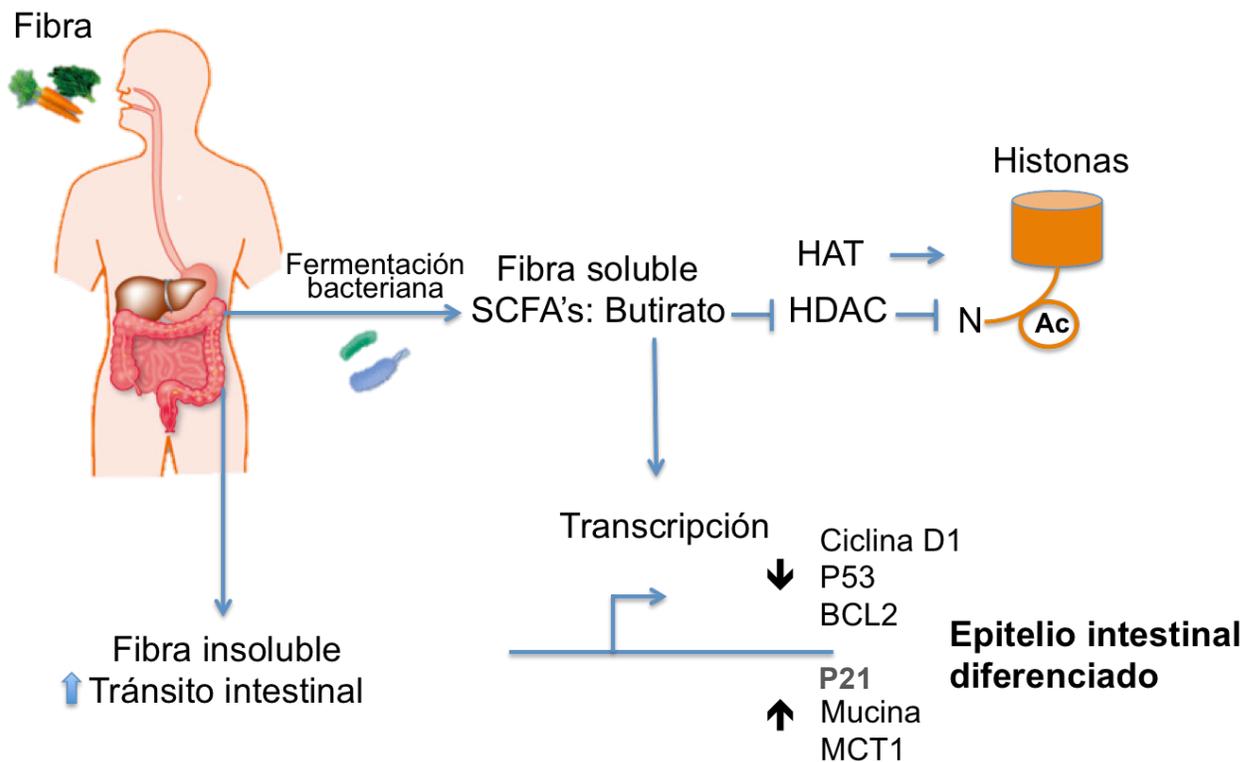
El butirato es uno de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA's por sus siglas en inglés) que se producen en el colon mediante fermentación bacteriana de las fibras de la dieta. Los productos finales principalmente son acetato, propionato y butirato. Los SCFA's se absorben una parte por difusión pasiva y la mayor parte a través de proteínas transportadoras (49).

El butirato ha sido estudiado ampliamente por sus efectos sobre las células cancerosas: induce diferenciación celular e inhibe su proliferación, sugiriendo su papel como anti-carcinógeno. Además, el butirato participa en el desarrollo normal del colon donde es la principal fuente de energía. La disminución de las fuentes de carbohidratos en el colon distal conduce a la fermentación de proteínas con formación de productos tóxicos. Estos productos tóxicos junto con la baja disponibilidad de SCFA's en el colon distal se ha propuesto que dan origen a desordenes gastrointestinales como colitis ulcerativa y cáncer (50,51).

El butirato es el más potente de los SCFA's en inhibir la proliferación celular, su acción es dosis dependiente en todas las líneas tumorales estudiadas, en donde produce muchos cambios morfológicos y bioquímicos. Aunque a bajas concentraciones (0.05-0.1 mM), el butirato estimula parcialmente la proliferación celular, a concentraciones  $\geq 1$  mM inhibe la proliferación de una forma dosis dependiente (52).

La acción del butirato incluye la activación específica de genes, además inhibe la actividad de desacetilasas de histonas, con lo que facilita la unión de factores de transcripción sobre el ADN. El butirato 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 translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, por lo tanto, previene la activación de genes pro-inflamatorios. También incrementa la expresión del oncogén *c-Fos* e inhibe la expresión del oncogén *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 transcripcional 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 (51).

El butirato induce arresto del ciclo celular en G1 o G2 de forma dependiente de p21, promueve diferenciación y finalmente muerte celular programada (53). El efecto de butirato 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 histonas (HDAC's) y no relacionado estructuralmente al butirato, demostró que la inducción de p21 es consecuencia directa de la inhibición de HDAC's (54). Ver Figura 9.



**Figura 9. Esquema de funcionamiento del butirato de sodio en la diferenciación de epitelios.**

### 2.7.2 Modelo de diferenciación por confluencia celular

Caco-2 es una línea celular de adenocarcinoma de colon humano que cuando se cultiva a baja densidad presenta un fenotipo indiferenciado, pero cuando el cultivo alcanza la confluencia 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, con 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 (55). 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 (56).

Los cultivos de Caco-2 son morfológicamente heterogéneos, se reporta expresión en mosaico de marcadores específicos de la función intestinal, como enzimas hidrolasas, lo cual sugiere que la diferenciación morfológica y funcional no ocurre en paralelo. El proceso de diferenciación de estas 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 sub-confluencia 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 (57,58).

Es uno de los modelos *in vitro* más relevantes para el estudio de diferenciación y regulación de la función intestinal, la monocapa de células muestra una polaridad funcional que se manifiesta por la formación de domos de las 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, después de la confluencia aún coexisten características de enterocitos y colonocitos (59).

Las células Caco-2 diferenciadas expresan EGF (factor de crecimiento epidermal, por sus siglas en inglés), receptor de vitamina D, IGF-I (factor de crecimiento tipo insulina, por sus siglas en inglés) éste último asociado con un incrementó en su capacidad para proliferar en cultivo. Además, secretan NGF (factor de crecimiento de nervios, por sus siglas en inglés), 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* (56).

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 (60,61). 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 (62).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ion  $\text{Ca}^{2+}$  modula múltiples procesos en el interior de la célula que determinan su destino por lo que existen diferentes mecanismos que mantienen su homeostasis, entre ellos las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  SERCA. 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 *in vitro* de líneas celulares cancerosas, se desconoce si dicha inducción ocurre a nivel de la transcripción del gen *ATP2A3*, lo cual coadyuvará al mejor entendimiento de los mecanismos por los cuales se restablece su expresión al adquirir un fenotipo diferenciado.

Por lo tanto, nos planteamos la pregunta ¿Cuáles son los mecanismos moleculares responsables del aumento en la expresión del gen *ATP2A3* en líneas de cáncer gástrico y de colon inducidas a diferenciación?

### 4. HIPÓTESIS

La inducción de la expresión del gen *ATP2A3* durante la diferenciación de células de cáncer gástrico y de colon es resultado de la regulación de su expresión por mecanismos transcripcionales, mediados por factores de transcripción y/o epigenéticos, como los mediados por desacetilasas de histonas e hipermetilación del ADN del promotor.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en la inducción de la expresión del gen *ATP2A3* en modelos de diferenciación *in vitro* de líneas celulares humanas de cáncer gástrico y de colon.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Determinar si existe un aumento en la expresión de ARNm de *ATP2A3* y su proteína SERCA3 en dos modelos de diferenciación de cáncer gástrico y de colon, uno mediante inhibidores de HDAC's y el otro a través de confluencia celular.
- B. Investigar el efecto del aumento de la expresión de SERCA3 en la homeostasis de calcio intracelular.
- C. Realizar un análisis *in silico* de los elementos putativos del promotor de *ATP2A3* humano que pudieran regular su expresión tras la diferenciación celular.
- D. Comparar la abundancia de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf4 antes y después de la inducción de la diferenciación.
- E. Demostrar la unión de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf4 a los elementos *cis* del promotor del gen *ATP2A3* humano, mediante ensayos de interacción ADN-proteína como ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA's) e inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).
- F. Establecer la participación de las Desacetilasas de Histonas (HDAC's) en la expresión de SERCA3, determinando el enriquecimiento de marcas de cromatina abierta o cerrada en la región del promotor del gen *ATP2A3* humano.
- G. Caracterizar mediante ensayos funcionales (transfecciones transitorias de construcciones quiméricas) y mutagénesis dirigida, la actividad funcional de los sitios que por estudios de interacción ADN-proteína hayan demostrado unir a los factores de transcripción.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Estrategia experimental

- I. Realizar cultivos líneas de células humanas neoplásicas: adenocarcinoma de colon Caco-2 y de cáncer gástrico KATO-III.
- II. Llevar a cabo la diferenciación de las células mediante tratamiento con butirato de sodio y Tricostatina A (inhibidores de desacetilasas de histonas, iHDAC's); y en cultivos post-confluentes de Caco-2.
- III. Medir la expresión de ARNm de *ATP2A2* y *ATP2A3* y su respectiva proteína de SERCA2 y SERCA3 mediante RT-PCR y Western blot.
- IV. Medir la concentración de calcio intracelular en cultivos de células epiteliales tumorales inducidas a diferenciación usando FURA-2 AM.
- V. Realizar un análisis *in silico* con la secuencia del promotor del gen *ATP2A3* humano, estableciendo las secuencias conservadas entre especies y los elementos putativos que puedan regular su expresión.
- VI. Medir la abundancia de factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf4 en los cultivos de células diferenciadas mediante Western blot.
- VII. Determinar la actividad transcripcional de construcciones quiméricas del promotor del gen *ATP2A3* unidas al gen reportero de la luciferasa, mediante transfección transitoria de las construcciones en cultivos de células cancerosas e inducidas a diferenciación.
- VIII. Realizar estudios de interacción de proteína-ADN *in vitro* mediante ensayos de retardamiento electroforético (EMSA's), con extractos nucleares de las células diferenciadas sobre las secuencias blanco de unión de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf4 marcados radiactivamente.
- IX. Analizar la interacción *in vivo* de los factores de transcripción con su secuencia consenso en el promotor de *ATP2A3*, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos específicos contra los factores: Sp1, Sp3, KLF4, y posterior amplificación de la secuencia blanco por PCR.
- X. Determinar mediante ChIP el enriquecimiento de marcas de cromatina abierta sobre los residuos de las proteínas histonas: por ej. acetilación y metilación de la histona H3.
- XI. Mediante mutagénesis dirigida realizar mutaciones puntuales de las secuencias en el

promotor de *ATP2A3*, que mediante ensayos de unión ADN-proteína mostró unir un factor de transcripción, y determinar el efecto de dicha mutación en la actividad transcripcional del promotor del gen *ATP2A3*.

## **7.2 Cultivos celulares y tratamientos farmacológicos**

Se trabajó con dos líneas celulares humanas: cáncer gástrico KATO-III y adenocarcinoma de colon Caco-2 obtenidas de ATCC (*American Type Culture Collection*). Cada línea celular fue descongelada y mantenida en medio de cultivo IMDM (Sigma I-7633) o EMEM (Sigma M-0643), respectivamente, con 20% de concentración de suero fetal bovino; 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C, conforme a las recomendaciones del proveedor. Los cultivos de KATO-III se sometieron a tratamientos farmacológicos cuando alcanzaron una confluencia del 80%, utilizando los siguientes compuestos: butirato de sodio (Fluka 19364, 99%), Tricostatina A (Sigma T8552), Actinomicina D (Sigma A9415). De cada tratamiento se prepararon stocks diluyendo en agua o en dimetil sulfóxido (DMSO Sigma D8418, 99.9%) conforme a sus características de disolución. 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. A las células Caco-2 en post-confluencia se les realizó cambios de medio fresco cada 48 h. Ambas líneas celulares fueron utilizadas con números de pasaje entre 0-10, a fin de prevenir variabilidad entre experimentos.

## **7.3 Purificación de ARN total y qRT-PCR en 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 desnaturante 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) en un volumen final de 20 µL, en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). Posteriormente, para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en los cultivos celulares, se realizó amplificación de los ARNm de interés (SERCA2a,b,c y SERCA3) mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo

real (qRT-PCR) a través de cuantificación relativa con SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen 11760) normalizando cada muestra contra un gen de expresión ubicua ( $\beta$ -actina) en un equipo Rotor Gene-Q (Qiagen, Alemania). Las 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 de humano.

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

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' -- 3'
hACTB F	TGAAGGTGACAGCAGTCGCTTG
hACTB B	GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC
hSERCA2 F	CGAACCCCTTGCCACTCATCTTC
hSERCA2a B	CGGTTACTCCAGTATTGCAGGTTCC
hSERCA2b B	TGCCGAGAACGAGCAGGATTTG
hSERCA2c B	TCCAGTATTGACAGCAGAGCAGG
hSERCA3 F	CAGGGGACATTGTAGAAGTGGC
hSERCA3 B	TGGTCACGGACACAGATTCACC

(F-forward; B-backward)

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:

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

Los resultados obtenidos por el método  $\Delta\Delta$ Ct se presentan como veces de cambio en la expresión de ARNm entre células KATO-III tratadas y control. Los resultados de las células

Caco-2 se expresa como veces de cambio de cierto número de días en confluencia celular contra células cultivadas a baja densidad (30% confluencia).

#### **7.4 Aislamiento de proteína total**

La proteína total se extrajo de cultivos celulares mediante el buffer RIPA, de donde se eliminó la fracción insoluble. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y fueron transferidas a una membrana de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare Bio-Sciences No. Cat. RPN2020F). Se bloqueó la señal de proteínas inespecíficas mediante incubación con leche al 5% (BioRad No. Cat. 170-6404) toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios y secundarios se incubaron 2 h a temperatura ambiente. La inmunodetección de SERCA2 y SERCA3 se realizó con anticuerpos de Abcam, ab3625 y ab54876, respectivamente. Para la cuantificación de factores de transcripción se utilizaron anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology: Klf4 (sc-20691), Sp1 (sc-59), Sp3 (sc-13018). La detección se realizó utilizando el reactivo quimioluminiscente SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific 34075) y exponiendo las membranas a placas fotográficas de rayos X. Por último, se realizó un análisis densitométrico de las placas escaneadas utilizando el software Image J versión 1.36 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

#### **7.5 Determinación de la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ )**

Células KATO-III tratadas previamente con 3 mM de butirato o 100 nM de Tricostatina A durante 72 h, fueron mantenidas en ayuno 4 h previas a ser cargadas con FURA-2 AM. Las células KATO-III se cargaron con FURA-2 AM durante 60 min y posteriormente se realizaron lecturas en un espectrofotómetro de luminiscencia Aminco Bowman Series 2, en dos longitudes de onda para excitación (340 y 380 nm) y una de emisión (510 nm). La fluorescencia mínima ( $F_{min}$ ) fue obtenida con la adición de 2 mM de EGTA, mientras que la fluorescencia máxima ( $F_{max}$ ) con la adición de detergente Triton X-100 al 0.2%. Después de 100 seg se adicionó una unidad de histamina para observar la liberación de calcio intracelular, una vez que la señal se estabilizó se adicionó 1  $\mu$ M de Tapsigargina (Alomone No. Cat. T-650) para inhibir a las bombas SERCA. Cada experimento se realizó por triplicado.

## 7.6 Construcciones de plásmidos

Los análisis funcionales de la región reguladora 5' del gen humano de *ATP2A3* se realizó mediante transfección transitoria en células KATO-III de tres construcciones quiméricas *ATP2A3*/Luciferasa que abarcan 1043, 735 y 135 pb de la región promotora, respectivamente. Para generar las construcciones se utilizó la clona BAC hRPK.167\_N\_20 que contiene el gen humano completo de *ATP2A3* con su región reguladora y fue obtenida del Sick Children Hospital de San Francisco, CA, USA (GeneBank® AC005940). Primero un fragmento de 1888 pb de la región reguladora 5' de *ATP2A3* fue amplificada por PCR utilizando una enzima de alta fidelidad Pfu (Agilent No. Cat. 600380-51) y los oligonucleótidos 5'-CCTGTAATACCAGCACTTTGGGAG-3' (forward), 5'-CCCAAGCTTCGGCCGTCTGCGCCGTCCG-3' (backward). El producto de ADN fue digerido con HindIII, obteniendo un fragmento de 1185 pb que contiene 1043 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción y 142 pb del 5'UTR (-1043/+142 pb). El fragmento de ADN resultante fue separado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y purificado utilizando el Kit GeneClean (Qbiogene No. Cat. 1001-600). El fragmento de 1185 pb fue sub-clonado in el sitio HindIII del plásmido pGL3-basic (Promega No. Cat. E1751) dirigiendo la expresión del gen de luciferasa de la luciérnaga. El plásmido fue amplificado en *E. coli* DH5α y purificado utilizando una columna de intercambio iónico PureLink (Invitrogen No. Cat. K210014). La identidad y orientación del fragmento subclonado fue verificada mediante mapeo de restricción con endonucleasas y secuenciación automática.

Otras dos construcciones fueron generadas mediante digestión del fragmento de 1185 pb con la enzima KpnI y una de las siguientes enzimas: SstI (-735/142+ pb) y PstI (-135/+142 pb). Los extremos cohesivos fueron rellenados con un fragmento Klenow (Invitrogen No. Cat. 18012021) y ligado con la ligasa de ADN T4 en el sitio SmaI del plásmido pGL3-basic. Cada construcción fue amplificada y purificada como ya se mencionó, y verificada a través de secuenciación y enzimas de restricción.

## 7.7 Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa

La actividad de las diferentes construcciones del promotor de *ATP2A3* fue evaluada mediante transfección transitoria de las mismas en células KATO-III. Para la transfección se utilizó

Lipofectamine 2000 (Invitrogen No. Cat. 11668-019) de acuerdo a las instrucciones del proveedor en medio de cultivo OPTIMEM libre de suero. Después de 3 h de transfección el medio fue reemplazado por IMDM al 20% de suero fetal bovino y las células fueron incubadas durante 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de transfección las células fueron lisadas con *Passive Lysis Buffer 1X* (Promega No. Cat. E194A), el sobrenadante fue utilizado para medir la actividad de luciferasa de la luciérnaga utilizando el sistema *Luciferase assay* (Promega No. Cat. E-1960) en un Luminómetro Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer). La actividad de luciferasa se normalizo con la cantidad total de proteína de los lisados, expresando los resultados como veces de inducción con respecto a la condición control. Como control positivo y negativo de la transfección se evaluó la actividad de los plásmidos pGL3-promotor (promotor de SV40, Promega No. Cat. E1761) y pGL3-basic (Promega No. Cat. E1751), respectivamente. Los resultados se presentan como el valor promedio de al menos tres experimentos independientes determinados por duplicado.

## **7.8 Extractos nucleares**

Se obtuvieron extractos nucleares de los cultivos celulares, a través del método de Wang, y cols. (63). Primero se realizaron dos lavados con PBS 1X estéril con 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) como inhibidor de proteasas, posteriormente con ayuda de un gendarme se rasparon las células en 3 mL de PBS 1X con PMSF, después de recuperar las células por centrifugación se lisaron con Buffer de lisis (HEPES 20 mM pH 7.6, Glicerol 20%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 10 mM y un “cocktail” de inhibidores de proteasas Sigma Fast S8820) recuperando a partir de éste núcleos, que posteriormente se lisaron con Buffer de extracción (misma composición del Buffer de lisis pero NaCl 500 mM), tras ésta lisis se recuperaron los extractos nucleares, tomando una alícuota para su cuantificación y almacenándolos a -70°C durante no más de dos meses para los ensayos de EMSA.

## **7.9 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)**

Se generaron oligonucleótidos de doble cadena a partir de los listados en la Tabla 3, calentando a razón 1:1 de sentido(F):antisentido(R) en un baño con agua hirviendo durante 5

min y después permitir enfriar gradualmente a temperatura ambiente. Posteriormente, los oligonucleótidos de doble cadena se marcaron con [<sup>32</sup>P] utilizando 10 U de polinucleótido cinasa de T4 en presencia de  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (>6000 Ci/mmol) para generar las sondas correspondientes. Los complejos ADN-proteína se generaron al incubar extractos nucleares con las diferentes sondas marcadas. Las mezclas de reacción se prepararon como sigue: 10  $\mu$ g de extracto nuclear, buffer de unión ADN-proteína (glicerol 20%, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 2.5 mM, NaCl 250 mM, Tris 50 mM pH 7.6, DTT 2.5 mM, cocktail de inhibidores de proteasas SigmaFast), 1  $\mu$ g de poli dI:dC (Sigma P-4929) en un volumen final de 10  $\mu$ L, preincubando 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 35 fmol de la sonda marcada o el oligonucleótido frío (oligonucleótido de doble cadena sin marca radiactiva) a la mezcla e incubando 10 min. Para los ensayos de súper-retardamiento, después de este paso, se agregaron 2  $\mu$ g del anticuerpo correspondiente incubando durante 20 min. Todo el ensayo se realizó a temperatura ambiente, deteniendo la reacción mediante la adición del amortiguador de corrida para ácidos nucleicos. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida al 5% y glicerol al 2.5%, separando los complejos en condiciones no desnaturizantes, con corriente constante de 15 mA durante 3 o 4 h. Después de la electroforesis, se secaron los geles y se expusieron sobre placas fotográficas X-Omat (Kodak) para la autoradiografía a -70°C por 12-72 h dependiendo de la intensidad de la marca radiactiva en la sonda.

**Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).** El nombre de la sonda indica su posición relativa con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) del gen *ATP2A3*. La secuencia consenso del elemento *cis* se encuentra subrayada.

Sonda	5'-Secuencia-3'
-48/-53	5'-CGGGCCCCGCGCCGCCCGCCCCGGGGAGGG-3'
-69/-81	5'-CGGCCGGAAGGGGTGTGATGGGGGCGGGCCCCG-3'
-129	5'-CTGCAGAATGGGCGGGGGACCCAGGCG-3'
Sp consenso	5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'

### 7.10 Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)

Se fijaron los cultivos celulares con formaldehído fresco al 1% (Sigma P-6148), colectando las

células en Buffer de lisis con SDS (Tris 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS 1%). El extracto resultante se sónico en un equipo Sonics Vibracell durante 12 ciclos de 20 segundos a una potencia del 30% manteniendo el extracto en hielo. Se inmunoprecipitó 25-30 µg de cromatina con 1.5 a 2 µg de los siguientes anticuerpos: KLF4 (Santa Cruz SC-20691X), Sp1 (Santa Cruz SC-59X), Sp3 (Santa Cruz SC-13018X), Histona H3 lisina 9 trimetilada (Abcam ab8898), Histona H3 lisina 4 monometilada (ab8895), Histona H3 lisina 9 acetilada (ab4441) e IgG (Santa Cruz SC-2020) como control negativo. Los complejos ADN-proteína fueron recuperados con perlas de proteína A/G agarosa (Santa Cruz SC-2003), los cuales se lavaron con los siguientes buffers: Buffer bajo en sales (Tris 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, Triton 1%, SDS 0.1% y NaCl 150 mM), Buffer alto en sales (lo mismo que el amortiguador bajo en sales, pero con NaCl 500 mM), Buffer con LiCl (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Desoxicolato de sodio 1%, Nonidet P-40 1%, LiCl 0.25 M) y dos lavados finales en TE (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8). Por último, se separaron los complejos ADN-proteína (decross-linking) previo tratamiento con RNasa A (Boehringer Mannheim 109126), incubando a 65°C toda la noche con proteínasa K (Sigma P-2308), e incubando 6 h en NaCl 0.2 M. El ADN fue purificado mediante extracción fenol-cloroformo, precipitación con etanol y dilución en 20 µL de TE para su amplificación por PCR en tiempo real, utilizando oligonucleótidos específicos para la región de -162 a +39 pb del promotor de *ATP2A3*. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados es: 5'- GCGGTCTCAGTTTCCCCTCTGC-3' (sentido) y 5'- TGTCCGTGCTGGGACCTTACCC-3' (antisentido), los cuales generan un producto de 201 pb. El Input representa el 0.1% de la cromatina utilizada para cada inmunoprecipitación, el cual fue tratado por igual integrándolo en el paso de decross-linking.

### 7.11 Mutagénesis sitio dirigida

Se generaron mutantes específicas de los sitios putativos de reconocimiento de factores de transcripción Sp y Klf mediante el Kit *QuikChange site-directed mutagenesis* (Agilent No. Cat. 200519) utilizando secuencias de ADN sintéticas (ver Tabla 4) y la construcción de -135/+142 pb del promotor de *ATP2A3* como molde.

**Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos para generar mutantes de los elementos Sp y Klf.**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
Sp mut -48/53 (-65 a -34)	GCCCCGCGCCGA <b>ACCGA</b> ACCGGGGAGGGAGTC
Sp mut -48 (-65 a -34)	GCCCCGCGCCGCCCCGA <b>ACCGGGGAGGGAGTC</b>
Sp mut -53 (-69 a -38)	GCGGGCCCCGCGCCGA <b>ACCGCCCCGGGGAGGG</b>
Sp mut -69 (-84 a -53)	GGGGTGTGATGGGG <b>TTCGGGCC</b> CCGCGCCGCC
Sp mut -81 (-96 a -65)	GGGCGGCCGGAAGG <b>TTTGTGATGGGGGGCGGG</b>
Sp mut -129 (-135 a -104)	GAATG <b>TTCGGGGG</b> ACCCAGGCGGTCGCCCCGG

Mut, mutante. Las bases en negritas son las que fueron sustituidas para generar las mutantes correspondientes.

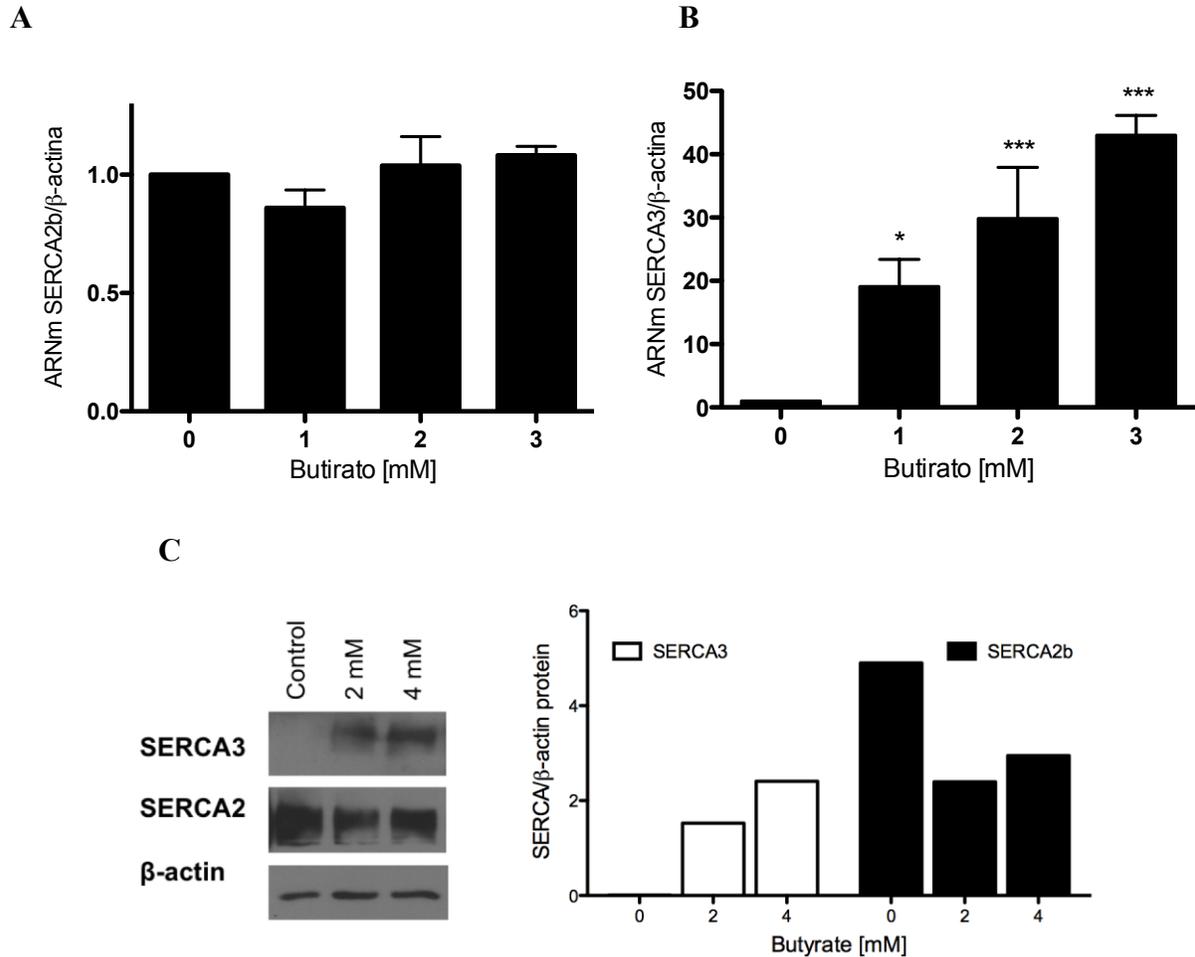
## 7.12 Análisis estadístico

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 Expresión de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en la línea celular de cáncer gástrico KATO-III tras la diferenciación celular con butirato.

Se realizó la detección de los niveles de expresión de ARNm de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* mediante qRT-PCR en tiempo real, en células de cáncer gástrico KATO-III inducidas a diferenciación mediante tratamiento con concentraciones milimolares de butirato de sodio durante 96 h. Se encontró que el tratamiento indujo la expresión de ARNm de *ATP2A3* de forma concentración dependiente hasta 40 veces con respecto al gen de expresión ubicua  $\beta$ -actina. A pesar del notorio incremento en la expresión de *ATP2A3*, la expresión de ARNm de *ATP2A2* se mantuvo sin cambios después de la diferenciación celular (ver Figura 10 A y B). En adición, en las mismas condiciones de cultivo, se determinó la expresión de la proteína correspondiente SERCA2 y SERCA3 mediante Western blot, observando un aumento muy marcado en SERCA3, pero una disminución en la expresión de SERCA2 (ver Figura 10C).

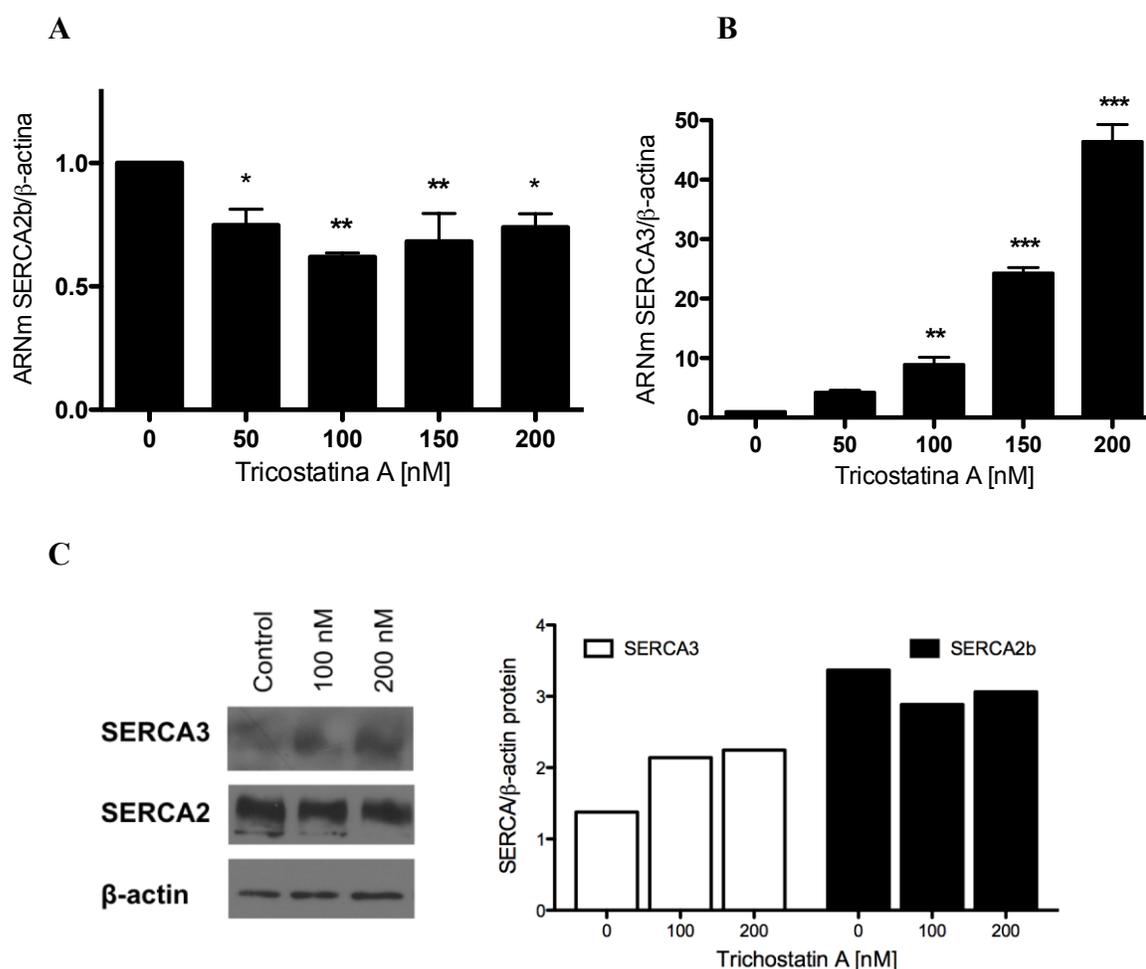


**Figura 10. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III diferenciadas con butirato.** Se usaron concentraciones de 1 a 3 mM durante 96 h de tratamiento. Los resultados A) ARNm de SERCA2b (*ATP2A2*) y B) ARNm de SERCA3 (*ATP2A3*), son el promedio de dos experimentos individuales, determinados cada uno por triplicado y normalizados contra  $\beta$ -actina. Las barras representan  $\pm$ EE, resultados significativos \*\*\* $P \leq 0.001$  y \* $P \leq 0.05$ . El resultado C) Western blot de SERCA3 y SERCA2b, es una imagen representativa de dos experimentos independientes y la gráfica de cuantificación de la misma.

## 8.2 Expresión de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en la línea celular de cáncer gástrico KATO-III tras la diferenciación celular con Tricostatina A.

La Tricostatina A fue otro tratamiento utilizado para inducir diferenciación de células de

cáncer gástrico KATO-III. Se encontró que éste inhibidor de HDAC's indujo la expresión de ARNm de *ATP2A3* de forma concentración dependiente hasta más de 40 veces con respecto al gen de expresión ubicua  $\beta$ -actina (ver Figura 11A), de manera muy similar a lo observado con butirato. La expresión de ARNm de *ATP2A2* con Tricostatina durante 96 h disminuyó hasta un 0.4 veces (ver Figura 11B). En la expresión de la proteína correspondiente SERCA2 y SERCA3, se observó un aumento de la abundancia de SERCA3 y una ligera disminución de la abundancia de SERCA2 (ver Figura 11C).

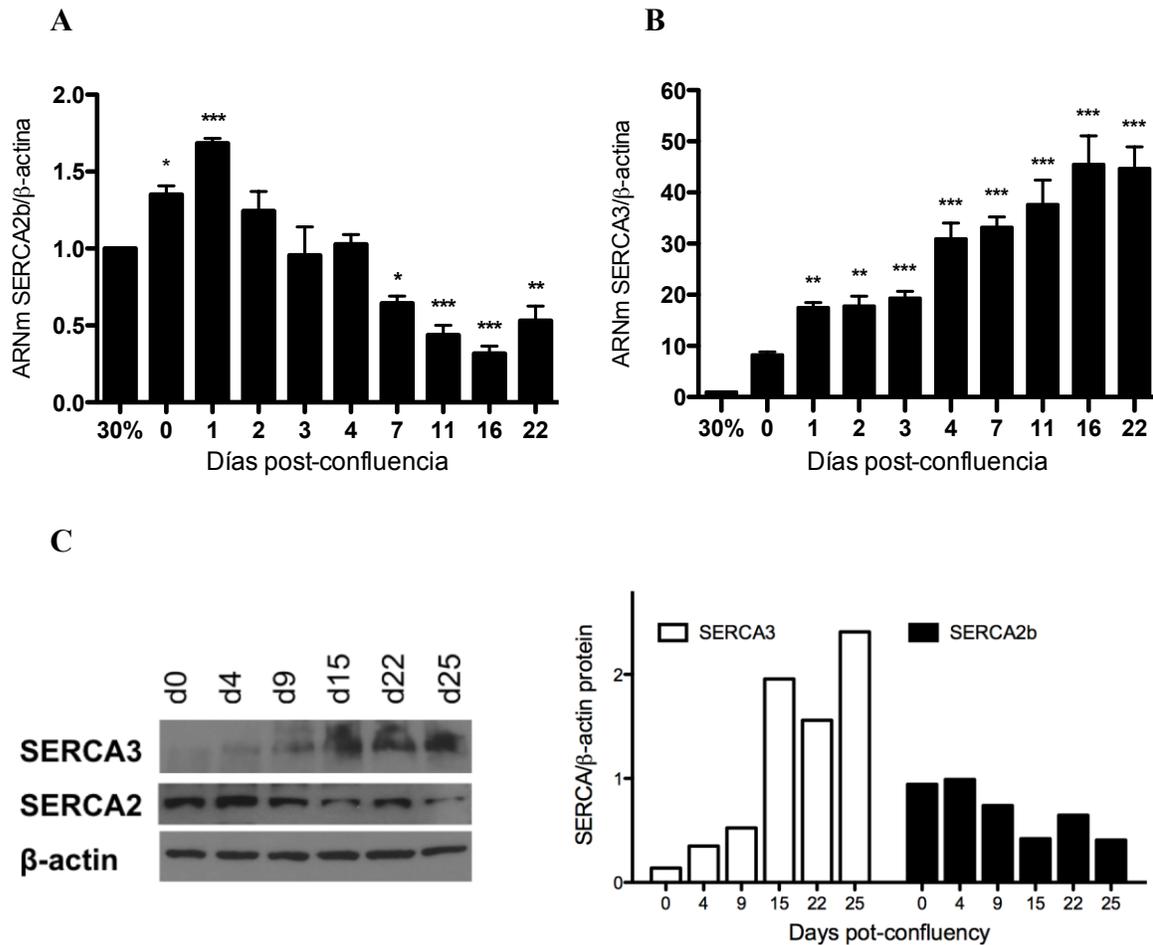


**Figura 11. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células KATO-III diferenciadas con Tricostatina A.** Se usaron concentraciones de 50 a 200 nM durante 96 h de tratamiento. Los resultados A) ARNm de SERCA2b y B) ARNm de SERCA3, son el promedio de dos experimentos individuales, determinados cada uno por triplicado y normalizados contra  $\beta$ -actina. Las barras representan +/-EE, resultados significativos \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$  y \* $P \leq 0.05$ . El resultado C) Western blot de SERCA3 y SERCA2b, es

una imagen representativa de dos experimentos independientes y la gráfica de cuantificación de la misma.

### **8.3 Expresión de las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 tras la diferenciación celular por confluencia celular.**

Se realizó la detección de los niveles de expresión de ARNm de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* mediante qRT-PCR en tiempo real, en células de cáncer gástrico Caco-2 inducidas a diferenciación mediante confluencia celular. Se encontró que desde que el cultivo alcanza la confluencia aumenta cerca de 10 veces la expresión de ARNm de *ATP2A3*, observando el mayor aumento a los 16 y 22 días en confluencia, con un aumento de hasta 40 veces con respecto al gen de expresión ubicua  $\beta$ -actina (ver Figura 12A). La expresión de ARNm de *ATP2A2* disminuyó después de la diferenciación celular hasta 40% en el día 16 de confluencia (ver Figura 12B). En adición, en las mismas condiciones de cultivo, se determinó la expresión de la proteína correspondiente SERCA2 y SERCA3 mediante Western blot, observando un aumento del doble en SERCA3 y una disminución del 50% en la expresión de SERCA2 (ver Figura 12C).

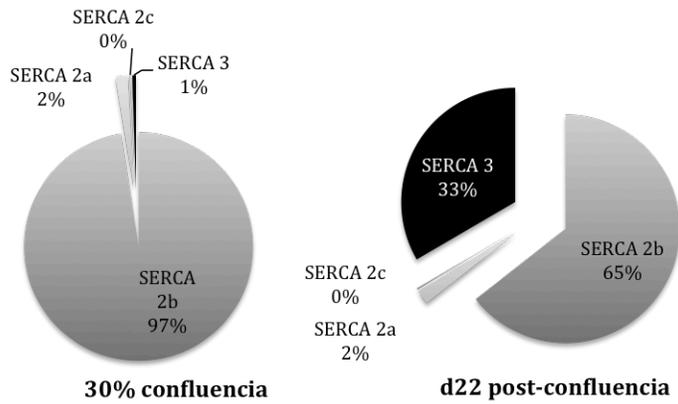


**Figura 12. Expresión relativa de las isoformas de SERCA en células Caco-2 diferenciadas por confluencia celular.** Las células se cultivaron en medio EMEM con 20% de suero: baja confluencia (30%); 100% de confluencia (día 0), desde el cuál se contaron los días en cultivo, realizando cambios de medio cada 48 h. Los resultados A) ARNm de SERCA2b y B) ARNm de SERCA3, son el promedio de dos experimentos individuales, determinados cada uno por triplicado y normalizados contra  $\beta$ -actina. Las barras representan +/-EE, resultados significativos \*\*\* $P \leq 0.001$  \*\* $P \leq 0.01$  y \* $P \leq 0.05$ . El resultado C) Western blot de SERCA3 y SERCA2b, es una imagen representativa de dos experimentos independientes y la gráfica de cuantificación de la misma.

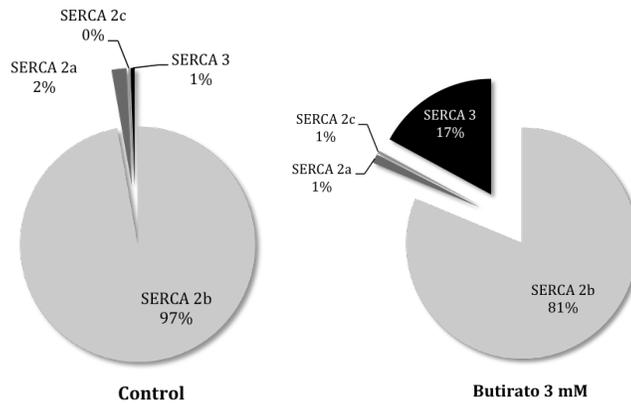
#### **8.4 Cambio en la abundancia relativa de isoformas de SERCA en las líneas celulares de cáncer gástrico y de colon tras la diferenciación celular.**

Una vez realizada la determinación de la cantidad de ARNm en las células de cáncer gástrico y de colon antes y después de inducir la diferenciación mediante confluencia celular y tratamiento con butirato de sodio, se determinó la abundancia relativa de cada isoforma tomando como referencia a la isoforma más abundante en ambas líneas celulares, SERCA2b. Se utilizaron oligonucleótidos que amplificaban las tres diferentes isoformas de SERCA2, a b y c, en tanto que los utilizados para amplificar SERCA3 identifican una región conservada entre sus seis isoformas. Se encontró muy baja expresión de las isoformas a y c de SERCA2 en ambas líneas celulares que se mantuvo prácticamente sin cambios después de la diferenciación celular. Sin embargo, a pesar del marcado incremento observado en SERCA3 de hasta 40 veces antes descrito, cuando se compara contra la isoforma más abundante SERCA2b el aumento va de 33% en las células Caco-2 y de 17% en las KATO-III después de la diferenciación. Además, se observó que SERCA2b se mantiene como la isoforma más abundante en las células epiteliales analizadas (ver Figura 13A y B).

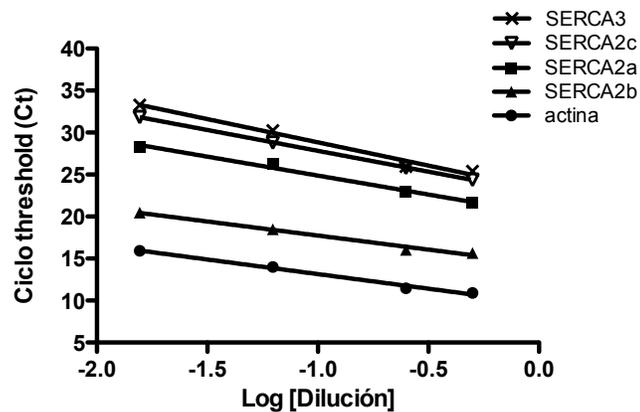
### A. Células Caco-2



### B. Células KATO-III



### C

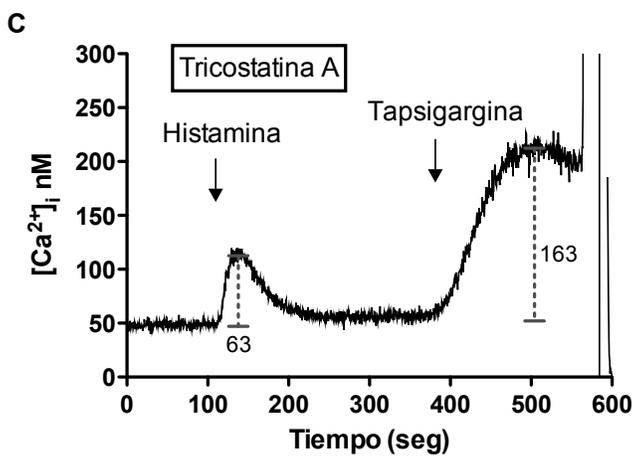
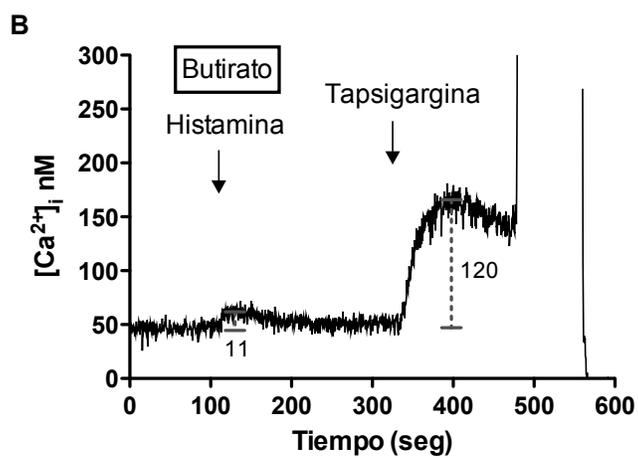
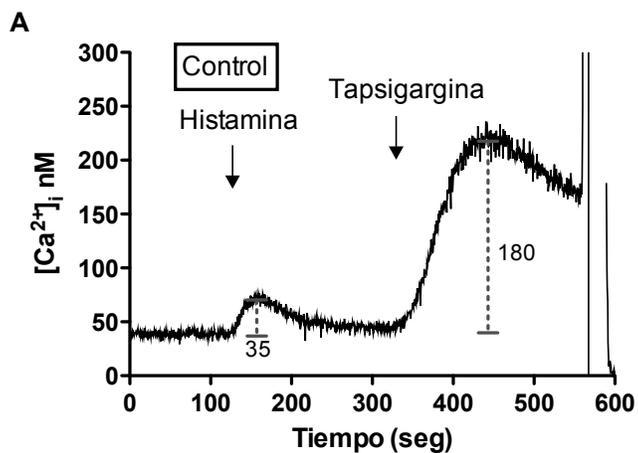


**Figura 13.** Expresión relativa de las isoformas de ARNm de SERCA en células Caco-2 y KATO-III, antes y después de la diferenciación celular. Los resultados de la amplificación por RT-PCR en tiempo real de las células A) Caco-2 y B) KATO-III, antes y después de la diferenciación, se graficó el promedio de dos experimentos individuales, determinados cada

uno por triplicado y normalizados contra el resultado de SERCA2b antes de la diferenciación de cada línea celular. C) Gráfica que demuestra la linealidad de amplificación de diluciones seriales 1/10 de ADN copia de KATO-III con los diferentes juegos de oligonucleótidos utilizados.

### **8.5 Determinación de calcio intracelular en líneas celulares de cáncer gástrico y de colon inducidas a diferenciación.**

Se analizó el efecto del aumento de SERCA3 tras la diferenciación, en el manejo de calcio intracelular, a través de la determinación de FURA-2 AM. Se utilizaron histamina y tapsigargina como estímulos para aumentar la cantidad de  $[Ca^{2+}]_i$  y observar la respuesta de las células indiferenciadas y diferenciadas a cada estímulo. La adición de histamina produjo la mayor liberación de  $[Ca^{2+}]_i$  en las células diferenciadas con Tricostatina A, pero muy discreta en las tratadas con butirato. En tanto con la adición de tapsigargina, la mayor liberación de 180 nM de  $[Ca^{2+}]_i$  se observó en las células sin diferenciar, muy similar a 163 nM en las células tratadas con Tricostatina A, mientras en las células diferenciadas con butirato fue de 120 nM (ver Figura 14).



**Figura 14. Determinación de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  en células KATO-III antes y después de la diferenciación.** Se utilizaron células KATO-III indiferenciadas e inducidas a diferenciación con butirato o Tricostatina A durante 72 h utilizando FURA-2 AM. En cada trazo se indica mediante una flecha, el momento en que se adiciono histamina o tapsigargina, como estímulos para aumentar la cantidad de  $[Ca^{2+}]_i$ . Se muestran trazos representativos de A) Células sin tratamiento, B) Células tratadas con butirato 3 mM y C) Células tratadas con Tricostatina A 100 nM, obtenidos de dos experimentos independientes medidos cada uno por duplicado.

### 8.6 Análisis de la secuencia del promotor de *ATP2A3* humano.

Para investigar que mecanismo de regulación transcripcional está involucrado en el aumento de la expresión de ARNm después de la diferenciación celular, se realizó un análisis de secuencia de la región promotora del gen *ATP2A3* para identificar la región del promotor que se encuentra altamente conservada entre las diferentes especies y que por ello resulte fundamental en la regulación de la expresión del gen.

El análisis *in silico* con BLAST entre las secuencias promotoras de los genes humano, chimpancé, toro, rata y ratón, mostró que el gen del humano y el del chimpancé (*Pan troglodytes*) son prácticamente idénticos, aunque con algunos “gaps”, y un mayor grado de conservación de la región promotora del gen humano con el del toro (*Bos taurus*) comparado con el de la rata (*Rattus norvegicus*) o ratón (*Mus musculus*). Se identificaron tres regiones altamente conservadas entre todas estas especies (Figura 15A), la más distal desde -2975 a -2156, una muy corta intermedia desde -916 hasta -727 y la más proximal y que abarca el sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) desde -237 hasta +200. En la Figura 15B se muestra otro análisis mediante el Software MathInspector de Genomatix que predice los factores de transcripción que poseen una secuencia de reconocimiento dentro de -1000 pb del promotor de *ATP2A3*, mostrando que los elementos más abundantes son secuencias que unen factores de transcripción de la familia Krüppel, que incluye Klf's y Sp's. La Figura 15C, muestra la secuencia proximal del gen *ATP2A3* de 180 pb corriente arriba del TSS humano, indicando las secuencias putativas de reconocimiento de factores de transcripción que identificó el Software Genomatix MathInspector y la identidad de secuencia con las secuencias promotoras de los genes del toro, rata y ratón que comparten con la



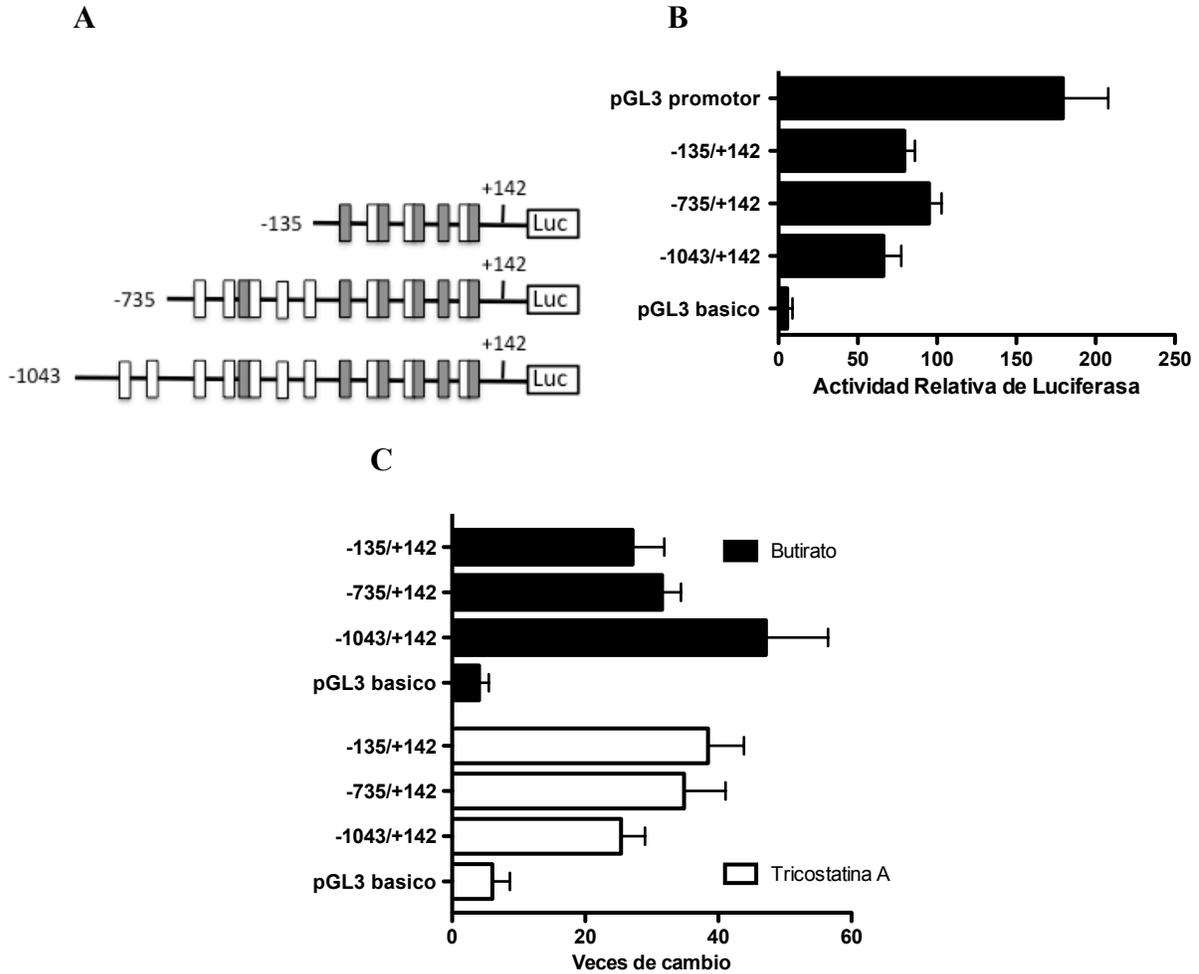


**Figura 15. Análisis *in silico* de las regiones proximales 5' del gen *ATP2A3* entre especies.**

A) El análisis de comparación de secuencias de nucleótidos fue realizada utilizando el programa MacVector 11.0.4 y el algoritmo BLAST de NCBI. B) El análisis de 1000 pb corriente arriba del TSS del gen humano *ATP2A3* con el Software Genomatix MathInspector, identificó secuencias de reconocimiento para factores de transcripción tipo Klf's y Sp's (Sp-like). C) La región proximal (230 pb) del gen *ATP2A3* se encuentra conservada entre las secuencias genómicas del humano, toro, rata and ratón con algunos “*mismatches*”. Identificando en esta región, a 8 sitios putativos Sp-like, además de un INR y un DPE como secuencias que reconocen factores basales de la transcripción.

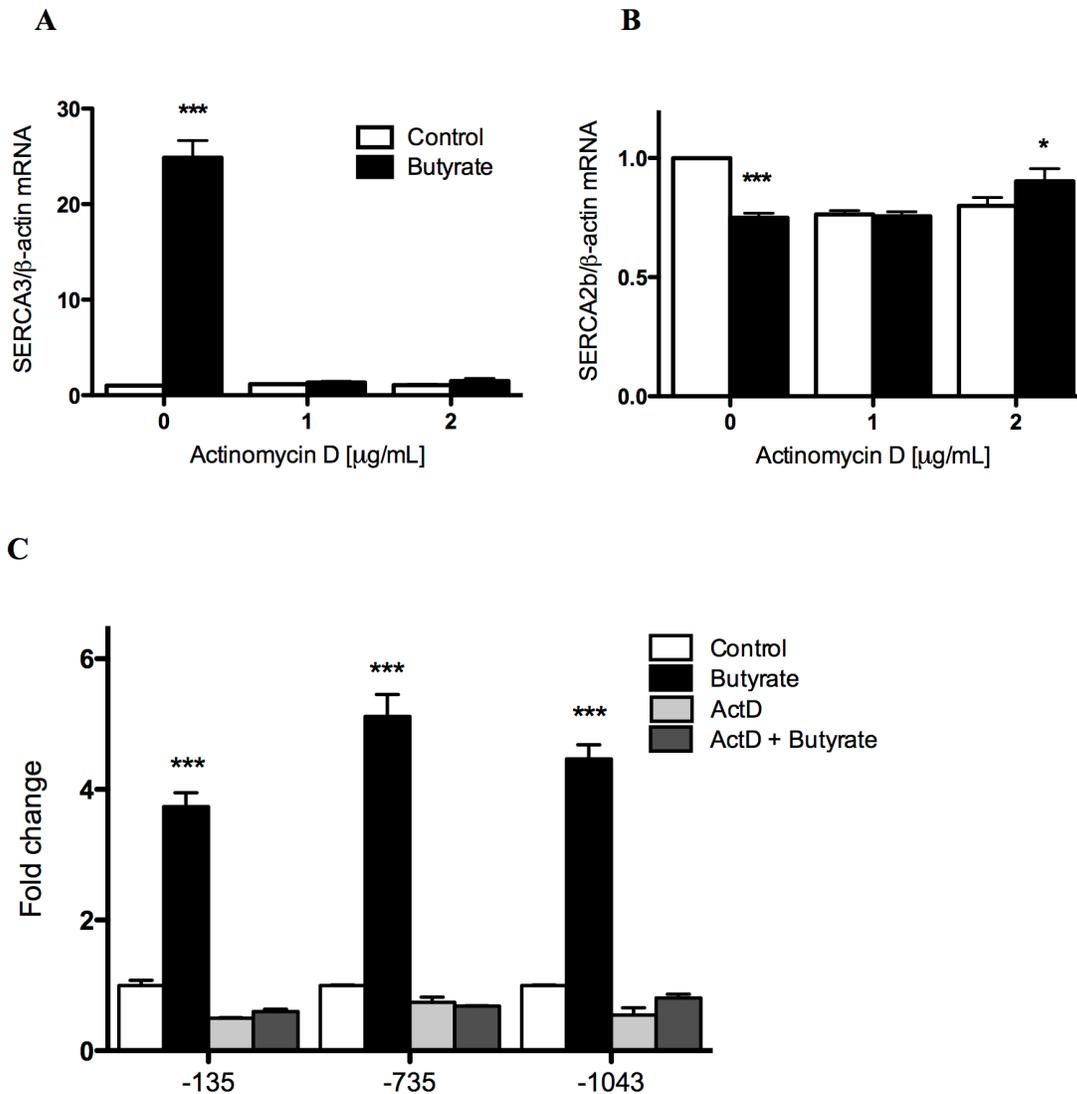
**8.7 Determinación de la actividad transcripcional de construcciones quiméricas del promotor del gen humano *ATP2A3*.**

Se determinó el efecto de los tratamientos que inducen diferenciación celular sobre la actividad transcripcional de tres construcciones del promotor humano *ATP2A3* fusionadas al gen de luciferasa y transfectadas de forma transitoria en células KATO-III. En la Figura 16A se esquematiza el tamaño de cada construcción y además mediante cajas en gris o blanco se identifican secuencias putativas de reconocimiento para factores de transcripción Sp o Klf, respectivamente. En la Figura 16B se observa la actividad relativa de cada una de las tres construcciones, usando como control positivo de transfección al promotor de SV40 y como control negativo una construcción sin promotor alguno, pGL3 basic. La actividad de las tres construcciones del gen *ATP2A3* humano resulto similar entre ellas, aunque con mayor actividad en la construcción intermedia de -735 a +142 pb, equivalente a aproximadamente la mitad de la actividad del control positivo. En la Figura 16C se observa que la inducción de diferenciación de células transfectadas con estas construcciones usando butirato o Tricostatina A se traduce en un marcado incremento en la actividad de todas las construcciones, con un aumento de por lo menos 20 veces con ambos tratamientos desde la construcción más corta.



**Figura 16. La inducción de la diferenciación celular aumenta la actividad transcripcional de fragmentos del promotor humano de *ATP2A3*.** A) Representación esquemática de los sitios putativos de reconocimiento de factores Klf y Sp situados dentro de los 1043 pb de la secuencia corriente arriba del TSS de *ATP2A3*, como cajas blancas o grises respectivamente. Cada sitio fue identificado mediante el Software MathInspector de Genomatix. B) Células KATO-III fueron transfectadas transitoriamente con construcciones *pGL3-ATP2A3/Luc* (-135, -735 y -1043 a +142 pb) durante 48 h. Se determinó la actividad de luciferasa en células lisadas normalizando contra la cantidad de proteína de los mismos extractos. C) Células KATO-III transfectadas fueron tratadas con butirato o Tricostatina A durante 48 h y se recalculo la actividad como veces de incremento con respecto a células sin tratamiento. Los datos representan valores promedio +/- EE de tres experimentos medidos por duplicado.

Se observó que el tratamiento con un inhibidor de la transcripción *de novo* Actinomicina D, previno la transactivación de la expresión de ARNm de SERCA3, así como la actividad del promotor *ATP2A3/Luc*, figura 17A y 17C respectivamente, producida por el tratamiento con butirato. El tratamiento con Actinomicina D no altera lo observado con el ARNm de SERCA2b, figura 17B.

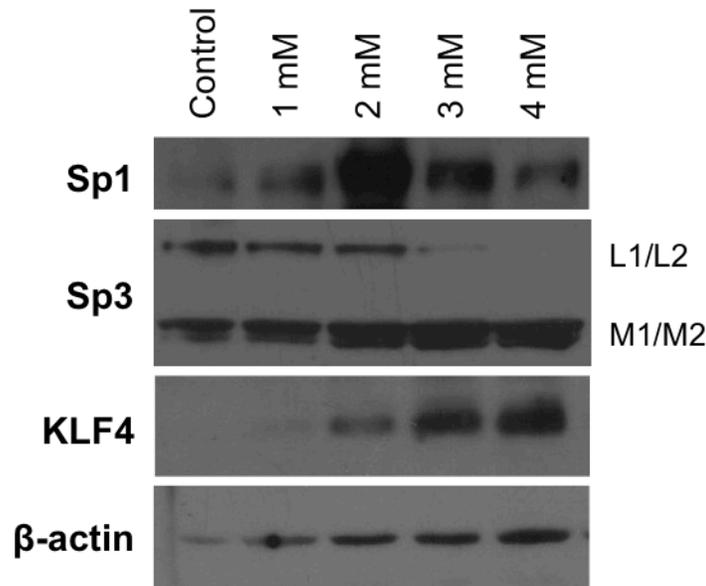


**Figura 17.** El tratamiento con Actinomicina D bloquea el aumento en la expresión de ARNm de SERCA3, así como de la actividad transcripcional del promotor *ATP2A3/Luc* inducido por butirato. Las células KATO-III fueron co-tratadas con 2 mM de butirato de sodio y dos diferentes concentraciones de Actinomicina D durante 16 h (1 o 2  $\mu\text{g/mL}$ ). A) ARNm de SERCA3, B) ARNm de SERCA2b fueron determinados mediante qRT-PCR. Los

resultados fueron normalizados contra la expresión de ARNm de  $\beta$ -actina y con respecto a células control sin tratar. C) Transfección transitoria de tres construcciones *ATP2A3/Luc* que contienen las secuencias del promotor -135 a +142 pb, -735 a +142 pb y -1043 a +142 pb en células KATO-III, 24 h después las células fueron tratadas 1 h con 2  $\mu$ g/mL de Actinomicina D, después se adicionó 2 mM de butirato y tras 6 h las células se lisaron para medir la actividad de luciferasa. Los resultados se normalizaron contra la concentración de proteína total y se expresaron como veces de cambio con respecto a la construcción sin tratamiento. Los datos representan valores promedio  $\pm$  S.E.M. de al menos tres experimentos medidos por triplicado. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$  vs. control.

### **8.8 Expresión diferencial de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y KLF4 después de la diferenciación celular.**

La abundancia de los diferentes factores de transcripción fue medida mediante Western blot en extractos de células KATO-III inducidas a diferenciación con butirato de sodio, encontrando que hay aumento en la abundancia de Sp1 y Klf-4, en la detección de los factores de transcripción Sp3 se observaron 4 isoformas de las cuales como puede verse en la Figura 18 hay aumento de las isoformas de menor peso molecular y disminución de las de mayor peso molecular. Con cada uno de los factores de transcripción analizados se obtuvo una abundancia diferencial.

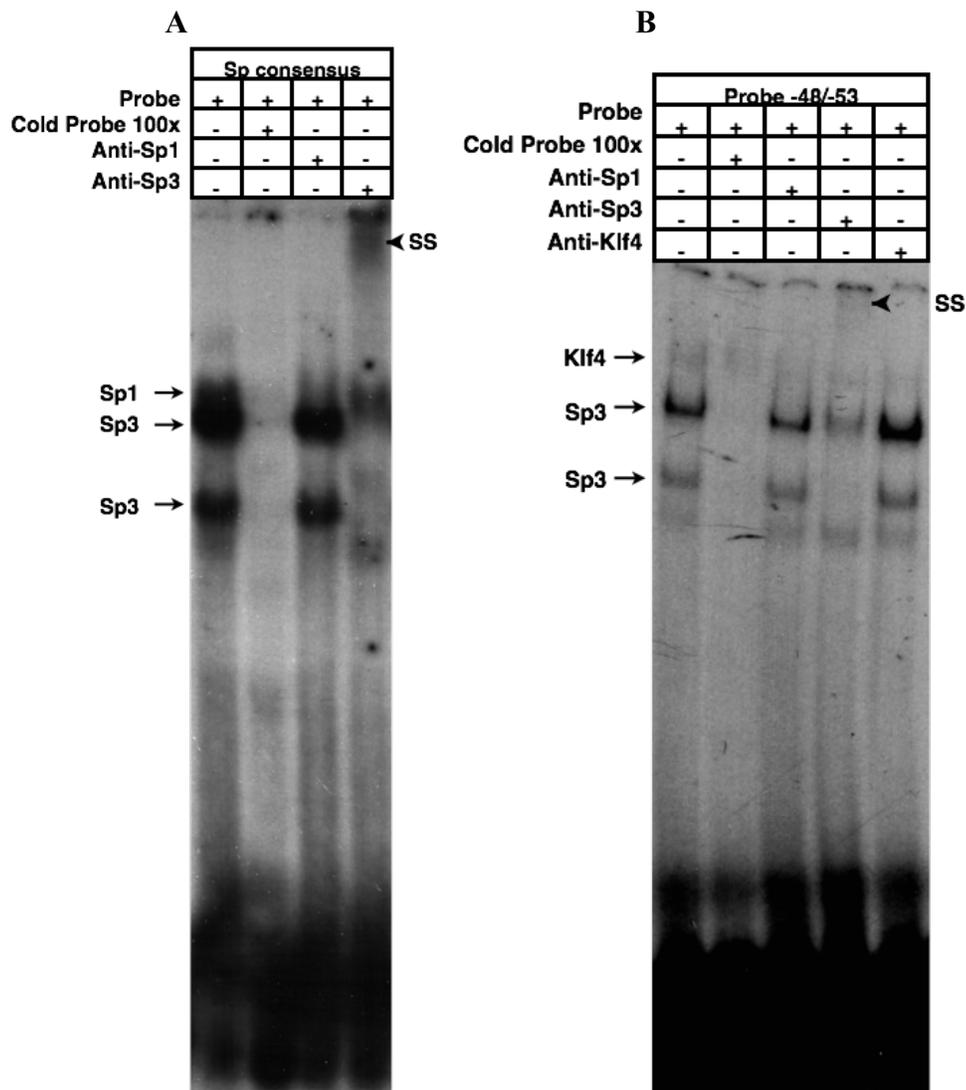


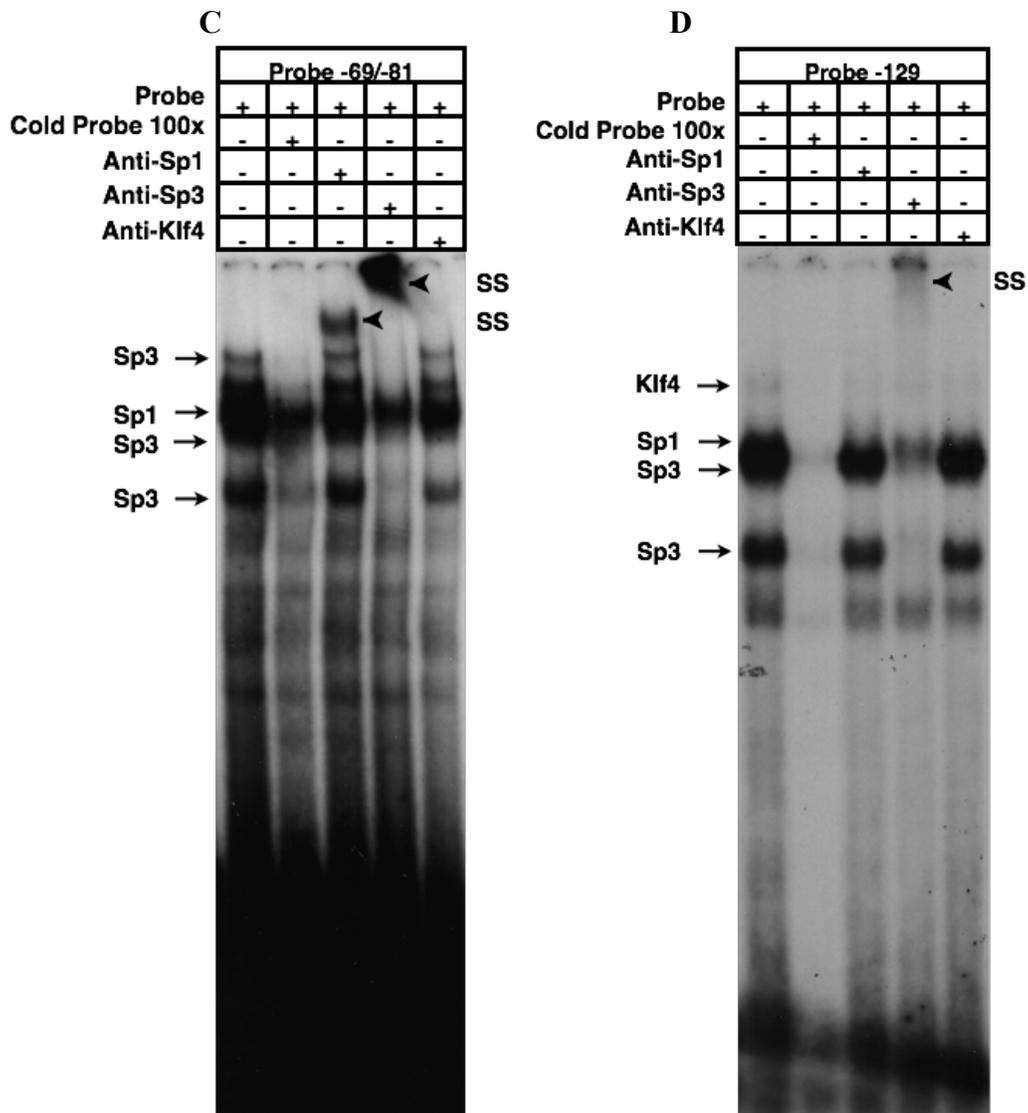
**Figura 18. Expresión de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf-4 en células KATO-III diferenciadas con butirato.** Se usaron concentraciones de 1 a 4 mM durante 96 h de tratamiento. Imagen representativa del promedio de dos experimentos individuales, normalizados contra  $\beta$ -actina. L1/L2 isoformas de alto peso molecular, M1/M2 isoformas de bajo peso molecular.

### 8.9 Ensayo *in vitro* de unión ADN-proteína que demuestra la unión de factores de transcripción por su secuencia blanco en el promotor de *ATP2A3*.

Para probar la funcionalidad de los elementos putativos identificados mediante análisis computacional, se realizaron ensayos EMSA usando las secuencias del promotor de *ATP2A3* marcadas con [ $^{32}$ P] y extractos de proteínas nucleares de las células de carcinoma de colon (Figura 19A) y gástrico (Figura 18B) inducidas a diferenciación, identificando la interacción de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf-4 con sus secuencias blanco como bandas de súper-retardamiento (SS) tras incubación con el anticuerpo específico correspondiente. En cada ensayo se discriminaron las bandas inespecíficas mediante competencia con la misma sonda sin marca radiactiva adicionada en exceso. El uso de una sonda de ADN con la secuencia consenso de Sp permitió confirmar que las bandas observadas corresponden con los factores de transcripción Sp1 y Sp3, además de que en cada ensayo se utilizó un anticuerpo específico contra cada factor de transcripción.

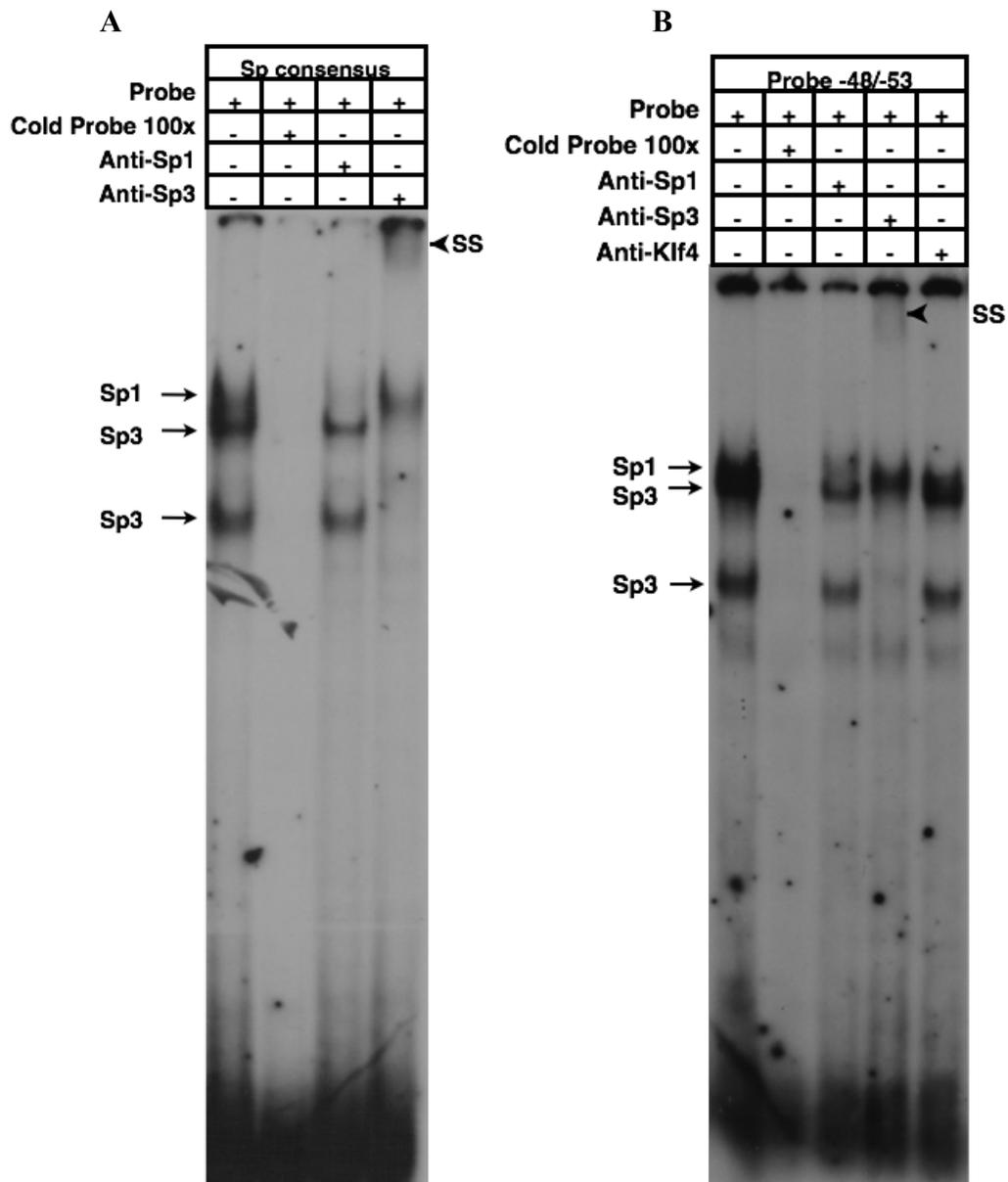
En la Figura 19 se observan los resultados obtenidos con la línea celular Caco-2. Con la sonda consenso Sp (panel A), hubo presencia de tres complejos ADN-proteína que compitieron específicamente con 100 veces de exceso de sonda fría. Se aprecia que estos complejos ADN-proteína compitieron con anticuerpos Sp1 y Sp3. Con la sonda -48/-53 (Fig. 19B), se observaron tres complejos específicos que compitieron con anticuerpos contra Klf4 y Sp3. Con la sonda -69/-81 (Fig. 19C), se observaron cuatro complejos ADN-proteína y se identificaron como Sp1 y Sp3 a través de la formación de complejos de súper-retardamiento (SS). En el panel D se observa el resultado de la sonda -129, donde se observaron cuatro complejos que compitieron específicamente con anticuerpos Sp1, Sp3 y Klf-4.

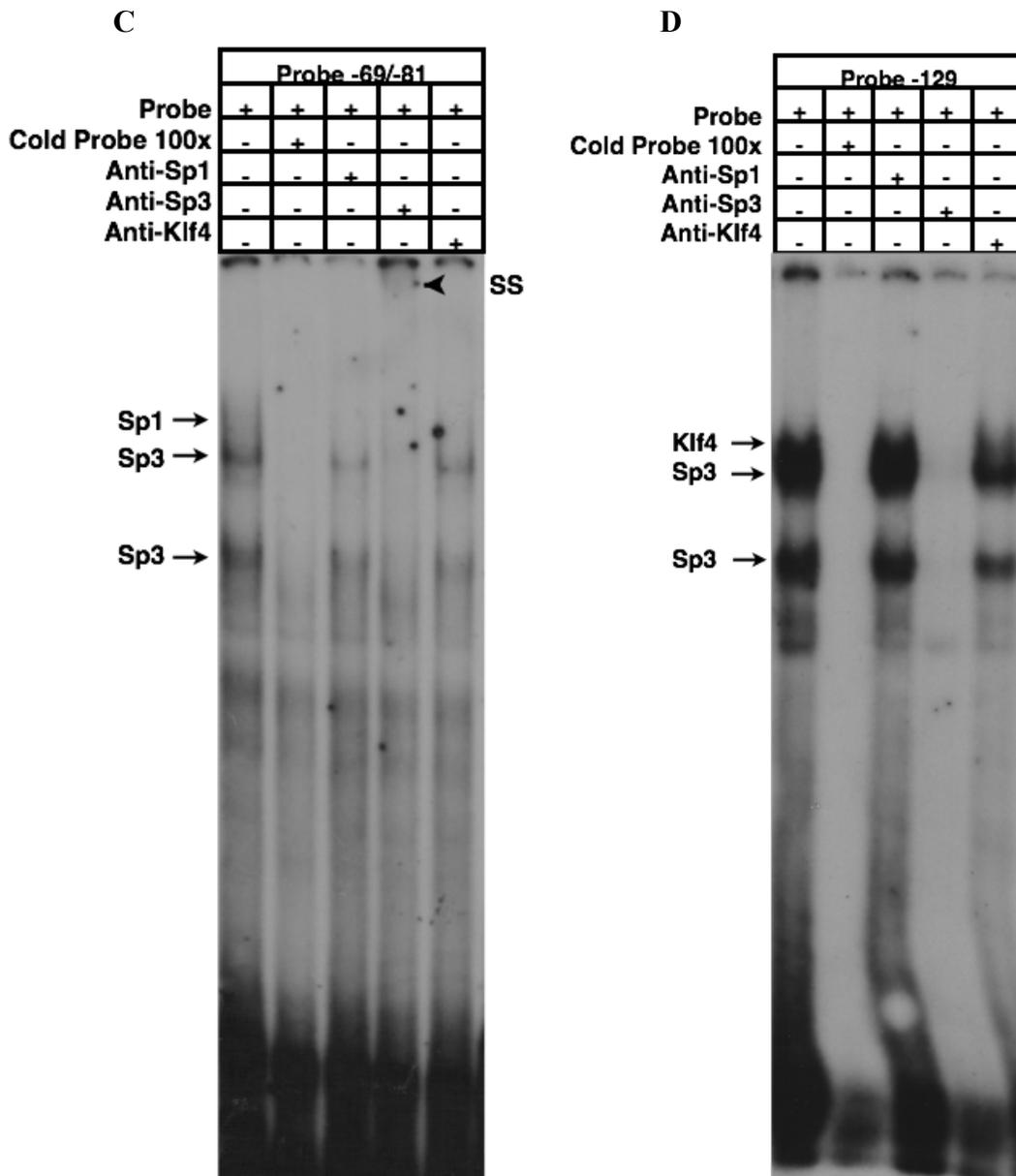




**Figura 19. Ensayo *in vitro* de interacción de elementos putativos del promotor proximal de *ATP2A3* con extractos nucleares de células *Caco-2*.** Ensayos de EMSA fueron realizados con sondas marcadas con [ $^{32}$ P] de la secuencia consenso de Sp, y sondas con la secuencia del promotor de *ATP2A3* con los elementos Sp y Klf (Sonda -48/-53, Sonda -69/-81 y Sonda -129, ver secuencia en la Tabla 3). Las sondas marcadas se incubaron con 10  $\mu$ g de extractos nucleares de células *Caco-2* con 22 días de diferenciación. A) Sonda consenso Sp. B) Sonda -48/-53, C) Sonda -69/-81 y D) Sonda -129. Las *flechas* indican la posición de un complejo específico, las *cabezas de flecha* indican complejos de súper-retardamiento (SS). Los resultados son imágenes representativas de al menos dos experimentos realizados de forma independiente.

Los resultados obtenidos con la línea celular KATO-III se resumen en la Figura 20. Con la sonda consenso Sp1 (panel A) se observaron tres complejos que compitieron específicamente con un exceso 100 veces de sonda fría, identificando cada complejos ADN-proteína según su competencia con anticuerpos específicos contra Sp1 y Sp3. En los paneles B y C, se observaron tres complejos específicos ADN-proteína con las sondas -48/-53 y -69/-81, los cuales compitieron con anticuerpos Sp1 y Sp3. Por último, en el panel D, con la sonda -129, también se observaron tres complejos, pero estos compitieron con anticuerpos específicos contra Klf4 y Sp3.



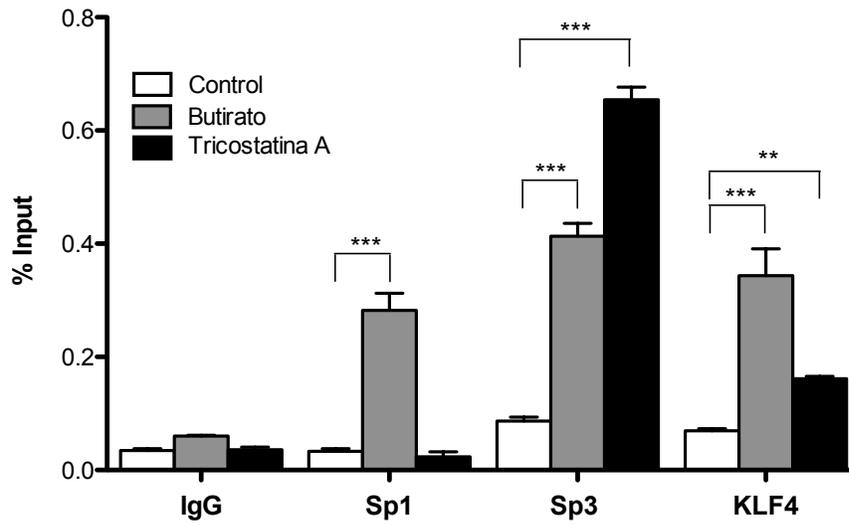
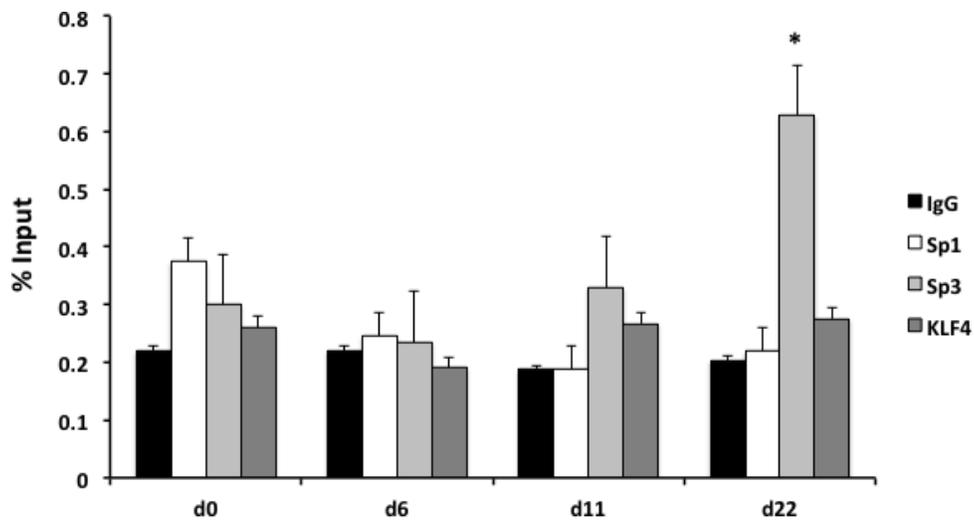


**Figura 20. Ensayo *in vitro* de interacción de elementos putativos del promotor proximal de *ATP2A3* con extractos nucleares de células KATO-III.** Ensayos de EMSA fueron realizados con sondas marcadas con [<sup>32</sup>P] de la secuencia consenso de Sp, y sondas con la secuencia del promotor de *ATP2A3* con los elementos Sp y Klf (Sonda -48/-53, Sonda -69/-81 y Sonda -129, ver secuencia en la Tabla 3). Las sondas marcadas se incubaron con 10 µg de extractos nucleares de células KATO-III inducidas a diferenciación con 3 mM de Butirato de sodio durante 96 h. A) Sonda consenso Sp. B) Sonda -48/-53, C) Sonda -69/-81 y D) Sonda -129. Las *flechas* indican la posición de un complejo específico, las *cabezas de flecha* indican

complejos de súper-retardamiento (SS). Los resultados son imágenes representativas de al menos dos experimentos realizados de forma independiente.

#### **8.10 Ensayo *in vivo* de unión ADN-proteína que demuestra la unión de factores de transcripción por su secuencia blanco en el promotor de *ATP2A3*.**

Se corroboraron los resultados del ensayo de EMSA mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), probando si la interacción de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf4 también ocurre en células vivas además de *in vitro*. Se realizó ChIP usando cultivos de células KATO-III y Caco-2 inducidas a diferenciación con iHDAC's o post-confluencia, respectivamente. En la Figura 21A se observa que las células KATO-III tratadas con butirato y Tricostatina A mostraron enriquecimiento de los factores de transcripción Sp3 y Klf4 con respecto a las células sin diferenciar. Mientras que sólo se observó enriquecimiento de Sp1 en el promotor de *ATP2A3* en las células tratadas con butirato. En las células Caco-2, solo se observó enriquecimiento de Sp3 en células con 22 días en confluencia, en tanto que no pudo demostrarse el enriquecimiento específico de Sp1 o Klf4 sobre el promotor de *ATP2A3* (ver Figura 21B)

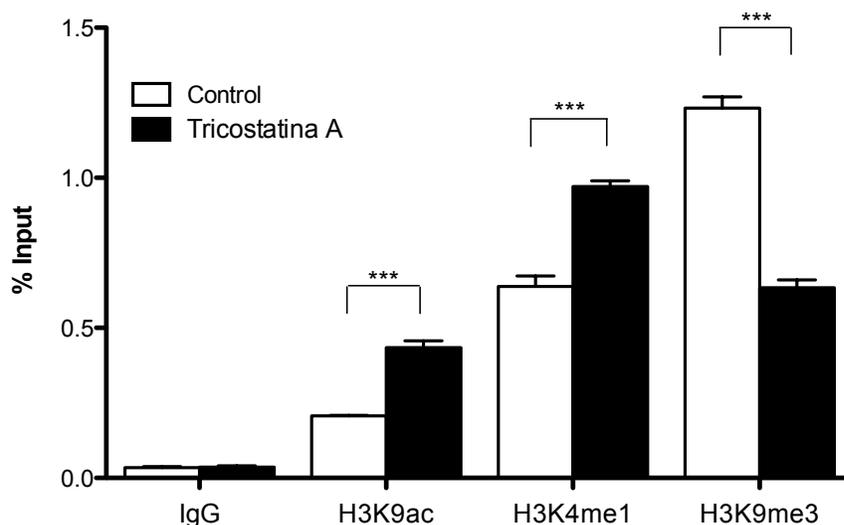
**A****B**

**Figura 21. Regulación de la expresión de SERCA3 mediante la unión diferencial de Sp1, Sp3 y Klf4 con sus secuencias blanco en el promotor de *ATP2A3*.** La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó con células epiteliales sin tratamiento e inducidas a diferenciación usando anticuerpos específicos contra Sp1, Sp3, Klf-4 o IgG como control negativo. A. Cromatina de células KATO-III control y tratadas con butirato 3 mM o Tricostatina A 100 nM durante 72 horas. B. Cromatina de células Caco-2 con hasta 22 días de diferenciación. PCR cuantitativo fue utilizado para determinar la cantidad de anticuerpo unido al promotor proximal de *ATP2A3* y los resultados se expresan como % de señal detectada con

respecto a la que proporciona el Input al 1%. Diferencias significativas (\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.1$ ) contra las células control sin tratamiento.

### 8.11 Ensayo *in vivo* que demuestra que el aumento en la expresión de SERCA3 en células diferenciadas de cáncer epitelial se acompaña de modificación en residuos de histonas que favorecen su expresión.

Para mostrar si la regulación de la expresión de *ATP2A3* se acompaña de modificaciones epigenéticas, Figura 22. Se determinó mediante ChIP la modificación de residuos de histonas en células KATO-III inducidas a diferenciación probando anticuerpos contra la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) y la monometilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1) como marcas de cromatina abierta. Además, se examinó la trimetilación de la lisina 9 de la Histona H3 (H3K9me3) como marca de cromatina cerrada. Como se observa en la Figura 22 se encontró enriquecimiento de las marcas de cromatina abierta, H3K9ac y H3K4me1, en las células diferenciadas con Tricostatina A con respecto a las células indiferenciadas. En tanto, se encontró disminución en la marca de la cromatina cerrada H3K9me3 sobre el promotor de *ATP2A3*.



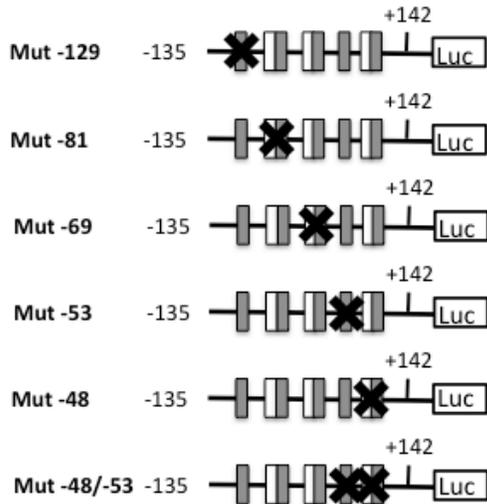
**Figura 22. Regulación de la expresión de SERCA3 a través de modificación de residuos de histona en el promotor de *ATP2A3*.** La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó con células KATO-III sin tratamiento e inducidas a diferenciación con Tricostatina A 100 nM. Se inmunoprecipitó con anticuerpos contra marcas en las histonas H3K9ac,

H3K4me1, H3K9me3 o IgG como control negativo. PCR cuantitativo fue utilizado para determinar la cantidad de anticuerpo unido al promotor proximal de *ATP2A3* y los resultados se expresan como % de señal detectada con respecto a la que proporciona el Input al 1%. Diferencias significativas (\*\*\*) $p < 0.001$ ) contra las células control sin tratamiento.

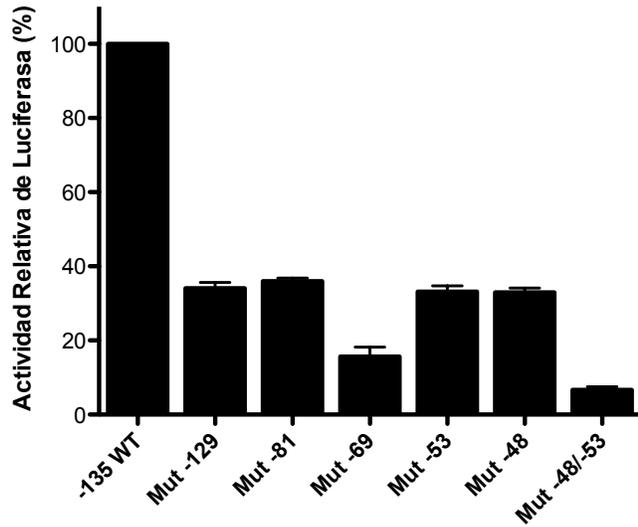
### **8.12 Efecto de la mutación sitio dirigida de los elementos *cis* del promotor de *ATP2A3* en la actividad transcripcional del promotor.**

Se demostró que los factores de transcripción se unen diferencialmente al promotor de *ATP2A3* y participan en la regulación de su expresión, Figura 23. Sin embargo, puesto que existen 8 elementos Sp y Klf dentro de los 135 pb del promotor proximal para probar cuál es su papel como elementos unitarios se realizaron mutantes puntuales de cada elemento. El nombre de la construcción corresponde con la posición del elemento *cis* mutado, para mutar los diferentes elementos, se realizó una sustitución de dos bases dentro de la secuencia *core* de reconocimiento. Sin embargo, en las construcciones -81, -69, -53 y -48, los elementos identificados mediante análisis bioinformático se encuentran sobrelapados y la sustitución de solo dos bases elimina hasta dos sitios de reconocimiento (ver Figura 23A y 15C). Todas las mutantes generadas mostraron actividad menor al 50% de la construcción silvestre -135/+142 pb. La construcción mutante del elemento -69 fue la que mostro la menor actividad entre las mutantes. En la construcción denominada -48/-53 se conjunto la mutación de los elementos -48 y -53, mostrando la menor actividad de todos los elementos mutados. Ver Figura 23B. El tratamiento con iHDAC's de las células transfectadas con las construcciones mutantes provocó un aumentó en la actividad transcripcional hasta de 3.5 veces en la mutante -81 tratada con Tricostatina A. Por otro lado, la doble mutante de -48/-53 fue la que mostró la menor inducción de la actividad con iHDAC's que además, coincide con la construcción que mostró menor actividad entre las mutantes del promotor de *ATP2A3*. Ver Figura 23C.

A



B



C

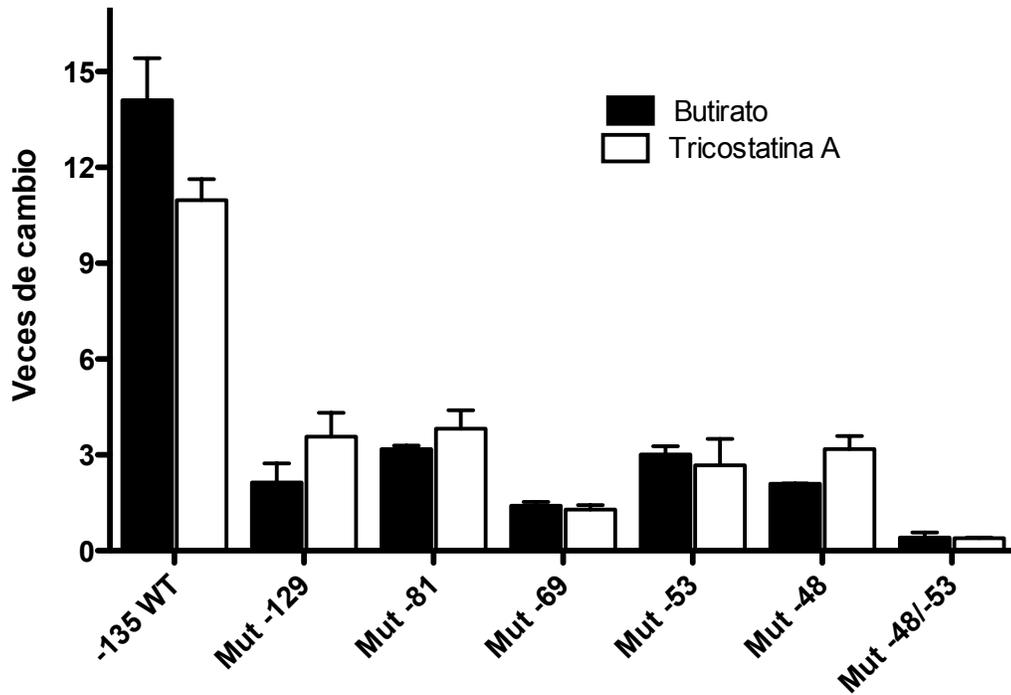


Figura 23. La mutación de los elementos *cis* Sp y Klf bloquea la expresión basal de *ATP2A3* y su transactivación a través de inhibidores de HDAC's. A. Representación esquemática de los sitios putativos Sp (cajas grises) y Klf (cajas blancas) presentes en la secuencia de -135 pb del promotor de *ATP2A3*, la tache indica los elementos mutados en cada construcción según lo descrito en "Materiales y Métodos". B. Actividad transcripcional de las

construcciones mutadas transfectadas en células KATO-III comparado contra la actividad normal de la construcción -135/+142 pb. C. Células KATO-III transfectadas con las construcciones mutantes fueron tratadas con butirato (2 mM) o Tricostatina A (100 nM) durante 48 h; la actividad transcripcional se expresa como veces de cambio con respecto a la construcción -135/+142 pb sin tratamiento. La eficiencia de transfección se normalizó contra la cantidad de proteína total. El nombre de las mutantes corresponde con la localización de los elementos putativos Sp y Klf en la secuencia del promotor de *ATP2A3* (ver Tabla 4). Los datos se representan como el valor +/- EE de tres experimentos medidos por duplicado.

## 9. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La disminución en la expresión de SERCA3 se ha observado en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer gástrico, de colon, mama y pulmón, presentando una fuerte asociación con el desarrollo de la patología, invasión y metástasis, por lo cual su grado de expresión incide en el pronóstico de la enfermedad (1,9,64,65).

Un conjunto de investigaciones previas han encontrado una disminución marcada y constante en la expresión de la proteína SERCA3. En el trabajo de maestría “Análisis de la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* (SERCA2 y SERCA3) en líneas celulares humanas de cáncer gástrico y de colon” se describió que también hay disminución en la expresión del ARNm de *ATP2A3*, el gen que codifica para la bomba SERCA3. Modelos de diferenciación en células epiteliales han establecido que es posible inducir la expresión de SERCA3 a nivel de abundancia de proteína (1). Éste proyecto pretende determinar el mecanismo por el cual aumenta la expresión de la bomba, cuyas evidencias señalan que dicho incremento tiene consecuencias en la homeostasis del calcio, restableciendo con la diferenciación, la muerte de las células cancerosas.

Los tratamientos utilizados para inducir la diferenciación de células de cáncer gástrico KATO-III, butirato y Tricostatina A (TSA), ambos con actividad inhibidora de desacetilasas de histonas (iHDAC's), mostraron un notable aumento en la expresión de ARNm de *ATP2A3* de hasta 40 veces con respecto al control (ver Figuras 10 y 11). En tanto, el ARNm de *ATP2A2* se mantiene sin cambios o disminuye ligeramente con ambos tratamientos. En adición, se observaron cambios también en la expresión de las proteínas SERCA2 y SERCA3, consistente con los reportes previos (1,15).

La diferenciación por confluencia celular en Caco-2, resultó otro modelo útil, puesto que, sin la adición de ningún fármaco, fue posible observar un incremento en la expresión de *ATP2A3* similar en magnitud al observado con los iHDAC's, de hasta 40 veces en el ARNm y disminución en la expresión de ARNm y proteína de *ATP2A2* (ver Figura 12). El cultivo de células Caco-2 tras 22 en cultivo forma una monocapa con transporte de solutos e iones que asemeja un epitelio funcional. Se ha establecido que SERCA2 y SERCA3 se expresan de forma simultánea en varios tejidos, la cual se ha asociado con microdominios con manejo particular de calcio, según la cinética de calcio de la isoforma presente (ver Tabla 1) (2,66). Entre la disminución de SERCA2 como respuesta al aumento de SERCA3, se desconoce si

hay un significado adicional de solo un mecanismo que compense el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de las células. Sin embargo, resultó claro que a pesar del significativo aumento en la expresión del ARNm de SERCA3, SERCA2b se mantiene como la isoforma más abundante en las células epiteliales tumorales antes y después de su diferenciación (ver Figura 13). Aunque los reportes indican que SERCA3 es muy abundante en epitelios diferenciados, se desconoce su abundancia con respecto a SERCA2b. El aumento de 32% observado tras la diferenciación de la isoforma SERCA3 con respecto a SERCA2b, se desconoce si es el equivalente al que se encuentra en un epitelio funcional, el panorama es más complejo si además se considera que SERCA2b posee una afinidad 10 veces mayor por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{0.5}$  0.13  $\mu\text{M}$  2b, 1.47  $\mu\text{M}$  3a). Sin embargo, proponemos que al menos en parte, el aumento en la expresión de SERCA3, restablece las vías de señalización por calcio alteradas en cáncer.

En la Figura 14, es posible apreciar un manejo diferencial de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  entre células KATO-III en estado maligno e inducidas a diferenciación. Histamina induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE en una forma dependiente de fosfolipasa C, en adición la liberación puede estar acompañada por influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  impulsado por la inhibición específica de la bomba SERCA con tapsigargina. Se observó que tanto histamina como tapsigargina, inducen un aumento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sin embargo la cinética fue distinta entre células KATO-III diferenciadas y sin tratar, cada grupo de células mostró diferencias en la magnitud y velocidad del cambio. Además, se observó una diferencia en el manejo del calcio entre las células diferenciadas ya sea con butirato o con TSA, figura 14 B y C, sin embargo, no es posible atribuir las diferencias observadas solo al incremento en la expresión de SERCA3, ya que otras bombas o canales de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden participar en la respuesta observada.

Griffin y cols. en 2006 reportaron que la disminución en la expresión de ARNm de *ATP2A3* aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  citoplásmica, que a su vez activa la respuesta a proteínas no plegadas (UPR), demostrando una función de SERCA3 como proteína de estrés en células Jurkat suplementadas con biotina (30). Los inhibidores de la bomba SERCA, también inducen un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  citoplásmica y disminución en el RE, la cual activa la respuesta de estrés del RE y diversas vías que llevan a muerte celular. Por esto último, se han buscado inhibidores de la bomba SERCA como tratamiento contra el cáncer. Tapsigargina, es un inhibidor específico de la bomba SERCA, sin embargo, cada isoforma presenta diferente sensibilidad:  $K_i=0.21$  nM para SERCA1b,  $K_i=1.3$  nM para SERCA2b y  $K_i=12$  nM SERCA3a

(67). Tapsigargina estabiliza la conformación E2 de la enzima por lo que su unión interfiere con la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y con ello con la formación del intermediario fosforilado (68).

Para entender los mecanismos moleculares involucrados en la inducción de la expresión de SERCA3, se estudió la regulación transcripcional del gen *ATP2A3* humano. Se realizó un análisis *in silico* de la región promotora del gen *ATP2A3* humano encontrando homología con cuatro especies: chimpancé, toro, rata y ratón. Entre las secuencias conservadas se identificaron tres regiones de homología, figura 15 A y C. La región conservada más distal se ubica entre -2975 y -2156 pb del TSS. Una porción intermedia de casi 200 pb, se encuentra en -916 y -727 pb con respecto al +1 de la secuencia del gen humano *ATP2A3*. La tercera región conservada sobrelapa con el +1, siendo una región rica en GC, que abarca hasta -237 pb corriente arriba del TSS y contiene 5 elementos putativos Sp y tres Klf, figura 15 B y C.

En el gen *ATP2A3* humano, un único sitio de inicio de la transcripción (TSS) (+1) está localizado a 152 nucleótidos (nt) corriente arriba del codón ATG, mientras que, en el gen de ratón, el único TSS se encuentra localizado a -301 nt. El grupo de Dode y cols. clonó diferentes construcciones del promotor del gen humano de *ATP2A3*, identificando que el promotor mínimo corresponde a la región de -135/-31 (5). En tanto el grupo de Hadri y cols., identificaron a la región de -97/+153 del promotor del gen de ratón como la responsable de su actividad basal, identificando elementos por arriba de -455 nt, que regulan de forma negativa su actividad (24). Para identificar si el promotor mínimo encontrado en ambas especies se corresponde, se realizó un alineamiento, encontrando que el promotor mínimo que reportan para el gen humano está contenido dentro del promotor mínimo del gen del ratón (ver Figura 3 y 15).

En el análisis de las secuencias de los promotores de *ATP2A3* de varias especies comparadas contra la del humano, se identificó que existe mayor homología entre el promotor humano y el del toro, encontrando homología hasta casi 4 Kb corriente arriba del TSS. Las regiones promotoras de los genes de rata y ratón conservan muy alta homología entre sí, pero poca comparada con la del promotor del gen humano. Se identificaron tres pequeñas regiones de homología que comprenden de -2967 a -2157/ -918 a -727/ -280 a +201, que también comparten homología con el promotor del toro, es decir que se encuentran conservadas en las 4 especies y que podrían ser fundamentales en su regulación transcripcional (ver Figura 15A y 15C).

En adición se realizó la identificación de sitios de reconocimiento para factores de transcripción que pudieran regular la expresión del gen *ATP2A3*. El software MathInspector de Genomatix identificó principalmente la presencia de sitios putativos para los factores de transcripción Sp y Klf, figura 15 B, los cuales además se encuentran conservados entre las diferentes especies dentro de la región proximal, figura 15C.

Es importante destacar que entre las características del promotor *ATP2A3* con respecto al gen *ATP2A2* que produce la forma ubicua SERCA2b, es que carece de caja TATA y en su lugar posee un elemento INR y un DPE, como sitios de reclutamiento de los factores basales de la transcripción. La literatura establece que en los promotores sin caja TATA resulta fundamental la presencia de elementos tipo Sp para la transcripción basal del gen (32,69). Respecto a la regulación transcripcional del gen *Atp2a3* de ratón, el grupo de Hadri *et al*, reporto que en células endoteliales MoBr 204 el gen se encuentra regulado por Sp1 y Ets1 (24).

A través de la cuantificación de la actividad transcripcional de diferentes porciones del promotor de *ATP2A3*, se investigó la contribución de los elementos putativos identificados mediante análisis *in silico*. Se evaluó el efecto de los iHDAC's en cultivos de células de cáncer gástrico KATO-III transfectadas con las construcciones quiméricas del gen *ATP2A3* fusionadas al gen de luciferasa como gen reportero. El tratamiento con butirato y Tricostatina A, activaron las tres porciones del promotor analizadas -135/+142, -735/+142 y -1043/+142, al menos 20 veces con respecto a su actividad basal, indicando que los elementos que inducen la respuesta se encuentran en la porción proximal de -135 a +142 pb, la cual contiene de 5 elementos putativos para Klf y 3 para Sp (ver Figura 16A y 16C).

En la figura 17 mediante el uso de Actinomicina D, un inhibidor de la transcripción *de novo*, previene el aumento en la expresión de ARNm de SERCA3 además de la activación de las distintas construcciones del promotor de *ATP2A3* inducido por butirato, indicando que la transactivación por éste iHDAC, es principalmente un fenómeno transcripcional.

La familia de KLF, está formada por proteínas con dominios de dedos de zinc, la integran 4 proteínas Sp's y 16 Klf's cuyas secuencias de reconocimiento son: cajas GC 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' y cajas GT 5'-GGTGTGGGG-3', respectivamente (34). Los diferentes factores que componen la familia KLF difieren en abundancia y localización celular, además contiene elementos que regulan tanto positiva como negativamente la

transcripción. Sp1 y Sp3 están relacionados con la diferenciación de los epitelios gástrico y del colon (70-73). Sp1 puede transactivar a través de la unión a otras moléculas de Sp1 en uno, dos o varios sitios de unión Sp1, a través del reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina como CBP/p300, SWI/SNF. Sp1 y Sp3 también puede interactuar con reguladores negativos como HDAC's y DNMT1, y correpresores como SMRT, NCoR y BCoR. Además, se propone un papel de Sp1 en proteger sitios de metilación dentro de islas CpG (32,71).

El GKlf o Klf4 debe su nombre a su alta abundancia en el epitelio intestinal (*Gut-enriched Krüppel-like factor*), sin embargo, su expresión también es muy abundante en el epitelio gástrico. La expresión de Klf4 tiene un patrón muy similar al de SERCA3, es decir abundante en epitelios intestinales, con expresión que aumenta gradualmente conforme las células alcanzan su estado de diferenciación final (36,74,75). En tejido canceroso se ha observado que la expresión de Klf4, se encuentra significativamente disminuida y de forma similar a SERCA3, su abundancia se correlaciona inversamente con el grado de malignidad de los tumores (70,74). En el modelo de ratón  $Apc^{Min}$  hay expresión disminuida de KLF4, la cual se acentúa conforme avanza el desarrollo de los tumores (76). La sobre-expresión de éste factor transcripción conduce a un arresto del crecimiento en líneas de cáncer de colon (38). En otra similitud a lo observado con SERCA3, la inducción de la diferenciación por butirato o confluencia también promueve la expresión de Klf4 (ver Figura 18) (36,39). A pesar de que la expresión de Klf4 es muy abundante en células diferenciadas normales, también es uno de los cuatro factores de transcripción que inducen reprogramación celular hacia células madre pluripotentes o iPSC (*induced pluripotent stem cells*) (77). Por lo que su papel en el desarrollo no se comprende por completo. Una explicación, es que KLF4 puede funcionar como activador y como represor transcripcional, según su interacción con proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, como son P300 o HDAC's (35,45).

Butirato además de inhibir la actividad de las HDAC's ejerce sus efectos a través de la activación de genes, incluyendo algunos factores de transcripción (51,78). En la figura 18 se comprobó la influencia del tratamiento con butirato en la expresión de factores de transcripción, resultando en un aumento en la expresión de Sp1, Klf4, las isoformas de bajo peso molecular de Sp3 y una disminución en las isoformas de alto peso molecular de Sp3. El patrón de expresión de Sp1, Sp3 y Klf4 observado, corresponde con reportes previos en líneas

celulares de cáncer epitelial diferenciadas con butirato (36,39,73). También se ha reportado en células del epitelio intestinal, que la inhibición de HDAC's incluso produce cambios post-traduccionales en los factores de transcripción, por ejemplo aumento en la fosforilación de Sp1 y acetilación de Sp3 (72,79).

Se demostró la interacción de Sp1, Sp3 y Klf4 mediante ensayos de interacción ADN-proteína. El ensayo *in vitro* de retardo de la movilidad electroforética, EMSA, identificó la interacción específica del factor de transcripción con su secuencia blanco en el promotor proximal de *ATP2A3* (-135 pb). En la figura 19, proteínas nucleares de células Caco-2 diferenciadas por confluencia, se encontró la unión de Sp1 y Sp3 dentro de las tres sondas usadas. Klf4 solo mostró reconocimiento por las sondas -48/-53 y -129 (la posición denota la posición de sitios putativos dentro de sondas de ADN de doble cadena de aproximadamente 30 pb), sin embargo a nivel de secuencia no existe sitio putativo en -129. Lo anterior apunta a que Klf4 podría interaccionar a través de otro factor de transcripción como un Sp1 o Sp3, forma de un complejo.

En el EMSA con proteínas de KATO-III, se encontró unión constante y clara de Sp3 con las 3 sondas, en tanto que Klf4 solo mostró unión con la sonda de -129. En tanto, Sp1 no mostró reconocimiento del sitio -129, pero de las otras dos sondas sí. El reporte previo de Hadri y cols. en líneas celulares derivadas de endotelio normal de ratón, estableció que el Sp1 transactiva la expresión del gen *Atp2a3* de ratón, a través de la interacción específica con los elementos conservados y localizados en -81 y -53 del gen humano. Sin embargo, en éste trabajo de tesis solo se observó unión de Sp1 con estos elementos en los extractos de células diferenciadas de KATO-III e interacción con el elemento de -81 en células Caco-2 (ver Figura 19 y 20). El sitio identificado por nosotros como -81, Hadri lo reporta como un elemento que es capaz de reconocer Ets-1 (EBS, *Ets-1 binding site*) demostrando también su funcionalidad, sin embargo, nosotros no observamos la unión específica de éste factor de transcripción en ensayos de EMSA (Figura no mostrada), pero sí la unión de Sp1 y Sp3 sobre la sonda -69/-81 que cubre éste sitio (24). En adición, la unión de Sp1, Sp3 y Klf4 sobre las secuencias consenso del promotor de *ATP2A3* podría ocurrir de forma conjunta, se sabe que Sp1 y Sp3 pueden unirse en forma de homodímeros o heterodímeros, sin embargo, no existen reportes de sí Klf4 puede formar complejos con los Sp's, así como se desconoce si esta interacción incidiría en su función como activador o represor transcripcional.

Para confirmar los resultados de interacción ADN-proteína *in vitro*, se realizó inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con extractos de células KATO-III diferenciadas fijadas con formaldehído. Sp1 mostró unión *in vivo* en extractos de células tratadas con butirato, pero no con Tricostatina A. Sin embargo, la diferenciación con ambos tratamientos si enriquecieron el reclutamiento de Sp3 y Klf4 sobre el promotor de *ATP2A3* en comparación con células sin tratar. Los extractos de células Caco-2 solo mostraron enriquecimiento Sp3 tras 22 días de diferenciación (ver figura 21).

El ChIP también permitió evaluar el efecto de los iHDAC's en marcas de la cromatina, mostrando un enriquecimiento en las marcas de cromatina abierta H3K9me1 y H3K9ac, y disminución en la marca de cromatina condensada H3K9me3, consistente con el aumento en la expresión de SERCA3 observado en células KATO-III (ver Figura 22).

El papel de Sp1, Sp3 y Klf4 quedó demostrada a través de la mutación de los 5 elementos putativos Sp (GGGCGG; en -48, -53, -69, -81 y -129 pb) y los 3 sitios para Klf (GTGTGGG; en -53, -69, -81 pb) localizados en la región proximal de -135/+142 del promotor de *ATP2A3* (ver Figura 23). La actividad de las diferentes mutantes determinada en células KATO-III sin tratar, mostró que la mutante de -69 presentó la menor actividad. En dicho sitio, se sobrelapan un elemento Klf y uno Sp, y no había sido reportado previamente su importancia en la transcripción basal del gen *ATP2A3* humano. El papel de factores Sp, en la transcripción del promotor murino de *Atp2a3*, se ha visto en células endoteliales, donde la mutación de los elementos -53 y -81, conservados en todas las especies conduce a una caída en la actividad del promotor (24). En éste trabajo comprobamos que la mutación de los elementos -53 y -81, al igual que las otras mutantes que analizamos presenta una caída de más de 60% en la actividad transcripcional. La menor actividad se observó con una doble mutante que se generó de los sitios -48 y -53 con pérdida de la actividad basal de hasta el 90%. La doble mutante demuestra que la unión de los factores de transcripción Sp y Klf puede ocurrir de forma sinérgica y coordinada, ya que dicha mutante muestra menor actividad de la que presentaban de forma individual.

El efecto del butirato y la Tricostatina A en las mutantes, mostró que, aunque el tratamiento induce un aumento discreto en la actividad de dichas construcciones (por ejemplo, de 2 veces en vez de 14, en la mutante -129 con respecto a la construcción silvestre), las mutantes conservan cierta capacidad en promover la actividad de *ATP2A3* (ver Figura 23). Sin embargo,

es importante destacar que ni la mutante de -69, ni la doble mutante de -48/-53, mostraron inducción por butirato o Tricostatina A.

## 10. CONCLUSIONES

- La diferenciación *in vitro* de células de cáncer gástrico y de colon con iHDAC's y por confluencia celular, KATO-III y Caco-2, respectivamente, provocan un aumento específico en la expresión de ARNm de *ATP2A3* de hasta 40 veces, así como de la proteína SERCA3 correspondiente.
- En los modelos de diferenciación *in vitro* se determinó que a pesar del marcado aumento en la expresión de SERCA3, la isoforma de expresión ubicua SERCA2b se mantiene como la isoforma más abundante en las líneas celulares KATO-III y Caco-2 después de inducir la diferenciación.
- El marcado aumento en la expresión de SERCA3 tras la diferenciación con iHDAC's (butirato y Tricostatina A) se refleja de forma funcional en un manejo diferencial de la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células KATO-III con respecto a las no tratadas.
- El análisis putativo de la secuencia del promotor del gen *ATP2A3* identificó la presencia de elementos de reconocimiento de factores de transcripción de la familia Klf como Sp1, Sp3 y Klf4. Dichas secuencias se encuentran en la región proximal de -230 pb que se encuentra conservada entre los genes *ATP2A3* de toro, rata, ratón y chimpancé.
- Se observó un aumento en la expresión de los factores de transcripción Sp1, Klf4 y las isoformas M1/M2 de Sp3 tras la diferenciación *in vitro* de células de cáncer gástrico.
- Se comprobó la unión específica de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf4 con su secuencia putativa en el promotor proximal de *ATP2A3* mediante ensayos de unión ADN-proteína *in vitro* e *in vivo*, EMSA's y ChIP, respectivamente.
- Como parte del mecanismo que favorece el aumento en la expresión de SERCA3, se demostró mediante ChIP, un enriquecimiento de marcas de cromatina abierta H3K9ac y H3K4me1, en tanto que se observó una disminución en la marca de cromatina cerrada H3K9me3.
- A través de mutación puntual de los 5 Sp's y 3 Klf's elementos putativos ubicados en el promotor proximal de *ATP2A3* (-135 pb), se comprobó su importancia tanto en la transcripción basal del gen así como en la inducción de SERCA3 tras la diferenciación celular.

## 11. PERSPECTIVAS

Estudios posteriores pueden identificar si modificaciones post-traduccionales como fosforilación de Sp1 y/o acetilación de Sp3 modifican el reconocimiento de sus elementos putativos en el promotor de *ATP2A3* humano. Además de sí dichas modificaciones son necesarias para el reclutamiento de Klf4 en respuesta a la diferenciación de células epiteliales cancerosas. La descripción sobre el mecanismo que modula la expresión del gen *ATP2A3* es importante porque la disminución en la expresión de SERCA3 se ha ligado al inicio y promoción del proceso carcinogénico en células epiteliales.

Los inhibidores de HDAC's utilizados en éste trabajo para inducir la diferenciación celular y aumento de la expresión de SERCA3, aunque se encuentran disponibles para su uso en la clínica, la administración de butirato en tratamientos de cáncer no ha sido probada, pero se ha utilizado exitosamente en padecimientos inflamatorios del colon o recto. Otra posibilidad de tratamiento es directamente sobre la inhibición de la bomba SERCA. Mipsagargina (8-*O*-(12-aminododecanoil)-8-*O*-debutanoil tapsigargina), un profármaco activado por el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, por sus siglas en inglés) basado en la tapsigargina, se encuentra en protocolo clínico fase I en pacientes con tumores sólidos refractarios, avanzados o con metástasis. Estudios adicionales se requieren para determinar la importancia de restaurar la expresión de SERCA3 en el destino y viabilidad de otros tipos de tumores. El nivel de expresión de la bomba SERCA3, correlaciona de forma inversa con el estadio y pronóstico de los tumores gástricos y de colon. De aquí que resta establecer la posible función de SERCA3 como marcador de estadio y pronóstico para tumores de origen epitelial.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Gelebart, P., Kovacs, T., Brouland, J. P., van Gorp, R., Grossmann, J., Rivard, N., Panis, Y., Martin, V., Bredoux, R., Enouf, J., and Papp, B. (2002) Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem* **277**, 26310-26320
2. Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., and Roberts-Thomson, S. J. (2007) Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nature reviews. Cancer* **7**, 519-530
3. Brandl, C. J., Green, N. M., Korczak, B., and MacLennan, D. H. (1986) Two Ca<sup>2+</sup> ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* **44**, 597-607
4. Verboomen, H., Wuytack, F., De Smedt, H., Himpens, B., and Casteels, R. (1992) Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca<sup>2+</sup> pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J* **286 ( Pt 2)**, 591-595
5. Dode, L., De Greef, C., Mountian, I., Attard, M., Town, M. M., Casteels, R., and Wuytack, F. (1998) Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *J Biol Chem* **273**, 13982-13994
6. Brini, M., and Carafoli, E. (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* **89**, 1341-1378
7. Launay, S., Gianni, M., Kovacs, T., Bredoux, R., Bruel, A., Gelebart, P., Zassadowski, F., Chomienne, C., Enouf, J., and Papp, B. (1999) Lineage-specific modulation of calcium pump expression during myeloid differentiation. *Blood* **93**, 4395-4405
8. Lacabaratz-Porret, C., Launay, S., Corvazier, E., Bredoux, R., Papp, B., and Enouf, J. (2000) Biogenesis of endoplasmic reticulum proteins involved in Ca<sup>2+</sup> signalling during megakaryocytic differentiation: an in vitro study. *Biochem J* **350 Pt 3**, 723-734
9. Papp, B., Brouland, J. P., Gelebart, P., Kovacs, T., and Chomienne, C. (2004) Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase expression during differentiation of colon cancer and leukaemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1223-1236
10. Brouland, J. P., Valleur, P., and Papp, B. (2006) [Expression of SERCA pumps during cell differentiation and tumorigenesis: application to colonic carcinogenesis]. *Ann Pathol* **26**, 159-172

11. Qu, L., Huang, S., Baltzis, D., Rivas-Estilla, A. M., Pluquet, O., Hatzoglou, M., Koumenis, C., Taya, Y., Yoshimura, A., and Koromilas, A. E. (2004) Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3beta. *Genes Dev* **18**, 261-277
12. Pacifico, F., Ulianich, L., De Micheli, S., Treglia, S., Leonardi, A., Vito, P., Formisano, S., Consiglio, E., and Di Jeso, B. (2003) The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation. *J Mol Endocrinol* **30**, 399-409
13. Korosec, B., Glavac, D., Rott, T., and Ravnik-Glavac, M. (2006) Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **171**, 105-111
14. Endo, Y., Uzawa, K., Mochida, Y., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., and Tanzawa, H. (2004) Sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **110**, 225-231
15. Brouland, J. P., Gelebart, P., Kovacs, T., Enouf, J., Grossmann, J., and Papp, B. (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**, 233-242
16. Hakii, H., Fujiki, H., Suganuma, M., Nakayasu, M., Tahira, T., Sugimura, T., Scheuer, P. J., and Christensen, S. B. (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**, 177-181
17. Gniadecki, R., and Gajkowska, B. (2003) Intracellular calcium pool emptying induces DNA synthesis in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* **12**, 453-459
18. Harmon, C. S., Ducote, J., and Xiong, Y. (1996) Thapsigargin induces rapid, transient growth inhibition and c-fos expression followed by sustained growth stimulation in mouse keratinocyte cultures. *J Invest Dermatol* **107**, 188-194
19. Humez, S., Legrand, G., Vanden-Abeebe, F., Monet, M., Marchetti, P., Lepage, G., Crepin, A., Dewailly, E., Wuytack, F., and Prevarskaya, N. (2004) Role of

- endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNF $\alpha$ . *J Cell Physiol* **201**, 201-213
20. Dode, L., Vilsen, B., Van Baelen, K., Wuytack, F., Clausen, J. D., and Andersen, J. P. (2002) Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem* **277**, 45579-45591
  21. Dode, L., Andersen, J. P., Leslie, N., Dhitavat, J., Vilsen, B., and Hovnanian, A. (2003) Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of Darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem* **278**, 47877-47889
  22. Dally, S., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J. P., Clausen, J. D., Dode, L., Fanchaouy, M., Gelebart, P., Monceau, V., Del Monte, F., Gwathmey, J. K., Hajjar, R., Chaabane, C., Bobe, R., Raies, A., and Enouf, J. (2006) Ca<sup>2+</sup>-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem J*
  23. Liu, L. H., Paul, R. J., Sutliff, R. L., Miller, M. L., Lorenz, J. N., Pun, R. Y., Duffy, J. J., Doetschman, T., Kimura, Y., MacLennan, D. H., Hoying, J. B., and Shull, G. E. (1997) Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca<sup>2+</sup> signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 3. *J Biol Chem* **272**, 30538-30545
  24. Hadri, L., Ozog, A., Soncin, F., and Lompre, A. M. (2002) Basal transcription of the mouse sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase type 3 gene in endothelial cells is controlled by Ets-1 and Sp1. *J Biol Chem* **277**, 36471-36478
  25. Hadri, L., Pavoine, C., Lipskaia, L., Yacoubi, S., and Lompre, A. M. (2006) Transcription of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase type 3 gene, ATP2A3, is regulated by the calcineurin/NFAT pathway in endothelial cells. *Biochem J* **394**, 27-33
  26. Dode, L., Wuytack, F., Kools, P. F., Baba-Aissa, F., Raeymaekers, L., Brike, F., van de Ven, W. J., and Casteels, R. (1996) cDNA cloning, expression and chromosomal

- localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 gene. *Biochem J* **318** ( Pt 2), 689-699
27. Kovacs, T., Felfoldi, F., Papp, B., Paszty, K., Bredoux, R., Enyedi, A., and Enouf, J. (2001) All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 gene are translated to proteins: a study of their co-expression in platelets and lymphoid cells. *Biochem J* **358**, 559-568
  28. Chaabane, C., Corvazier, E., Bredoux, R., Dally, S., Raies, A., Villemain, A., Dupuy, E., Enouf, J., and Bobe, R. (2006) Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase type 3 isoforms (SERCA3b and SERCA3f): distinct roles in cell adhesion and ER stress. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 1377-1385
  29. Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovacs, T., Gelebart, P., and Enouf, J. (2002) Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *J Biol Chem* **277**, 24442-24452
  30. Griffin, J. B., Rodriguez-Melendez, R., Dode, L., Wuytack, F., and Zemleni, J. (2006) Biotin supplementation decreases the expression of the SERCA3 gene (ATP2A3) in Jurkat cells, thus, triggering unfolded protein response. *J Nutr Biochem* **17**, 272-281
  31. Smale, S. T., and Kadonaga, J. T. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry* **72**, 449-479
  32. Wierstra, I. (2008) Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* **372**, 1-13
  33. Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M. and Bao, S. (2008) Krüppel-like transcription factors: A functional family. *Int J Biochem and Cell Biol* **40**, 1996-2001
  34. Kaczynski, J., Cook, T., and Urrutia, R. (2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* **4**, 206
  35. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676
  36. Flandez, M., Guilmeau, S., et al. (2008) KLF4 regulation in intestinal epithelial cell maturation. *Exp Cell Res* **314**, 3712-3723

37. Evans, P. M., Chen, X., Zhang, W., and Liu, C. (2010) KLF4 interacts with beta-catenin/TCF4 and blocks p300/CBP recruitment by beta-catenin. *Molecular and cellular biology* **30**, 372-381
38. Stone, C. D., Chen, Z. Y., and Tseng, C. C. (2002) Gut-enriched Kruppel-like factor regulates colonic cell growth through APC/beta-catenin pathway. *FEBS letters* **530**, 147-152
39. Chen, Z. Y., Rex, S., and Tseng, C. C. (2004) Kruppel-like factor 4 is transactivated by butyrate in colon cancer cells. *The Journal of nutrition* **134**, 792-798
40. Zhao, J. L., Austen, K. F., and Lam, B. K. (2000) Cell-specific transcription of leukotriene C(4) synthase involves a Kruppel-like transcription factor and Sp1. *J Biol Chem* **275**, 8903-8910
41. Zhang, W., Geiman, D. E., Shields, J. M., Dang, D. T., Mahatan, C. S., Kaestner, K. H., Biggs, J. R., Kraft, A. S., and Yang, V. W. (2000) The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem* **275**, 18391-18398
42. Yori, J. L., Johnson, E., Zhou, G., Jain, M. K., and Keri, R. A. (2010) Kruppel-like factor 4 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression. *J Biol Chem* **285**, 16854-16863
43. Wei, D., Kanai, M., Huang, S., and Xie, K. (2006) Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis* **27**, 23-31
44. Evans, P. M., and Liu, C. (2008) Roles of Kruppel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **40**, 554-564
45. Evans, P. M., Zhang, W., Chen, X., Yang, J., Bhakat, K. K., and Liu, C. (2007) Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J Biol Chem* **282**, 33994-34002
46. Chu, S., and Ferro, T. J. (2005) Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* **348**, 1-11
47. Sapetschnig, A., Koch, F., Rischitor, G., Mennenga, T., and Suske, G. (2004) Complexity of translationally controlled transcription factor Sp3 isoform expression. *J Biol Chem* **279**, 42095-42105

48. Mariadason, J. M. (2008) HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics* **3**, 28-37
49. Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., and Jenkins, D. J. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **40**, 235-243
50. Chen, J. S., Faller, D. V., and Spanjaard, R. A. (2003) Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? *Curr Cancer Drug Targets* **3**, 219-236
51. Vanhoutvin, S. A., Troost, F. J., Hamer, H. M., Lindsey, P. J., Koek, G. H., Jonkers, D. M., Kodde, A., Venema, K., and Brummer, R. J. (2009) Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One* **4**, e6759
52. Kruh, J., Defer, N., and Tichonicky, L. (1992) [Molecular and cellular action of butyrate]. *C R Seances Soc Biol Fil* **186**, 12-25
53. Gupta, S., Alpini, G., Vemuru, R. P., Hurston, E., and Shafritz, D. A. (1994) Butyrate synchronization of hepatocytes: modulation of cycling and cell cycle regulated gene expression. *Growth Factors* **10**, 171-180
54. Mottet, D., Pirotte, S., Lamour, V., Hagedorn, M., Javerzat, S., Bikfalvi, A., Bellahcene, A., Verdin, E., and Castronovo, V. (2009) HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism. *Oncogene* **28**, 243-256
55. Ranaldi, G., Islam, K., and Sambuy, Y. (1992) Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1374-1381
56. Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., and Zucco, F. (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**, 1-26
57. Vachon, P. H., Perreault, N., Magny, P., and Beaulieu, J. F. (1996) Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *J Cell Physiol* **166**, 198-207

58. Mariadason, J. M., Arango, D., Corner, G. A., Aranes, M. J., Hotchkiss, K. A., Yang, W., and Augenlicht, L. H. (2002) A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro. *Cancer Res* **62**, 4791-4804
59. Engle, M. J., Goetz, G. S., and Alpers, D. H. (1998) Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J Cell Physiol* **174**, 362-369
60. Artursson, P., and Magnusson, C. (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* **79**, 595-600
61. Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736-749
62. van Breemen, R. B., and Li, Y. (2005) Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**, 175-185
63. Wang, Y. D., and Caldwell, R. B. (2006) Isolation of nuclear and cytoplasmic proteins from DT40 cells. *Subcell Biochem* **40**, 439-440
64. Arbabian, A., Brouland, J. P., Apati, A., Paszty, K., Hegedus, L., Enyedi, A., Chomienne, C., and Papp, B. (2012) Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J*, 1-11
65. Papp, B., and Brouland, J. P. (2011) Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)* **5**, 163-174
66. Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006) Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* **86**, 369-408
67. Wootton, L. L., and Michelangeli, F. (2006) The effects of the phenylalanine 256 to valine mutation on the sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) Ca<sup>2+</sup> pump isoforms 1, 2, and 3 to thapsigargin and other inhibitors. *J Biol Chem* **281**, 6970-6976
68. Inesi, G., Lewis, D., Ma, H., Prasad, A., and Toyoshima, C. (2006) Concerted conformational effects of Ca<sup>2+</sup> and ATP are required for activation of sequential reactions in the Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) catalytic cycle. *Biochemistry* **45**, 13769-13778

69. Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M. and Martinez, E. . (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* **389**, 52-65
70. Kanai, M., Wei, D., Li, Q., Jia, Z., Ajani, J., Le, X., Yao, J., and Xie, K. (2006) Loss of Kruppel-like factor 4 expression contributes to Sp1 overexpression and human gastric cancer development and progression. *Clin Cancer Res* **12**, 6395-6402
71. Black, A. R., Black, J. D., and Azizkhan-Clifford, J. (2001) Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* **188**, 143-160
72. White, N. R., Mulligan, P., King, P. J., and Sanderson, I. R. (2006) Sodium butyrate-mediated Sp3 acetylation represses human insulin-like growth factor binding protein-3 expression in intestinal epithelial cells. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **42**, 134-141
73. Zeissig, S., Fromm, A., Mankertz, J., Weiske, J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2007) Butyrate induces intestinal sodium absorption via Sp3-mediated transcriptional up-regulation of epithelial sodium channels. *Gastroenterology* **132**, 236-248
74. Patel, N. V., Ghaleb, A. M., Nandan, M. O., and Yang, V. W. (2010) Expression of the tumor suppressor Kruppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **19**, 2631-2638
75. Cho, Y. G., Song, J. H., Kim, C. J., Nam, S. W., Yoo, N. J., Lee, J. Y., and Park, W. S. (2007) Genetic and epigenetic analysis of the KLF4 gene in gastric cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **115**, 802-808
76. Ghaleb, A. M., McConnell, B. B., Nandan, M. O., Katz, J. P., Kaestner, K. H., and Yang, V. W. (2007) Haploinsufficiency of Kruppel-like factor 4 promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* **67**, 7147-7154
77. Singh, V. K., Kumar, N., Kalsan, M., Saini, A., and Chandra, R. (2015) Mechanism of Induction: Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *Journal of stem cells* **10**, 43-62

78. Blottiere, H. M., Buecher, B., Galmiche, J. P., and Cherbut, C. (2003) Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* **62**, 101-106
79. Kiela, P. R., Kuscuoglu, N., Midura, A. J., Midura-Kiela, M. T., Larmonier, C. B., Lipko, M., and Ghishan, F. K. (2007) Molecular mechanism of rat NHE3 gene promoter regulation by sodium butyrate. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C64-74