



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN SUBCELULAR Y FUNCIONAL DE LA
ATPASA DE Ca^{2+} DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (SERCA) EN
CÉLULAS DERIVADAS DE CÁNCER MAMARIO (MCF-7).**

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en

Biología

PRESENTA:

GUSTAVO ACOSTA SANTOYO

DIRIGIDA POR:

DRA. VERÓNICA MORALES TLALPAN

QUERÉTARO, QRO

FEBRERO 2009

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. ~~11741848~~

No. Título

Clas. TS 616.99449

S237C



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Biología

**CARACTERIZACIÓN SUBCELULAR Y FUNCIONAL DE LA ATPASA DE Ca^{2+}
DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (SERCA) EN CÉLULAS DERIVADAS DE
CÁNCER MAMARIO (MCF-7).**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Gustavo Acosta Santoyo

Dirigido por:

Dra. Verónica Morales Tlalpan

SINODALES

Dra. Verónica Morales Tlalpan
Presidente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Secretario

Dra. Teresa García Gasca
Vocal

Dr. Juan Campos Guillén
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Febrero, 2009
México

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular, a cargo del Dr. Mauricio Díaz Muñoz, en el Instituto de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla.

Apoyado por los donativos PAPPIT a Mauricio Díaz Muñoz, y PFAMU a Verónica Morales Tlalpan

Resumen

En situaciones fisiológicas extremas; como el proceso canceroso, la pérdida de la homeostasis de calcio (Ca^{2+}) es determinante. Este catión regula una gran cantidad de funciones celulares: proliferación, apoptosis y síntesis de proteínas, entre muchas más. El manejo de Ca^{2+} está altamente organizado y para llevar a cabo sus efectos se necesita la participación coordinada de diversas proteínas localizadas en diferentes compartimentos. El retículo sarco/endoplásmico (ER) es el principal organelo que contribuye en mantener la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica (≈ 100 nM). Este organelo acumula Ca^{2+} mediante la intervención de ATPasa- Ca^{2+} de ER (SERCA). Nuestro grupo de trabajo, se ha interesado en la línea celular MCF-7, una clona de tejido mamario canceroso utilizada ampliamente en estudios de ciclo celular y dinámica de Ca^{2+} . Datos preliminares mostraron una distribución subcelular atípica de SERCA en las células MCF-7. Con este antecedente, el objetivo de este trabajo fue determinar si esta distribución anómala afecta la dinámica de Ca^{2+} en estas células. Para caracterizar funcionalmente a la SERCA, se estudió la movilidad intracelular de Ca^{2+} inducida por tapsigargina (Tg) en células MCF-7 y MCF-12F (células no cancerosas). Los resultados mostraron que la SERCA de MCF-7 fue 6 veces más sensible a TG que la enzima en las células MCF-12F. En contraste, la actividad de SERCA fue 2 veces menor en las células cancerosas (MCF-7) con respecto a las células controles (MCF-12F). Estos datos indican que la distribución espacial de SERCA en MCF-7 afecta la homeostasis de Ca^{2+} al ser menos eficiente para recapturar Ca^{2+} al RE y en consecuencia hay una acumulación de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico. El estudio de esta enzima enfatiza algunas de las diferencias moleculares que distinguen a las células neoplásicas de sus controles.

Summary

In physiological extreme situations such as in cancer, the loss of Ca^{2+} homeostasis is determinant. This cation regulates a great quantity of cellular functions: proliferation, apoptosis and synthesis of proteins, among many others. The handling of Ca^{2+} is highly organized and to carry out its effects, it is necessary to coordinate the participation of diverse proteins, located in different compartments. The sarco/endoplasmic reticulum (ER) is the principal organelle that contributes in supporting the cytosolic concentration [Ca^{2+}] (≈ 100 nM). This organelle accumulates Ca^{2+} by means of the intervention of the ATPase- Ca^{2+} of ER (SERCA). Our group of work has been interested in the cellular line MCF-7 which is a clone of mammary cancerous tissue used widely in studies of cellular cycle and dynamics of intracellular Ca^{2+} . Preliminary information showed an atypical subcellular distribution of SERCA in the MCF-7 cells. With this precedent, the aim of this work was to determine if this distribution affects the dynamics of Ca^{2+} in this cell line. To characterize functionally SERCA, we studied the mobility of Ca^{2+} induced by Thapsigargin (Tg) in cells MCF-7 and MCF-12F (not cancerous cells). The results showed that SERCA of MCF-7 is 6 times more sensitive to TG than MCF-12F. In contrast, SERCA's activity is two times less in the MCF-7 with regard to the MCF-12F cells. This information suggests that SERCA's spatial distribution in MCF-7 could affect the homeostasis of Ca^{2+} because the ER it is less efficient to re-capture of Ca^{2+} and in consequence promotes an accumulation of cytosolic [Ca^{2+}]. The study of this enzyme emphasizes some of the molecular differences that distinguish the neoplastic and non-neoplastic cells.

Dedicatorias

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente”

Henfil.

A mis Padres, mis hermanos, mis profesores y mis amigos.

Agradecimientos

A mi Padre, por su tiempo, confianza y apoyo incondicional, y porque este es su logro quizá más que el mío.

A mi Madre, por creer siempre en mí y hacerme una persona fuerte con sus consejos..

A la Dra. Verónica Morales, por su tiempo, dedicación e invaluable amistad. Por aceptar y corregir mis y errores y forjar en mí fortalezas para dirigir mi camino en la ciencia.

Al Dr. Mauricio Díaz, por apoyarme en todo momento, por saber que puedo contar con sus consejos.

Al Dr. Carlos Saldaña, por ser un amigo franco antes que ser un tutor, y por hacerme ver que la vida es como la quieras tomar.

A la Dra. Teresa Gasca, por sus consejos y su apoyo siempre constante, ahora y en los momentos difíciles.

A mis profesores, por enseñarme los secretos de la biología.

A mis amigos: Mario, Alejandra, Anaid, Georgina, Aurelio, Jaime, Axini, Edith, Sandra, Alfonso, Sebastián, Patricia, Sabina, Gerardo, Óscar, Karina y Horacio, por estar siempre que los necesito, por hacerme saber que era importante y más que nada, por compartir una de las mejores épocas de mi vida.

A Dalia, Aura, Moisés, Adrián, Julieta, Olivia, Clara, Jimena por compartir las tardes de trabajo en el laboratorio y por su apoyo.

A Silvia, Perla y Tania, porque ellas hicieron en muchas ocasiones mi camino más fácil.

Índice

Resumen	4
Agradecimientos.....	7
1. Cascada de señalización de Calcio.	10
1.1 Proteínas relacionadas con la extrusión de Ca²⁺	13
1.2 ATPasa de Ca²⁺ de retículo endoplásmico (SERCA)	14
1.2.1 Estructura y Mecanismo de Activación	15
1.2.2 Activadores y bloqueadores: endógenos y farmacológicos	17
1.2.3 Función	20
1.3 Cáncer	21
III. Justificación	25
IV. Hipótesis	27
V. Objetivos	27
VI. Materiales y Métodos	28
<i>Reactivos</i>	28
<i>Tinción con fluoróforos</i>	28
<i>Determinación de Ca²⁺ intracelular mediante microscopía confocal</i>	29
<i>Fraccionamiento celular y medición de la actividad de SERCA</i>	30
<i>Western blot</i>	31
VII. Resultados	32
<i>SERCA se localiza en la región perinuclear en las células MCF-7</i>	32
<i>Las células MCF-7 movilizan Ca²⁺ en respuesta a TG lentamente, pero presentan una sensibilidad alta al fármaco</i>	33
<i>La actividad de SERCA es menor en las células MCF-7</i>	37
<i>Las células MCF-7 y MCF-12F expresan la isoforma 2 de SERCA</i>	38
VIII. Discusión	41
IX. Conclusiones	42
X. Perspectivas	42

Índice de Figuras

Figura 1.....	13
Figura 10.....	38
Figura 11.....	39
Figura 12.....	41
Figura 2.....	15
Figura 4.....	18
Figura 5.....	19
Figura 6.....	21
Figura 7.....	26
Figura 8.....	34
Figura 9.....	36
Figura. 3.....	17
Tabla 1.....	25

1. Antecedentes

1. Cascada de señalización de Calcio.

El calcio (Ca^{2+}) es un catión divalente que participa en una gran cantidad de procesos como: la contracción celular, regulando el ciclo del ácido cítrico en diversos puntos y puede activar la enzima piruvato deshidrogenasa, además, participa activamente como un mensajero intracelular (Voet *et al.*, 1999). Como mensajero, funciona como un organizador de eventos celulares como exocitosis, transcripción de genes y proliferación celular, por citar algunos. La amplia variedad de sus funciones se debe, en parte, al tiempo que permanece y la concentración que alcanza en el citosol. Este catión constituye parte integral de la red de transducción intracelular de señales, ya que la activación/inhibición de muchas proteínas reguladoras pueden ser moduladas por cambios en su concentración (Berridge *et al.*, 2003). Por ejemplo, en una célula en reposo, la concentración citosólica de Ca^{2+} oscila entre 50-100 nM, mientras que en el retículo sarco/endoplásmico (RE) fluctúa en el rango μM alto y en la región extracelular puede variar entre 1-2 mM (Papp *et al.*, 2004; Gélébart, *et al.*, 2002). Para mantener este equilibrio dinámico, la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) debe ser finamente regulada por diferentes proteínas, algunas de ellas y otras se localizan en la membrana. Este último grupo se ha dividido en 3 subgrupos: 1) las que ingresan Ca^{2+} del exterior celular, 2) las que liberan Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Bootman *et al.*, 2001), y 3) las que extruyen el Ca^{2+} del citosol, ya sea al interior del RE o hacia el espacio extracelular (Berridge *et al.*, 2003) (Figura 1).

Algunos de los canales que controlan la entrada se clasifican en canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Éstos se han subdividido en canales de bajo umbral (tipo T) y de alto umbral (tipos L, N, P, Q y R). Todos se activan en respuesta a cambios de voltaje (Catterall, 2000). Otros permiten la entrada de Ca^{2+} en respuesta al vaciamiento de reservorios intracelulares, entre los cuales podemos nombrar a los canales del potencial transitorio (TRP, *Transient Receptor Potential*) (Pedersen *et al.*, 2005). Esta superfamilia de proteínas ha sido subdividida en múltiples subfamilias tomando como base la similitud en sus secuencias (Venkatachalam *et al.*, 2002). Una categoría aparte son los receptores ionotrópicos que en respuesta a la unión de neurotransmisores, hormonas u otros ligandos

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

permiten el paso de Ca^{2+} a favor de gradiente hacia el interior celular, como la familia de receptores a glutamato (Illes y Alexandre-Ribeiro, 2004; Fumagalli *et al.*, 2003; Bockaert y Pin, 1999) y los receptores nicotínicos (Liu *et al.*, 2007).

En el segundo grupo están descritos 2 tipos de canales: los receptores a inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3R) y a ryanodina (RyR). Ambos canales liberan Ca^{2+} de los depósitos internos (RE, aparato de Golgi y núcleo), y son activados por mensajeros intracelulares. Aunque los mecanismos de activación/inhibición para ambos canales son diferentes, comparten ciertas características como la sensibilidad a Ca^{2+} que favorecen su activación y/o inhibición. (Bootman *et al.*, 2001).

En el caso de los IP_3Rs , la unión de algunos neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento que reconocen a receptores específicos en la membrana plasmática, inducen la activación de alguna isoforma de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato (PIP_2) para producir los mensajeros intracelulares: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3). El DAG por su parte activa a la proteína cinasa C, mientras que el IP_3 se une al IP_3R localizado en el RE, permitiendo la salida del Ca^{2+} almacenado en el lumen de este depósito hacia el citoplasma (Bootman y cols., 2001). La actividad del IP_3R está regulada por metabolitos como el ATP, ADP y NADP y por productos generados de eventos intracelulares como el IP_3 , Ca^{2+} , fosforilación y el ácido araquidónico, por citar algunos. Farmacológicamente se ha estudiado a esta proteína con sustancias como la cafeína (activador) y la heparina (inhibidor). Los sitios de reconocimiento de estos moduladores metabólicos y farmacológicos se encuentran dispersos en los dominios de unión y modulación, localizados en la porción amino-terminal de la proteína (Patel *et al.*, 1999), que corresponde al 80 % de la proteína. Por otra parte, el RyR , recibe este nombre, debido a su afinidad por la ryanodina, un alcaloide vegetal extraído del arbusto *Ryana speciosa*. La actividad de este canal está modulada por una gran variedad de segundos mensajeros intracelulares y fármacos como el Ca^{2+} , la ADP ribosa cíclica (cADPr), fosforilación por cinasas, ATP, Mg^{2+} , calmodulina (CaM), calsecuestrina, ryanodina, cafeína, rojo de rutenio, entre otros (Arredouani, 2004). Aunque, el RyR es modulado por una amplia variedad de moléculas

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

endógenas, el Ca^{2+} citosólico es el regulador/activador más importante del RyR (Meissner, 1994).

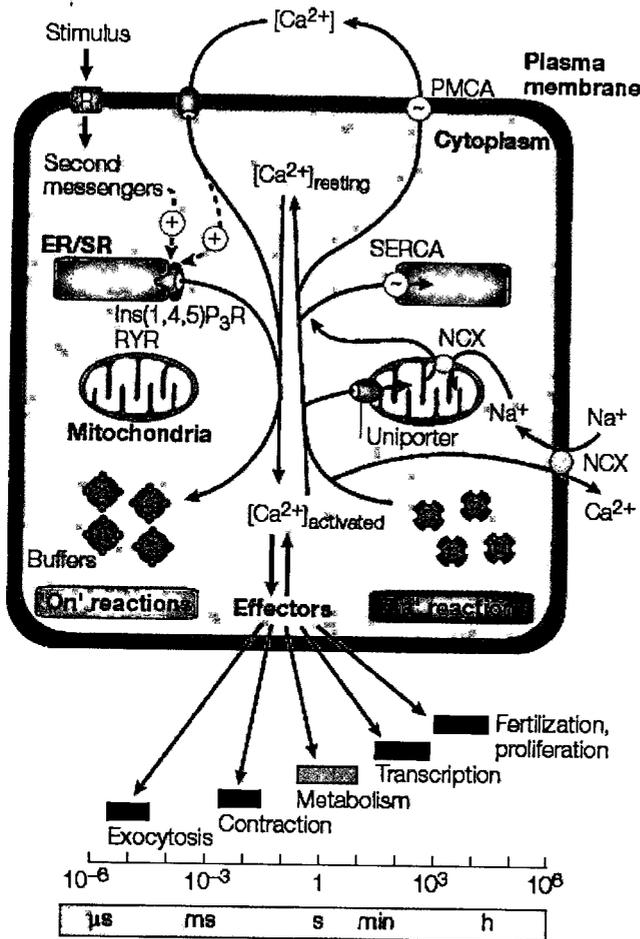


Figura 1. En el esquema se observan las principales componentes que participan en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, como las bombas, canales, moléculas amortiguadoras, intercambiadores, y los depósitos intracelulares. Los elementos que se localizan a la izquierda de la imagen, indican la forma en como se lleva a cabo la coordinación entre los integrantes para incrementar la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, mientras que, a la derecha se observa los recursos que utiliza la célula para disminuir la concentración de este cation. En la parte inferior del dibujo se muestra la escala de $[\text{Ca}^{2+}]$ y de tiempo para realizar las diversas funciones celulares involucradas en mantener la homeostasis de este ión (Tomado de Berridge *et al.*, 2003).

La entrada de Ca^{2+} a través de canales o la liberación de Ca^{2+} de los depósitos internos son las dos vías principales que controlan el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), sin embargo, la célula cuenta con mecanismos de extrusión de Ca^{2+} . Estos sistemas permiten mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en un nivel basal, ya que una desregulación prolongada puede desencadenar diversas respuestas celulares como la pérdida de la transcripción génica y la apoptosis, entre otros eventos (Bootman *et al.*, 2001).

1.1 Proteínas relacionadas con la extrusión de Ca^{2+}

La extrusión de Ca^{2+} es un mecanismo por el cual un exceso de este catión acumulado en el citosol es removido al medio extracelular y/o a los depósitos intracelulares, por medio de proteínas que son capaces de movilizar el Ca^{2+} del citoplasma en contra de su gradiente. Estas proteínas son los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y las bombas de membrana plasmática y retículo sarco/endoplásmico. En la Figura 2 se muestran ejemplos de estas tres clases de proteínas, algunos inhibidores farmacológicos, y los sitios de unión de sus reguladores biológicos (Monteith *et al.*, 2007).

Los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localizados en la membrana plasmática, RE y la mitocondria juegan un papel importante en remover el Ca^{2+} del citosol, estas proteínas se encargan de translocar el Ca^{2+} al exterior celular y a la membrana interna mitocondrial. Estos antiportadores utilizan la energía derivada del gradiente electroquímico del Na^+ , permitiendo el ingreso de Na^+ y el cotransporte de Ca^{2+} , con una estequiometría 3 Na^+ :1 Ca^{2+} . Estos intercambiadores actúan de manera reversible, contra gradiente y son electrogénicos. Presentan una baja afinidad por Ca^{2+} pero lo transportan rápidamente, debido a su alta capacidad $\approx 5 \text{ Ca}^{2+}/\text{seg}$ (Monteith *et al.*, 2007).

Por otro lado, las bombas o ATPasas de Ca^{2+} localizadas en la membrana plasmática y la membrana del RE, presentan una alta afinidad por el Ca^{2+} . La ATPasa de membrana plasmática se encarga de expulsar el Ca^{2+} del citosol hacia el espacio extracelular, mientras que su contraparte, la localizada en la membrana del RE, transloca el Ca^{2+} del citosol hacia el lumen de este organelo (Wu *et al.*, 2008; Strehler *et al.*, 2007).

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

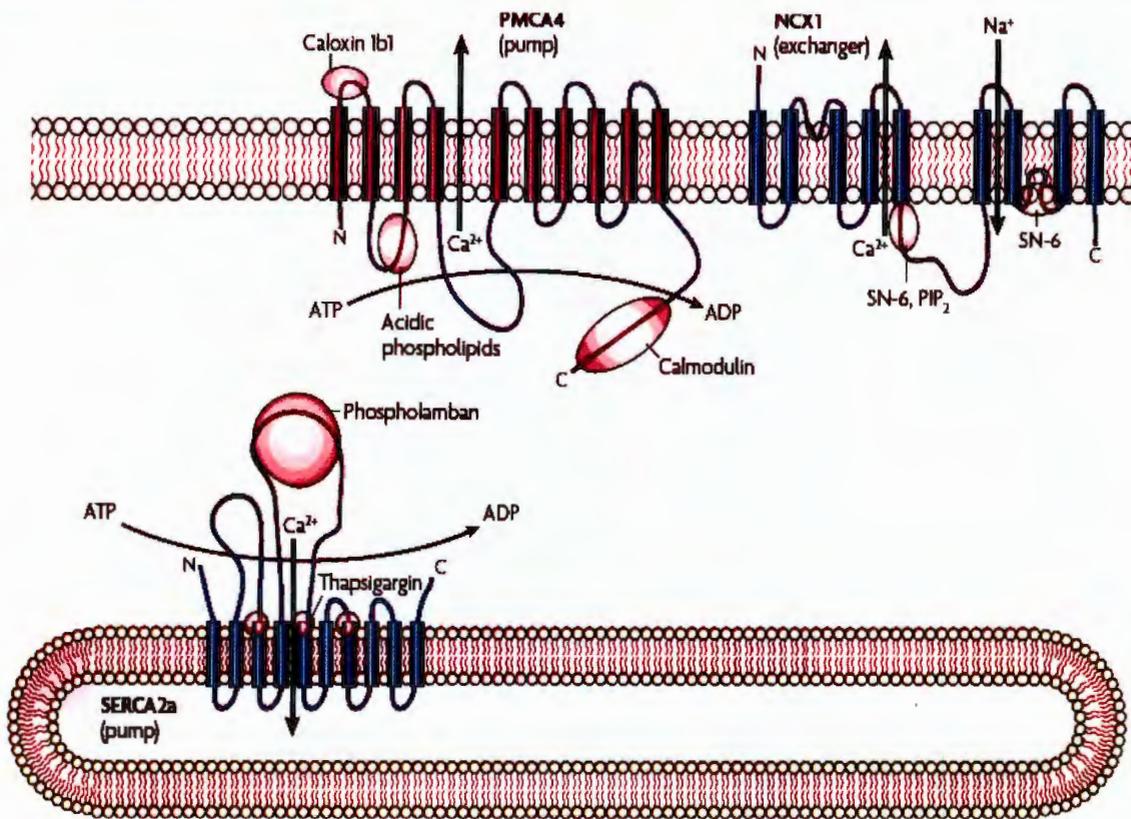


Figura 2. Se muestran las bombas de Ca^{2+} (membrana plasmática y RE), y el intercambiador de $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ (membrana plasmática). También se observan algunos dominios reguladores y moduladores (formas de color rosa). Las flechas negras indican la dirección del transporte de Ca^{2+} . En el transporte activo hacia el RE, se ejemplifica la isoforma SERCA2a, con moduladores y la actividad de ATPasa (Tomado y modificado de Monteith *et al.*, 2007).

1.2 ATPasa de Ca^{2+} de retículo endoplásmico (SERCA)

El RE es el principal reservorio de Ca^{2+} , está equipado con sistemas muy sofisticados que de manera indirecta mantienen o disparan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gracias a la acción concertada de proteínas solubles (calsequestrina, calreticulina, calbindina, etc.), de canales de Ca^{2+} y de ATPasas (Arredouani *et al.*, 2002; Gilon *et al.*, 1999). La movilización de Ca^{2+} del RE al citosol es un componente clave de varias redes de señalización, involucradas en diversas funciones celulares como apoptosis o crecimiento tumoral (Brouland *et al.*, 2005; Gélébart *et al.*, 2002). Mientras que el Ca^{2+} localizado en RE participa en varios procesos

como la homeostasis del mismo catión y en la síntesis y maduración de proteínas (Putney, Jr., 1990).

El Ca^{2+} regresa al RE por medio de las ATPasas que transportan Ca^{2+} al retículo sarco/endoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés, *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATP-ase*) acumulando Ca^{2+} en este compartimento. Las proteínas SERCA son una familia de enzimas transmembranales que pertenecen a la familia “P” de ATPasas que son aquellas que se caracterizan por que forman un intermediario fosforilado durante su ciclo de reacción (Di Leva *et al.*, 2008). Transportan cationes como el Ca^{2+} y Mg^{2+} desde el citosol al lumen del RE utilizando la energía que se deriva de la hidrólisis del ATP, (de Meis, 2002).

1.2.1 Estructura y Mecanismo de Activación

SERCA es una proteína de membrana compuesta de un solo polipéptido de ≈ 994 residuos de aminoácidos (≈ 100 kDa). Estas proteínas están codificadas en vertebrados por tres genes diferentes (≈ 3000 pb), denominados ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3 que codifican para tres isoformas de SERCAs 1, 2 y 3, respectivamente. Al respecto, existen reportes en la literatura que describen que cada gene puede producir variantes moleculares mediante empalme alternativo (SERCA1a, SERCA1b, por ejemplo). Incluso algunos estudios demuestran que estas variantes moleculares se pueden distinguir principalmente por sus diferencias en afinidad por Ca^{2+} ($2b > 2a = 1 > > 3$) (Bobe *et al.*, 2005). Sin embargo, a nivel funcional, la expresión de las diferentes isoformas de SERCA *in vitro* no ha revelado diferencias significativas entre la SERCA1a y la b (Dode *et al.*, 1998; Verboomen *et al.*, 1992).

Para facilitar su estudio, esta enzima se ha dividido en 2 regiones principales: 1) La región citoplasmática con forma de “tijera” constituida por tres dominios separados (N, A y P). El dominio N implicado en la unión de ATP. El dominio P donde se localiza el residuo ASP^{351} involucrado en la fosforilación. El dominio A es el encargado de transducir la señal. 2) La región transmembranal compuesta por 10 α -hélices (M1-M10), propuestas

como sitios de unión a Ca^{2+} (Toyoshima *et al.*, 2002). El arreglo de la proteína se muestra en la Figura 3.

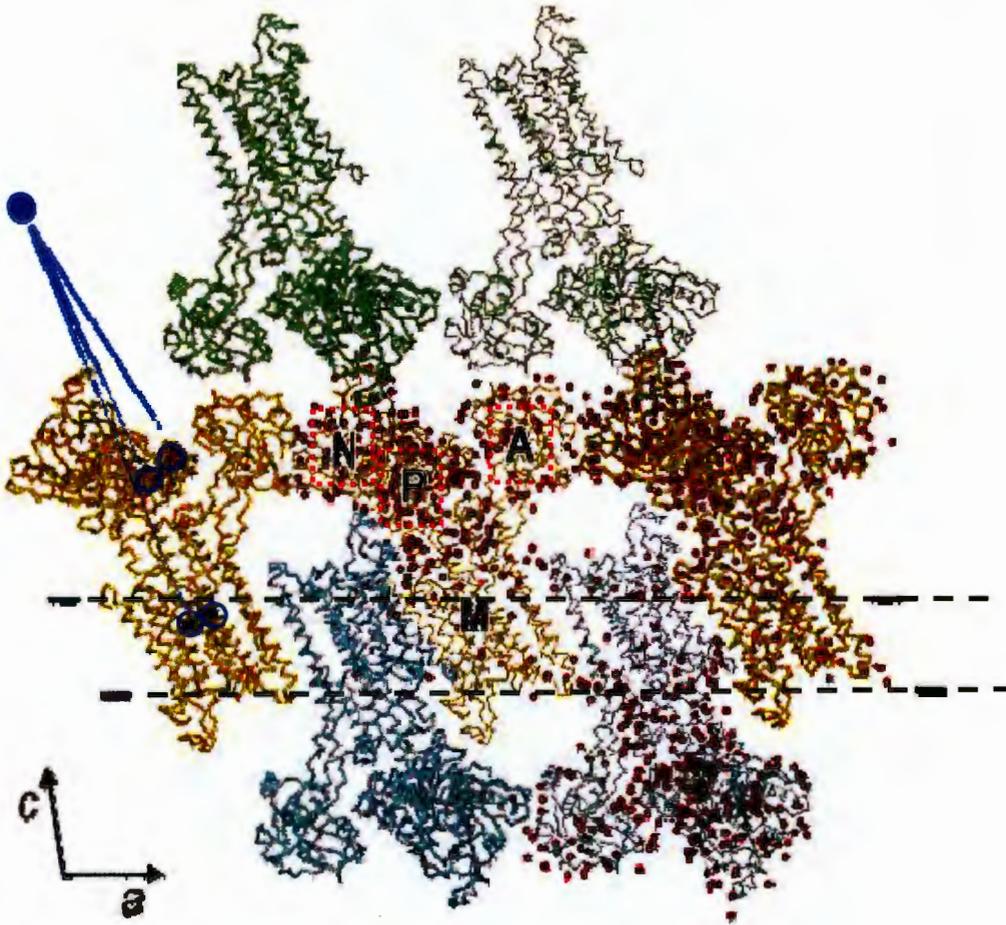


Figura. 3. Estructura tridimensional de SERCA obtenida mediante cristalografía de rayos X. En la figura se muestran los tres dominios citoplasmáticos A, N y P (en recuadros rojos). Las líneas punteadas delimitan la región membranal (negro). Los sitios de la interacción de los 2 iones de Ca^{2+} están indicados por esferas color violeta en la región membranal (M). La distancia entre capas adyacentes mide 145.7 Å. (Tomado de Toyoshima *et al.*, 2000).

El acoplamiento y translocación del Ca^{2+} involucra una secuencia de reacciones reversibles y ordenadas, las cuales ocurren alternativamente entre el sitio de unión a ATP y los sitios de transporte de Ca^{2+} en la región transmembranal. En el 2002, Xu y colaboradores propusieron un modelo para describir como se lleva este proceso. Postulan

que la enzima pasa por tres cambios conformacionales durante este ciclo. El primer cambio conformacional involucra un cierre de las “tijeras” formadas por las regiones P y N, éste es inducido por la fosforilación del Asp³⁵¹ a través de la unión del ATP en la región N. El segundo cambio conformacional es provocado por la rotación del dominio A, favoreciendo el contacto con los dominios P y N. Finalmente, estos cambios transducen la información a los sitios de unión y traslocación de Ca²⁺ donde ocurren nuevamente cambios conformacionales que atrapan el Ca²⁺ y luego lo liberan hacia el lumen del ER (Figura 4).

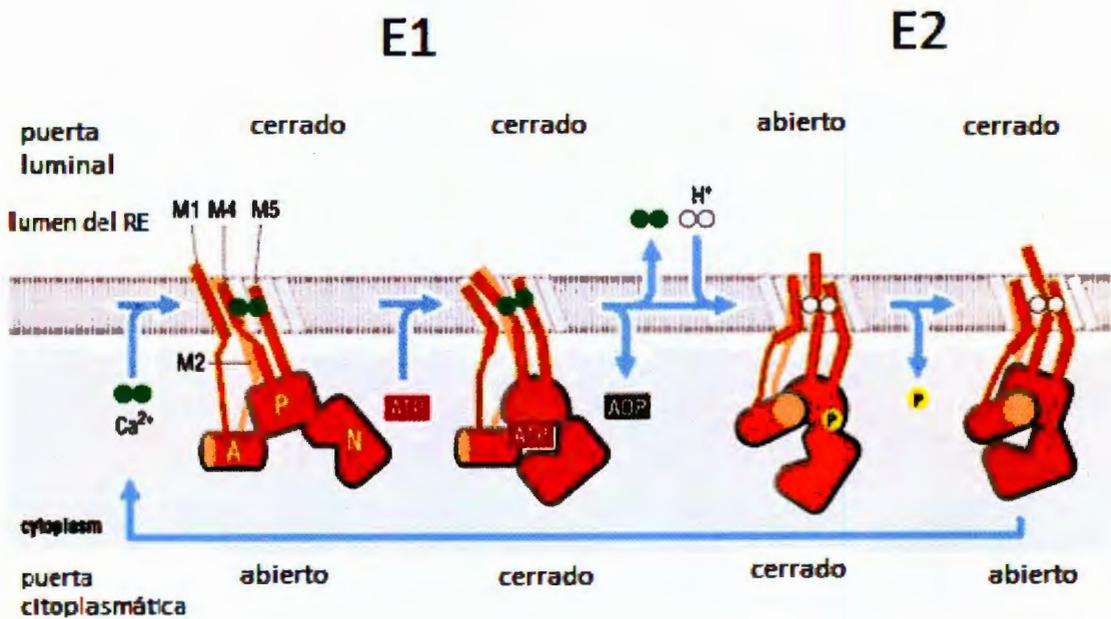


Figura 4. Modelo de los cambios conformacionales que se presentan en las enzimas SERCA durante el transporte de Ca²⁺ mediado por la hidrólisis de ATP (Tomado y modificado de Petsko y Ringe, 2006 y 2007).

1.2.2 Activadores y bloqueadores: endógenos y farmacológicos

Las SERCAs presentan características bioquímicas, farmacológicas y estructurales similares, con sus respectivos cambios en afinidad de sustratos y modulación por inhibidores. Todas las enzimas SERCA son activadas por Ca²⁺ citosólico, ATP, y carga energética. Como ya se mencionó, todos los miembros de la familia presentan un período donde la proteína se encuentra en su forma “fosforilada”, relacionada con los ciclos

reversibles de hidrólisis de ATP y de transporte de Ca^{2+} (Figura 5) (Mc Lennan *et al.*, 1997). Otra característica en común entre estas proteínas es la afinidad por el ATP; en general se considera que es similar en todas las isoformas ($\approx 0.02\text{-}0.05 \mu\text{M}$). De manera global se acepta que los miembros de la familia SERCA presentan propiedades equivalentes en cuanto a la similitud en aminoácidos, características bioquímicas y de regulación. Aunque existen reportes que demuestran que la SERCA3 tiene diferencias bioquímicas particulares y que se distribuye principalmente en corazón y tejido embrionario de riñón humano (Dally *et al.*, 2008) sugiriendo que esta enzima puede tener un papel más especializado (Liu *et al.*, 1997).

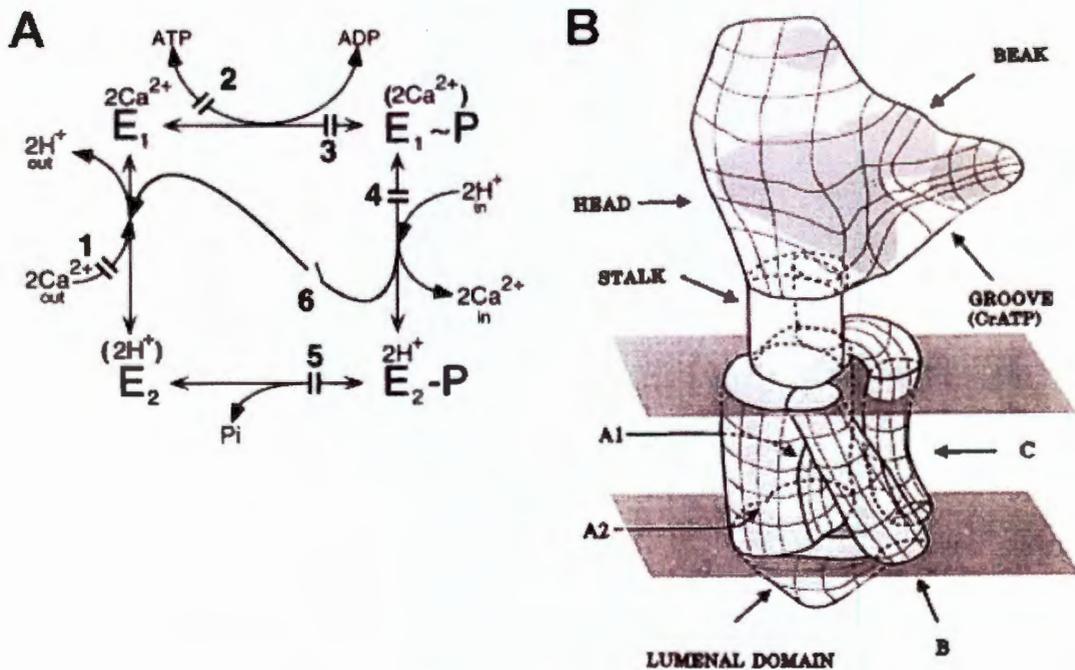


Figura 5. (A) Representación esquemática de los ciclos de reacciones mediante las cuales las enzimas SERCA transportan Ca^{2+} , además se ilustran los puntos de control, donde es posible bloquear el transporte de Ca^{2+} : 1) la unión de Ca^{2+} a la enzima; 2) el complejo Ca^{2+} :enzima expone el sitio de unión al ATP con su respectiva hidrólisis; 3) estado intermedio o fosfoenzima; 4) la transición entre $E_1\text{P} \rightarrow E_2\text{P}$, donde se libera el Ca^{2+} al interior del RE; 5) $E_2\text{P}$, se lleva a cabo la liberación del pirofosfato y la enzima se torna sensible a Ca^{2+} nuevamente; y 6) representa un estado de transición. Los paréntesis alrededor Ca^{2+} o H^+ indican oclusión. (B) Modelo espacial de SERCA1b donde se

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

representan la cabeza el tallo y los surcos de la enzima en ausencia de ATP y Ca^{2+} . Las superficies de la bicapa se indican como dos planos sombreados (MacLennan *et al.*, 1997).

La inhibición de SERCA permite hacer estudios analíticos acerca de la actividad catalítica, los mecanismos de transporte de Ca^{2+} y para entender el papel que desempeña esta enzima en funciones celulares vitales que dependen del control de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Inesi *et al.*, 2005). SERCA, puede ser inhibida por una serie de compuestos endógenos como el fosfolamban (PLN) y la sarcolifina (SLN) en músculo y tejido cardíaco (Traaseth *et al.*, 2008). Entre los compuestos no endógenos que bloquean a las SERCAS se han reportado el sesquiterpeno lactona o tapsigargina (TG), el vanadato, la 3,5-di-tert-butilhidroquinona (DHBQ), la debutanoil tapsigargina (DBTG) y el ácido ciclopiazónico (CPA). En la Figura 6 se muestran algunos de estos compuestos.

Estos compuestos tienen sitios de unión específicos en la proteína, diferentes mecanismos de inhibición y se han utilizado de manera extensiva como una herramienta farmacológica en la experimentación fisiológica. Uno de los fármacos más utilizados para estudiar la función de SERCA es el vanadato, con una estructura similar al fosfato. Este compuesto se une en el sitio de unión del fosfato e inactiva a la enzima (Lajas *et al.*, 2001). Es interesante notar que SERCA3 es 10 veces más sensible a la inhibición por vanadato que las otras variantes moleculares (Wuytack *et al.*, 1995). Otro compuesto que inhibe a las SERCAS con gran potencia es la TG, esta sustancia se deriva de la planta *Thapsia garganica* (Xu *et al.*, 2004 y Traaseth *et al.*, 2008). En particular, la TG, se ha considerado como un posible tratamiento en cáncer debido a sus efectos inhibitorios en la proliferación celular (Xu *et al.*, 2004).

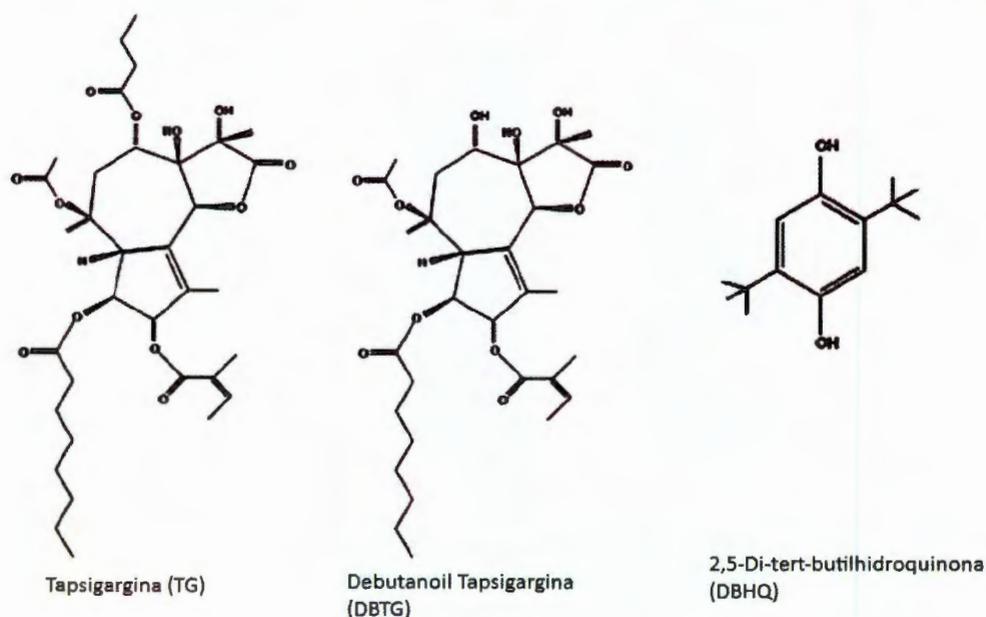


Figura 6. Estructura de la tapsigargina (TG), la debutanoil tapsigargina (DBTG) y la 2,5-Di-tert-butilhidroquinona (DHBQ). (Tomado y modificado de Xu *et al.*, 2004).

La TG bloquea irreversiblemente las funciones de SERCA porque se une en el sitio de fosforilación y en el sitio catalítico; de hecho, la TG forma un complejo inactivo con la ATPasa con características similares a las que muestra en el estado E2 (Inesi *et al.*, 2005). Como consecuencia, se bloquea el sitio de unión del Ca^{2+} y se impide que este ión entre de nuevo al RE, por lo que se acumula en el citosol (Christensen *et al.*, 1993). En experimentos de electrofisiología se puede retirar el exceso de droga mediante perfusión del interior celular, pero ya que la TG que se ha unido a la ATPasa permanece dentro de la célula tratada con la droga como se ha observado en experimentos anteriores (Mikkelsen *et al.*, 1988).

1.2.3 Función

La evidencia bioquímica muestra que las enzimas SERCA difieren en afinidad y en la tasa de transporte de Ca^{2+} . También se ha propuesto que las variantes moleculares presentan características únicas, en términos de velocidad de transporte de Ca^{2+} . Por lo que el manejo de Ca^{2+} por parte de un tejido o célula específica dependerá de las propiedades de la variable alternativa de SERCA que se encuentre presente. De tal manera que las células

pueden tener un nivel basal de Ca^{2+} en el RE y en la región citoplasmática, ligeramente diferente a lo normal, situación que favorece la formación de microdominios de Ca^{2+} . Estas características espaciotemporales (forma de la onda, amplitud, frecuencia y duración) de las oscilaciones de Ca^{2+} que confieren información biológica relevante a las células y tejidos que son modulados por Ca^{2+} . Permitiendo así, la activación preferencial y selectiva de proteínas blanco en la célula y el remodelamiento de la homeostasis celular del Ca^{2+} durante la diferenciación y otras funciones celulares (Papp *et al.*, 2004).

Por ejemplo, en células cancerosas y leucémicas se ha encontrado que la isoforma SERCA2b está presente (Papp *et al.*, 2004). Mientras que, la expresión de SERCA3 varía considerablemente, estas diferencias en la expresión de SERCA3 se han hallado en líneas celulares derivadas de carcinomas y sarcomas, de tejidos no hematopoyéticos (colon, estómago, páncreas, pulmón, mama, tiroides, cerebro, piel, músculo, hueso, entre otros). También se ha demostrado que los niveles de expresión de esta enzima pueden ser extremadamente altos o ser prácticamente indetectables en las varias de las células estudiadas. De manera interesante, la distribución de la enzima parece ser constante en cada tipo celular estudiado, pero a veces las diferencias encontradas en la distribución suelen ser enormes incluso en tipos celulares muy relacionados u obtenidos de patologías similares como, por ejemplo, en varios adenocarcinomas de colon (Papp *et al.*, 2004).

1.3 Cáncer

La palabra cáncer es el término genérico empleado para designar un grupo de enfermedades que difieren en su histogénesis, morfología, evolución clínica y pronóstico. Estos padecimientos presentan características morfológicas y biológicas que los permiten clasificar e identificar de manera muy formal. En esencia tienen comportamiento biológico maligno y presentan diferencias fundamentales con las neoplasias benignas como la independencia al anclaje a la matriz extracelular, capacidad de colonización de otros órganos o tejidos (metástasis), y la proliferación descontrolada (Ferbeyre y Salinas, 2005).

La carcinogénesis es un proceso durante el cual intervienen mutaciones sucesivas, propiciando que una célula normal se convierta en un clon de células neoplásicas. Con su ciclo celular alterado y seguido de divisiones celulares sucesivas, la clona sigue mutando

hasta adquirir nuevos atributos biológicos como: motilidad celular, adhesividad celular, invasión, angiogénesis, protección inmunológica y metástasis (Renan, 1993). En síntesis, se puede definir al cáncer como un grupo grande y heterogéneo de alteraciones que desencadenan un desequilibrio en la relación proliferación/muerte celular, con una tendencia a favorecer la acumulación de células, provocado por mecanismos genéticos o epigenéticos. Las alteraciones genéticas pueden ser congénitas, adquiridas o ambas y alteran en principio el funcionamiento normal de algunos genes involucrados en la proliferación celular, apoptosis, envejecimiento celular y reparación del ADN (Ferbeyre y Salinas, 2005).

El cáncer es la principal causa de mortalidad a nivel mundial, se atribuyen 7.9 millones de defunciones (o aproximadamente 13% de las defunciones mundiales) ocurridas en 2007. Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general anual por cáncer son los siguientes según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008):

- Pulmón (1.4 millones defunciones)
- Estómago (866 000 defunciones)
- Hígado (653 000 defunciones)
- Colon (677 000 defunciones)
- Mama (548 999 defunciones)

El cáncer de mama es la forma neoplásica letal de mayor incidencia en las mujeres (Boring *et al.*, 1994), seguidos de cáncer de pulmón, estómago, colon-recto y cuello uterino (OMS, 2008). De acuerdo al tejido de origen, el cáncer de mama puede ser dividido en: epiteliales (carcinomas) y estromáticos (sarcomas) y ambos tipos cuentan con un potencial metastásico elevado (Mundy, 1997). Durante los últimos 30 años, las líneas celulares de cáncer de mama han sido aceptadas para estudiar aspectos tanto bioquímicos, endocrinos, moleculares y fisiológicos relacionados con esta condición. En los últimos 50 años se han logrado aislar y cultivar líneas celulares provenientes de tumores mamarios primarios, por lo que en la actualidad se cuenta con alrededor de 100 clonas diferentes. A pesar de este gran esfuerzo la mayor parte del trabajo de investigación (alrededor del 70%) se ha realizado en tres clonas: T-47D, MDA-MB-231 y MCF-7 (Lecroix y Leclerq, 2004).

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

Las células MCF-7 (de *Michigan Cancer Foundation* línea 7), es una línea celular obtenida de una mujer caucásica de 69 años de edad a quien se le extirpó por medio de una efusión pleural un adenocarcinoma maligno en 1970 (Dickson *et al.*, 1986). Formalmente, el tipo de cáncer asociado con las células MCF-7 es un carcinoma invasivo ductal que responde a esteroides (Soule *et al.*, 1973). Estas células responden a estímulos hormonales, específicamente al tratamiento con estrógenos, por lo que se han utilizado para caracterizar los mecanismos de transducción de señales involucrados en eventos de mitosis y en procesos apoptóticos asociados con señales endocrinas (Scodelaro *et al.*, 2007; Sergeev *et al.*, 2006). Debido a esto, y a que se ha reportado evidencia sobre la capacidad de las células MCF-7 para movilizar Ca^{2+} intracelular en varias circunstancias, entre las que destacan la respuesta a estímulos de radiación ionizante, y unión de ligandos farmacológicos y endócrinos, es que nuestro grupo de trabajo se ha interesado en el estudio de la distribución y fisiología de la señalización del Ca^{2+} (Todd y Mikkelsen, 1994; Jain y Trump, 1997; Bollig *et al.*, 2007). A partir de esta información, se ha demostrado que las células MCF-7 expresan muchas de las proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} (Liao *et al.*, 2007), entre ellas la enzima SERCA (Anantamongkol *et al.*, 2007). A pesar de esto, no hay una descripción sistemática de las características bioquímicas, funcionales o celulares de la dinámica intracelular de Ca^{2+} en células MCF-7.

En contraparte, las células MCF-12F son una línea celular de origen epitelial no-tumoral, obtenida de una mamoplastía tisular de una paciente nulípara, con fibrosis cística mamaria que contenía áreas focales de hiperplasia intraductal. La línea se derivó de células flotantes y fue producida mediante cultivo a largo plazo con concentraciones bajas de Ca^{2+} (Paine *et al.*, 1992). Debido a que esta línea celular no es de origen canceroso pero proviene del mismo tejido, se decidió usarla como control para compararla con las células MCF-7.

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

Antecedentes

Monteith y colaboradores (2007), realizaron una revisión bibliográfica con el fin de interpretar la relación que existe entre el cáncer y el transporte de Ca^{2+} . En su búsqueda, encontraron estudios con proteínas moduladas por Ca^{2+} , entre ellas la enzima SERCA. Con respecto a la isoforma SERCA 2 determinaron que había cambios en cáncer oral, de colon, colorectal y de tiroides estudiado tanto en líneas celulares como en muestras de tejido de pacientes. La SERCA 3 se expresa de manera diferencial en biopsias de colon provenientes de tejidos de pacientes que padecen cáncer y en líneas celulares de colon. Los resultados de ambas isoformas muestran un comportamiento diferente en expresión de RNAm, síntesis de proteínas y actividad de la ATPasa, lo que podría sugerir una participación diferencial de esta proteína en células normales y alteradas como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Cambios en la expresión, o actividad de SERCA en tumores y líneas cancerosas y número de referencias hasta julio 2007 (Monteith *et al.*, 2007).

Bomba	Tipo de cáncer	Cambio en cáncer			Referencias
		mRNA	Proteína	Actividad	
SERCA2	Cáncer Oral, carcinoma de células escamosas (Tejido de pacientes y líneas celulares)	↓	↓	ND	34
	Cáncer de colon y pulmón (tejido de pacientes)	↓	ND	ND	36
	Cáncer colorectal (tejido de pacientes)	↑	ND	ND	122
	Cáncer de tiroides: líneas celulares.	↓	↓	↓ (Actividad microsomal de la ATPasa de Calcio)	123
SERCA3	Cáncer de colon (tejido de pacientes y líneas celulares)	ND	↓	ND	44,124

ND = No determinado.

Con respecto a las líneas celulares derivadas de cáncer de mama se han realizado experimentos en células MDA-MB-231 y en MCF-7 para determinar el papel del Ca^{2+} en tratamientos con fármacos que afectan el ciclo celular. Por ejemplo la exposición a baicaleína, (un flavonoide bioactivo, extraído de *Scutellaria baicallensis* y de *S. radix*), afecta la capacidad proliferativa de células cancerosa. Otros compuestos como los derivados de uabaína, digoxina y la proslaridina A (glucósidos esferoidales, extraídos de plantas del género *Digitalis* utilizados para inducir citotoxicidad), han mostrado que el Ca^{2+}

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

puede modular el ciclo celular activando proteínas cinasas, por lo que actualmente se investiga su uso como agentes anticancerosos (Chao *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Winnicka *et al.*, 2008).

Resultados de nuestro laboratorio muestran que SERCA se localiza principalmente en endomembranas en células MCF-7, aunque, la distribución subcelular de esta proteína es atípica con una clara tendencia a concentrarse de manera lateral en la zona perinuclear (Saldaña *et al.*, 2008).

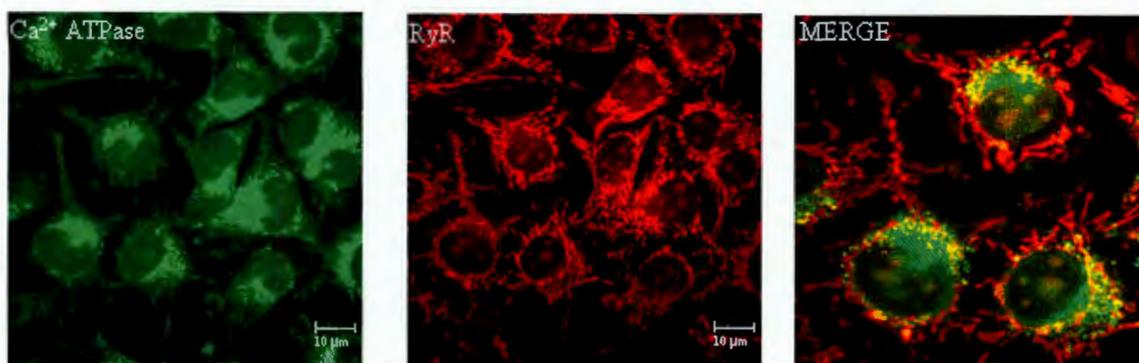


Figura 7. Distribución subcelular de las proteínas SERCA (ATPasa de Ca²⁺) y el RyR en células MCF-7. En la columna de la derecha se muestra la colocalización de estas proteínas (Tomado de Saldaña *et al.*, 2008) Aumento 63 X.

En otros estudios, se ha encontrado que la expresión de la proteína SERCA2 en cáncer colorectal está aumentada (Chung *et al.*, 2006), y que el bloqueo de la actividad de SERCA mediante inhibidores farmacológicos (CPA y TG) altera de su distribución en células de glioma C6 (Suplat *et al.*, 2004). Debido a estos experimentos decidimos caracterizar celular y funcionalmente esta enzima en la clona proveniente de cáncer de mama MCF-7 y compararla con la línea celular MCF-12F que es similar a la clona MCF-7 pero sin ser de origen canceroso.

III. Justificación

A pesar del continuo esfuerzo realizado en varios niveles (económico, social y en investigación) para entender al cáncer, no se ha encontrado una cura eficaz, debido a que se

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

desconoce la etiología del cáncer de mama. La investigación básica es sin duda necesaria para entender las bases moleculares, celulares y fisiológicas de esta enfermedad. Debido a esto, la tipificación estructural y funcional de modelos *in vitro* es una herramienta celular ampliamente aceptada en estudios clínicos y funcionales sobre el cáncer. Una de las moléculas que regula elegantemente diversos mecanismos moleculares, celulares y fisiológicos es el Ca^{2+} . En cuanto a la homeostasis de Ca^{2+} intracelular los estudios sugieren que SERCA está relacionada con esta etiología (Chang *et al.* 2003; Suplat *et al.*, 2004) En nuestro estudio, la clona MCF-7 y MCF-12F representan un modelo experimental ideal porque permite hacer un análisis comparativo entre células de origen canceroso y no canceroso. La caracterización celular y funcional de la enzima SERCA proveerá información de cómo se lleva a cabo la recaptura de Ca^{2+} al interior del RE y el potencial efecto sobre la proliferación, síntesis y/o maduración de proteínas, entre otros., en condiciones normales y en células tumorales.

IV. Hipótesis

Las células de la clona cancerosa MCF-7 presentan una distribución subcelular atípica de la enzima SERCA con respecto a la línea celular control no cancerosa MCF-12F. Por lo tanto en este estudio se propone que esta disposición puede influir en la dinámica de Ca^{2+} en las células cancerosas, porque este arreglo puede estar favorecido por cambios en la estructura proteica y/o en el ambiente intracelular. De tal forma que este tipo de localización puede ayudar a tipificar las diferencias entre ambas clonas.

V. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar celular y funcionalmente a la enzima SERCA proveniente de la línea celular cancerosa MCF-7 y comparar los resultados con los obtenidos con la clona MCF-12F.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la localización intracelular de la enzima SERCA en células de la línea cancerosa MCF-7 y la clona control no cancerosa MCF-12F.
- Analizar la capacidad de liberar Ca^{2+} en ambas líneas celulares en respuesta al fármaco TG.
- Determinar la actividad enzimática de la enzima SERCA para ambos tipos celulares.
- Identificar molecularmente la enzima SERCA en ambas clonas.

VI. Materiales y Métodos

Reactivos.

El suero fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomycin y DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), penicilina y estreptomycin fueron adquiridos de Gibco BRL (Gaithersburgh, MD), Fluo-4 AM, BODIPY FL taspigargina, rodamina-faloidina fueron obtenidos de Molecular Probes (Eugene, Oregon). 4',6-diamidime-2-phenylindole dihidroclorido cristalizado (DAPI) de Roche (Indianapolis, IN). Primocina de InvivoGen (San Diego, CA). La solución de glutaraldehído al 50% fue obtenido de Electron Microscopy Sciences (Washington, PA). Ácido plurónico, Tritón X-100 de JT Baker (Phillipsburg, NJ). El anticuerpo policlonal de cabra para SERCA2 se obtuvo de Santa Cruz (Ca, USA). 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO), albúmina sérica bovina (BSA), dimetil-sulfoxido (DMSO) y otras sales fueron obtenidas de Sigma (St-Louis, MO).

Cultivo celular.

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATTC HTB-22) y la línea celular inmortalizada no cancerosa MCF-12F (ATTC CRL-10783) fueron amablemente donadas por la Dra. Carmen Aceves Velasco (Instituto de Neurobiología, UNAM). Las células fueron sembradas en cajas Petri en medio DMEM (suplementado con 5% FBS, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin), mantenidas en una incubadora a 37° C con una atmósfera de 5% CO₂ y 95 % de O₂ por 18-24 h. Para llevar a cabo los experimentos de dinámica de Ca²⁺ intracelular y tinción con fluoróforos las células fueron cultivadas en portaobjetos de vidrio estériles.

Tinción con fluoróforos.

Portaobjetos a una confluencia celular del 60-80% se fijaron con glutaraldehído al 4%. Después del proceso de fijado, las células se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Posteriormente los sitios de unión inespecíficos se bloquearon, incubando las células en una solución de PBS suplementada con leche libre de grasas al 4%

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

y Tritón X-100 al 0.1% (PBST:leche) por 90 minutos. Después de este proceso, las células fueron incubadas con BODIPY FL tapsigargina (1 μM) para examinar la distribución intracelular de SERCA, DAPI (1 μM) para visualizar los núcleos y rodamina-faloidina (1 μM) para visualizar el citoesqueleto. Todos los fármacos fueron diluidos en PBST:leche; se retiró esta solución después de dos horas de incubación y se lavaron las células tres veces con PBS para retirar el exceso de fluoróforos. Después se añadió DABCO y se llevó a cabo la visualización utilizando un microscopio confocal láser Carl Zeiss META 510 laser con filtros apropiados y con un objetivo plan-apocromático de inmersión en aceite 63X con una apertura numérica de 1.4 (AN). Las imágenes fueron analizadas y convertidas a formato TIFF con el software del fabricante (AIM Image Examiner) y procesadas con la ayuda de Adobe Photoshop CS2®.

Determinación de Ca^{2+} intracelular mediante microscopía confocal.

Como se describe arriba, las células fueron sembradas en portaobjetos de vidrio estériles y cuando alcanzaron una confluencia del 80-90%, fueron lavadas con solución de Krebs (KS; NaCl 150 mM, KCl 1 mM, MgCl_2 1.8 mM, CaCl_2 1.8 mM, Glucosa 4 mM y HEPES 10 mM, pH 7.4) suplementado con BSA al 0.01% (KS:BSA). Después de este tratamiento se incubaron con Fluo-4 AM (5 μM) diluido en KS:BSA con 0.1% de ácido plúronico por aproximadamente 30 minutos protegidas de la luz a temperatura ambiente; posteriormente, las células fueron lavadas dos veces por 10 minutos con KS:BSA. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue medida utilizando un microscopio confocal Nikon Eclipse E-600 acondicionado con un objetivo 20X de multi inmersión recuperando la fluorescencia emitida por el Fluo-4 AM (la longitud de onda de excitación fue de 506 nm y la longitud de onda de emisión colectada a 526 nm). Se colectaron secuencias de 241 imágenes (una imagen por segundo) en cada uno de los experimentos. Para determinar los niveles de Ca^{2+} de las pozas, se añadió tapsigargina en las concentraciones finales de 5, 50, 100, 250, 500, 1250 y 2500 nM. Las imágenes fueron analizadas por regiones de interés (ROI's) para estimar la fluorescencia de cada célula, además, se estimó el ruido de fondo del sistema tomando el nivel de fluorescencia en zonas sin células. Los niveles de fluorescencia se graficaron tomando la media de la fluorescencia con respecto al tiempo. Estos procedimientos se

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

realizaron con el software del fabricante del microscopio confocal y el software OriginLab®.

Fraccionamiento celular y medición de la actividad de SERCA.

Para llevar a cabo estos experimentos, las células fueron sembradas en cajas Petri de 100 mm y cuando alcanzaron la confluencia de 95-100%, se aisló la fracción microsomal de acuerdo al protocolo descrito por Ohlendiek (2004). Las células se homogenizaron con amortiguador A (20 mM MOPS, 0.25 M sucrosa, el pH de esta solución se ajustó a 7.0), suplementado con inhibidores de proteasas (100 µg/ml benzamidina, 0.23 mM PMSF, leupeptina, aprotinina y pepstatina A, 0.5 µg/ml), el homogenado obtenido se diluyó en 5 volúmenes de amortiguador A, posteriormente se procesaron las muestras para aislar membranas totales y la fracción microsomal de acuerdo al siguiente método: una primera centrifugación a 2000 x g por 10 minutos para remover las partículas pesadas seguida de una centrifugación de 10000 x g por 10 minutos para obtener las membranas mitocondriales en el precipitado. El sobrenadante fue centrifugado a 105000 x g por 45 minutos para obtener los precipitados microsomales, ambas fracciones celulares fueron resuspendidas en amortiguador A. La concentración de proteína se determinó usando el método de Lowry (1951), las fracciones se mantuvieron a -70° C hasta el momento de las determinaciones.

La actividad de SERCA en ambas líneas celulares fue realizada por ensayo estándar descrito en el trabajo de Saborido (1999), basado en la tasa de la hidrólisis de ATP y la oxidación de NADH visualizada a 340 nm (Coeficiente de extinción molar del NADH a esta longitud de onda= $6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La actividad se mide por dos reacciones en paralelo, una con alta concentración de Ca^{2+} para medir la actividad basal (MOPS 25 mM, MgCl_2 15 mM, KCl 200 mM, EGTA 1 mM, CaCl_2 21 mM) y otra con baja para medir la actividad total (MOPS 25 mM, MgCl_2 15 mM, KCl 200 mM, EGTA 1 mM, CaCl_2 1 mM). La diferencia entre las dos reacciones se toma como la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} . El remanente de actividad, la ATPasa que no es de Ca^{2+} , corresponde a la actividad de ATPasas dependientes de Mg^{2+} . Todos los datos de la medición de la actividad de SERCA para ambas líneas celulares se expresan en los resultados como µmol de ATP hidrolizado

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se presentan datos de las medias \pm desviación estándar de $n=4$ preparaciones independientes. Las comparaciones estadísticas fueron hechas utilizando una prueba pareada de t de Student. Se seleccionó un nivel de $P < 0.05$ para indicar la significancia estadística.

Western blot

Se aisló la fracción microsomal mediante centrifugación diferencial resuspendiendo las células con amortiguador SET (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol, 200 μM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) y después centrifugando a 2000 x g por 10 minutos para remover las partículas pesadas seguida de una centrifugación de 10000 x g por 10 minutos para obtener las membranas mitocondriales en el precipitado. El sobrenadante fue centrifugado a 105000 x g por 45 minutos para obtener los precipitados microsomales, ambas fracciones celulares fueron resuspendidas en amortiguador SET-2 (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), esto como una modificación del protocolo descrito por He y colaboradores (1999). Las membranas se guardaron a -70°C hasta su uso. La cantidad de proteína se determinó usando el método de Lowry (1951). Las proteínas se desnaturalizaron a 100°C por 10 min y posteriormente se colocaron en geles de SDS-poliacrilamida al 7.0% (Mini Protean 3 System, BioRad, Hercules CA) usando "mini Trans Blot Semi dry transfer cell" (BioRad, Hercules CA). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó por 2 hrs con PBS-0.05% Tween-20 (PBS-Tween) adicionado con 5% leche libre de grasas. Posteriormente se lavó 3 veces con 150 mM NaCl-0.05% Tween-20 (NaCl-T) por 10 min. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (policlonal de cabra para SERCA, dilución 1:250) en PBS-Tween suplementado con 0.1% BSA. Después la membrana se lavó 3 veces con NaCl-T por 10 min y se incubó 1 hr con el anticuerpo secundario (levantado en conejo contra cabra, dilución 1:500) en PBS-Tween mas 0.1% BSA. Se realizaron 3 lavados con 0.1 M Tris-HCl pH 9.5, el color asociado a la unión de los anticuerpos se desarrolló usando el kit de sustratos conjugados con fosfatasa alcalina (BioRad, Hercules CA).

VII. Resultados

SERCA se localiza en la región perinuclear en las células MCF-7.

En los últimos años se han hecho importantes hallazgos sobre la enzima SERCA a nivel estructural y en el papel que desempeña en ciertas enfermedades humanas (Martin *et al.*, 2002) En general, se ha encontrado que la proteína se encuentra distribuida en la totalidad del RE, aun en tejidos normales (Choi *et al.*, 2008; Krisaj, 2005; Sepúlveda *et al.*, 2004; Marin, *et al.*, 2002). En nuestro estudio, las imágenes obtenidas por microscopía confocal y el uso de indicadores fluorescentes que reconocen selectivamente a la enzima SERCA, mostraron que esta enzima en MCF-7 se encuentra en el RE. Sin embargo, la distribución es inusual, ya que observamos una polarización distinta localizándose la proteína en un solo lado del citoplasma, principalmente en endomembranas cercanas a la zona perinuclear (n= 5 experimentos independientes. 20-25 células por campo) (Figura 8). Con la finalidad de determinar si este cambio es típico de esta línea celular, decidimos explorar la distribución de esta enzima en las células control MCF-12F. En claro contraste, en esta clona la enzima SERCA se observó homogéneamente distribuida a lo largo del RE. De tal forma que el aglutinamiento que observamos en las MCF-7 es particular de este tipo celular.

Para comprobar con más precisión la localización espacial de SERCA, marcamos las células con dos fluoróforos: uno para ver la estructura del citoesqueleto y el otro para localizar el núcleo. La faloidina acoplada a rodamina (modificada en verde), reconoce selectivamente a la proteína de citoesqueleto, actina, mientras que, con DAPI observamos la estructura de los núcleos (azul). La tonalidad de algunos colores fueron modificados mediante el programa Adobe Photoshop® para visualizar mejor el cambio en la distribución celular en la proteína SERCA en relación con la estructura del citoesqueleto y el núcleo.

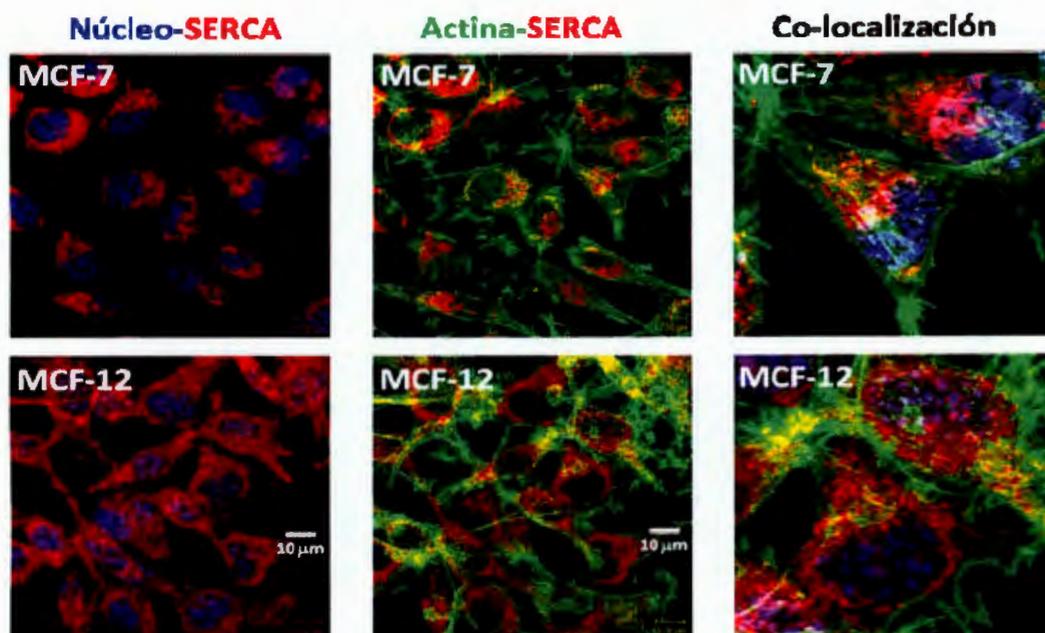


Figura 8. Distribución subcelular de SERCA. Las células fueron teñidas con DAPI (azul) para observar la localización de los núcleos, con faloidina acoplada a rodamina (verde) para determinar la estructura del citoesqueleto de actina y TG fluorescente acoplada a rojo Texas para ubicar la SERCA. Los colores originales fueron modificados para apreciar mejor la distribución de las proteínas. Se muestran experimentos representativos de al menos 5 observaciones independientes.

Estos datos indican que la distribución en las células cancerosas es diferente al observado en las células control. Con el fin de determinar si esta agrupación inusual afectaba la movilización de Ca^{2+} , nos propusimos realizar experimentos funcionales de SERCA.

Las células MCF-7 movilizan Ca^{2+} en respuesta a TG lentamente, pero presentan una sensibilidad alta al fármaco.

Para demostrar si la distribución de SERCA en MCF-7 afecta los patrones de movilización de Ca^{2+} , decidimos estudiar la movilización de este catión en respuesta a TG. Este inhibidor, provoca que el Ca^{2+} contenido en el lumen del RE se libere de manera masiva a través de los IP₃R, RyR o por una salida inespecífica (Thastrup *et al.*, 1990), de tal forma que el Ca^{2+} se acumula en el citosol. Debido a que la ATPasa de Ca^{2+} del RE se

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

encuentra irreversiblemente bloqueada, ésta no puede recapturar al Ca^{2+} al lumen del RE y en consecuencia se acumula más Ca^{2+} en el citosol.

Para llevar a cabo este objetivo utilizamos el reportero fluorescente Fluo-4 AM, un indicador selectivo para Ca^{2+} , con una K_D de 400 nM, que permea la membrana porque contiene en su estructura un grupo acetometil ester (en el citosol esterasas endógenas hidrolizan el grupo ester y el indicador queda atrapado en el citoplasma). En las células MFC-7 la elevación de Ca^{2+} en respuesta a TG fue dosis-dependiente, con concentraciones de 50, 100, 250, 500, 1000, 1200 y 2500 nM provocaron un aumento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente de la dosis aplicada. Sin embargo, a concentraciones por debajo de 5 nM TG no observamos ningún efecto, aunque dosis mayores las células respondieron rápidamente y el efecto fue mayor. Para determinar el efecto que tiene la TG en las células control, se realizaron experimentos utilizando las mismas concentraciones (5, 50, 100, 250, 500, 1000, 1200 y 2500 nM). El comportamiento de la respuesta también fue dosis-dependiente. Interesantemente, en las MCF-12F no hubo respuesta a concentraciones de TG de 5, 50, 100, y 250 nM. Las MCF-12F respondieron al estímulo de TG a concentraciones por arriba de 500 nM de manera sostenida aumentaron la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. No obstante después de 4 minutos, las células retornaron al nivel basal Ca^{2+} a diferencia de las MCF-7 que no regresaron al nivel normal de Ca^{2+} . Los resultados se muestran en la Figura 9, la gráfica es una muestra representativa de varios experimentos realizados de manera independiente ($n= 5$, células analizadas 50-60 células por campo en ambos tipos celulares). La respuesta se observó principalmente en el citoplasma, donde se aprecia el efecto de TG, referido como un aumento en las unidades arbitrarias de fluorescencia (U. F. A) con respecto al tiempo (minutos). La aplicación de TG se realizó al segundo 30, indicado por el cuadro oscuro localizado en la parte superior de la gráfica. Las concentraciones de TG están señaladas por las flechas horizontales, ubicadas a la derecha de cada gráfica. En la Figura 9-panel B. Se muestran imágenes representativas, donde se ilustran las células (MCF-7 y MCF-12F) en condición basal, en las imágenes a la derecha se muestra el efecto de la aplicación de 1000 nM TG en ambos tipos celulares después de un 1 y 2 minutos en presencia del fármaco. En la gráfica se aprecia que la sensibilidad, la velocidad de la respuesta y el tiempo que permaneció el Ca^{2+} elevado en el citoplasma, fue claramente diferente en las células cancerosas MCF-7 con respecto a las células control MCF-12F.

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

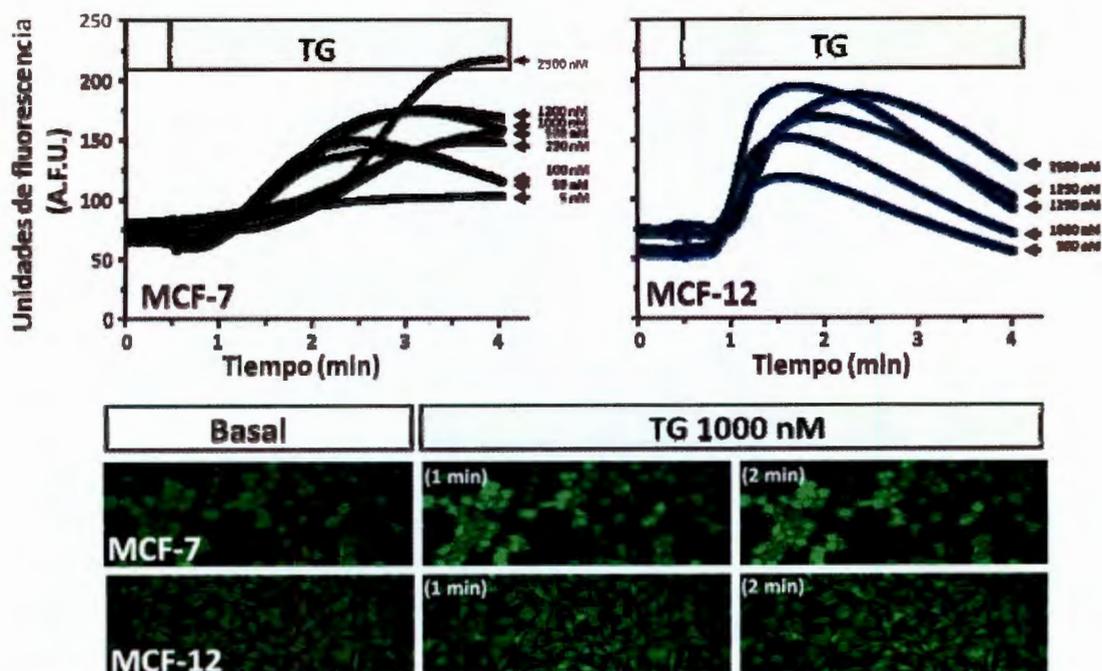


Figura 9. Trazos representativos del manejo del Ca^{2+} en respuesta a TG en las células MCF-7 y las MCF-12F. En el panel inferior, se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal de ambos tipos celulares en estado basal y después de 1 y 2 minutos de exposición al fármaco.

Para determinar las diferencias cinéticas de ambas clonas, decidimos analizar los resultados, ajustándolos a la ecuación de Hill. Para ciertas enzimas y proteínas fijadoras de ligando, que no presentan la cinética de saturación característica de Michaelis-Menten se utiliza la ecuación de Hill, que describe el grado de saturación de una proteína en función de su sustrato, y el grado de cooperatividad de una enzima (Voet *et al.*, 1999). Se define como:

$$\log v_i/v_{max} - v_i = n \log [s] - \log k'$$

Donde k' es una constante compleja. La ecuación establece que cuando la $[s]$ (concentración de sustrato) es baja, comparada con k' , la velocidad de reacción se incrementa a la n ésima potencia de $[s]$, cuando se realizan los cálculos graficando el término $v_i/v_{max} - v_i$ contra el logaritmo de $[s]$, se obtiene una línea recta con inclinación = n , donde n corresponde a un parámetro empírico cuyo valor depende de la cantidad de sitios

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

para el enlace del sustrato, así como la cantidad y tipo de interacciones entre estos sitios de enlace. Los parámetros obtenidos de la ecuación de Hill son 1) la EC_{50} , que es un término que describe la mitad de la concentración máxima efectiva y se refiere a la concentración a la que una droga o fármaco induce la mitad de la respuesta entre la línea base y el máximo de concentración, se utiliza como una medida para la potencia de fármacos (The Merck Veterinary Manual, 2008), y 2) el número de Hill (n_{Hill}), cuando $n_{Hill}=1$, los sitios de enlace actúan de manera independiente uno del otro y se obtiene una saturación simple, es decir, se observa un comportamiento cinético de Michaelis-Menten. En el caso de $n_{Hill} > 1$, los sitios son cooperativos; en este caso, a mayor valor de n_{Hill} , mayor es la cooperación y, por tanto, resulta más sigmoide la cinética de la saturación. En el caso de $n_{Hill} < 1$, se dice que los sitios presentan cooperatividad negativa o no hay cooperatividad (Murray *et al.*, 2001).

Para la consecución de este objetivo, se tomó el valor de la respuesta al pico de cada experimento y se graficó con respecto a la [TG], es decir, se realizó la curva dosis-respuesta, para determinar la EC_{50} y el n_{Hill} . Como se observa en la Figura 10, los resultados muestran que ambos tipos celulares presentan una afinidad diferente por TG: en MCF-7 $EC_{50}= 228.8 \pm 2.3$ nM mientras que para MCF-12F la $EC_{50}= 1200 \pm 4.4$ nM, lo cual revela 4 veces más afinidad a la TG por parte de las células MCF-7. La EC_{50} muestra la concentración media a la que responden las células a determinado fármaco, en este caso los datos muestran una diferencia importante entre las células MCF-7 y las MCF-12F. Las MCF-7 responden gradualmente a concentraciones menores de TG y alcanzan su saturación a concentraciones por arriba de 500 nM de TG, mientras que las células no cancerosas no responden a bajas concentraciones y a concentraciones altas (> 1000 nM TG) la cinética es instantánea. Este resultado muestra una mayor sensibilidad al fármaco por parte de las células MCF-7. Estos hallazgos concuerdan con la medición de actividad de este fármaco sobre células normales de cerebelo de cerdo realizadas en el 2004 por Sepúlveda *et al.* (2004), donde se mostró que el fármaco tenía una actividad mayor a 250 nM.

El ajuste de los datos a la ecuación de Hill muestra que las MCF-7 presentan una cooperatividad diferente a las MCF-12F. El valor obtenido para las células MCF-7 es de $n_{Hill}=10.2$ mientras que para las células MCF-12F es de 3.1. En ambos casos la cooperatividad es positiva, y en conclusión las MCF-7 presentan una mayor cooperatividad

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

que las MCF-12F con respecto a la liberación de Ca^{2+} en respuesta a TG. Este resultado indica que pueden estar involucradas: 1) más de una isoformas y/o 2) el lumen del RE en cuanto a concentración de Ca^{2+} es diferencial en cada tipo celular y por lo tanto la forma en como se moviliza Ca^{2+} de este organelo en ambos tipos celulares necesariamente será diferente.

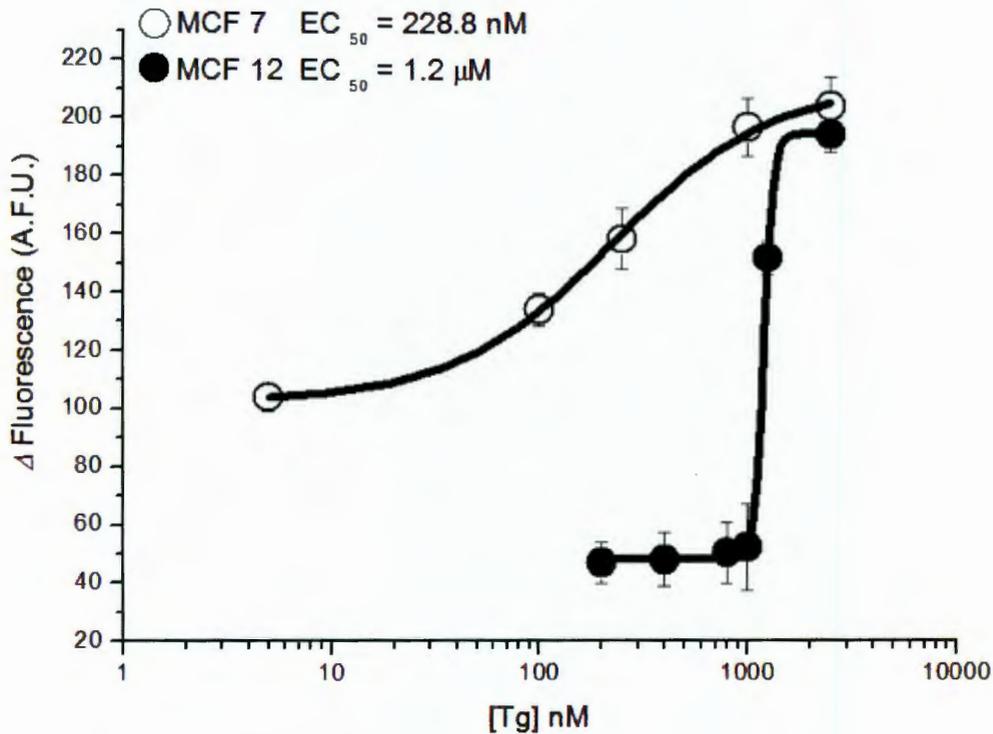


Figura 10. Curva dosis-respuesta para la TG en células MCF-7 (○) y en las células no cancerosas MCF-12 (●). En la gráfica se observa que las células MCF-7 responden a concentraciones nM de fármaco y, a medida que se incrementa la concentración, responden de manera gradual. A diferencia de las células MCF-12F en las que se necesitan concentraciones en el rango μM de TG para que las células respondan y cuando lo hacen, responden muy rápido hasta alcanzar la saturación. En la figura se muestra también el valor de la EC_{50} para ambos tipos celulares.

La actividad de SERCA es menor en las células MCF-7.

Para entender si las diferencias en la afinidad por TG se deben a una expresión diferencial entre las MCF-7 con respecto a las MCF-12F, decidimos determinar la actividad

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

de la SERCA en membranas totales y microsomas a través de métodos acoplados (basado en la tasa de la hidrólisis de ATP y la oxidación de NADH). Los resultados de este ensayo mostraron que la actividad de SERCA en las células MCF-7 corresponde a la mitad de la actividad detectada en las células MCF-12F en ambas fracciones (Figura 11). Estos datos indican que ambas tipos celulares expresan SERCA pero a la actividad de cada ATPasa en cada tipo celular es desigual y que la diferencia en la actividad podría deberse al tipo de isoforma que expresa las MCF-7 con respecto a su control.

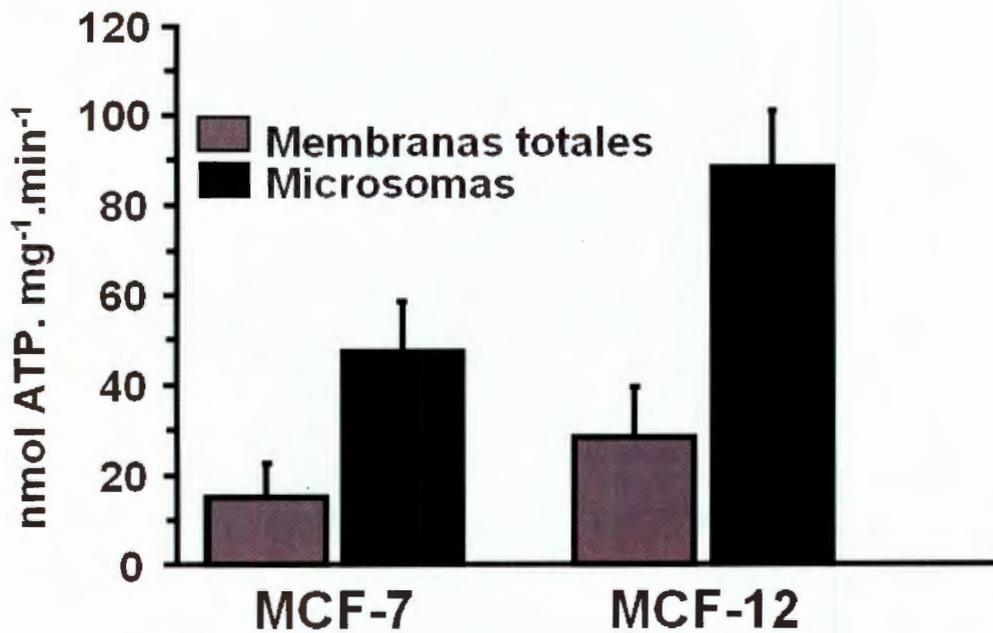


Figura 11. En la figura se muestran los resultados obtenidos de la medición de la actividad de SERCA para las células MCF-7 y MCF-12F. Se presentan datos de las medias de los datos.

Las células MCF-7 y MCF-12F expresan la isoforma 2 de SERCA.

Para determinar la expresión de las isoformas de SERCA en las células MCF-7 y MCF-12F, decidimos realizar experimentos de Western blot con los microsomas obtenidos de ambas clonas. En la figura 12, se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos realizados de manera independiente con un anticuerpo genérico que reconoce a la proteína SERCA2. A la izquierda se representa el marcador de peso molecular (121, 77 y 55 kDa).

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

En los subsecuentes carriles observamos una curva de proteína de tejido muscular (80, 10 y 1 μg), utilizado como control positivo, donde la proteína tiene una fuerte expresión. En los siguientes carriles se colocaron 10 μg de microsomas provenientes de MCF-12F y MCF-7 respectivamente. Los resultados mostraron que la isoforma 2 se expresa tanto en las células MCF-7 como en las células MCF-12F. El peso molecular esperado es de 100 kDa, y se observó en ambos tipos celulares y en el tejido control. Por otra parte, una banda de ≈ 50 kDa mostró una fuerte señal en ambos tipos celulares, incluyendo la curva del tejido control. Sin embargo, la cantidad de expresión es variable entre las MCF-12F y las MCF-7, y entre estas con respecto al tejido control, donde el nivel de expresión fue menor. Al respecto, se ha demostrado en tejido adulto y fetal humano la presencia de una forma truncada de SERCA2, que es incapaz de transportar Ca^{2+} (Chami *et al.*, 2001). Estos resultados muestran que la concentración de SERCA en ambas líneas celulares es diferente y que existe una predominancia de la banda de 50 kDa en ambas clonas, de tal forma que ambas clonas expresan la isoforma 2 de SERCA pero en diferentes concentraciones.

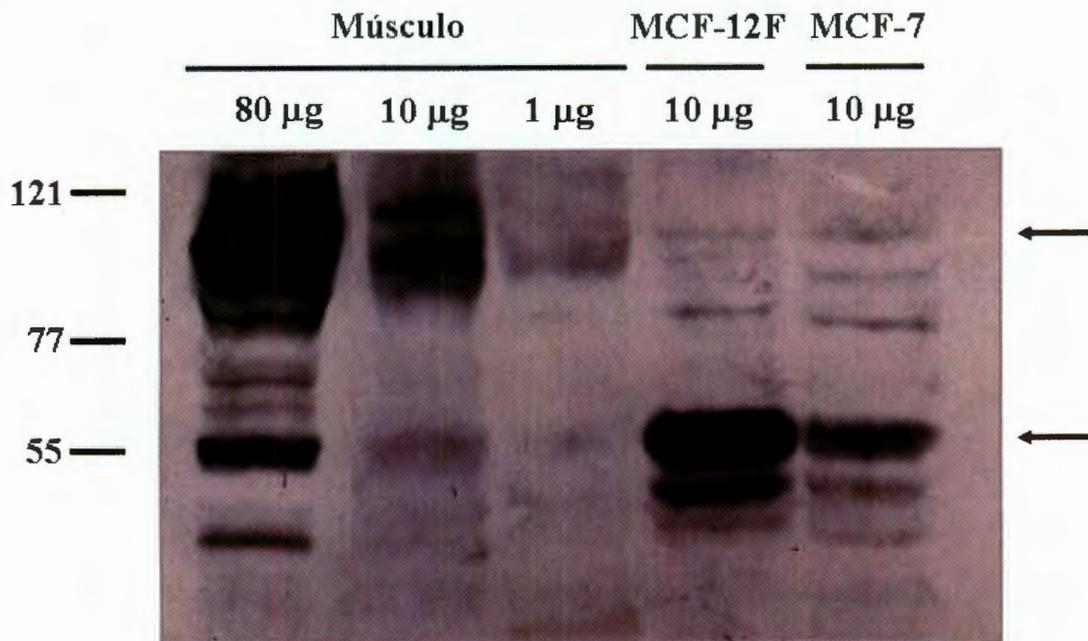


Figura 12. Expresión de SERCA2 en microsomas de MCF7 y MCF-12F, y en músculo esquelético, usando un anticuerpo genérico que reconoce a la proteína SERCA2. En la figura, se muestra un ejemplo representativo de varios experimentos independientes. A la

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

izquierda las líneas negras indican el peso molecular (121, 77 y 55 kDa respectivamente). Los siguientes 3 carriles corresponden a una curva de proteína de tejido muscular (80, 10 y 1 μ g respectivamente), utilizado como control positivo. En los carriles continuos se colocaron 10 μ g de microsomas provenientes de MCF-12F y MCF-7 respectivamente.

Para determinar si existen diferencias en la expresión de otras variantes moleculares, estamos diseñando experimentos de biología molecular, entre ellos RT-PCR para explorar la expresión en proteína de la isoforma 3 y de sus homólogos moleculares.

VIII. Discusión

El RE tiene un rol muy importante en la síntesis, plegamiento y distribución de proteínas. SERCA es una proteína que se expresa en este organelo, la función es preponderante en todas las células para alcanzar una homeostasis de Ca^{2+} . Actualmente representa un blanco terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades incluido el cáncer. La inhibición de esta enzima por fármacos como la TG promueve un estrés en el RE, debido a que este organelo es muy sensible a las variaciones de este ión, estimulando la iniciación de cascadas apoptóticas entre el mismo RE y la mitocondria (Denmeade e Isaacs, 2005). El descubrimiento de la polaridad en la distribución de SERCA hace énfasis en las diferencias estructurales que las células cancerosas muestran con respecto a sus controles. Esto no ha sido reportado en ninguna otra línea celular (Saldaña *et al.*, 2008).

La TG ha sido propuesta como agente terapéutico para el tratamiento de cáncer de próstata, ya que, al igual que en nuestros experimentos, en estas células transformadas, la TG es específica para este tipo de células porque reconoce un antígeno propio del cáncer de próstata (PMSA, prostate-specific membrane antigen) y otras proteasas comunes en líneas celulares cancerosas como la kalikreina 2 (hK2) (Denmeade e Isaacs, 2005). Los compuestos farmacológicos como la TG también han sido utilizados para estudiar la movilización de Ca^{2+} intracelular y ya se había encontrado con anterioridad que este fármaco interfiere en la proliferación de células en cultivo (Jakobsen *et al.*, 2001), aunque el uso terapéutico de este fármaco aún se encuentra en etapa clínica para células de cáncer de próstata (Denmeade e Isaacs, 2003). Nuestros resultados muestran que la enzima SERCA de células cancerosas MCF-7 es inhibida en concentraciones en el rango nanomolar, lo cual ya había sido reportado en trabajos anteriores de otros grupos de trabajo en otras líneas celulares cancerosas y no cancerosas (Sagara e Inesi, 1991), lo que resulta interesante de nuestro trabajo es la diferencia de la respuesta entre este tipo celular y su control.

La actividad de la enzima, depende de la línea celular en estudio (Monteith *et al.*, 2007). Específicamente la actividad esta estrechamente relacionada con la(s) isoforma(s) que se expresen en el modelo. Incluso se han encontrado diferencias en la actividad enzimática en tipos celulares relacionados, lo cual nos lleva a interpretar que las isoformas

involucradas en estos dos tipos celulares son diferentes, aunque nuestros resultados de expresión de proteína no muestran diferencias en SERCA2 analizadas, aún resta analizar las isoformas SERCA1 y 3 y las variables alternativas de estas enzimas.

IX. Conclusiones

La distribución subcelular de SERCA es diferente en ambos tipos celulares. Las células muestran un comportamiento diferente a TG. La actividad de SERCA en la clona MCF-12F fue superior a la MCF-7. Ambas líneas celulares expresan SERCA tipo 2, pero la MCF-7 presenta una señal mayor para esta isoforma.

Estos datos sugieren fuertemente que el Ca^{2+} de los depósitos internos es modulado diferencialmente en ambos tipos celulares. Por lo tanto, el estudio de esta enzima enfatiza algunas de las diferencias moleculares que distinguen a las células neoplásicas de sus controles.

Debido a que el Ca^{2+} juega un papel importante en muchas funciones, el reto es entender como este catión regula los elementos involucrados en la decodificación de señales extra e intracelulares, y comprender como las cascadas de señalización se activan y/o desactivan en procesos fisiológicos de células normales y cancerosas.

X. Perspectivas

Este trabajo ha mostrado diferencias moleculares y funcionales entre dos líneas celulares, una de ellas de origen canceroso, sin embargo, aún quedan estudios por desarrollar en torno a la expresión de las isoformas de SERCA involucradas en la señalización intracelular del Ca^{2+} en este tipo de cáncer y ratificar los resultados obtenidos en este estudio con otras técnicas moleculares y bioquímicas.

El paso siguiente involucra determinar las diferencias en el manejo de Ca^{2+} de los depósitos internos en ambas clonas, analizar estos resultados en comparación con la actividad y distribución de otras proteínas y canales involucrados en la señalización de Ca^{2+} como los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, los receptores de IP_3 y $\text{R}_y\alpha$, entre muchos otros.

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

Otra de las perspectivas de este trabajo es realizar este análisis en otros tipos celulares neoplásicos ya sea del mismo tejido (mama) o de algún otro que puedan explicar de manera general una participación activa del Ca^{2+} en el proceso canceroso o un papel terapéutico de la TG en el cáncer de mama.

1. XI. Literatura Citada

Anantamongkol U, Takemura H, Suthiphongchai T, Krishnamra N, Horio Y (2007). Regulation of Ca^{2+} mobilization by prolactin in mammary gland cells: posible role of secretory pathway Ca^{2+} -ATPase type 2. *Biochem Biophys Res Commun* 352:537-42.

Arredouani A (2004). Diversification of function and pharmacology in intracellular calcium signalling. *Cellscience Reviews* vol. 1.

Arredouani A, Henquin JC, Gilon P (2002). Contribution of the endoplasmic reticulum to the glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ response in mouse pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E982-91.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003). Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Mol Cell Biol* 4:517-529.

Bober R, Bredoux R, Corvaizier E, Lacabaratz-Porret C, Martin V, Kovács T, Enouf J (2005). How many Ca^{2+} ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets. *Platelets* 16: 133-150.

Bockaert J, Pin JP (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18:1723-9.

Bollig A, Xu L, Thakur A, Wu J, Kuo TH, Liao JD (2007). Regulation of intracellular calcium release and PPIalpha in a mechanism for 4-hydroxytamoxifen-induced cytotoxicity. *Mol Cell Biochem* 305: 45-54.

Bootman MJ, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LM, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P (2001). Calcium signaling: an overview. *Cell Dev Biol* 12:3-10.

Boring CC, Squires TS, Long T, Montgomery S (1994). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 44: 7-26.

Brouland JP, Gélébart P, Kovács T, Enouf J, Grossman J and Papp B (2005). The loss of Sarco/Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression in an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol* 167 (1): 233-42.

Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16:521-55.

Chang JP, Wong CJ, Davis PJ, Soetaert B, Fedorow C, Sawinsky G (2003). Role of Ca^{2+} stores in dopamine- and PACAP-evoked growth hormone release in goldfish. *Mol Cell Endocrinol* 206:63-74.

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

Chami M, Gozuacik D, Lagorce D, Brini M, Falson P, Peaucellier G, Pinton P, Lecoeur H, Gougeon ML, le Maire M, Rizzuto R, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P (2001). SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis. *J Cell Biol* 153:1301-14.

Chao JI, Su WC, Liu HF (2007). Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT. *Mol Cancer Ther* 6:3039-48.

Choi JH, Jo H, Hong JH, Lee SI, Shin DM (2008). Alteration of expression of Ca²⁺ signaling proteins and adaptation of Ca²⁺ signaling in SERCA^{+/-} mouse parotid acini. *Yonsei Med J* 49:311-21.

Christensen SB, Andersen A, Poulsen JC, Treiman M (1993). Derivatives of thapsigargin as probes of its binding site on endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase stereoselectivity and important functional groups. *FEBS Lett* 335:345-8.

Chung FY, Lin SR, Lu CY, Yeh CS, Chen FM, Hsieh JS, Huang TJ, Wang JY (2006). Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2 expression as a tumor marker in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 30:969-74.

Dally S, Monceau V, Corvazier E, Bredoux R, Raies A, Bobe R, del Monte F, Enouf J (2008). Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing human heart. *Cell Calcium*. In Press.

de Meis L (2002). Ca²⁺-ATPases (SERCA): Energy transduction and heat production in transport ATPases. *J Membrane Biol* 188: 1-9.

Denmeade SR, Isaacs JT (2005). The SERCA pump as a therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 4:14-22.

Denmeade SR, Jacobsen CM, Janssen S, Khan SR, Garrett ES, Lilja H, Christensen SB, Isaacs JT (2003). Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 95:990-1000.

Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E (2008). The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys* 476:65-74.

Dickson RB, Bates SE, Mc Manaway ME, Lippman ME (1986). Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 46:1707-13.

Dode L, De GC, Mountian I, Attard M, Town MM, Casteels R, Wuytack F (1998). Structure of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *J Biol Chem* 273:13982-94.

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

- Ferbeyre L, Salinas JC (2005). Bases genéticas y moleculares del cáncer. *Gamo* 4:32-47.
- Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonté C, Matteoli M, Verderio C, Abbraccio MP (2003). Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43:218-23.
- Gélébart P, Kovács T, Brouland JP, van Gorp R, Grossman 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. *J Biol Chem* 277: 26310-20.
- Gilon P, Arredouani A, Gailly P, Gromada J, Henquin JC (1999). Uptake and release of Ca^{2+} by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca^{2+} concentration triggered by Ca^{2+} influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 274:20197-205.
- He Cl, Damiani P, Ducibella T, Takahashi M, Tanzawa K, Parys JB, Fissore R (1999). Isoforms of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are expressed in bovine oocytes and ovaries: The type 1 isoform is down-regulated by fertilization and by injection of adenophostin A. *Biol Reprod* 61:935-43.
- Illes P, Alexandre Ribeiro J (2004). Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 1:5-17.
- Inesi G, Hua S, Xu C, Ma H, Seth M, Prasad AM, Sumbilla C (2005). Studies of Ca^{2+} ATPase (SERCA) Inhibition. *J Bioener Biomem* 37: 365-8.
- Jakobsen CM, Denmeade SR, Isaacs JT, Gady AM, Olsen CE, Christensen SB (2001). Design, synthesis and pharmacological evaluation of thapsigargin analogues for targeting apoptosis to prostatic cancer cells. *J Med Chem* 44:4696-703.
- Jain PT, Trump BF (1997). Human breast cancer cell growth inhibition and deregulation of $[\text{Ca}^{2+}]$ by estradiol. *Anticancer Drugs* 8: 283-7.
- Krisaj D (2005). Serca isoform expression in the mammalian retina. *Exp Eye Res* 1:690-99.
- Lajas AI, Sierra V, Camello PJ, Salido GM, Pariente JA (2001). Vanadate inhibits the calcium extrusion in rat pancreatic acinar cells. *Cel Sign* 13:451-6.
- Lecroix M, Leclerq G (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Can Res Treat* 83:249-89.
- Lee JH, Ip SW, Hsu SC, Chang NW, Tang NY, Yu CS, Chou ST, Lin SS, Lino CC, Yang JS, Chung JG (2008). The role of Ca^{2+} in baicalein-induced apoptosis in human breast MDA-MB-231 cancer cells through mitochondria- and caspase-3-dependent pathway. *Anticancer Res* 28:1701-11.

Caracterización de SERCA en células cancerosas MCF-7

Liao JY, Li LL, Wei Q, Yue JC (2007). Heregulinbeta activates store-operated Ca^{2+} channels through c-erbB2 receptor level-dependent pathway in human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 458:244-52.

Liu LH, Paul RJ, Sutliff RL, Miller ML, Lorenz JN, Pun RY, Duffy JJ, Doetschman T, Kimura Y, MacLennan DH, Hoying JB, Shull GE (1997). Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca^{2+} signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform. *J Biol Chem* 272:30538-45.

Liu Z, Zhang J, Berg DK (2007). Role of endogenous nicotinic signaling in guiding neuronal development. *Biochem Pharmacol* 74 :1112-9.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.

MacLennan DH, Rice WJ, Odermatt A (1997). Structure/function analysis of the Ca^{2+} binding and translocation domain of SERCA1 and the role in Brody disease of the ATP2A1 gene encoding SERCA1. *Ann N Y Acad Sci* 834:175-85.

Martin V, Bredoux R, Corvazier E, van Gorp R, Kovács T, Gélébart P, Enouf J (2002). Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 3 isoforms. *J Biol Chem* 277:24442-24452.

Meissner G (1994). Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 56:485-508.

Mikkelsen EO, Thastrup O, Christensen SB (1988). Effects of thapsigargin in isolated rat thoracic aorta. *Pharmacol Toxicol* 62:7-11.

Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Robert-Thomson SJ (2007). Calcium and cancer: targeting Ca^{2+} transport. *Nature Reviews. Cancer* 7:519. CHECAR APELLIDO

Mundy GR (1997). Mechanism of bone metastasis. *Cancer* 80:1546-56.

Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW (2001). Bioquímica de Harper. 15a edición. Editorial Manual Moderno. pp 113-114.

Ohlendiek K (2004). Purification of membrane proteins. *Methods Mol Biol* 244:301-8.

OMS (2008). Nota descriptiva No 297. Cáncer. WHO Media centre. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html> Última consulta, 04/09/08.

Paine TM, Soule HD, Pauley RJ, Dawson PJ (1992). Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *Int J Cancer* 50:463-73.

Papp B, Brouland JP, Gélébart P, Kovács T and Chomienne C (2004). Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase expression during differentiation of colon cancer and leukaemia cells. *Biochem Biophys Res Comm* 322: 1223-36.

Patel S, Joseph SK, Thomas AP (1999). Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 25:247-64.

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005). TRP channels: An Overview. *Cell Calcium*. 38:233-52.

Petsko GA, Ringe D (2007). From: protein and Function. *News Science Press*. Online Update.

Putney JW, Jr. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11:611-24.

Renan MJ (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications for human cancer data. *Mol Carcinol* 7:139-46.

Saborido A, Delgado J, Megías A (1999). Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity and E- Type Mg^{2+} -ATPase activity in rat heart homogenates. *Analytical Biochemistry* 268:79-88.

Sagara Y, Inesi G (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J Biol Chem* 266: 13503-6.

Saldaña C, Díaz-Muñoz M, Antaramián A, González-Gallardo A, García Solís P. Morales-Tlalpan V (2008). MCF-7 breast carcinoma cells Express ryanodine receptors type 1: functional characterization and subcellular localization. *Mol Cell Biochem* (**En Prensa**).

Scodelaro-Bilbao P, Boland R, Russo de Boland A, Santillán G (2007). ATP modulation of mitogen activated protein kinases and intracellular Ca^{2+} in breast cancer (MCF-7) cells. *Arch Biochem Biophys* 466:15-23.

Sepúlveda MR, Hidalgo-Sánchez M, Mata AM (2004). Localization of endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in subcellular fractions and sections of pig cerebellum. *Eur J Neurosci* 19:542-51.

Sergeev IN, Li S, Colby J, Ho CT, Dushenkov S (2006). Polymethoxilated flavones induce Ca^{2+} -mediated apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci* 80:245-53.

Soule HD, Vázquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409-16.

Strehler EE, Caride AJ, Filoteo AG, Xiong Y, Penniston JT, Enyedi A (2007). Plasma Membrane Ca^{2+} ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann NY Acad Sci* 1099:226-36.

Suplat D, Targos B, Sabala P, Baranska J, Pomorski P (2004). Differentiation of answer og glioma C6 cells to SERCA pump inhibitors by actin desorganization. *Biochem Biophys Res Commun* 22:870-5.

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BJ, Hanley MR, Dawson AP (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2466-70.

The Merck Veterinary Manual – Drug Dose and Clinical Response. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/190116.htm>. Última consulta: 25 de septiembre de 2008.

Todd DG, Mikkelsen RB (1994). Ionizing radiation induces a transient increases in cytosolic free $[Ca^{2+}]$ in human epithelial tumor cells. *Cancer Res* 54: 5224-30.

Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405:647-55.

Toyoshima C, Nomura H (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418:605-11.

Traaseth NJ, Ha NK, Verardi R, Shi L, Buffy JJ, Masterson LR, Veglia G (2008). Structural and dynamic basis of phospholamban and sarcolipin inhibition of Ca^{2+} -ATPase. *Biochem J* 8:3-13.

Venkatachalam K, van Rossum DB666, Patterson RL, Ma HT, Gill DL (2002). The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol.* 4:E263-72.

Verboomen H, Wuytack F, De SH, Himpens B, & Casteels R (1992). Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca^{2+} pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J* 286:91-95.

Voet D, Voet JG, Pratt CW (1999). Fundamentals of Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. 168-170 pp. New York, USA.

Winnicka K, Bielawski K, Dielawska A, Surazynski A (2008). Antiproliferative activity of derivatives of Ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Pharm Bull* 31:1131-40.

Wu MP, Kao LS, Liao HT, Pan CY (2008). Reverse mode Na^{+}/Ca^{2+} exchangers trigger the release of Ca^{2+} from intracellular Ca^{2+} stores in cultures rat embryonic cortical neurons. *Brain Res* 1201:41-51.

Wuytack F, Dode L, Baba-Aissa F, Raeymaekers L (1995). The SERCA3-type of organellar Ca^{2+} pumps. *Biosci Rep* 15:299-306.

Xu C, Ma H, Inesi G, Al-Shawi MK, Toyoshima C (2004). Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca^{2+} ATPase SERCA. *Journal of Biological Chemistry* 279:17973-79.

Xu C, Rice WJ, He W, Stokes DL (2002). A structural model for the catalytic cycle of Ca^{2+} -ATPase. *J Mol Biol* 316:201-11.