



**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**

---

---

**INSTITUTO EN CIENCIAS DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**“Regulación epigenética de las enzimas SERCA2 y SERCA3  
en células de carcinoma hepatocelular”**

**TESIS**

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en  
Ciencias de la Salud

PRESENTA:

**M. en C. Andrés Hernández Oliveras**

Director de tesis:

**Dr. Juan Santiago García**

**LGAC: Estudio de las bases moleculares y celulares de la enfermedad**



Universidad Veracruzana

### ACTA DE EXAMEN CERRADO

ACTA NÚMERO DIECIOCHO . En la Ciudad de Xalapa-Enríquez, Veracruz, México siendo las 10-00 horas con — minutos del día 15 del mes de agosto de dos mil diecinueve, reunido el comité tutorial en la sala de juntas del Instituto de Ciencias de la Salud conformado éste por: Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba, Dr. Enrique Juárez Aguilar, Dra. Rebeca García Román, Dr. Ángel Zarain Herzberg y Dr. Roberto Zenteno Cuevas. Se procedió a examinar al C. **Andrés Hernández Oliveras** alumno de la generación 2016-2019 y con matrícula S16017370, quien presentó la tesis titulada: "**Regulación epigenética de las enzimas SERCA2 Y SERCA3 en células de carcinoma hepatocelular**", como requisito para la presentación del examen abierto, dentro del programa del **Doctorado en Ciencias de la Salud**. Acto seguido el comité deliberó en privado y, una vez hecho esto, se procedió a hacer la votación acerca del resultado, habiéndose determinado por unanimidad que el C. **Andrés Hernández Oliveras** obtuvo la aprobación para la impresión de la tesis y la presentación del examen abierto, para la defensa de la misma. Posteriormente el comité en pleno procedió a notificar al alumno los resultados del examen cerrado, con las siguientes observaciones:

Atender observaciones generadas,  
enriquecer la discusión de la tesis, con  
énfasis en los fundamentos

Firmado para constancia los que en el intervinieron, siendo las 12 horas con 00 minutos del día antes mencionado.

Comité Tutorial

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Enrique Juárez Aguilar

  
 \_\_\_\_\_  
 Dra. Rebeca García Román

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Ángel Zarain Herzberg

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Roberto Zenteno Cuevas

## **FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo de tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Juan Santiago García, en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas, de la Universidad Veracruzana y en el laboratorio del Dr. Ángel Zarain Herzberg, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Financiado por el donativo 2015-01-1518 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Dr. Juan Santiago García y el donativo IN217216 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM), otorgado al Dr. Ángel Zarain Herzberg. Adicionalmente, el M. en C. Andrés Hernández Oliveras tuvo el apoyo de la beca doctoral No. 443164 por parte del CONACyT.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Juan Santiago García, por todos estos años que he tenido el gusto y el honor de ser su alumno, gracias por todo lo aprendido. Al Dr. Ángel Zarain Herzberg, por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyar en gran medida a que este proyecto concluyera. A mi comité tutorial, que me acompañó y aportó ideas a este proyecto desde hace 5 años cuando inicié mi tesis de maestría. A mi familia y a mi novia Ivonne, quienes siempre han sido un gran apoyo en mi desarrollo profesional y personal.

## RESUMEN

La expresión de las ATPasas- $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) se encuentra disminuida o ausente en muestras y líneas celulares de cáncer; sin embargo, su expresión y regulación en carcinoma hepatocelular (CHC) es desconocida. Líneas celulares de cáncer de mama y gástrico tratadas con inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) incrementan la expresión del ARNm de SERCA3, a través del aumento en la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) y el reclutamiento de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 en su promotor. Por otro lado, el tratamiento con un inhibidor de las ADN metiltransferasas (DNMTi) incrementa la expresión de SERCA2 en líneas celulares de cáncer oral. Sin embargo, a pesar de la evidencia, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de SERCA2 y SERCA3 mediada por HDACi y DNMTi no son del todo claro.

Los resultados de la presente tesis muestran que la expresión de SERCA3 está disminuida en muestras de cáncer hepatocelular (CHC) en humanos y en células AS-30D de CHC de rata, en comparación con hígado normal. Pacientes con CHC con alta expresión de SERCA3 sobreviven más tiempo que los pacientes con baja expresión. Por otro lado, el butirato de sodio (NaB) y la tricostatina A (TSA) incrementan la expresión del ARNm y proteína de SERCA3 en células AS-30D, mientras que la expresión de SERCA2 no mostró cambios significativos. El NaB y la TSA incrementan la acetilación de H3K9 y H3K27 en dos regiones del promotor de SERCA3. Además, el NaB promueve la presencia de los factores de transcripción Sp1 y Sp3, mientras que TSA aumenta el reclutamiento de p300, en el promotor de SERCA3. La inhibición específica de p300 con C646, reduce la expresión basal de SERCA3 en un 70% y mitiga el efecto de la TSA en la expresión de SERCA3, así como en la acetilación de H3K9, sugiriendo que, en células AS-30D, p300 es importante en la expresión de SERCA3. Por otro lado, se encontró que el promotor de SERCA3 está hipermetilado en células AS-30D, en comparación con hígado control. Sin embargo, el tratamiento con 5-Azacidina (un DNMTi), incrementa la expresión de SERCA3, sin cambios en la metilación de su promotor.

El estudio de las alteraciones epigenéticas en CHC puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Particularmente, los resultados presentados en este trabajo sugieren que los tratamientos con HDACi y DNMTi pueden ser una excelente alternativa en la activación de genes como SERCA3, que se encuentran disminuidos en CHC.

### **PALABRAS CLAVE**

SERCA3, remodelación de la cromatina, cáncer de hígado, butirato de sodio, tricostatina A

## ABSTRACT

Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (SERCA) expression is reduced or absent in several types of cancer and cancer cell lines; however, their expression and regulation in hepatocellular carcinoma (HCC) are unknown. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) increase SERCA3 mRNA expression in gastric and breast cancer cell lines by increasing H3K9ac and binding of Sp1 and Sp3 transcription factors to the promoter. On the other hand, DNA methyltransferase inhibitor (DNMTi) treatment upregulates SERCA2 mRNA expression in oral cancer cell lines. However, despite the evidence, the molecular mechanisms involved in HDACi and DNMTi mediated SERCA2 and SERCA3 expression is not fully understood.

The results show that *ATP2A3* (SERCA3) gene expression is decreased in human HCC samples and rat HCC AS-30D cells, compared to normal liver; and HCC patients with high expression of *ATP2A3* had longer overall survival compared to those with low expression. Sodium butyrate (NaB) and trichostatin A (TSA) increase SERCA3 mRNA and protein expression in AS-30D cells, whereas SERCA2b mRNA expression did not change. NaB and TSA increase H3K9ac and H3K27ac in two *ATP2A3* promoter regions. Besides, NaB treated cells increased Sp1 and Sp3 occupancy at *ATP2A3* promoter; whereas TSA treated cells showed increased p300 levels at *ATP2A3* promoter. Inhibition of p300 by C646, a specific inhibitor, mitigates SERCA3 mRNA induction by TSA, and reduces more than 70 % of basal SERCA3 mRNA expression, suggesting that p300 is important for *ATP2A3* gene transcription in AS-30D cells. Moreover, inhibition of p300 decreases H3K9ac in TSA treated cells. On the other hand, we found that *ATP2A3* promoter is heavily methylated in AS-30D cells compared to normal liver. However, 5-Azacytidine (a DNMTi) has no effect in DNA methylation status of the *ATP2A3* promoter; although it increased SERCA3 mRNA expression.

The understanding of epigenetic changes in HCC could contribute to the development of new therapies, and our data suggest that HDACi and DNMTi could

be an excellent alternative to reactivate some downregulated genes in HCC, such as *ATP2A3*.

**KEYWORDS**

SERCA3, chromatin remodeling, liver cancer, sodium butyrate, trichostatin A



## **ABREVIATURAS**

5-Aza: 5-Azacitidina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Ca<sup>2+</sup>: Ión calcio

CHC: Carcinoma hepatocelular

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina

CpG: dinucleótido de citocina y guanina

DNMT: ADN metiltransferasa

DNMTi: Inhibidor de ADN metiltransferasa

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory

H3K9ac: acetilación en lisina 9 de la histona H3

H3K27ac: acetilación en lisina 27 de la histona H3

HAT: Acetil transferasa de histonas

HDAC: Desacetilasa de histonas

HDACi: Inhibidor de desacetilasa de histonas

NaB: Butirato de sodio

OMS: Organización mundial de la salud

RE: Retículo sarco(endo)plásmico

SERCA: ATPasas-Ca<sup>2+</sup> del retículo sarco(endo)plásmico

TCGA: The Cancer Genome Atlas

Tg: Tapsigargina

TSA: Tricostatina A

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1    Cáncer de hígado .....	2
2.2    Ión calcio y proliferación celular .....	3
2.3    Las enzimas SERCA .....	6
2.4    Las enzimas SERCA y cáncer .....	9
2.5    Regulación epigenética de las enzimas SERCA .....	10
2.6    Mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica .....	11
3. JUSTIFICACIÓN .....	13
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	14
5. HIPÓTESIS.....	14
6. OBJETIVOS .....	15
6.1    Objetivo general .....	15
6.2    Objetivos particulares .....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
7.1    Análisis de la expresión de SERCA2 y SERCA3 a partir de los datos reportados en las bases Oncomine y KMplot .....	15
7.2    Cultivo celular .....	16
7.3    Tratamiento de las células AS-30D con inhibidores de desacetilasas de histonas y 5'-Aza.....	16
7.4    Purificación de ARN total.....	17
7.5    Reacciones de transcripción reversa, PCR tiempo real y PCR punto final..	17
7.6    Análisis de metilación de los promotores de los genes ATP2A2 y ATP2A3.	19
7.7    Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	20
7.8    Actividad acetil transferasa de histonas (HAT).....	21
7.9    Actividad ADN metil-transferasas (DNMT).....	22
7.10    Inmunodetección de SERCA2 y SERCA3 por Western-blot.....	22
7.11    Análisis estadístico.....	22
8. RESULTADOS.....	23

8.1	La expresión de <i>ATP2A3</i> disminuye en muestras de carcinoma hepatocelular de humano y su expresión correlaciona con una mayor supervivencia .....	23
8.2	El promotor del gen <i>ATP2A3</i> se encuentra hipermetilado en las células AS-30D. 29	
8.3	La 5-azacitidina induce la expresión del ARNm de <i>SERCA3</i> , disminuye la actividad DNMT, pero no modifica la metilación de la región -500 a -150 del promotor del gen <i>ATP2A3</i> . .....	30
8.4	El tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas induce la expresión de <i>SERCA3</i> . .....	33
8.5	Curso temporal de expresión de <i>SERCA3</i> en respuesta al tratamiento con NaB o TSA.....	35
8.6	El NaB y la TSA incrementan la actividad acetil transferasa de histonas en células AS-30D .....	38
8.7	El tratamiento con NaB y TSA incrementa la acetilación de la histona 3 en el promotor proximal del gen <i>ATP2A3</i> .....	38
8.8	El NaB incrementa la unión de Sp1 y Sp3 en el promotor proximal del gen <i>ATP2A3</i> .....	39
8.9	p300 es importante en la expresión basal y mediada por TSA de <i>SERCA3</i> . 40	
8.10	La inhibición de p300 mitiga la acetilación de lisina 9 de la histona H3 mediada por TSA, en el promotor del gen <i>ATP2A3</i> .....	42
9.	DISCUSIÓN.....	43
10.	CONCLUSIONES.....	53
11.	PERSPECTIVAS .....	54
12.	REFERENCIAS .....	55
13.	ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	64
14.	ANEXOS.....	66
14.1	Anexo 1. El tratamiento con NaB y TSA modula el manejo de Ca <sup>2+</sup> en células AS-30D.....	66
14.2	Anexo 2. El tratamiento con NaB o TSA no modifica la metilación del promotor del gen <i>ATP2A3</i> . .....	68
14.3	Anexo 3. Artículo científico de los resultados de tesis doctoral .....	69

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de hígado es una enfermedad neoplásica que afecta a una gran parte de la población mundial. En 2018 se reportaron 841,080 casos nuevos y 781,631 defunciones, convirtiéndole en la cuarta causa de muerte por cáncer. En nuestro país, ocupa el 4° lugar de defunciones por cáncer, siendo un grave problema de salud. Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, como infecciones por virus de hepatitis B o C, esteatosis hepática, cirrosis, alcoholismo, entre otras; sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de esta enfermedad son poco conocidos.

Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  es un mensajero celular universal que regula diversos procesos como son la señalización intracelular, ciclo celular, expresión génica, apoptosis, entre otros. Una regulación aberrante de los procesos celulares regulados por el  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser un factor para el desarrollo de diversas enfermedades, como el cáncer. Las enzimas SERCA o bombas de calcio del retículo endoplásmico, juegan un papel importante en este proceso. Se ha demostrado que ratones mutantes con una copia funcional del gen *ATP2A2*, que codifica para SERCA2, desarrollan tumores en la cavidad oral y tracto digestivo. También se ha encontrado que la expresión de SERCA2 y SERCA3 está disminuida o ausente en algunos tipos de cáncer y líneas celulares tumorales; además, la expresión de estas enzimas está regulada por diferentes mecanismos epigenéticos como la metilación de promotor y acetilación/des-acetilación de histonas. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la expresión de los ARNm y proteínas SERCA2 y SERCA3 está disminuida en el carcinoma hepatocelular (CHC) AS-30D en comparación con el hígado normal de rata, lo que podría sugerir una posible alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de estas enzimas en CHC son desconocidos. Así mismo, se desconoce si su expresión está alterada en muestras de HCC en humanos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer de hígado

El cáncer de hígado es una enfermedad neoplásica que se caracteriza por una proliferación descontrolada de las células hepáticas. En el 2018, a nivel mundial se reportaron 841,080 nuevos casos de cáncer de hígado y 781,631 defunciones por este cáncer en el mundo y el número de casos aumenta cada año. Se caracteriza por tener un índice de incidencia/defunción de 0.93, convirtiéndolo en la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo (GLOBOCAN, 2018). Para el mismo año, en nuestro país se reportó una incidencia de 7,265 casos nuevos y 6,868 defunciones por cáncer de hígado, con lo que ocupa el 4º lugar en defunciones por cáncer (GLOBOCAN, 2018), lo que representa un grave problema de salud.

Se han descrito varios factores de riesgo para esta enfermedad, entre los que destacan: infecciones por virus de hepatitis B o C, enfermedad de hígado graso no alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica, cirrosis, alcoholismo, enfermedades autoinmunitarias del hígado (Carr, 2012). Además, existen factores externos como la alimentación, obesidad, consumo de aflatoxinas y otras (Carr, 2012). También se ha demostrado que existen alteraciones y/o mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes, las cuales se relacionan, en parte, con el desarrollo del cáncer de hígado como son: *TP53* (Puisieux y Ozturk, 1997; Ozen *et al.*, 2013), *Smad2* y *Smad4* (Yakicier *et al.*, 1999; Kawate *et al.*, 1999), *p16INK4* (Kita *et al.*, 1996; Chaubert *et al.*, 1997), *M6P/IGF2R* (De Souza *et al.*, 1995), *Ciclina D1* (Nishida *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993), *p53* (Bressac *et al.*, 1993; Ozen *et al.*, 2013; Murakami *et al.*, 1991), por mencionar algunos.

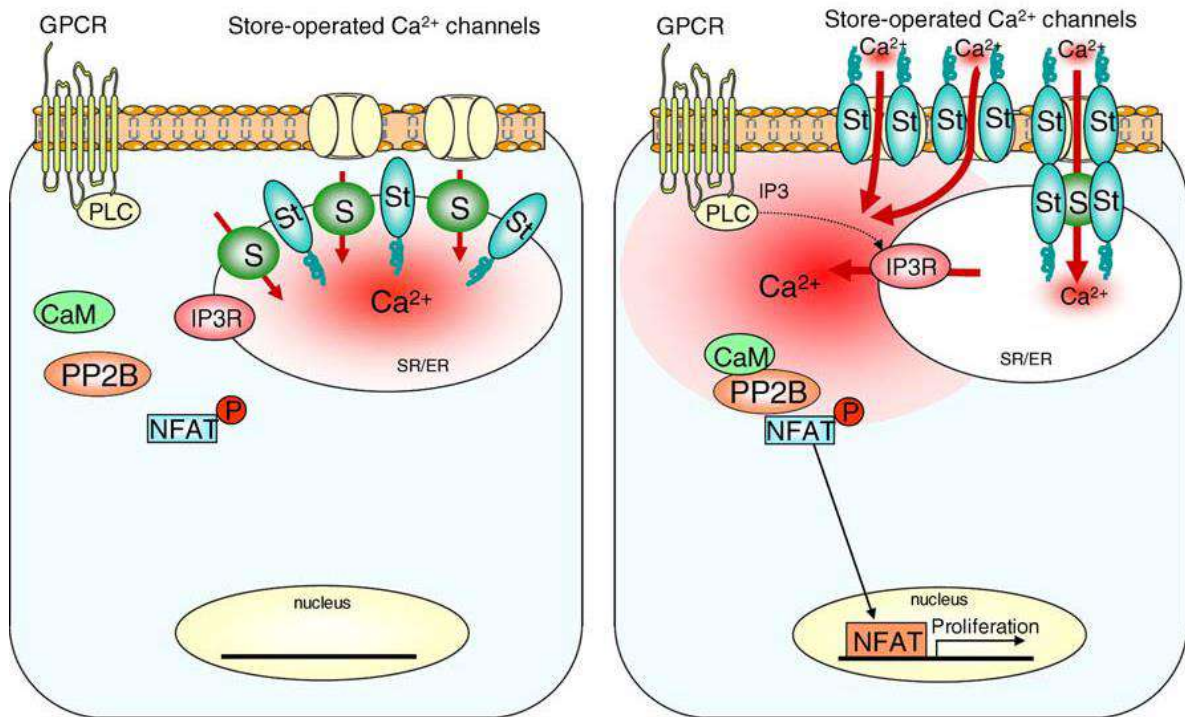
Estos tumores suelen ser resistentes a quimioterapias y radioterapias (Ozen *et al.*, 2013) y en la actualidad el tratamiento más eficiente para el cáncer de hígado es el trasplante de hígado (si se detecta a tiempo). Sin embargo, estos procedimientos no tienen un gran efecto en la disminución de la tasa de mortalidad por cáncer de hígado, por lo que conocer los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de este tipo de cáncer cobra gran interés.

## 2.2 Ión calcio y proliferación celular

Uno de los principales mecanismos alterados en el cáncer es la proliferación celular, la cual es regulada por diferentes factores, como el calcio celular; sin embargo, los procesos que relacionan la homeostasis del ión calcio con el desarrollo y proliferación del cáncer no son del todo claros. Por lo tanto, conocer los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de este tipo de cáncer es relevante.

El ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un segundo mensajero que regula una gran cantidad de procesos celulares en los hepatocitos, los cuales van desde la secreción de bilis, metabolismo de la glucosa, hasta la transcripción, proliferación celular y apoptosis (Amaya y Nathanson, 2013). El  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un papel importante durante todo el ciclo celular, especialmente en la fase G1 y en las transiciones G1/S y G2/M. Cuando la célula pasa a través de las fases G1, G1/S y mitosis, existen cambios en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  es requerido para activar a genes de expresión temprana como *FOS*, *JUN* y *MYC*, y para la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Roderick y Coock 2008; Takuwa *et al.*, 1993). Uno de los mecanismos más importantes que regula el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico es la activación de la calcineurina, la cual es una fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, cuya función es la desfosforilación de algunas proteínas, una de ellas es el factor de transcripción NFAT (Lipskaia y Lompre, 2004; Lipskaia *et al.*, 2009). NFAT es un mediador de la proliferación celular en casi todos los tipos celulares debido a que, en su estado desfosforilado, migra hacia el núcleo uniéndose al promotor de diversos genes que regulan el ciclo celular (Figura 1) (Lipskaia y Lompre, 2004; Lipskaia *et al.*, 2009). Este tipo de mecanismo de activación por  $\text{Ca}^{2+}$  se tiene que dar en condiciones específicas ( $\text{Ca}^{2+}$  citosólico alto sostenido por 1-2 horas) para la activación de la calcineurina (Lipskaia y Lompre, 2004; Lipskaia *et al.*, 2009). Diversos factores están involucrados para generar este tipo de señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico, incluyendo al IP3, el receptor de IP3 y canal de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, canales de calcio de la membrana plasmática operados por la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y las enzimas SERCA que controlan la recaptura del

Ca<sup>2+</sup> al lumen del retículo endoplásmico, y con ello la amplitud y propagación de la señal de Ca<sup>2+</sup> (Lipskaia *et al.*, 2009).



**Figura 1. Representación de la regulación de la proliferación celular mediada por Ca<sup>2+</sup>.** Panel izquierdo: célula quiescente. Panel derecho: célula proliferante. CaM: Calmodulina, GPCR: Receptor acoplado a proteína G, PLC: Fosfolipasa C, PP2B: Calcineurina, NFAT: Factor nuclear de linfocitos T activados, P: fosfato, IP3: Inositol tri-fosfato, IP3R: Receptor de inositol tri-fosfato, S: SERCA, SR/ER: retículo sarco(endo)plásmico, St: STIM1 (Tomado de Lipskaia *et al.*, 2009).

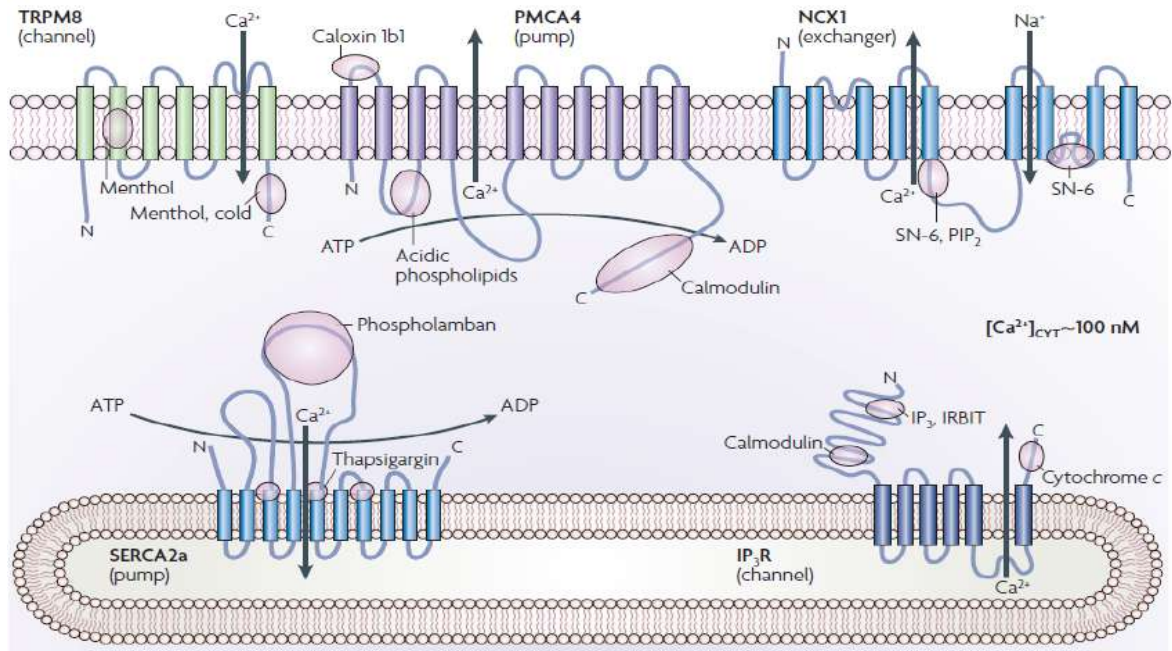
Los mecanismos celulares regulados por el calcio se activan en respuesta a señales extracelulares como factores de crecimiento o mitógenos, e intracelulares como la producción de inositol-3-fosfato, los cuales inducen la liberación de iones Ca<sup>2+</sup> del lumen del retículo endoplásmico al citosol y la entrada masiva de Ca<sup>2+</sup> del espacio extracelular hacia el citoplasma a través de canales de Ca<sup>2+</sup> presentes en la membrana plasmática y del retículo sarco(endo)plásmico (Lipskaia *et al.*, 2009).

Después de que el Ca<sup>2+</sup> ha llevado a cabo sus funciones de señalización, la célula no puede permanecer en estado activado por mucho tiempo, ya que la elevación sostenida de Ca<sup>2+</sup> es dañina y puede afectar de manera descontrolada la expresión de diversos genes, así como la estructura, proliferación y muerte celular, o conducir

a carcinogénesis (MacLennan, 2000; Berridge *et al.*, 2000; 2003; Roderik y Cook 2008). La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  celular es orquestada por proteínas ancladas en la membrana plasmática y del retículo endoplásmico. Se conocen cuatro grandes grupos de proteínas que participan directamente en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  celular: canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , ATPasas o bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , proteínas intercambiadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  y las proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 2). Las concentraciones basales de  $\text{Ca}^{2+}$  se reestablecen por la actividad de las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA) y del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) que transportan  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma hacia el exterior de la célula y hacia el lumen del retículo sarco(endo)plásmico, respectivamente, utilizando como fuente de energía la hidrólisis del ATP (Contreras-Leal *et al.*, 2010). Las enzimas SERCA remueven aproximadamente el 90% del  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que las enzimas PMCA remueven cerca del 10% de  $\text{Ca}^{2+}$  aproximadamente (MacLennan *et al.*, 1985). Las células excitables (musculares y neuronas) disponen también de intercambiadores iónicos como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  o el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$  en su membrana plasmática, que transportan  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular cuando su concentración citoplásmica se ha elevado (Contreras-Leal *et al.*, 2010). En algunas enfermedades, la señal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se altera, manteniendo activadas algunas vías de señalización, que a su vez activan o reprimen la transcripción de ciertos genes que promueven la proliferación celular.

En años recientes se ha acumulado evidencia indicando que las células tumorales o cancerosas remodelan la actividad o expresión de los componentes de su maquinaria de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 1) (Roderick y Coock 2008; Monteith *et al.*, 2007).





**Figura 2. Homeostasis del Ca<sup>2+</sup> celular.** La homeostasis del calcio celular es orquestada por proteínas ancladas en la membrana plasmática y en la membrana del retículo sarco(endo)plásmico. TRPM: Canal iónico receptor de potencial transitorio, PMCA: bomba de calcio de la membrana plasmática, NCX: intercambiador iónico de sodio-calcio, SERCA: bomba de calcio del retículo sarco(endo)plásmico, IP<sub>3</sub>R: receptor de inositol-3-fosfato (Tomado de Monteith *et al.*, 2007)

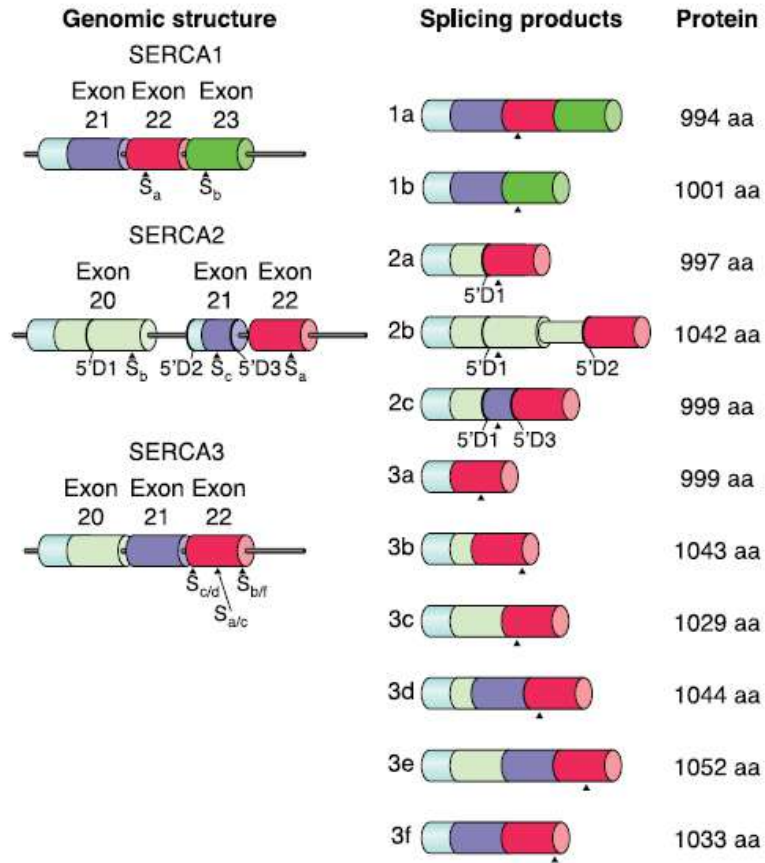
### 2.3 Las enzimas SERCA

Las proteínas encargadas de transportar el Ca<sup>2+</sup> del citoplasma hacia el interior del retículo endoplásmico se conocen como ATPasas-Ca<sup>2+</sup> del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA). Estas enzimas, junto con el canal de Ca<sup>2+</sup> o receptor de inositol-1,4,5-trifosfatado (IP<sub>3</sub>R) y el receptor de rianodina (RyR), mantienen el equilibrio del Ca<sup>2+</sup> en el retículo endoplásmico. Las enzimas SERCA son proteínas formadas por una sola cadena de aminoácidos (aproximadamente 1000), con una masa molecular aproximada de 110 kDa (Wuytack *et al.*, 2002). En los vertebrados se han descrito tres genes diferentes que codifican para las enzimas SERCA: *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, cuyos mensajeros dan origen a diversas isoformas a través de la edición alterna (Wuytack *et al.*, 2002; Brini y Carafoli, 2009). Estas isoformas pueden ser tejido-específico o expresarse de manera ubicua. La enzima SERCA1 presenta 2 isoformas: *a* y *b*, las cuales se expresan en músculo de

contracción rápida en adulto y neonatal, respectivamente. La enzima SERCA2 presenta 3 isoformas: *a*, se expresa en músculo cardiaco y esquelético; *b*, es ubicua y *c*, la cual se expresa en múltiples tejidos. Por otro lado, la enzima SERCA3 tiene 6 isoformas descritas en humanos y 2 en rata, las cuales se expresan en múltiples tipos celulares (Figura 3) (Brini y Carafoli, 2009; Martin *et al.*, 2002).

**Tabla 1. Canales y bombas de Ca<sup>2+</sup> cuya expresión se encuentra alterada en diferentes tipos de cáncer.**

Canal o Bomba	Tipo de cáncer	Alteraciones en cáncer			Referencia
		ARNm	Proteína	Actividad	
IP <sub>3</sub> R2	Pulmón	↑	N/D	N/D	Ji <i>et al.</i> , 2005
IP <sub>3</sub> R3	Gástrico	↑	↑	N/D	Sakura <i>et al.</i> , 2003
RyR1	Timo	↓	N/D	N/D	Kusner <i>et al.</i> , 1998
PMCA1	Piel, pulmón, oral y mama	↓	↓	N/D	Saito <i>et al.</i> , 2006; Reisner <i>et al.</i> , 1997
PMCA2	Mama	↑	N/D	N/D	Lee <i>et al.</i> , 2005
PMCA4	Piel	↓	N/D	N/D	Reisner <i>et al.</i> , 1997
SERCA2	Oral	↓	↓	N/D	Endo <i>et al.</i> , 2004
	Colon, pulmón	↓	N/D	N/D	Korosec <i>et al.</i> , 2006
	Tiroides	↓	↓	↓	Pacifico <i>et al.</i> , 2003
SERCA3	Colon, mama, gástrico, pulmón, plexos coroideos	N/D	↓	N/D	Gelebart <i>et al.</i> , 2002; Brouland <i>et al.</i> , 2005; Papp y Brouland, 2011; Arbabian <i>et al.</i> , 2012; Ait-Ghezali <i>et al.</i> , 2014



**Figura 3. Edición alterna de los mensajeros de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*.** Los exones se representan en cilindros de colores, las líneas representan intrones. 5'D1, 5'D2 y 5'D3 representa el sitio donador opcional de edición alterna para SERCA2a, SERCA2b y SERCA2c respectivamente. S<sub>a-f</sub> indica la posición de los diferentes codones de paro para cada isoforma. Los productos de las proteínas se representan del lado derecho de la figura (Tomado de Brini y Carafoli, 2009).

A pesar de que todas las isoformas de las enzimas SERCA bombean Ca<sup>2+</sup> del citoplasma al lumen del retículo sarco(endo)plásmico, difieren en sus parámetros bioquímicos. La principal diferencia radica en la afinidad y capacidad de transporte de Ca<sup>2+</sup>. SERCA2b tiene mayor afinidad por Ca<sup>2+</sup> pero menor velocidad catalítica que SERCA2a; mientras que SERCA3 tiene menor afinidad por Ca<sup>2+</sup> que la enzima SERCA2b, pero mayor capacidad de transporte de Ca<sup>2+</sup>. Tanto las enzimas SERCA1 como SERCA3 poseen una mayor velocidad catalítica que las enzimas SERCA2 (Lytton *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 2000). Se sabe que estas enzimas son

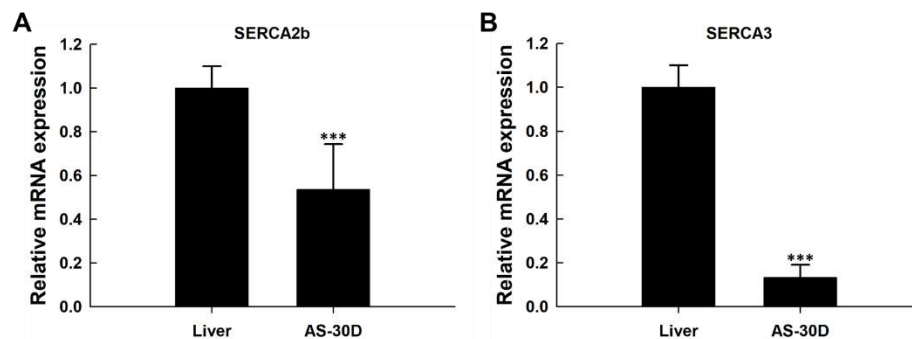
muy importantes en la homeostasis del calcio celular, ya que remueven cerca del 90% del calcio citoplásmico.

## **2.4 Las enzimas SERCA y cáncer**

De manera indirecta, se ha demostrado una posible relación entre las enzimas SERCA y el cáncer mediante experimentos realizados con taspigargina (Tg) un inhibidor específico de las enzimas SERCA. Hakii et al (1986) demostraron que Tg promueve la formación de tumores en piel de ratón. Por otro lado, se sabe que Tg induce la activación de Raf-1 y MAP, los cuales son parte de vías de señalización celular relacionadas con cáncer (Chao *et al.*, 1997). La primera evidencia directa de la posible relación de las enzimas SERCA y el desarrollo del cáncer se dio por Liu *et al.*, (2001) quienes demostraron que los ratones mutantes con una copia funcional del gen *ATP2A2* (SERCA2) desarrollan cáncer en células escamosas de estómago, esófago, mucosa oral, lengua y piel. A partir de estos estudios se despertó el interés por caracterizar la expresión y posible papel de las enzimas SERCA en el desarrollo del cáncer. Diversas investigaciones indican que la expresión del ARNm y de la proteína de algunas isoformas de las enzimas SERCA2 y SERCA3 se encuentra disminuida o ausente en diferentes tipos de cáncer y líneas celulares tumorales (Tabla 1). De manera particular la expresión de SERCA2 se encuentra disminuida en cáncer oral y cáncer de pulmón en humanos y en células tiroideas transformadas de rata (Endo *et al.*, 2004; Bergner *et al.*, 2009; Pacifico *et al.*, 2003). Por su parte, la expresión de SERCA3 está disminuida en cáncer de colon, estómago, mama, pulmón y plexos coroideos (Gélébart *et al* 2002; Brouland *et al* 2005; Papp y Brouland 2011; Arbabian *et al.* 2012; Ait-Ghezali *et al.*, 2014). También se ha demostrado que el grado de pérdida de expresión de SERCA3 correlaciona con el grado de avance del tumor y pérdida de la diferenciación celular, tanto en tumores benignos como malignos. Su expresión es casi ausente en etapas avanzadas de los tumores. Por lo que se ha sugerido que la expresión de SERCA3 se podría comportar como un marcador de diferenciación celular en varios tipos de cáncer (Brouland *et al.* 2005; Papp y Brouland 2011; Ait-Ghezali *et al.*, 2014). Sin embargo,

los mecanismos que pudieran estar alterando la expresión de las enzimas SERCA en células cancerígenas no son del todo claros.

Resultados recientes de nuestro laboratorio mostraron que la expresión del ARNm de las enzimas SERCA2b y SERCA3 se encuentran disminuida en células de CHC de rata AS-30D, en comparación con hígado de ratas control (Figura 4), sin embargo, la expresión de estas enzimas en muestras de pacientes con CHC, así como su regulación transcripcional en dicho tipo de cáncer son desconocidos.



**Figura 4. La expresión de los ARNm de SERCA2b y SERCA3 está disminuida en células de CHC de rata AS-30D. \*\*\* $p < 0.001$ , Tomado de Hernández-Oliveras *et al.*, 2019.**

## 2.5 Regulación epigenética de las enzimas SERCA

Se han descrito diversos mecanismos que regulan la expresión de los ARNm para SERCA2 y SERCA3 en células tumorales. De manera particular se observó que los promotores de diversas muestras de cáncer oral estaban hipermetilados y que el tratamiento de líneas celulares de estos tumores (células escamosas de cáncer oral) con 5-aza-2'-dC induce la expresión de SERCA2 en líneas celulares de cáncer oral (Endo *et al.*, 2004), sugiriendo que la disminución de la expresión de SERCA2 es parcialmente ocasionada por la metilación del promotor del gen *ATP2A2*.

También se ha demostrado que la expresión de SERCA3 se puede inducir después de un tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas en líneas celulares de cáncer de colon, mama, gástrico, pulmón (Gelebart *et al.*, 2002; Papp y Brouland, 2011; Arbabian *et al.*, 2013; Contreras-Leal *et al.*, 2015; Flores-Peredo *et al.* 2017). Al inducir la expresión de SERCA3 se obtiene un fenotipo diferenciado en líneas

celulares de cáncer gástrico y colon (Gelebart *et al.*, 2002). Sin embargo, en cáncer de hígado se desconoce el papel que tienen la metilación del ADN y la acetilación/desacetilación de histonas en la expresión de las enzimas SERCA.

Por otro lado, se han descrito algunos microARN's (miR's) como posibles candidatos reguladores de la expresión de las enzimas SERCA2 (Bostjancic *et al.*, 2012), sin embargo, la mayoría de estos posibles candidatos se han propuesto mediante análisis *in silico*. Únicamente existe información sobre tres microARN's como posibles reguladores de la expresión de la enzima SERCA2a: El primero de ellos es miR-25, el cual regula la expresión de SERCA2a en un modelo murino de insuficiencia cardiaca (Walhquist *et al.*, 2014). Esto se demostró mediante un vector que contenía la secuencia 3'-UTR de SERCA2a unida a una secuencia codificante para proteína verde fluorescente y se encontró que miR-25 se une a la región 3'-UTR de SERCA2a y regula su traducción. El segundo microARN descrito fue miR-151-3p como regulador de la expresión de SERCA2a en células de músculo esquelético, lo cual se demostró con un ensayo de luciferasa (Wei *et al.*, 2014), en donde se observó que este microARN regula directamente la expresión de SERCA2a, uniéndose a la región 3'-UTR, disminuyendo su expresión en células musculares. Finalmente, el tercer microARN con una posible actividad regulatoria sobre SERCA2a es miR-214, cuya expresión demostró tener una correlación negativa respecto a la proteína de SERCA2a en un modelo murino de infarto de miocardio, sin embargo, esta relación no fue demostrada por experimentos de luciferasa o proteína verde fluorescente (Soares-Melo *et al.*, 2015). Por otro lado, no existe evidencia sobre la regulación de SERCA3 mediante microARN's. Además, no hay información sobre la regulación de microARN's en la expresión de las enzimas SERCA2 y SERCA3 en cáncer.

## **2.6 Mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica**

Los mecanismos epigenéticos son todos aquellos procesos que regulan la expresión génica sin alterar la secuencia de ADN, entre los que se encuentran: metilación de ADN, modificación de histonas y los miR's (Huang *et al.*, 2011). La metilación de ADN es la adición de un grupo metilo a un nucleótido del ADN, que

en la mayoría de los casos es citosina en secuencias CpG; este proceso es orquestado por un grupo de enzimas denominadas ADN-metil transferasas (Huang *et al.*, 2011). La adición de un grupo metilo al ADN puede tener un papel importante en la expresión de un gen y se puede dar de dos formas: directa, cuando el cromosoma se encuentra metilado, se estabiliza y no permite que la transcriptasa sintetice ARNm; o indirecta, cuando proteínas de unión a grupos metilo (MBD) y desacetilasas de histonas son reclutadas a la región metilada, impidiendo la unión de factores de transcripción, favoreciendo el compactamiento de la cromatina (Li *et al.*, 2012).

Por otro lado, la modificación de histonas es un mecanismo que también regula la expresión génica y se da por acetilación, desacetilación, metilación, ubiquitinación o fosforilación de estas proteínas (Davis y Brachmann, 2003). Uno de los mecanismos más importantes dentro de la modificación de histonas es la acetilación de residuos de lisina y la desacetilación de los mismos. Este mecanismo es orquestado por dos grupos de proteínas, las que transfieren el grupo acetilo o acetil-transferasas de histonas, y las proteínas encargadas de remover el grupo acetilo o desacetilasas de histonas. La acetilación de histonas favorece un estado abierto o relajado de la cromatina, induciendo la transcripción; mientras que la desacetilación de histonas compacta la cromatina inhibiendo la expresión génica (Davis y Brachmann, 2003; Wang *et al.*, 2009).

Por su parte, los miR's son una familia de ARN's no codificantes de una longitud de 20-25 nucleótidos en su forma madura, que se transcriben a partir de secuencias génicas que no codifican para ninguna proteína. Estas secuencias génicas contienen la región del miR y una secuencia complementaria a la anterior. Los miR's son codificados en genes que en un primer paso se transcriben a un ARN llamado pri-microARN, el cual contiene una 5'cap y una cola de poli adeninas en su extremo 3'. Este pri-microARN es procesado en el núcleo por las enzimas drosha y pasha para formar estructuras de 70 nucleótidos en forma de tallo-asa o "stem loop" conocidas como pre-microARN. El pre-microARN es transportado al citoplasma donde es procesado por la ribonucelasa dicer, formando los fragmentos de doble

cadena de 20-25 nucleótidos aproximadamente. Una vez procesado el pre-microARN, se selecciona una de las dos hebras y finalmente, esta hebra se une al extremo 3' no codificante del mensajero y forma un complejo con RISC, el cual se encarga de degradar a los ARNm correspondientes y con ello regular su traducción (Penna *et al.*, 2015). Se sabe que los miR's pueden fungir como supresores de tumores o como oncogenes, ya que regulan diferentes vías de señalización relacionadas con proliferación celular, apoptosis, metástasis y angiogénesis (Penna *et al.*, 2015).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En 2018 la OMS reportó 841,080 casos nuevos y 781,631 defunciones por cáncer de hígado en el mundo, sin embargo, estas cifras aumentan cada año. El cáncer de hígado se caracteriza por tener un índice de incidencia/defunción de 0.93, convirtiéndolo en la cuarta causa de muerte por cáncer y un serio problema de salud (GLOBOCAN, 2018). En el 2018, en nuestro país se reportó una incidencia de 7,265 casos nuevos y 6,868 defunciones por cáncer de hígado, con lo que ocupa el cuarto lugar en defunciones por cáncer (GLOBOCAN, 2018). Este tipo de cáncer suele ser resistente a los tratamientos utilizados en la actualidad y prácticamente la única opción "viable" es el trasplante de hígado, si su detección se hace en los primeros estadios de la enfermedad.

Se han descrito varios factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad neoplásica como son infecciones por virus de hepatitis B o C, alcoholismo, cirrosis, enfermedad de hígado graso, aflatoxinas, entre otras; sin embargo, los mecanismos moleculares que participan en el proceso de esta enfermedad son poco conocidos.

Por lo anterior, es importante estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y proliferación del cáncer de hígado, así como nuevas estrategias para el diagnóstico de cáncer de hígado. En específico, caracterizar los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de las enzimas SERCA y su papel en la homeostasis del calcio intracelular en células de hepatocarcinoma, debido a que se sabe que el calcio citoplásmico juega un papel importante en el ciclo celular y



analizar si hay alguna relación entre la progresión tumoral y la expresión de las enzimas.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La expresión de SERCA2 y principalmente SERCA3 está sumamente disminuida o ausente en diversos tipos de cáncer y líneas celulares de cáncer. En algunos tipos de cáncer se ha demostrado que la metilación del promotor de SERCA2 reprime su expresión, mientras que en otros tipos de células tumorales se ha encontrado que la acetilación/desacetilación de histonas regula la expresión de SERCA3. Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas incrementa el reclutamiento de factores de transcripción en el promotor de SERCA3. Recientemente en el laboratorio encontramos que la expresión de los ARNm para SERCA2b y SERCA3, así como de las proteínas SERCA2 y SERCA3 se encuentra disminuida en células AS-30D de CHC de rata en comparación con hígado control de rata. Además, observamos alteraciones en la relación de la expresión SERCA3/2, lo que pudiera ocasionar alteraciones en las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de estas enzimas en el CHC son desconocidos. Así mismo, se desconoce si su expresión está alterada en muestras de pacientes con CHC. Por lo anterior, se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

¿La expresión de las enzimas SERCA2 y SERCA3 está alterada en muestras de CHC de humano? ¿Su expresión está regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación de sus promotores o la acetilación de histonas en células de CHC?

#### **5. HIPÓTESIS**

La expresión de los ARNm de las enzimas SERCA2 y SERCA3 está regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN o acetilación de histonas en células de CHC.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

- Determinar si mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN o la acetilación de histonas regulan la expresión de las enzimas SERCA2 y SERCA3 en células de CHC.

### 6.2 Objetivos particulares

- 1) Analizar la expresión de SERCA2 y SERCA3 en bases de datos de CHC.
- 2) Determinar si el tratamiento con 5-Azacidina (5-Aza), un inhibidor de la metilación del ADN, estimula la expresión de SERCA2 y SERCA3.
- 3) Evaluar si el tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas estimulan la expresión de SERCA2 y SERCA3 en células del CHC AS-30D.
- 4) Evaluar si el tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas modifica el patrón de acetilación de los residuos 9 y 27 de lisina de la histona 3 (H3).
- 5) Analizar si el tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas modula el reclutamiento de los factores de transcripción Sp1 y Sp3, en el promotor proximal del gen *ATP2A3*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Análisis de la expresión de SERCA2 y SERCA3 a partir de los datos reportados en las bases Oncomine y KMplot

Los niveles de expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* (SERCA2 y SERCA3) en muestras de CHC e hígado normal de humano se analizaron a partir de las bases de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y de Roessler liver 2 (Roessler *et al.*, 2010) a través de la plataforma *Oncomine*. Para la cohorte de TCGA, como grupo externo se utilizaron 56 muestras de sangre de pacientes sanos, como grupo control se

consideraron 59 muestras de hígado normal y como grupo de interés 97 muestras de CHC. Los resultados se graficaron como unidades de  $\text{Log}_2$  del número de copias y los reporteros utilizados para el análisis fueron 12-109238347 y 17-003794201 para *ATP2A2* y *ATP2A3*, respectivamente. Para la cohorte de Roessler liver 2, como grupo control se utilizaron 220 muestras de hígado normal y como grupo de interés 225 muestras de CHC. Los resultados se graficaron como  $\text{Log}_2$  de la intensidad media centrada y los reporteros utilizados para el análisis fueron 213036\_x\_at y 212362\_at para *ATP2A2* y *ATP2A3* respectivamente.

Para determinar la relación entre los niveles de expresión de SERCA2 y SERCA3 con la supervivencia de pacientes con CHC, se accedió a la base de datos *KMplot* y se generaron gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier utilizando los datos disponibles de ARN-seq para pacientes con CHC. Las cohortes analizadas para SERCA2 se dividieron en dos grupos: alta expresión, con 147 pacientes y baja expresión, con 217 pacientes. De manera similar, las cohortes analizadas para SERCA3 se dividieron en dos grupos: alta expresión, con 257 pacientes y baja expresión, con 107 pacientes.

## **7.2 Cultivo celular**

Las células de CHC AS-30D se cultivaron en medio RPMI con alta glucosa, suplementado con suero fetal bovino 10%, penicilina-estreptomicina 1% y kanamicina 70 mg/l, a 37°C con 5% de aire y 95% de  $\text{CO}_2$ . Las células obtenidas del cultivo se utilizaron para los tratamientos con inhibidores de desacetilasas de histonas, 5-Aza, modificación con bisulfito de sodio y para la medición de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico, como se describe a continuación.

## **7.3 Tratamiento de las células AS-30D con inhibidores de desacetilasas de histonas y 5'-Aza.**

Las células AS-30D se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por pozo, 48 horas después se trataron con butirato de sodio (1, 2 o 3 mM) o tricostatina A (50, 100 o 150 nM) y las células se colectaron a las 12, 24, 48 o 72 horas después de iniciado el tratamiento. Por otro lado, las células AS-30D se

trataron con 5-Aza (inhibidor de ADN metil-transferasas) a una concentración de 1, 3 o 5  $\mu$ m, durante 96 horas.

#### **7.4 Purificación de ARN total**

A partir de células en cultivo: Las células se lavaron dos veces con PBS 1x, después se agregó 1 ml de Trizol a cada pozo y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A partir de hígado: las muestras de hígado normal se homogenizaron con 1 ml de Trizol. Posteriormente se agregó 0.2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y el ARN se separó del material celular, ADN y proteínas por centrifugación. Se recuperó la fase acuosa y el ARN se precipitó con isopropanol. La pastilla resultante se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en agua libre de ARNasas, de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Invitrogen, EUA). La concentración de ARN de cada una de las muestras se determinó a 260/280 nm en un espectro Nanodrop 1000 (ThermoScientific, EUA). La integridad de las muestras de ARN total se corroboró por medio de electroforesis en geles de formaldehído y agarosa al 1% (Judelson, 2002). Las muestras de ARN se separaron durante 120 minutos a 100V, después se visualizaron y se capturó la imagen con un sistema de foto-documentación GBL-1000 (Axygen, EUA).

#### **7.5 Reacciones de transcripción reversa, PCR tiempo real y PCR punto final**

Las reacciones de transcripción reversa (RT) se realizaron con 2.0  $\mu$ g de ARN total, 1  $\mu$ l de hexámeros al azar (60 nmol), 1  $\mu$ l de dNTPs (10 mM) y H<sub>2</sub>O libre de ARNasas para volumen total de 12.5  $\mu$ l; la mezcla se incubó a 65°C por 5 min y se enfriaron rápidamente en hielo. Posteriormente se agregó 4  $\mu$ l de buffer para RT, 2  $\mu$ l de DTT, 1  $\mu$ l de inhibidor de ARNasas, 0.5  $\mu$ l de transcriptasa reversa (200 unidades, Invitrogen, EUA) y se incubó a 37°C por 50 min, seguido de 70°C por 15 min para inactivar a la enzima. Al final de la síntesis se agregaron 20  $\mu$ l de agua libre de ARNasas y los tubos se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

Las reacciones de PCR de punto final se realizaron con la finalidad de determinar la especificidad de cada uno de los pares de primers que se emplearon en el estudio,

para lo cual se mezcló 1 µl de ADNc, 7.5 µl de mezcla 2x para PCR, 1 µl del par de primers correspondiente (Tabla 2) y 5.5 µl de H<sub>2</sub>O. Las condiciones de amplificación fueron: 3 min a 95°C, 35 o 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 1min, seguido de un paso a 72°C por 7 min, en un termociclador Perkin Elmer (MA, EUA). Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado, para lo cual se empleó 1µl de ADNc de cada muestra (equivalente a 50 ng de ARN), 6µl de mezcla 2x para PCR tiempo real (Bioline, EUA), que contiene Taq polimerasa, dNTPs, buffer con Mg<sup>2+</sup> y SYBRGreen, 0.5µl de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) específicos para cada uno de los genes y agua para un volumen final de 12 µl. Para cada una de las muestras también se incluyeron reacciones por triplicado con primers para β-actina que sirvieron como control interno para normalizar los datos. Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 60°C por 1 min, en un termociclador 7500 (Applied Biosystems, EUA). Los datos de PCR en tiempo real se analizaron por medio del programa LinReg y la expresión relativa de cada gen se normalizó con los valores obtenidos para β-Actina de acuerdo con el modelo matemático de Pfaffl (2001).

**Tabla 2. Secuencia de los primers para SERCA2b, SERCA3, β-actina, promotor proximal del gen ATP2A3 y el tamaño esperado de los productos.**

Primer	Secuencia	Producto amplificado
SERCA2bF SERCA2bR	ATCTGACCCAGTGGCTGATG CACAAAGGGCCAGGAAATG	182 pb
SERCA3F SERCA3R	TTCCGCTATTTGGCTATTGG GGAAGCGTGA CTCAAAGACC	184 pb
β-actinaF1 β-actinaR1	AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	201pb
pATP2A3 F1 pATP2A3 R1	ACCAAACCGACATCTGCAA TTCCCTCCTGTCCTACCAAA	161 pb
pATP2A3 F2 pATP2A3 R2	ACAGGAGGGAAGCATACTCG CAGTGGCTGTGGCAGTCC	180 pb
ATP2A3bis F2 ATP2A3bis R1	AGTGTATGAGGAGTGGGTAT TACTTCCCTCCTATCCTACC	350 pb

## **7.6 Análisis de metilación de los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*.**

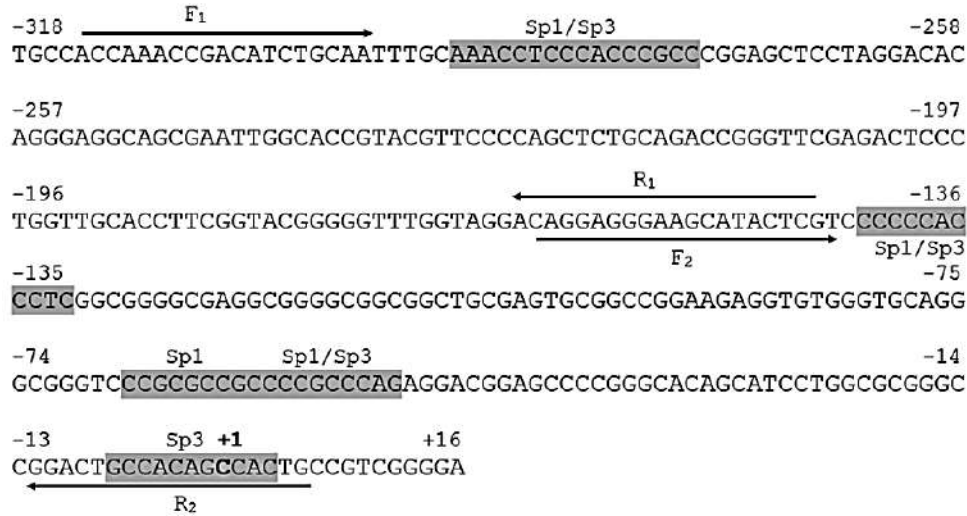
El análisis de la metilación de las citocinas en las islas CpG en los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* se realizó mediante la modificación de ADN con DNA Methylation-Direct (Zymo Research, CA, USA) y se realizó de acuerdo con las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. Las muestras obtenidas de hígado control y células AS-30D ( $1 \times 10^5$ ) se digirieron con proteinasa K (13µl buffer de digestión, 12µl de muestra, 1µl de Proteinasa K) por 20 minutos a 50°C. Posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 10,000 xg y del sobrenadante se tomó 20 µl, los cuales se mezclaron con 130 µl de “CT Conversión Reagent” en un tubo de PCR. Las muestras se colocaron en un termociclador y se aplicó el siguiente programa: 8 minutos a 98°C, 3.5 horas a 64°C y un paso final a 4°C. En seguida, las muestras se colocaron en columnas “Zymo-Spin™ IC” (pretratadas con 600 µl de buffer M-Binding) y se centrifugaron 30 segundos a 10,000 xg. La columna se lavó con buffer M-Wash por 30 segundos a velocidad máxima y después se agregó 200 µl de buffer a la columna para desulfonación y se incubó a temperatura ambiente por 15 o 20 minutos. Después se centrifugó por 30 segundos a máxima velocidad y se lavaron nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente, se agregó a la columna 10 µl de buffer de elución y la muestra se colectó en un tubo de 1.5 ml, centrifugando 30 segundos a máxima velocidad.

El ADN obtenido se sometió a PCR con primers específicos para la región promotora de los genes *ATP2A2* o *ATP2A3* (Tabla 2), para lo cual se utilizó 1µl de ADN modificado, 10µl de mezcla 2x para PCR, 1µl de primer sentido, 1µl primer anti sentido (Tabla 2) y 7µl de H<sub>2</sub>O, las condiciones de amplificación fueron: 4 min a 94°C, 45 ciclos de 94°C por 40 seg, 55-60°C (de acuerdo a cada par de primers) por 30 seg y 72°C por 1min, seguido de un paso a 72°C por 5 min, en un termociclador Perkin Elmer (MA, USA). Los fragmentos amplificados por PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% y las bandas que corresponden al tamaño de producto esperado se purificaron con el kit GeneClean (MP Biomedicals, Santa Ana, CI, USA). Posteriormente se clonaron en el vector pGEM T-easy (Promega,

WI, USA), y se transformaron células competentes DH5- $\alpha$ . Se recuperaron colonias independientes y se crecieron en medio LB líquido para purificar el plásmido. En seguida, se sometieron a digestión con EcoRI para determinar las clonas recombinantes y se procedió con la secuenciación de ADN. A partir de los resultados de secuenciación se determinó la posición de las citosinas metiladas.

### **7.7 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

Las células AS-30D tratadas con NaB 3 mM, TSA 100 nM por 24 horas o sin tratamiento (control), se sometieron a entrecruzamiento con formaldehído al 1% durante 20 minutos o 30 minutos. La reacción de entrecruzamiento se detuvo adicionando glicina 1.25 M. Las células se trataron con buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS 1% e inhibidores de proteasas) y se sometieron a 4 ciclos de sonicación para fragmentar la cromatina. Las reacciones de inmunoprecipitación se realizaron con 1 mg de cromatina sonicada y 2  $\mu$ g de cada anticuerpo específico para H3K9ac, H3K27ac, Sp1, Sp3 y p300. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado, para lo cual se empleó 5  $\mu$ l de ADN de cada muestra, 6  $\mu$ l de mezcla 2x para PCR tiempo real (Bioline, EUA), que contiene Taq polimerasa, dNTPs, buffer con Mg<sup>2+</sup> y SYBRGreen, 0.5  $\mu$ l de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 5% de DMSO y agua para un volumen final de 12  $\mu$ l. Se diseñaron primers específicos que amplifican la región de -314 a -143 y de -164 a +6 del promotor de *ATP2A3* (Tabla 2 y Figura 5).



**Figura 5. Esquema de la región de alineamiento de los primers para el análisis del promotor del gen *ATP2A3*.** Las flechas indican la región de alineación de los primers, así como su orientación; en cajas grises se indican los potenciales sitios de unión de Sp1 y Sp3; F<sub>1</sub> y R<sub>1</sub> indican los primers que alinean de -314 a -143, mientras que F<sub>2</sub> y R<sub>2</sub> indican los primers que alinean de -164 a +6; con una **C** y **+1** se indica el sitio de inicio de la transcripción.

### 7.8 Actividad acetil transferasa de histonas (HAT)

Para preparar los extractos nucleares, las células AS-30D tratadas con NaB 3 mM, TSA 100 nM o sin tratamiento se lavaron dos veces con PBS e inhibidores de proteasas. Se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm, 4°C. Se removió el sobrenadante y se adicionó 1 ml de buffer de lisis (HEPES 1mM pH 7.6, glicerol 80%, NaCl 5M, MgCl<sub>2</sub> 1M, EDTA 0.5 M e inhibidores de proteasas). Las muestras se incubaron 15 minutos a 4°C, posteriormente se adicionó 1.5 µl de Triton X-100 y se mezcló en el vortex por 10 segundos a máxima velocidad. Se centrifugó 30 segundos a 12,000 rpm, 4°C, y el sobrenadante se retiró. Para la extracción de núcleos se adicionó 200 µl de buffer de extracción y se incubó 30 minutos a 4°C en agitación constante. Posteriormente las muestras se centrifugaron por 15 minutos, 12,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Para el ensayo de actividad acetil transferasas de histonas (HAT) se ocupó un kit colorimétrico (Biovision, CA, USA), de acuerdo con las especificaciones recomendadas. Los extractos nucleares (50 µg) se incubaron por una hora a 37°C, posteriormente se midió la absorbancia a 440 nm.



### **7.9 Actividad ADN metil-transferasas (DNMT)**

Los extractos nucleares de células AS-30D tratadas con 5-Azacitidina por 96 horas o sin tratamiento se prepararon de acuerdo con lo descrito en el apartado anterior. La actividad DNMT se determinó con 20 µg de proteína de extractos nucleares de cada condición experimental con el kit EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibition Assay de acuerdo con las especificaciones recomendadas por el fabricante (Epigentek, Farmingdale, NY).

### **7.10 Inmunodetección de SERCA2 y SERCA3 por Western-blot**

La expresión de las proteínas SERCA2 y SERCA3 se determinó por medio de Western-blot. Los extractos de proteínas de células AS-30D se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se bloquearon e incubaron con anticuerpos para SERCA2 (1:5000), SERCA3 (1:1000) o β-actina (1:5000) (Abcam, UK) Posteriormente se lavaron con TBS-T (cuatro lavados) para remover el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con anticuerpo secundario. Las membranas se lavaron con TBS y se incubaron con el sustrato para la peroxidasa de rábano ECL (luminol y peróxido de hidrógeno, PIERCE-ThermoScientific, MA, USA) y se expusieron a películas para autoradiografía. Las películas se analizaron con el programa Image J (NCBI) para estimar la densidad óptica.

### **7.11 Análisis estadístico**

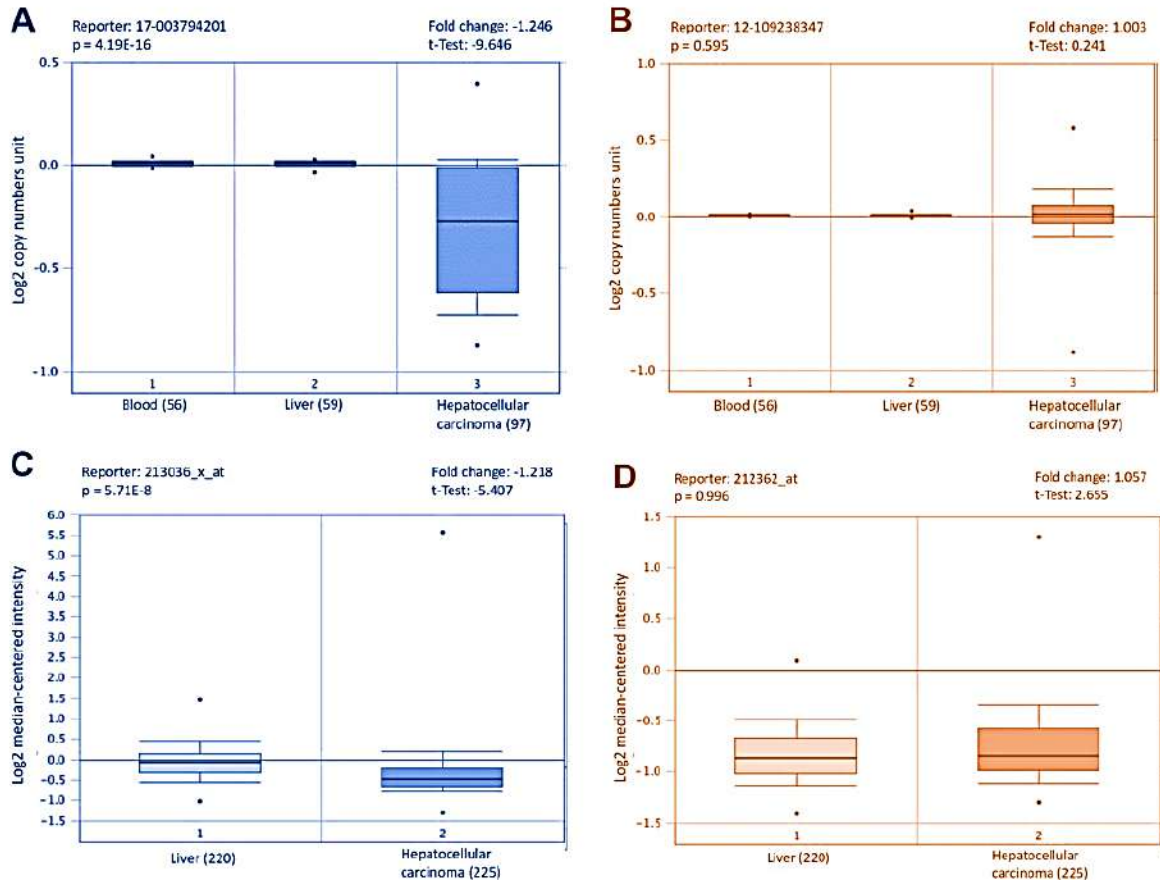
Se realizaron pruebas de normalidad en el programa estadístico Statistica 7 para determinar la distribución de los datos obtenidos a partir de PCR en tiempo real, el análisis densitométrico de los Western blots y de las concentraciones citoplásmicas de Ca<sup>2+</sup>, con base en los resultados se aplicó la prueba ANOVA con un análisis *posthoc* de Tukey. Los resultados se reportan como el promedio ± desviación estándar. Un valor de p <0.05 se consideró estadísticamente significativo.

## 8. RESULTADOS

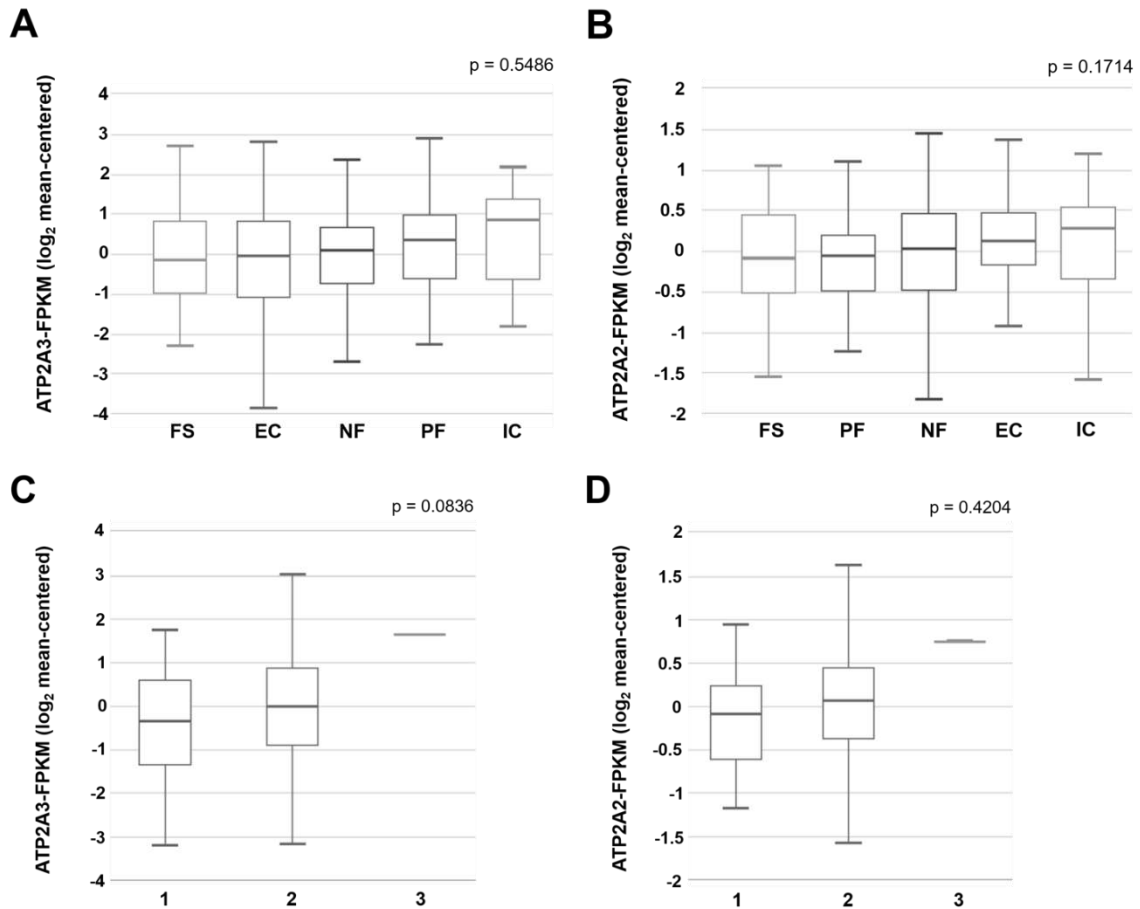
### 8.1 La expresión de *ATP2A3* disminuye en muestras de carcinoma hepatocelular de humano y su expresión correlaciona con una mayor supervivencia

Con la intención de determinar los niveles de expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de CHC de humano y compararlo con su contraparte normal, se accedió a las bases de datos para CHC de *The Cancer Genome Atlas* y Roessler liver 2 (Roessler et al 2010), mediante el servidor *Oncomine*. Los resultados indican que, en muestras de CHC, existe una disminución significativa en la expresión del gen *ATP2A3* (*SERCA3*) en comparación con hígado normal (Figura 6A y C). En contraparte, no se encontró diferencia alguna en la expresión del gen *ATP2A2* (*SERCA2*) en muestras de CHC e hígado normal (Figura 6B y D).

Adicionalmente, se determinó si la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* se encontraba alterada en diferentes grados de daño hepático, para lo cual, las muestras de la base de datos TCGA se analizaron de acuerdo con las clasificaciones Child-Pugh que se enfoca en marcadores de funcionamiento hepático o grado de fibrosis de Ishak. Los resultados no mostraron diferencias significativas para ninguno de los dos genes al analizarlos bajo los parámetros de ambas clasificaciones o índices (Figura 7).

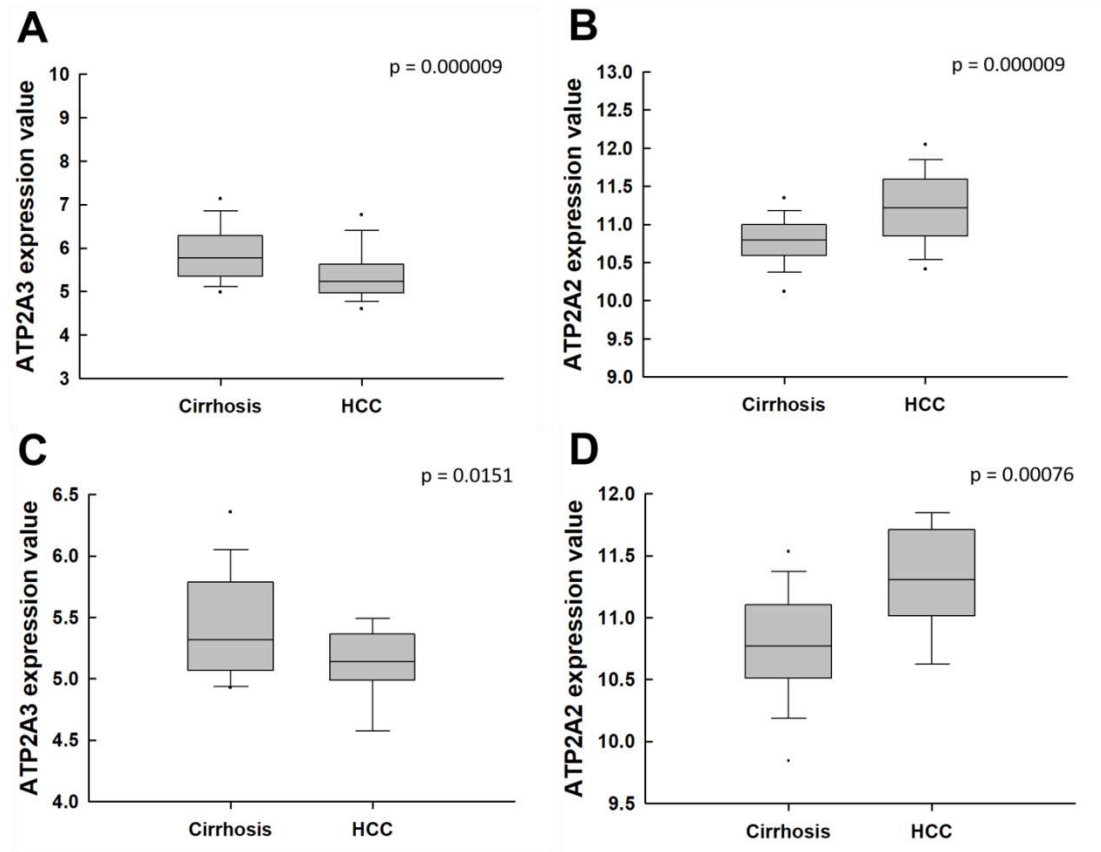


**Figura 6. La expresión de SERCA3 disminuye en muestras de carcinoma hepatocelular.** El análisis se realizó a partir de datos de CHC de las bases *The Cancer Genome Atlas* (Panel A y B) y Roessler liver 2 (Panel C y D) por medio del servidor *Oncomine*. Panel A y C representa la información generada para el gen *ATP2A3* (azul) y panel B y D la información pertinente al gen *ATP2A2* (naranja).



**Figura 7. Análisis de las muestras de la cohorte de TCGA acorde a las clasificaciones Child-Pugh e Ishak.** Los datos de TCGA se analizaron con la plataforma Xena de la Universidad de California en Santa Cruz (<https://xenabrowser.net/>). Panel A y B representan los resultados para el gen *ATP2A3* y *ATP2A2*, respectivamente, acorde a la clasificación Ishak, FS: fibrous speta, EC: established cirrhosis, NF: no fibrosis, PF: portal fibrosis, IC: nodular formation and incomplete cirrhosis. Panel C y D representa los resultados de expresión para los genes *ATP2A3* y *ATP2A2*, respectivamente, acorde a la clasificación de Child-Pugh.

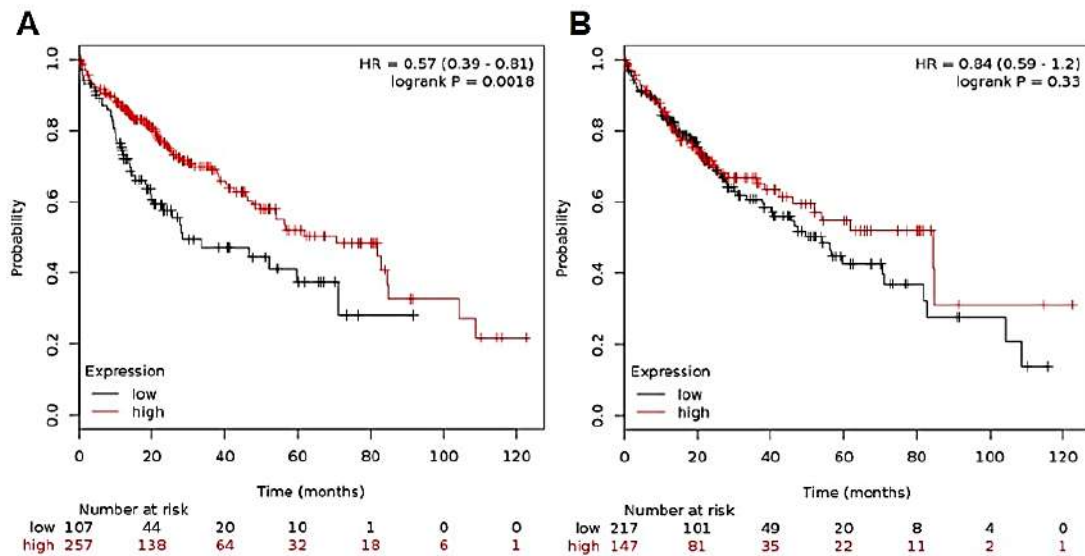
Posteriormente, se analizó la expresión de *SERCA2* y *SERCA3* en muestras de hígado cirrótico no tumoral y de CHC del mismo paciente de dos bases de datos adicionales, y se encontró que la expresión del gen *ATP2A3* disminuye y la del gen *ATP2A2* aumenta en CHC, en relación con tejido cirrótico (Figura 7).



**Figura 8. Análisis de la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de cirrosis y de carcinoma hepatocelular del mismo paciente, en dos bases de datos adicionales del Gene Expression Omnibus (GEO).** La expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* se analizó a partir de las bases de datos GSE63898 y GSE17548, mediante el software GEO2R ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r)). Panel A y B representan los resultados para *ATP2A3* y *ATP2A2*, respectivamente, con la base de datos GSE63898. Panel C y D representan los resultados para *ATP2A3* y *ATP2A2*, respectivamente, con la base de datos GSE17548.

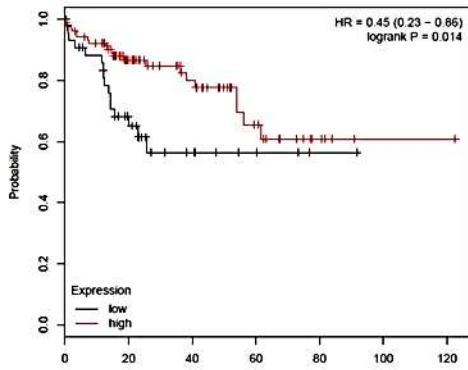
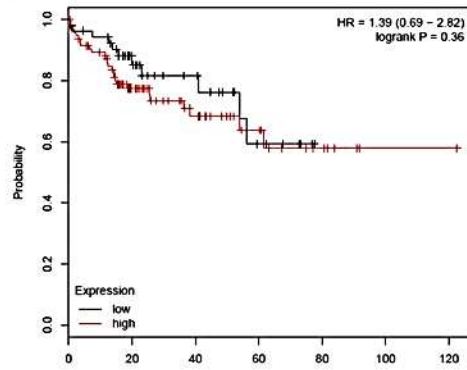
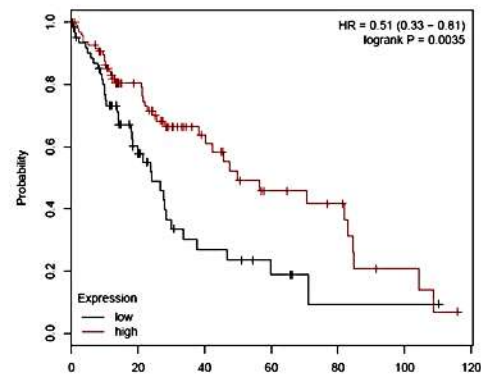
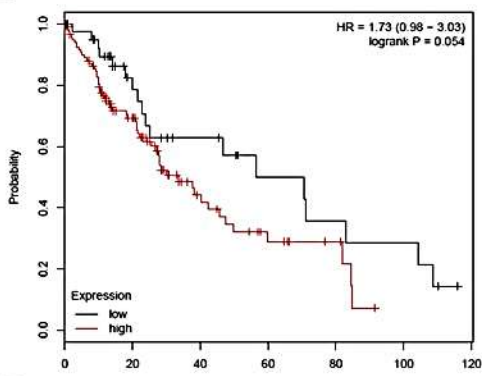
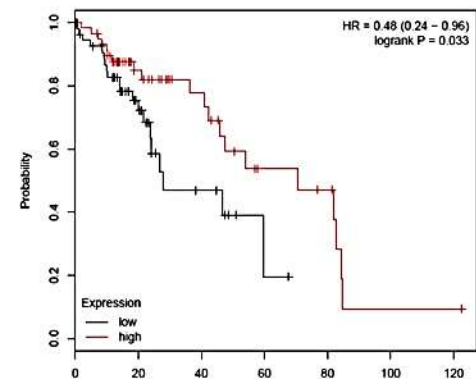
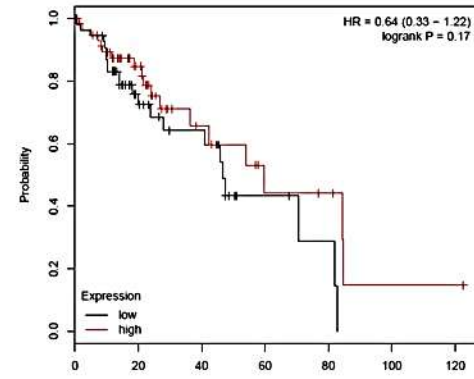
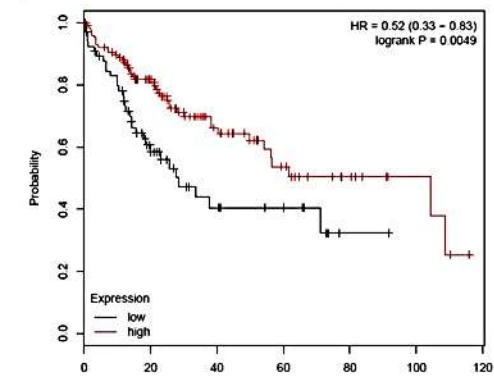
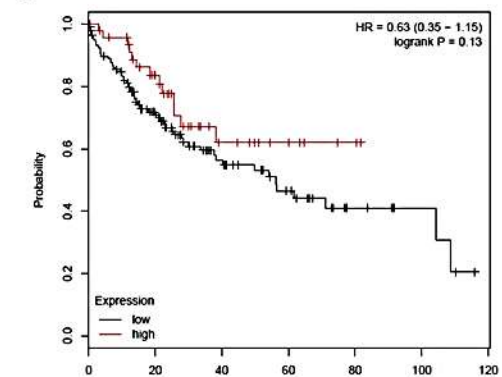
Adicionalmente se exploró si la expresión de *SERCA2* o *SERCA3* tiene un papel importante en la supervivencia de los pacientes con CHC. Se accedió a la base de datos *KM plot* para realizar un gráfico de Kaplan-Meier con datos de ARN-seq de *SERCA2* y *SERCA3*. Los resultados mostraron que pacientes con una alta expresión de *SERCA3* tienen una mayor probabilidad de supervivencia con una mediana de 70.5 meses, en comparación con pacientes con una baja expresión, cuya mediana fue de 28.3 meses,  $p=0.0018$  (Figura 9A). En contraparte, no se

encontró diferencia significativa en la supervivencia de pacientes con alta y baja expresión de SERCA2,  $p=0.33$  (84.4 y 54.1 meses, respectivamente, Figura 9B).



**Figura 9. Pacientes de cáncer hepatocelular con alta expresión de SERCA3 muestran una mayor probabilidad de supervivencia.** Panel A representa el análisis de supervivencia de pacientes con alta y baja expresión de SERCA3. Panel B representa el análisis de supervivencia de pacientes con alta y baja expresión de SERCA2. Las líneas rojas y negras representan a los pacientes con alta y baja expresión de cada gen, respectivamente.

Adicionalmente se encontró que la correlación entre alta expresión de SERCA3 y mayor supervivencia de pacientes con CHC, se mantiene independientemente del consumo de alcohol o por infección del virus de hepatitis, mientras que la expresión de SERCA2 se mantiene sin correlación alguna (Figura 10)

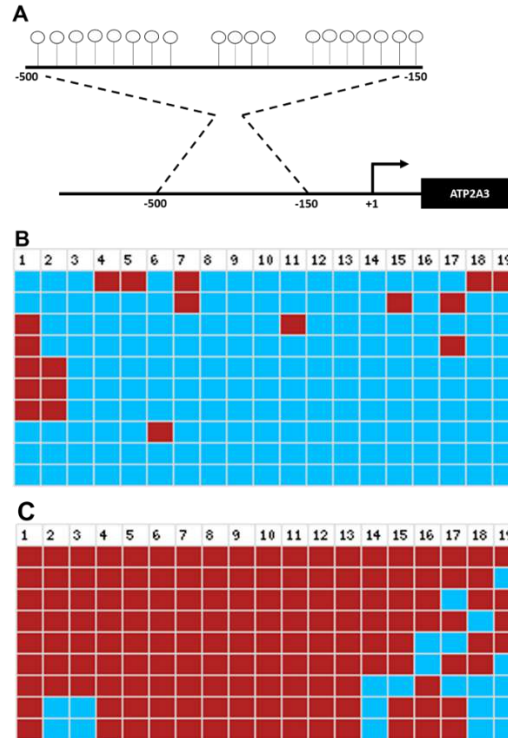
**A****B****C****D****E****F****G****H**

**Figura 10. Pacientes de cáncer hepatocelular con alta expresión de SERCA3 muestran una mayor supervivencia independientemente del consumo de alcohol o de infección por virus de hepatitis.** Paneles A, C, E y G representan los datos obtenidos para el gen *ATP2A3* (SERCA3), mientras que los paneles B, D, F y H representan los datos obtenidos para el gen *ATP2A2* (SERCA2). El análisis se realizó con información de pacientes con (A y B) o sin (C y D) hepatitis, y con (E y F) o sin (G y H) consumo de alcohol. Las líneas rojas y negras representan a los pacientes con alta y baja expresión de cada gen, respectivamente.

### **8.2 El promotor del gen *ATP2A3* se encuentra hipermetilado en las células AS-30D.**

Estudios recientes de nuestro laboratorio mostraron que la expresión del ARNm y proteína de SERCA2b y SERCA3 se encuentra disminuido en células de CHC de rata AS-30D. En este sentido, se decidió explorar si un mecanismo epigenético como la metilación del ADN a nivel de promotor regula su expresión. Por un lado, no fue posible amplificar el promotor de SERCA2 para el análisis de su patrón de metilación; fueron probadas diferentes condiciones de amplificación, así como diversos pares de primers. Por otro lado, únicamente los primers específicos (Tabla 2) para amplificar la región de -500 a -150 (Figura 11A) del promotor de SERCA3, permitieron la amplificación de un producto de 350 pb a partir de ADN modificado por bisulfito de sodio, proveniente de hígado control y células AS-30D. El producto de PCR amplificado se purificó de geles de agarosa y se clonó en el vector pGEM T-easy. Se obtuvieron un total de 19 clonas transformantes, 10 correspondientes a hígado control y 9 a células AS-30D, las cuales se secuenciaron. Con base en las secuencias obtenidas, se realizó un análisis del patrón de metilación de CpG's con el programa BISMA (Universidad de Stuttgart). El programa hace una comparación entre la secuencia genómica del inserto, la secuencia modificada por bisulfito del inserto y la secuencia de las diferentes clonas. El análisis mostró que existe una hipermetilación en la secuencia de la región -500 a -150 del promotor de *ATP2A3* en las clonas obtenidas de células AS-30D (Figura 11C); mientras que la mayoría de los dinucleótidos CpGs de las clonas de hígado control se encuentran desmetiladas (Figura 11B).



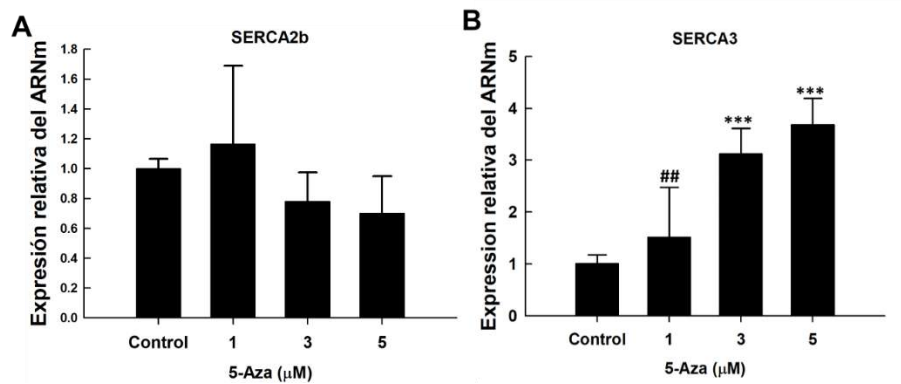


**Figura 11. El promotor del gen *ATP2A3* se encuentra hipermetilado en células AS-30D.** Panel A: esquematización de la región del promotor del gen *ATP2A3* analizada, los círculos indican CpGs. Panel B: patrón de metilación de CpG's en ADN de clonas transformantes obtenidas con ADN de hígado control. Panel C: patrón de metilación de CpG's en ADN de clonas transformantes obtenidas con ADN de células AS-30D. Cada recuadro representa un sitio CpG, el color rojo significa que está metilado y el color azul significa que no se detectó metilación.

### **8.3 La 5-azacitidina induce la expresión del ARNm de *SERCA3*, disminuye la actividad DNMT, pero no modifica la metilación de la región -500 a -150 del promotor *del gen ATP2A3*.**

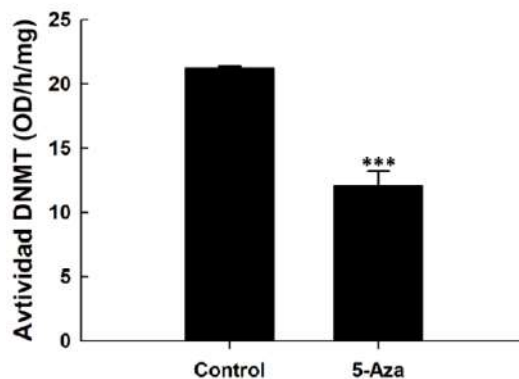
Al encontrar que el promotor de *SERCA3* está hipermetilado en células AS-30D, se propuso investigar si un agente inhibidor de las ADN-metil transferasas, 5-Aza-2'-desoxicitidina (5-Aza), pudiera tener algún efecto en la expresión del ARNm de *SERCA2b* y *SERCA3*. Los resultados de PCR-tiempo real muestran que la expresión del ARNm de *SERCA3* se induce después del tratamiento con 5-Aza. Particularmente, las concentraciones de 3 y 5  $\mu\text{M}$  incrementan  $3.1 \pm 0.48$  y  $3.6 \pm 0.5$ , respectivamente la expresión del ARNm de *SERCA3* respecto al control,

$p < 0.001$  (Figura 12B); mientras que 5-Aza no mostró efecto alguno en la expresión de SERCA2b (Figura 12A).



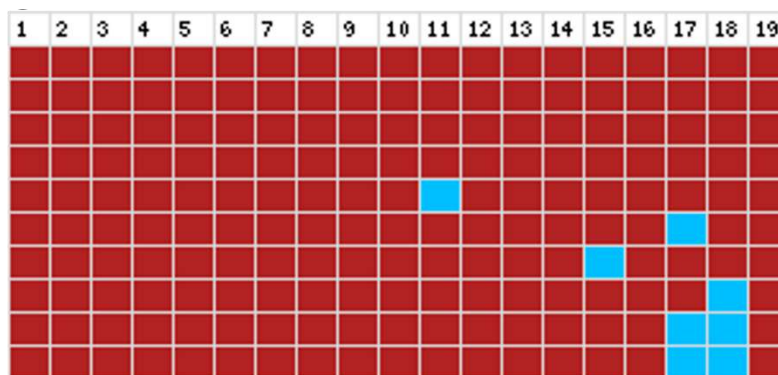
**Figura 12. La 5-azacitidina incrementa la expresión del ARNm de SERCA3.** Panel A expresión relativa del ARNm de SERCA2b en células tratadas con 5-Aza. Panel B, expresión relativa del ARNm de SERCA3 en células tratadas con 5-Aza. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado, \*\*\* $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$  respecto a 5  $\mu$ M en panel B.

La 5-Aza además de incorporarse al ADN se une covalentemente a las DNMTs provocando su inhibición. En este sentido, se exploró si la actividad DNMT disminuía en extractos nucleares de células AS-30D tratadas con 5-Aza 5  $\mu$ M por 96 horas. Los resultados mostraron una disminución en la actividad DNMT en extractos nucleares de células tratadas ( $12.1 \pm 1.1$  OD/h/mg) en comparación con extractos nucleares de células no tratadas ( $21.2 \pm 0.1$  OD/h/mg),  $p < 0.001$  (Figura 13).



**Figura 13. El tratamiento con 5-Aza disminuye la actividad DNMT en extractos nucleares de células AS-30D.** Las células AS-30D se trataron con 5-Aza 5  $\mu$ M durante 96 h, se prepararon extractos nucleares y se determinó la actividad DNMT. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

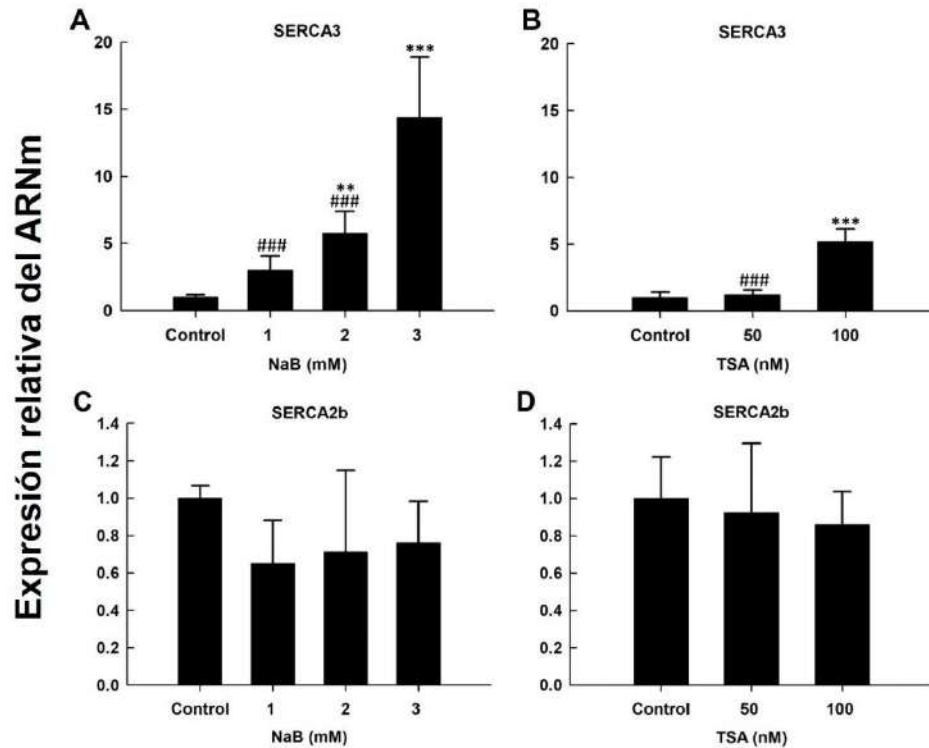
Posteriormente se analizó el patrón de CpG's metiladas en células tratadas con Aza 5  $\mu$ M. Los resultados de secuenciación no mostraron una disminución en la metilación en la región -500 a -150 del promotor del gen *ATP2A3* en células tratadas con 5-Aza, en comparación con células sin tratamiento (Figura 14).



**Figura 14. El tratamiento con 5-Aza no modifica la metilación en el promotor del gen *ATP2A3*.** Patrón de metilación de CpG's en ADN de clonas transformantes obtenidas de células AS-30D tratadas con 5-Aza. Cada recuadro representa un sitio CpG de la región de -500 a -150 del promotor, si se encuentra de color rojo significa que se encuentra metilado, si el color es azul significa que no se detectó metilación.

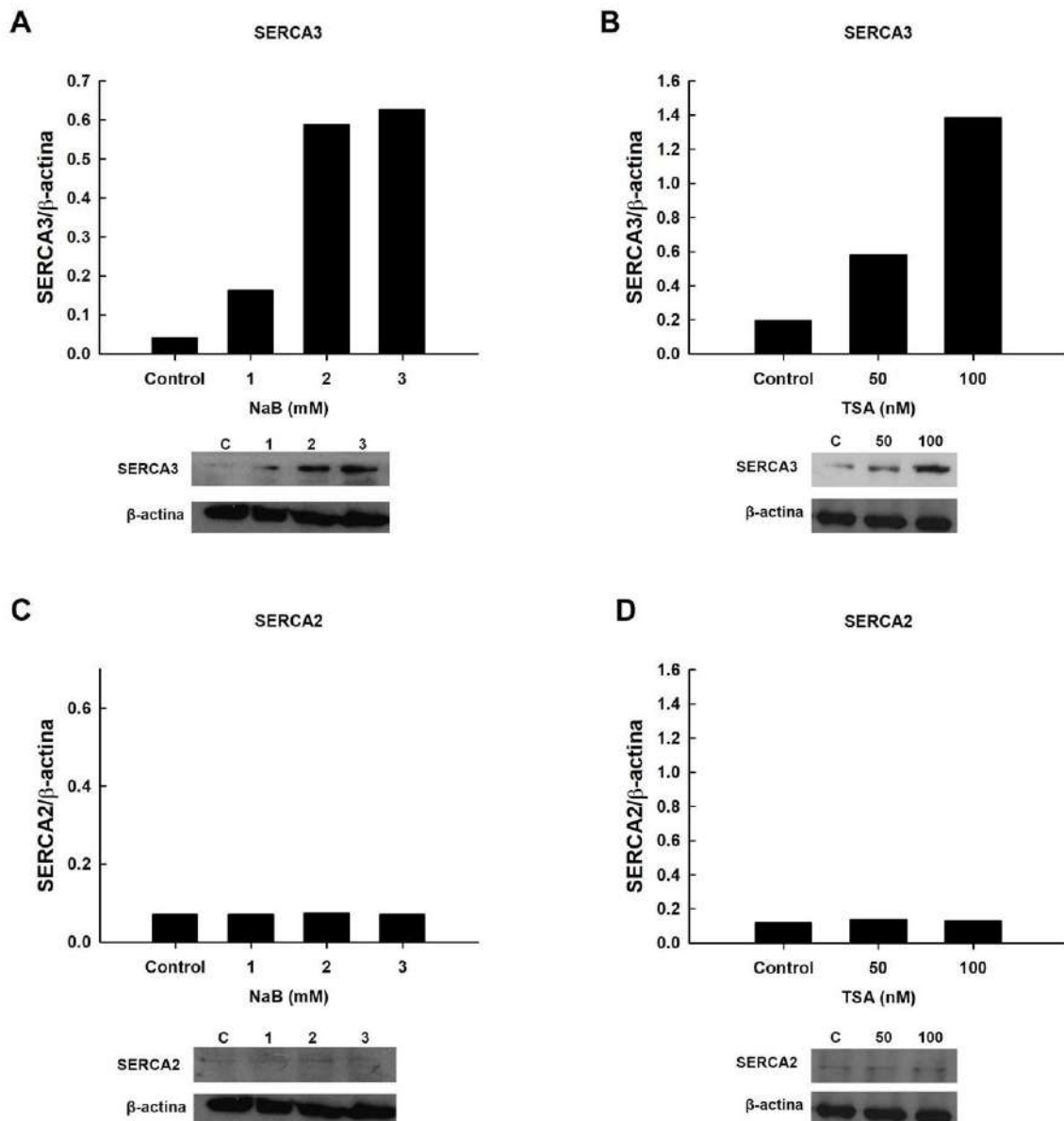
#### **8.4 El tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas induce la expresión de SERCA3.**

Posteriormente, al no encontrar cambios en el patrón de metilación del promotor de SERCA3, se decidió explorar si otro mecanismo epigenético como la acetilación/desacetilación de histonas, a nivel de promotor, regula la expresión de las enzimas SERCA2 y SERCA3. En este sentido se decidió explorar si dos HDACi como el NaB y la TSA incrementan su expresión. Primero se probaron diferentes concentraciones de NaB y TSA en las células AS-30D para determinar su efecto en la expresión de los mensajeros que codifican para las enzimas SERCA2 y SERCA3. Los resultados mostraron que la expresión de SERCA3 (ARNm y proteína) se induce después de un tratamiento con NaB o TSA por 48 h, no así para SERCA2b. Comparado con el control (células no tratadas), el butirato de sodio 1, 2 y 3 mM indujo la expresión del ARNm de SERCA3 ( $3.01 \pm 1.05$ ,  $5.7 \pm 1.6$  y  $14.3 \pm 4.5$  veces más, respectivamente,  $p < 0.01$ ). El efecto de NaB 3 mM fue mayor al observado con NaB 1 y 2 mM ( $p < 0.001$ ) (Figura 15A). Por otro lado, el tratamiento con NaB no mostró cambio alguno en la expresión de SERCA 2b (Figura 15C).



**Figura 15. Efecto del butirato de sodio y la tricostatina A en la expresión relativa del ARNm de SERCA2b y SERCA3 en células AS-30D.** Las células AS-30D se trataron con butirato de sodio 1, 2 o 3 mM y con tricostatina A 50 o 100 nM por 48 horas. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  respecto al control, ### $p < 0.001$  respecto a NaB 3 mM en panel A y TSA 100 nM en panel B).

Por su parte, TSA a 100 nM induce la expresión de SERCA3 ( $5.1 \pm 0.98$  veces por arriba de las células control,  $p < 0.001$ ) (Figura 15B). La TSA tampoco mostró un efecto significativo sobre la expresión de SERCA2b (Figura 15D). Adicionalmente se analizó la expresión de la proteína de SERCA2 y SERCA3. De manera similar a los resultados obtenidos de la expresión del ARNm, en células tratadas con NaB, se observó un incremento en la expresión de la proteína de SERCA3 en relación con la dosis utilizada (Figura 16A), mientras que en las células tratadas con TSA, el mayor incremento en la expresión de la proteína de SERCA3 se observó con el tratamiento de 100 nM (Figura 16B). Por su parte, la expresión de la proteína de SERCA2 no mostró cambio alguno en ambos tratamientos (Figura 16C y D).



**Figura 16. Efecto del butirato de sodio y la tricostatina A en la expresión de la proteína de SERCA2 y SERCA3 en células AS-30D.** Las células AS-30D se trataron con butirato de sodio 1, 2 o 3 mM y con tricostatina A 50 o 100 nM por 48 horas. Se muestra el análisis normalizado de la proteína de SERCA2 o SERCA3 con  $\beta$ -actina, así como su blot correspondiente.

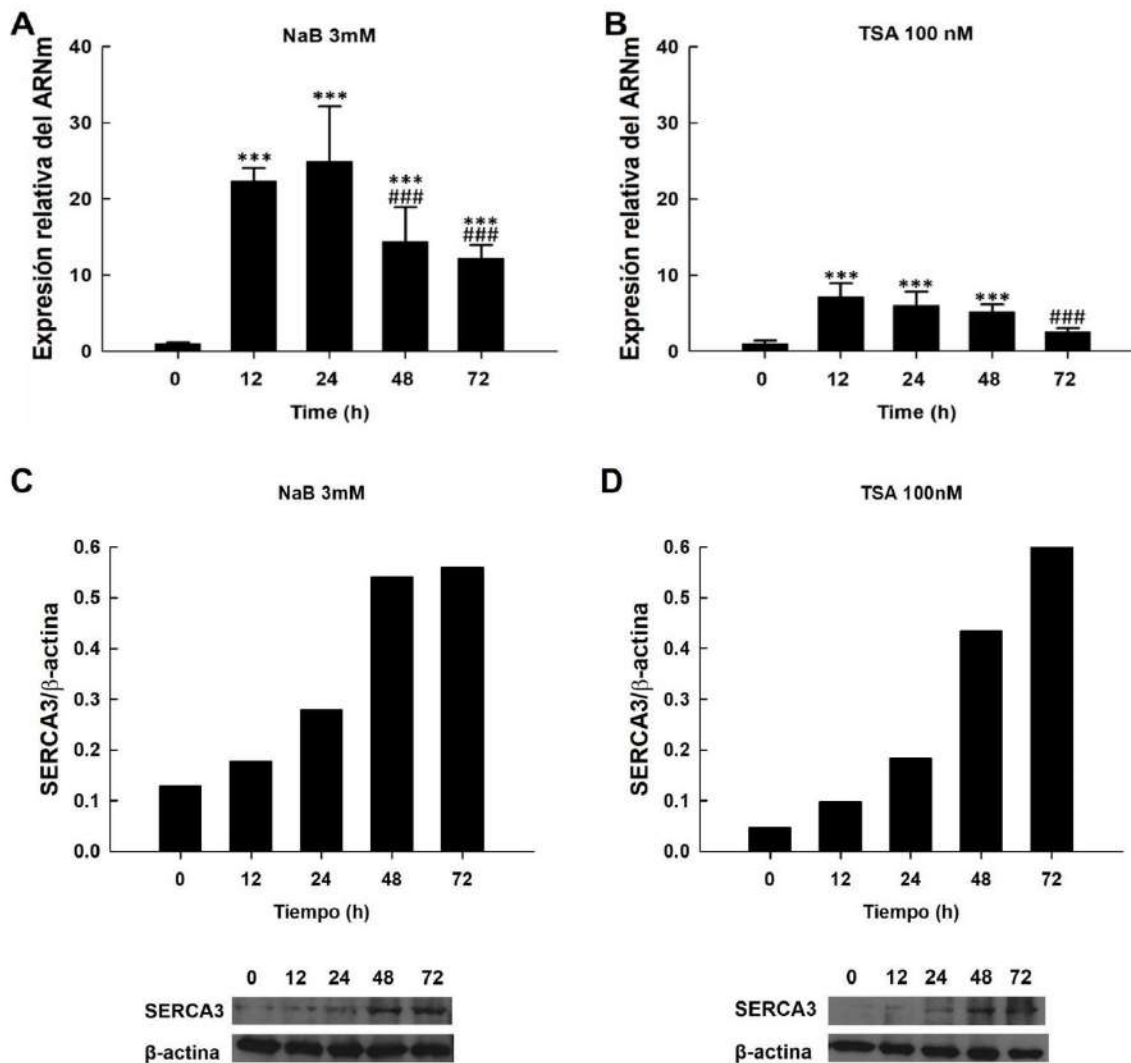
### 8.5 Curso temporal de expresión de SERCA3 en respuesta al tratamiento con NaB o TSA

Una vez determinado que el butirato de sodio 3 mM y la tricostatina A 100 nM tienen un efecto mayor sobre la expresión de SERCA3 que las otras concentraciones

(Figura 15A y B y 16A y B), se realizó un curso temporal. Para lo cual, las células se trataron durante 12, 24, 48 y 72 horas con NaB 3 mM o TSA 100 nM. La expresión del ARNm de SERCA3 se induce desde las 12 horas de tratamiento con butirato de sodio ( $22.3 \pm 1.6$  veces más respecto al control,  $p < 0.001$ ). Este efecto se mantiene a las 24 horas con un ligero incremento ( $24.9 \pm 7.1$ ,  $p < 0.001$ ); sin embargo, a las 48 horas la expresión de SERCA3 fue de  $14.3 \pm 4.5$  y a las 72 horas fue de  $12.8 \pm 1.7$  veces más respecto al control,  $p < 0.001$  (Figura 17A). Por otro lado, el tratamiento por 24 horas con NaB mostró una diferencia significativa con los tratamientos de 48 y 72 horas ( $p < 0.001$ , Figura 17A).

Por su parte, el tratamiento con TSA 100 nM por 12 horas estimula la expresión de SERCA3,  $7.09 \pm 1.8$  veces respecto al control ( $p < 0.001$ ), mientras que a las 24 y 48 horas de tratamiento la inducción fue de  $5.9 \pm 1.8$  y  $5.1 \pm 0.98$  veces más comparado con el control, respectivamente,  $p < 0.001$  (Figura 17B). El tratamiento por 72 horas no mostró una diferencia significativa respecto al control. Por otro lado, el tratamiento con TSA por 24 horas mostró significancia respecto al tratamiento de 72 horas,  $p < 0.001$  (Figura 17B).

Por otro lado, los resultados del curso temporal de la expresión de la proteína de SERCA3 mostraron que, en ambos tratamientos, hay un incremento gradual a mayor tiempo de tratamiento, detectándose los mayores niveles de proteína entre las 48 y 72 horas (Figura 17 C y D). No se realizó el curso temporal de tratamiento con NaB o TSA para analizar la expresión de SERCA2b en las células, debido a que estos inhibidores, a diferentes concentraciones, no estimularon su expresión.



**Figura 17. Curso temporal con butirato de sodio 3 mM o tricostatina A 100 nM en células AS-30D.** Las células AS-30D se trataron con butirato de sodio 3 mM o tricostatina A 100 nM por 12, 24, 48 y 72 horas y posteriormente se determinó la expresión de SERCA3 por RT-qPCR y Western blot. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey (\*\*\*)  $p < 0.001$ , ###  $p < 0.001$  respecto a 24 h de tratamiento en panel A y panel B respectivamente)

Las células tratadas con NaB y TSA mostraron un incremento significativo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular,  $74.9 \pm 1.9$  y  $89.8 \pm 10.2$  nM, respectivamente, en comparación con células control, sin embargo, únicamente las células tratadas con TSA mostraron un



aumento significativo en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, respecto al control (Anexo 1).

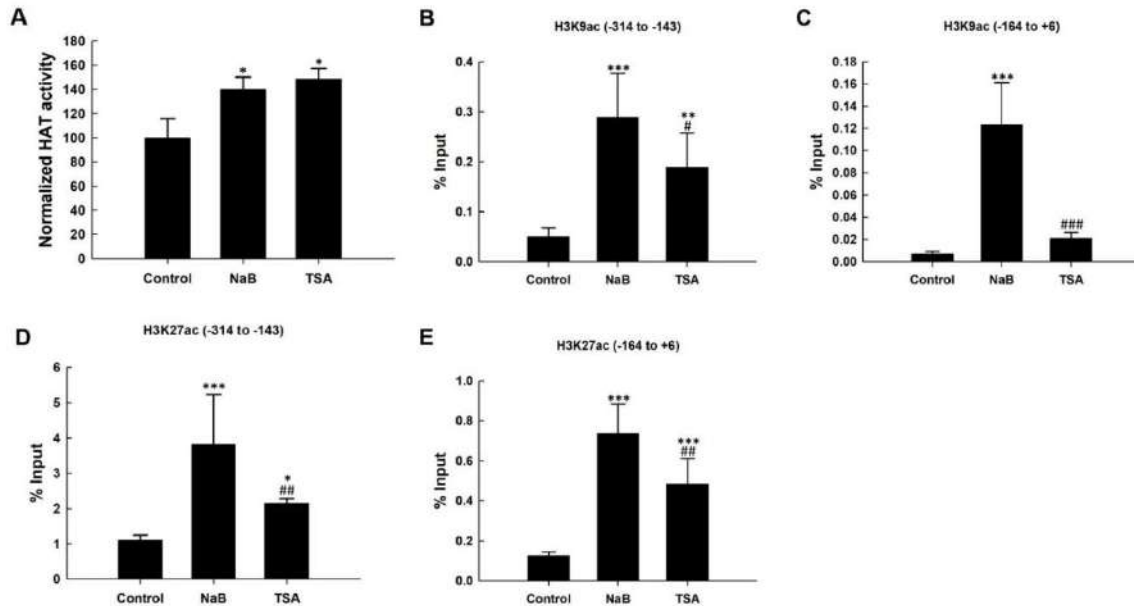
### **8.6 El NaB y la TSA incrementan la actividad acetil transferasa de histonas en células AS-30D**

A partir de células tratadas con NaB 3 mM o TSA 100 nM por 24 horas, se prepararon extractos nucleares y se realizó un ensayo para determinar la actividad acetil transferasa de histonas (HAT). Los resultados muestran un incremento aproximado de 40% con ambos tratamientos respecto al control ( $140\% \pm 10.1$  y  $148\% \pm 8.6$ ,  $p < 0.05$ , para NaB y TSA respectivamente) (Figura 18A).

### **8.7 El tratamiento con NaB y TSA incrementa la acetilación de la histona 3 en el promotor proximal del gen *ATP2A3***

Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para determinar si el NaB 3 mM o la TSA 100 nM modulan los niveles de acetilación en el promotor proximal del gen *ATP2A3* (SERCA3). Particularmente, se utilizaron anticuerpos específicos para acetilación en lisina 9 o 27 de la histona 3, ambas marcas de eucromatina. El NaB incrementa la acetilación de lisina 9 en la región de -314 a -143 del promotor del gen *ATP2A3* (SERCA3) ( $7 \pm 0.8$  veces,  $p < 0.001$ ), mientras que el tratamiento con TSA la incrementó  $4.5 \pm 0.6$  veces ( $p < 0.01$ ), por arriba del control (Figura 18B). El tratamiento con NaB mostró una diferencia significativa respecto a TSA en la acetilación H3K9 ( $p < 0.05$ ). En la misma región el NaB incrementó  $3.8 \pm 1.4$  veces la acetilación de lisina 27 ( $p < 0.001$ ), mientras que la TSA  $2.1 \pm 0.13$ ,  $p < 0.05$  veces (Figura 18D). Nuevamente el tratamiento con NaB mostró una diferencia significativa respecto al tratamiento con TSA ( $p < 0.01$ ).

Al analizar la acetilación en otra región del promotor (-164 a +6), se encontró únicamente un incremento de  $17 \pm 0.3$  veces en la acetilación de lisina 9 con el tratamiento de NaB ( $p < 0.001$ ) y una diferencia significativa entre NaB y TSA ( $p < 0.001$ ) (Figura 18C). Por otro lado, los tratamientos con NaB y TSA incrementaron la acetilación de la lisina 27 hasta  $6 \pm 0.14$  y  $4 \pm 0.12$  veces más respecto al control ( $p < 0.001$ ) (Figura 18E).



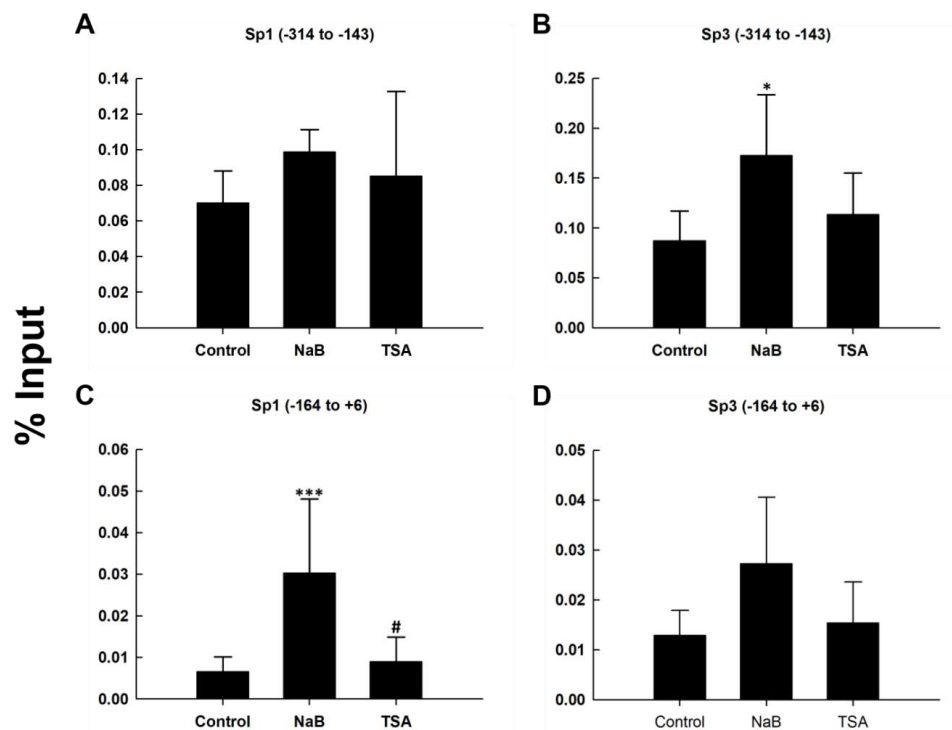
**Figura 18. NaB y TSA incrementan la acetilación en el promotor proximal del gen *ATP2A3*.** Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$  respecto a NaB en panel B, ### $p < 0.01$  respecto a NaB en panel C y #### $p < 0.001$  respecto a NaB en panel E).

### 8.8 El NaB incrementa la unión de Sp1 y Sp3 en el promotor proximal del gen *ATP2A3*

El tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas como NaB y TSA se ha asociado con incremento en el reclutamiento de factores de transcripción de la familia Sp en el promotor de diversos genes, particularmente Sp1 y Sp3. En estudios previos se ha demostrado que Sp1 regula la transcripción basal del promotor del gen *ATP2A3* (SERCA3) en fibroblastos de ratón (Hadri et al 2002). Por otro lado, los tratamientos con NaB y TSA en células KATO III, incrementa los niveles de Sp1 y Sp3 en el promotor del gen *ATP2A3* (Flores-Peredo et al 2016). Por lo anterior, se determinó si, además del incremento en los niveles de acetilación de H3, los tratamientos con NaB y TSA incrementan el reclutamiento de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 en el promotor del gen *ATP2A3*. Los resultados de ChIP mostraron un incremento de 2 veces aproximadamente en el reclutamiento de Sp3 con NaB en la región de -314 a -143 ( $p < 0.05$ ), no así para Sp1. Por su parte, la TSA

no mostró efecto significativo en los niveles de Sp1 y Sp3 en dicha región (Figura 19A y B).

Ademas, el tratamiento con NaB incrementó el nivel de Sp1 aproximadamente 5 veces en la región de -164 a +6 ( $p < 0.001$ ) y una diferencia significativa de  $p < 0.05$  respecto a TSA, pero no se observó efecto alguno en el reclutamiento de Sp1 (Figura 19C y D). De manera similar a la región -314 a -143, TSA no mostró efecto en el reclutamiento de Sp1 y Sp3 (Figura 19C y D).

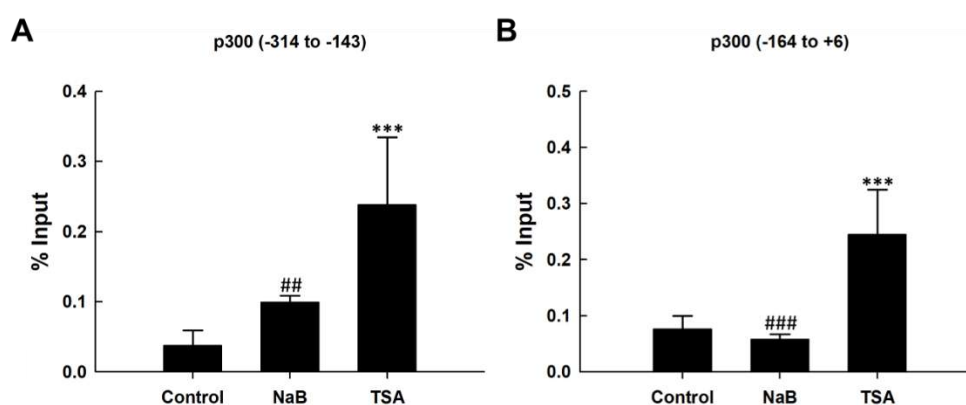


**Figura 19. El tratamiento con NaB incrementa los niveles de Sp1 y Sp3 en el promotor proximal del gen *ATP2A3*.** Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes, cuyo qPCR se realizó en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , # $p < 0.05$  respecto a NaB en panel C).

### 8.9 p300 es importante en la expresión basal y mediada por TSA de SERCA3

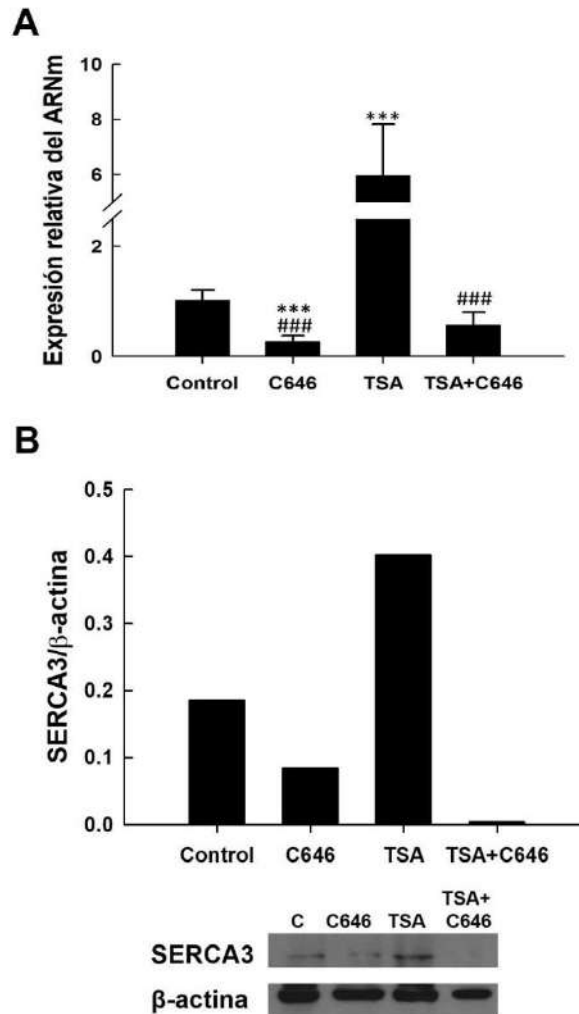
Al no encontrar un incremento en el reclutamiento de Sp1 y Sp3 después del tratamiento con TSA, se investigó que otro mecanismo pudiera estar involucrado en

la regulación de SERCA3 mediada por TSA. p300 es una acetil-transferasa de histonas que se ha asociado con acetilación en los residuos de lisina 9 y 27 de la histona 3, por lo que se exploraron cambios en el reclutamiento de esta proteína. Los resultados de ChIP muestran un incremento en los niveles de p300 en el promotor del gen *ATP2A3* después de tratar las células AS-30D con TSA en las dos regiones analizadas, aproximadamente 6 y 3 veces más respecto al control,  $p < 0.001$  (Figura 20A y B). En contraparte, el tratamiento con NaB no mostró efecto alguno en el reclutamiento de p300.



**Figura 20. El tratamiento con TSA incrementa los niveles de p300 en el promotor proximal del gen *ATP2A3*.** Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey (\*\* $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$  respecto a TSA en panel A, ### $p < 0.001$  respecto a TSA en panel B).

Posteriormente, para demostrar que p300 es necesaria para la expresión de SERCA3, se utilizó el inhibidor C646, específico de la actividad de p300. Los resultados muestran que C646 disminuye la expresión basal del ARNm y proteína de SERCA3 aproximadamente 75% respecto al control, mientras que el efecto de TSA sobre la expresión del ARNm de SERCA3 se mitigó al realizar el tratamiento conjunto de TSA más el inhibidor C646 (Figura 21A). Ambas condiciones mostraron diferencia significativa comparado con las células tratadas únicamente con TSA ( $p < 0.001$ ).



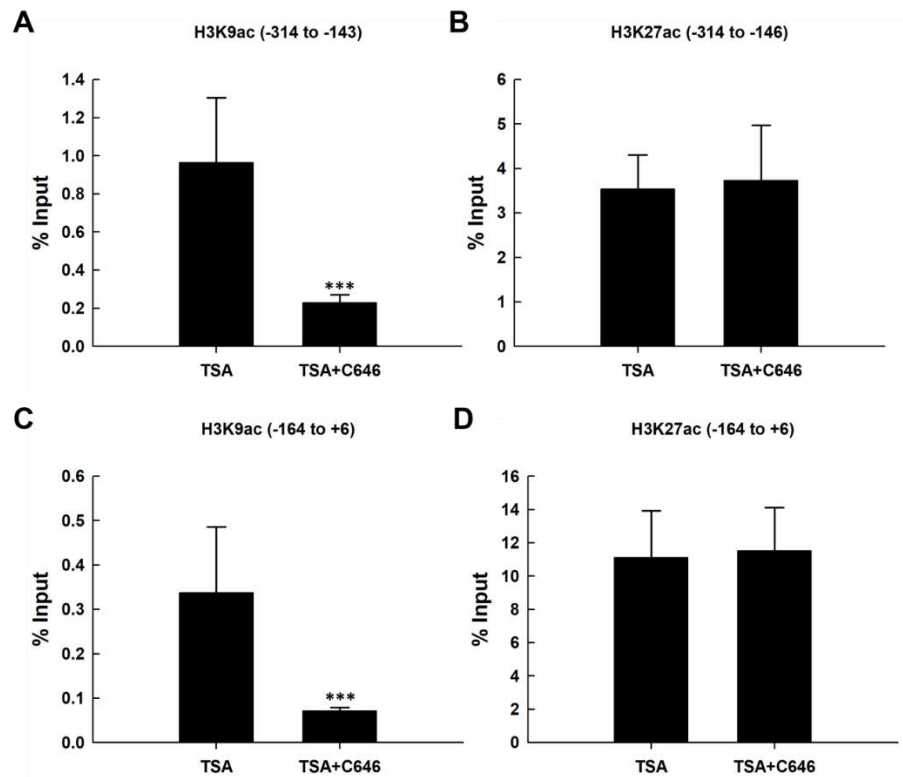
**Figura 21. p300 es importante en la regulación de la expresión basal de SERCA3 y mediada por TSA.** Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey (\*\* $p < 0.001$ , ### $p < 0.001$  respecto a TSA en panel A)

De manera similar, resultados de la de proteína de SERCA3 mostraron que, su expresión basal e inducida por TSA disminuye en presencia de C646 (Figura 21B).

### 8.10 La inhibición de p300 mitiga la acetilación de lisina 9 de la histona H3 mediada por TSA, en el promotor del gen *ATP2A3*

Posteriormente, con la intención de determinar si p300 tiene un papel en la acetilación de los residuos de lisina 9 y 27 de la histona H3 en el promotor del gen *ATP2A3*, se realizaron ensayos de CHIP de células tratadas con TSA o TSA+C646.

Los resultados mostraron que al inhibir específicamente a p300 con C646, se mitiga el efecto mediado por TSA en la acetilación de la lisina 9 (Figura 22A y C), mientras que la acetilación en la lisina 27 no mostró cambios por la inhibición de p300 (Figura 22B y D), sugiriendo que la acetilación de lisina 9 mediada por TSA en el promotor del gen *ATP2A3* es mediada por p300 y es esencial para la expresión de SERCA3.



**Figura 22. La inhibición de p300 mitiga la acetilación de H3K9 en el promotor de SERCA3 mediada por TSA.** Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

## 9. DISCUSIÓN

La importancia de las enzimas SERCA2 y SERCA3 no ha sido estudiada en CHC. Análisis de la información de CHC de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y de la base de datos de Roessler liver 2 indican que la expresión de SERCA3 disminuye en muestras de CHC en comparación con muestras de hígado normal de humano, mientras que la expresión de SERCA2 no mostró diferencia entre ambas

condiciones. Al analizar la expresión de SERCA2 y SERCA3 en las muestras de CHC de TCGA, clasificadas acorde a la escala Child-Pugh o al grado de fibrosis de Ishak, no se encontró diferencia significativa entre ellas. Sin embargo, el análisis de dos bases de datos adicionales, que incluyen muestras de hígado cirrótico no tumoral y de CHC del mismo paciente mostraron que, la expresión de SERCA3 disminuye y la de SERCA2 aumenta, en CHC comparado con muestras de tejido cirrótico, sugiriendo que la alteración en la expresión de SERCA2 y SERCA3 pudiera establecerse entre la transición de cirrosis a CHC. Por otro lado, pacientes con cáncer de hígado con alta expresión de SERCA3 tienen una mayor probabilidad de supervivencia que los pacientes con baja expresión, independientemente del consumo de alcohol o infección por virus de hepatitis en el paciente, sugiriendo que SERCA3 pudiera tener un papel importante en cáncer de hígado.

La expresión de SERCA2 y SERCA3 se ha encontrado disminuida en muestras y líneas celulares tumorales de cáncer de mama, oral, pulmón, estómago, colon y plexos coroideos (Endo *et al.*, 2002; Brouland *et al.*, 2005; Gélébart *et al.*, 2002; Papp y Brouland 2011; Arbabian *et al.*, 2013; Ait-Ghezali *et al.*, 2014). Además, se ha observado una relación entre la progresión tumoral y la disminución en la expresión de SERCA3 (Brouland *et al.*, 2005, Gélébart *et al.*, 2002; Ait-Ghezali *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos a partir de los tratamientos con inhibidores de desacetilasas de histonas muestran que el butirato de sodio (NaB) y la tricostatina A (TSA) inducen la expresión de SERCA3, no así la expresión de SERCA2 en células AS-30D de CHC. Esto sugiere que la expresión de SERCA3 pudiera estar regulada por la acetilación/desacetilación de histonas, mientras que este mecanismo parece inducir una ligera, pero no significativa disminución en el ARNm para SERCA2b. Este resultado es comparable a lo descrito en otras líneas celulares tumorales como MDA-MB-231 y MCF-7 de cáncer de mama (Contreras-Leal *et al.*, 2016), KATO III de cáncer gástrico (Flores-Peredo *et al.*, 2016; Gélébart *et al.*, 2002) y A549 de cáncer de pulmón (Arbabian *et al.*, 2013), donde se observó que la expresión de SERCA3 aumentaba después del tratamiento con inhibidores de

desacetilasas de histonas, mientras que SERCA2 se mantenía constante. En el caso particular de las células KATO III la expresión de SERCA2 disminuyó gradualmente a medida que aumentaba la expresión de SERCA3 (Gélébart *et al.*, 2002).

Por otro lado, se observó que el butirato de sodio tuvo un mayor efecto sobre la expresión de SERCA3 respecto a la tricostatina A (aproximadamente cinco veces más dentro de las primeras 24 horas de tratamiento) en las células AS-30D. En la literatura se reporta que el butirato de sodio 3 mM tiene un mayor efecto sobre la expresión de SERCA3 que la tricostatina A a 100 nM. Particularmente en células MDA-MB-231, el butirato de sodio indujo 14 veces más la expresión de la isoforma SERCA3a, mientras que tricostatina A únicamente 8 veces más, respecto al control (Contreras-Leal *et al.*, 2016). Además, el butirato de sodio indujo aproximadamente 40 veces más la expresión de SERCA3 en células KATO III, mientras que tricostatina A únicamente 10 veces más, respecto al control (Flores-Peredo *et al.*, 2016). Los resultados del curso temporal con butirato de sodio indican que la expresión de SERCA3 se induce desde las 12 horas de tratamiento y se mantiene constante hasta las 24 horas, pero a partir de las 48 horas de tratamiento, la expresión del ARNm empieza a disminuir. Para la tricostatina A también se observó un efecto similar, pero los niveles de inducción en la expresión de SERCA3 fueron menores a los observados con NaB. Una posible explicación para la menor inducción de la expresión del ARNm de SERCA3 a las 48 y 72 horas, es que los HDACi como el NaB, TSA, inducen la expresión de HDACs. Particularmente, se ha observado que en células HL60, los tratamientos con NaB y TSA inducen la expresión de HDAC9, HDAC11 y SIRT4 (Bradbury *et al.*, 2005), lo que podría inducir el silenciamiento de la expresión génica. Por otro lado, se sabe que el efecto que tienen los HDACi sobre la acetilación de histonas a nivel de promotor es transitorio, encontrándose los niveles más altos de acetilación antes de las primeras 24 horas de tratamiento (Richon *et al.*, 2000; López-Atalaya *et al.*, 2014).

La diferencia entre los niveles de inducción del ARNm de SERCA3 mediada por NaB y TSA se puede deber a los mecanismos de acción de ambos HDACi. Por un

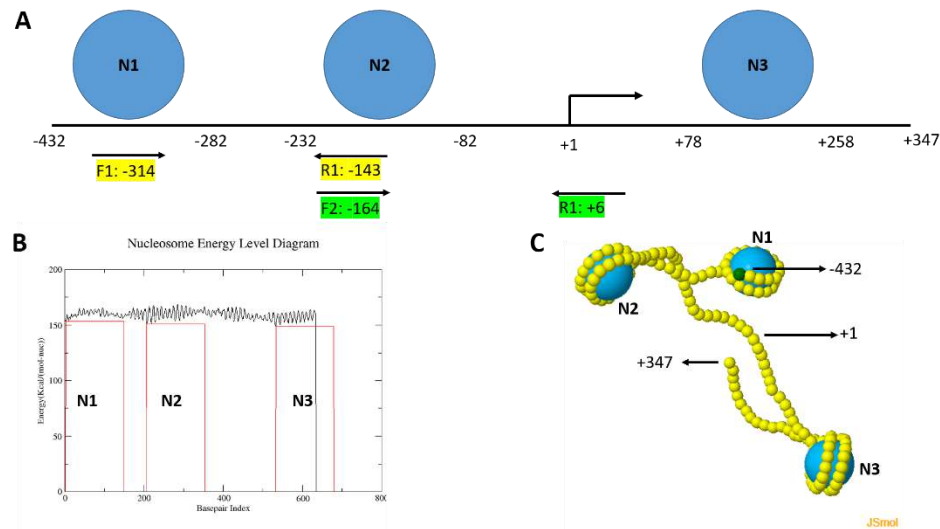


lado, se han descrito dos mecanismos principales mediante los cuales el butirato de sodio regula la expresión génica: 1) como inhibidor directo de las desacetilasas de histonas, incorporándose a los sitios de unión del zinc (cofactor) e inhibiendo su actividad (Donohoe *et al.*, 2012) y 2) como agente inductor de la acetilación, el butirato de sodio es oxidado en la mitocondria para producir acetil-Coenzima A, la cual es utilizada como cofactor de las acetil-transferasas de histonas (HAT), favoreciendo la expresión génica. En contra parte, el mecanismo de acción de la tricostatina A es específico sobre las desacetilasas de histonas al quelar el ion zinc, cofactor de estas enzimas (Kim y Bae, 2011).

No obstante, la diferencia entre los mecanismos de acción del NaB y la TSA, se ha propuesto que ambos inhibidores incrementan la actividad HAT mediante la desestabilización del balance HAT-HDAC. Resultados de la actividad HAT en extractos nucleares de células tratadas con NaB y TSA muestran un incremento aproximado del 40% y 45%, respectivamente, en comparación con células control. Para determinar si el incremento en la actividad HAT modula la acetilación en el promotor del gen *ATP2A3* se realizaron ensayos de ChIP con anticuerpos específicos para H3K9ac y H3K27ac. Los resultados de ChIP mostraron un incremento en los niveles de acetilación en H3K9 en las dos regiones analizadas en las células tratadas con NaB, mientras que TSA únicamente incrementa la acetilación en H3K9, en la región de -314 a -143 del promotor del gen *ATP2A3*. Además, se encontró un aumento en la acetilación de H3K27 en las dos regiones analizadas del promotor del gen *ATP2A3* en células AS-30D tratadas con NaB o con TSA. Estos resultados son similares a lo reportado previamente en células MDA-MB-231, donde el tratamiento con NaB y TSA incrementa la acetilación en H3K9 (Contreras-Leal *et al.*, 2016), mientras que en células KATO III tratadas con TSA, la acetilación se incrementa en el mismo residuo de lisina (Flores-Peredo *et al.*, 2016). Por otro lado, el tratamiento con NaB indujo un incremento en la acetilación en H3K27 en células KATO III (Meneses-Morales *et al.*, 2018) y en células MDA-MB-231 tratadas con TSA (Izquierdo-Torres *et al.*, 2018). El incremento diferencial de acetilación en residuos de lisina en la región promotora de otros genes ya se ha observado. Roy *et al.*, (2014), demostraron que, ante

diferentes condiciones de estrés, se acetila de manera diferencial los residuos de lisina 9, 14 y 27 de la histona 3 en 4 regiones del promotor del gen *OsDREB1b* comprendidas de -610 a +307 (Roy et al., 2014).

Una posible explicación para el patrón diferencial de acetilación en el promotor de un gen sería la localización de los nucleosomas. En este sentido, se realizó un análisis *in silico* para predecir el posicionamiento de nucleosomas de la región comprendida de -432 a +347 del promotor del gen *ATP2A3* muestra que existen tres zonas potenciales de localización de nucleosomas comprendidas de -432 a -281, de -232 a -82 y de +78 a +258 (Figura 23). La distribución de los nucleosomas coincide con la región amplificada con los dos pares de primers utilizados para el ChIP (Figura 12A), lo que podría explicar en parte porque la TSA incremente la acetilación de H3K9 en la región de -314 a -143 y no en la región de -164 a +6.



**Figura 23. Predicción de posicionamiento de nucleosomas en el promotor proximal del gen *ATP2A3*.** Panel A, esquematización de la región analizada, en azul se indican los nucleosomas, las flechas indican la posición y orientación de los primers utilizados para el ChIP. Panel B, determinación de la energía de deformación del ADN para la formación de nucleosomas, así como su distribución en la secuencia de análisis. Panel C, predicción de conformación tridimensional de la región comprendida de -432 a +347 del promotor del gen *ATP2A3*, las esferas azules representan los nucleosomas, las esferas amarillas representan 5 nucleótidos de ADN y la esfera verde representa el nucleótido 5' de la región analizada (-432). El análisis para los resultados del panel B y panel C se realizó en la plataforma <http://dna.engr.latech.edu/icm-du/index.php>.

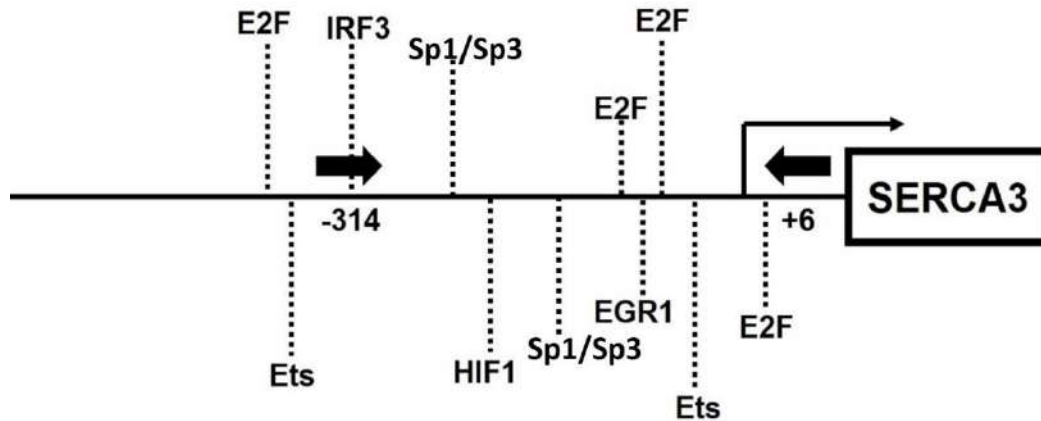
De manera adicional se analizó si el tratamiento con NaB o TSA incrementa el reclutamiento de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 en el promotor proximal del gen *ATP2A3*. Los resultados de CHIP mostraron que el NaB incrementó de manera significativa el reclutamiento de ambos factores de transcripción, mientras que la TSA no mostró incremento alguno. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se ha demostrado una relación entre tratamientos con inhibidores de desacetilasas de histonas y el aumento en el reclutamiento de los factores de transcripción Sp1 y Sp3. Se ha demostrado que el butirato de sodio induce la expresión génica promoviendo la unión de factores de transcripción como Sp1, Sp3 y KLF4 en los promotores de los genes que regula (Walker *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Davie *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Zeissig *et al.*, 2007). Particularmente, se ha demostrado que la expresión de SERCA3 es regulada por la unión de los factores de transcripción Sp1 y Ets-1 (Hadri *et al.*, 2002). Además, se observó un incremento en el reclutamiento de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf4 en el promotor proximal del gen *ATP2A3* en células KATO-III tratadas con NaB y TSA (Flores-Peredo *et al.*, 2016). La sobre-expresión del gen *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* mediada por NaB es acompañada con el incremento de Sp1 a nivel de promotor en células HT29, mientras que no se observa incremento en los niveles de Sp3 o la acetil transferasa de histonas p300 (Kobayashi *et al.* 2004).

Al no encontrar incremento en el reclutamiento de Sp1 y Sp3 en el promotor del gen *ATP2A3* con el tratamiento de TSA, se investigó si p300, una acetiltransferasa de histonas tiene un papel en este mecanismo de regulación. Resultados de CHIP mostraron que el tratamiento con TSA incrementa los niveles de p300 en el promotor del gen *ATP2A3*. Aunado a esto, se utilizó el inhibidor específico de p300, C646 (Bowers *et al.*, 2010), para determinar si al inhibir químicamente al coactivador transcripcional se mitigaba el efecto que tiene la TSA en la expresión del ARNm de SERCA3. Resultados de PCR-tiempo real mostraron que C646 100  $\mu$ M mitiga la inducción de la expresión de SERCA3 promovida por TSA, incluso C646 inhibe aproximadamente 75% la expresión basal del ARNm de SERCA3 en células AS-30D. Esto sugiere que p300 tiene un papel importante en la transcripción basal de SERCA3 y en el mecanismo de acción de la TSA. p300 se ha asociado con la

acetilación de histonas particularmente en los residuos 9 y 27 de lisina de la histona 3. Li et al reportaron que en el promotor del gen *11 $\beta$ -HSD2* en trofoblastos humanos, la acetilación en H3K9 y K27 es mediada por la actividad de p300, donde a su vez observaron que al inhibir químicamente a p300 con C646 la expresión del ARNm y proteína disminuía más del 50% en comparación con el control (Li *et al.*, 2013). Sin embargo, el papel de p300 en la regulación de la expresión de *SERCA3* no se había estudiado, por lo que estos resultados son los primeros en evidenciar la posible participación de p300 en la regulación de *SERCA3*.

Por otro lado, experimentos de ChIP mostraron que al inhibir a p300 se mitiga el efecto de la TSA en la acetilación de la lisina 9 en las dos regiones analizadas, mientras que la acetilación en la lisina 27 se mantuvo constante en las dos condiciones, lo que sugiere que p300 acetila selectivamente a la lisina 9 en el promotor proximal de *SERCA3*. Estos resultados son similares a los descritos por Crump et al., (2011) y Li et al., (2013), quienes reportaron que al inhibir a p300 con C646, se reduce significativamente la acetilación de la lisina 9 en el promotor de los genes *11 $\beta$ -HSD2*, *c-fos* y *c-jun*. Por otro lado, los resultados sugieren que es necesaria la acetilación en conjunto de la lisina 9 y 27 para la activación transcripcional de *ATP2A3* mediada por TSA. Se ha reportado que la acetilación de la lisina 9 en la histona H3, se asocia con la transición del inicio de la transcripción a la elongación, mientras que la acetilación en la lisina 27 de la histona H3 se relaciona con el reclutamiento de la ARN Pol II (Jin et al., 2011; Stasevich et al., Gates et al., 2017).

Adicionalmente, se exploró cuáles podrían ser los factores de transcripción que interactúan con p300 en el promotor de *ATP2A3*. Se realizó un análisis *in silico* con Ingenuity Target Explorer (Qiagen, <https://targetexplorer.ingenuity.com/index.htm>) para predecir potenciales factores de transcripción en la región proximal del promotor de este gen. Los resultados muestran que los factores de transcripción E2F, IRF3, Ets, EGR1, HIF1, Sp1 y Sp3 son potenciales candidatos para la interacción con p300 en el promotor del gen *ATP2A3* (Figura 24)



**Figura 24.** Factores de transcripción con potenciales sitios de unión al promotor de el gen *ATP2A3* y que pudieran interactuar con p300.

Hadri *et al.*, (2002 y 2006), demostraron que Ets-1 es importante en la transcripción de SERCA3, en fibroblastos de ratón y células endoteliales humanas. Por lo tanto, sería interesante explorar si Ets-1 interactúa con p300 en la regulación de la expresión de SERCA3. De manera adicional, Flores-Peredo *et al.*, (2016) demostraron que Sp1 y Sp3 son importantes mediadores de la regulación transcripcional de SERCA3, en células tratadas con TSA. Xiao *et al.*, (2000), demostraron que p300 colabora con Sp1 y Sp3 en la regulación del gen *p21*. Por lo tanto, sería interesante explorar si este mecanismo transcripcional también participa en la regulación de SERCA3 mediada por p300.

Con la intención de analizar si la metilación del ADN, otro mecanismo epigenético, pudiera estar involucrado en la regulación de la expresión del gen *ATP2A3* en células AS-30D, se analizó el patrón de metilación en células sin tratamiento y se comparó con hígado control de rata. Los resultados de secuenciación, en ADN modificado con bisulfito de sodio, muestran una marcada hipermetilación en las 19 CpG's analizadas en la región -500 a -150 del promotor de *ATP2A3* en células AS-30D, mientras que en hígado normal de rata esta región está hipometilada. Recientemente se ha acumulado evidencia indicando que las células cancerígenas remodelan los patrones de metilación del ADN en comparación con sus contrapartes normales. Dicha remodelación puede conllevar al aumento en la metilación de regiones reguladoras de la transcripción (promotores o enhancers) de genes clave

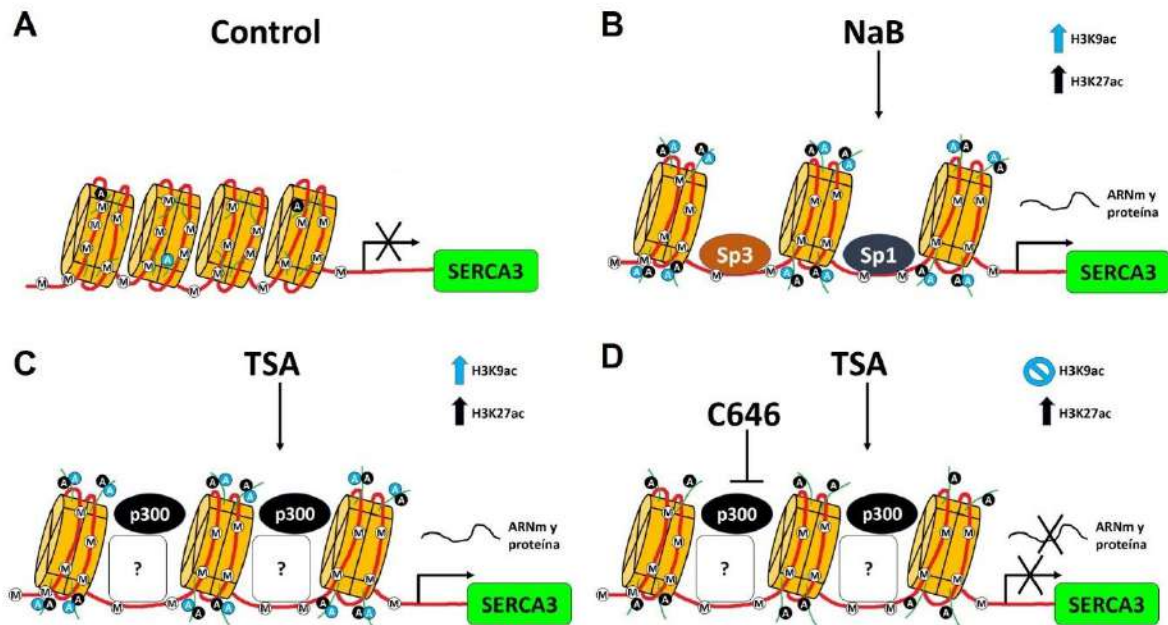
en la regulación de proliferación celular, o disminución en la metilación de regiones reguladoras de oncogenes (Hassler y Egger, 2012).

Se encontró que la 5-Aza induce la expresión del ARNm de SERCA3 en relación dosis-dependiente; sin embargo, no se observó cambio en la metilación de la región -500 a -150 del promotor del gen *ATP2A3*, a pesar de disminuir la actividad DNMT en un 40% aproximadamente. Estos resultados sugieren que 5-Aza pudiera regular la expresión de SERCA3 de manera indirecta o a través de otra región del promotor no analizada. La 5-Aza-2'-dC induce la expresión del gen *COX-2* sin disminuir la metilación en su promotor, a través de la activación del regulador transcripcional *c8orf4* (Evans *et al.*, 2016). Además, 5-Aza-2'-dC induce la expresión de Apaf-1 en células de melanoma sin cambios en la metilación del ADN de la región de -680 a +420 (Soengas *et al.*, 2001).

Poco se sabe sobre el papel de la metilación del ADN en la regulación de la expresión de las enzimas SERCA2 y SERCA3. En la literatura se reporta que el promotor de SERCA2 está hipermetilado en muestras de cáncer oral de humanos y el tratamiento de líneas celulares derivadas de estos tumores con 5-Aza induce la expresión de SERCA2 (Endo *et al.*, 2004). Sin embargo, en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, los tratamientos con 5-Aza 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$  por 72 horas, no mostraron efecto alguno sobre la expresión de SERCA2b y SERCA3a (Contreras-Leal *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que no hay relación entre la metilación del promotor de SERCA3 y la disminución de su expresión en muestras de cáncer de cuello, colon, pulmón y sistema nervioso central (Korosec *et al.*, 2008; Korosec *et al.*, 2009).

Tomando los resultados de acetilación de histonas y metilación del ADN en el promotor de SERCA3 se propone el siguiente modelo (Figura 25). Partiendo de una condición control en las células AS-30D, donde hay niveles basales de acetilación en H3K9 y H3K27 en el promotor de SERCA3, así como una región de su promotor hipermetilada (Figura 25A), se logró inducir la expresión del ARNm y proteína de SERCA3 con dos HDACi, con algunas diferencias y similitudes en sus mecanismos. Por un lado, el tratamiento con NaB (Figura 25B), incrementó los niveles de

acetilación en H3K9 y H3K27, aumentó la presencia de los factores de transcripción Sp1 y Sp3, sin cambios en la metilación de la región del promotor analizada (Anexo 1). Por otro lado, de manera similar al tratamiento con NaB, el de TSA también incrementó los niveles de acetilación de H3K9 y H3K27 y no cambió el patrón de metilación del promotor (Anexo 2), sin embargo, a diferencia del tratamiento con NaB, se observó un incremento en el reclutamiento del coactivador transcripcional y HAT, p300 (Figura 25C), el cual resultó ser importante en la expresión basal y mediada por TSA del ARNm y proteína de SERCA3, así como en la acetilación de H3K9 en su promotor (Figura 25D).



**Figura 25. Mecanismo de regulación del gen *ATP2A3* por NaB y TSA.** La línea roja representa la doble cadena de ADN, los cilindros amarillos representan el octámero de histonas, las lisinas 9 y 27 acetiladas de la histona H3 se representan en círculos azules y negros respectivamente, las CpGs metiladas se representan con círculos blancos.

Finalmente se analizó si el tratamiento con NaB o TSA remodelan el manejo de  $Ca^{2+}$  intracelular. NaB y TSA incrementan significativamente las concentraciones basales de  $Ca^{2+}$ , pero únicamente el tratamiento con TSA tiene un incremento significativo en el  $Ca^{2+}$  liberado del retículo endoplásmico. Estos resultados son en parte similares a lo reportado por Gelebart *et al* (2002), quienes observaron que el NaB, incrementa la concentración basal de  $Ca^{2+}$  en células KATO III, debido, en parte, a

la disminución de la expresión de la enzima SERCA2b. A diferencia de lo reportado por Gelebart *et al* (2002) y Flores-Peredo *et al* (2016), el tratamiento con NaB o TSA no disminuye la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del retículo endoplásmico, por el contrario, el tratamiento con TSA incrementa de manera significativa el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por tapsigargina, mientras que NaB, si bien no induce un aumento significativo, tampoco lo disminuye. El incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado con TSA pudiera deberse, en parte, al incremento de la expresión de SERCA3, sin embargo, es difícil adjudicar el aumento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  únicamente al incremento en la expresión de SERCA3 mediada por ambos inhibidores, ya que las enzimas SERCA son una parte de todo un complejo de proteínas que regula el manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

## 10. CONCLUSIONES

La expresión de SERCA3 es menor en muestras de CHC en comparación con hígado normal de humano, así como en muestras de CHC en comparación con tejido cirrótico no tumoral del mismo paciente. Pacientes con alta expresión de SERCA3 sobreviven más, en comparación con pacientes con baja expresión de este gen, independientemente del consumo de alcohol o infección por el virus de hepatitis.

Los tratamientos con NaB y TSA inducen la expresión del ARNm de SERCA3 a través de un incremento en la acetilación de la lisina 9 y 27 de la histona H3. El tratamiento con NaB además, incrementa el reclutamiento de los factores de transcripción Sp1 y Sp3, mientras que el tratamiento con TSA incrementa los niveles de p300, en el promotor de SERCA3. Al inhibir específicamente a p300 disminuye la expresión basal de SERCA3; mientras que en células tratadas con TSA, se mitiga la inducción del ARNm de SERCA3 y se inhibe la acetilación de la lisina 9.

Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor de ADN metil-transferasas 5-Azacidina incrementa la expresión del ARNm de SERCA3. Sin embargo, no disminuye la metilación de CpGs en su promotor, sugiriendo que la metilación del ADN, en la



región analizada, no tiene un papel importante en la regulación transcripcional de *ATP2A3* (SERCA3).

La expresión de SERCA2b no mostró cambio significativo con ambos inhibidores de desacetilasas de histonas, así como con el inhibidor de ADN-metil transferasas, sugiriendo que la acetilación/desacetilación de histonas y la metilación del ADN no regulan su expresión.

## **11.PERSPECTIVAS**

Los resultados obtenidos en este proyecto dan cabida a dos temas por investigar. Por un lado, falta determinar que otra(s) HAT participa(n) en el proceso de acetilación de lisina 9 y 27 de la histona 3 en las células AS-30D tratadas con NaB y lisina 27 en células tratadas con TSA. Por otro lado, se sabe que p300 no se une directamente al ADN; en este sentido sería interesante determinar con que proteína(s) interactúa para unirse al promotor de SERCA3 en células tratadas con TSA.

## 12. REFERENCIAS

- Ait-Ghezali, L., Arbabian, A., Jeibmann, A., *et al.* Loss of endoplasmic reticulum calcium pump expression in choroid plexus tumors. *Neuropathol App Neurobiol*, 2014; 40: 726-735.
- Amaya, M. y Nathanson, M. Calcium signaling in the liver. *Comprehensive Physiology*, 2013; 3: 515-539.
- Arbabian, A., Brouland, J.P., Apáti, Á., *et al.* Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J*, 2013; 280: 5408-5418.
- Ashby, M. y Tepikin, A. ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Cell and Developmental Biology*, 2001; 12: 11-17.
- Bartel, D. MicroRNA target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009; 136(2): 215-233.
- Bergner, A., Kellner, J., Tufman, A., *et al.* Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-homeostasis is altered in small and non-small cell lung cancer cell lines. *J Exp Clinical Cancer Res*, 2009; 28(25): 1-7.
- Berridge, M., Lipp, P., Bootman, M. The versality and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000; 1(1): 11-21.
- Berridge, M., Bootman, M., Roderick, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003; 4(7): 517-529.
- Bostjancic, E., Zidar, N., Glavac, D. MicroRNAs and cardiac sarcoplasmic reticulum calcium ATPase-2 in human myocardial infarction: expression and bioinformatic analysis. *BMC Genomics*, 2012; 13: 552.
- Bowers, E.M., Yan, G., Mukherjee, C., *et al.* Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chemistry and Biology*, 2010; 17: 471-482.
- Bradbury, C.A., Khanim, F.L., Hayden, R., *et al.* Histone deacetylase in acute myeloid leukemia show distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, 2005; 19: 1751-1759.
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J., Ozturk, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 1991; 350(6317): 429-431.
- Brini, M., Carafoli, E. Calcium pumps in health disease. *Phys Rev*, 2009; 89:1341-1378.

Brouland, J.P., Gélébart, P., Kovacs, T., *et al.* The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *American J Pathol*, 2005; 167:233-242.

Carr, B.I. Tumores de hígado y vías biliares. En: Longo, D.L., Kasper, D.L., Jameson, J., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Loscalzo, J. eds. *Harrison. Principios de Medicina Interna, 18e.* New York, NY: McGraw-Hill; 2012. Disponible en: <http://harrisonmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=865&Sectionid=68932052>. Consultado el 11-03-2016.

Chao, T.S., Abe, M., Hershenson, M.B., Gomes, I., Rosner, M.R. Src tyrosine kinase mediates stimulation of Raf-1 and Mitogen-activated Protein kinase by tumor promoter thapsigargin. *Can Res*, 1997; 57: 3168-3173.

Chen, Z.Y., Rex, S., Tseng, C.C. Krüppel-like factor 4 is transactivated by butyrate in colon cancer cells. *J Nutr*, 2004; 134: 792-798.

Chen, Y.J., Wang, Y.N., Chang, W.C. ERK2-mediated C-terminal Serine Phosphorylation of p300 Is Vital to the Regulation of Epidermal Growth Factor-induced Keratin 16 Gene Expression. *J Biol Chem*, 2007; 282(37): 27215-27228.

Clark, A., Befus, D., O'Hashi, P., *et al.* Guidelines on: antibody production. Canadian Council of Animal Care 2002, 40 pp. Disponible en: <https://www.medicin.uni-tuebingen.de/>

Contreras-Leal E., Hernández-Oliveras, A., Flores-Peredo, L., Zarain-Herzberg, A., Santiago-García, J. Histone deacetylase inhibitors promote the expression of *ATP2A3* Gene in breast cancer cell lines. *Mol Carcinogen*, 2016; 55(10): 1477-1485.

Contreras-Leal, E., Zarain-Herzberg, A., Santiago-García, J. Enfermedades asociadas con mutaciones y cambios en la expresión de las ATPasas-Ca<sup>2+</sup> del retículo sarco(endo)plásmico. *Rev Med UV*, 2010; 10(2):40-48.

Crump, N., Hazzalin, C., Bowers, E., Alani, R., Cole, P., Mahadevan, L. Dynamic acetylation of all lysine-4 trimethylated histone H3 is evolutionary conserved and mediated by p300/CBP. *PNAS* 2011;108(19):7814-7819.

Dancy, B.M. y Cole, P.A. Protein lysine acetylation by p300/CBP. *Chem Rev*, 2015; 115(6): 2419-2452.

Davie, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, 2003; 133: 2485S-2493S.

Davis, P., Brachmann, R. Chromatic remodeling and cancer. *Cancer Biol Therapy*, 2003; 2(1): 24-31.

De Souza, A.T., Hankins, G.R., Washington, M.K., Orton, T.C., Jirtle, R.L. MP6/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nature Genetics*, 1995; 11(4): 447-449.

Delgado-Coello, B., Santiago-García, J., Zarain-Herzberg, A., *et al.* Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase mRNA expression in murine hepatocarcinoma and regenerating liver cells. *Mol Cell Biochem*, 2003; 247:177-184.

Donohoe, D., Collins, L.B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., Bultman, S.J. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular Cell*, 2012; 48: 612-626.

Endo, Y., Uzawa, K., Mochida, Y., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., Tanzaw, H. Sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2004; 110: 225-231.

Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018: GLOBOCAN 2018. Consultado el 1 de Febrero del 2019, disponible en: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/liver-new.asp>

Evans, I.C., Barnes, J.L., Garner, I.M., *et al.* Epigenetic regulation of cyclooxygenase-2 by methylation of c8orf4 in pulmonary fibrosis. *Clin Sci*, 2016; 130: 575-586.

Flores-Peredo, L., Rodríguez, G., Zarain-Herzberg, A. Induction of cell differentiation activates transcription of the sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 3 gene (ATP2A3) in gastric and colon cancer cells. *Mol Carcinog*, 2017; 56(2):735-750.

Gates, L., Shi, J., Rohira, A., *et al.* Acetylation of histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *J Biol Chem*, 2017;292(35):14456-14472.

Gèlébart, P., Kovács, T., Brouland, J.P., *et al.* Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. *J Biol Chem*, 2002; 277(29): 26310-26320.

Ghebraniou, N., Sell, S. The mouse equivalent of the human p53ser249 mutation p53ser246 enhances aflatoxin hepatocarcinogenesis in hepatitis B surface antigen transgenic and p53 heterozygous null mice. *Hepatology*, 1998, 27, 967–973.

Grimson, A., Farh, K, Johnston W, *et al.* MicroRNA Targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, 2007; 27: 91-105.

Hadri, L., Pavoine, C., Lipskaia, L., Yacoubi, S., Lompré, A.M. 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*, 2006; 394: 27-33.

Hadri, L., Ozog, A., Soncin, F., Lompré, A.M. 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*, 2002; 277(39):36471-36478.

Hakii, H., Fujiki, H., Sugganuma, M., *et al.* Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type 7 tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1986; 111(3): 177-181-

Hassler, M.R. y Egger, G. Epigenomics of cancer-emerging new concepts. *Biochimie*, 2012; 94: 2219-2230.

Hays, T., Rusyn, I., Burns A.M. *et al.* Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) in bezafibrate-induced hepatocarcinogenesis and cholestasis. *Carcinogenesis*, 2005; 26, 219–227.

Hernández-Oliveras, A., Izquierdo-Torres, E., Meneses-Morales, I., Rodríguez, G., Zarain-Herzberg, A., Santiago-García, J. Histone deacetylase inhibitors promote ATP2A3 gene expression in hepatocellular carcinoma cells: p300 as a transcriptional regulator. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019; 133: 8-16.

Huang, Y., Nayak, S., Jankowitz, R., *et al.* Epigenetics in breast cancer: what's new? *Breast Cancer Research*, 2011; 13: 225.

Instituto Nacional de Geografía y Estadística: INEGI 2012. Consultado el 28 de enero del 2016, disponible en: [www.inegi.com.mx](http://www.inegi.com.mx)

Izquierdo-Torres, E., Meneses-Morales, I., Rodríguez, G., Fuentes-García, G., Hernández-Oliveras, A., Zarain-Herzberg, A. Resveratrol upregulates human ATP2A3 gene expression by disrupting histone H3 acetylation/deacetylation equilibrium in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019; 133: 37-47.

Ji, L., Minna, J., Roth, J. 3p21.3 tumor suppressor cluster: prospects for translational applications. *Future Oncol*, 2005; 1: 79-92.

Jin, Q., Yu, L., Wang, L., *et al.* Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J*, 2011; 30: 249-262.

Kawate, S., Takenoshita, S., Ohwada, S., *et al.* Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 1999; 14(1): 127-131.

Kim, H.J., Bae, S.C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Trans Res*, 2011; 3(2): 166-179.

Kobayashi, H., Mei-Tan, E., Fleming, SE. Acetylation of histones associated with the p21<sup>WAF1/CIP1</sup> gene by butyrate is not sufficient for p21<sup>WAF1/CIP1</sup> gene transcription in human colorectal adenocarcinoma cells. *In J Cancer*, 2004; 109: 207-213.

Kondo, Y., Shen, L., Issa, J.P. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol*, 2003; 23(1): 206-215.

Korosec, B., Glavac, D., Volavsek, M., Ravnik-Glavac, M. Alterations in genes encoding sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pumps in association with head and neck squamous cell carcinoma. *Canc Genet Cytogenet*, 2008; 181: 112-118.

Korosec, B., Glavac, D., Volavsek, M., Ravnik-Glavac, M. ATP2A3 gene is involved in cancer susceptibility. *Canc Genet Cytogenet*, 2009; 188: 88-94.

Kusner, L., Mygland, A., Kaminski, H. Ryanodine receptor gene expression thymomas. *Muscle Nerve* 1998; 21: 1299-1303.

Lee, W., Roberts-Thomson, S., Monteith, G. Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 337: 779-783.

Li, J., Wang, W., Liu, C., *et al.* Critical role of histone acetylation p300 in human placental 11 $\beta$ -HSD2 expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013; 98(7): E1189-E1197.

Li, X., Guo, Y., De, W. DNA methylation and microRNAs in cancer. *World J of Gastroenterology*, 2012; 18(9): 882-888.

Li, Y. y Tollefsboll, T.O. DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Biol Mol*, 2011; 791: 11-21.

Lipskaia, L., Hulot, J.S., Lompré, A.M. Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation. *Eur J Physiol*, 2009; 457: 673-685.

Liu, L., Boivin, G., Prasad, V., *et al.* Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of Atp2a2, encoding the Sarco(endoplasmicreticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2 Ca<sup>2+</sup>pump. *J BiolChem*, 2001; 276(29): 26737-26740.

- López-Atalaya, J.P., Ito, S., Valor, L.M., Benito, E., Barco, A. Genomic targets, and histone acetylation and gene expression profiling of neural HDAC inhibition. *Nucl Acids Res*, 2013; 14(17): 8072-8084.
- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., *et al.* Functional comparison between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 1992; 267:14483-9.
- Macian, F., García-Rodríguez, C., Rao, A. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J*, 2000; 19(17):4783-4795.
- MacLennan, D. Brandl, C.J., Korczak, B., *et al.* Amino-acid sequence of a  $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, 1985; 316: 696-700.
- Martin, N. y Bernard, D. Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium*, 2018; 70: 16-23.
- Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., *et al.* Three novel sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) 3 isoforms. *J Biol Chem*, 2002; 277(27):24442-24452.
- Meneses-Morales, I., Izquierdo-Torres, E., Flores-Peredo, L., Rodríguez, G., Hernández-Oliveras, A., Zarain-Herzberg, A. Epigenetic regulation of the human ATP2A3 gene promoter in gastric and colon cancer cell lines. *Mol Carcinog*, 2019; 58(6): 887-897.
- Messeguer, X., Escudero, R., Farré, D., Nuñez, O., Martínez J., Alba M. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 2002; 18(2): 333-334.
- Monteith, G., McAndrew, D., Faddy, H., *et al.* Calcium and cancer: targeting  $\text{Ca}^{2+}$  transport. *Nat Rev Cancer*, 2007; 7:519-530.
- Murakami, Y., Hayashi, K., Hirohashi, S., *et al.* Aberrations of the tumor suppressor gene p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 1991; 51(20): 5520-5525.
- Ozen, C., Yildiz, G., Dagcan, A.T., *et al.* Genetics and epigenetics of liver cancer. *Nature Biotechnol*, 2013; 30(4): 381-384.
- Pacifico, F., Ulianich, L., De Micheli, S., *et al.* The expression of the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation. *J Mol End*, 2003; 30: 399-409.
- Papp, B., Brouland, J.P. Altered endoplasmic reticulum calcium pump expression during breast tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)*, 2011; 5:163-174.

Papp, B., Brouland, J.P., Arbabian, A., Gélébart, P., Kovács, T., Bobe, R., Enouf, J., Varin-Blank, N., Apáti, A. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules*, 2012; 2(1): 165-186.

Park, T.J., Kim, J.Y., Oh, S.P. *et al.* TIS21 negatively regulates hepatocarcinogenesis by disruption of cyclin B1-Forkhead box M1 regulation loop. *Hepatology*, 2010; 47, 1533–1543.

Penna, E., Orso, F., Taverna, D. miR-214 as a key hub that controls cancer networks: small player, multiple function. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015; 135: 960-969.

Pitot, H.C., Dragan, Y.P. Facts and theories of concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J*, 1991; 5: 2280-2286.

Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001; 1:29:45

Puisieux, A., Ozturk, M. TP53 and hepatocellular carcinoma. *Path Biol*, 1997; 45(10): 864-870.

Rasmussen, C. y Means, A. Calmodulin is required for cell-cycle progression during G<sub>1</sub> and mitosis. *The EMBO J*, 1989; 8(1): 73-82.

Reisner, P., Brandt, P., Vanaman, T. Analysis of plasma membrane Ca(2+)-ATPase expression in control and SV40-transformed human fibroblast. *Cell Calcium*, 1997; 21: 53-62.

Richon, W.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A., Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitors selectively induces p21<sup>WAF1</sup> expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci*, 2000; 97(18): 100014-10019.

Roderick, H., Cook, S. Ca<sup>2+</sup>signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*, 2008; 8:361-375.

Roessler, S., Jia, H.L., Budhu, A., *et al.* A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma samples. *Canc Res*, 2010; 70: 10202-10212.

Roy, D., Paul, A., Roy, A., Ghosh, R., Ganguly, P., Chaudhuri, S. Differential acetylation of histone H3 at the regulatory region of OsDREB1b promoter facilitates chromatin remodeling and transcription activation during cold stress. *PLOS ONE*, 2014; 9(6): 1-12.

Saito, K. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 1 down-regulated in human oral cancer. *Oncol Rep*, 2006; 171: 105-111.

Sakura, C. Possible involvement of inositol-1,4,5-triphosphate receptor type 3(IP3R3) in the peritoneal dissemination of gastric cancers. *Anticancer Res*, 2003; 23: 3691-3697.



Shi, K., Lin, Z., Chen, X.J., *et al.* Hepatocellular carcinoma associated microRNA expression signature: integrated bioinformatic analysis, experimental validation and clinical significance. *Oncotarget*, 2015; 6(28): 25093-25108.

Siavoshian, S., Segain, J.P., Kornprobst, M., *et al.* Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut*, 2000; 46: 507-5014.

Soares Melo, S.F., Garrone Barauna, V., José Neves, V., *et al.* Exercise training restores the cardiac microRNA-1 and -214 levels regulating Ca<sup>2+</sup> handling after myocardial infarction. *BMC Cardiovascular Disease*, 2015; 166.

Soengas, M.S., Capodieci, P., Polsky, D., *et al.* Inactivation of the apoptosis factor Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 2001; 409: 207-211.

Stasevich, T., Hayashi-Takanaka, Y., Sato, Y., *et al.* Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature*, 2014; 516:272-275.

Suzuki, T., Kimura, R., Nagai, R., Horikosi, M. Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes to Cells*, 2000; 5:29-41.

Verna, L., Whysner, J., Williams, G. N-nitrosodiethyl-amine mechanistic data and risk assesment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenecity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther*, 1996; 71: 57-81.

Wahlquist, C., Jeong, D., Rojas-Muñoz, A., *et al.* Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature*, 2014; 508: 531-535.

Walker, G.E., Wilson, E.M., Powell, D., Oh, Y. Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Activates the Human IGF Binding Protein-3 Promoter in Breast Cancer Cells: Molecular Mechanism Involves an Sp1/Sp3 Multiprotein Complex. *Endocrinology*, 2001; 142(9): 3817-3827.

Wang, H.Y., Greenawalt, D., Cui, X., *et al.* Identification of possible genetic alterations in the breastcancer cell line MCF-7 using high-density SNP genotyping microarray. *J. Carcinogenesis*.2009; 8; 6.

Wei, H., Li, Z., Wang, X., *et al.* microRNA-151-3p Regulates Slow Muscle Gene Expression by Targeting ATP2a2 in Skeletal Muscle Cells. *Cellular Physiology*, 2015; 230: 1003-1012.

White, N.R., Mulligan, P., King, P.J., Sanderson, I.R. Sodium Butyrate-Mediated Sp3 Acetylation Represses Human Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Expression in Intestinal Epithelial Cells. *JPGN*, 2006; 46: 134-141.

Wuytack, F., Raeymaekers, L., Missiaen, L., *et al.* Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, 2002; 32(5-6):279-305.

Xiao H., Hasegawa T., Isobe, K. p300 Collaborates with Sp1 and Sp3 in p21<sup>waf1/cip1</sup> Promoter Activation Induced by Histone Deacetylase Inhibitor. *J Biol Chem*, 2000; 275(2): 1371-1376.

Yakicier, M., Irmak, M.B., Romano, A. *et al.* Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 1999; 18(34): 4879-4883.

Yang, J., Kawai, Y., Hanson, R.W., Arizne, I.J. Sodium Butyrate Induces Transcription from the G<sub>ai2</sub> Gene Promoter through Multiple Sp1 Sites in the Promoter and by Activating the MEK-ERK Signal Transduction Pathway. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 25742-25752.

Zeissig, S., From, A., Mankertz, J., *et al.* Butyrate Induces Intestinal Sodium Absorption via Sp3-Mediated Transcriptional Up-Regulation of Epithelial Sodium Channels. *Gastroenerology*, 2007; 132: 236-248.

Zhang, Y., Jiang, W., Chen, C.J. *et al.* Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; 196(2): 1010-1016.

Zheng, Y., Thomas, P.M., Kelleher, N.L. Measurement of acetylation turnover at distinct lysines in human histones identifies long-lived acetylation sites. *Nat Commun*, 2013; 4: 2203.

### 13. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Representación de la regulación de la proliferación celular mediada por Ca <sup>2+</sup> .....	4
Figura 2. Homeostasis del Ca <sup>2+</sup> celular.....	6
Figura 3. Edición alterna de los mensajeros de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> .....	8
Figura 4. La expresión de los ARNm de <i>SERCA2b</i> y <i>SERCA3</i> está disminuida en células de CHC de rata AS-30D.....	10
Figura 5. Esquema de la región de alineamiento de los primers para el análisis del promotor del gen <i>ATP2A3</i> .....	21
Figura 6. La expresión de <i>SERCA3</i> disminuye en muestras de carcinoma hepatocelular.....	24
Figura 7. Análisis de las muestras de la cohorte de TCGA acorde a las clasificaciones Child-Pugh e Ishak.....	25
Figura 8. Análisis de la expresión de los genes <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en muestras de cirrosis y de carcinoma hepatocelular del mismo paciente, en dos bases de datos adicionales del Gene Expression Omnibus (GEO).....	26
Figura 9. Pacientes de cáncer hepatocelular con alta expresión de <i>SERCA3</i> muestran una mayor probabilidad de supervivencia.....	27
Figura 10. Pacientes de cáncer hepatocelular con alta expresión de <i>SERCA3</i> muestran una mayor supervivencia independientemente del consumo de alcohol o de infección por virus de hepatitis.....	28
Figura 11. El promotor del gen <i>ATP2A3</i> se encuentra hipermetilado en células AS-30D.....	30
Figura 12. La 5-azacitidina incrementa la expresión del ARNm de <i>SERCA3</i> .....	31
Figura 13. El tratamiento con 5-Aza disminuye la actividad DNMT en extractos nucleares de células AS-30D.....	32
Figura 14. El tratamiento con 5-Aza no modifica la metilación en el promotor del gen <i>ATP2A3</i> .....	32

Figura 15. Efecto del butirato de sodio y la tricostatina A en la expresión relativa del ARNm de SERCA2b y SERCA3 en células AS-30D.....	34
Figura 16. Efecto del butirato de sodio y la tricostatina A en la expresión de la proteína de SERCA2 y SERCA3 en células AS-30D.....	35
Figura 17. Curso temporal con butirato de sodio 3 mM o tricostatina A 100 nM en células AS-30D.....	37
Figura 18. NaB y TSA incrementan la acetilación en el promotor proximal del gen <i>ATP2A3</i> .....	39
Figura 19. El tratamiento con NaB incrementa los niveles de Sp1 y Sp3 en el promotor proximal del gen <i>ATP2A3</i> .....	40
Figura 20. El tratamiento con TSA incrementa los niveles de p300 en el promotor proximal del gen <i>ATP2A3</i> .....	41
Figura 21. p300 es importante en la regulación de la expresión basal de SERCA3 y mediada por TSA.....	42
Figura 22. La inhibición de p300 mitiga la acetilación de H3K9 en el promotor de SERCA3 mediada por TSA.....	43
Figura 23. Predicción de posicionamiento de nucleosomas en el promotor proximal del gen <i>ATP2A3</i> .....	47
Figura 24. Factores de transcripción con potenciales sitios de unión al promotor de el gen <i>ATP2A3</i> y que pudieran interactuar con p300.....	50
Figura 25. Mecanismo de regulación del gen <i>ATP2A3</i> por NaB y TSA.....	52
Figura 26. Modificación de las concentraciones intracelulares de Ca <sup>2+</sup> por NaB y TSA.....	67
Figura 27. El tratamiento con NaB o TSA por 24 h no modifica la metilación en el promotor del gen <i>ATP2A3</i> .....	68
<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Canales y bombas de Ca <sup>2+</sup> cuya expresión se encuentra alterada en diferentes tipos de cáncer.....	7
Tabla 2. Secuencia de los primers para SERCA2b, SERCA3, β-actina, promotor proximal del gen <i>ATP2A3</i> y el tamaño esperado de los productos.....	18

## 14. ANEXOS

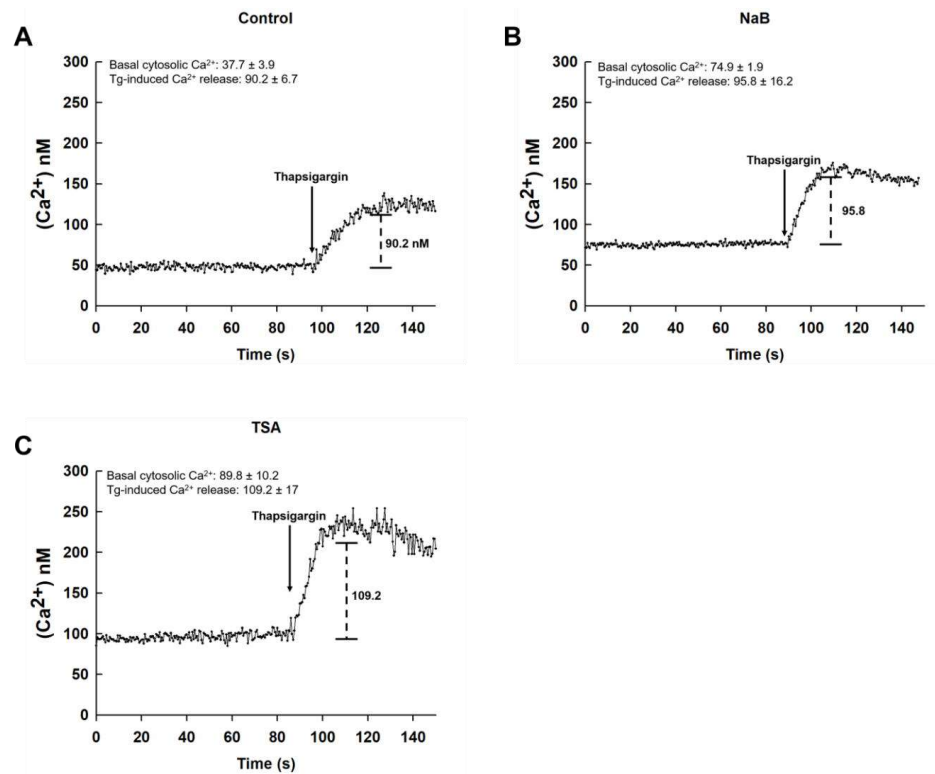
### 14.1 Anexo 1. El tratamiento con NaB y TSA modula el manejo de Ca<sup>2+</sup> en células AS-30D.

#### Materiales y métodos

La concentración de Ca<sup>2+</sup> citoplásmico se determinó por medio del indicador de calcio Fura-2 AM en células del CHC AS-30D y células AS-30D sometidas a tratamientos con los diferentes inhibidores (HDACi), de acuerdo con lo descrito por Flores-Peredo *et al.*, (2017). El indicador de calcio Fura-2 AM, disuelto en DMSO, se adicionó a las células en suspensión y se incubó a 37°C por 60 minutos. Las células se lavaron dos veces con Krebs-Ringer y la fluorescencia se midió en un fluorómetro (Aminco Bowman, Rochester, NY, USA) a 340/380 nm (excitación) y la luz emitida se detectó a 510 nm. La F<sub>min</sub> se obtuvo adicionando EGTA 2mM y la F<sub>max</sub> se obtuvo adicionando de Triton X-100 0.2%. La concentración de Ca<sup>2+</sup> dentro del retículo endoplásmico se calculó mediante la movilización de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico al citoplasma, utilizando Tapsigargina 1μM para inhibir la actividad de las enzimas SERCA.

#### Resultados

Con la intención de determinar si el tratamiento con NaB o TSA por 24 h tienen algún efecto en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, se midió la concentración basal de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la concentración total después de la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico inducida por tapsigargina, utilizando el indicador de calcio Fura2-AM (Figura 27).



**Figura 26. Modificación de las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  por NaB y TSA.** Panel A, concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal e inducida por tapsigargina en células AS-30D sin tratamiento. Panel B, concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal e inducida por tapsigargina en células AS-30D tratadas con NaB. Panel C, concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal e inducida por tapsigargina en células AS-30D tratadas con TSA. Se muestra un experimento representativo por condición, de un total de tres experimentos independientes. Los resultados de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  basales e inducidas por tapsigargina se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar.

Las células tratadas con NaB y TSA mostraron un incremento significativo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $74.9 \pm 1.9$  y  $89.8 \pm 10.2$  nM, respectivamente) en comparación con las células control ( $p < 0.001$ ), además de una diferencia significativa entre los dos tratamientos ( $p < 0.001$ ). Posteriormente se midió la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico utilizando tapsigargina, un inhibidor específico de SERCA. Los resultados mostraron únicamente un aumento significativo de  $\text{Ca}^{2+}$  en células tratadas con TSA  $109.2 \pm 17$  nM, respecto al control ( $p < 0.001$ ). Además, se observó significancia con el tratamiento de NaB ( $p < 0.01$ ).



correlaciona con la acetilación en H3K9, sin cambios en la metilación del promotor (Kondo et al 2002).

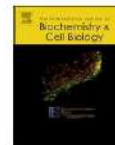
### **14.3 Anexo 3. Artículo científico de los resultados de tesis doctoral**

A continuación, se muestra el artículo científico publicado a partir de los resultados de la expresión de SERCA2 y SERCA3 en muestras de CHC humano y en células AS-30D, así como su relación con la supervivencia de pacientes con CHC. Además, se incluyeron los resultados de los tratamientos con HDACi, ChIPs y concentraciones de  $Ca^{2+}$ .





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biochemistry  
and Cell Biologyjournal homepage: [www.elsevier.com/locate/biociel](http://www.elsevier.com/locate/biociel)Histone deacetylase inhibitors promote *ATP2A3* gene expression in hepatocellular carcinoma cells: p300 as a transcriptional regulatorAndrés Hernández-Oliveras<sup>a,b</sup>, Eduardo Izquierdo-Torres<sup>c</sup>, Iván Meneses-Morales<sup>d</sup>,  
Gabriela Rodríguez<sup>c</sup>, Ángel Zarain-Herzberg<sup>c</sup>, Juan Santiago-García<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico<sup>d</sup> Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Mexico

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
SERCA3  
Chromatin remodeling  
Liver cancer  
Sodium butyrate  
Trichostatin A

## ABSTRACT

Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (SERCA) expression is reduced or absent in several types of cancer and cancer cell lines; however, their expression and regulation in hepatocellular carcinoma (HCC) are unknown. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) increase SERCA3 mRNA expression in gastric and breast cancer cell lines by increasing H3K9ac and binding of Sp1 and Sp3 transcription factors to the promoter; however, the molecular mechanism is not fully understood. Our results show that *ATP2A3* (SERCA3) gene expression is decreased in human HCC samples and rat HCC AS-30D cells compared to normal liver, and HCC patients with high expression of *ATP2A3* had longer overall survival than those with low expression. Sodium butyrate (NaB) and trichostatin A (TSA) increase SERCA3 mRNA expression in AS-30D cells, whereas SERCA2b mRNA expression did not change. NaB and TSA increase H3K9ac and H3K27ac in two *ATP2A3* promoter regions. Besides, NaB treated cells increased Sp1 and Sp3 occupancy at *ATP2A3* promoter; whereas TSA treated cells showed increased p300 levels at *ATP2A3* promoter. Inhibition of p300 by C646, a specific inhibitor, mitigates SERCA3 mRNA induction by TSA, and reduces more than 70% of basal SERCA3 mRNA expression, suggesting that p300 is important for *ATP2A3* gene transcription in AS-30D cells. Moreover, inhibition of p300 decreases H3K9ac in TSA treated cells. Our results provide evidence of decreased SERCA3 expression in human HCC samples and rat AS-30D cells and a correlation of SERCA3 expression with overall survival in HCC patients. Also, reveal new insights in SERCA3 transcriptional regulation mediated by HDACi.

## 1. Introduction

Calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) regulates a broad range of cellular functions like gene expression, cell cycle, muscle contraction, cell growth and differentiation, angiogenesis, and cell death (Roderick and Cook, 2008; Monteith et al., 2007). Several proteins, including  $\text{Ca}^{2+}$  pumps, exchangers, effectors, channels, among others, modulate  $\text{Ca}^{2+}$  signaling by increasing and decreasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in time and cell-specific manner (Berridge et al., 2003). In many diseases like cancer, cells remodel the expression and activity of the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling protein machinery (Roderick and Cook, 2008; Berridge et al., 2003).

Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (SERCA) transport  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytosol into the sarco(endo)plasmic reticulum, and have

a major role in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Brini and Carafoli, 2009). There are three SERCA enzymes (SERCA1, 2, and 3) encoded by three different genes: *ATP2A1*, *ATP2A2*, and *ATP2A3* (Brini and Carafoli, 2009; Wuytack et al., 2002). The mRNA from the SERCA genes undergo splicing, generating several isoforms. *ATP2A1* encodes for SERCA1a and SERCA1b, *ATP2A2* encodes SERCA2a, SERCA2b, and SERCA2c, whereas *ATP2A3* encodes six SERCA3 isoforms (a–f) in humans and two isoforms in rats (Brini and Carafoli, 2009; Wuytack et al., 2002).

The evidence suggests that *ATP2A3* gene expression could have a major role in several types of cancer. SERCA3 expression is down-regulated in several types of cancer and cancer cell lines such as breast, oral, lung, colon, gastric, and choroid plexus (Endo et al., 2004; Brouland et al., 2005; Gélébart et al., 2002; Papp and Brouland, 2011;

**Abbreviations:** SERCA, sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase; NaB, sodium butyrate; TSA, trichostatin A; HDAC, histone deacetylase; HAT, histone acetyltransferase; H3K9ac, acetylated lysine 9 of histone 3; H3K27ac, acetylated lysine 27 of histone 3; ER, endoplasmic reticulum

\* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Luis Castelazo Ayala S/N, Xalapa, Veracruz, 91190, Mexico.  
E-mail address: [jusantiago@uv.mx](mailto:jusantiago@uv.mx) (J. Santiago-García).

<https://doi.org/10.1016/j.biociel.2019.05.014>

Received 23 February 2019; Received in revised form 22 May 2019; Accepted 25 May 2019

Available online 27 May 2019

1357-2725/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Arhajian et al., 2013; Ait-Ghezali et al., 2014; Contreras-Leal et al., 2016; Flores-Peredo et al., 2016). Recently, we and others have demonstrated that treatment of cancer cell lines with histone deacetylase inhibitors (HDACi), like sodium butyrate (NaB) or trichostatin A (TSA) increases SERCA3 mRNA expression by increasing histone H3 acetylation at the proximal promoter of *ATP2A3* gene (Contreras-Leal et al., 2016; Flores-Peredo et al., 2016). Also, NaB and TSA increase Sp1, Sp3, and Klf4 levels at the proximal promoter of *ATP2A3* gene, suggesting that these transcription factors have a role in SERCA3 mRNA expression (Flores-Peredo et al., 2016). Despite this evidence, the molecular mechanism of SERCA3 mRNA upregulation by NaB and TSA is not fully understood. This study was aimed to determine whether NaB or TSA modulate SERCA3 mRNA expression in rat hepatocellular carcinoma cells and whether these HDACi modulate acetylation of specific lysines (K9 and K27) of histone 3 in two regions of the *ATP2A3* proximal promoter. Moreover, we explored levels of Sp1 and Sp3 transcription factors, as well as p300, a transcription co-activator and histone acetyltransferase (HAT), at the *ATP2A3* promoter.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Analysis of human *ATP2A2* and *ATP2A3* expression from Oncomine and Kaplan-Meier plotter databases

With the intention to compare *ATP2A2* and *ATP2A3* expression levels between normal liver tissue and hepatocellular carcinoma, we accessed the Oncomine database (Oncomine™ Research Edition, 2018), and performed an analysis using The Cancer Genome Atlas (TCGA) liver cancer dataset, including 97 samples of hepatocellular carcinoma, 59 samples of normal liver and 56 samples of normal blood; as well as the Roessler liver 2 dataset (Roessler et al., 2010), that includes 225 hepatocellular carcinoma samples and 220 normal liver samples. To show the association of *ATP2A2* and *ATP2A3* expression with the overall survival of liver cancer patients, a Kaplan-Meier survival plot was generated using the Kaplan-Meier plot database of mRNA-seq (KM-plot, 2018). For the analysis of *ATP2A2* gene, the data of 364 patients were divided into low expression group (217 patients) and high expression group (147 patients). Similarly, for *ATP2A3* analysis, data of 364 patients were divided into low expression group (107 patients) and high expression group (257 patients) (Szász et al., 2016).

### 2.2. Cell culture and treatments

Frozen stocks of AS-30D hepatocellular carcinoma cells were kindly provided by Dr. Jaime Mas-Oliva from the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Cells were cultured in RPMI medium with high glucose, supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.5% penicillin-streptomycin and 70 mg/L kanamycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere incubator. For the treatments with histone deacetylase inhibitors, sodium butyrate (NaB) or trichostatin A (TSA), 0.3 × 10<sup>6</sup> cells were seeded in 6-well plates. After two days in culture, the medium was changed and replaced with fresh medium with NaB 1, 2, or 3 mM; TSA 50 or 100 nM. Cells were harvest after 12, 24, 48 or 72 h of treatment and processed for RNA isolation. The medium containing the indicated inhibitors was replaced every 24 h.

### 2.3. RNA isolation, reverse transcription, and real-time RT-PCR

RNA isolation, reverse transcription, and real-time RT-PCR were performed as previously described (Contreras-Leal et al., 2016). Briefly, AS-30D cells were washed twice with cold PBS, then 1 ml of Trisure reagent was added to each well, whereas liver tissue samples (50–100 mg) were obtained from healthy adult rats and homogenized with 1 ml of Trisure reagent. Total RNA was isolated according to the instructions of the manufacturer (BioLine, Taunton, MA, USA). The RNA

concentration was determined with a Nanodrop One (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and RNA integrity was assessed by 1% formaldehyde-agarose gel.

Briefly, two µg of total RNA were reverse transcribed using 200 U of M-MLV reverse transcriptase in a final volume of 20 µl according to the specifications of the manufacturer (Invitrogen, Thermo Scientific), and then diluted to 40 µl with nuclease-free water. Real-time RT-PCR reactions were performed in triplicate with 1 µl of cDNA (equivalent to 50 ng of the initial RNA), 6 µl of 2x SensiFast SYBRGreen qPCR reaction (BioLine), 5 pmoles of primers for rat SERCA2b or panSERCA3 (Table S1), and water up to 12 µl. PCR conditions were 2 min at 95 °C, 40 cycles of 10 s at 95 °C and 60 s at 60 °C, with a final dissociation analysis, in a 7500 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions with β-actin were used for data normalization. PCR efficiencies were determined with the LinReg program, and relative mRNA expression was calculated using the model described by (Pfaffl, 2001).

### 2.4. Histone acetyltransferase activity

HAT activity assay was performed with the HAT Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 µg of nuclear extracts from control or AS-30D cells treated with NaB or TSA were incubated with HAT substrate at 37 °C. Absorbance was measured at 440 nm in a Wallac Victor<sup>2</sup> Luminometer (Perkin Elmer, Waltham, MA).

### 2.5. Chromatin immunoprecipitation

AS-30D cells treated with 3 mM NaB or 100 nM TSA for 24 h were crosslinked with 1% formaldehyde for 20 min. Crosslinking reaction was stopped with 1.25 M glycine, and cells were washed twice with PBS containing 1 mM PMSF, then lysed with lysis buffer [Tris HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS 1%, and Fast Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)]. Chromatin sonication was performed in a Bioruptor Pico (Diagenode, NJ, USA), samples were exposed to 4 sonication cycles. Protein concentration was determined in each sample, and 1 mg of the sonicated chromatin was incubated overnight at 4 °C with 2 µg of specific antibodies for H3K9Ac (Abcam ab4441), H3K27Ac (Abcam ab4729), Sp1 (Santa Cruz sc-59X), Sp3 (Santa Cruz sc-13018X), or p300 (Santa Cruz sc-32244). Immunoprecipitation was performed with One-Day ChIP kit (Diagenode), according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were performed with specific primers (Table S1) for *ATP2A3* gene promoter, spanning two regions -314 to -154 and -164 to +6 (Figure S1). Real-time PCR reactions were performed in triplicate as described above, except that 0.5% DMSO was added to the mix. Data are shown as percent of the input signal.

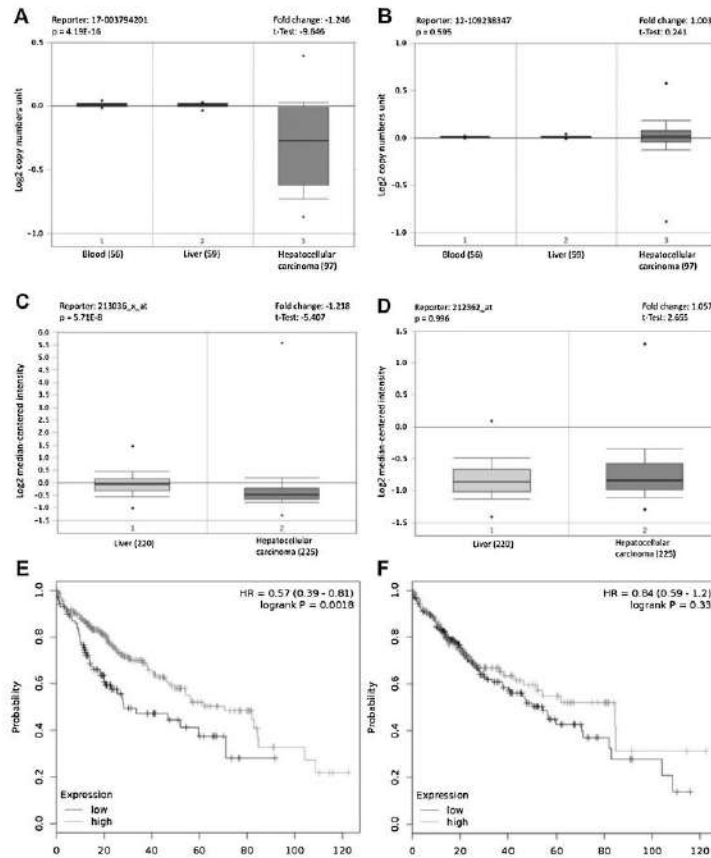
### 2.6. Spectrofluorometric determination of Ca<sup>2+</sup>

AS-30D cells treated with 3 mM NaB or 100 nM TSA for 24 h were washed twice with PBS, they were loaded with 5 µM FURA2-AM (Thermo Scientific) in Krebs buffer (120 mM NaCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 4.75 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, 1.27 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% BSA, and 0.001% pluronic acid, pH 7.4) for 45 min at 37 °C. Fluorescence was measured at 340 nm excitation, and light emission was recorded at 510 nm in an Aminco Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (Aminco Bowman, Rochester, NY, USA). Thapsigargin (50 µM) was used to measure Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum (ER).

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Tukey posthoc test in STATISTICA 7.0 software (TIBCO, CA, USA). Results are presented as mean ± standard deviation (SD), a p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.





**Fig. 1.** SERCA3 mRNA decreases in human hepatocellular carcinoma samples and its high expression correlates with longer survival of liver cancer patients. SERCA3 mRNA (A and C) and SERCA2 mRNA (B and D) expression were analyzed using the Oncomine database. Kaplan-Meier overall survival plot from liver cancer patients with high and low expression of SERCA3 (E) and SERCA2 (F).

### 3. Results

#### 3.1. SERCA3 mRNA expression is decreased in human hepatocellular carcinoma, and its low expression correlates with poor survival

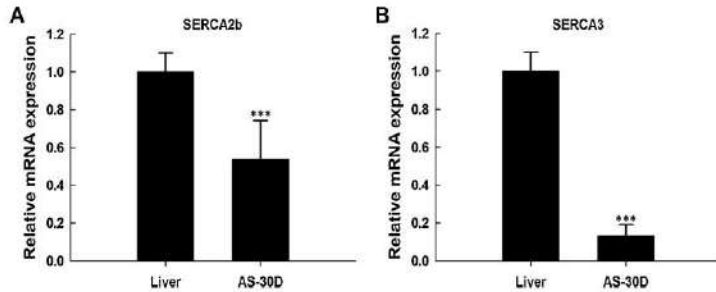
Analysis of liver cancer datasets for *ATP2A2* (SERCA2) and *ATP2A3* (SERCA3) shows a reduction of SERCA3 mRNA abundance in hepatocellular carcinoma samples compared to normal liver tissue samples (Fig. 1A and C). In contrast, SERCA2 mRNA relative expression displayed similar values between hepatocellular carcinoma and normal liver samples (Fig. 1B and D). In addition, analysis of TCGA liver cancer cohort samples according to their Ishak fibrosis stage or the Child-Pugh score showed that neither SERCA2 nor SERCA3 mRNA expression has significant difference among different liver damage stages (Fig. S2). However, SERCA3 mRNA expression is decreased in hepatocellular carcinoma samples, compared to non-tumor cirrhotic tissue of the same patients in two additional datasets (GEO GSE63898 and GSE17548) (Fig. S3A and S3C), whereas SERCA2 mRNA expression is increased (Fig. S3B and S3D).

Overall survival analysis of hepatocellular carcinoma patients with

high and low SERCA2 and SERCA3 mRNA expression showed that patients with high *ATP2A3* expression survived longer, with a median of 70.5 months, compared to patients with low *ATP2A3* expression, with a median of 28.3 months,  $p = 0.0018$  (Fig. 1E). Also, HCC patients with high *ATP2A3* expression survive longer, independently of alcohol consumption or hepatitis virus infection (Fig. S4). In contrast, patients with high or low *ATP2A2* expression showed no significant difference in overall survival, with a median of 84.4 and 54.1 months, respectively,  $p = 0.33$  (Fig. 1F and S4).

#### 3.2. SERCA2b and SERCA3 mRNA expression is downregulated in rat hepatocellular carcinoma AS-30D cells

We quantified the relative mRNA expression of SERCA2b and SERCA3 in rat hepatocellular carcinoma AS-30D cells and control rat liver tissue. We found a reduction of SERCA2b (Fig. 2A) and SERCA3 (Fig. 2B) mRNA levels in AS-30D cells, compared to control rat liver ( $0.53 \pm 0.2$  and  $0.13 \pm 0.05$ , respectively,  $p < 0.001$ ).



**Fig. 2.** Downregulated SERCA2b and SERCA3 mRNA expression in rat hepatocellular carcinoma AS-30D cells. SERCA2b (A) and SERCA3 (B) mRNA expression were analyzed by qRT-PCR in AS-30D cells and compared to normal rat liver. Data are presented as mean  $\pm$  SD of eight independent experiments performed in triplicate, \*\*\* $p$  < 0.001 compared to control.

### 3.3. NaB and TSA increase SERCA3 mRNA expression in AS-30D cells

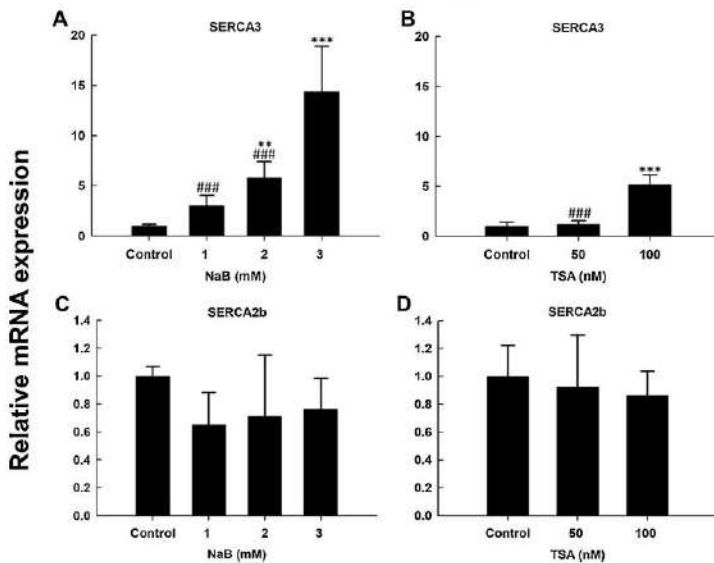
Once established that both SERCA2b and SERCA3 mRNA were downregulated in AS-30D cells, we further investigate whether NaB and TSA regulate SERCA2b and SERCA3 mRNA expression. To achieve this, AS-30D cells were treated with different concentrations of NaB or TSA for 48 h. NaB increased SERCA3 mRNA expression in a dose-dependent manner to  $3.01 \pm 1.05$ ,  $5.7 \pm 1.6$  ( $p < 0.01$ ), and  $14.3 \pm 4.5$  ( $p < 0.001$ ) with 1, 2, and 3 mM NaB, respectively (Fig. 3A). Cells treated with 3 mM NaB also showed a significant difference to those treated with 1 and 2 mM ( $p < 0.001$ ). In addition, 100 nM TSA upregulates SERCA3 mRNA to  $5.1 \pm 0.1$  above control cells ( $p < 0.001$ ), whereas TSA 50 nM shows no difference (Fig. 3B). Cells treated with 100 nM TSA displayed a significant difference to those treated with 50 nM TSA ( $p < 0.001$ ). In contrast, NaB or TSA treatment shows no induction of SERCA2b mRNA expression compared to control cells (Fig. 3C and D).

We performed a time course treatment of AS-30D cells during 12–72 h, to evaluate whether the effect of 3 mM NaB or 100 nM TSA on SERCA3 expression was time dependent. Results show that NaB and TSA increase SERCA3 mRNA expression at 12 h of treatment to  $22.3 \pm 1.6$  and  $7.09 \pm 1.8$  fold, respectively ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4).

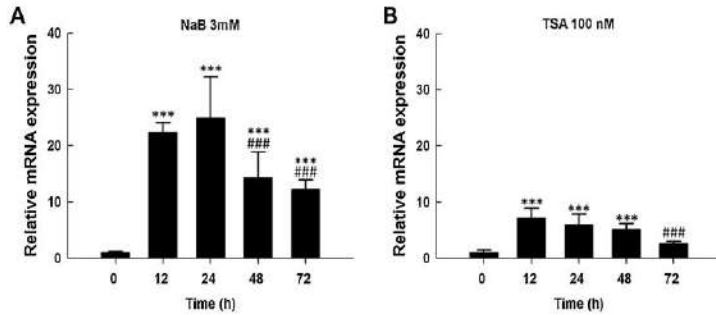
Treatment of AS-30D cells for 24 h increased SERCA3 mRNA expression to  $24.9 \pm 7.17$  and  $5.9 \pm 1.8$  fold above control cells ( $p < 0.001$ ) with NaB and TSA, respectively. However, no statistical difference was found between cells treated during 12 or 24 h. Moreover, treatment for 48 h or 72 h shows a lower induction of SERCA3 mRNA to NaB and TSA, compared to 12 h and 24 h ( $12.1 \pm 1.7$ ,  $p < 0.001$  and  $2.5 \pm 0.43$ ,  $p = 0.07$ , respectively) (Fig. 4).

### 3.4. NaB and TSA increase H3K9 and H3K27 acetylation at the proximal promoter of the ATP2A3 gene

To explore if SERCA3 mRNA upregulation by NaB and TSA was associated with changes on histone acetylation of the ATP2A3 gene promoter, we first performed a HAT activity assay with nuclear extracts from AS-30D cells treated with 3 mM NaB or 100 nM TSA for 24 h. Both NaB and TSA increase HAT activity to  $140\% \pm 10.1$  and  $148\% \pm 8.6$ ,  $p < 0.05$ , respectively, compared to untreated cells (Fig. 5A). Next, we evaluated by ChIP assays whether the increased HAT activity modulates chromatin acetylation at the ATP2A3 promoter, using specific antibodies to H3K9ac and H3K27ac, followed by real-time PCR reactions with primers covering two regions of the ATP2A3 promoter, -314 to -154 and -164 to +6 (Fig. S1). Compared to control cells, we found a



**Fig. 3.** NaB and TSA treatment increase SERCA3 mRNA expression in AS-30D cells, whereas SERCA2b mRNA expression shows no change. AS-30D cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of NaB (A and C) or TSA (B and D) and mRNA levels were measured by qRT-PCR. Data are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. \* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 indicate significance compared to control, ### $p$  < 0.001 indicate significance compared with 3 mM NaB in panel A and TSA 100 nM in panel B.



**Fig. 4.** NaB and TSA up-regulate SERCA3 mRNA expression in a time-dependent manner in AS-30D cells. AS-30D cells were treated with 3 mM NaB (A) or 100 nM TSA (B) for 12, 24, 48, and 72 h. Data are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate, \*\*\* $p$  < 0.001 indicate significance compared to control, ### $p$  < 0.001 indicate significance compared to 24 h in panel A and panel B.

significant increase of H3K9ac at both regions of the *ATP2A3* promoter in cells treated with NaB ( $p$  < 0.001) (Fig. 5B and C), whereas TSA increased H3K9ac only at the -314 to -154 promoter region,  $p$  < 0.01 (Fig. 5B). Similarly, an increase of H3K27ac was found in cells treated with NaB and TSA at both promoter regions (Fig. 5D and E). A larger effect was observed with NaB than TSA, and H3K27ac also showed higher levels than H3K9ac (Fig. 5).

### 3.5. NaB increases Sp1 and Sp3 binding at the proximal promoter of *ATP2A3* gene

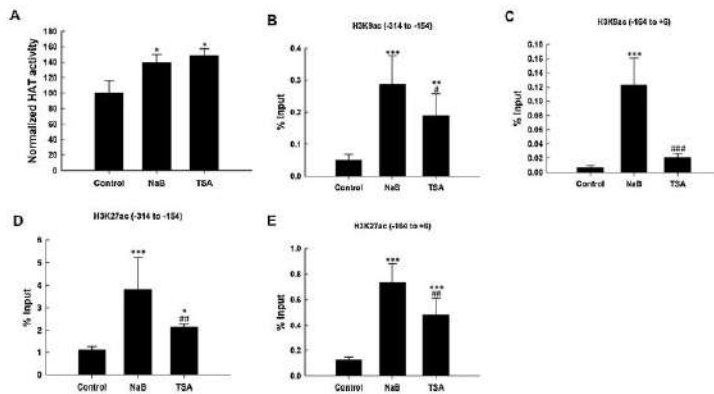
It has been shown that Sp1 and Sp3 transcription factors regulate SERCA3 mRNA expression. Particularly, (Hadri et al., 2002) showed that Sp1 binding between -97 to +153 of *ATP2A3* gene was essential for its basal transcription, and KATO-III cells treated with NaB or TSA increase Sp1 and Sp3 recruitment to the *ATP2A3* gene proximal promoter (-162 to +39) (Flores-Peredo et al., 2016). *In silico* analysis showed the presence of one Sp1/Sp3 putative DNA binding site at -314 to -154 region, as well as two Sp1/Sp3, one Sp1, and one Sp3 putative DNA binding sites at -164 to +6 of the rat *ATP2A3* promoter (Fig. S1). Therefore, we evaluate whether Sp1 or Sp3 binding increased at the *ATP2A3* gene promoter after NaB or TSA treatment. ChIP results show an increase of Sp1 binding to the -164 to +6 region in cells treated with NaB,  $p$  < 0.001 (Fig. 6B); whereas Sp3 binding increased at the -314 to -154 region with the NaB treatment ( $p$  < 0.05, Fig. 6C). TSA treated cells display no difference in Sp1 or Sp3 binding to the two promoter regions compared with control cells.

### 3.6. p300 is important for basal and TSA-mediated SERCA3 mRNA expression in AS-30D cells

We further investigate which other mechanisms could be involved in the up-regulation of SERCA3 mRNA mediated by NaB or TSA. p300, a well-known HAT, was recently associated with increased acetylation of H3K9 and H3K27 (Qiao et al., 2015; Jin et al., 2011; Li et al., 2013; Hilton et al., 2015). Thus, we tested the binding of p300 to the *ATP2A3* promoter after NaB or TSA treatment. Results showed a marked increase of p300 recruitment to both *ATP2A3* promoter regions after TSA treatment ( $p$  < 0.001), compared to control cells; whereas NaB treated cells show no difference compared to control (Fig. 7A and B). We next examine the role of p300 in TSA-mediated SERCA3 mRNA expression using the specific p300 inhibitor, C646 (Bowers et al., 2010). Results of real-time PCR show that C646 decreased the basal SERCA3 mRNA expression compared to untreated cells (Fig. 7C). Moreover, TSA-mediated SERCA3 mRNA up-regulation was abolished by C646 ( $p$  < 0.001). This result is the first evidence showing the role of p300 in the regulation of SERCA3 mRNA expression.

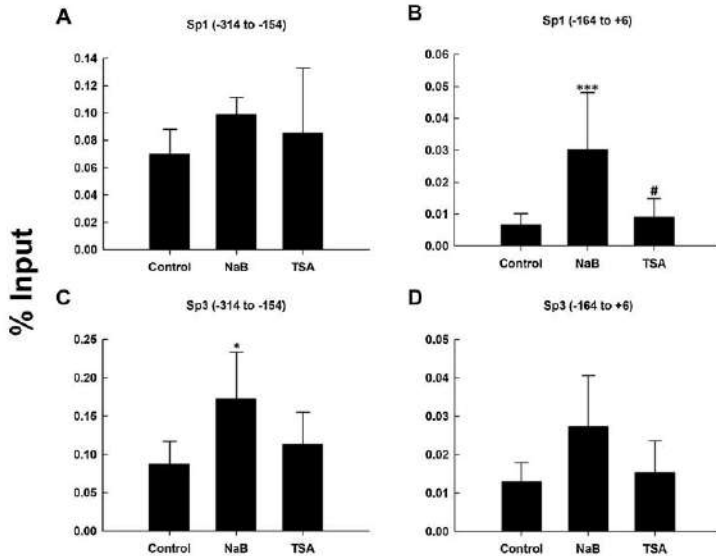
### 3.7. Inhibition of p300 decrease acetylation of H3K9 at *ATP2A3* gene promoter in TSA treated cells

Once established that p300 is involved in basal and TSA-mediated up-regulation of SERCA3 mRNA, we investigated whether p300 inhibition by C646 has any effect on H3K9 and H3K27 acetylation observed in TSA treated cells (Fig. 5). ChIP results from AS-30D cells treated with TSA or TSA + C646 showed a significant reduction of H3K9ac at the two promoter regions when p300 was inhibited,



**Fig. 5.** NaB and TSA treatment modulates H3 acetylation at the proximal promoter region of *ATP2A3* gene. AS-30D cells were treated with 3 mM NaB or 100 nM TSA for 24 h; then chromatin was processed for ChIP assays using antibodies specific to H3K9ac or H3K27ac, followed by real time-PCR. HAT activity assay performed in nuclear extracts of AS-30D cells treated with NaB or TSA (A). ChIP results of H3K9ac in two regions of the proximal *ATP2A3* promoter (B and C). ChIP results of H3K27ac in the same promoter regions (D and E). Data are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001 indicate significance compared to control, # $p$  < 0.05, ## $p$  < 0.01, ### $p$  < 0.001 indicate significance compared to NaB in panels B, C, D, and E, respectively.





**Fig. 6.** NaB treatment modulates Sp1 and Sp3 recruitment to the proximal promoter of *ATP2A3* gene. AS-30D cells were treated with 3 mM NaB or 100 nM TSA for 24 h; then chromatin was processed for ChIP assays using antibodies specific to Sp1 or Sp3, followed by real time-PCR. ChIP results of Sp1 (A and B) and Sp3 (C and D) are shown. Data are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. \* $p < 0.05$ , and \*\*\* $p < 0.001$  indicate significance compared to control, # $p < 0.05$  indicate significance compared to NaB in panel B.

compared to TSA treated cells,  $p < 0.001$  (Fig. 7D and E). In contrast, no significant effect was found on H3K27ac at both promoter regions analyzed (Fig. S5A and S5B).

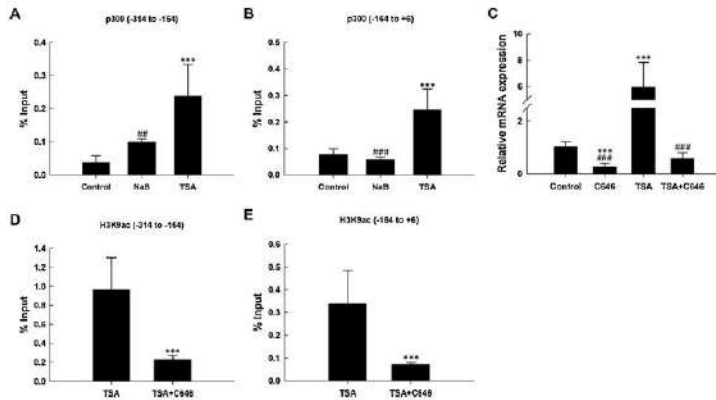
**3.8. NaB and TSA modulate intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in AS-30D cells**

To determine the effects of NaB and TSA on the intracellular  $Ca^{2+}$  handling, we measured the basal cytosolic  $Ca^{2+}$  and thapsigargin-induced  $Ca^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum in AS-30D cells. A significant increase in basal cytosolic  $Ca^{2+}$  was found in NaB and TSA treated cells ( $74.9 \pm 1.9$  nM and  $89.8 \pm 10.2$  nM, respectively) compared to untreated cells ( $37.7 \pm 3.9$  nM),  $p < 0.001$ , (Fig. 8). Moreover, TSA treated cells displayed a significant increase in thapsigargin-induced  $Ca^{2+}$  release ( $109.2 \pm 17$  nM,  $p < 0.001$ , Fig. 8C), compared to control cells ( $90.2 \pm 6.7$  nM, Fig. 8A). In contrast, NaB treated cells

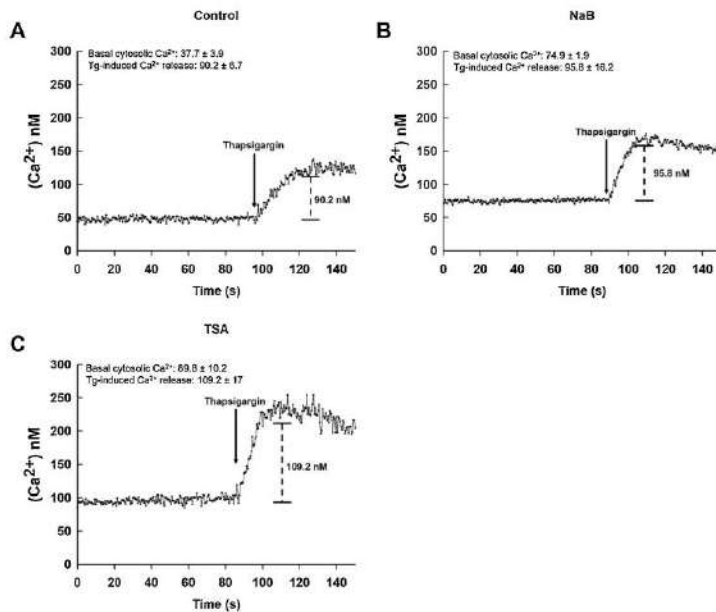
showed no significant difference in thapsigargin-induced  $Ca^{2+}$  release ( $95.8 \pm 16.2$  nM, Fig. 8B).

**4. Discussion**

The importance of SERCA2 and SERCA3 in hepatocellular carcinoma has not been established. Analysis of liver cancer datasets in Oncomine database showed lower *ATP2A3* expression levels in human hepatocellular carcinoma samples compared to normal liver tissue, whereas *ATP2A2* expression remains similar to normal liver. Interestingly, no difference in SERCA2 or SERCA3 mRNA expression was found among different stages of Ishak fibrosis stage or Child-Pugh score of liver function in TCGA liver cancer samples. However, SERCA3 mRNA expression is decreased and SERCA2 mRNA expression is increased in HCC compared to non-tumor cirrhotic tissue of the same patients, in two additional datasets, suggesting that alteration of



**Fig. 7.** p300 is involved in *ATP2A3* basal transcription and TSA-mediated upregulation. AS-30D cells were treated with 3 mM NaB, 100 nM TSA or TSA + C646 (100  $\mu$ M) for 24 h, then chromatin was processed for ChIP assays using a specific antibody to p300 (A and B). AS-30D cells were treated with 100 nM TSA, 100  $\mu$ M C646, or both for 24 h, then RNA was isolated and used for qRT-PCR experiments (C). ChIP results obtained for H3K9ac in TSA and cells treated with TSA + C646 (D and E). Data are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$ , indicate significance compared to control and in panels D and E indicate significance compared to TSA, ## $p < 0.01$  indicate significance compared to TSA in panel A, and ### $p < 0.001$  indicate significance compared to TSA in panel B and C.



**Fig. 8.** Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in control and AS-30D cells treated with NaB or TSA. To determine basal cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , control and AS-30D cells treated with NaB or TSA for 24 h were incubated with the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator FURA 2-AM, once the signal was stabilized, endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  content was determined by adding thapsigargin (Tg), a specific SERCA inhibitor. Data are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate.

SERCA2 and SERCA3 expression could take place during the transition of cirrhosis to HCC. Moreover, high expression of *ATP2A3* gene correlates with longer survival in patients with liver cancer, whereas no significant difference was found in patients' survival with high and low expression of the *ATP2A2* gene and this correlation was independent of alcohol consumption and hepatitis virus infection. These results suggest that *ATP2A3* (SERCA3) gene expression could have a role in liver cancer and patients' survival.

We also found a marked reduction of SERCA2b and SERCA3 mRNA expression in rat AS-30D cells compared to normal rat liver. Downregulation of SERCA2 and SERCA3 expression has been found in several types of cancer such as oral, breast, lung, colon, gastric, and choroid plexus (Endo et al., 2004; Brouland et al., 2005; Gélébart et al., 2002; Papp and Brouland, 2011; Arbabian et al., 2013; Ait-Ghezali et al., 2014). Moreover, an association between decreased SERCA3 expression and tumor progression has been found in breast, gastric, and choroid plexus cancer samples (Gélébart et al., 2002; Papp and Brouland, 2011; Ait-Ghezali et al., 2014).

We and others have previously shown that NaB or TSA up-regulate SERCA3 mRNA and protein expression in breast and gastric cancer cell lines (Gélébart et al., 2002; Contreras-Leal et al., 2016; Flores-Peredo et al., 2016). Here we have shown that NaB and TSA induced SERCA3 mRNA expression, in a dose- and time-dependent manner, in AS-30D cells, whereas SERCA2 mRNA levels do not change with these HDACi. Higher levels of SERCA3 mRNA were found with 3 mM NaB and 100 nM TSA after 12 or 24 h of treatment, whereas 48 and 72 h of treatment displayed a lower induction of SERCA3 mRNA. These findings are different from those reported by (Gélébart et al., 2002) who found high SERCA3 protein expression in gastric and colon cancer cells after 72 to 96 h of treatment with 3 mM NaB. Transient effect of HDACi on gene expression has been previously observed. NaB increases gastrin mRNA in a time-dependent manner with a higher effect at 48 h of treatment (Simon et al., 1997). On the other hand, p21 and BIM mRNA expression displayed a transient increase in cells treated with 200 nM TSA (Moore et al., 2004).

We found an increase in HAT activity in response to NaB and TSA treatments, as well as an increment of H3K9 and H3K27 acetylation at two *ATP2A3* promoter regions. NaB treatment increases H3K9 and H3K27 acetylation at -314 to -154 and -162 to +6, whereas TSA increased H3K9 acetylation only at -314 to -154, and H3K27 acetylation at both regions. The differential effect of NaB and TSA could be the explanation for the different SERCA3 mRNA levels induced by these HDACi. Previous reports indicate an increment of H3K9ac at -162 to +39 of the *ATP2A3* promoter region in breast and gastric cancer cell lines after treatment with NaB or TSA (Contreras-Leal et al., 2016; Flores-Peredo et al., 2016). On the other hand, Meneses-Morales et al. saw a marked increase of H3K27ac at -265 to -135 of the *ATP2A3* promoter region in KATO-III cells treated with NaB (Meneses-Morales et al., 2019). A differential promoter acetylation pattern after stimuli has been found in other promoters. Romidepsin differentially acetylates histone H3 at *ABCG2* proximal and distal promoter in S1 colon cancer cell line (To et al., 2008). (Roy et al., 2014) showed a differential acetylation pattern of H3K9, H3K14, and H3K27 between -610 to +307 of the *OsDREB1b* gene promoter after stress stimuli.

Another reported mechanism of NaB and TSA on gene expression is through increased occupancy of transcription factors such as Sp1 and Sp3 in gene promoters (Walker et al., 2001; Kuan et al., 2016). Our results showed that only NaB increases binding of Sp1 and Sp3 at the *ATP2A3* gene promoter. Notably, Sp1 levels increased at -164 to +6, whereas Sp3 levels increased at -314 to -154. (Hadri et al., 2002) showed that Sp1 is critical for the basal transcription of the mouse SERCA3 gene. Moreover, the occupancy of Sp1 and Sp3 at the *ATP2A3* gene promoter increased in KATO-III cells treated with NaB or TSA (Flores-Peredo et al., 2016). Together these results suggest that Sp1 and Sp3 are important for SERCA3 gene expression and this mechanism is conserved at least in three different species (human, mouse, and rat). Our data suggest that Sp1 and Sp3 are not involved in the *ATP2A3* mRNA upregulation by TSA; therefore, we explored which other mechanisms could be involved in TSA mediated SERCA3 upregulation and increased H3K9ac and H3K27ac to the promoter.



ChIP results showed increased p300 occupancy to both regions of the *ATP2A3* gene promoter analyzed in AS-30D cells treated with TSA. Moreover, when we chemically inhibited p300 with C646, a specific inhibitor (Bowers et al., 2010), the effect of TSA on *ATP2A3* mRNA expression was abolished entirely. Added to this, AS-30D cells treated with C646 displayed a 70% decrease in basal SERCA3 mRNA expression compared to untreated cells. These results suggest that p300 is important in TSA-mediated SERCA3 mRNA upregulation and basal *ATP2A3* transcription in AS-30D cells. In contrast, NaB treated cells showed no difference in p300 occupancy at the *ATP2A3* promoter compared to untreated cells. Our results are in agreement with those reported by (Li et al., 2013), who found that C646 reduced *11β-HSD2* gene expression due to the crucial role of p300 in this process. Recent evidence showed that p300 is important in several liver functions. (Breux et al., 2015) reported that p300 is involved in normal mouse liver development, regulating hepatocyte proliferation, as well as C/EBPα and p53 protein expression.

We further investigate the role of p300 in the acetylation of H3K9 and H3K27 at *ATP2A3* gene promoter. TSA-mediated acetylation of H3K9 was reduced in AS-30D cells treated with TSA + C646 compared to cells treated with TSA alone. In contrast, no significant effect was found in H3K27 acetylation. These results suggest that acetylation of H3K9 at the *ATP2A3* gene proximal promoter in TSA-treated cells is mediated by p300 and relevant for *ATP2A3* up-regulation. Our results are in accordance with those reported by (Li et al., 2013) and (Crump et al., 2011), who found that inhibition of p300 by C646 significantly reduced acetylation of H3K9 at the promoters of *11β-HSD2*, *c-fos*, and *c-jun* genes. TSA-treated cells displayed enrichment of H3K9ac and H3K27ac; however, C646 completely abolished TSA-mediated up-regulation of SERCA3 mRNA and TSA-mediated increase of H3K9ac, with no effect on H3K27ac. H3K27ac was associated with the recruitment of RNA Pol II, whereas H3K9ac was associated with the transition of transcription initiation to elongation (Jin et al., 2011; Stasevich et al., 2014; Gates et al., 2017). These distinct roles of H3K9ac and H3K27ac in gene regulation could explain the sustained H3K27ac in TSA + C646 treated cells despite the marked reduction in SERCA3 mRNA expression. Thus, we propose that together H3K9ac and H3K27ac are important for TSA-mediated SERCA3 up-regulation.

Many liver functions, such as bile secretion, glucose metabolism, cell proliferation, and apoptosis, are regulated by the increase and decrease of intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations (Amaya and Nathanson, 2013). We explored whether NaB and TSA treatments modulate intracellular  $Ca^{2+}$  handling in AS-30D cells. We found a significant increase of basal cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in NaB and TSA treated cells compared to untreated cells, whereas only TSA significantly increased the  $Ca^{2+}$  released from the endoplasmic reticulum. (Gélébart et al., 2002) and (Flores-Peredo et al., 2016) found an increase of the basal cytosolic  $Ca^{2+}$  and a reduction of the  $Ca^{2+}$  released from the endoplasmic reticulum in KATO-III cells treated with NaB or TSA. Nevertheless, it is difficult to attribute the difference of the intracellular  $Ca^{2+}$  handling to SERCA3 expression only, due to the presence of other  $Ca^{2+}$  handling proteins and buffering systems.

In conclusion, SERCA3 expression, a major modulator of  $Ca^{2+}$  homeostasis, is decreased in human HCC samples and the rat HCC AS-30D cell line, compared to normal liver, and high levels of SERCA3 mRNA correlate with longer HCC patient's survival. Additionally, we found a clear decrease in SERCA3 expression in HCC samples compared to cirrhotic liver. In AS-30D cells, NaB and TSA upregulate SERCA3 mRNA expression by increasing H3K9 and H3K27 acetylation and differential recruitment of transcriptional machinery proteins into the *ATP2A3* gene promoter. Notably, we describe for the first time the role of p300 in SERCA3 expression and acetylation of H3K9 at *ATP2A3* gene proximal promoter in AS-30D cells. Together, these results suggest that SERCA3 could have a role in HCC, and give new insights into the molecular mechanism of NaB and TSA-mediated SERCA3 expression. The understanding of epigenetic changes in HCC could contribute to the

development of new therapies, and our data suggest that HDACi could be an excellent alternative to reactivate some downregulated genes in HCC, such as *ATP2A3*.

## Funding

The present study was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (grant No. 2015-01-1518 to JS-G), Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (grant PAPIIT No. IN217216 to AZ-H), and AH-O was supported by a scholarship No. 443164 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

## Acknowledgments

We thank Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (LaNSE-CINVESTAV-IPN) for their technical assistance with chromatin sonication.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.bjocel.2019.05.014>.

## References

- Roderick, H.L., Cook, S.J., 2008.  $Ca^{2+}$  signaling checkpoints in cancer: remodeling  $Ca^{2+}$  for cancer cell proliferation and survival. *Nat. Rev.* 8, 361–375. <https://doi.org/10.1038/nrc2374>.
- Monteith, G.R., McAndrew, D., Faddy, H.M., Roberts-Thomson, S.J., 2007. Calcium and cancer: targeting  $Ca^{2+}$  transport. *Nat. Rev.* 7, 519–530. <https://doi.org/10.1038/nrc2171>.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Rev.* 4, 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrn1155>.
- Brini, M., Carafoli, E., 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 1341–1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2008>.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., Missiaen, L., 2002. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32, 279–305. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001847>.
- Endo, Y., Uzawa, K., Mochida, Y., et al., 2004. Sarcoendoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 110, 225–231. <https://doi.org/10.1002/ijc.20118>.
- Brouland, J.P., Gélébart, P., Kovács, T., Enouf, J., Grossmann, J., 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. *American J. Pathol.* 167, 233–242. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62968-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62968-9).
- Gélébart, P., Kovács, T., Brouland, J.-P., et al., 2002. Expression of endomembrane calcium pump in colon and gastric cancer cells: induction of SERCA3 expression during differentiation. *J. Biol. Chem.* 277, 26310–26320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201747200>.
- Papp, B., Brouland, J.-P., 2011. Altered endoplasmic reticulum calcium pump expression during breast tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)* 5, 163–174. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.37481>.
- Arbaban, A., Brouland, J.-P., Apáti, Á., et al., 2013. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J.* 280, 5408–5418. <https://doi.org/10.1111/febs.12064>.
- Ait-Ghezal, L., Arbaban, A., Jelibmann, A., et al., 2014. Loss of endoplasmic reticulum calcium pump expression in choicoid plexus tumors. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40, 726–735. <https://doi.org/10.1111/nan.12098>.
- Contreras-León, E., Hernández-Oliveras, A., Flores-Peredo, L., Zarain-Herzberg, A., Santiago-García, J., 2016. Histone deacetylase inhibitors promote the expression of *ATP2A3* gene in breast cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* 55, 1477–1485. <https://doi.org/10.1002/mc.22402>.
- Flores-Peredo, L., Rodríguez, G., Zarain-Herzberg, A., 2016. Induction of cell differentiation activates transcription of the sarco/endo plasmic reticulum calcium-ATPase 3 gene (*ATP2A3*) in gastric and colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* 56, 735–750. <https://doi.org/10.1002/mc.22529>.
- Oncotimes Research Edition, 2018. Oncotimes® Research Edition, Oncotimes. (Accessed 20 September 2018). <https://www.oncotimes.org>.
- Roessler, S., Jin, H.L., Budhu, A., et al., 2010. A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma samples. *Cancer Res.* 70, 10202–10212. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CCR-10-2507>.
- KM-plot, 2018. Kaplan-Meier Plotter. (Accessed 2 July 2018). [http://kmplot.com/analysis/index.php?service=cancer=livr\\_rnaseq](http://kmplot.com/analysis/index.php?service=cancer=livr_rnaseq).
- Szász, A.M., Lánckzy, A., Nagy, Á., Förster, S., Hark, K., Green, J.E., Boussiotis, A.,



- Busuttill, R., Szabó, A., Györfly, B., 2016. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data from 1,065 patients. *Oncotarget* 7 (31), 49322–49333. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10337>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Hadrí, L., Ozog, A., Soncin, F., Lompré, A.M., 2002. Basal transcription of the mouse sarco (endo)plasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase type 3 gene in endothelial cells is controlled by Ets-1 and Sp1. *J. Biol. Chem.* 277 (39), 36471–36478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204731200>.
- Qiao, Y., Wang, R., Yang, X., Tang, K., Jing, N., 2015. Dual roles of histone H3 lysine acetylation in human embryonic stem cell pluripotency and neural differentiation. *J. Biol. Chem.* 290 (4), 2508–2520. <https://doi.org/10.1074/jbc.A114.603761>.
- Jin, Q., Yu, L., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, L., Lee, J., et al., 2011. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J.* 30, 249–262. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.318>.
- Li, J., Wang, W., Liu, C., Wang, W., Li, W., Qun, S., et al., 2013. Critical role of histone acetylation by p300 in human placental 11 $\beta$ -HSD2 expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (7), E1189–E1197. <https://doi.org/10.1210/jc.2012.4291>.
- Hilton, I., D'Ippolito, A., Vockley, C., Thakore, P., Crawford, G., Reddy, T., et al., 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* 33 (5), 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>.
- Bowers, E.M., Yang, G., Mukherjee, C., et al., 2010. Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chem. Biol.* 17, 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.006>.
- Simon, B., Merchant, J., Eissele, R., Köhler, K., Arnold, R., 1997. Transient transcriptional activation of gastrin during sodium butyrate induced differentiation of islets cells. *Regul. Peptides* 70, 143–148. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(97\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(97)00026-8).
- Moore, P.S., Barbi, S., Donadelli, M., et al., 2004. Gene expression profiling after treatment with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A reveals altered expression of both pro- and anti-apoptotic genes in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1693, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbancer.2004.07.001>.
- Meneses-Morales, I., Izquierdo-Torres, E., Flores-Peredo, L., Rodríguez, G., Hernández-Oliveras, A., Zarain-Hierberg, Á., 2019. Epigenetic regulation of the human ATP2A3 gene promoter in gastric and colon cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* 1–11. <https://doi.org/10.1002/mc.22978>.
- To, K.K.W., Polgar, O., Huff, L.M., Morisaki, K., Bates, S.E., 2008. Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells. *Mol. Cancer Res.* 6, 151–164. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0175>.
- Roy, D., Paul, A., Roy, A., Ghosh, R., Ganguly, P., Chaudhuri, S., 2014. Differential acetylation of the histone H3 at the regulatory region of OsDREB1b promoter facilitates chromatin remodeling and transcription activation during cold stress. *PLoS One* 9 (6), e100343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100343>.
- Walker, G., Wilson, M., Powell, D., Butyrate, Oh Y., 2001. A histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 in breast cancer cells: molecular mechanism involves Sp1/Sp3 multiprotein complex. *Endocrinology* 142 (9), 3817–3827. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8380>.
- Kuan, C., See Too, W., Few, L., 2016. Sp1 and Sp3 are transcription activators of the human ckl1 promoter in TSA-treated human colon carcinoma cells. *PLoS One* 11 (1), e0147886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147886>.
- Breaux, M., Lewis, K., Valanejad, L., et al., 2015. p300 regulates liver functions by controlling p53 and C/EBP family proteins through multiple signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* 35 (17), 3005–3016. <https://doi.org/10.1128/MCB.00421-15>.
- Crump, N., Hazzalin, C., Bowers, E., Alani, R., Cole, P., Mahadevan, L., 2011. Dynamic acetylation of all lysine-4 trimethylated histone H3 is evolutionary conserved and mediated by p300/CBP. *PNAS* 108 (19), 7814–7819. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100099108>.
- Stasevich, T., Hayashi-Takanaka, Y., Sato, Y., et al., 2014. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature* 516, 272–275. <https://doi.org/10.1038/nature13714>.
- Gates, L.A., Shi, J., Rohira, A.D., et al., 2017. Acetylation of histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *J. Biol. Chem.* 292 (35), 14456–14472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802974>.
- Amaya, M., Nathanson, M., 2013. Calcium signaling in the liver. *Compr. Physiol.* 3 (1), 515–539. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120013>.