

## ZÁRÓJELENTÉS – T 046814 (2004-2008)

## ZÁRÓJELENTÉS – T 046814 (2004-2008)

Sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisában és  $\text{Ca}^{2+}$  szignalizációjában, ezen keresztül pedig a különböző sejtélettani folyamatokban fontos szerepet töltenek be azok a  $\text{Ca}^{2+}$ -transzport fehérjék, -szarko/endoplazmás retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ ATPázok (SERCA) és plazmamembrán  $\text{Ca}^{2+}$ ATPázok (PMCA), - melyek célpontjait képezték a 2004-2008 között folyó, és az OTKA támogatását is élvező kutatásainknak. Munkánk alapvetően két téma köré koncentrált, és zárójelentésünket is ennek szellemében állítottuk össze.

### 1. A SERCA3 fehérjék szerkezet-elemzése.

A kutatási munkatervben foglaltaknak megfelelően a 2004-2008 közötti időszakban vizsgáltuk a SERCA családban még kevésbé tanulmányozott, de a nem-izom típusú sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -transzport fehérjéi között fontos szerepet játszó SERCA3 fehérjét, azok szerkezeti sajátosságait.

#### Irodalmi és kísérleti előzmények:

Az évezred fordulóján a C. Toyoshima vezette japán kutatócsoport részletes röntgen-krisztallográfiai adatokat közölt a SERCA családban legrégebben és legkiterjedtebben vizsgált SERCA1a fehérjéről (1,2). Leírták a fehérje korábbi ismereteinknél pontosabb domén-szerkezetét és annak átrendeződését a P-típusú ATPázok működését jellemző ún. katalitikus ciklus két konformációs állapotában, a nagy  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitású  $E1.2\text{Ca}^{2+}$  és az alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitású  $E2$ -Thapsigargin ( $E2$ -Tg) állapotokban. Ezt követően a SERCA1a fehérje további konformációs állapotairól is jelentek meg röntgen-krisztallográfiai adatok (3,4). Megjegyzendő azonban, hogy egy adott fehérje kristályosítására használt körülmények lényegesen eltérnek a normál fiziológiai állapotoktól.

A SERCA családban utoljára azonosított és jellemzett SERCA3 fehérjéről nem álltak rendelkezésre kristályszerkezeti adatok. Ugyanakkor, elsőként a SERCA3a, majd később a további SERCA3 izoformák (3b-3f) funkcionális vizsgálatai is azt mutatták, hogy e fehérjék  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitása szignifikánsan alacsonyabb, mint a SERCA1a, -2a és -2b izoformáké (5-7). Magyarozatként szolgálhat a SERCA3 fehérjék katalitikus ciklusának a SERCA1, SERCA2 fehérjékétől eltérő egyensúlyi állapota, azaz például az alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitású  $E2$  konformációs állapot túlsúlya.

A témavezető és francia kollégái egy korábbi tanulmányukban két egymástól eltérő tripszines fragmentációs profilt rendeltek egy 97 kDa molekulatömegű, de akkor még nem azonosított SERCA fehérjéhez (8). Későbbi munkák igazolták, hogy ez a 97 kDa membránfehérje a SERCA3a izoforma (9,10).

#### Eredmények:

Jelen projekt keretében próbáltunk magyarázatot találni a SERCA3a fehérje, és potenciálisan a többi SERCA3 izoforma (3b-3f), korábban leírt, rendhagyó emésztődési profiljára. Vad típusú és mutáns SERCA3 fehérjét tranziens transzfekciót követően HEK-293 sejtekben expresszáltunk, majd mikroszómális membránpreparátumokban elemeztük tripszinnel kiváltott degradációjukat. Vizsgálatainkat kiegészítettük humán trombocita membránpreparátumok limitált tripszin-proteolízisének analizisével is, tudván, hogy trombocitákban magas az endogén SERCA3 expresszió (9,10). Hasonló módszereket használva más kutatócsoportok sikerrel elemezték a SERCA1a fehérje szerkezet/funkció kapcsolatát (11-13). Eredményeinket (**10. sz. közlemény**) az alábbiakban összegezzük:

1. Humán trombocita SERCA3a, illetve HEK-293 sejtekben expresszált rekombináns humán SERCA3a limitált tripszines emésztése két, kinetikailag elválasztható, korai

(ETF = Early Tryptic Fragmentation) és későbbi (LTF = Late Tryptic Fragmentation) tripszines fragmentációs profilt eredményezett.

2. Az ETF profil több tripszines hasítási helyen, míg az LTF profil csak egy tripszines hasítási helyen történő proteolitikus emésztés eredménye.
3. Irányított mutagenezissel sikerrel azonosítottunk több tripszines hasítási helyet. Így, az Arg334 (T3) és Arg638 (T2) hasítási helyeket az ETF profilhoz, míg az Arg198 (T5) hasítási helyet az LTF profilhoz rendeltük. A T1 és T4 hasítási helyekre kísérleteink alapján csak javaslatokat tudtunk tenni, pontos azonosításuk még nem sikerült.
4. Az Arg396, Arg671, Lys712/Lys713 és Lys728 aminosavak mutációi befolyásolták a SERCA3a ETF fragmentációs profilját.
5. A SERCA inhibitor thapsigargin (Tg) jelenléte, mely irodalmi adatok alapján *E2*-Tg állapotban stabilizálja a SERCA1a fehérjét (2), kis mértékben gátolta a SERCA3a ETF profil kialakulását, míg nem befolyásolta az LTF profilt.
6.  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA és  $\text{AlF}_4^-$  hatását vizsgálva SERCA3a tripszines hasítására azt tapasztaltuk, hogy 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  vagy 50  $\mu\text{M}$   $\text{AlF}_4^-$  jelenléte a proteolízis során jelentősen gátolta, míg 2 mM EGTA jelenléte segítette az ETF profil kialakulását.  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA vagy  $\text{AlF}_4^-$  jelenléte ugyanakkor nem befolyásolta az LTF profil kialakulását.
7. HEK-293 sejtekben expresszált rekombináns humán SERCA3b-SERCA3f izoformák limitált tripszines emésztése a SERCA3a-hoz hasonlóan két, ETF és LTF, tripszines fragmentációs profilt eredményezett.
8. SERCA3b-SERCA3e izoformák esetében azonosítottunk még egy tripszines hasítási helyet, a C-terminális Arg1002-t, mely hiányzik mind a SERCA3a, mind a SERCA3f izoformákban.

**Összefoglalva:** Endogén, valamint vad típusú és mutáns SERCA3 membránfehérjék limitált tripszines proteolízisét elemezve a fehérjék különböző régióit felismerő pan-SERCA3 és izoforma-specifikus anti-SERCA3 ellenanyagok kombinációjával kimutattuk két, kinetikailag elkülöníthető, de ugyanazon SERCA3 fehérjéhez rendelhető fragmentációs profil (ETF és LTF) párhuzamos megjelenését. Azonosítottunk néhány tripszines hasítási helyet, illetve további olyan aminosavakat, melyek befolyásolják az ETF és/vagy LTF profilok kialakulását. Azt gondoljuk, hogy natív membránkörnyezetben a SERCA3 fehérjék két fő konformációs állapotot vesznek fel, és a két tripszines fragmentációs profil e két konformációs állapothoz köthető: az ETF profil egy *E2*-közeli konformációhoz, míg az LTF profil inkább egy *E1*-közeli konformációhoz.

## 2. Nem-izom típusú sejtek $\text{Ca}^{2+}$ -transzport fehérje készletének változásai sejt differenciáció során.

A citoszol szabad  $\text{Ca}^{2+}$  ion tartalma kulcsfontosságú jelátviteli tényező a sejtek életében. A  $\text{Ca}^{2+}$  szignálutak központi szerepet játszanak a sejtproliferáció, differenciáció és az apoptózis folyamataiban, melyek egyensúlya nélkülözhetetlen a normál szöveti fejlődéshez illetve homeosztázishoz. E homeosztatis egyensúly megbomlása gyakran vezet malignus és/vagy degeneratív betegségek kialakulásához. Több kutatócsoport vizsgálta/vizsgálja a  $\text{Ca}^{2+}$  szignálutak elemeinek sejt differenciációban betöltött funkcióit (14-16). Egyre több irodalmi adat áll rendelkezésünkre arra vonatkozóan is, hogy egyes  $\text{Ca}^{2+}$  szignálutak miként vesznek részt tumorok kialakulásában és progressziójában (17-19). G.R. Monteith és mtsai egy figyelemre méltó összefoglaló tanulmányban elemzik, hogy mely  $\text{Ca}^{2+}$ -transzport fehérjék (csatorna-, pumpa- vagy cserefehérjék) lehetnek potenciális célpontok daganat terápiákban (20).

**Irodalmi és kísérleti előzmények:**

Korábbi kutatásainkban számos haematopoietikus eredetű sejtmodellben, továbbá a gyomor- és bélepitélium tumoraiból alapított sejtvonalakban sikerült kimutatnunk a SERCA fehérjék expressziójának változásait sejtaktiváció illetve sejt differenciáció során (21-23). E munkákat kicsit kibővítve és elemezve összefoglaló tanulmányt írtunk (**1. sz. közlemény**), melynek legfontosabb megállapításait az alábbiakban soroljuk fel:

1. Leukémia és különböző karcinoma sejtek SERCA fehérjekészletében lényeges változások következnek be sejt differenciáció során, melynek hatásaként jelentősen módosul az endoplazmás retikulum SERCA-függő  $Ca^{2+}$  felvétele.
2. Mivel az endoplazmás retikulum  $Ca^{2+}$  háztartása visszahat és befolyásolja a sejt differenciáció folyamatait, a SERCA izoformák expressziójának változásai, különösképpen a SERCA3 fehérjék expressziójának differenciáció során bekövetkező nagymértékű indukciója, számos leukémia és egyéb tumorsejt differenciációs programjának szerves részét képezik.
3. Az endoplazmás retikulum  $Ca^{2+}$  háztartása és a sejt differenciáció közötti párbeszéd alaposabb megismerése elősegítheti azon szignál-mechanizmusokban bekövetkező hibák jobb megértését, melyek kiváltják egyes malignus fenotípusok kialakulását, illetve hozzájárulnak azok fennmaradásához.
4. Mind leukémia és karcinoma sejtvonalakon végzett kísérleteink, mind normál és daganatos szöveti metszeteken végzett immunhisztokémiai vizsgálataink alapján javasoljuk, hogy a SERCA3 fehérjék hasznos új differenciációs markerekként szolgálhatnak, s ezáltal segíthetik egyes malignus elváltozások fenotípusának és lehetséges prognózisának meghatározását.

**Eredmények:**

*2.1. A gyomor és béltraktus jóindulatú, továbbá daganatos elváltozásaiból nyert szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata (4. sz. közlemény).*

1. Normál bélepitélumban és egyes bélpolipokban a SERCA3 expresszió a kripták aljától felfelé haladva, a differenciáció fokával összhangban fokozódik.
2. Gyomor- és különböző stádiumú béltumorokból nyert szöveti metszeteken végzett immunhisztokémiai vizsgálataink szerint a SERCA3 expresszió defektusa már a tumorok kialakulásának korai szakaszában jelentkezik.

*2.2. Gyomor-/béltumorsejtek differenciációja és a SERCA család fehérjeinek expressziója, funkciója közötti összefüggések vizsgálata (4. sz. közlemény).*

1. A SERCA fehérjék funkciójának, így az endoplazmás retikulumba történő  $Ca^{2+}$  akkumulációnak a gátlása elősegíti egyes béltumorsejtek differenciációját.
2. A béltumorok kialakulásában fontos APC/ $\beta$ -katenin/TCF4 jelátviteli út gátlása fokozott SERCA3 expresszióhoz vezet.
3. Az Sp1 transzkripciós faktornak szerepe van a gyomor-/béltumorsejtek differenciációját kísérő markáns SERCA3 expresszió fokozódásban.

*2.3. Plazmamembránban lokalizálódó PMCA transzportfehérjék és a sejt differenciáció összefüggéseinek vizsgálata gyomor- és béltumorsejtekben.*

Eredményeinkről részben konferenciákon számoltunk be poszter formájában (lásd: Szakmai részjelentések), illetve azok egy részét a *Cell Calcium* folyóiratban tettük közzé (**8. sz. közlemény**), és az alábbiakban összegezzük:

1. Elemeztük a PMCA pumpafehérjék expressziós mintázatát nem, vagy csak kevésbé differenciálódott malignus gyomor/bél epiteliális sejtvonalakban. Valamennyi

sejtvonalban a PMCA1b *“housekeeping”* izoforma expressziója dominált, míg a PMCA4b variáns csak jóval alacsonyabb szinten fejeződött ki.

2. Rövid szénláncú zsírsavakkal (pl. nátrium-valerát, nátrium -butirát) vagy más hisztonezacetiláz gátlószerekkel (pl. trichostatin A) kiváltott sejt differenciáció a tumorsejtekben gátolt expressziójú PMCA4b expressziójának jelentős fokozódását idézte elő mind fehérje, mind mRNS szinten. A *“housekeeping”* PMCA1b expressziója, sejtvonaltól és a differenciáció indukció módjától függően nem, vagy csak kismértékben változott. A differenciáció tényét ismert markerfehérjékkel (karcinoembrionális antigén (CEA) és dipeptidyl-peptidáz IV (DPP IV)) bizonyítottuk modelljeinkben. Valamennyi sejtmodellünkben követtük a szintén plazmamembránban lokalizálódó  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz expresszióját is, mely nem változott számottevően.
3. Kimutattuk, hogy a PMCA4b expresszió rövid szénláncú zsírsavakkal előidézett növekedését nem a sejtosztódás gátlása, hanem a differenciáció indukció váltotta ki.
4. A PMCA pumpák expressziós mintázatának változásait analizáltuk Caco-2 adenokarcinoma sejtek poszt-konfluens sejt kultúrában spontán módon végbemenő differenciációja során is. Az éretlen sejtekben alig kifejeződő PMCA4b izoforma expressziója erősen indukálódott a sejtek érése során, mind mRNS, mind fehérje szinten. A *“housekeeping”* PMCA1b expressziója csak kisebb mértékben fokozódott.
5. Mikroszómális membránpreparátumokon végzett PMCA-specifikus vezikuláris  $\text{Ca}^{2+}$ -transzport méréseink a differenciálódott sejtek PMCA pumpáinak aktivitás fokozódását mutatták, igazolva a PMCA expresszió növekedésének funkcionális következményét.

**Összefoglalva:** Eredményeink azt mutatják, hogy tumorsejtek differenciációja során jelentősen átrendeződik nem csak a SERCA, de a PMCA fehérjék expressziós mintázata is. Mivel irodalmi adatokból jól ismert a különböző SERCA és PMCA izoformák eltérő enzimatis/funkcionális viselkedése (5-7,24,25), expressziójuk sejt differenciáció során észlelt változásai feltehetően szerves részét képezik az érési folyamatot kísérő sejtéletteni változásoknak.

#### 2.4. $\text{Ca}^{2+}$ ATPázok és a sejt differenciáció összefüggéseinek vizsgálata az eddigiektől eltérő differenciációs modellekben.

1. Elemeztük a SERCA és PMCA pumpafehérjék expressziós mintázatát további enterocita, kehelysejt, és kevert fenotípusú malignus bélepitél sejtvonalakban. A vizsgált sejtvonalakban a SERCA2b és PMCA1b *“housekeeping”* izoformák expressziója dominált, míg a SERCA3 és PMCA4b variánsok csak jóval alacsonyabb szinten fejeződtek ki.
2. A SERCA és PMCA pumpák expressziós mintázatának változásait analizáltuk több enterocita fenotípusú (Caco-2, DLD-1, HT29-5M12), bizonyítottan kehelysejt fenotípusú (HT29-5M21) és kevert fenotípusú (HT-29) adenokarcinoma sejtek poszt-konfluens sejt kultúrában spontán módon végbemenő differenciációja során. Az éretlen sejtekben alig vagy alacsony szinten kifejeződő SERCA3 és PMCA4b izoformák expressziója erősen indukálódott a sejtek érése során. A *“housekeeping”* SERCA2b és PMCA1b expressziója csak kisebb mértékben fokozódott vagy nem változott a differenciációs modellekben. A differenciáció tényét valamennyi sejt vonal esetében irodalomból ismert markerfehérjékkel (CEA, dipeptidil-peptidáz IV, E-kadherin, stb.) bizonyítottuk.
3. Elemeztük a SERCA és PMCA pumpafehérjék expressziós mintázatának, valamint több differenciációs markerfehérje expressziójának változásait enterocita fenotípusú (Caco-2, DLD-1) béltumorsejtek  $\text{D}_3$ -vitamin jelenlétében történő differenciációja

során, a poszt-konfluencia különböző fázisaiban. A D<sub>3</sub>-vitamin a Ca<sup>2+</sup> pumpafehérjék közül kizárólag a PMCA1b expresszióját fokozta (2-4-szeres indukció). A SERCA3 és PMCA4b variánsok, valamint több differenciációs marker konfluencia okozta sejt differenciáció során bekövetkező expresszió fokozódását D<sub>3</sub>-vitamin jelenléte nem befolyásolta. Mindez arra enged következtetni, hogy i) bár a D<sub>3</sub>-vitamin több sejt típus esetében gátolja a sejtosztódást és indukálja a sejtek érését (26,27), vizsgált tumormodelljeinkben számottevően nem befolyásolta a legtöbb differenciációs marker expresszióját; ii) a bélepitélium Ca<sup>2+</sup> felvételében, melyre a D<sub>3</sub>-vitamin serkentőleg hat (28,29), a Ca<sup>2+</sup> pumpafehérjék közül a “housekeeping” PMCA1b játszhat kitüntetett szerepet.

4. Végezetül, elkezdtük a Ca<sup>2+</sup> pumpafehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálatát immunfluoreszcens festést követő konfokális lézerpásztázó mikroszkópiával. Jól differenciált, polarizált Caco-2 enterocita fenotípusú sejtekben vizsgáltuk a PMCA fehérjék membránlokalizációját. Mind a “housekeeping” PMCA1b, mind a differenciált sejtekben jól detektálhatóan expresszálódó PMCA4b a sejtek bazolaterális plazmamembránjában található, míg az apikális régiókban nem láttunk PMCA pumpát. D<sub>3</sub>-vitamin kezelés nem befolyásolta a PMCA pumpafehérjék membránlokalizációját, de a PMCA1b izoforma expressziójára gyakorolt serkentő hatása evvel a módszerrel is egyértelműen igazolható volt.

A SERCA izoformák sejten belüli lokalizációjának tanulmányozása folyamatban van egyes tumorsejt modellekben. Szintén további vizsgálatokra lesz szükség annak kiderítéséhez, hogy a Ca<sup>2+</sup> pumpafehérjék sejten belüli megjelenése változik-e és hogyan a tumorsejtek érése folyamán. Ugyancsak elkezdtük PMCA és SERCA fehérjék expressziójának/lokalizációjának vizsgálatát normál bélepitéliumból, valamint bél adenokarcinómákból nyert szöveti metszeteken lézerpásztázó konfokális mikroszkóp segítségével. A módszer beállítása azonban a tervezettnél hosszabb időt fog igényelni.

(Megjegyzés: Itt összefoglalt eredményeink egy részét 2007-ben egy hazai konferencián poszter formájában már bemutattuk (7. sz. közlemény), illetve alapját képezik egy készülő folyóiratcikkeknek.)

**Összefoglalva:** Ez utóbbi eredményeink tovább erősítik korábbi megfigyeléseinket, miszerint tumorsejtek differenciációja során jelentősen átrendeződik a SERCA és PMCA fehérjék expressziós mintázata, mely változások bizonyára szerves részét képezik az érési folyamatnak. Eredményeink alapján felvetjük annak lehetőségét, hogy a gyomor-/béltraktusban egyes Ca<sup>2+</sup> transzporterek, mint markerfehérjék segíthetik malignus elváltozások fenotípusának meghatározását, azaz diagnosztikai fejlesztések potenciális célpontjai lehetnek. Megfigyeléseink tovább pontosítják a PMCA pumpáknak a bélepitélium Ca<sup>2+</sup> felszívásában betöltött szerepéről alkotott elképzeléseket is.

### 3. Új kvantitatív PCR módszer (*external cell control PCR*) kidolgozása.

Differenciációs modelljeinkben a Ca<sup>2+</sup>-transzport fehérjék valamint a különböző differenciációs markerek génexpressziójának változásait gyakran követjük mRNS szinten, kvantitatív RT-PCR analízissel, LightCycler kapilláris PCR készülék segítségével. A módszer során a vizsgált célgénekre specifikus PCR termékek mennyiségi változásait fluoreszcens DNS-jelölési technikával detektáljuk minden egyes PCR ciklusban és meghatározzuk azt a ciklusszámot (Cp: *crossing point*), amelynél a PCR termék mennyisége átlépi a detekciós küszöböt. Az RNS preparálás és a reverz transzkripció különbségek kiküszöbölésére azonos módszerrel mérjük a sejtekben egyes ún. referencia gének mRNS-einek mennyiségét is. A

módszer megbízhatóságát azonban megkérdőjelezhetik a használt referencia gének transzkripció szintjének esetleges változásai.

Dr. Tordai Attila csoportjával (Országos Vértranszfúziós Szolgálat), továbbá Dr. Várad Andrással és Dr. Arányi Tamással (MTA Enzimológiai Intézet) együttműködve e technikai probléma áthidalására alkalmas módszert állítottunk be (*eccPCR: external cell control PCR*), mely alapját képezte két benyújtott szabadalomnak is (**5-6. sz. közlemények**). A módszer lényegét az *Analytical Biochemistry* folyóiratban (**9. sz. közlemény**) ismertettük és az alábbiakban foglaljuk össze:

1. A vizsgálandó sejtekhez alkalmasan megválasztott ún. kontroll sejteket keverünk ismert arányokban az RNS preparálást és az azt követő kvantitatív RT-PCR-t megelőzően.
2. A kontroll sejtek és a vizsgálandó referencia gének kiválasztásánál ügyelünk arra, hogy a referencia gének csak a kontroll sejtekben, míg a vizsgálandó célgének csak a vizsgálandó sejtekben fejeződjenek ki.
3. A kvantitatív RT-PCR-t követően a célgének változásait mindenkor a csak kontroll sejtekben kifejeződő referencia génekre normálva értékeljük.
4. A módszert mind szuszpenziós (pl. KATO-III gyomor tumorsejtek), mind adherens (pl. DLD-1 bél tumorsejtek) sejt kultúrákra beállítottuk. Kontroll sejt-ként emlős vagy *Drosophila* sejteket is kipróbáltunk.
5. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az *eccPCR*-módszer alkalmas a célgének expressziójában bekövetkező kisebb (akár 1,5-szeres) változások megbízható értékelésére is szemben az irodalomból eddig ismert klasszikus kvantitatív RT-PCR módszerekkel.

**Összefoglalva:** Az *eccPCR*-módszer a későbbiekben alkalmas lehet differenciáció indukció hatására a  $Ca^{2+}$ -transzport fehérjék valamint a különböző differenciációs markerek génexpressziójában bekövetkező változások követésére és értékelésére.

A témavezető 1991-1993 között a franciaországi INSERM Poste Verte ösztöndíjasaként, majd azt követően idehaza, de Dr. J. Enouf párizsi munkacsoportjával szoros együttműködésben, részt vett nem-izom típusú sejtek SERCA-transzporter készletének – elsősorban a SERCA3 izoformák - feltérképezésében. A SERCA3 gén 3f “splice-variánsát” bemutató eredményeink ugyan a most lezárult OTKA projekt futamideje alatt jelentek meg (7), de erről a munkáról a témavezető részletesen beszámolt előző OTKA pályázatának (T 032766, 2000-2003) zárójelentésében. Jelen kutatási periódusban két, a  $Ca^{2+}$ ATPázokat elemző összefoglaló tanulmányt írtunk Dr. J. Enouf vezetésével (**2-3. sz. közlemények**), melyekben a témavezető aktívan közreműködött.

**Referenciák:**

1. C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura, H. Ogawa, Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution, *Nature* 405 (2000) 647-655.
2. C. Toyoshima, H. Nomura, Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium, *Nature* 418 (2002) 605-611.
3. C. Toyoshima, T. Mizutani, Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue, *Nature* 430 (2004) 529-535.
4. C. Olesen, M. Picard, A.M. Winther, C. Gyruup, J.P. Morth, C. Oxvig, J.V. Moller, P. Nissen, The structural basis of calcium transport by the calcium pump, *Nature* 450 (2007) 1036-1042.
5. J. Lytton, M. Westlin, S.E. Burk, G.E. Shull, D.H. MacLennan, Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 14483-14489.
6. V. Martin, R. Bredoux, E. Corvazier, R. van Gorp, T. Kovács, P. Gélébart, J. Enouf, Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase (SERCA) 3 isoforms, Expression, regulation and function of the members of the SERCA3 family, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 24442-24452.
7. R. Bobe, R. Bredoux, E. Corvazier, J.P. Andersen, J.D. Clausen, L. Dode, T. Kovács, J. Enouf, Identification, expression, function and localization of a novel (sixth) isoform of the human Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase 3 (SERCA3) gene, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24297-24306.
8. T. Kovács, E. Corvazier, B. Papp, C. Magnier, R. Bredoux, A. Enyedi, B. Sarkadi, J. Enouf, Controlled proteolysis of Ca<sup>2+</sup>-ATPases in human platelet and non-muscle cell membrane vesicles. Evidence for a multi-sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase system, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 6177-6184.
9. F. Wuytack, B. Papp, H. Verboomen, L. Raeymaekers, L. Dode, R. Bobe, J. Enouf, S. Bokkala, K.S. Authi, R. Casteels, A sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase 3-type Ca<sup>2+</sup> pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1410-1416.
10. T. Kovács, F. Felföldi, B. Papp, K. Paszty, R. Bredoux, A. Enyedi, J. Enouf, All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase 3 gene are translated to proteins. A study of their co-expression in platelets and lymphoid cells, *Biochem. J.* 358 (2001) 559-568.
11. S. Danko, T. Daiho, K. Yamasaki, M. Kamidochi, H. Suzuki, C. Toyoshima, ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin, *FEBS Lett.* 489 (2001) 277-282.
12. S. Danko, K. Yamasaki, T. Daiho, H. Suzuki, C. Toyoshima, Organization of cytoplasmic domains of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in E(1)P and E(1)ATP states: a limited proteolysis study, *FEBS Lett.* 505 (2001) 129-135.
13. G. Inesi, D. Lewis, C. Toyoshima, A. Hirata, L. de Meis, Conformational fluctuations of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the native membrane environment: Effects of pH, temperature, catalytic substrates, and thapsigargin, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 1189-1196.
14. A. Schaefer, M. Magocsi, U. Stocker, F. Kosa, H. Marquardt, Early transient suppression of c-myc mRNA levels and induction of differentiation in Friend erythroleukemia cells by the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-increasing agents cyclopiazonic acid and thapsigargin, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 8786-8791.
15. S. Launay, M. Gianni, L. Diomedea, L. M. Machesky, J. Enouf, B. Papp, Enhancement of ATRA-induced cell differentiation by inhibition of calcium accumulation into the endoplasmic reticulum: cross-talk between RAR alpha and calcium-dependent signaling, *Blood.* 101 (2003) 3220-3228.
16. M. Zayzafoon, Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation, *J. Cell Biochem.* 97 (2006) 56-70.
17. P. Kirchoff, J. P. Geibel, Role of calcium and other trace elements in the gastrointestinal physiology, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 3229-3236.
18. A. Apati, J. Janossy, A. Brozik, P. I. Bauer, M. Magocsi, Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9235-9243.
19. K. Vanoverberghe, F. Vanden Abeele, P. Mariot, et al., Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 321-330.

20. G.R. Monteith, D. McAndrew, H.M. Faddy, S.J. Roberts-Thomson, Calcium and cancer: targeting  $\text{Ca}^{2+}$  transport, *Nat. Rev. Cancer*. 7(7) (2007) 519-30.
21. S. Launay, M. Gianni, T. Kovács, R. Bredoux, A. Bruel, P. Gélébart, F. Zassadowski, C. Chomienne, J. Enouf, B. Papp, Lineage-specific modulation of calcium pump expression during myeloid differentiation, *Blood* 93 (1999) 4395-4405.
22. C. Lacabartz-Porret, S. Launay, E. Corvazier, R. Bredoux, B. Papp, J. Enouf, Biogenesis of endoplasmic reticulum proteins involved in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling during megakaryocytic differentiation: an in vitro study, *Biochem. J.* 350 (2000) 723-734.
23. P. Gélébart, T. Kovács, J.P. Brouland, R. van Gorp, J. Grossmann, N. Rivard, Y. Panis, V. Martin, R. Bredoux, J. Enouf, B. Papp, Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26310-26320.
24. E. E. Strehler, M. Treiman, Calcium pumps of plasma membrane and cell interior, *Curr Mol Med.* 4 (2004) 323-335.
25. E.E. Strehler, A.G. Filoteo, J.T. Penniston, A.J. Caride, Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pumps: structural diversity as basis for functional versatility, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 919–922.
26. H.G. Pálmer, M. Sánchez-Carbayo, P. Ordóñez-Morán, M.J. Larriba, C. Cerdón-Cardó, A. Muñoz, Genetic signatures of differentiation induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells, *Cancer Res.* 63 (2003) 7799-7806.
27. K.K. Deeb, D.L. Trump, C.S. Johnson, Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics, *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 684-700.
28. A.J. Brown, J. Finch, E. Slatopolsky, Differential effects of 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on intestinal calcium and phosphate transport, *J. Lab. Clin. Med.* 139 (2002) 279-284.
29. A.J. Brown, E. Slatopolsky, Vitamin D analogs: therapeutic applications and mechanisms for selectivity, *Mol. Aspects Med.* 29 (2008) 433-452.